Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Filogenia molecular e delimitação de espécies no gênero *Brasiliorchis* (MAXILLARIINAE, ORCHIDACEAE)

Mariana Novello

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2013

Mariana Novello
Licenciada em Ciências Biológicas

Filogenia molecular e delimitação de espécies no gênero *Brasiliorchis* (MAXILLARIINAE, ORCHIDACEAE)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra.**ELIZABETH ANN VEASEY**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Novello, Mariana
Filogenia molecular e delimitação de espécies no gênero *Brasiliorchis* (MAXILLARIINAE, ORCHIDACEAE) / Mariana Novello.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
96 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. *Brasiliorchis* 2. Filogenia 3. ITS 4. cpDNA 5. Orchidaceae I. Título

CDD 635.93415
N939f

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico,

Aos meus pais Odair e Cecilia e a minha irmã,

por todo apoio e amor.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Profa. Dra. Elizabeth Ann Veasey, pela oportunidade e pela confiança em mim depositada, pelos seus ensinamentos e dedicação,sou grata por todo seu apoio durante esses dois anos.

À Profa. Dra. Samantha Koehler, pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua supervisão. Por todo apoio, dedicação, paciênciae por tudo que aprendi durante esses anos, sou muito grata por tudo.

Agradeço a todos os professores e funcionários da universidade, em especial do Departamento de Genética por toda colaboração e suporte oferecido, em especial nas viagens de coleta, pela disponibilização de carro e motorista.

Ao Orquidário ‘Prof. Paulo Sodero Martins’ do Departamento de Genética pela disponibilidade do material utilizado no trabalho e também ao funcionário Josué Pontes pelo auxílio durante a coleta do material.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado, assim como aos projetos que proporcionaram de alguma forma apoio financeiro para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Orquidário ‘Dr. Frederico Carlos Hoehne’ do Instituto de Botânica de São Paulo (IBOT), pela concessão do material coletado utilizado na pesquisa. Agradeço em especial ao Dr. Eduardo Luis Martins Catharino.

Agradeço a minha família, em especial a meus pais e minha irmã por todo apoio, amor e dedicação, sem eles a realização desse trabalho seria muito mais difícil.

Ao meu namorado, por todo seu amor e apoio, em especial na fase final da dissertação.

Em especial quero agradecer a todos meus amigos e companheiros de laboratório, por estarem presentes em todos os momentos, bons e ruins, pelas conversas, desabafose acima de tudo pela amizade de todos.

Agradeço a todos que, de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

“Existem apenas duas maneiras de ver a vida. Uma é pensar que não existem milagres e a outra é que tudo é um milagre.”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

RESUMO.....11
ABSTRACT 13
LISTA DE FIGURAS 15
LISTA DE TABELAS 17
1 INTRODUÇÃO 19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 23
2.1 Sistema de estudo.....23
2.1.1 Família Orchidaceae 23
2.1.2 Subtribo Maxillariinae 23
2.1.3 Gênero *Brasiliorchis* 25
2.2 Métodos para delimitação de espécies 30
2.3 Métodos filogenéticos.....31
2.3.1Inferência Bayesiana (IB) 32
2.3.2Método de Máxima Parcimônia (MP) 34
2.4 Seleção de modelos de evolução.....36
3MATERIAL E MÉTODOS 39
3.1 Material vegetal 39
3.2 Extração de DNA.....44
3.3 Seleção dos marcadores 44
3.4Amplificação e sequenciamento.....46
3.5Análises de dados 48
3.5.1 Edição e alinhamento das sequências 48
3.5.2 Análises filogenéticas.....48
4 RESULTADOS 51
4.1Caracterizações das regiões estudadas.....51
4.2Análises filogenéticas.....52
4.2.1 Cloroplasto 52
4.2.2 ITS.....57
4.2.3 Dados concatenados das regiões ITS e cloroplasto.....61
5 DISCUSSÃO 65
6 CONCLUSÕES 73

REFERÊNCIAS 75
ANEXOS 83

RESUMO

Filogenia molecular e delimitação de espécies no gênero *Brasiliorchis* (MAXILLARIINAE, ORCHIDACEAE)

O gênero *Brasiliorchis* inclui atualmente 14 espécies de orquídeas restritas ao bioma Mata Atlântica, ocorrendo desde Misiones, Argentina, até o Estado da Bahia, na região nordeste do Brasil.Embora estas espécies tenham sido tradicionalmente reconhecidas pelos seus caracteres vegetativos e principalmente florais, elas são morfologicamente muito similares e apresentam caracteres diagnósticos contínuos,assim, ousoexclusivo da morfologiapode não ser útil para identificação das espéciesneste grupo de orquídeas. Um estudo morfométrico anteriormente realizado com seis espécies deste gênero não conseguiu identificar agrupamentos claros. Amaioria dos caracteres analisados apresentou sobreposição entre diferentes espécies, sendo que apenas a espécie *B. gracilis*se mostrou distinta das demais. O objetivo desse estudo foi contribuir para aidentificação de linhagens evolutivamente distintas dentro do gênero e avaliar se os padrões filogenéticos de diversificação corroboram com o estudo morfométrico anteriormente realizado.Foram utilizados dados de sequências de plastídios (*psbj-petA, atpl-atpH)*e nucleares (ITS1-2) considerandoampla variação geográfica e morfológica observada no grupo. Foram amostrados 96 indivíduos,originados de 37 localidades de ocorrência no Brasil, incluindo 11 espéciesdo gênero. Análises de máxima parcimônia e bayesiana foram realizadas considerando os dados separadamente e concatenados.Os resultados suportam *B. schunkeana* como irmã de todas as outras espécies do gênero. *B. barbozae*foi reconhecida como um grupo monofilético distinto, corroborando com os caracteres morfológicos diagnósticos desta espécie, e possivelmente irmão das espécies do complexo *B. picta*.A espécie *B. gracilis* não foi reconhecida como um grupo monofilético, não corroborando com o estudo de morfometria, na qual essa espécie se apresentou distinta das outras do complexo. Contudo, nas análises concatenadas alguns indivíduos apresentaram-se como irmãos das espécies do complexo *B. picta*. As espécies morfologicamente homogêneas pertencentes ao complexo *B. picta* (*B. chrysantha*, *B. marginata*, *B. porphyrostele*, *B. ubatubana, B. phoenicanthera* e *B. picta*) não formaram clados monofiléticos distintos. *B. kautskyi* e *B. consanguinea*, as quais são morfologicamente distintas, foram incluídas nos clados constituídos pelas espécies do complexo *B. picta*.Eventos de introgressão e hibridação podem ser potenciais causas da insuficiente resolução das árvores filogenéticas obtidas nesse estudo. Os padrões observados também sugerem que a separação das linhagens pode ter ocorrido recentemente e/ou rapidamente. Marcadores adicionais e análises de árvores de espécies podem ajudar a esclarecer os padrões de diversificação neste grupo.

Palavras-chave: *Brasiliorchis*; Filogenia; ITS; cpDNA; Orchidaceae

ABSTRACT

Molecular phylogeny and species delimitation in the genus *Brasiliorchis* (MAXILLARIINAE, ORCHIDACEAE)

The genus *Brasiliorchis* currently includes 14 species of orchids occurring mainly in the Atlantic Forest Biome, from Misiones, Argentina, to the stateof Bahia, in northeastern Brazil. Although these species have been traditionally recognized by vegetative andmainly floral traits, they are morphologically very similar and display continuouscharacters, thus the exclusive use of the morphologycannot be useful for species identificationin this group of orchids. A morphometric study previously conducted with six species of this genus could not identify clear groupings. The majority of analyzed characters showed overlap between different species, with only the species *B. gracilis*being distinct from the others. The goals of this study were to contribute to the identification of evolutionary distinct lineages within the genus and assess if the phylogenetic patterns of diversification agree with a previous morphometric study available. Sequence data from plastid (*psbj-petA, atpl-atpH)* and nuclear (ITS1-2)regions were used considering wide morphological and geographical sampling variation. We sampled 96 individuals, originated from 37 sites of occurrence in Brazil, including 11 species of the genus. Bayesian and parsimony analyses were performed considering data separately and concatenated. The results support *B. schunkeana* as sister to all other species of the genus. *B. barbozae*wasrecognized as a monophyletic group,corroborating with morphological diagnostic characters of this species,and possibly sisters of the complex species *B. picta*.The species *B. gracilis* was not recognized as a monophyletic group, not agreeing with the morphometry study, which showed this species as being distinct from the other species in the complex. However, in the concatenated analysis, some individuals presented themselves as sisters of the species complex *B. picta*. The morphologically homogeneous species belonging to the *B. picta* complex (*B. chrysantha*, *B. marginata*, *B. porphyrostele*, *B. ubatubana, B. phoenicanthera* e *B. picta*) did not form distinct monophyletic clades. *B. kautskyi* and *B. consanguinea*, which are morphologically clearly distinct, are embedded in clades consisting of the *B. picta*species complex.Hybridization and introgression events may be potential causes of insufficient resolution of phylogenetic trees obtained in this study. The observed patterns also suggest that the separation of the lineage may have occurred recently and/or quickly.Additional markers and species tree analyses may help clarify diversification patterns in this group.

Keywords:*Brasiliorchis*; Phylogeny; ITS; cpDNA; Orchidaceae

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resumo das relações filogenéticas dentro da subtribo Maxillariinae, baseado em quatro regiões de DNA representando os clados bem suportados (A – Q) proposto no estudo de Whitten et al. (2007) 24

Figura 2 - Árvore filogenética da subtribo Maxillariinae com análises de nrITS, *matK+trnK*, espaçador *atpB-rbcL* e dados de seqüenciamento de drpoC1, mostrando o clado bem suportado representando espécimes do gênero *Brasiliorchis* (adaptado de WHITTEN et al., 2007) 25

Figura 3 -Mapa da distribuição geográfica do gênero *Brasiliorchis* no Brasil (Fonte:Flora do Brasil, 2013)..... 26

Figura 4 - Morfologia do gênero *Brasiliorchis* (adaptado de SINGER; KOEHLER; CARNEVALI, 2007)..... 27

Figura 5 -Representantes do gênero *Brasiliorchis*. (A) *B. picta*, (B) *B. gracilis*, (C) *B. phoenicanthera*, (D) *B. barbozae*, (E) *B. marginata*, (F) *B. ubatubana*, (G) *B. consanguinea*, (H) *B. porphyrostele*, (I) *B. schunkeana*..... 29

Figura 6 - Populações de espécies pertencentesao gênero *Brasiliorchis* consideradas neste estudo 43

Figura 7 - Resultado da reação de amplificação da região não codificadora de cloroplasto *atpL-atpH*. A última canaleta corresponde ao marcador Low Mass DNA ladder..... 47

Figura 8 - Árvore bayesiana dos dados combinados das duas regiões de plastídios *psbj-petA* e *atpl-atpH* obtidas com o alinhamento Muscle. Valores de probabilidade posterior são mostrados acima dos ramos. Os nomes das amostras indicam a região de coleta seguida pelo número de registro de acordo com a Tabela 2..... 54

Figura 9 - Uma das árvores mais parcimoniosas obtidas da análise de máxima parcimônia com os dados combinados das duas regiões de plastídios *psbj-petA* e *atpl-atpH* com o alinhamento Muscle. Valores de *bootstrap* são mostrados acima dos ramos. Os nomes das amostras indicam a região de coleta seguida pelo número de registro de acordo com a Tabela 2..... 56

Figura 10 - Árvore bayesiana com o conjunto de dados de ITS obtidos com o alinhamento Muscle. Valores de probabilidade posterior são mostrados acima dos ramos. Os nomes das amostras indicam a região de coleta seguida pelo número de registro de acordo com a Tabela 2 58

Figura 11 - Uma das árvores mais parcimoniosas obtida da análise de máxima parcimônia a partir do conjunto de dados de ITS com o alinhamento Muscle. Valores de *bootstrap* são mostrados acima dos ramos. Os nomes das amostras indicam a região de coleta seguida pelo número de registro de acordo com a Tabela 2..... 60

Figura 12 -Árvore bayesiana com o conjunto de dados concatenados da região nuclear e de plastídios. Valores de probabilidade posterior são mostrados acima dos ramos. Os nomes das amostras indicam a região de coleta seguida pelo número de registro de acordo com a Tabela 2 62

Figura 13 -Uma das árvores mais parcimoniosas obtidas com o conjunto de dados concatenados da região nuclear e de plastídios. Valores de *bootstrap* são mostrados acima dos ramos. Os nomes das amostras indicam a região de coleta seguida pelo número de registro de acordo com a Tabela 2..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das 14 espécies atualmente reconhecidas para o gênero *Brasiliorchis*de acordo com Barros et al. (2013).....26

Tabela 2 - Lista de espécimes utilizados neste estudo, incluindo identificação, local de coleta, número de registro das amostras em cultivo do Instituto de Botânica (ibt) e ESALQ e identificação dos materiais testemunha depositadas no herbário da ESALQ (ESA).....40

Tabela 3 - Nome e sequência dos iniciadores de cloroplasto (SHAW et al,, 2007) e nuclear (SUN et al., 2004) testados para amplificação e sequenciamentopara espécies do gênero *Brasiliorchis*e duas do grupo externo 45

Tabela 4 - Protocolo da reação de amplificação para sequenciamento de DNA das regiões de cloroplasto *psbJ-petA*e*atpL-atpH*para *Brasiliorchis spp* 47

Tabela 5 - Protocolo da reação de amplificação para sequenciamento de DNA da região ITS 1-2.....47

Tabela 6 - Informações de dados dos alinhamentos com as duas regiões de DNA plastidial e da região nuclear sequenciados para 96 amostras do gênero *Brasiliorchis* e mais duas do grupo externo.....51

Tabela 7 - Valores dos parâmetros dos modelos de substituição selecionados pelo Critério de informação Akaike (AIC) utilizados nas análises bayesianas. São apresentados dois modelos, um para os dados combinados duas regiões de plastídeo e outro modelo para a região nuclear (ITS) 52

1INTRODUÇÃO

O gênero *Brasiliorchis*R. Singer, S. Koehler & Carnevali (subtribo Maxillariinae, tribo Maxillariae) reúne orquídeas restritas ao bioma Mata Atlântica, ocorrendo de Misiones, Argentina, até o Estado da Bahia, na região nordeste do Brasil (SINGER; KOEHLER; CARNEVALI, 2007). A exceção é a espécie *B. marginata*, registrada também para o Equador (TOSCANO; CRIBB, 2005). Espécies atualmente consideradas como pertencentes ao gênero *Brasiliorchis* foram recentemente segregadas do gênero *Maxillaria* por constituírem um grupo monofilético filogeneticamente distinto do gênero *Maxillaria* s. str. (WHITTEN et al., 2007). O gênero pode ser distinguido de outras orquídeas Maxillariinae pela presença de pseudobulbos bifoliados, sulcados a estriados, folhas conduplicadas, longas e estreitas, flores fragrantes e de longa-duração, sem recompensas florais e com polinários geralmente desprovidos de estipes (SINGER; KOEHLER; CARNEVALI, 2007).

De acordo com o estudo filogenético de Whitten et al. (2007)para o gênero *Maxillaria*, clados fortemente suportados foram obtidos e alguns gêneros aliadoscorrespondentes a esses clados foram reconhecidos. Um desses grupos bem suportados corresponde ao gênero *Brasiliorchis*. Os autores Singer; Koehler e Carnevali (2007) formalizaram a transferência de espécies de *Maxillaria* para*Brasiliorchis* e reconheceram 13 espécies para o gênero.Entretanto, tratamentos taxonômicos e listagens de espécies anteriores divergem muito em relação ao número de táxons reconhecidos para este grupo,principalmente devidoà alta variação morfológica desse gênero, fazendo da identificação das espécies um trabalho muito difícil.

No primeiro tratamento taxonômico para orquídeas do Brasil, Cogniaux (1904) reconheceu 11 espécies e cinco variedades morfologicamente relacionadas ao gênero *Brasiliorchis*. Em um tratamento taxonômico posterior, Hoehne (1953) reconheceu 17 espécies e 19 variedades, incluindo três espécies e 14 variedades novas descritas, no entanto, o autor mesmo admite que erros na identificação das espécies possam ter ocorrido devido à dificuldade de distinção entre as diferentes espécies, especialmente quando o material considerado para estudo foi obtido de herbários (Hoehne, 1953). Em sua listagem de espécies de orquídeas brasileiras,

Pabst e Dungs (1977) reconheceram 14 espécies divididas em três alianças: “picta”, “marginata” e “gracilis”, de acordo com caracteres vegetativos. Já Butzin e Senghas (1996) reconheceram apenas duas alianças, juntando as alianças “picta” e “gracilis” de Pabst e Dungs (1977) e mantendo “marginata” (ver Anexo A para informações resumidas). Atualmente, são reconhecidas 14 espécies para o gênero *Brasiliorchis* (Barros et al., 2013), apenas uma a mais que Singer; Koehler e Carnevali (2007).

Das 14 espécies atualmente reconhecidas no gênero *Brasiliorchis*, cinco (*B. barbozae, B. gracilis, B. consanguinea, B. kautskyi e B. schunkeana*) são claramente distinguíveis das outras espécies do gênero de acordo com caracteres morfológicos diagnósticos. Por outro lado, as nove espécies restantes (*B. chrysantha, B. marginata, B. moutinhoi, B. phoenicanthera, B. picta, B. polyantha, B. porphyrostele*, *B. heismanniana e B. ubatubana* - denominado aqui de complexo *‘Brasiliorchis picta’*) são morfologicamente muito similares, apresentando caracteres morfológicos aparentemente contínuos. Em um estudo morfométrico considerando caracteres vegetativos e, principalmente, florais, de seis espécies do gênero, Pinheiro e Barros (2009) não conseguiram identificar agrupamentos claros correspondentes às espécies *B. chrysantha, B. marginata, B. picta, B. porphyrostele*e *B. ubatubana* (as outras espécies do complexo *‘Brasiliorchis picta’* não foram amostradas). A única espécie claramente distinta foi *B. gracilis*. A maioria dos caracteres analisados apresentou sobreposição entre diferentes espécies, embora os autores tenham identificado uma tendência para distinção de agrupamentos correspondentes às espécies analisadas, com exceção de *B. picta* (PINHEIRO; BARROS, 2009).

Espécies são linhagens compostas por conjuntos de metapopulações (i.e. populações inclusivas constituídas de subpopulações) que evoluem separadamente, sendo resultantes da atuação de processos em escalas temporais e espaciais múltiplas que atuam em indivíduos (DE QUEIROZ, 2007; HART, 2010). Por este motivo, questões relacionadas à delimitação de espécies devem considerar diferentes propriedades determinantes no processo de especiação, tais como isolamento reprodutivo, isolamento ecológico, distinção fenotípica e molecular, bem como padrões filogenéticos e filogeográficos. Desta forma, é possível reunir linhas de evidência relevantes para identificar linhagens distintas (DE QUEIROZ, 2007; PADIAL et al., 2007).

‘Brasiliorchis picta’ constitui um dos grupos de orquídeas brasileiras taxonomicamente mais complexos. A ausência de caracteres morfológicos

diagnósticos claros dificulta o desenvolvimento de estudos em outras áreas do conhecimento biológico, além de ser um obstáculo para a comercialização de suas espécies, que são de grande valor ornamental, bem como para elaboração de medidas para conservação. Nesse sentido, o desenvolvimento de estudos visando a identificação de linhagens evolutivamente distintas é fundamental para a taxonomia, na identificação e utilização de nomes; bem como para a compreensão de processos chave que moldaram a diversidade no bioma Mata Atlântica em particular e de orquídeas neotropicais em geral.

Neste trabalhofoi proposto o desenvolvimento de um estudo filogenético, utilizando sequências cloroplastidiais e de ITS, com o objetivo de contribuir para a delimitação de espécies no gênero *Brasiliorchis*. Especificamente, pretendeu-se com este estudo responder as seguintes questões:

(1) As espécies reconhecidas por Barros et al. (2013) constituem grupos monofiléticos distintos?

(2) As espécies *B. chrysantha, B. marginata, B. picta, B. porphyrostele*e *B. ubatubana* identificadas no estudo de Pinheiro e Barros (2009) como morfologicamente homogêneas, constituem um grupo monofilético exclusivo?

(3) Qual é a posição e relação filogenética das espécies *Brasiliorchis barbozae, B. consanguinea, B. kautskyi, B. schunkeana, B. phoenicanthera*,não analisadas por Pinheiro e Barros (2009), em relação a outras espécies do gênero?

Este estudo foi desenvolvido com a colaboração da Profa. Dra. Samantha Koehler, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), em São Paulo, que já vem estudando este grupo de espécies e apresenta grande experiência em estudos desta natureza.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sistema de estudo

2.1.1 Família Orchidaceae

Orchidaceae é a maior família dentre as monocotiledôneas, compreendendo cerca de 26.000 espécies distribuídas em aproximadamente 850 gêneros (WORLD CHECKLIST OF MONOCOTYLEDONS, 2011). Apresentam ampla distribuição geográfica, sendo que a maior diversidade de espécies está localizada nos trópicos, onde na sua maioria são epífitas. Também existem espécies de orquídeas terrestres e rupícolas, desenvolvendo-se no chão úmido da floresta tropical ou em rochas (DRESSLER, 1993; PRIDGEON et al., 2009; FAY; CHASE, 2009).

Estudos filogenéticos têm sido intensamente desenvolvidos para a família Orchidaceae e são de fundamental importância para rever classificações de subfamílias, tribos e subtribos (CAMERON et al., 1999; FREUDENSTEIN; RASMUSSEN, 1999; FREUDENSTEIN et al., 2004). Além disso, o aumento do conhecimento sobre as relações na família tem incentivado estudos em baixos níveis taxonômicos, como gêneros (KOEHLER, et al., 2008; KENNEDY; WATSON, 2010; RODRIGUES, 2011; BATISTA et al., 2013).

2.1.2Subtribo Maxillariinae

A subtribo Maxillariinae (subfamília Epidendroideae, tribo Cymbidieae) é uma das subtribos mais diversificadas de orquídeas brasileiras, englobando cerca de 600-700 espécies (DRESSLER, 1993; WHITTEN; WILLIAMS; CHASE, 2000). Apresenta ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada desde o Sul da Flórida até o norte da Argentina, com maior diversidade no Sul da América Central e no Sudeste do Brasil (WHITTEN et al., 2007).

As relações dentro de Maxillariinae foram parcialmente resolvidas no estudo de Whitten, Williams e Chase (2000). Estes autores demonstraram que os gêneros reconhecidos para Maxillariinae (sensu Dressler, 1993): (*Maxillaria*, *Anthosiphon*, *Cryptocentrum*, *Chrysocycnis*, *Cyrtidiorchis*, *Mormolyca*, *Pityphllum* e *Trigonidium*) constituem um grupo monofilético bem suportado de orquídeas neotropicais. No

entanto, a circunscrição de gêneros dentro dessa subtribo através desse estudo não foi resolvida, necessitando de uma nova reavaliação para delimitação dos gêneros dentro de Maxillariinae (SINGER; KOEHLER; CARNEVALI, 2007). Num estudo mais recente, Whitten et al. (2007) apresentaram uma análise filogenética muito mais detalhada de Maxillariinae com 619 espécimes, representando cerca 354 espécies, utilizando as regiões *nrITS*, *matK*, intron *trnK* e o espaçador intergênico *atpB-rblL*.Esse estudo suporta o gênero *Maxillaria* com uma delimitação mais restrita e o reconhecimento de 17 gêneros correspondentes a grupos monofiléticos bem suportados (*Brasiliorchis*, *Camaridium*, *Christensonella*, *Heterotaxis*, *Ornithidium*, *Sauvetrea)* (WHITTEN et al., 2007; BLANCO et al., 2007) (Figura 1).

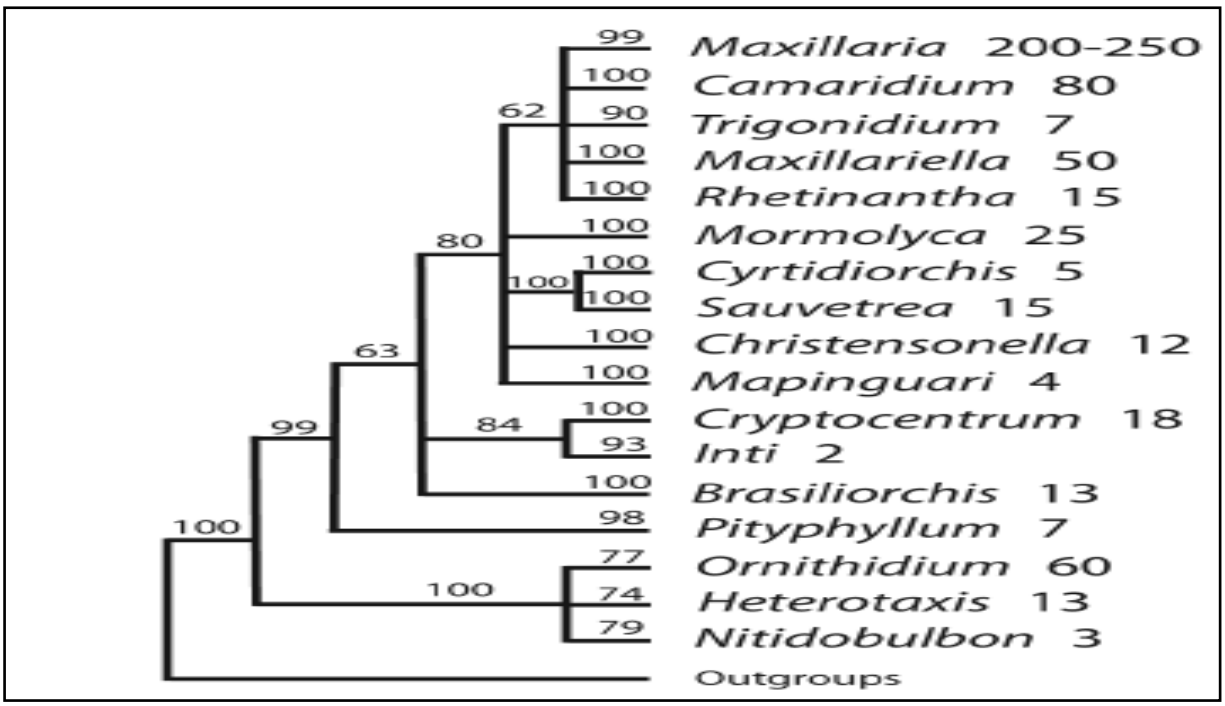


Figura 1 - Resumo das relações filogenéticas dentro da subtribo Maxillariinae, baseado em quatro regiões de DNA representando os clados bem suportados proposto no estudo de Whitten et al. (2007) (BLANCO et al., 2007)

2.1.3 Gênero *Brasiliorchis*

No estudo realizado por Whitten et al. (2007) obteve-se um clado monofilético bem suportado, representado por 22 espécimes correspondentes ao gênero *Brasiliorchis*(Figura 2).O gênero *Brasiliorchis*, Singer, S. Koehler & Carnevali (subtribo Maxillariinae, tribo Maxillariae) é essencialmente brasileiro, apresenta orquídeas endêmicas na maior parte do bioma Mata Atlântica, ocorrendo de Misiones, Argentina, até o estado da Bahia, na região nordeste do Brasil (SINGER; KOEHLER; CARNEVALI, 2007; PRIDGEON et al., 2009) (Figura 3). Atualmente, são reconhecidas 14 espécies para esse gênero (BARROS et al., 2013)(Tabela 1).

Embora *Brasiliorchis*seja facilmente distinguível de outros gêneros da subtribo Maxillariinae pela presença de pseudobulbos bifoliados, sulcados a estriados, folhas conduplicadas, longas e estreitas, flores campanuladas, fragrantes e de longa-duração, sem recompensas florais e com polinários geralmente desprovidos de estipes (SINGER; KOEHLER; CARNEVALI, 2007) (Figura 4), a identificação das espécies dentro do grupo ainda tem sido muito problemática.

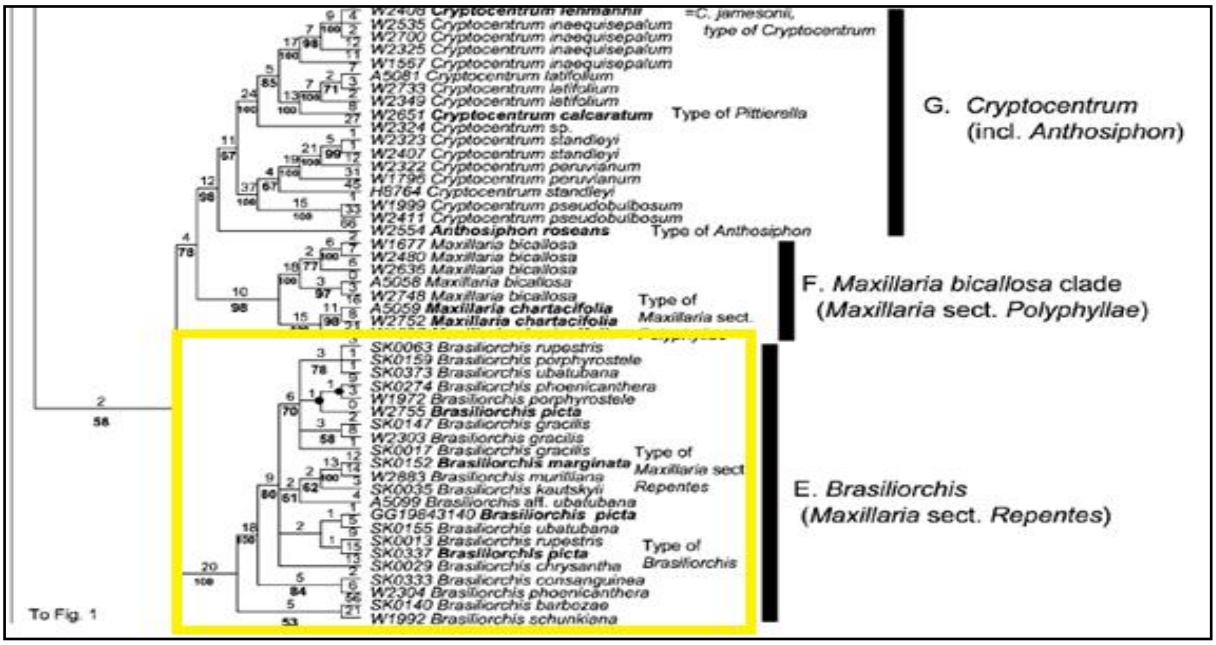


Figura 2 - Árvore filogenética da subtribo Maxillariinae com análises de nrITS, matK+trnK, espaçador atpB-rbcL e dados de seqüenciamento de drpoC1, mostrando o clado bem suportado representando espécimes do gênero *Brasiliorchis* (adaptado de WHITTEN et al., 2007)

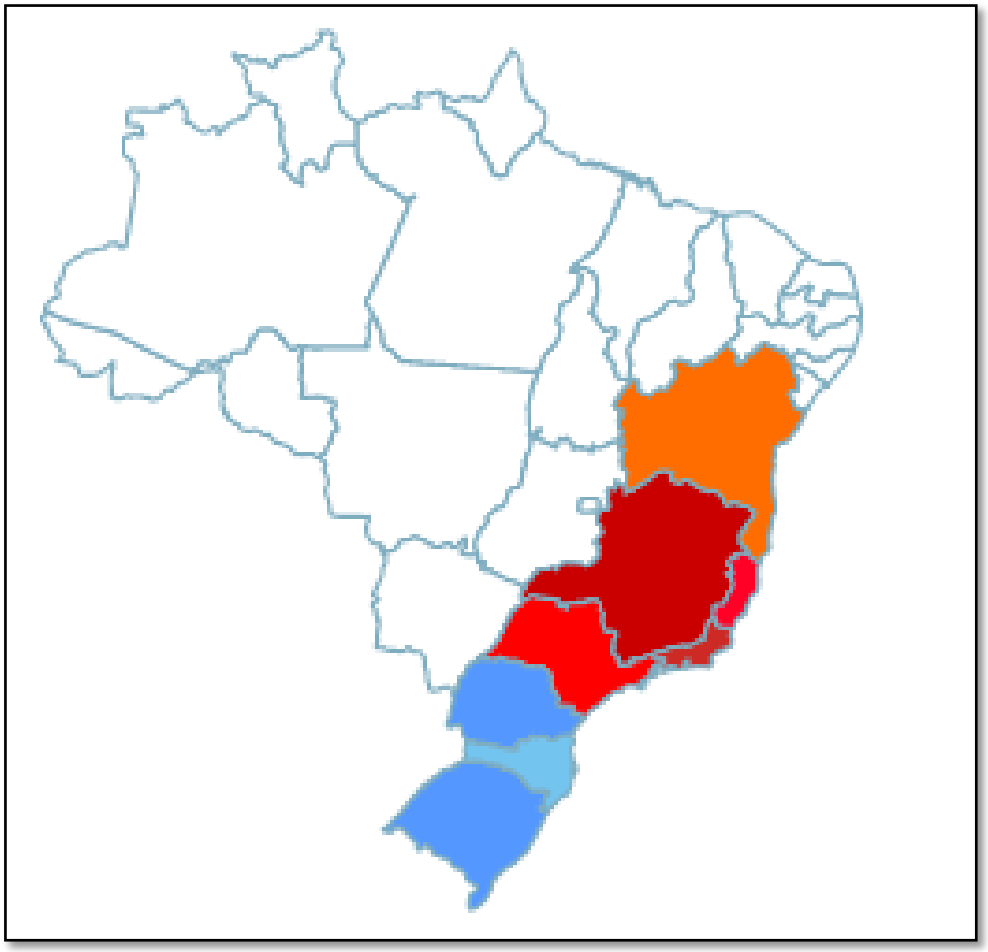


Figura 3 - Mapa da distribuição geográfica do gênero *Brasiliorchis* no Brasil (Fonte: Flora do Brasil, 2013)

Tabela 1 -Relação das 14 espécies atualmente reconhecidas para o gênero *Brasiliorchis*de acordo com Barros et al. (2013)

Espécie
B. barbozae (Loefgren) R. Singer, S. Koehler & Carnevali
B. chrysantha (Barbosa Rodrigues) R. Singer, S. Koehler & Carnevali
B. consanguinea (Klotzsch) R. Singer, S. Koehler & Carnevali
B. gracilis (Loddiges) R. Singer, S. Koehler & Carnevali
B. heismanniana (Barbosa Rodrigues) R. Singer, S. Koehler & Carnevali
B. kautskyi (Pabst) R. Singer, S. Koehler & Carnevali
B. marginata (Lindley) R. Singer, S. Koehler & Carnevali
B. moutinhoi (Pabst) F. Barros & L. Guimarães
B. phoenicanthera (Barbosa Rodrigues) R. Singer, S. Koehler & Carnevali
B. picta (Hooker) R. Singer, S. Koehler & Carnevali
B. polyantha (Barbosa Rodrigues) R. Singer, S. Koehler & Carnevali
B. porphyrostele (Reichenbach f.) R. Singer, S. Koehler & Carnevali
B. schunkeana (Campacci & Kautsky) R. Singer, S. Koehler & Carnevali
B. ubatubana (Hoehne) R. Singer, S. Koehler & Carnevali

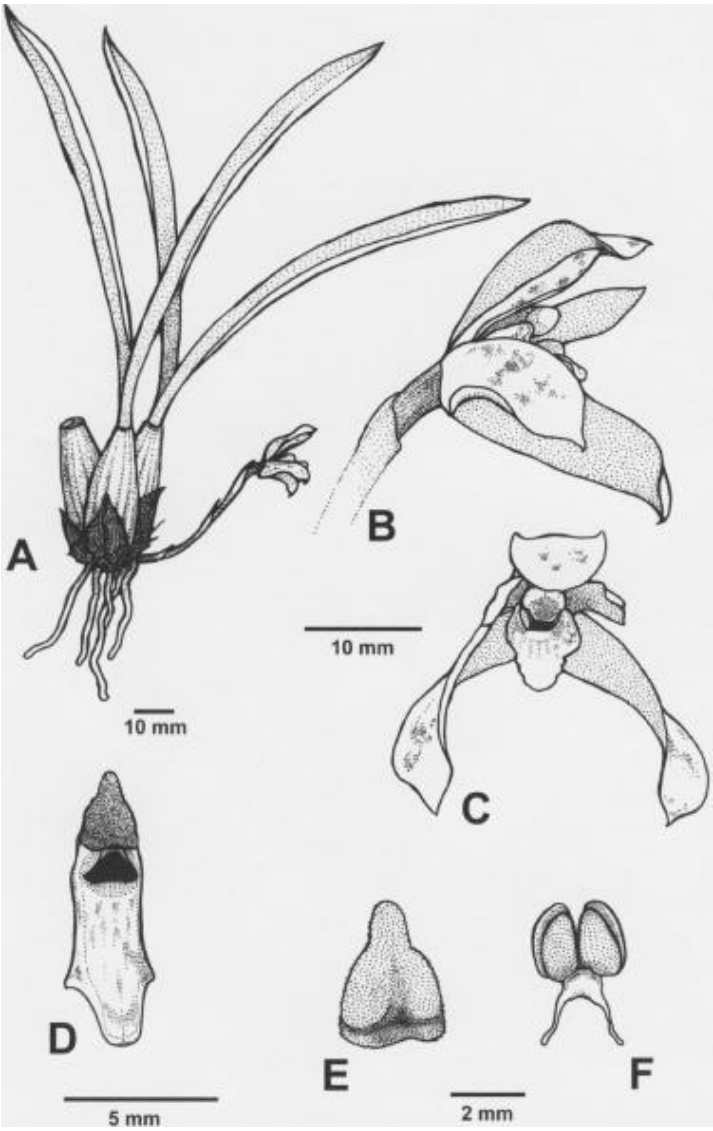


Figura 4 - Morfologia do gênero *Brasiliorchis* (adaptado de SINGER; KOEHLER; CARNEVALI, 2007)

O primeiro tratamento taxonômico para o gênero *Maxillaria* no Brasil foi feito por Cogniaux (1904) que reconheceu 11 espécies e cinco variedades morfologicamente relacionadas ao gênero *Brasiliorchis*. Posteriormente, Hoehne (1953) reconheceu 17 espécies e 19 variedades, incluindo três espécies e 14 variedades novas descritas por ele, sendo que esse é o tratamento taxonômico mais recente para o gênero. Os caracteres diagnósticos considerados importantes por Hoehne (1953) para identificação das espécies dentro do grupo foram tamanho e forma dos pseudobulbos, assim como forma, tamanho e consistência das folhas e principalmente os caracteres florais como a cor, forma e tamanho das sépalas, pétalas, labelo e coluna (ANEXO B). Hoehne (1953) também relata sobre o perfume que as diferentes flores deixam emanar em determinadas horas do dia ou da noite,

sendo considero por ele também bons recursos para distinguir as espécies neste grupo.

Apesar da importante contribuição de Hoehne (1953) para a descrição das espécies relacionadas ao gênero *Brasiliorchis*, seu trabalho não forneceu limites claros entre elas, existindo confusões e incertezas sobre o número de espécies e a relação entre elas, possivelmente por causa do grande número de caracteres morfológicos com formas intermediárias, gerando sobreposição entre indivíduos de diferentes espécies. O autor admitenas suas descrições a dificuldade para a identificação dessas espécies, e que erros na distinção entre elas podem ter ocorrido (Hoehne, 1953). Além disso, uma quantidade maior de material precisaria ser avaliada para descrição. Considerando os caracteres morfológicos diagnósticos apresentados nas descrições originais (Anexo C) e o único tratamento taxonômico disponível (HOEHNE, 1953),fica clara a baixa eficácia destes para delimitação de espécies, principalmente devido à variação contínua de caracteres florais, mostrando-se pouco eficazes para esclarecer limites entre as espécies no grupo (Figura 5).

Num estudo mais recente, Pinheiro e Barros (2009) realizaram uma análise morfométrica com seis espécies do complexo '*Brasiliorchis picta*' (*B. chrysantha, B. marginata, B. picta, B. porphyrostele*, *B. gracilis*e *B. ubatubana)* com o objetivo de avaliar a variação morfológica e a delimitação dessas espécies dentro do complexo. Foram utilizadas 340 plantas em 30 localidades brasileiras. Para as análises morfométricas foram utilizados 20 caracteres morfológicos, quatro vegetativos e 16 florais. Os resultados da análise mostraram que a maioria dos caracteres apresentou sobreposição entre as espécies, com exceção de *B. gracilis*, que se apresentou claramente como um agrupamento distinto em relação às outras espécies avaliadas. As espécies restantes apresentaram apenas uma tendência para agrupamento nas análises, exceto *B. picta* que juntamente com a espécie *B. chrysantha* apresentaram a maior variação morfológica, com alguns de seus indivíduos agrupados com outras espécies.

Os autores sugerem que fatores como distribuição geográfica e eventos como hibridação e introgressão podem estar ocorrendo entre as espécies do complexo '*Brasiliorchis picta*' contribuindo para a grande variação morfológica encontrada entre as espécies, sendo responsável pela sobreposição morfológica entre elas. Estes fenômenos têm sido observados para outros gêneros de orquídeas,dificultando na

identificação e delimitação das espécies (PINHEIRO et al., 2010; RODRIGUES, 2011). Apesar do uso de morfometria fornecerem dados importantes para esclarecer as relações e delimitação de espécies em orquídeas, em alguns casos, como nas espécies com provável origem recente e que não apresentam diferenciação morfológica clara, como o observado em *B. picta*, o uso de análise morfométrica não é suficiente, sendo necessários, por exemplo, o uso de marcadores moleculares e, além disso, um maior número de indivíduos por população para esclarecer as relações e compreender os mecanismos de diversificação envolvidos nas espécies e linhagens do complexo *B. picta*.

Figura5 - Representantes do gênero *Brasiliorchis*. (A) *B. picta*, (B) *B. gracilis*, (C) *B. phoenicanthera*, (D) *B. barbozae*, (E) *B. marginata*, (F) *B. ubatubana*, (G) *B. consanguinea*, (H) *B. porphyrostele,* (I) *B.schunkeana* (Foto (I) adaptada de Campacci; Kautsky, 1993)

2.2Métodos para delimitação de espécies

Espécies são consideradas unidades fundamentais da biologia, sua acurada delimitação é a base para a descrição da biodiversidade. Porém para organismos que exibem pouca ou nenhuma diferenciação morfológica, as denominadas espécies crípticas (BICKFORDet al., 2007), e para os de especiação recente e/ou rápida, a identificação de espécies pode ser desafiadora. A falta de limites claros entre linhagens dificulta os estudos em outras áreas do conhecimento biológico, além de ser um obstáculo para conservação (WIENS; SERVEDIO, 2000).

Contudo, determinar os limites entre as espécies envolve o problema relacionado ao conceito de espécie. Os diversos conceitos de espécies existentes são baseados em diferentes propriedades biológicas, por exemplo, o isolamento reprodutivo no caso do conceito biológico de espécie, a ocupação de um nicho ou zona adaptativa distinta no caso do conceito ecológico de espécie, ou ainda a monofilia no conceito filogenético de espécie(DE QUEIROZ, 2007). A utilização de um ou outro conceito está relacionado com o interesse de estudo do pesquisador e pode levar a conclusões diferentes sobre os limites e o número de espécies a serem considerarados (SITES; MARSHALL, 2004; DE QUEIROZ, 2007; HART, 2010).

Apesar das diferenças existentes, todos os conceitos de espécies possuem um elemento em comum, estes conceitos concordam que espécies são linhagens de metapopulações evoluindo separadamente(DE QUEIROZ, 2007). A distinção entre os conceitos está na adoção de diferentes propriedades adquiridas pelas linhagens durante o processo de divergência. Essas propriedades surgem em diferentes momentos durante o processo de especiação e são consideradas diferentes linhas de evidência para avaliar a separação das linhagens (PADIAL; DE LA RIVA, 2010).

Desse modo, nenhuma evidência sozinha (morfologia, isolamento reprodutivo, diferenciação genética) é considerada definitiva para o reconhecimento de uma espécie. Múltiplas linhas de evidência, isto é, a presença de várias propriedades, resultam em uma hipótese mais robusta sobre a separação de linhagens (especiação). Este conceito está sendo aceito pela maioria de biólogos, filogeneticistas e também pelos taxonomistas, promovendo o surgimento de uma taxonomia integrativa. Uma abordagem integrativa, com a combinação de várias fontes de evidências, permitirá avaliar o status taxonômico das espécies, bem como a identificação de novas espécies, além disso, também irá integrar as informações

fornecidas pelos diferentes métodos para o resolver o problema da delimitação de espécies (DAYRAT, 2005; DE QUEIROZ, 2007; PADIAL et al., 2007).

Por razões práticas, o uso da morfologia é tradicionalmente considerado como um critério primário para definir espécies (DAYRAT, 2005). Essa abordagem é bastante comum, inclusive com orquídeas. No entanto, sabe-se que o uso exclusivo da taxonomia tradicional para identificação de espécies é falha devido a complexidade morfológica presente em alguns grupos de organismos e, muitas vezes, à variação contínua dos caracteres morfológicos observado entre as espécies (COGNIAUX, 1904; HOEHNE, 1953; PABST; DUNGS, 1996).

O surgimento das técnicas moleculares tornou-se uma nova ferramenta para a identificação de espécies morfologicamente semelhantes, trazendo novas perspectivas sobre conceitos e delimitação de espécies. Dados moleculares são importantes e úteis quando combinados com outros tipos de dados para avaliar a divergência das linhagens (PADIAL et al., 2010). Na família Orchidaceae é crescente a utilização de dados moleculares em estudos filogenéticos e/ou filogeográficos que pretendem revisar a atual classificação e entender os processos evolutivos envolvidos na diversificação das espécies (KOEHLER et al., 2008; KENNEDY; WATSON 2010; PINHEIRO et al., 2011; RODRIGUES, 2011).

2.3 Métodos filogenéticos

A construção de árvores filogenéticas representam hipóteses sobre as relações evolutivas entre os grupos de organismos em estudo. As filogenias são baseadas no princípio da ancestralidade comum. Na inferência filogenética são consideradas somente características homólogas, ou seja, que compartilham um ancestral comum, sendo que essas homologias são denominadas sinapomorfias. Em alguns casos as espécies compartilham características semelhantes que não derivaram de um ancestral comum, que são as homoplasias, devido à evolução convergente (táxons originados de diferentes ancestrais e que compartilham características semelhantes) e a mutação reversa ou reversões (quando ocorre uma mudança na característica, mas ela reverte para o estado ancestral). As homoplasias são problemáticas para a inferência filogenética, pois podem sugerir que certas espécies

são filogeneticamente mais próximas umas das outras, quando na verdade, não são (FREEMAN; HERRON, 2009).

Atualmente há diferentes métodos disponíveis para inferir árvores filogenéticas (HOLDER; LEWIS, 2003). Esses métodos podem ser divididos em dois tipos básicos, os métodos de distância, que transformam a matriz de caracteres original em uma matriz de distâncias genéticas, e os métodos de matriz de caracteres, que mantém a informação original dos dados. No primeiro, a distância representa a estimativa da quantidade de divergência entre os táxons, tais como o método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)(SOKAL; MICHENER, 1958; SNEATH; SOKAL, 1973) e *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987). Esses métodos baseados em distância constroem árvores através de uma sequência de regras e operações e estabelecem as relações entre os organismos, não utilizando nenhum critério de otimização. São, portanto,denominados métodos de solução única (HOLDER; LEWIS, 2003).

Os métodos que utilizam a matriz de caracteres inferem a melhor árvore de acordo com um critério de otimização, ou seja, dentre as topologias possíveis selecionam a melhor (ou as melhores) de acordo com um critério previamente definido (p.ex. o menor número de mudanças - Critério de Máxima Parcimônia - ou a árvore de maior verossimilhança - Critério de Máxima Verossimilhança) (SWOFFORD; SULLIVAN, 2009). Nos métodos que utilizam critérios de otimização, o número de topologias de árvores possíveis cresce exponencialmente com o aumento do número de terminais.

Para o estudo filogenético do gênero *Brasiliorchis* serão utilizados os métodos de inferência bayesianae o de máxima parcimônia,descritos a seguir.

2.3.1 Inferência Bayesiana (IB)

A inferência bayesiana, introduzida em meados dos anos 90, é o método mais recente para construção de árvores filogenéticas. Na análise bayesiana o objetivo é calcular a distribuição de probabilidade posterior através da função de verossimilhança e de uma distribuição de probabilidade a priori em função de um conjunto de dados observados (LARGET; SIMON, 1999).

O método de análise bayesiana permite que modelos mais complexos de evolução de sequências sejam implementados. Ao contrário da verossimilhança, a

árvore de maior probabilidade posterior não depende de um valor específico, mas considera todos os valores possíveis dos parâmetros. Além disso, na verossimilhança, com o aumento do número de parâmetros, os algoritmos que são usados para encontrar o ponto de ML podem ser lentos ou não confiáveis (HOLDER; LEWIS, 2003).

Na inferência bayesiana, o resultado é o que maximiza a probabilidade posterior dos parâmetros do modelo, dos comprimentos de ramos e da topologia da árvore. Este cálculo é feito através do teorema de Bayes. A distribuição da probabilidade posterior é igual à função da verossimilhança ($Pr[X|T_i, V_i, \theta]$) vezes a distribuição a priori($Pr[T_i, V_i, \theta]$) dividido por uma constante de normalização ($Pr[X]$). Onde, X = dados (no caso de estudos moleculares, será a matriz de sequências de DNA/RNA); T_i= topologia da árvore;V_i= comprimento dos ramos; θ = parâmetros do modelo evolutivo (HUELSENBECK; RONQUIST, 2005; RONQUIST; VAN DER MARK; HUELSENBECK, 2009).

Na maioria dos casos, é muito difícil e até mesmo impossível calcular ($Pr[X]$) analiticamente, por isso é utilizadoa Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC).O MCMC é um método estocástico para gerar amostras aleatórias de uma distribuição de interesse. No caso da inferência filogenética, a distribuição da probabilidade posterior. O programa MrBayes (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001; RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) utiliza o algoritmo conhecido como Metropolis-Hastings (METROPOLIS et al., 1953; HASTINGS, 1970) para avaliar a distribuição posterior da árvores filogenéticas (HUELSENBECK; RONQUIST, 2005).

O MCMC gera uma cadeia conceitual no espaço de parâmetros (que são as topologias possíveis, com todas as combinações de parâmetros do modelo evolutivo) através de uma sequência de passos. A ideia central é fazer pequenas mudanças aleatórias para alguns valores dos parâmetros atuais, para isso, novos estados são propostos (mudanças de posição ou no comprimento de ramos)e suas probabilidades com relação aos estados anteriores são calculadas (probabilidade posterior) em cada geração através do teste estatístico descrito por Metropolis et al. (1953). Cada comparação entre as topologias corresponde a uma geração da cadeia. À medida que o número de gerações aumenta, o processo converge em um pequeno conjunto de árvores que apresentam aproximadamente a mesma probabilidade, sendo as árvores com menor probabilidade eliminadas. Esse procedimento é repetido milhões de vezes e uma longa cadeia de locais no espaço

de parâmetros é criada (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001; RONQUIST, VAN DER MARK; HUELSENBECK, 2009). Quando o processo termina, faz-se um consenso dessas árvores. A frequência com que um determinado clado aparece em 95% do grupo de árvores visitadas é assumida como a sua probabilidade posterior e é uma forma de avaliar a probabilidade de cada agrupamento.

2.3.2 Método de Máxima Parcimônia (MP)

O princípio da máxima parcimônia (FITCH, 1971) é selecionar a(s) árvore(s) com menor comprimento total. O comprimento de uma árvore é medido pelo número de mutações necessárias para explicar as diferenças observadas na matriz de caracteres, que no caso dos dados molecularessão as sequências alinhadas (KLUGE; FARRIS, 1969; FARRIS, 1970).

Para um conjunto limitado de dados, que contenham até 12 terminais pode ser feita uma busca exaustiva, onde (SWOFFORD; SULLIVAN, 2009)todas as topologias possíveis são avaliadas. O método do *branch-and-bound*(HENDY; PENNY, 1982) aplicável com até 22 terminais, não avalia todas as árvores possíveis, mas garante encontrar a árvore mais parcimoniosa. É realizada uma busca inicial para obter uma árvore próxima da ótima, e o escore desta árvore será usado como limitante superior para corte, descartando caminhos que não tem chance de chegar à árvore ótima.

Quando se tem um número elevado de terminais, as árvores são avaliadas por meio de buscasheurísticas, utilizando algoritmos aproximados que não garantem encontrar a melhor árvore como nos métodos exatos de busca exaustiva (HOLDER; LEWIS, 2003).Esses métodos começam com a construção de uma árvore inicial não ótima e essa árvore é submetida a uma série de rearranjos. As árvores vizinhas produzidas pelos rearranjos são avaliadas. Se for originada uma árvore melhor, essa se torna a árvore nova, que também é submetida a novos rearranjos. Esse processo continua de forma a encontrar a solução ótima para uma dada árvore inicial. São geradas milhares de árvores iniciais que sãousualmente obtidas através do método de adição passo-a-passo (“*stepwise addition*”), como por exemplo, árvores de Wagner. Onde os táxons são adicionados em uma sequência aleatória. Em seguida, cada uma dessas árvores iniciais é submetida ao processo de rearranjo dos ramos (“*branch swapping*”). Na adição sequencial de terminais, tipicamente, o processo

começa com três táxons. Em seguida, um terminal é adicionado, sendo que cada uma das três árvores resultantes é avaliada e a que tem melhor escore é armazenada para a próxima adição. Esse processo continua até que todos os terminais sejam adicionados à árvore. O "*branch swapping*" envolve a mudança de ramos para novas partes da árvore produzindo novas topologias(GIRIBET, 2007; SWOFFORD; SULLIVAN, 2009).

Três tipos algoritmos de *branch-swapping* são geralmente utilizados: 1) *Nearest-neighbor interchange* (NNI) ou troca de vizinhos mais próximos, sendo que essa técnica troca uma subárvore ligada a um extremo do ramo com a subárvore ligada ao outro extremo, gerando rearranjos topologicamente distintos. Essas perturbações são então comparadas com a árvore original. 2) *Subtree pruning and regrafting* (SPR), sendo que durante o *SPR-swapping* ocorre poda da subárvore e inserção em todos os locais possíveis do restante da árvore, medindo o comprimento da árvore resultante em cada etapa. Esse método testa muito mais possibilidades de árvores comparadas ao NNI. Esses algoritmos têm sido considerados como sendo de valor limitado em encontrar as árvores mais parcimoniosas em grandes conjuntos de dados, ou que são altamente homoplásticos. 3) *Tree bisection and reconnection* (TBR), que é o algoritmo *branch-swapping* geralmente mais usado e empregado nos softwares da filogenia moderna. É feita a bissecção e reconexão de árvore: ocorre o corte da árvore em duas subárvores cortando o ramo interno da árvore original. As duas árvores são reconectadas criando um novo ramo que junta o ramo de uma subárvore com o da outra. Todos os possíveis ramos e as reconexões são testados, aumentando o número de topologias testadas em comparação com o SPR (NIXON, 1999; GIRIBET, 2007).

O tempo necessário para realizar o *branch-swapping* em uma árvore aumenta com o número de terminais. Esse aumento é particularmente mais acentuado quando o TBR é usado, devido ao grande número de árvores examinadas por cada bissecção. Isto produz um agrupamento de árvores que é referido como ilha, existindo a possibilidade de que esses métodos fiquem presos em ilhas de árvores subótimas (ótimos locais), não permitindo chegar ao ótimo global.Geralmente, os métodos de *branch-swapping* são eficientes para conjunto de dados com até 100 terminais (NIXON, 1999; GIRIBET, 2007).

Para grandes conjuntos de dados, são necessários outros métodos que tentem resolver o problema dos ótimos locais, requerendo diferentes estratégias baseadas em analisar diferentes partes da árvore separadamente (GIRIBET, 2007). Para isso, foram propostos vários novos métodos que visam encontrar árvores mais curtas possíveis, tais como: *Tree-Fusing*(TF), sendo que a idéia principal desse método é a troca de subgrupos entre diferentes árvores; *Sectorial Searches* (SS), que é baseado na seleção de diferentes setores da árvore, reanalisando-os separadamente. Se uma melhor configuração é encontrada, ela é adicionada na árvore; *Tree-Drifting* (DFT), sendo que esse método possibilita que soluções subótimas sejam aceitas durante o *branch-swapping*, visando explorar novas regiões do espaço de busca, mas com certa probabilidade de aceite da solução subótima, que depende da *Relative Fit Difference* (RDF) e da diferença de comprimento entre a nova e a velha solução (GOLOBOFF, 1999); *Ratchet* (NIXON, 1999), sendo que essa estratégia foi desenvolvida visando maximizar os pontos de partida, ou seja, de árvores iniciais, e reduzir a quantidade de tempo gasto em cada pesquisa de um ponto inicial particular.Na primeira etapa, na qual são geradas as árvores, poucas (uma ou duas) são salvas durante a pesquisa e utilizadas como ponto de partida para uma estratégia de busca interativa. Dessa forma não é gasto tempo com orearranjo de ramos, uma vez que as árvores iniciais são quase idênticas. A combinação de estratégias de busca utilizando esses novos algoritmos tem possibilitado a análise de um número cada vez maior de terminaise permitindo analisar grandes conjuntos de dados em uma razoável quantidade de tempo(GOLOBOFF, 1999; GIRIBET, 2007).

2.4Seleção de Modelos de Evolução

O uso do modelo de evolução se torna indispensável quando usamos sequências de DNA para estimar as reconstruções filogenéticas entre os organismos. Os modelos de evolução são hipóteses sobre os processos de substituição de nucleotídeos, que resultaram dos processos evolutivos. Eles descrevem as diferentes probabilidades de mudança de um nucleotídeo para outro ao longo da árvore filogenética, permitindo-nos escolher entre as diferentes hipóteses filogenéticas para explicar os dados. Qualquer modelo de substituição de nucleotídeos é uma aproximação do real processo evolucionário, embora esteja

longe de ser o verdadeiro modelo que represente completamente a evolução das sequências em estudo (BOS; POSADA, 2005; POSADA, 2009).

A escolha entre os diversos modelos de evolução continua a ser um problema importante na reconstrução filogenética, pois a utilização de um ou outro modelo pode alterar os resultados das análises. A estimação do comprimento do ramo e do suporte *bootstrap* pode ser afetada, tornando os métodos filogenéticos menos consistentes e levando à incorreta inferência da árvore filogenética. Por isso é de extrema importância decidir qual é o modelo mais apropriado para explicar um determinado conjunto de dados (POSADA; CRANDALL, 2001; BOS; POSADA, 2005).

A seleção do modelo que melhor se ajusta a um conjunto de dados em particular pode ser feita através de testes estatísticos. Diferentes tipos de testes são utilizados para comparar modelos, como o teste de razão de verossimilhança (*likelihood ratiotests,* LRT), Critério de informação Akaike (*AkaikeInformation Criterion*,AIC) e o Critério de informação Bayesiano (*Bayesian Information Criterion,* BIC)(POSADA; CRANDALL, 2001).

O teste estatísticoLRT(HUELSENBECK; CRANDALL, 1997) tem sido sugerido para comparar dois modelos de evolução. O LRT é calculado comparando duas árvores de máxima verossimilhança (L_0 e L_1), considerando que L_1 foi obtida com um modelo com maior número de parâmetros (hipótese alternativa) eL_0, com um modelo mais simples (hipótese nula). Quando os modelos comparados são aninhados (a hipótese nula é um caso especial da hipótese alternativa), e a hipótese nula é correta, a distribuição qui-quadradoé uma boa aproximação da distribuição nula da estatística LRT, com o número de graus de liberdade igual à diferença no número de parâmetros livres entre dois modelos. Quando o valor de LRT é significativamente grande, a conclusão é que a inclusão de parâmetros adicionais em modelos alternativos aumenta a verossimilhança dos dados significativamente, e consequentemente o uso de um modelo mais complexo é favorecido. Mas, a pequena diferença nas verossimilhanças indica que a hipótese alternativa não explica os dados significativamente melhor do que a hipótese nula, portanto não rejeita a hipótese mais simples (hipótese nula) (POSADA, 2009).

Outra maneira de selecionar modelos mais apropriados para os dados é através do AIC (AKAIKE, 1974). A ideia deste método é calcular a probabilidade dos modelos propostos e impor uma penalidade com base no aumento de número de

parâmetros do modelo. Quanto menor for o AIC, melhor é o ajuste do modelo aos dados, portanto o modelo com menor AIC é escolhido. As vantagens do AIC sob o LRT é que ele pode ser usado para comparar tanto modelos aninhados e não aninhados, além de comparar simultaneamente todos os modelos concorrentes. O AIC reconhece que o verdadeiro modelo não está entre o conjunto de modelos concorrentes, assim, ele tente encontrar o modelo que melhor se aproxima do verdadeiro modelo de evolução dada a quantidade de informações presente nos dados (POSADA; CRANDALL, 2001; BOS; POSADA, 2005).

A seleção de modelos usando o BIC (SCHWARZ, 1974) é interessante quando o tamanho das amostras são grandes e as hipóteses concorrentes estão aninhadas (POSADA; CRANDALL, 2001). Assim como a abordagem LRT, o BIC faz comparações par a par dos modelos, entretanto este método permite mais facilmente a comparação de múltiplos modelos (BOS; POSADA, 2005). Para a escolha entre os múltiplos modelos é considerado o que tiver a maior probabilidade posterior.Quanto menor for o BIC, melhor o ajuste do modelo aos dados (POSADA, 2009). Os métodos AIC e BIC para seleção de modelos apresentam diversas e importantes vantagens em relação ao LRT. Eles são capazes de, simultaneamente, comparar modelos aninhados e não aninhados, estimar a incerteza da seleção do modelo, ou seja, permite-nos avaliar a confiância no modelo selecionado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

Foram incluídas no trabalho 11 das 14 espécies atualmente reconhecidas para o gênero *Brasiliorchis*, de acordo com a última listagem de espécies (Barros et al., 2013), abrangendo as principais áreas de ocorrência do gênero no Brasil (Tabela 2; Figura 6). A amostragem constituiu de 96 indivíduos do gênero *Brasiliorchis*, sendo cinco indivíduos para *B. barbozae*, sete para *B. ubatubana*, seis para *B.phoenicanthera*, sete para *B. gracilis*, sete para *B. porphyrostele*, cinco para *B. chrysantha*, 18 para *B. marginata*, 38 para *B. picta* e apenas um indivíduo para as espécies *Brasiliorchisconsanguinea*, *B. kautskyi* e *B.schunkeana*devido à raridade dessas espécies e/ou dificuldade de obtenção do material. Foram incluídas as espécies *Trigonidium obtusum e Christensonella subulata* como grupo externo de acordo com o estudo filogenético de Whitten et al. (2007) para a subtribo Maxillariinae.. Três espécies: *B. moutinhoi*, *B. heismanniana* e *B. polyantha* não foram amostradas no estudo porque não se obteve nenhum material vivo disponível.

As amostras consistiram de folhas jovens coletadas de espécimes em cultivo no orquidário ‘Paulo Sodero Martins’ do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, SP, no orquidário‘Dr. Frederico Carlos Hoehne’do Instituto de Botânica de São Paulo, SP e também de colaboradores. As amostras coletadas no orquidário da ESALQ/USP foram previamente identificadas pelo professor Friedrich Gustav Brieger, as quais incluem a espécie *B. chrysantha* e duas amostras da espécie *B. marginata* da região de Jussari. As espécies *B. picta*, *B. marginata*, *B. porphyrostele*, *B. gracilis*, *B. phoenicanthera*, *B. ubatubana* e *B. barbozae* coletadas no Instituto de Botânica de São Paulo foram identificadas pelo professor Eduardo Luis Catharino e Samantha Koehler,e as espécies *B. kautskyi*, *B. schunkeana* e *B. consanguinea* foram identificadas e doadas por Marco Antonio Campacci.

O material coletado foi imediatamente armazenado em gel CTAB (3g de Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB), 35 g NaCl e 70mL de água destilada (Van Den Berg, com. pess.), que se apresentou eficiente para preservação do DNA total neste grupo de plantas. Após a coleta, as amostras foram armazenadas a 4^0C de temperatura. Para cada localidade amostrada, será feita pelo menos uma exsicata e

depositada no Herbário da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESA), Universidade de São Paulo, sendo que 14 amostras já foram depositadas. O material testemunha e todas as informações sobre as coletas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 -Lista de espécimes utilizados neste estudo, incluindo identificação, local de coleta, número de registro das amostras em cultivo do Instituto de Botânica (ibt) e ESALQ e identificação dos materiais testemunha depositadas no herbário da ESALQ (ESA)

(continua)

Espécies	**Localidade**	**Nº de registro**	**Material testemunha**
Brasiliorchis barbozae	Bananal - SP	ibt 16516	ESA123024
Brasiliorchis barbozae	Bananal - SP	ibt 16517	
Brasiliorchis barbozae	Campos do Jordão - SP	ibt 12161	
Brasiliorchis barbozae	Campos do Jordão - SP	ibt 14391	ESA123023
Brasiliorchis barbozae	São J. do Barreiro - SP	ibt 12732	ESA123021
Brasiliorchis ubatubana	Embú-Guaçu - SP	ibt 49	
Brasiliorchis ubatubana	Paranapiacaba – SP	ibt 9751	
Brasiliorchis ubatubana	Camanducaia – MG	ibt 1009	
Brasiliorchis ubatubana	Nova Friburgo – RJ	ibt 5997	
Brasiliorchis ubatubana	Nova Friburgo – RJ	ibt 6053	
Brasiliorchis ubatubana	Campos do Jordão - SP	ibt 12251	
Brasiliorchis ubatubana	Ubatuba – SP	ibt 17553	
Brasiliorchis phoenicanthera	Teodoro Sampaio – SP	ibt 14242	
Brasiliorchis phoenicanthera	Teodoro Sampaio – SP	ibt 14243	ESA123028
Brasiliorchis phoenicanthera	Teodoro Sampaio – SP	ibt 14245	
Brasiliorchis phoenicanthera	Jaguariaíva – PR	ibt 2731	ESA123029
Brasiliorchis phoenicanthera	Guaira – PR	ibt 6548	
Brasiliorchis phoenicanthera	Guaira – PR	ibt 6549	ESA123025
Brasiliorchis gracilis	Santana do Riacho – MG	ibt 5116	
Brasiliorchis gracilis	Santana do Riacho – MG	ibt 5119	
Brasiliorchis gracilis	Santana do Riacho – MG	ibt 5122	ESA123022
Brasiliorchis gracilis	São T. das Letras – MG	ibt 1768	
Brasiliorchis gracilis	Embú-Guaçu – SP	ibt 114	ESA118310
Brasiliorchis gracilis	Jard. Bot. de São Paulo – SP	ibt 253	
Brasiliorchis gracilis	Rod. Cunha- Parati – SP/RJ	ibt 3353	
Brasiliorchis porphyrostele	Novo Horizonte – SC	ibt 1881	
Brasiliorchis porphyrostele	Novo Horizonte – SC	ibt 1883	
Brasiliorchis porphyrostele	Novo Horizonte – SC	ibt 1884	ESA123033
Brasiliorchis porphyrostele	Matos Costa – SC	ibt 4695	
Brasiliorchis porphyrostele	Lages – SC	ibt 4733	
Brasiliorchis porphyrostele	Lages – SC	ibt 4734	

Tabela 2 -Lista de espécimes utilizados neste estudo, incluindo identificação, local de coleta, número de registro das amostras em cultivo do Instituto de Botânica (ibt) e ESALQ e identificação dos materiais testemunha depositadas no herbário da ESALQ (ESA)

(continuação)

Espécies	Localidade	Nº de registro	Voucher
Brasiliorchis porphyrostele	Lages – SC	ibt 4735	
Brasiliorchis chrysantha	Perdões – MG	ESALQ 19513	
Brasiliorchis chrysantha	Perdões – MG	ESALQ 19514	
Brasiliorchis chrysantha	Itutinga – MG	ESALQ 19576	
Brasiliorchis chrysantha	Itutinga – MG	ESALQ 19579	
Brasiliorchis chrysantha	Itutinga – MG	ESALQ 19581	
Brasiliorchis marginata	Camanducaia – MG	ibt 1480	
Brasiliorchis marginata	Próx. Camanducaia – MG	ibt 432	
Brasiliorchis marginata	Teodoro Sampaio – SP	ibt 14937	
Brasiliorchis marginata	Teodoro Sampaio – SP	ibt 14939	
Brasiliorchis marginata	Teodoro Sampaio – SP	ibt 14940	
Brasiliorchis marginata	São Paulo – SP	ibt 12346	
Brasiliorchis marginata	Mucuri – BA	ibt 2888	
Brasiliorchis marginata	Mucuri – BA	ibt 2890	
Brasiliorchis marginata	Mucuri – BA	ibt 2893	
Brasiliorchis marginata	Mucuri – BA	ibt 2896	
Brasiliorchis marginata	Jussari – BA	ibt 17898	
Brasiliorchis marginata	Jussari – BA	ESALQ 14832	ESA123020
Brasiliorchis marginata	Dourados – MS	ibt 6420	
Brasiliorchis marginata	Dourados – MS	ibt 6422	
Brasiliorchis marginata	Dourados – MS	ibt 6423	
Brasiliorchis marginata	Dourados – MS	ibt 6430	
Brasiliorchis marginata	Mato Grosso	ibt 10437	
Brasiliorchis marginata	Mato Grosso	ibt 10438	
Brasiliorchis picta	Campos do Jordão - SP	ibt 12217	
Brasiliorchis picta	Campos do Jordão - SP	ibt 12219	
Brasiliorchis picta	Campos do Jordão - SP	ibt 12223	
Brasiliorchis picta	Paranapiacaba – SP	ibt 11945	
Brasiliorchis picta	Paranapiacaba – SP	ibt 11952	
Brasiliorchis picta	Paranapiacaba – SP	ibt 11997	
Brasiliorchis picta	Apiaí – SP	ibt 11077	
Brasiliorchis picta	Apiaí – SP	ibt 11079	
Brasiliorchis picta	Apiaí – SP	ibt 11082	
Brasiliorchis picta	Atibaia – SP	ibt 1360	
Brasiliorchis picta	Atibaia – SP	ibt 1361	
Brasiliorchis picta	Atibaia – SP	ibt 1362	
Brasiliorchis picta	Cunha – SP	ibt 6109	
Brasiliorchis picta	Embú-Guaçu – SP	ibt 69	

Tabela 2 -Lista de espécimes utilizados neste estudo, incluindo identificação, local de coleta, número de registro das amostras em cultivo do Instituto de Botânica (ibt) e ESALQ e identificação dos materiais testemunha depositadas no herbário da ESALQ (ESA)

(conclusão)

Espécies	**Localidade**	**Nº de registro**	**Voucher**
Brasiliorchis picta	Camanducaia – MG	ibt 992	
Brasiliorchis picta	Camanducaia – MG	ibt 1027	
Brasiliorchis picta	Camanducaia – MG	ibt 1030	
Brasiliorchis picta	Teófilo Otoni – MG	ibt 2875	
Brasiliorchis picta	Teófilo Otoni – MG	ibt 2877	
Brasiliorchis picta	São T. das Letras – MG	ibt 1765	ESA123027
Brasiliorchis picta	São T. das Letras – MG	ibt 1770	
Brasiliorchis picta	Nova Friburgo – RJ	ibt 17741	
Brasiliorchis picta	Nova Friburgo – RJ	ibt 17777	
Brasiliorchis picta	Nova Friburgo – RJ	ibt 17779	
Brasiliorchis picta	Parati – RJ	ibt 3289	
Brasiliorchis picta	Parati – RJ	ibt 3291	
Brasiliorchis picta	Parati – RJ	ibt 3292	
Brasiliorchis picta	Orleans – SC	ibt 1958	ESA123026
Brasiliorchis picta	Orleans – SC	ibt 1959	
Brasiliorchis picta	Orleans – SC	ibt 1960	
Brasiliorchis picta	Itagimirim – BA	ibt 9256	
Brasiliorchis picta	Itagimirim – BA	ibt 9259	
Brasiliorchis picta	Itagimirim – BA	ibt 9260	
Brasiliorchis picta	Espírito Santo	ibt 4018	
Brasiliorchis picta	Espírito Santo	ibt 4021	
Brasiliorchis picta	Jaguariaíva – PR	ibt 2730	
Brasiliorchis picta	Jaguariaíva – PR	ibt 2732	
Brasiliorchis picta	Boraceia – SP	ibt 14793	
Brasiliorchis consanguinea	Taubaté/Ubatuba – SP		ESA123031
Brasiliorchis schunkeana	Santa Leopoldina – ES		
Brasiliorchis kautskyi	Domingos Martins – ES		
Trigonidium obtusum	Pariquera-Açú– SP	ESALQ 33768	ESA123032
Christensonella subulata		ESALQ 34129	ESA123030

Figura 6 –Populações de espécies pertencentes ao gênero *Brasiliorchis* consideradas neste estudo

3.2 Extração de DNA

O DNA total das amostras foi extraído de acordo com um protocolo modificado de Doyle e Doyle (1987). Uma vez que as amostras foram fixadas em gel CTAB foi necessário retirar o excesso de gel com auxílio de papel toalha. Em seguida as amostras foram maceradas em 1,0 mL de tampão STE (Sacarose Tris-EDTA) gelado, que auxilia a retirada de cloreto de sódio presente no gel. O material macerado foi transferido para um tubo de eppendorf 1,5 mL e centrifugadas a velocidade de 4.000 rpm por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de CTAB 2% (com PVP 1%) Polivinilpirrolidona e 8 uL de β-mercaptoetanol, depois esse material foi incubado a 60°C por cerca de 1 hora. Após o aquecimento, foi adicionado 500 uL de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), em seguida as amostras foram homogeneizadas em vortex e centrifugadas por 5 min a 13.000 rpm. Essa etapa foi realizada duas vezes. Posteriormente, adiciona-se 500 uL de isopropanol e 30 uL de acetato de sódio 3 M ao sobrenadante obtido da centrifugação e as amostras foram precipitadas de 12-72 horas a -20°C. Depois de retiradas do freezer as amostras foram centrifugadas por 30 min a 13.000 rpm. Em seguida, foram purificadas com etanol 70% por três vezes com posterior secagem em temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol. O pellet foi ressuspendido em 50uL de tampão TE 0,1M EDTA. Após a extração, a quantificação do material foi realizada em gel de agarose 1%, visualizado em transluminador de luz ultravioleta com auxílio do sistema de fotodocumentação Syngene (Synoptics Ltda, Cambridge, United Kingdom). Após a extração, o DNA total foi diluído para 10X ou 20X com água Milli-Q para ser usado nas reações de PCR.

3.3 Seleção dos marcadores

Inicialmente foi realizado um teste de amplificação com 14 pares de iniciadores universais de regiões não codificadoras do DNA plastidial (cpDNA) descritos no estudo de Shaw et al. (2007)(Tabela 3). Este teste teve como objetivo verificar a viabilidade de amplificação e sequenciamento, bem como a variabilidade dessas regiões. Para esse teste, foram utilizados seis indivíduos de quatro espécies do gênero *Brasiliorchis*. As regiões que apresentaram maior facilidade de amplificação e

variabilidade foram selecionadas e sequenciadas com todos os indivíduos amostrados no trabalho. Também foram utilizados no estudo os espaçadores internos do DNA nuclear ribossomal (nrDNA) (incluindo ITS1-2), que separam os genes 18S, 5,8S e 26S. A escolha desses marcadores nucleares foi baseada em estudos prévios para outros gêneros da subtribo Maxillariinae (e.g.WHITTEN, 2007;KOEHLERet al., 2008).

Tabela 3 - Nome e sequência dos iniciadores de cloroplasto (SHAW et al,, 2007) e nuclear (SUN et al., 2004) testados para amplificação e sequenciamento para espécies do gênero *Brasiliorchis*e duas do grupo externo

Nome	Sequência
rpL14	AAG GAA ATC CAA AAG GAA CTC G
rpL36	GGR TTG GAA CAA ATT ACT ATA ATT CG
petL	AGT AGA AAA CCG AAA TAA CTA GTT A
psbE	TAT CGA ATA CTG GTA ATA ATA TCA GC
psbJ	ATA GGT ACT GTA RCY GGT ATT
petA	AAC ART TYG ARA AGG TTC AAT T
accD	AAT YGT ACC ACG TAA TCY TTT AAA
psaI-75R	AGA AGC CAT TGC AAT TGC CGG AAA
trnV(UAC)x2	GTC TAC GGT TCG ART CCG TA
ndhC	TAT TAT TAG AAA TGY CCA RAA AAT ATC ATA TTC
ndhJ	ATG CCY GAA AGT TGG ATA GG
TabE	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC
trnT(GGU)-R	CCC TTT TAA CTC AGT GGT AG
atpI	TAT TTA CAA GYG GTA TTC AAG CT
atpH	CCA AYC CAG CAG CAA TAA C
trnQ(UUG)	GCG TGG CCA AGY GGT AAG GC
rpS16x1	GTT GCT TTY TAC CAC ATC GTT T
rpS16x2F2	AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC
trnK(UUU)x1	TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC
ndhAx1	GCY CAA TCW ATT AGT TAT GAA ATA CC
ndhAx2	GGT TGA CGC CAM ARA TTC CA
rpL32-R	CCA ATA TCC CTT YYT TTT CCA A
ndhF	GAA AGG TAT KAT CCA YGM ATA TT
trnL(UAG)	CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT
rpL32-F	CAG TTC CAA AA A AAC GTA CTT C
trnG(UUC)*	GAA TCG AAC CCG CAT CGT TAG
trnS(GCU)*	AAC TCG TAC AAC GGA TTA GCA ATC
ITS 1	ACG AAT TCA TGG TCC GGT GAA GTG TTC G
ITS 2	TAG AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA C

3.4 Amplificação e Sequenciamento

As condições de amplificação dos iniciadores foram otimizadas conforme necessário, considerando a temperatura de anelamento, concentração de $MgCl_2$ e do DNA molde. Para as regiões do genoma de plastídio foram utilizados os iniciadores descritos por Shaw et al. (2007) e para as regiões ITS1-2 os iniciadores descritos por Sun et al. (1994). As reações foram conduzidas em um volume total de 50 uL de um coquetel contendo 10X buffer (Thermo Scientific, Burlington, Canadá) constituído de 100mM Tris-HCl (pH 8.8), 500mM KCl, 0.8% (v/v) Nonidet P40; 4mM de $MgCl_2$; 3mM de dNTPs (Ludwig Biotec, Rio Grande do Sul, Brasil); 10 pmol de cada iniciador (1uL de cada); 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific) e DNA molde (10-100ng). Somente para a amplificação de ITS1-2 foi adicionado ao mix (12uL)de uma solução saturada de Betaína 5M, sendo que essa solução relaxa a estrutura secundária do DNA e aumenta a eficiência da amplificação de PCR.

Para as regiões de cloroplasto selecionadas e para as regiões ITS1-2, foi utilizada a estratégia de amplificação "*hot start*", na qual é feita a desnaturação do DNA total com uma temperatura mais altae em seguida é feita uma pausa para a adição da *taq* polimerase. O programa "*hot start*" resultou na amplificação mais específica e maior concentração dos produtos de PCR em relação aos outros programas testados e, foi, portanto, escolhido para a realização do trabalho porque devido às amostras terem sido sequenciadas no exterior, foi necessário enviar produtos de PCR com alta concentração, no mínimo 40 ng, segundo orientação da empresa que realiza o sequenciamento.

As reações foram realizadas no termociclador Multigene Thermal Cycler (Labnet International, Inc.). As condições para amplificação das regiões de cloroplasto e ITS 1-2 são apresentadas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. O sucesso da reação foi verificado em gel de agarose 1%, contendo tampão TBE 1X e 2,0 uL de brometo de etídeo, por 45 minutos a 90V. Foi utilizado o marcador Low Mass Ladder (Invitrogen™, Life Technologies, São Paulo, Brasil) para estimar a concentração dos produtos de amplificação (Figura 7).

Os produtos de PCR foram sequenciados pela Macrogen Inc., Korea. Foi enviado para sequenciamento 40 uL de cada amostra. Como o volume final de cada reação é de 50 uL, foram realizadas duas reações de amplificação para cada amostra porque o sequenciamento foi feito em ambas as direções usando o

*forward*e *reverse* de cada par de iniciador. As reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático ABI 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Tabela 4 - Protocolo da reação de amplificação para sequenciamento de DNA das regiões de cloroplasto *psbJ-petA* e *atpL-atpH*para*Brasiliorchis*spp.

95 ºC	5 min	
80 ºC	adição da *taq*	
94 ºC	1min	
50 ºC	30 s	*repetir etapas 3-5 30X*
72º C	30 s	
72º C	2 min	

Tabela 5 - Protocolo da reação de amplificação para sequenciamento de DNA da região *ITS 1-2*para*Brasiliorchis*spp.

99 ºC	10 min	
80 ºC	adição da *taq*	
94 ºC	45 s	
60 ºC	45 s	*repetir etapas 3-5 30X*
72º C	1 min	
72º C	3 min	

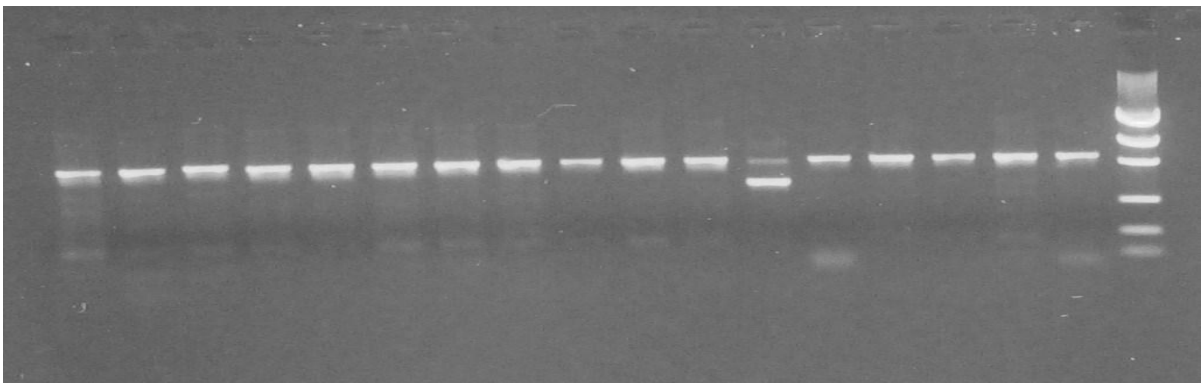


Figura 7 - Resultado da reação de amplificação da região não codificadora de cloroplasto *atpL-atpH*. para*Brasiliorchis*spp. A última canaleta corresponde ao marcador Low Mass DNA ladder

3.5 Análises de dados

3.5.1. Edição e alinhamento das sequências

As sequências obtidas foram editadas no programa Chromas Lite© (2005 Technelysium Pty Ltda), sendo os trechos de baixa qualidade excluídos da análise. Sequências complementares foram pareadas com auxílio do software SeqMan Pro 7.0 (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA). Posteriormente, foi realizado o alinhamento das sequências utilizando o algoritmo de alinhamento múltiplo com dois softwares diferentes: Clustal W (THOMPSON et al., 1994) e Muscle (EDGAR, 2004), ambos implementados no programa eBioX v. 1.5.1 (LAGERCRANTZ, 2008). As sequências obtidas serão depositadas no GenBank.

O número de sítios variáveis, conservados e parcimoniosamente informativos, assim como a composição de nucleotídeo para cada matriz de dados alinhada das diferentes regiões utilizadas no estudo foi obtido através do programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011).

3.5.2 Análises filogenéticas

As árvores filogenéticas foram construídas com o método deinferência bayesiana (IB) e máxima parcimônia (MP). As análises foram realizadas separadamente para a matriz com os dados da região do DNA nuclear (ITS1-2) e com os dados combinados das regiões de cloroplasto. Também foram realizadas análises com os dados concatenados das regiões de cloroplasto com a nuclear. As matrizes foram concatenadas no programa Mesquite, v. 2.75 (MADDISON; MADDISON, 2011).

As análises bayesianas foramrealizadas noprograma MrBayesv.3.14 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003), considerando Cadeias de Markov Monte Carlo, geradas pelo algoritmo Metropolis-Hastings.A seleção do modelo de evolução foi realizada utilizando o Critério de Informação Akaike (AIC), com auxílio do programa jModelTestv.0.1.1 (POSADA, 2008).Para a análise bayesiana particionada foram utilizados modelos de evolução independentes para a região de cpDNA e ITS.

Foram realizadas duas análises em paralelo, considerando cada uma das quatro cadeias MCMC (uma fria e três quentes) e 5.000.000 de gerações,

amostrando-se a cada 100. Foi avaliada a convergência para uma distribuição estacionária dos parâmetros amostrados pelas análises examinando a média dos desvios padrão da verossimilhança entre as duas corridas, estabelecida para menor que 0.01. Também foi utilizado oprograma Tracer v. 1.5.0 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2011) para verificar a convergência de todos os parâmetros amostrados nas corridas das cadeias de MCMC. Os primeiros 25% das árvores iniciais referidas como 'burn-in' foram descartados e uma árvore de consenso foi obtida.

As análises de MP foram realizadas através do programa TNT (GOLOBOFF, 2008). Primeiramente, foram feitas buscas heurísticas com a estratégia *tradicional search*(GOLOBOFF et al., 2003). Árvores de Wagner foram inicialmente obtidas pelo algoritmo *stepwise addition* com 10.000 replicações, seguidas de rearranjos de ramos(*branch swapping*) do tipo *tree bisection and reconnection* (TBR), salvando 100 árvores por réplica. Também foram realizadas análises com os métodos incorporados no programa TNT denominados de novas tecnologias para verificar se um comprimento de árvore menor seria encontrado (GOLOBOFF, 1999; NIXON, 1999). Para tal foram realizadas análises combinandoas estratégias*tree-fusing*, *tree-drifting* e *sectorial search*, o último com *Random Sectorial Searches* (RSS) e *Consensus-Based Sectorial Searches* (CSS). Todas as análises consideraram parâmetros padrão do programa.A confiabilidade dos clados obtidos foi inferida através do método de reamostragem de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985) com 1000 replicações. Os valores de *bootstrap* considerados nesse estudo foram: fraco (50-74%), moderado (75-84%) e forte (85-100%) (WHITTEN; WILLIAMS; CHASE, 2000).

A visualização das árvores obtidas pelas análises bayesianas e de máxima parcimônia foram realizadas no programa FigTree v 1.3.1 (RAMBAUT, 2009) e TreeViewX v 0.5.0 (PAGE, 1996), respectivamente. A edição das árvores foi feita pelo editor de desenhos Inkscape v 0.48.4.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterizações de regiões estudadas

Das 14 regiões deDNA plastidial (cpDNA) inicialmente testadas, sete apresentaram maior facilidade de amplificação e variação das sequências, mostrando-se úteis para resolver as relações dentro de '*Brasiliorchis*'. Para esse estudo, foram selecionados dois espaçadores intergênicos (*psbJ-petA* e *atpl-atpH*) por apresentarem maior variação entre as regiões inicialmente testadas. Além dessas duas regiões plastidiais, também foi utilizada a região do DNA nuclear ribossomal (ITS1-2). A escolha destes marcadores foi baseada pela frequente utilização dos mesmos em estudos filogenéticos na família Orchidaceae (KOEHLER, et al., 2008; KENNEDY; WATSON, 2010).

A matriz alinhada de sequências plastidiais resultou em 1614 pb (ClustalW) e 1624 pb (Muscle), sendo 869 pb da região *psbj-petA*e 745 pb da região *atpl-atpH* (ClustalW), e 878 pb (*psbj-petA*)e 746 pb (*atpl-atpH*) para o alinhamento Muscle (Tabela 6). Duas sequências para a região*atpl-atpH*, correspondentes às amostras *6053* e *2732*, foram excluídas devido a baixa qualidade dos eletroferogramas obtidos. Portanto, para as análises filogenéticas com os dados combinados, elas foram consideradas como dados faltantes. Para a região nuclear ITS foram obtidas sequências de comprimento variando 758-786 pb, sendo o comprimento da matriz alinhada de 796 pb (ClustalW) e 798 (Muscle).

Informações adicionais para os dois alinhamentos utilizados (Muscle e ClustalW) estão apresentadas na Tabela 6. A região *psbj-petA* foi a que apresentou maior número de caracteres, seguida pela região ITS. Jáa região *atpl-atpH* apresentou o menor número de caracteres.

Tabela 6 - Informações de dados dos alinhamentos com as duas regiões de DNA plastidial e daregião nuclear sequenciado para 96 amostras do gênero *Brasiliorchis* e mais duas espécies do grupo externo

	Muscle			**ClustalW**		
Característica	*ITS*	*psbj-petA*	*atpl-atpH*	*ITS*	*psbj-petA*	*atpl-atpH*
Comprimento do alinhamento (pb)	798	878	746	796	869	745
Sítios variáveis (pb)	116	84	42	120	81	42
Sítios conservados (pb)	674	752	678	670	754	677
Sítios parcimoniosamente informativos	75	32	22	75	31	22
% T	18,7	34,0	32,4	18,7	34	32,4
% C	26,2	15,6	11,6	26,2	15,6	11,6
% A	21,4	36,4	37,9	21,4	36,4	37,9
% G	33,7	14,0	18,0	33,7	14,0	18,0

4.2 Análises filogenéticas

4.2.1 Cloroplasto

Análises bayesianas

O modelo de evolução de melhor ajuste selecionado pelo programa jModeltest v.0.1.1 (POSADA, 2008) utilizando o Critério de Informação Akaike (AIC) foi o modelo denominado TVM+I+G. Os valores dos parâmetros desse modelo considerados na análise são apresentados na Tabela 7.

As análises bayesianas para os dados de cloroplasto obtidas a partir dos alinhamentos Muscle (Figura 8) e ClustalW (Anexo D), apresentaram topologias similares. A espécie *B. schunkeana* é a mais distante de todos os outros táxons amostrados e irmão do clado (A), grupo com 96% de probabilidade posterior (PP) composto por *B. consanguinea* e alguns indivíduos de *B. picta*. No clado (B) são observados todos os outros espécimes de *Brasiliorchis* amostrados. Dentro deste clado observa-se uma politomia basal que inclui indivíduos de *B. porphyrostele* e *B. picta*, além do clado C.

No clado C observa-se uma politomia basal que inclui todas as amostras identificadas como *B. gracilis*; outro grupo de amostras de *B. porphyrostele* da região de Lages (SC); alguns indivíduos de *B. picta*e uma amostra que identificamos como *B. ubatubana* da região de Ubatuba (SP). Também dentro do clado C observam-se dois clados mais inclusivos. O clado (D), composto porindivíduos de *B. picta* e um de *B. ubatubana*. E o clado (E) com (78% PP),que incluio clado (F)(99% PP), constituído por um cladomorfologicamente distinto e com 100% PP referente à espécie *B. barbozae*. O clado 2, irmão ao clado 1, inclui indivíduos da espécie*B. marginata*. Irmão ao clado (F) tem-se o clado (G), que inclui indivíduos de*B. ubatubana* + *B. picta* em uma politomia basal e o clado (H). No clado (H) observa-se uma politomia com o restante das amostras de *B. marginata*,a espécie *B. kautskyi* e um grupo de amostras identificadas como*B. chrysantha* e o clado (I), constituído pela espécie *B. phoenicanthera* e uma amostra de *B. picta.*

Tabela 7–Valores dos parâmetros dos modelos de substituição selecionados pelo Critério de informação Akaike (AIC)utilizados nas análises bayesianas. São apresentados dois modelos, um para os dados combinados das duas regiões de plastídeos e outro modelo para a região nuclear (ITS)

	plastídeo	*ITS*
Parâmetros / Modelo	TVM+I+G	TIM2+I
r_{AC}	0.702	2.964
r_{AG}	0.401	8.144
r_{AT}	0.104	2.964
r_{CG}	0.260	1.000
r_{CT}	0.401	19.16
r_{GT}	1.000	1.000
f_A	0.38	0.21
f_C	0.13	0.26
f_G	0.14	0.33
f_T	0.33	0.18
p_{inv}	0.73	0.58
α	0.78	-

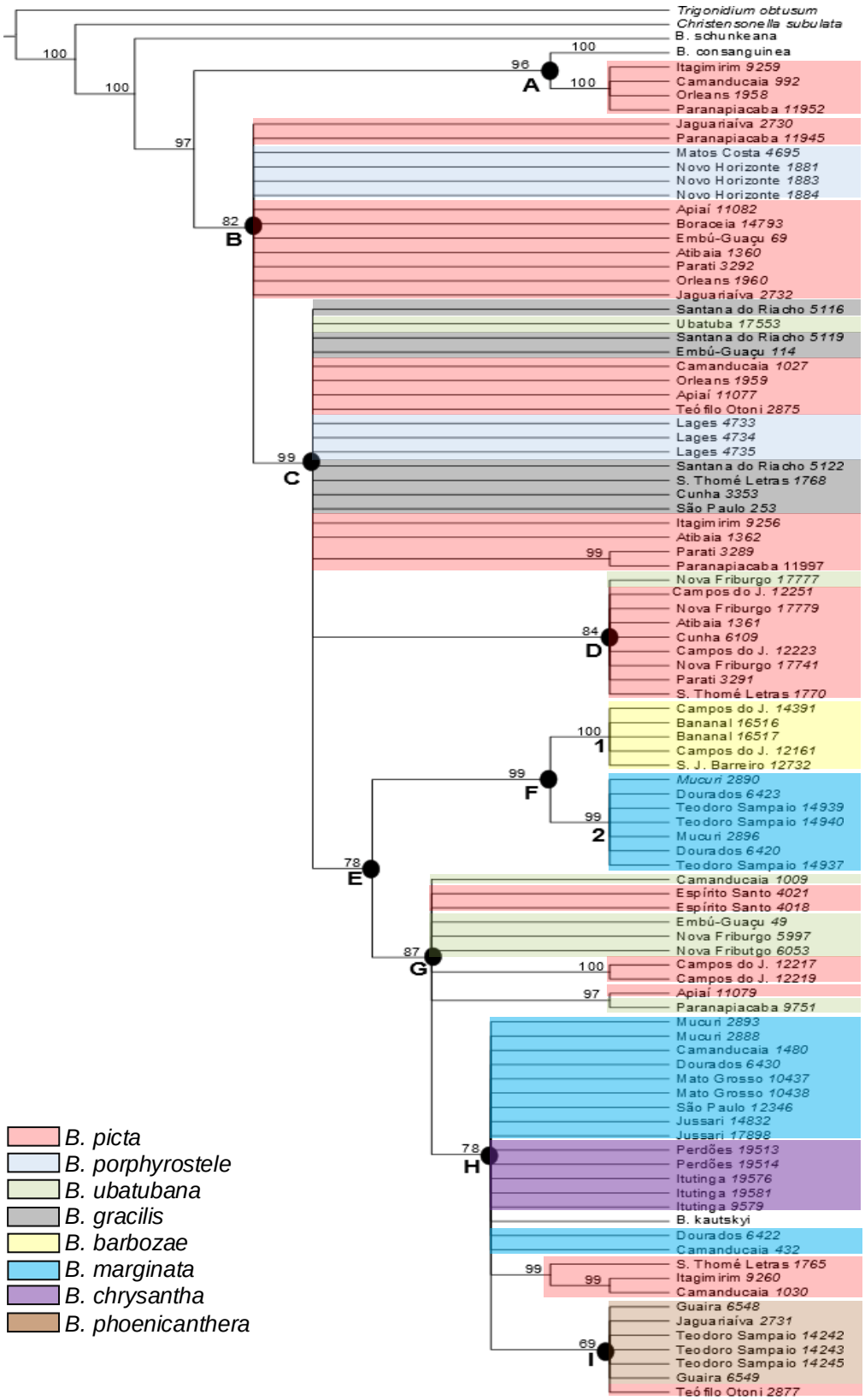


Figura 8 – Árvore bayesiana dos dados combinados das duas regiões de plastídios *psbj-petA* e*atpI-atpH* obtidas com o alinhamento Muscle. Valores de probabilidade posterior são mostrados acima dos ramos. Os nomes das amostras indicam a região de coleta seguida pelo número de registro de acordo com a Tabela 2

Análises de máxima parcimônia

A análise de MP da matriz com os dados combinados das duas regiões de plastídios, obtidas do alinhamento com o programa Muscle, resultou em 400 árvores mais parcimoniosas (MPTs) com comprimento de 147 passos, apresentando índice de consistência (IC) de 0.782 e índice de retenção (IR) de 0.941.Esses resultados foram obtidos utilizando-se a estratégia de busca heurística tradicionais. Posteriormente, realizamos uma análise combinada utilizando os métodosde novas tecnologias (*tree-fusing*, *tree-drifting* e *sectorialsearch*),mas não foi encontrada nenhuma árvore com comprimento menor a obtida pelo método anterior. Para a matriz de dados obtida do alinhamento utilizando o programa ClustalW, foram encontradas 400 MPTs com comprimento de 158 passos, índice de consistência (IC) de 0.797 e índice de retenção (IR) de 0.941. A análise da matriz concatenada alinhada pelo programa ClustalW e utilizando estratégias de novas tecnologias não resultou em nenhuma árvore de menor comprimento.

As reconstruções filogenéticas das análises de MPobtidas a partir dos alinhamentos Muscle (Figura 9) e ClustalW (Anexo E) foram congruentes com as árvores bayesianas, os mesmos clados foram reconhecidos, mas com diferenças nas relações de parentesco entre eles. A espécie *B. schunkeana*, assim como na análise bayesiana, também se mostrou mais distante filogeneticamente em relação às outras espécies do gênero e irmão do clado (J) composto por todas as outras espécies amostradas. Dentro do clado (J) tem-se um clado formado por indivíduos de *B. porphyrostele* e *B. picta* e irmão de todos os outros indivíduos amostrados. Neste segundo clado *B. consanguinea* aparece como irmã dos demais indivíduos. Dentre esses demais indivíduos tem-se o clado (K) que inclui indivíduos de *B. picta*e o clado (L). O clado (L) inclui as espécies *B. picta* e *B. ubatubana*, além de clados congruentes com a análise bayesiana (BI), como o clado (H), incluindo *B. kautskyi*, *B. chrysantha, B. marginata e B. phoenicanthera*. Além disso, também em concordância a análise BI, *B. barbozae* aparece como um grupo monofilético irmão de alguns indivíduos de *B.marginata*.

Nas árvores de MP, a politomia basal do clado C, observada nas árvores de BI, é resolvida (clado C) e inclui o clado D, composto por indivíduos de *B. picta* e *B. ubatubana* identificados na análise BI também como clado D.

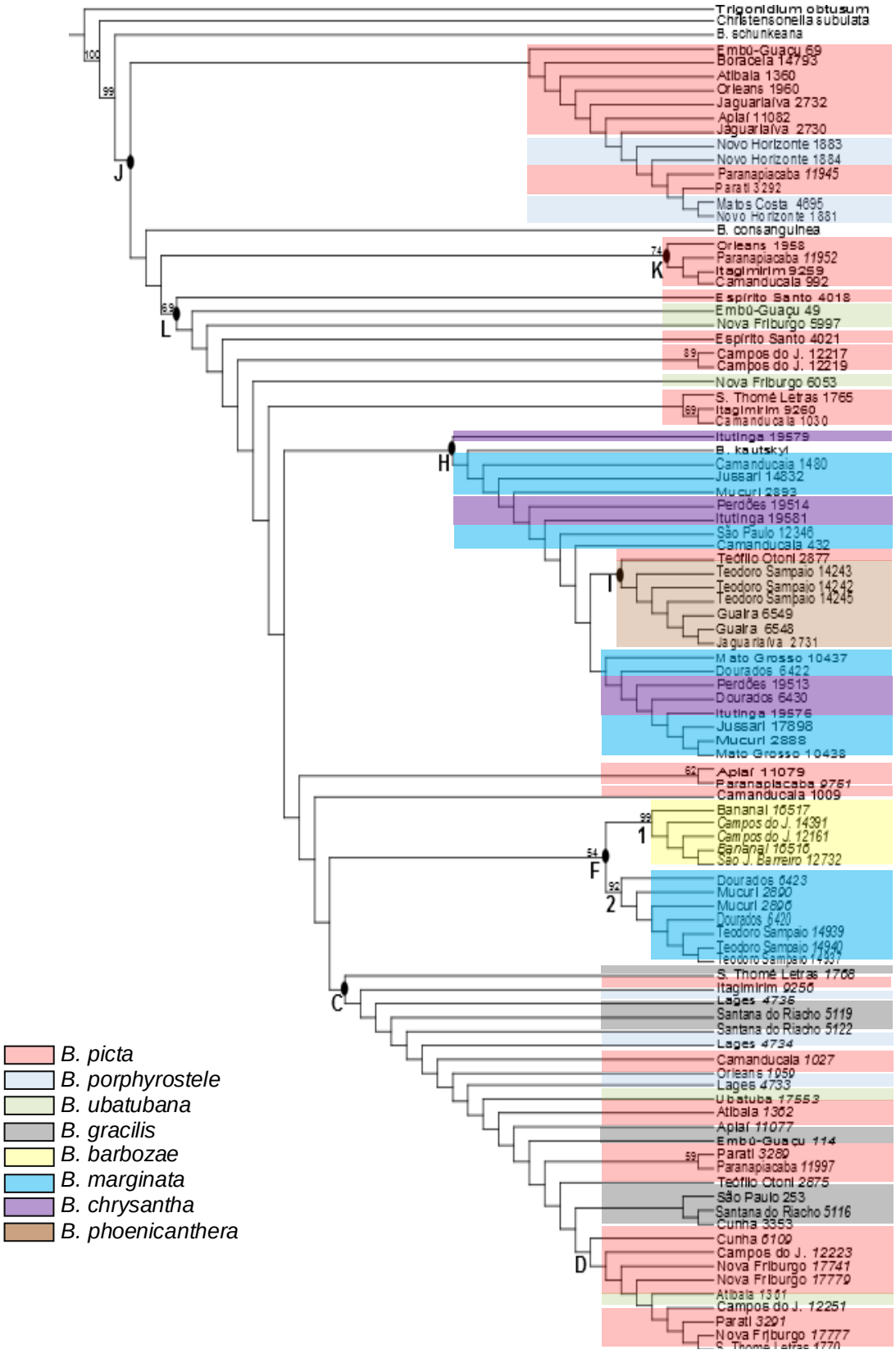


Figura 9 – Uma das árvores mais parcimoniosas obtidas da análise de máxima parcimônia com os dados combinados das duas regiões de plastídios *psbj-petA* e*atpl-atpH* com o alinhamento Muscle. Valores de *bootstrap* são mostrados acima dos ramos. Os nomes das amostras indicam a região de coleta seguida pelo número de registro de acordo com a Tabela 2

4.2.2 ITS

Análises bayesianas

Para a matriz de ITS, o Critério de Informação Akaike (AIC) selecionou o modelo de evolução denominado TIM2-I. Valores dos parâmetros desse modelo são apresentados na Tabela 7.

Asanálises bayesianas com os dados de ITSresultaram em algumas diferenças na topologia comparada à obtida pelos dados de plastídios. Na árvore obtida a partir do alinhamento Muscle (Figura 10), a espécie *B. barbozae* é observada novamente como um grupo monofilético (100% PP), entretanto filogeneticamente distinto das outras espécies amostradas. Além disso, o clado formado por indivíduos de *B. marginata* (clado M) considerado irmão de *B. barbozae* nas análises baseadas nos dados cloroplastidiais, aparece como irmão de todas as espécies amostradas com exceção de *B. barbozae* e *B. schunkeana* (100% PP clado B). O clado (B) apresenta uma politomia basal com todas as amostras identificadas como *B. gracilis*, um espécime da *B. ubatubana* e outro grupo de amostras também identificadas como *B. marginata*. Além disso, este clado apresenta quatro clados adicionais (clados N, I, O e P). O clado (N) é constituído de todos os acessos coletados da espécie *B. chrysantha* e uma amostra de *B. picta*. O clado (I) (com 100% PP) é constituído por todas as amostras da espécie *B. phoenicanthera* e um espécime de *B. picta*. Já o clado (O) apresenta a espécie*B. kautskyi e* indivíduos de*B. picta*. O clado (P)contém a espécie *B. consanguinea*, todos osindivíduosamostrados da espécie *B. porphyrostele* e o restante dos indivíduos amostrados de *B. picta*, *B. ubatubana*, e*B. marginata*. Na árvore obtida a partir do alinhamento ClustalW (Anexo F) pode-se visualizar os mesmos clados obtidos com o alinhamento Muscle.

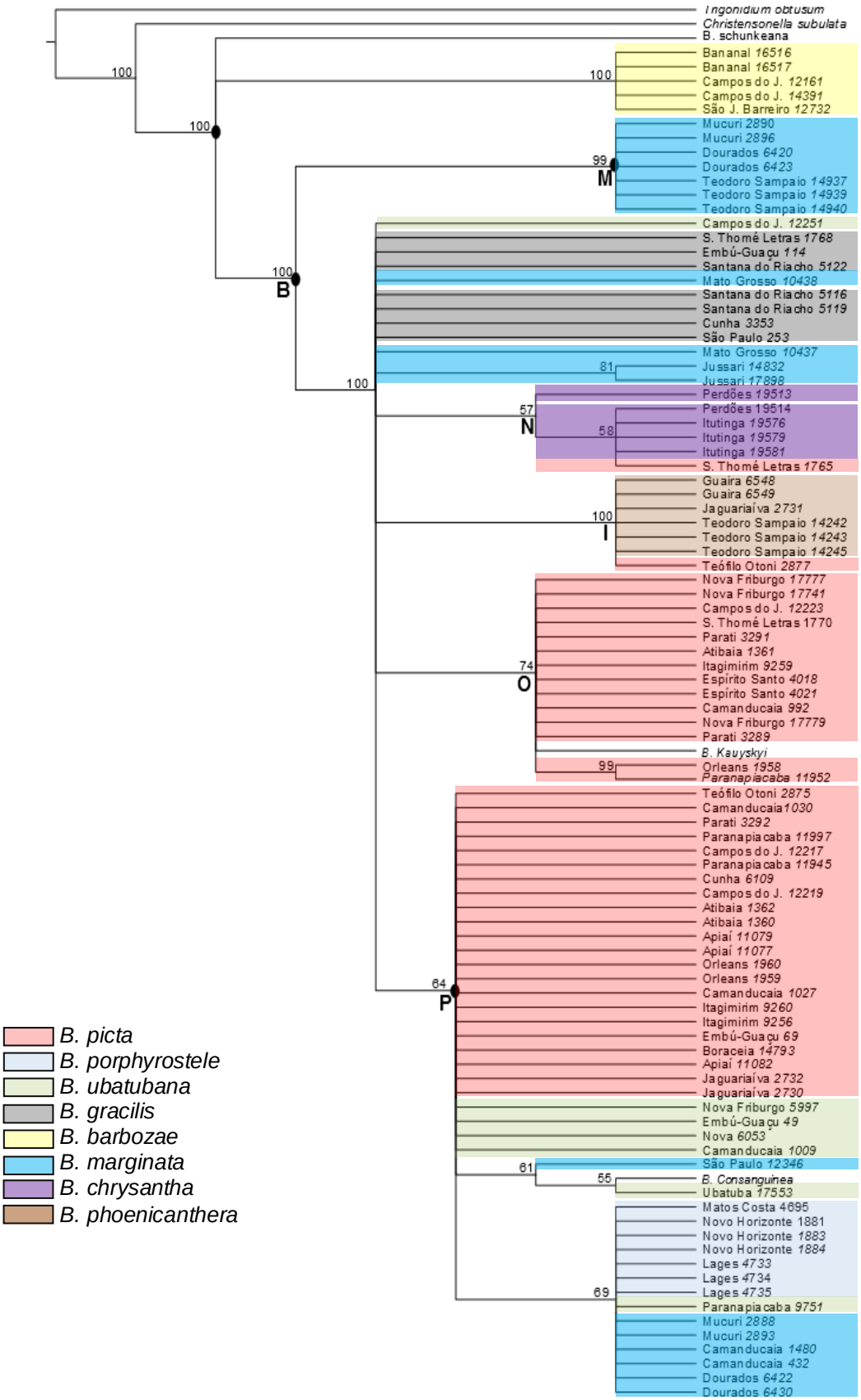


Figura 10 - Árvore bayesiana com o conjunto de dados de ITS obtidos com o alinhamento Muscle. Valores de probabilidade posterior são mostrados acima dos ramos. Os nomes das amostras indicam a região de coleta seguida pelo número de registro de acordo com a Tabela 2

Análises de máxima parcimônia

Análises de máxima parcimônia dos dados de ITS, obtidos do alinhamento com o programa Muscle, resultaram em 6.580 árvores mais parcimoniosas (MPTs) com comprimento de 134 passos, índice de consistência (IC) de 0.925 e índice de retenção (IR) de 0.978. Esses resultados foram obtidos utilizando a estratégia de busca heurística tradicional. As análises utilizando os métodos *de nova tecnologia* (*tree-fusing*, *tree-drifting* e *sectorialsearch*) foram combinadas no programa TNT, mas não foi encontrada nenhuma árvore com comprimento menor que 134 passos. Para o alinhamento obtido utilizando o programa ClustalW, foram encontradas 6.650 MPTs com comprimento de 140 passos, índice de consistência (IC) de 0.929 e índice de retenção (IR) de 0.978. O teste com as análises combinadas utilizando novas tecnologias não encontrou nenhuma árvore com menor comprimento. As reconstruções filogenéticas obtidas pela máxima parcimônia com os dados de ITS Muscle (Figura 11) e ClustalW (Anexo G) recuperaram os clados já observados nas análises bayesianas, com algumas pequenas diferenças não significativas.

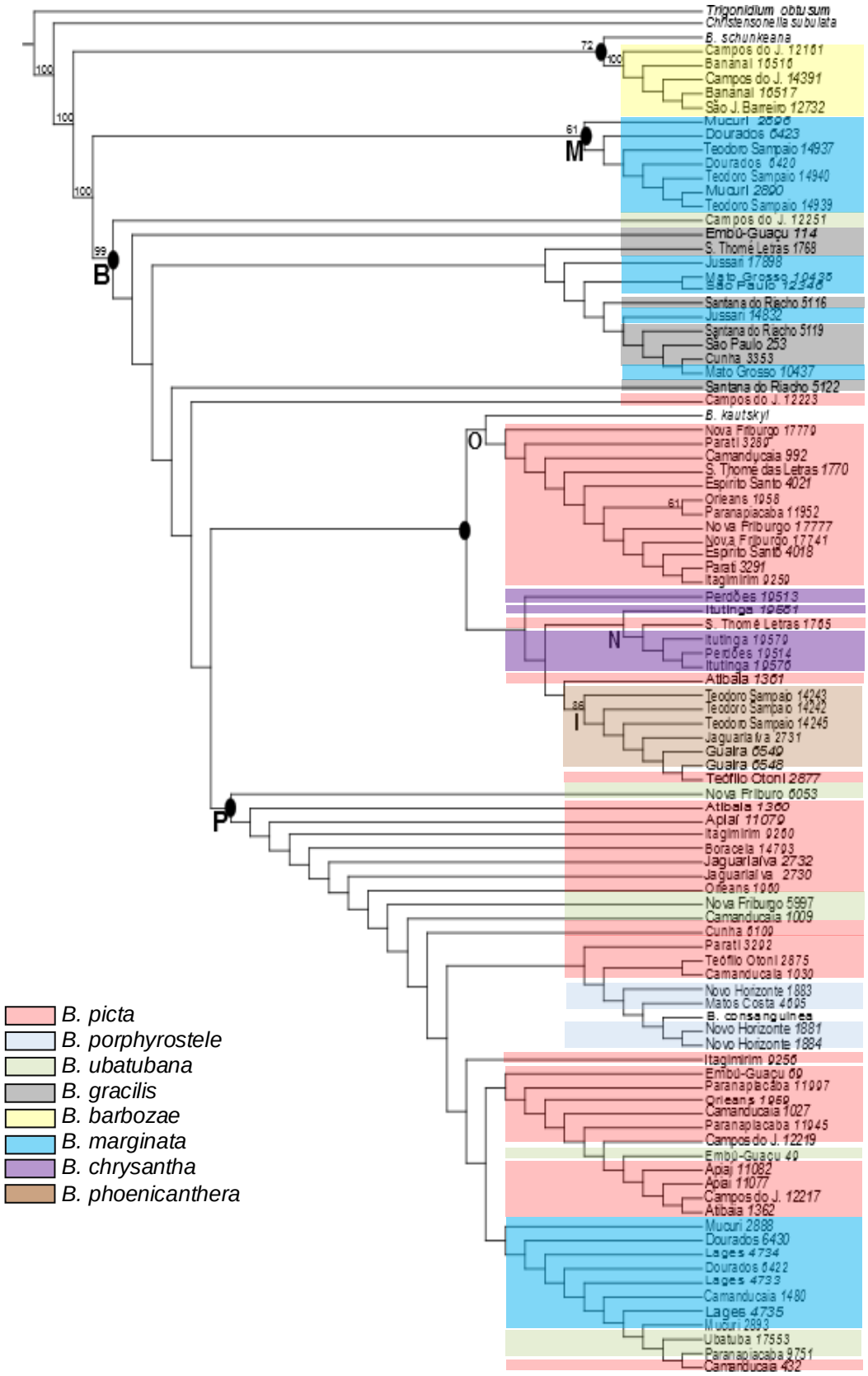


Figura 11 – Uma das árvores mais parcimoniosas obtida da análise de máxima parcimônia a partir do conjunto de dados de ITS com o alinhamento Muscle. Valores de *bootstrap* são mostrados acima dos ramos. Os nomes das amostras indicam a região de coleta seguida pelo número de registro de acordo com a Tabela 2

4.2.3 Dados concatenados das regiões ITS e cloroplasto

Com base na avaliação visual das topologias obtidas pelos conjuntos de dados separados de ITS, *psbj-petA* e*atpl-atpH*, não foram detectadas incongruências significativas entre as regiões de plastídios e nuclear, por isso também optamos por realizaras análises com os dados concatenados dessas regiões. Para a matriz concatenada da região nuclear e de cloroplasto, o alinhamento total obtido pelo programa Muscle constituiu de 2.422 (pb) e com o programa ClustalW foi de 2.410 (pb).

Na árvore obtida a partirda análise bayesiana com os dados concatenados (Figura 12), a espécie *B. schunkeana* aparece como irmã de todos os outros indivíduos amostrados (97% PP). Dentre estes, a espécie *B. barbozae* aparece como grupo monofilético(100% PP) irmão dos outros indivíduos amostrados (clado B, 99% PP).Diferentemente das análises apresentadas anteriormente, quatro indivíduos da espécie *B. gracilis*aparece com um grupo monofilético(84% PP) e com exceção da amostra (3353), os outros seis indivíduos desta espécie aparecem como irmãs das outras espécies do complexo *B. picta*.Dentro do clado (B) tem-se o clado (C), que inclui ainda os clados (A) e (D).Tambémfoi reconhecido o clado (G), que é correspondenteao observado nas análises com os dados de plastídios, no entanto, com maior resolução e commaiores valores de probabilidade posterior.

A análise de máxima parcimônia com os dados concatenados utilizando a estratégia de busca heurística tradicionalresultou em 16.390 (MPTs) com comprimento de 308 passos, índice de consistência (IC) de 0.782 e índice de retenção (IR) de 0.932. A árvore filogenética com os dados concatenados da análise de MP (Figura 13) foi congruente com a árvore produzida pela inferência bayesiana, com algumas diferenças pouco significativas.

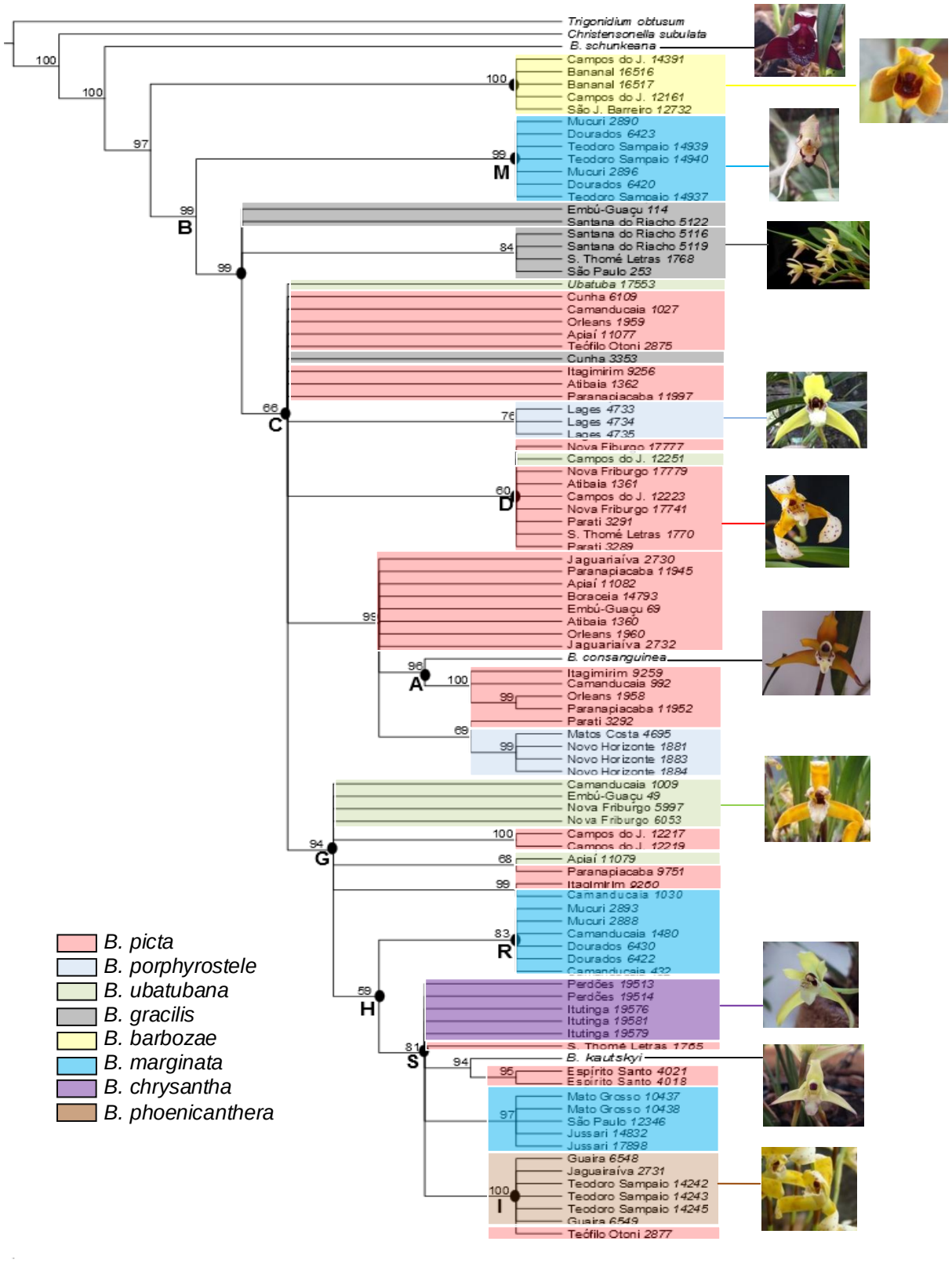


Figura 12 – Árvore bayesiana com o conjunto de dados concatenados da região nuclear e de plastídios. Valores de probabilidade posterior são mostrados acima dos ramos. Os nomes das amostras indicam a região de coleta seguida pelo número de registro de acordo com a Tabela 2

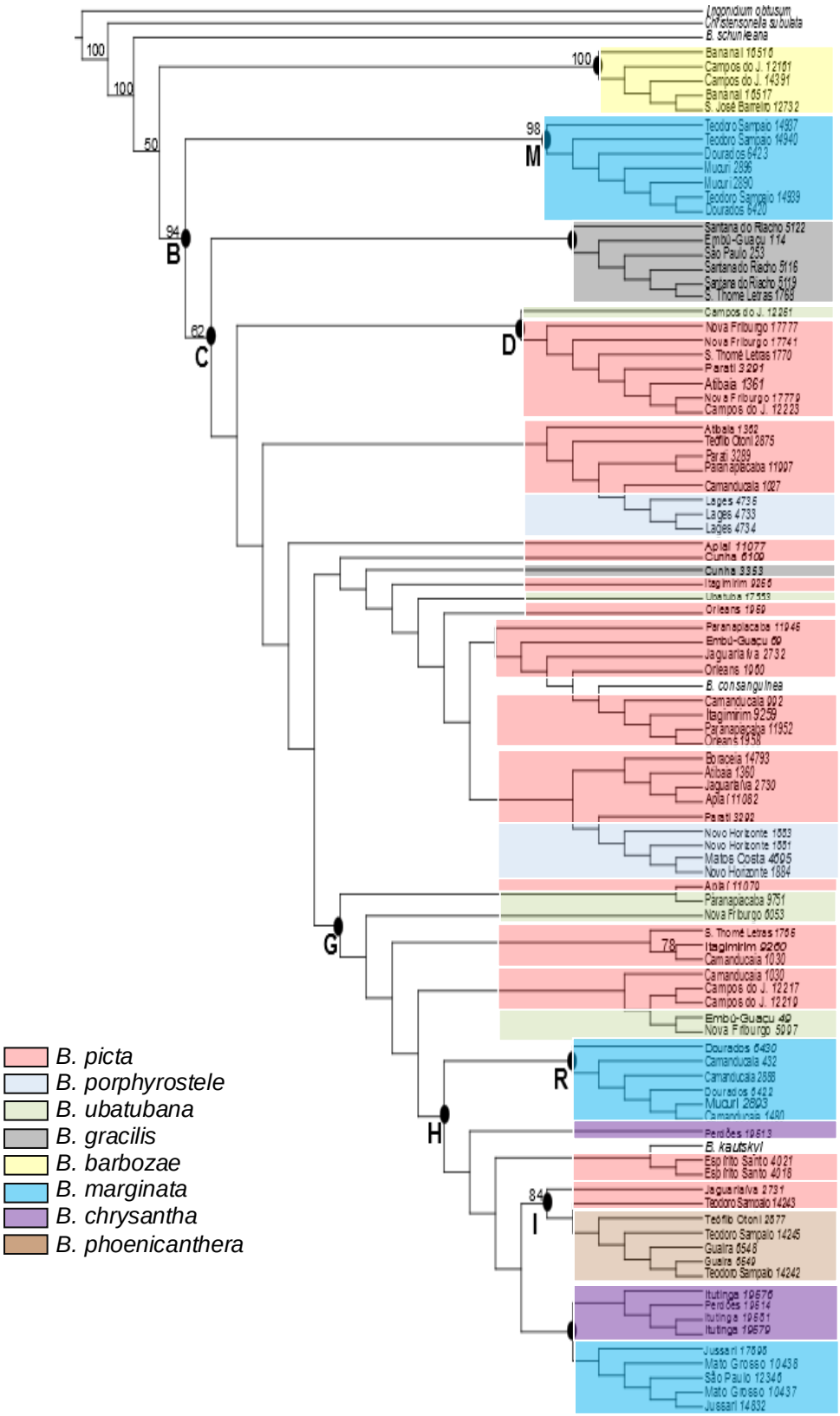


Figura 13 – Uma das árvores mais parcimoniosas obtidas com o conjunto de dados concatenados da região nuclear e de plastídios. Valores de *bootstrap* são mostrados acima dos ramos. Os nomes das amostras indicam a região de coleta seguida pelo número de registro de acordo com a Tabela 2

Em todas as análises utilizando a (IB) e (MP) com os dados de ITS e de plastídios separados e concatenados,*B. schunkeana* se apresenta como irmã de todas as outras espécies do gênero.A espécie *B. barbozae* constitui um grupo monofilético claramente distinto, e possivelmente irmão das espécies do complexo do complexo *B. picta*. A espécie *B. gracilis*, embora na análise com os dados concatenados da (IB) quase todos os indivíduos (com exceção da amostra 3353) apresentaram-se como irmãos das espécies do complexo *B. picta*, ela não foi reconhecida como um grupo monofilético.As espécies morfologicamente homogêneas pertencentes ao complexo *B. picta* (*B. chrysantha*, *B. marginata*, *B. porphyrostele*, *B. ubatubana, B. phoenicanthera* e *B. picta*) não formaram clados monofiléticos distintos.Jáas espécies*B. kautskyi* e *B. consanguinea*, embora sejam morfologicamente distintas,se agruparam nos clados formados pelas espécies do complexo *B. picta*.

5 DISCUSSÃO

Pretendeu-se com esse trabalho desenvolver uma filogenia molecular parao gênero *Brasiliorchis* com o objetivo de delimitaras espécies dentro desse grupo. Para tal, três perguntas foram levantadas.

A primeira questão buscou verificar se as espécies reconhecidas por Barros et al. (2013) constituem grupos monofiléticos distintos. De acordo com a amostragem deste estudo, podemos reconhecer apenas *B. barbozae* como um clado, que apareceu fortemente suportado em todas as análises. Não foi possível testar o monofiletismo das espécies *B. schunkeana*, *B. consanguinea* e *B. kautskyi* porque apenas um indivíduo de cada foi amostrado. Para todas as outras espécies as análises não corroboraram seu monofiletismo.

A espécie *B. gracilis*, indicada no estudo de Pinheiro e Barros (2009) como morfologicamente distinta, não é recuperada como um grupo monofilético, com alguns indivíduos mostrando-se filogeneticamente mais próximos de indivíduos pertencentes ao complexo *B. picta*. Entretanto, na análise bayesiana com dados concatenados (Figura 12), os indivíduos amostrados de *B. gracilis* emergem como três linhagens irmãs das outras espécies do complexo *B. picta*. É possível que com a análise de marcadores mais informativos e/ou com uma maior amostragem, *B. gracilis* seja corroborada como uma espécie monofilética, e irmã das outras do complexo *B. picta*. *B. gracilis* difere das outras do gênero pelo seu tamanho, sendo morfologicamente menor do que qualquer outra espécie do grupo com exceção de *B. barbozae*. As flores são amareladas com sombras de vermelho na parte externa das sépalas e pétalas e possuem labelo com séries longitudinais de pontinhos avermelhados (HOEHNE, 1953).

Na segunda pergunta testamos se as espécies consideradas morfologicamente homogêneas no estudo de Pinheiro e Barros (2009) correspondem a um grupo monofilético exclusivo. Nossos resultados não sugerem que o complexo *B. picta* (*B. chrysantha*, *B. marginata*, *B. picta*, *B. porphyrostele* e *B. ubatubana*) seja um grupo monofilético exclusivo. As espécies estudadas por Pinheiro e Barros (2009), denominadas *B. marginata*, *B. porphyrostele* e *B. ubatubana*, apresentaram uma tendência para agrupamento nas análises morfométricas, mas com sobreposição de indivíduos de espécies diferentes. Já as espécies *B. picta* e *B. chrysantha*apresentaram a maior variação morfológica e indivíduos agrupados com

outras espécies (PINHEIRO; BARROS, 2009). Esses resultados foram confirmados com as análises filogenéticas realizadas neste estudo, que não corroboram com a atual delimitação dessas espécies. As análises filogenéticas não recuperaram grupos monofiléticos referentes às espécies*B. marginata*, *B. porphyrostele*, *B. ubatubana, B. picta* e *B. chrysantha.*

Em todas as análises moleculares, amostras da espécie *B. marginata* formaram um clado fortemente suportadocom sete amostras, irmão da espécie *B. barbozae*. A relação de grupo irmão entre *B. barbozae* e *B. marginata* foi fortemente apoiada em praticamente todas as análises, no entanto não existem evidências de semelhanças morfológicas florais entre essas duas espécies (HOEHNE, 1953; PABST e DUNGS, 1977). O restante das amostras de *B. marginata* se agrupou com outras espécies do gênero, na análise com os dados de cloroplasto, elas formaram um clado parafilético juntamente com a espécie *B. chrysantha*, *B. picta*, *B. kautskyi* e *B. phoenicanthera*. Na análise com ITS, um grupo de amostras de *B. marginata* também formou um clado parafilético com as espécies citadas acima e mais as amostras de *B. graclis* e outro grupo de amostras formou um clado juntamente com as amostras de *B. porphyrostele* e uma amostra de *B. ubatubana*. Pinheiro e Barros (2009) sugerem que o longo rizoma de *B. marginata* permite que ela se propague em diferentes hábitats e apresente formas vegetativas variadas, isso influenciou a diversidade morfológica obtida nas análises e dificultou na identificação de espécies, que tiveram sobreposição com os indivíduos *de B. picta* e *B. chrysantha* (PINHEIRO; BARROS, 2009). Além disso, a espécie *B. marginata*, juntamente com a *B. picta*, apresenta a maior distribuição geográfica do gênero, ela ocorre desde o Sul até o estado da Bahia.

Indivíduos da espécie *B. picta* ocorreram em divergentes clados, se agrupando com as outras espécies do gênero: *B. phoenicanthera*, *B. marginata*, *B. chrysantha*, *B. ubatubana*, *B. porphyrostele* e *B. gracilis*. Hoehne (1953) relata a semelhança dessa espécie com outras do grupo, como a *B. chrysantha* e *B. phoenicanthera*, mas suas inflorescências altas, as flores grandes, vistosas e ornamentais, por dentro amarelo-alaranjadas e o exterior com desenhos irregulares de pintas e manchas que constituem faixas transversais, além do retorcimento das sépalas laterais e pétalas às vezes cruzadas sobre a antera, são detalhes que as distinguem de entre todas. No entanto, esta espécie apresenta grande variação morfológica, algumas das características que definem esta espécie variam entre os indivíduos, o que dificulta

na identificação de espécimes dentro do grupo. Esta ampla variação morfológica também foi evidenciada nesse durante as coletas e pode estar associada à ampla distribuição geográfica desta espécie.

A terceira e última pergunta propôs compreender a posição e relação filogenética das espécies não amostradas por Pinheiro e Barros (2009): *B. consanguinea*, *B. barbozae*, *B. kautskyi*, *B. schunkeana* e *B. phoenicanthera*. Os indivíduos identificados como *B. phoenicantheraneste* estudo ficaram agrupados em todas as análises, no entanto, essa espécie não foi reconhecida como monofilética,pois um indivíduo de *B. picta* (2877) em todas as análisesagrupou-se com esses indivíduos de *B. porphyrostele*. Embora *B. phoenicanthera* não tenha sido amostrada no estudo morfológico de Pinheiro e Barros (2009), ela pode ser facilmente reconhecida por suas flores.Estas apresentam sépalas e pétalas por dentro amarelo-claras, externamente um pouco mais pálidas e pintalgadas de pontinhos vermelho-claros até vermelho-sanguíneos (no entanto, não formam zonas transversais como os da *B. picta*), sendo também menores em relação à espécie *B. picta*. Além disso, *B. phoenicanthera* apresenta grande número de flores, o que a torna muito ornamental (HOEHNE, 1953).

O nosso estudo também indica que os indivíduos identificados como *B. consanguinea* e *B. kautskyi* pertençam ao clado referente ao complexo *B. picta*. No entanto, *B. kautskyi*é facilmente diferenciada das outras pelas suas folhas estreitamente lineares e agudas, enquanto que *B. consanguinea*apresentaparte externa das sépalas e pétalas acastanhada e por dentro também ou mais clara, além de serem muito odoríferas e carnosas (HOEHNE, 1953). A morfologia distinta dessas espécies sugere que elas possam corresponder a linhagens evolutivas que se isolaram por seleção natural ou deriva genética de outras populações do complexo *B. picta*.

Conforme mencionado anteriormente,*B. barbozae* constitui um grupo monofilético claramente distinto, e possivelmente irmão das espécies do complexo do complexo *B. picta*. *B. barbozae* é facilmente caracterizada, de acordo com a descrição original dessa espécie.Suas flores são pequenas com labelo laranja e na metade superior da face lateral vermelho manchado, exclusivo dessa espécie (LOEFGREN, 1918), sendo que essas características também foram observadas durante as coletas (Figura 5 D). Assim, o reconhecimento de um clado monofilético

para *B. barbozae* corrobora com seus caracteres exclusivos e distintos em relação às outras espécies do gênero.

A posição filogenética de *B. schunkeana* como irmã de todas as outras espécies do gênero não foi surpresa. Essa espécie é morfologicamente muito distinta das demaisapresentando flores de cor roxo escura, quase pretas, com labelo com ornamentações brilhantes semelhantes às espécies do gênero *Christensonella*. Adicionalmente, resultados apresentados em um estudo citogenético recente (MORAES, 2012), indicam que a espécie *B. schunkeana* apresenta distinta estrutura e organização dos cromossomos e maior genoma em comparação às outras nove espécies do gênero *Brasiliorchis* incluídas no estudo (MORAES, 2012).

O fato da maioria das espécies reconhecidas atualmente para o gênero *Brasiliorchis* não ter sido reconhecida como monofilética neste estudo pode ser uma consequência da insuficiente variação das regiões estudadas aqui.A informação filogenética inadequada pode ocorrer, por exemplo, se o gene escolhido para a reconstrução filogenética estiver evoluindo muito devagar em relação à taxa de especiação ou se o fragmento do gene que esta sendo analisado for muito pequeno. Nesses casos, os dados obtidos podem fornecer poucas sinapomorfias para recuperar robustamente a árvore filogenética. Além disso, as homoplasias podem ser confundidas com as sinapomorfias.Assim, as árvores de genes podem reconstruir de forma errônea a história das espécies analisadas (FUNK; OMLAND, 2003).

Outra explicação para os padrões observados nesse estudo é a inadequação de análises filogenéticas para estudar padrões de diversificação em grupos muito recentes ou que sofreram rápida especiação devido à retenção de polimorfismo ancestral. Nesses casos, a separação de linhagens pode ter ocorrido antes da fixação dos alelos que estão sendo utilizados para a reconstrução filogenética. Há, nesses casos, um compartilhamento de alelos ancestrais. O polimorfismo ancestral é retido nas linhagens divergentes podendo resultar em falsas semelhanças entre as sequências de DNA (DEGNAN; ROSENBERG, 2009; CARTER, 2012). Por essa razão, árvores de genes não são equivalentes a árvores de espécies. Portanto, é esperado que linhagensque divergiram recentemente ou rapidamente sejam representadas como grupos polifiléticos ou parafiléticos em árvores filogenéticas. Um tempo evolutivo maior é necessário até que a separação das linhagens se complete e, consequentemente, alelos nas duas espécies derivadas indiquem

linhagens reciprocamente monofiléticas (HARE; AVISE, 1986; CRANDALL; FITZPATRICK, 1996).

Eventos de introgressão e hibridização podem ser potenciais causas de não se observar monofilia e da insuficiente resolução das árvores filogenéticas obtidas nesse estudo. Estes fenômenos têm sido discutidos com frequência em outros trabalhos com plantas (PALMA-SILVA et al., 2011; SPRUNT et al., 2011; FISHBEIN et al., 2012; CARTER, 2012).Pinheiro e Barros (2009) também sugerem que eventos de introgressão e hibridização estejam ocorrendo entre as espécies do grupo, justificandoa sobreposição morfológica entre elas. Quando as populações parapátricas ou simpátricas estão num estágio intermediário de especiação e não estão isoladas completamente, elas podem se intercruzar ao longo de uma zona de hibridação. Pode ocorrer a transferência de alelos de uma espécie no conjunto gênico para outra espécie através de cruzamentos interespecíficos e subsequentes retrocruzamentos de híbridos com sua população parental, sendo que esse processo é conhecido como hibridação introgressiva e é uma maneira de introduzir variações genéticas numa população. Estes eventos são comuns, especialmente em plantas, entre espécies que divergiram recentemente e que ocorrem em simpatria (KRAK et al., 2013). No caso das espécies do gênero *Brasiliorchis*, em que as espécies crescem em hábitats semelhantes e apresentam distribuição geográfica e época de floração sobrepostas, eventos de introgressão e hibridação devem ser comuns.

Uma barreira forte à troca gênica entre essas espécies seria o isolamento ecológico, por exemplo, através de mecanismos específicos de polinização e atração a polinizadores. Dessa forma, diferentes espécies de plantas se especializam em atrair polinizadores específicos e a polinização é feita por espécies diferentes. Contudo, apenas um único estudo morfológico disponível para as espécies *B. picta*, *B. gracilis*, *B. chrysantha*, *B. marginata* e *B. schunkeana* sugere que elas não oferecem recompensas e são pouco atrativas aos polinizadores, sendo, possivelmente, polinizadas por engano (SINGER; KOEHLER, 2004).As flores destas espécies e de outras da subtribo Maxillariinae permitem que os polinizadores cheguem e saiam da flor livremente, não oferecendo qualquer barreira ou especificidade ao polinizador (SINGER; KOEHLER, 2004). Além disso, a morfologia do viscídio faz com que ocorra a deposição de polinários no escutelo dos polinizadores assim que o inseto deixa a flor, aumentando as possibilidades de

polinização cruzada (SINGER; KOEHLER, 2004). Claramente estudos de biologia reprodutiva e polinização de espécies do gênero *Brasiliorchis* são necessários para uma melhor compreensão de possíveis barreiras pré-zigóticas.

A distribuição geográfica sobreposta das espécies tradicionalmente reconhecidas, aliada ao alto grau de polimorfismo de caracteres morfológicos, determinou uma história taxonômica confusa para o gênero *Brasiliorchis*, sobretudo para os táxons identificados como pertencentes ao complexo *B. picta*. Entretanto, a delimitação de espécies deste gênero tem sido exclusivamente baseada em caracteres morfológicos que não fornecem muita informação para diagnosticar linhagens evolutivamente distintas. As relações entre linhagens identificadas neste estudo sugere que a atual taxonomia do grupo não reflete adequadamente a história de divergência evolutiva do grupo, desse modo, é necessária uma revisão taxonômica na atual circunscrição dessas espécies.

Não podemos deixar de considerar que os padrões polifiléticos observados nesse estudo pode ser uma consequência da “confusão taxonômica” existente no grupo. A taxonomia pode subestimar ou superestimar os limites entre as espécies quando variantes de uma única espécie são erroneamente descritas como espécies nominais diferentes ou, o contrário, quando diferentes espécies são identificadas com um único nome. Nessas duas situações, a polifilia pode ser eliminada simplesmente mudando a taxonomia atual(FUNK; OMLAND, 2003). Outro problema mais trivial que possa ter ocorrido é que a polifilia pode ter sido resultado da má identificação das amostras utilizadas no estudo devido à dificuldade de distinção entre as diferentes espécies.

Portanto, a inferência das relações e delimitações de espécies somente através da morfologia pode ser incorreta. A utilização de conjuntos de dados adicionais, como os moleculares, pode ajudar a resolver as relações neste grupo. Outros trabalhos com gêneros de plantas têm discutido o uso de caracteres taxonomicamente distintos para definir gêneros e complexos de espécies, enfatizando o uso de múltiplas linhas de evidência a serem utilizadas para resolver problemas taxonômicos (SPRUNT et al., 2011; BATISTA et al., 2013).

Trabalhos utilizando análises de multilocos estão sendo cada vez mais frequentes dado o crescente aumento na obtenção dos dados moleculares, sendo essa nova abordagem uma ferramenta importante para inferência filogenética.Alguns métodos estatísticos já foram desenvolvidos para estimar árvores de espécies a

partir dessa abordagem multilocos (HARRINGTON; NEAR, 2012; RITTMEYER; AUSTIN, 2012). Esses métodos são baseados em modelos de coalescência que consideram a história ancestral dos genes de uma determinada população (FUJITA et al., 2012). Através desses modelos é possível identificar linhagens distintas que divergiram recentemente e que, portanto, ainda não estão completamente isoladas entre si e entender os processos evolutivos envolvidos na diversificação de linhagens desse grupo de orquídeas.

6 CONCLUSÕES

- Este estudo representa uma hipótese filogenética para quase todas as espécies do gênero *Brasiliorchis* e adicionam novas informações sobre a complexidade das relações entre elas.

- A espécie *B. schunkeana* se apresenta comomais distante filogeneticamente em relação às outras espécies do gênero**.** *B. barbozae* constitui um grupo monofilético claramente distinto, e possivelmente irmão das espécies do complexo do complexo *B. picta*. A espécie *B. gracilis*, embora na análise com os dados concatenados da (IB) quase todos os indivíduos apresentaram-se como irmãos das espécies do complexo *B. picta*, ela não foi reconhecida como um grupo monofilético, embora foi observado uma tendência para formação de grupos.

- As espécies morfologicamente homogêneas pertencentes ao complexo *B. picta* não formaram clados monofiléticos distintos.Enquanto que as espécies *B. kautskyi* e *B. consanguinea*, embora sejam morfologicamente distintas, se agruparam nos clados formados pelas espécies do complexo *B. picta*.

- Estudos futuros incluindo outros marcadores moleculares, dados adicionais de morfologia e com uma maior amostragem serão de grande importância para melhor caracterização e esclarecimento da taxonomia do gênero.

REFERÊNCIAS

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEETransactions on Automatic Control**, Notre Dame, v. 19, p.716-723, 1974.

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N; PESSOA, E.M. Orchidaceae.**In: Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br.html>. Acesso em: 01 abr. 2013.

BATISTA, J.A.N; BORGES, K.S.; FARIA, M.W.; PROITE, K.; RAMALHO, A.J.; SALAZAR, G.; VAN DEN BERG, C. Molecular phylogenetics of the species-rich genus (Orchidaceae) in the New World based on nuclear and plastid DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 67, p.95-109, 2013.

BICKFORD, D.; LOHMAN, J.D.; SODHI, S.N.; NG, K.L.P.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K.K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 22, p.148-155, 2007.

BLANCO, M.A.; CARNEVALI, G.; WHITTEN, W.M.; SINGER, R.B.; KOEHLER, S.; WILLIAMS, N.H.; OJEDA, I.; NEUBIG, K.M.; ENDARA, L. Generic realignments in Maxillariinae (Orchidaceae). **Lankesteriana**, Costa Rica, v. 7, p.515-337, 2007.

BOS, D.H.; POSADA, D. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees.**Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 29, p.211-227, 2005.

BUTZIN, F.; SENGHAS, K. Subtribus: Maxillariinae. In: BRIEGER, F.G.; MAATSCH, R.; SENGHAS, K. (Ed.). **Rudolf SchlechterDie Orchideen**.Berlin: Blackwell, 1996.p.1727-1792.

CAMERON**,**K.M.; CHASE, M.W.; WHITTEN, W.M.; KORES, P.J.; JARRELL, D.C.; ALBERT, V.A.; YUKAWA, T.; HILLS, H.G.; GOLDMAN, D.H. Evidence from *rbcL* nucleotide sequences. **American Journal of Botany**, St. Louis, v.86, p.208–224, 1999.

CAMPACCI, M.A.; KAUTSKY, R.A. O gênero Maxillaria no Espírito Santo: uma nova espécie. **Orquidário**, São Paulo, v. 7, p.136-137, 1993.

CARTER, B.E. Species delimitation and cryptic diversity in the moss genus *Scleropodium* (Brachytheciaceae).**Molecular Phylogenetic and Evolution**, San Diego, v. 63, p.891-903, 2012.

COGNIAUX, A.Orchidaceae III.Maxillarinae.In: von MARTIUS, C.F.P.; EICHLER, A.G.; URBAN, I. (Ed.).**Flora Brasiliensis**.Lipsiae: Frid. Fleischer, 1904.v. 3, p. 1-604.

CRANDALL, K.A.; FITZPATRICK, J.F. Crayfish molecular systematics: using a combination of procedures to estimate phylogeny. **Systematic Biology**, Oxford, v. 45, p.1-26, 1996.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v.85, p.407-415, 2005.

DEGNAN, J.H.; ROSENBERG, N.A. Gene tree discordance, phylogenetic inference and multispecies coalescent.**Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 24, p.332-340, 2009.

DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation.**Systematic Biology**, Oxford, v. 56, p. 879-886, 2007.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.**Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America**, London, v. 19, p. 11-15, 1987.

DRESSLER, R.L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides Press, 1993. 316p.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

EFRON, B.; TIBSHIRANI, R.**An introduction to the Bootstrap**. New York: Chapman and Hall, 1993. 436 p.

FARRIS, J.S. Methods for computing Wagner trees. **Systematic Zoology**, Lawrence, v. 19, p.83–92, 1970.

FAY, F.M.; CHASE, W.M. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. **Annals of botany**, London, v. 104, p. 359-364, 2009.

FELSENSTEIN, J.Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, Chicago, v. 17, p. 368-376, 1981.

_____. Phylogenies from molecular sequences: inference and reability. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 22, p. 521-565, 1988.

FISHBEIN, M.; KEPHART, S. R.; WILDER, M.; HALPIN, K.M.; DATWYLER. Phylogeny of *Camassia* (Agavaceae) inferred from plastid *rpl16* intron and *trnD-trnY-trnE-trnT* intergenic spacer DNA sequences: implications for species delimitation. **Systematic botany**, Oxford, v. 35, p.77-85, 2010.

FITCH, W.M. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. **Systematic Zoology**, Lawrence, v.20, p. 406-416, 1971.

FREEMAN, S.; HERRON, J.C. **Análise evolutiva**, Porto Alegre: Artmed, 2009. 831 p.

FREUDENSTEIN, J.V.; RASMUSSEN, F.N. What does morphology tell us about orchid relationships? A cladistic analysis.**American Journal of Botany**, St. Louis,v. 86, p. 225-248, 1999.

FREUDENSTEIN, J.V.; VAN DEN BERG, C.; GOLDMAN, D.H.; KORES, P.J.; MOLVRAY, M.; CHASE, M.W. An expanded plastid DNA phylogenetic analysis of Orchidaceae and analysis of jackknife clade support strategy. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 91, p. 149-157, 2004.

FUJITA, M.K.; LEACHÉ, A.D.; BURBRINK, F.T.; MCGUIRE, J.A.; MORITZ, C. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy.**Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 27, p.480-488, 2012.

FUNK, D.J.; OMLAND, K.E. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 34, p.397-423, 2003.

GIRIBET, G. Efficient tree searches with available algorithms. **Evolutionary Bioinformatics**, Cambridge, v.3, p.341-356, 2007.

GOLOBOFF, P.A. Analyzing large data sets in reasonable times: solutions for composite optima. **Cladistics**, New York, v. 15, p.415-428, 1999.

_____. Parsimony, likelihood, and simplicity.**Cladistics**, New York, v. 19, p. 91-103, 2003.

GOLOBOFF, P.A.; FARRIS, J.S.; NIXON, K.C. TNT, a free program for phylogenetic analysis.**Cladistics**, New York, v. 24, p. 774-786, 2008.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIIK, W.; GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate Maximum-Likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0.**Systematic Biology**, Oxford, v. 59, n.3, p. 307-321, 2010.

HARE, M.P.; AVISE, J.C. Population structure in the American Oyster as inferred by nuclear gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 15, p.119-128, 1998.

HARRINGTON, R.C.; NEAR, T.J. Phylogenetic and coalescent strategies of species delimitation in Snubnose Darters (Percidae: *Etheostoma*). **Systematic Biology**,Oxford, v. 61, p. 63-79, 2012.

HART, M.W. The species concept as an emergent property of population biology.**Evolution**,London, v. 65, p. 613-616, 2010.

HASTINGS, W.K. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications.**Biometrika**, London, v. 57, p. 97-109, 1970.

HENDY, M.D.; PENNY, D. Branch and Bound algorithms to determine minimal evolutionary trees.**Mathematical Biosciences**, New York, v.59, p.277-290, 1982.

HOEHNE, F.C. Orchidaceas.In:_____.**Flora Brasilica**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1953. v.12, fasc.7, 397 p.

HOLDER, M.; LEWIS, P.O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, p.275-284, 2003.

HUELSENBECK, J.P.; CRANDALL, K.A. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood.**Annual Review Ecology and Systematics**, El Camino Way, v. 28, p.437-466, 1997.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. Bayesian analysis of molecular evolution using MrBayes. In: NILSEN, R. (Ed.). **Statisticalmethods in molecular evolution**. New York: Springer, 2005. chap. 7, p.183-226.

_____. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, n. 8, p. 754–755, 2001.

KENNEDY, A.H.; WATSON, L.E. Species delimitations and phylogenetic relationships within the fully Myco-Heterotrophic *Hexalectris* (Orchidaceae).**Systematic Botany**, Oxford, v. 35, n. 1, p.64-76, 2010.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, Chicago, v. 16, p. 111-120, 1980.

KLUGE, A. G.; FARRIS, J.S. Quantitative phyletics and the evolution of anurans.**Systematic Zoology**, Lawrence, v.18, p.1-32, 1969.

KOEHLER, S; CABRAL, J. S.; WHITTEN, W. M; WILLIAMS, N. H.; SINGER, R. B.; NEUBIG, K. M.; GUERRA, M.; SOUZA, A. P.; AMARAL, M. C. E. Molecular phylogeny of the neotropical genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): species delimitation and insights into chromosome evolution. **Annals of Botany** London, v. 102, p.491-507, 2008.

KRAK, K.; CAKLOVÁ, P.; CHRTEK, J.; FEHRER, J. Reconstruction of phylogenetic relationships on a highly reticulate group with deep coalescence and recent speciation (*Hieracium*, Asteraceae). **Heredity**, London, v. 110, p.138-151, 2013.

KUMAR, S.; FILIPSKI, A. Multiple sequence alignment: In pursuit of homologous DNA positions. **Genome Research**, Seattle, v.17, p. 127-135, 2007.

LAGERCRANTZ, E. **eBioX.** 2008. Disponível em: <htpp://www.ebioinformatics.org/>. Acesso em: 30 jan. 2013.

LARGET, B.; SIMON, D.L. Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees.**Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 16, p. 750-759, 1999.

MADDISON, W.P.; MADDISON, D.R. **Mesquite:** a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. 2011. Disponível em: <http://mesquiteproject.org>. Acesso em: 05 dez. 2012.

METROPOLIS, N.; ROSENBLUTH, A.W.; ROSENBLUTH, M.N.; TELLER, A.W.; TELLER, E. Equations of state calculations by fast computing machines. **Journal of Chemical Physics.**, New York, v. 21, p.1087-1091, 1953.

MORAES, A.P.; LEITCH, I.J.; LEITCH, A.R. Chromosome studies in Orchidaceae: karyotype divergence in Neotropical genera in subtribe Maxillariinae. **BotanicalJournal of the Linnean Society**,London, v. 170, p.29-39, 2012.

NEI, M. Relative efficiencies of different tree-making methods for molecular data. In: MIYAMOTO, M.M.; CRACRAFT, J. (Ed.). **Phylogenetics analysis of DNA sequences.** New York: Oxford University Press, 1991. p. 358.

NIXON, K.C. The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis.**Cladistics**, New York, v. 15, p.407-414, 1999.

PABST, G.F.J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses II**. Hildesheim: Brucke-Verlag Kurt Schmersow, 1977. p. 183-184.

PADIAL, J.M.; DE LA RIVA, I.A response to recent proposals for integrative taxonomy.**Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 101, p.747-756, 2010.

PADIAL, J.M.; CASTROVIEJO-FISHER, S.; KOHLER, J.; VILÀ, C.; CHAPARRO, J.C.; DE LA RIVA, I. Deciphering the products of evolution at the species level: the need for an integrative taxonomy. **Zoologica Scripta**, Stockholm, v. 38, p. 431-447, 2009.

PAGE, R.D.M. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v.12, p. 357-358, 1996.

PALMA-SILVA, C.; WENDT, T.; PINHEIRO, F.; BARBARÁ, T.; FAY, M.F.; COZZOLINO, S.; LEXERS, C. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* ssp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 20, p. 3185-3201, 2011.

PINHEIRO, F.; BARROS, F. Morphometric analysis of the *Brasiliorchis picta* complex (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.1, p. 11-21, 2009.

PINHEIRO, F.; BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; MEYER, D.; FAY, M.F.; SUZUKI, R.M.; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 19, p. 3981-3994, 2010.
POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution.**Systematic Biology**, Oxford, v. 50, p. 580-601, 2001.

_____. jModelTest: phylogenetic model averaging. **MolecularBiology and *Evolution*,** Chicago, v. 25, p. 1253-1256, 2008.

_____. Selecting models of evolution. In: LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A.M. (Ed.). **The phylogenetic handbook:** a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing.New York: Cambridge University Press, 2009. chap. 10, p. 345-361.

PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N. **Genera Orchidacearum:** Epidendroideae (Parte II). New York: Oxford University Press, 2009. 664p.

RAMBAUT, A. **Tree figure drawing tool:** version 1.3.1.University of Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology, 2009.Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>. Acesso em: 09 fev. 2013.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A.J. **MCMCtrace analysis tool1.5.0.**2011. Disponível em: <http://beast.bio.ed.ac.uk/>. Acesso em: 06 fev. 2013.

RITTMEYER, E.N.; AUSTIN, C.C. The effects of sampling on delimitations species from multi-locus sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 65, p.451-463, 2012.

RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e*C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. 2011. 81p.Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

RONQUIST, F.; VAN DER MARK, P.; HUELSENBECK, J.P. Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes. . In: LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A.M. **The phylogenetic handbook:** a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing. New York: Cambridge University Press, 2009. chap. 7, p. 210-266.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.4, p. 406-425, 1987.

SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. **Annals of Statistics**, Philadelphia, v. 6, p.461-464, 1974.

SHAW, J.; LICKEY, E.B.; SCHILLING, E.E.; SMALL, R.L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 94**,** p. 275–288, 2007.

SINGER, R.B.; KOEHLER, S. Pollinarium morphology and floral rewards in Brazilian Maxillariinae (Orchidaceae).**Annals of Botany**, London, v. 93, p.39-51, 2004.

SINGER, R.B.; KOEHLER, S.; CARNEVALI, G. *Brasiliorchis*: a new genus for the *Maxillaria picta* Alliance (Orchidaceae, Maxillariinae). **Novon**, St. Louis, v. 17, p.91-99, 2007.

SITES, J.W.; MARSHALL, J.C. Operation criteria for delimiting species.**Annual Review of Ecological Evolutionary Systems**, Palo Alto, v. 35, p.199-227, 2004.

SNEATH, P.H.A; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. São Francisco: Freeman, 1973. 573p.

SOKAL, R.R.; MICHENER C.D.A Statistical method for evaluating systematic relationships.**TheUniversity of Kansas Scientific Bulletin**, Lawrence, v.38, p.1409-1438, 1958.

SPRUNT, S.V.; SCHNEIDER, H. WATSON, L.E.; RUSSEL, S.J.; NAVARRO-GOMEZ, A.; HICKEY. Exploring the molecular phylogeny and biogeography of *Pleopeltis polypodioides* (Polypodiaceae, polypodiales) inferred from plastid DNA sequences. **Systematic Botany**, Oxford, v. 36, p.862-869, 2011.

SUN, Y.; SKINNER, D.Z.; LIANG, G.H.; HULBERT, S.H. Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA.**Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 89 p. 26-32, 1994.

SWOFFORD, D.L.; SULLIVAN, J. Phylogeny inference based on parsimony and other methods using PAUP. In: LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A.M. (Ed.). **The phylogenetic handbook:** a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing. New York: Cambridge University Press, 2009. chap. 8, p. 267-312.

TAMURA, K.; DDUDLAY, J.; NEI, M.; KUMAR, S.Mega5.1: Molecular evolutionaryGenetics (MEGA) software version 5.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.24, p. 1596-1599, 2011.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOSCANO DE BRITO, A.L.V.; CRIBB, P. **Orquídeas da Chapada Diamantina**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira Brasil, 2005.400p.

VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W.E.; DRESSLER, R.L.; WHITTEN, W.M.; SOTO-ARENAS, M. A.; CHASE, M. W. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, London, v. 104, p. 417-430, 2009.

XIA, X.; XIE, Z. Dambe: data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Molecular Evolution**, Chicago, v. 9, p. 315-329, 2001.

WCSP WORLD CHECKLIST OF SELECTED PLANT FAMILIES.**World checklist of Monocotyledons.facilitated by the Royal Botanic Gardens.**Kew, 2011. Disponível em: <htpp://apps.kew.org/wcsp/wcsp/>. Acesso em: 07 abr. 2011.

WHELAN, S.; LIO, P.; GOLDMAN, N. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. **Trends in Genetics**, Cambridge,v. 17, p. 262–272, 2001.

WHITTEN, W.M.; WILLIAMS, N.H.; CHASE, M.W. Subtribal and generic relationship of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence**. American Journal of Botany**, St. Louis, v.87, p.1842-1856, 2000.

WHITTEN, W.M.; BLANCO, M.A.; WILLIAMS, N.H.; KOEHLER, S.; CARNEVALI, G.; SINGER, R.B.; ENDARA, L; NEUBIG, K.M. Molecular phylogenetics of Maxillaria and related genera (Orchidaceae: Cymbidieae) based upon combined molecular data sets. **American Journal of Botany**, St. Louis,v. 94, p.1860-1889, 2007.

WIENS, J.J.; SERVEDIO M.R. Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, London, v.267, p.631-636. 2000.

ANEXOS

Anexo A - Tratamentos taxonômicos com listagens de espécies e variedades reconhecidas para o grupo *Brasiliorchis*

(continua)

Tratamento tanonômico	**Espécies**	**Variedades**
Cogniaux (1904)	*M. chrysantha*	*curtifolia, macrobulbosa*
	M. furfuracea	
	M. gracilis	
	M. heismanniana	
	M. lilacea	
	M. marginata	
	M. phoenicanthera	
	M. picta	*major, brunnea, punctata*
	M. porphyrostele	
	M. rigeliana	
	M. polyantha	
Hoehne (1953)	*M. barbozae*	*citrina*
	M. chrysantha	*typica, curtifolia, pallidiflora, macrobulbosa*
	M. consanguinea	*major*
	M. crassipes	
	M. gracilis	*queirogana, lilacea, augustifolia, intermedia, macrantha, minor*
	M. heismanniana	
	M. hoehnei	
	M. marginata	
	M. murilliana	
	M. phoenicanthera	
	M. picta	
	M. piresiana	
	M. polyantha	
	M. porphyrostele	*typica, submarginata, minutipunctulata, chrysanthoides*
	M. regeliana	
	M. rupestris	*brevis, minor*
	M. ubatubana	*mantiqueirana*
Pabst e Dungs (1977)		
‘Aliança *M. picta*’	*M. consanguinea*	
	M. heismanniana	
	M. phoenicanthera	
	M. picta	
	M. polyantha	
	M. porphyrostele	
	M. rupestris	
	M. ubatubana	

Anexo A- Tratamentos taxonômicos com listagens de espécies e variedades reconhecidas para o grupo *Brasiliorchis*

(conclusão)

Tratamento tanonômico	**Espécies**	**Variedades**
‘Aliança *M. gracilis’*	*M. barbozae* *M. gracilis* *M. kautskyi*	
‘Ali.*M. marginata’*	*M. chrysantha* *M. marginata* *M. piresiana*	
Butzin e Senghas (1996)		
‘Aliança *M. picta*’	*M.consanguinea* *M. heismanniana* *M. phoenicanthera* *M. picta* *M. polyantha* *M. porphyrostele* *M. rupestris* *M. ubatubana*	
‘Aliança *M. marginata’*	*M. barbozae* *M. gracilis* *M. kautskyi* *M. chrysantha* *M. marginata* *M. piresiana*	

Anexo B - Caracteres morfológicos considerados por Hoehne (1953) para espécies de *Maxillaria* morfologicamente relacionadas ao gênero *Brasiliorchis*

(continua)

ESPÉCIE	CARACTERES DIAGNÓSTICOS			HÁBITAT
	pseudobulbos	**folhas**	**flores**	
B. barbozae	tamanho variável no mesmo exemplar conforme a idade, bifoliados	moles, herbáceas, linear-lanceoladas até linear-oblongadas	amareladas com labelo bem vermelho, com calo intensamente vinoso e coluna com a antera também dessa cor nos bordos externos	partes mais altas da serra da mantiqueira, SP, MG, RJ
B. chrysantha	eretos, ovóide cônicos sobre base mais grossa, de até 3 cm. de alt. por 2 cm. de espessura	lineares tendendo ao lanceolado no tipo e mais largo um pouco nas variedades, firmes e coriáceas, eretas e voltadas para os lados, de 20-35 cm. de comp. e 5-9 mm. de larg.	amarelo, cor de ouro pálido, na base das sépalas e pétalas internamente um tanto esverdeadas, dorsalmente com sombras e pintinhas vermelhas, margens vermelhas, labelo sobre fundo claro com pintas de vermelho em ambos os lados, coluna intensamente vermelha inclusive na antera	SP. RJ. e sul de MG
B. consanguinea	mais ou menos espassados sobre o rizoma, bifoliados	coriáceas, oblanceoladas, ápice inteiro, para a base atenuadas em pseudo-peciolo mais ou menos longo, de face acanoada, comprimento variável e largura mediana	muito odoríferas, carnosas, parte externa das sépalas acastanhada e por dentro também ou mais clara, perto da base interna amarelados, as pétalas acompanham as sépalas, labelo sobre fundo branco com linhas em pontilhado de cada lado do calo mediano e lobo mediano amarelado	SP, RJ, MG, em regra nas pedras
B. gracilis	bifoliados, espaçados de 5-10 mm. entre si, eretos, oblongo-obpiriformes ou ovóides	oblanceoladas, relativamente pequenas atenuadas em curto pseudopecíolo acanoado, ereto-patentes	entre as menores do agrupamento, perfumosas, amareladas com sombras de vermelho na parte externa junto as margens das sépalas e pétalas e labelo com séries longitudinais de pontinhos avermelhados no disco, no lobo mediano com esparsas pintas vermelhas	serra do mar e nasoutras serras de MG, RJ, SP em localidades altas

Anexo B - Caracteres morfológicos considerados por Hoehne (1953) para espécies de *Maxillaria* morfologicamente relacionadas ao gênero *Brasiliorchis*

(continuação)

ESPÉCIE	CARACTERES DIAGNÓSTICOS			HÁBITAT
	pseudobulbos	**folhas**	**flores**	
B. heismanniana	tamanho mediano, ovóides, bifoliados	como as da m. phoenicanthera e m. polyantha	relativamente pequenas, com segmentos alvacentos, pontilhados de vermelho	
B. marginata	espaçados de 3-10 cm entre si sobre o rizoma, tamanho médio, oblongo-cônicos, bifoliados	coriáceas, estreitoliguladas, agudas quase obtusas no ápice e para base atenuadas em pseudo-pecíolo acanoado	amareladas com sépalas e pétalas por dentro e por fora marginados de vermelho, restante sem manchas ou pintas nos mesmo, labelo com manchas vermelhas escuras quase negras nas imediações dos sinais dos lobos laterais e do lobo mediano coluna amarelada com sombras e linhas vermelhas	lugares menos úmidos da serra do mar e da mantiqueira, nos estados de MG, SP, RJ, ES, RS
B. phoenicanthera	adensados, ovóide-oblongados até ovóide cônicos, bifoliados	lanceoladas	por dentro nas sépalas e pétalas amarelo-claras, externamente um pouco mais pálida e pintalgadas de pontinhos vermelho-sanguíneos (que não confluem para formar zonas como as da m. picta hook, cuja dimensões também não atingem, antera intensamente sanguínea	matas da serra do mar e rochas das serras de MG
B. picta	bufoliados, mais ou menos espaçados sobre o rizoma, eretos, ovóide-cônicos até ovóide-oblongados	coriáceas, eretas e em cima curvadas para os lados, linearlanceoladas até linear-oblongadas	grandes, por dentro amarelo-alaranjadas, na parte externa com manchas grandes de vermelho-castanho que se fundem em zonas transversais, o retorcimento das sépalas e pétalas não raro cruzados sobre a antera da coluna, são detalhes que a distinguem de entre todas	serra do mar, da mantiqueira e outras elevações em MG e ES

Anexo B - Caracteres morfológicos considerados por Hoehne (1953) para espécies de *Maxillaria* morfologicamente relacionadas ao gênero *Brasiliorchis*

(conclusão)

ESPÉCIE	CARACTERES DIAGNÓSTICOS			HÁBITAT
	pseudobulbos	**folhas**	**flores**	
B. polyantha	medianos no tamanho, bifoliados	muito semelhantes aos da m. picta (hook), inflorescências numerosas	relativamente pequenas, alvacentas, pontilhadas e maculadas de vermelho, muito odoríferas, sépalas carnosas, pétalas linear-oblongados, coluna pouco arcada, espêssa	serra do mar/RJ
B. porphyrostele	mais ou menos agregados, ovóide-oblongados	coriáceas, eretas, estreitoliguladas até quase lanceoladas, verde-escuras, dorsalmente mais pálidas	amarelo-oca, por fora tenuemente pintalgadas de vermelho sanguíneo, pétalas com pinceladas de vermelho, o labelo sobre fundo amarelo com venulações vermelhas irradiantes da base e dos bordos do calo do disco, em cima com manchinhas de vermelho-sanguíneo, coluna e antera intensamente vinosa como, só raramente com transparência do amarelo ou branco	PR-RS
B. ubatubana	grandes, de 5-7 cm de alt., por 25-35 mm. de espessura, um pouco distanciados entre si, ovóide-angulosos, bifoliados	sempre ereta, firme, coriácea, raramente torcida, de até 35 cm. de comp., por 3-4 cm de larg.	grandes, internamente com sépalas e pétalas amarelo-claro, os últimos na base com traços curtos de vermelho, a coluna e antera, vermelho-vinosos, não representam exclusividade específica, mas devem ser consignados como peculiaridade combinada com as pintas vermelhas da parte externa superior ao labelo	serra do mar e suas ramificações

Anexo C – Descrições originais de 11 espécies atualmente pertencentes ao gênero *Brasiliorchis*

(continua)

ESPÉCIE	CARACTERES DIAGNÓSTICOS			HÁBITAT
	pseudobulbos	**folhas**	**flores**	
B. schunkeana	fusiformes-cilíndricos, com 5 cm de comp. por 1cm de diâmetro, bifoliados revestidos de bainhas na base	lineares de 8cm a 12cm de comp. por 0,7 a 1,0cm de largura;	solitárias, com pedúnculo curto, até a altura do pseudobulbo e de duração relativamente longa. Coloração atropúrpurea uniforme em todos os segmentos da flor, tendo apenas a base do labelo com pequena área creme. Sépala dorsal ligular-oblongada, de 12mm x 4mm; sépalas largo-falciformes, de 12 mm x 4 mm e pétalas falciformes, de 12 mm x 2,5 mm. Labelo levemente trilobado, de 12 mm x 8 mm, apresentando calosidade longitudinal de 6mm de comp., que na sua base; lobo mediano totalmente, verrucoso; coluna semi-cilíndrica, levemente arcada, com 7,5 mm de comp. de cor creme, matizada de púrpura; antera também creme e com 2 mm de diâmetro.	Espírito Santo, município de Santa Leopoldina
B. kautskyi	globulosos, enrugados e sulcados; bifoliados; 15 mm de altura e espessura	estreita-linear, aguda; nervura mediana proeminente; 17-25 cm de comp. e 4-5 mm de largura	inflorescências curtas, duas e quatro, pseudobulbos apenas ligeiramente superior; bainhas espessas; brácteas obovadas e abruptamente afiada, 12mm de comp. e 6mm de espessura; na flor manchas roxas escuras na borda frontal do labelo; sépalas estreitamente oblongas, aguda, multinervadas de 13-15mm de comp. e 5mm de largura; pétalas lineares, agudas; labelo amplamente elíptico, todo labelo 12mm de comp. e largura máxima de 8,5mm; coluna esbelta, ligeiramente encurvada, 8mm de altura e 1,5mm de espessura	Espírito Santo, próximo a Domingos Martins

Anexo C – Descrições originais de 11 espécies atualmente pertencentes ao gênero *Brasiliorchis*

(continuação)

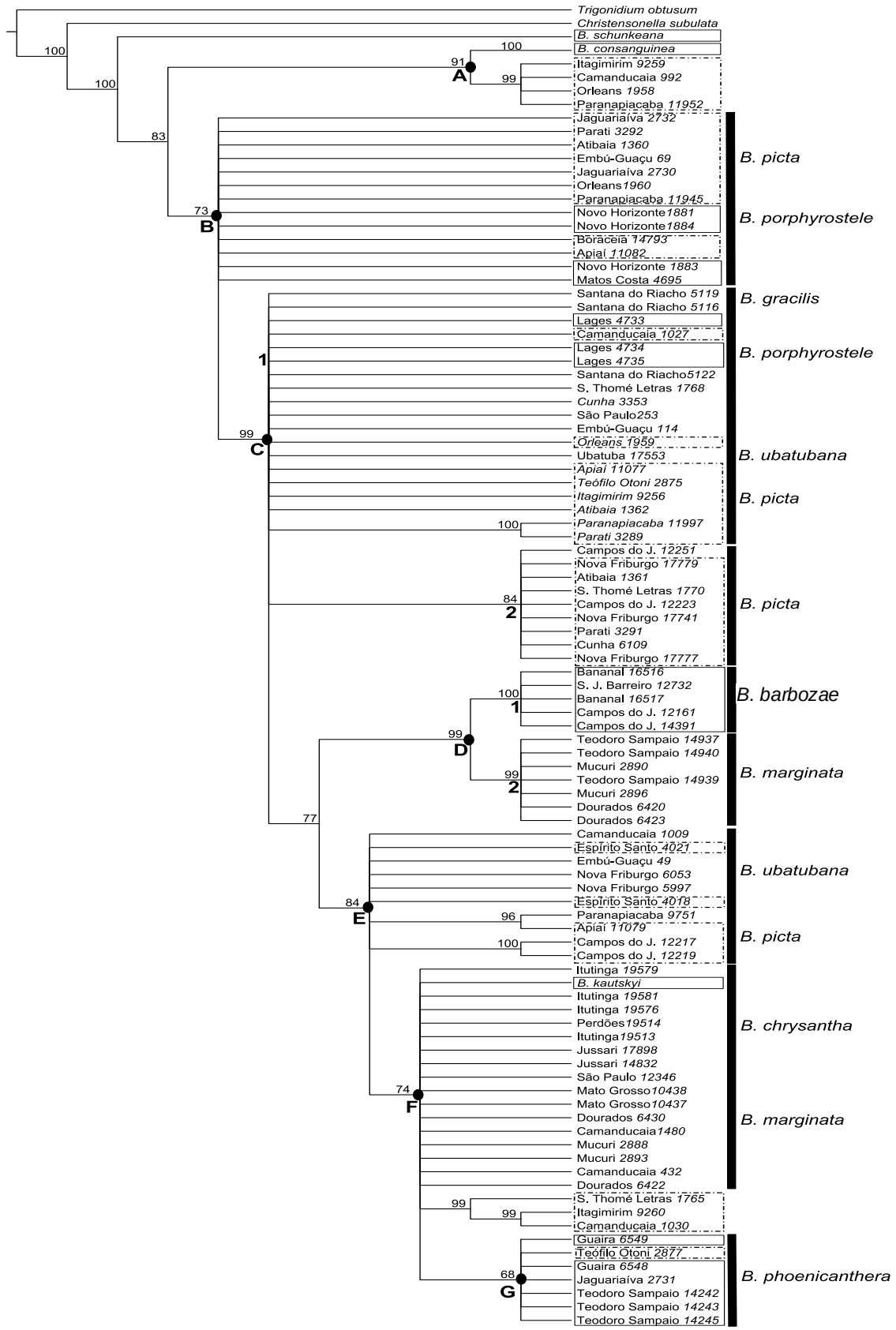
ESPÉCIE	CARACTERES DIAGNÓSTICOS			HÁBITAT
	pseudobulbos	**folhas**	**flores**	
B. barbozae	pequenos, alongados e cônicos; 5-7 cm. de largura, 12-15 mm máximo de altura; bifoliados	coriáceas, estreitamente linear-liguladas, até 25 cm de comp., afiadas, acima caniculadas	pedúnculos únicos, pseudobulbos quase tão longos quanto ou um pouco acima, com uma única flor; brácteas membranáceas flores pequenas, subnutantes, segmentos branco-amarelada, topo salpicado (nem sempre) de roxo punctata; pétalas ereta submembranacea, 10-12 mm; labelo ereto, trilobado, margens dos lóbulos inteiras, laterais eretas, vértice acentuado, laranja e na metade superior da face lateral vermelho manchado; calo spathulato, intenso roxo vernicoso; coluna subclavata, arqueada; antera roxa granulosa; floresce em Setembro	Itatiaia
B. chrysantha	ovais, angulares, bifoliados	lineares, agudas, com base conduplicada-atenuada, curva;	escapo com única flor, fasciculados, três vezes maios que os pseudobulbos; sépalas oblongas, agudas; pétalas menores e mais estreitas, lineares, agudas; labelo trilobado, lobos laterais eretos, arredondados, terminais menores, subrotundato, afiado, com projeções linguiforme; floresce em Setembro	Sapucaí
B. phoenicanthera	bifoliados		escapo pouco maiores que os pseudobulbos, fino; sépalas oblongas, agudas, margens recurvadas, inferiores um pouco maiores; pétalas e sépalas superiores menores, lineares, agudas; labelo menor, trilobado, lobos laterais eretos, obtusos; antera mitriforme, anteriormente emarginado; floresce em Maio	Nas florestas em volta “de rodeio” ao Rio de Janeiro
B. marginata	ovado-oblongados, arredondados, 1-3 folhas	linear lanceoladas, coriáceas, ereto-recurvadas,	escapo com única flor; sépalas oblongo-lanceoladas, as pétalas são menores; labelo oblongo-lanceolados	Rio de Janeiro

Anexo C – Descrições originais de 11 espécies atualmente pertencentes ao gênero *Brasiliorchis*

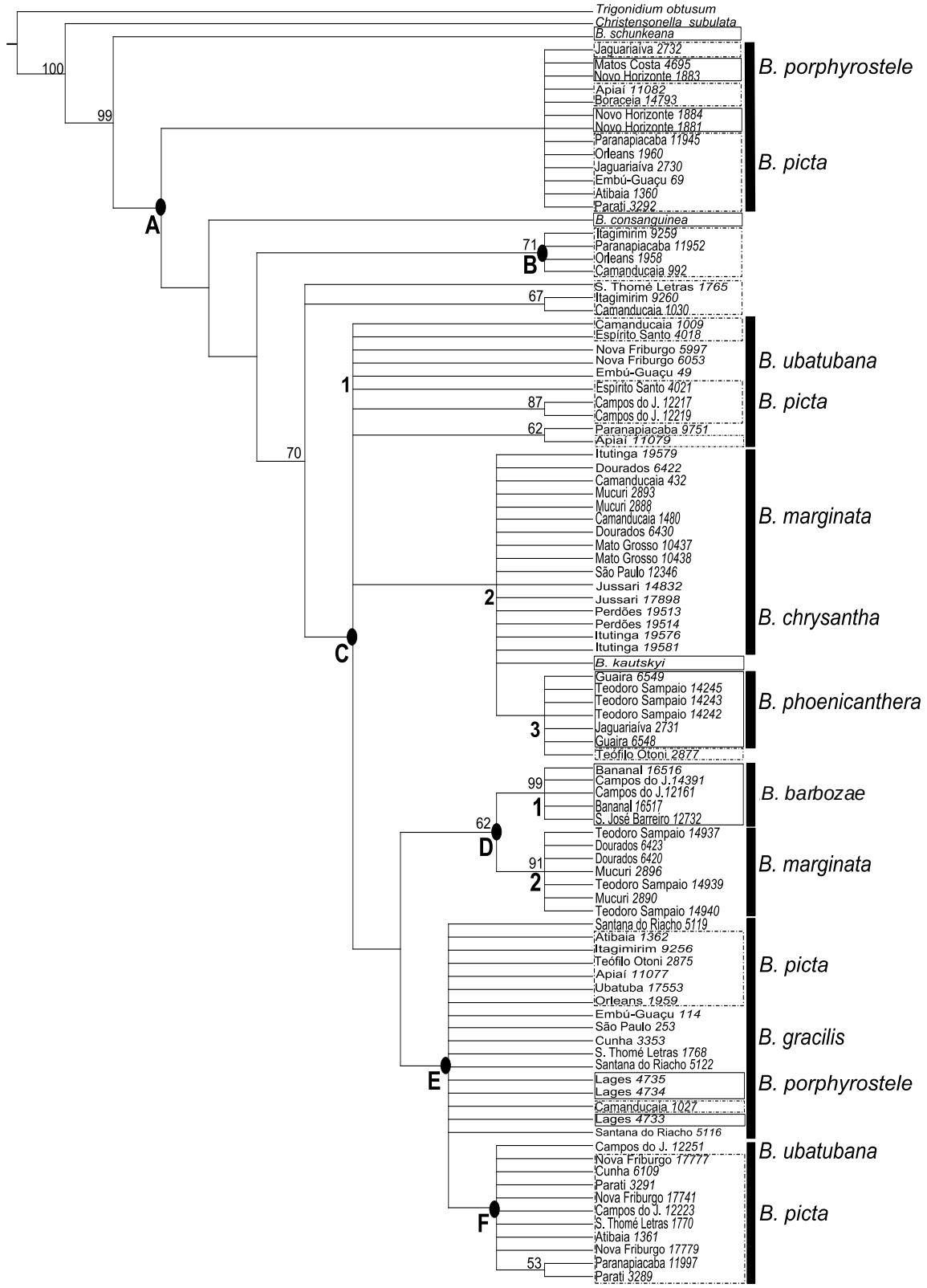
(conclusão)

ESPÉCIE	CARACTERES DIAGNÓSTICOS			HÁBITAT
	pseudobulbos	**folhas**	**flores**	
B. picta	ovados, 1-2 folhas	linear-lanceoladas	escapo com única flor; pétalas linear-oblongas, borda subigual manchado; labelo oblongo curvado, trilobado, púberes elevada, lobos laterais curvados, terminais subcordato afiado; floresce em Dezembro	Serra dos órgãos
B. porphyrostele	ovóides, pequenos, verde brilhante com numerosas rugas	pecioladas, linear, aguda	flores amarelo esbranquiçado por fora e amarelo por dentro; pétalas liguladas, agudas, laterais para baixo curvadas; as pétalas tem um traço arroxeado em sua base; o labelo é amarelo esbranquiçado com veias arroxeadas; coluna completamente arroxeada; floresce em Fevereiro	Rio Grande do Sul
B. consanguinea	alongados, com nervuras, bifoliados	oblongo-lanceolada, pontudas, lisas, base conduplicada-atenuada, abaixo verde-esbranquiçado	escapo unifloris, distantes, membranosos, amarelo, agudos, botão roxo; folíolos do perigônio exterior lanceoladas, subnervuras mais nítidas, amarelo, borda vermelha; labelo trilobado, de branco-amarelado, roxo manchado, lobos laterais eretos, arredondados, intermediário ovado, obtuso, glabro recurvados, coluna arcada, glabra, parte traseira amarela e anterior vermelha, labelo duas vezes mais curto	Rio de Janeiro, Nova Friburgo
B.heisnsmanniana	bifoliados		Escapos um pouco menores que os pseudobulbos; ovário nu, sépalas com margens recurvadas, inferiores um pouco maior; pétalas e sépalas superiores menores, lineares, agudas; labelo trilobado; lobos laterais eretos, oblongos, agudos, margens onduladas; floresce em Julho	crescem em tufos em tornos de árvores das florestas das montanhas
B. polyantha			sépalas curvadas, lanceoladas, sub-obtusos; pétalas linear-lanceoladas, agudas, menores que as sépalas; labelo trilobado, lobos laterais eretos; floresce em agosto	Serra do mar, no RJ

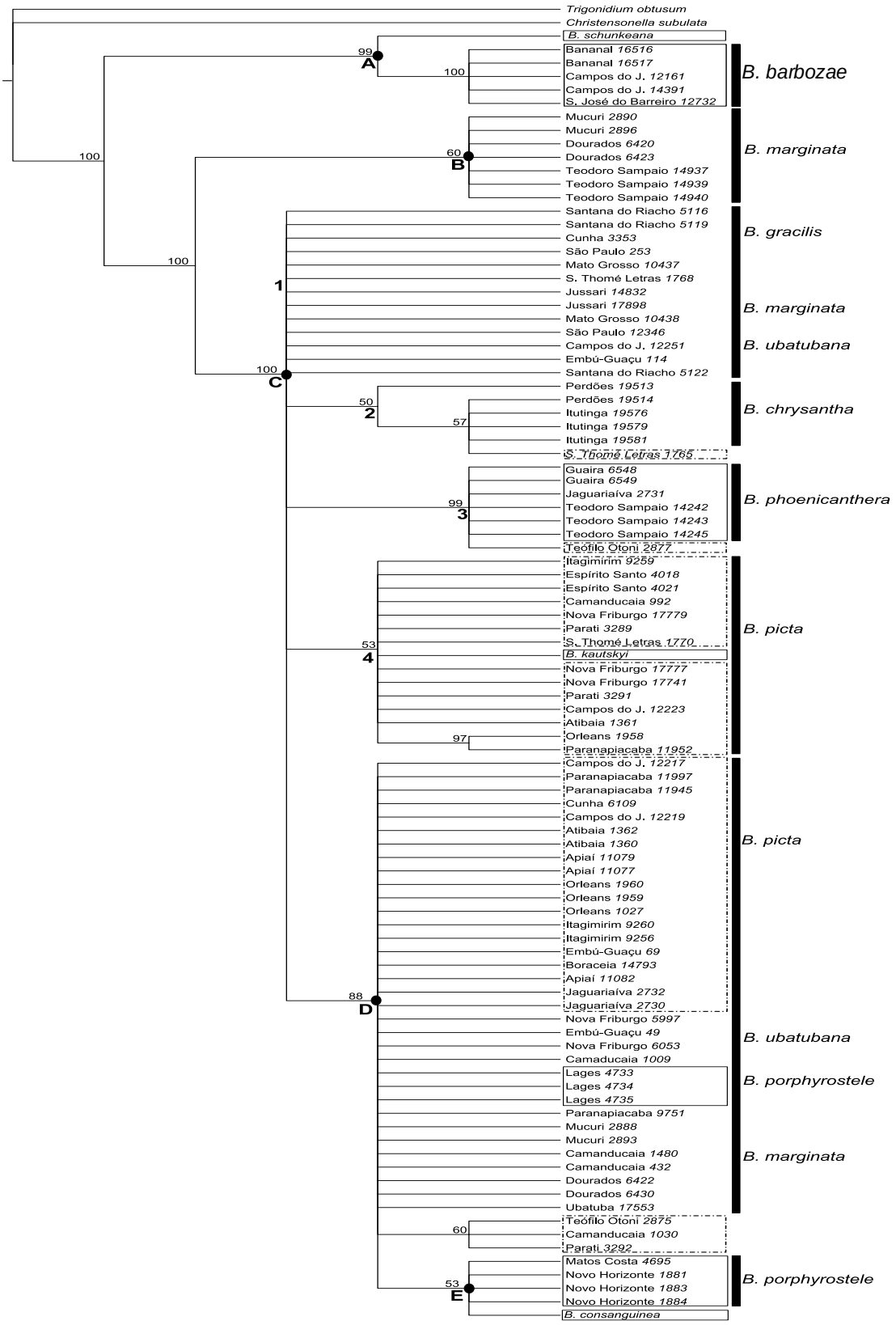
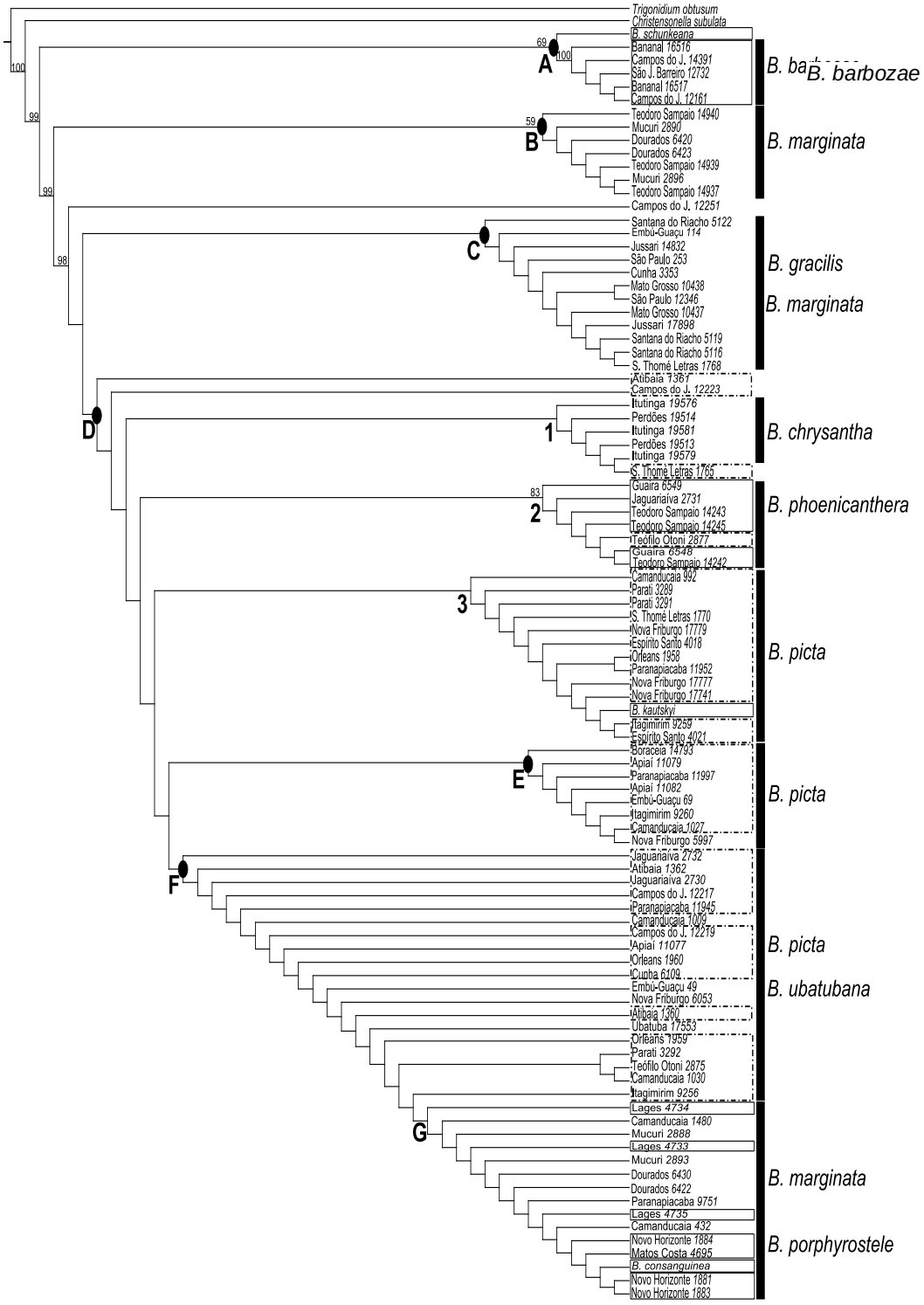
Anexo D -Árvore bayesiana dos dados combinados das duas regiões de plastídios *psbj-petA* e*atpl-atpH* obtidas com o alinhamento ClustalW



Anexo E - Uma das árvores mais parcimoniosas obtidas da análise de máxima parcimônia com os dados combinados das duas regiões de plastídios *psbj-petA* e*atpI-atpH* com o alinhamento ClustalW



Anexo F - Árvore bayesiana com o conjunto de dados de ITS obtidas com o alinhamento ClustalW



Anexo G -Uma das árvores mais parcimoniosas obtida da análise de máxima parcimônia a partir do conjunto de dados de ITS com o alinhamento ClustalW