

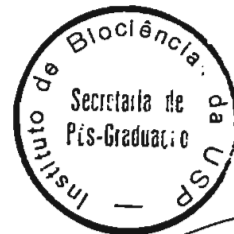
Fábio Pinheiro

Avaliação das relações intra e interespecíficas no  
complexo *Epidendrum secundum* e espécies afins  
(Orchidaceae) através de AFLP

São Paulo

2005

M-1215



Fábio Pinheiro

*[Handwritten signatures and initials]*  
R. Pinheiro  
M. Barros  
R. Pinheiro  
M. Barros

Avaliação das relações intra e interespecíficas  
no complexo *Epidendrum secundum* e  
espécies afins (Orchidaceae) através de AFLP

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Orientador(a): Dr. Fábio de Barros

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS  
BIBLIOTECA  
TOMBO: M-1215

São Paulo  
2005

DATA DE DEFESA: 30.11.05

P 654 a Pinheiro, Fábio  
Avaliação das relações intra e  
interespecíficas no complexo *Epidendrum  
secundum* e espécies afins (Orchidaceae)  
através de AFLP / Fábio Pinheiro. – São  
Paulo : F. Pinheiro, 2005.  
182p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de  
Biotecnologia da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Botânica, 2005.

1. Taxonomia vegetal; 2. AFLP; 3.  
Morfometria; 4. Orchidaceae; 5.  
*Epidendrum*. I. Universidade de São Paulo.  
Instituto de Biotecnologia. Departamento de  
Botânica.

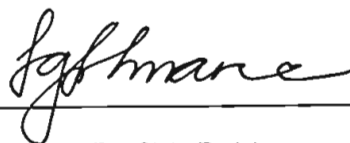
LC: QK 95

### Comissão Julgadora:



Prof(a). Dr(a).

GEORGE JOHN SHEPPARD

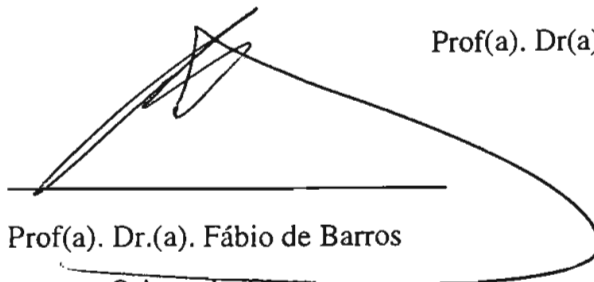


Prof(a). Dr(a).

Lúcia G. Lehmann

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).



Prof(a). Dr(a). Fábio de Barros

Orientador(a)

À minha família,  
com todo meu amor,  
respeito e admiração

“The more I study nature, the more I become impressed with ever-increasing force, that the contrivances and beautiful adaptations slowly acquired through each part occasionally varying in a slight degree but in many ways, with the preservation of those variations which were beneficial to the organism under complex and ever-varying conditions of life, transcend in an incomparable manner the contrivances and adaptations which the most fertile imagination of man could invent”

C.R. Darwin

The various contrivances by which orchids are fertilized by insects, 1877

“...ainda muita cousa há para ser posta a limpo na secção Schistochilae deste gênero. Como demonstram os estudos que fizemos (Hoehne), em diversos exemplares e espécies diferentes nas regiões em que ellas aparecem, o callo do labello não pode, absolutamente, merecer a importância que até hoje tem sido dado a elle como character específico. Elle é tão variável e inconstante em cada espécie como o são os lobos do labello em sua forma e as incisões na sua maior ou menor profundidade. Estes estudos serão continuados para averiguarmos quaes os limites que temos de estabelecer para a variabilidade destes órgãos em cada espécie.”

F.C. Hoehne

Archivos de Botanica do Estado de São Paulo, 1926

“All orchid-species enthusiasts must by now surely be aware that just as orchids themselves are in a continual flux of evolution, the naming of orchids is equally in flux, a price we must pay for becoming involved in such a truly fascinating and enormous family of plants.”

G.C.K. Dunsterville

American Orchid Society Bulletin, 1979

## Agradecimentos

Para mim, esta é uma parte muito querida da dissertação. Este trabalho só foi possível graças a ajuda de muitas pessoas, que me auxiliaram das mais diferentes formas. A ordem em que os nomes aparecem nada significa, todos são importantes, de todos eu lembrarei com carinho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo financiamento deste projeto.

Ao Departamento de Botânica do Instituto de Biociências – USP e às seções de Orquidário do Estado e de Curadoria do Herbário do Instituto de Botânica, por terem oferecido as condições necessária para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos curadores dos herbários SP, SPF, RB, HB, R, MBM e UEC e das coleções vivas do Instituto de Botânica e do Departamento de Genética – ESALQ, por terem me auxiliado em todas as minhas necessidades.

Aos professores Antonio Salatino e Maria Luiza Faria Salatino por terem acreditado no meu projeto e me auxiliado em etapas bastante importantes do trabalho.

À Dra. Maria Candida Henrique Mamede, pelo apoio valioso no início deste trabalho.

À Samantha e Rodrigo, que me trouxeram clareza e incentivo para minhas idéias, num momento de grande confusão mental da minha vida.

Aos professores Gabriel Marroig e George Shepherd, que muito contribuíram para o amadurecimento das idéias contidas neste trabalho.

À Dra. Mariângela Cristofani e Alexandra Maria Casa por terem me ouvido e auxiliado num momento muito difícil do trabalho, onde tudo parecia impossível.

À George Mattox e Dr. Marcos Silveira Buckeridge, pela ajuda na tradução e revisão dos *abstracts*.

Aos amigos que trabalham com taxonomia, Denise, Lia, Rebeca, Franklin, Alexandra, Vinícius, Cristina, Marília, Bia, Lívia, Fátima, Renata, Ana Paula, João Vicente e Marcelo, por todas aventuras, desabafos, conselhos, pelos cafezinhos que me incentivaram a continuar e principalmente, pela nossa capacidade de rir das próprias desventuras.

A seguir, escrevo o nome de pessoas que tiveram extrema paciência comigo, já que foram elas que aceitaram o desafio de ensinar técnicas de biologia molecular a uma pessoa que jurou jamais colocar os pés num laboratório!!! Agradeço, de coração, à Lucimar, Mourisa, Cristiane, Claudinha, Sílvia e Elis por todo incentivo nos momentos de dificuldade, aflição, angústia e desespero, os quais não foram poucos.

De nada valeria a ciência que eu pratico sem as relações humanas que eu construí. Durante todos estes anos trabalhando na Seção do Orquidário do Estado, percebi o quanto estas relações são importantes, e o quanto devo a estas pessoas. Este trabalho é o reflexo destas relações, tão importantes para mim. À Rosana, Helena, Trisca, Diva, Naná e Romário, minha profunda admiração e carinho por todos vocês.

Ao meu amigo Emerson, pelo apoio e amizade em todos os momentos deste trabalho, alguns deles até bastante emocionantes.

Ao Ricardo Lourenço quero expressar minha gratidão pelo detalhamento bastante minucioso da variação morfológica encontrada neste grupo de plantas.

Muitas pessoas me ajudaram a conseguir espécimes importantíssimas, que me auxiliaram muito no entendimento deste grupo de plantas tão complexo. Agradeço, de coração, à Rubens Custódio, José Leônidas, João Batista, Leonardo Félix, José Lima Verde, Noé von Atzingen, Mauro Peixoto, Cláudio Fraga, Melissa, Marta, Eric, Juliane Stancik, Gilvan, Maria Ana e Marcelo.

Ao Edgley e a Cecília, meus amigos virtuais, pela grande ajuda em conseguir as imagens dos tipos que eu tanto precisava.

À Alessandra, minha importante amiga, também “virtual”, pelo apoio e pelos conselhos neste período louco de finalização da tese, e também pela revisão dos meus agradecimentos!!!!

Ao Fernando, meu grande amigo, agradeço por toda a ajuda valiosa e por tudo aquilo que me ensinou. Nunca pensei que nossa amizade tomaria o rumo que tomou. De colecionadores amadores que trocavam idéias sobre como cultivar plantas carnívoras, passamos a conversar sobre reações de amplificação e análises de eletroferogramas!!!

Ao Vítor, meu grande amigo, pelos conselhos preciosos no início, meio e fim deste trabalho, que parecia impossível de ser concretizado.

Aos meus amigos, companheiros que me ajudaram em tantas coisas que seria impossível enumerar aqui todas elas, mas que sem eles eu seria uma pessoa bem

diferente do que sou. Ao Rodrigo (Portuga), Fernanda (Maluf), George (Peixeiro), Riviane (Rivi), Pedro (Bial), Adriano (Pol), Marco (Gandhi), André (Big Milk), Evandro (Formiga) e Fernando (Pera). Se me esqueci de alguém, perdão, a culpa é das lesões cerebrais adquiridas durante este trabalho!!!

Não posso dizer que sou o mesmo de quando comecei este trabalho. Estas pessoas também não, pois durante todo este período, senti que elas se modificaram junto comigo. Neste trajeto, foram fundamentais para mim, nos conselhos, nas trocas de experiências, na sinceridade, no apoio irrestrito e, o mais importante, na amizade, em todos os significados que esta palavra possui. Ao Marcello, Adriano e Denise, amigos muito importantes para mim.

Agradeço muito ao meu orientador, Dr. Fábio de Barros, por me mostrar a seriedade e o rigor de sua forma de trabalhar com orquídeas, por me ensinar muito e, principalmente, por ter acreditado em mim em todos estes anos, me apoiando com muita coragem em projetos que, muitas vezes, pareciam impossíveis. Espero poder ter a sua colaboração em diversos projetos futuros, já que assuntos interessantes, em Orchidaceae, não faltam.

À minha família, que durante toda minha vida, foi uma grande “Fundação de Amparo à Pesquisa”!!! Com ela, conquistei tudo aquilo que parecia impossível, incerto, distante, difícil e complicado. Sempre recebi um apoio tão generoso e sincero, que o caminho a ser trilhado, por mais tortuoso que fosse, sempre foi vencido. Palavras não são suficientes para expressar toda minha gratidão, por isso espero que meus atos estejam a altura de todo amor e carinho que sempre recebi. Amo todos vocês.



# Índice

<b>Capítulo 1.</b>	Caracterização, biogeografia e padrões evolutivos em Orchidaceae.....	<b>01</b>
<b>Capítulo 2.</b>	Influência, em análises de AFLP, da análise visual dos eletroferogramas, sua padronização de intensidade e utilização de diferentes combinações de iniciadores.....	<b>08</b>
<b>Capítulo 3.</b>	Avaliação das relações intra e interespecíficas no complexo <i>Epidendrum secundum</i> (Orchidaceae) e espécies afins, através de AFLP.....	<b>60</b>
<b>Capítulo 4.</b>	Análise Morfométrica do complexo <i>Epidendrum secundum</i> (Orchidaceae) e espécies afins no Brasil...	<b>91</b>
<b>Capítulo 5.</b>	Estudo taxonômico do complexo <i>Epidendrum secundum</i> (Orchidaceae).....	<b>138</b>
<b>Capítulo 6.</b>	Conclusões gerais.....	<b>159</b>
<b>Bibliografia consultada</b> .....		<b>161</b>

# Capítulo 1

## Caracterização, biogeografia e padrões evolutivos em Orchidaceae

Fábio Pinheiro & Fábio de Barros

Fábio Pinheiro<sup>1,2</sup>, Fábio de Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Botânica – Seção de Curadoria do Herbário. <sup>2</sup>Instituto de Biociências, Laboratório de Sistemática Molecular - USP

### A família Orchidaceae

As plantas popularmente conhecidas como “orquídeas” pertencem à família Orchidaceae, um dos grupos de plantas mais diversos na atualidade, com um número de espécies entre 19.000 (Atwood, 1986) e 25.000 (Chase *et al.*, 2003). Existe uma grande diversidade de estruturas vegetativas e florais na família, fato que dificulta, muitas vezes, o estabelecimento de relações de parentesco entre as espécies e gêneros com base nas características morfológicas. Segundo Dressler (1993), são as partes vegetativas que possuem uma grande diversidade estrutural, relacionada com diferentes estratégias para a obtenção de recursos como água, luz e nutrientes (Benzing, 1990).

As flores possuem uma grande diversidade de tamanho e forma das estruturas, fato que confere à família grande parte de sua popularidade entre colecionadores e público em geral, seja pelas combinações bastante ornamentais, seja pelas formas estranhas e insólitas, algumas consideradas até bizarras. Ao contrário do que muitos pensam, o número e arranjo das partes florais são relativamente uniformes (Dressler, 1993), constantes em quase todas as espécies da família. Aliás, são as características da flor que possibilitam a identificação de uma planta como sendo uma orquídea ou não. Para muitos autores (van der Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1993; Arditti, 1992), são também estas características as responsáveis pelo grande número de espécies, ampla distribuição e intrincados mecanismos de polinização, já que possuem influência direta sobre a reprodução e a evolução do grupo.

Nas plantas em geral os órgãos sexuais são divididos em androceu, a parte masculina, formado por filete, conectivo e antera, e gineceu, a parte feminina, formado por ovário, estilete e estigma. Estas estruturas se dispõem de diversas maneiras nas flores, mas em orquídeas elas estão agrupadas de uma maneira única: o filete e o estilete se encontram soldados, formando uma

estrutura única, chamada de ginostêmio, popularmente conhecido como “coluna”. Esta é uma das principais características que diferencia as orquídeas das demais plantas. Geralmente, a antera fértil se encontra no ápice do ginostêmio e os lobos do estigma se localizam numa cavidade, a cavidade estigmática, na face voltada para o labelo. Em Orchidaceae, acredita-se que houve uma gradual redução no número de anteras, pois em *Apostasia* e *Neuwiedia*, gêneros considerados ancestrais dentro da família, existem duas ou três anteras férteis e, na grande maioria das demais espécies, apenas uma (Arditti, 1992; Dressler, 1993). Em Orchidaceae, os segmentos do perianto externo e interno são divididos em sépalas e pétalas, pois estes dois conjuntos de segmentos possuem morfologias diversas. Uma das pétalas, exatamente aquela que se encontra geralmente oposta à única antera fértil, é bastante diferenciada das demais, e recebe o nome de labelo, outra estrutura utilizada para se diferenciar, à primeira vista, uma orquídea de outras plantas.

Na antera, os grãos de pólen estão agrupados, unidos por uma substância denominada viscina, formando a polínia (Dressler, 1993). Esta união dos grãos de pólen pode ser entendida como uma característica diretamente ligada à grande quantidade de óvulos a serem fecundados no ovário (Dressler, 1993). O baixo número de visitas de polinizadores também pode ser uma causa, já que todos os grãos de pólen podem ser levados para outra flor em apenas uma visita (Johnson & Edwards, 2000). Os óvulos só iniciam seu desenvolvimento após a fecundação, fato que garante uma economia de energia caso a flor não seja fecundada (Arditti, 1992).

As sementes de orquídeas são estruturas bastante pequenas e especialmente adaptadas à dispersão pelo vento (Arditti, 1992). A maioria das espécies possui sementes com paredes bem finas, translúcidas, através das quais se vê o embrião, formado por poucas células e quase sem tecido de reserva. Em condições favoráveis a plântula completa, às suas próprias expensas, apenas os primeiros estágios de crescimento e, para continuar seu desenvolvimento, precisa ser infectada por determinados tipos de fungos (Dressler, 1981). Estes fungos, num primeiro momento, penetram pela parede da semente através de suas hifas, chegando ao embrião; este possui a capacidade de controlar o crescimento das hifas e digerí-las, aproveitando seus nutrientes (Arditti, 1992). É uma relação bastante próxima daquela que ocorre nas raízes de orquídeas, onde também há uma associação com fungos, chamados de micorrizas, que também efetuam aporte de nutrientes para as plantas.

#### Tendências evolutivas em Orchidaceae

Tanto o labelo quanto o ginostêmio conferem à flor uma simetria bilateral. Se flores como rosas, lírios e íris forem divididas em duas metades, estas serão a imagem especular uma da outra, independentemente da posição do corte, desde que este passe pelo centro da flor, pois estas flores possuem simetria radial. Em orquídeas, para se obter duas metades que sejam a imagem especular uma da outra, o corte só pode ser realizado numa posição. O ginostêmio e o labelo têm papel fundamental na evolução do grupo, pois estão diretamente relacionadas com a atração e interação da flor com o polinizador, a causa primária da grande diversidade encontrada na família (Rudall & Bateman, 2002).

O labelo atua diretamente em duas etapas: atração do polinizador e plataforma de pouso. É no labelo que se encontra a maior parte dos recursos utilizados pela planta para atrair os polinizadores que, além de cores atrativas, pode conter ceras, utilizadas por algumas abelhas para construção de colméias, néctar, localizado em nectários e utilizado como alimento, fragrância, utilizada por machos de algumas abelhas para compor seu feromônio para atração das fêmeas, grãos de amido, denominados de pseudopólen, utilizados por insetos como alimento.

Existem casos em que nenhum recurso está disponível, ou seja, o agente polinizador é atraído, efetua a fecundação e não recebe nenhuma recompensa. São os casos de polinização por decepção, nos quais a flor “simula” a existência de uma recompensa.

Diversos apêndices no labelo, além de abrigar os recursos ou “simular” a existência de recursos, têm um papel muito importante no correto posicionamento do polinizador na flor (van der Pijl & Dodson, 1966), para que este possa retirar as polínias de maneira satisfatória e, depositá-las corretamente no estigma de outra flor. Diversos estudos demonstraram que não existe uma grande especificidade entre polinizador e flor, mas sim uma especificidade na região do corpo do polinizador onde as polínias são fixadas. É relativamente comum observar uma abelha carregando polínias de diversas espécies de orquídeas simultaneamente, em locais diferentes do corpo. Em muitas espécies de orquídeas, é a maneira com que a polínia é afixada no agente polinizador que garante o transporte do pólen para outra planta da mesma espécie, já que o local onde a polínia é afixada é constante para cada espécie de orquídea.

Orquídeas, de um modo geral, parecem apresentar uma tendência a limitar seu número de polinizadores e tornar o processo de transferência de pólen de uma flor a outra o mais eficiente possível, de tal modo que o transporte do pólen seja efetuado exatamente para uma outra flor de um indivíduo da mesma espécie (Arditti, 1992, Dressler, 1981).

Sistemas de polinização nos quais o recurso não é, necessariamente, alimento para o polinizador, comuns em Orchidaceae, parecem conferir bastante eficiência no transporte do pólen (Dressler, 1981). Fragrâncias específicas para cada inseto, óleos e estruturas na flor que simulam o

parceiro sexual parecem garantir grande fidelidade do polinizador à flor, o que é bastante eficaz no isolamento reprodutivo e economia de recurso, ao garantir que o pólen de uma espécie seja levado para outro indivíduo da mesma espécie, limitando seu desperdício (Dressler, 1981). Além disso, as polínias podem ser transportadas por longas distâncias, permitindo a polinização de espécies com distribuição descontínua, já que o recurso que o inseto procura é encontrado apenas nas flores de determinada espécie.

A grande quantidade de óvulos que podem ser fecundados no ovário parece ter sido a principal causa de tais especializações em flores de orquídeas. A redução do número de anteras férteis e a aglutinação dos grãos de pólen em polínias parecem ser características selecionadas em virtude de uma maior economia de pólen e uma maior eficiência no seu transporte (Darwin, 1892; Johnson & Edwards, 2000), já que todos os grãos de pólen são transportados de uma única vez. Assim, o fluxo gênico necessário para manter a variabilidade da espécie ocorreria através da grande quantidade de sementes produzida e dispersa, ao contrário de outras plantas, em que a dispersão dos grãos de pólen é o fato responsável pelo fluxo gênico (Rudall & Bateman, 2002).

### Biogeografia e evolução de Orchidaceae na América do Sul

Representantes da família ocorrem em todo o planeta, exceto nas regiões polares. Porém, a maioria das espécies ocorre nas regiões tropicais e, em especial, nos Neotrópicos (Dressler, 1981; Gentry & Dodson, 1987). A ampla distribuição da família pelo planeta não pode ser atribuída totalmente a eventos de dispersão a longa distância, apesar das sementes serem pequenas e terem condições de percorrer longas extensões de terreno (van der Pijl, 1972). Existem diferenças marcantes nas composições de gêneros e espécies entre os continentes (Brieger, 1958, 1971), existindo apenas alguns gêneros e espécies em comum entre eles, sugerindo que grande parte da evolução ocorreu por pressões intrínsecas a cada continente.

A Região Neotropical exibe quantidade de espécies bastante superior à da África e do Sudeste Asiático. Tal situação pode ser devida ao fato da África e Sudeste Asiático possuírem solos relativamente mais pobres e menor quantidade de florestas nebulares (Gentry & Dodson, 1987; Benzing, 1990) e, por estas regiões terem sofrido efeitos mais severos no que diz respeito à retração das áreas tropicais durante as flutuações do Pleistoceno (Raven & Axelrod, 1974), já que é observada menor riqueza também em outros grupos vegetais.

As encostas do Norte da Cadeia dos Andes são as áreas conhecidas com a maior quantidade de espécies de plantas epífitas, sendo a ampla maioria pertencentes às Orchidaceae (Dressler, 1981;

Gentry & Dodson, 1987; Benzing, 1990). O clima da região é um dos fatores responsáveis por esta diversidade. Na faixa entre 1000m e 1500m de altitude situam-se as matas nebulares, favoráveis ao epifitismo pela sua grande umidade atmosférica e baixa sazonalidade (Benzing, 1990).

É tentador sugerir que este tipo de ambiente é estável o bastante para que as espécies de Orchidaceae tivessem tempo para especiar e produzir a riqueza de espécies observadas no presente, porém, o panorama observado é bem diferente, a começar pela própria dinâmica da floresta. A queda de árvores, propiciando áreas florestais em diferentes níveis de sucessão é uma causa bastante importante, já que produz diversidade de microhabitats disponíveis para serem colonizados (Gentry & Dodson, 1987). A própria instabilidade do substrato (ciclo de vida da árvore que serve de apoio para as orquídeas) é um fator determinante da necessidade de colonizar novas áreas constantemente. A produção de grande quantidade de sementes em Orchidaceae é uma estratégia que procura aumentar as chances de estabelecimento das plântulas pois os locais adequados para germinação são bastante específicos. Isso permite o estabelecimento de poucos indivíduos em locais distantes de sua origem, de maneira dispersa, gerando populações disjuntas. Os mecanismos específicos de polinização, caracterizados por relações estreitas entre planta e polinizador, geram eficientes barreiras reprodutivas, apesar do fato de diferentes espécies produzirem, artificialmente, híbridos férteis (van der Pijl & Dodson, 1966). Pequenas diferenças entre espécies de orquídeas, na morfologia ou composição de aromas (van der Pijl & Dodson, 1966) são suficientes para que o agente polinizador possa discriminá-las (Dafni *et al.*, 1997). Um cenário com estas condições sugere um tipo de evolução pelo processo de "shifting balance", no qual novas oportunidades ecológicas propiciam a ocupação de diferentes picos adaptativos por seleção natural (Wright, 1982). A produção de populações disjuntas, originadas talvez por apenas um indivíduo, gera desequilíbrios gaméticos e novas ordens de recombinação genética, gerando populações distintas pelo processo de efeito fundador (Carson & Templeton, 1984). As características presentes em Orchidaceae favorecem a ocorrência de "shifting balance" e efeito fundador em conjunto (Gentry & Dodson, 1987), sendo responsáveis pelos padrões observados, como gêneros possuindo uma grande quantidade de espécies (*Epidendrum* = 1.125; *Lepanthes* = 931; *Pleurothallis* = 813; *Masdevalia* = 507; *Maxillaria* = 552; *Oncidium* = 336) (Chase *et al.*, 2003) pouco diferenciadas entre si, gerando grandes incertezas taxonômicas (Dressler, 1993).

### Varição intra e interespecífica em gêneros neotropicais de Orchidaceae

A quantificação do número de espécies existentes em diversos gêneros de Orchidaceae ainda é bastante incerta, principalmente em gêneros muito grandes, amplamente distribuídos, como *Epidendrum*, *Lepanthes* e *Maxillaria* (Chase *et al.*, 2003). Em diversos levantamentos de espécies realizados (Schweinfurth, 1959; Dunsterville & Garay, 1959, 1961, 1965, 1966, 1972, 1976; Pabst & Dungs, 1975) os caracteres utilizados para delimitar espécies foram, basicamente, morfológicos os quais, muitas vezes, apresentam um padrão de variação contínuo entre indivíduos considerados como espécies distintas. Trabalhos recentes utilizando outras fontes de dados, como a variação presente em sequências de nucleotídeos (van den Berg, 2000; Whitten *et al.*, 2000; Pridgeon *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001; Koehler *et al.*, 2002; Higgins *et al.*, 2003) tiveram como objetivo principal esclarecer a delimitação genérica de vários grupos ainda incertos, promovendo grande mudança na nomenclatura de diversos gêneros, muitas vezes com base em evidências pouco conclusivas e amostragens reduzidas.

Estudos baseados em caracteres morfológicos ainda são publicados, principalmente na caracterização de novas espécies (Hagsáter, 1993; Bennett & Christenson, 1998). Porém, na maioria dos casos, diversas espécies são descritas sem considerar a variação morfológica que existe numa mesma população, levando a conclusões equivocadas já que, nestes casos, a descrição de um novo táxon não se justifica.

Trabalhos utilizando morfometria (Palestina & Sosa, 2002; Sapir *et al.*, 2002), técnicas moleculares (Hédren *et al.*, 2001; Tremetsberger *et al.*, 2003) e, às vezes, ambos (Saarela *et al.*, 2003; Lihová *et al.*, 2004) produzem conjuntos de dados bastante consistentes pois se baseiam em diferentes tipos de caracteres. Sua interpretação conjunta permite uma delimitação muito mais segura dos táxons envolvidos, podendo ser feitas, inclusive, inferências sobre os processos responsáveis pelos padrões observados (Borba *et al.*, 2001; Marhold *et al.*, 2002). Nem sempre a interpretação de conjuntos de dados distintos é possível, já que a variação genética pode ser diferente daquela encontrada nos padrões morfológicos. Porém, estas discordâncias são indícios de que os processos biológicos envolvidos na formação do padrão de variação observado podem ser complexos, oferecendo oportunidades para que outros trabalhos sejam realizados (Borba & Semir, 2001; Smith *et al.*, 2004). A formação de novas espécies por hibridização era um processo considerado raro nas populações naturais, mas que ganhou uma grande importância com trabalhos que exploraram incongruências entre fontes de dados distintas (Barkman & Simpson, 2002; Gross *et al.*, 2003). Atualmente existem evidências que a hibridização entre espécies pode ter originado grande parte das espécies observadas no presente (Rieseberg, 1997; Funk & Omland, 2003; Seehausen, 2004).

O objetivo deste trabalho foi esclarecer as relações intra e interespecíficas em um dos grupos de espécies mais complexos de Orchidaceae, pertencente ao gênero *Epidendrum* L., o complexo *Epidendrum secundum*. A caracterização das espécies deste grupo tem sido baseada apenas em características morfológicas, que se revelam bastante confusas quando se tenta utilizá-las na separação de espécimes, já que muitas delas mostram variação contínua. Os trabalhos que existem sobre este grupo são, em sua maioria, levantamentos de espécies de regiões específicas da América do Sul, nos quais se pode notar uma divergência na opinião dos autores: alguns considerando a existência de diversas espécies no grupo (Pabst & Dungs, 1975; Brieger, 1976-1977; Sastre, 1990a, 1990b), e outros partindo do pressuposto de que as variações são contínuas, permitindo reconhecer apenas uma espécie polimorfa (Dressler, 1989; Dunsterville & Garay, 1961; Garay & Sweet, 1974; Vasquez & Ibsch, 2004). Foram levantados dados morfológicos, através de morfometria, e moleculares, com a utilização da técnica de AFLP. A utilização destas técnicas visa conferir maior objetividade ao tratamento taxonômico deste grupo, baseando a delimitação das espécies existentes em caracteres provenientes de fontes distintas. A congruência entre as fontes de dados é discutida, assim como os processos biológicos que podem estar envolvidos no padrão observado.

## Capítulo 2

### **Influência, em análises de AFLP, da análise visual dos eletroferogramas, sua padronização de intensidade e utilização de diferentes combinações de iniciadores**

Fábio Pinheiro<sup>1,2</sup>, Fernando Rivadavia<sup>3</sup>, Fábio de Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Botânica – Seção de Curadoria do Herbário. <sup>2</sup>Instituto de Biociências, Departamento de Botânica – USP. <sup>3</sup>Alameda Ribeirão Preto, 438, São Paulo - SP

#### Resumo

O esclarecimento de relações intra e interespecíficas entre espécies vegetais tem sido alcançado com o emprego de técnicas baseadas na análise de fragmentos de DNA, já que o sequenciamento de nucleotídeos não tem oferecido resolução suficiente. Nesse sentido, AFLP é uma técnica bastante útil, pois pode ser aplicada em diversos tipos de organismos sem que se tenha um conhecimento prévio de seus genomas, possui etapas que restringem o aparecimento de artifícios e produz grande quantidade de polimorfismos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência que a análise manual dos eletroferogramas, a padronização de suas intensidades e a utilização de diversas combinações de iniciadores exercem em conjuntos de dados provenientes de grupos de espécies taxonomicamente próximas. Foram utilizadas nove espécies de *Epidendrum* (Orchidaceae) das subseções *Carinata* e *Tuberculata*, totalizando 87 indivíduos. Os resultados indicam que a análise manual dos eletroferogramas produz resultados compatíveis com a taxonomia e a distribuição geográfica das espécies envolvidas, melhorando sua interpretação, assim como a padronização das intensidades dos eletroferogramas. A utilização de mais de um par de iniciadores em conjunto produz resultados mais consistentes do que aqueles obtidos por pares de iniciadores em separado, mostrando a importância de se utilizar diversas combinações de iniciadores, principalmente em grupos de espécies próximas.

## Abstract

The understanding of intra- and interspecific relationships among plant species has been enhanced by the use of techniques based on DNA fragments analysis, mainly when the nucleotide sequencing has not enough resolution. AFLP is a useful technique because: (a) it can be applied to many types of organisms without the need of a previous knowledge of their genome, (b) it has some steps preventing the occurrence of artificial data, and (c) it produces a large amount of polymorphisms. The aim of this work was to evaluate the influence of manual analysis of electroferograms, standardization of its intensities, and use of some combinations of primers for the analyses of sets of data from taxonomically close species. Eighty seven individuals from nine species of *Epidendrum* (Orchidaceae) from subsections *Carinata* and *Tuberculata* were used. Our results indicate that the manual analysis of electroferograms improved data interpretation and produced outcomes that are consistent with the taxonomy and the geographical distributions of the species. The same occurred with the standardization of intensities of electroferograms. The use of more than one pair of primers in combination produces results that are more consistent than those obtained with each separate pair of primers. This highlights the importance of the use of diverse combinations of primers, mainly when analyzing taxonomically close species.

## Introdução

Estudos que tentam entender a relação de parentesco entre plantas em níveis intra e interespecíficos são importantes porque permitem avaliar quais caracteres tiveram, de fato, importância nos processos de diferenciação de linhagens e/ou especiação nesses grupos (Templeton, 1981). A utilização de dados moleculares nesse tipo de abordagem é fundamental pois essa fonte de dados fornece a resolução necessária para que sejam discriminados indivíduos (Fritsch & Lucas, 2000; Nason *et al.*, 2002; Squirrel *et al.*, 2002), linhagens (Cardoso *et al.*, 2000; Kjaer *et al.*, 2004; Tremetsberger *et al.*, 2003) ou mesmo grupo de espécies muito próximas (Marhold *et al.*, 2002; Wallace & Case, 2000; Winfield *et al.*, 1998).

Dentre os tipos de técnicas moleculares que podem ser utilizadas, o seqüenciamento de bases nucleotídicas alcançou grande popularidade por produzir resultados importantes e congruentes com outras fontes de dados para diversos grupos vegetais, em diversos níveis hierárquicos (Pryer *et al.*, 2001; APG, 1998; Chase *et al.*, 2003; Rivadavia *et al.*, 2003; van den Berg *et al.*, 2000). Porém, em níveis hierárquicos inferiores, as seqüências obtidas revelam-se bastante conservadas, não produzindo a resolução necessária para a distinção dos táxons envolvidos (Crawford & Mort, 2004; Després *et al.*, 2003). Além disso, tentar reconstruir relações evolutivas entre grupos de espécies próximas, ou linhagens, com base em apenas algumas regiões do genoma pode levar a resultados duvidosos, já que cada região do genoma pode ter história evolutiva e taxas de mutação diferentes (Avice & Wollenberg, 1997). Numa análise deste tipo, pode-se obter um dendrograma que represente a relação evolutiva entre as regiões do genoma utilizadas e não dos organismos em questão (Crawford & Mort, 2004).

A resolução necessária para se estabelecer relações de parentesco entre espécies, linhagens ou mesmo populações pode ser obtida com o emprego de técnicas que se baseiam em comparações entre tamanhos de fragmentos de DNA ou enzimas, comumente chamados marcadores moleculares. Tais técnicas foram desenvolvidas inicialmente em plantas cultivadas, para a detecção de linhagens em espécies agrícolas e florestais, testes de paternidade e mapeamento de genes (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Karp *et al.*, 1997). Dentre as técnicas mais utilizadas, podem ser destacadas:

**Isoenzimas** – A técnica se baseia em comparar indivíduos com base na presença ou ausência de determinadas proteínas, bem como em diferenças no tamanho molecular dessas enzimas (Ferreira & Grattapaglia, 1995). A presença de determinadas enzimas numa amostra e sua variação de tamanho é verificada empregando-se eletroforese em gel de amido. As isoenzimas são visualizadas através de corantes histoquímicos específicos, que fornecem um substrato para as enzimas, as quais catalisam uma reação no local onde se encontram no gel, produzindo uma banda (Fig. 1) (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Padrões de bandas distintos são interpretados como resultantes de diferenças em nível de seqüências de DNA que codificam essas enzimas (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Apesar de ser de fácil utilização e de produzir dados em pouco tempo, abarca um número limitado de polimorfismos (Rieseberg, 1998; Adell, 1999), sendo imprópria para detectar casos de divergência recente de espécies.

Além disso, os polimorfismos observados podem ser fruto de variação fisiológica produzida como resposta às variações ambientais (Adell, 1999).

**RFLP** (Restriction Fragment Length Polymorphism) - São fragmentos de DNA clivados através de enzimas de restrição. A existência de polimorfismos é detectada quando esses fragmentos se ligam às seqüências complementares de DNA marcadas radioativamente, denominadas "sondas" (Fig. 2) (Adell, 1999). Tais sondas são específicas para cada organismo e sua disponibilidade pode estar restrita às culturas intensivamente estudadas, como milho, soja, batata, etc. (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Para grupos vegetais que ainda não foram estudados, sondas apropriadas precisam ser desenvolvidas para que se possa utilizar RFLP. Além disso, os passos a serem seguidos para se obter os resultados consomem muito tempo, são difíceis de automatizar e a utilização do método foi reduzida após o desenvolvimento da reação em cadeia de polimerase (PCR = Polymerase Chain Reaction) (Karp *et al.*, 1996; Adell, 1999). Apesar disso, a técnica seguramente envolve a comparação de caracteres homólogos, que podem ser analisados com método filogenético, como parcimônia (Karp *et al.*, 1997).

**Microssatélites**, ou **SSRs** (Simple Sequence Repeats) - A técnica baseia-se na comparação de regiões altamente repetitivas do genoma (repetições em "tandem") geralmente menores que cinco pares de bases (AATAATAATAAT = (AAT)<sub>4</sub>; TGTGTGTGTG = (TG)<sub>5</sub>), como (AAT)<sub>n</sub> ou (TG)<sub>n</sub>. A fonte de polimorfismos está no número de vezes que as unidades ocorrem entre os indivíduos (Fig. 3). As regiões do genoma que possuem estas seqüências repetitivas são amplificadas e sua presença pode ser verificada em gel, com marcação radioativa, ou por seqüenciadores automáticos de DNA, com marcação por fluorescência. Esses marcadores produzem grande quantidade de variação e, como são do tipo co-dominantes, são usados extensamente em trabalhos de diversidade, fluxo gênico, paternidade e caracterização de linhagens (Robinson & Harris, 1999). A técnica exige um conhecimento prévio do genoma a ser estudado, já que necessita de iniciadores específicos para amplificar as regiões que possuem as unidades de repetição (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Karp *et al.*, 1997). Além disso, apenas algumas regiões do genoma são amostradas (como no seqüenciamento de nucleotídeos) e a homologia entre estas regiões não é garantida (Robinson & Harris, 1999).

**RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA) - é uma técnica baseada na análise de fragmentos específicos de DNA, amplificados através de iniciadores com seqüências estabelecidas aleatoriamente (Adell, 1999). As cópias são produzidas em termocicladores e analisadas por eletroforese, sendo visualizadas como bandas, ou seja, regiões do gel correspondentes a fragmentos de mesmo tamanho (Fig. 4). A comparação entre bandas que ficam em diferentes posições no gel revela a existência de fragmentos com diferentes tamanhos e, portanto, os polimorfismos entre as diferentes amostras de DNA são evidenciados. A comparação do padrão de bandas entre as diferentes amostras é convertida em dados de presença/ausência, sendo produzidas matrizes de similaridade por meio das quais são calculadas as distâncias genéticas (Karp *et al.*, 1996). A simplicidade do equipamento de laboratório necessário, a marcação não radioativa dos fragmentos e a produção de muitos marcadores com os iniciadores disponíveis fazem de RAPD uma técnica tentadora (Wolfe & Liston, 1998). Porém, um dos principais problemas dessa técnica é a baixa reprodutibilidade, pois em muitos casos a estabilização e a reprodução dos resultados obtidos são muito difíceis de obter (Karp *et al.*, 1996; Wolfe & Liston, 1998). A homologia entre os fragmentos de um mesmo tamanho não é segura, já que não se conhece a seqüência de nucleotídeos dos fragmentos. Porém, Rieseberg (1996) demonstrou que 91% dos fragmentos obtidos em seu trabalho eram homólogos, tornando a questão ainda incerta.

**AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphisms) - é uma técnica mais recente, com passos semelhantes a algumas técnicas anteriores, como RFLP e RAPD (Vos *et al.*, 1995). O genoma total do organismo de interesse (inclusive das organelas) é clivado com duas enzimas de restrição, *Mse* I e *Eco*R I (Fig. 5). Nas extremidades dos fragmentos originados por clivagem são ligados adaptadores específicos, que reconhecem os sítios cortados por cada uma das enzimas de restrição (Fig. 5). Na primeira etapa de amplificação, os fragmentos ligados a adaptadores são amplificados utilizando-se iniciadores que possuem seqüência complementar aos adaptadores (Fig. 5). Sendo assim, apenas os fragmentos que possuem adaptadores são amplificados. Esta primeira amplificação chama-se "amplificação pré-seletiva" porque os iniciadores podem conter, além de sua seqüência usual, a adição de mais um nucleotídeo, que tem por função restringir o número de fragmentos que serão amplificados, já que, para ser amplificado, o fragmento precisa estar ligado a um adaptador e possuir o nucleotídeo complementar àquele do iniciador. A próxima etapa consiste numa



segunda amplificação, chamada “amplificação seletiva”, pois os iniciadores utilizados agora, além das seqüências complementares às dos adaptadores, contêm dois ou três nucleotídeos extras, que também têm por função, como na etapa anterior, restringir o número de fragmentos que serão amplificados (Fig. 5). Os fragmentos obtidos podem ser verificados num gel de poliacrilamida, com marcação radioativa ou por prata, ou, ainda, podem ser detectados em um seqüenciador automático de DNA, através de marcação por fluorescência. Mais detalhes sobre a técnica são disponíveis no “AFLP Plant Mapping Protocol” (Applied Biosystems, 2000), bem como nos trabalhos de Karp *et al.* (1996), Mueller & Wolfenbarger (1999), Rieseberg (1998) e Wolfe & Liston (1998).

Dentre as principais vantagens da técnica, podem-se destacar: a) a produção de grande quantidade de polimorfismos, produzindo alta resolução mesmo em grupos de organismos bastante próximos (Despres *et al.*, 2003; Gobert *et al.*, 2002; Hedren *et al.*, 2001; Kjaer *et al.*, 2004; Kropf *et al.*, 2003; Lihová *et al.*, 2004); b) os marcadores são produzidos em todo o genoma do organismo, excluindo-se o risco de basear as análises de parentesco apenas em algumas regiões que podem não representar as relações evolutivas do genoma como um todo (Crawford & Mort, 2004; Robinson & Harris, 1999); c) como a técnica é baseada em etapas de amplificação, pequena quantidade de DNA é necessária para iniciar as reações, podendo este fato representar grande vantagem quando o tecido vegetal é de difícil obtenção (Fay *et al.*, 2005; Robinson & Harris, 1999); d) não é necessário um conhecimento detalhado do genoma, em se tratando de seqüências de nucleotídeos, pois existem diversos tipos de iniciadores em AFLP que podem ser testados, de acordo com o seu desempenho no táxon em estudo. A maior parte dos trabalhos em AFLP realiza estes testes prévios (Forrest *et al.*, 2004; Gaudeul *et al.*, 2000; Gobert *et al.*, 2002; Hedren *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004). Em kits especializados para a técnica, como o “AFLP Plant Mapping Kit” da Applied Biosystems, existe a possibilidade de se testar 64 combinações diferentes de iniciadores (Applied Biosystems, 2000).

Estimativas de tamanho do genoma a ser analisado, correspondendo ao valor de 1C (1C = quantidade de DNA de um núcleo haplóide de um organismo, em picogramas), podem diminuir problemas no emprego da técnica (Fay *et al.*, 2005). Mesmo entre populações de uma espécie foram detectadas variações no valor de 1C, que podem indicar processos de diferenciação de linhagens ou mesmo de especiação (Murray, 2005). Variações no valor de

1C podem ter importante papel adaptativo em grupos diversificados, que exibem elevado grau de especialização a determinados tipos de ambientes (Chase *et al.*, 2005).

Existem evidências que confirmam que o tamanho do genoma tem influência sobre dados gerados por AFLP (Fay & Krauss, 2003; Fay *et al.*, 2005; Ferreira & Grattapaglia, 1995; Han *et al.*, 1999). Quanto maior o valor de 1C, maior a chance de fragmentos de igual tamanho serem originados de diferentes partes do genoma, diminuindo e mascarando polimorfismos entre amostras (Fay & Krauss, 2003). Neste caso, mesmo que a quantidade de fragmentos produzidos seja grande, estes possuem baixa intensidade, comprometendo seu aproveitamento nas análises (Fay *et al.*, 2005).

Uma forma de contornar esse problema é a utilização de iniciadores com graus de especificidade distintos, isto é, iniciadores que, além de sua seqüência usual, possuem 2, 3 ou 4 nucleotídeos extras que tendem a ser mais seletivos à medida em que se aumenta a quantidade de nucleotídeos adicionais. Existem kits especializados para AFLP que possuem iniciadores com números diferentes de nucleotídeos extras (Applied Biosystems, 2000). Kits para “genoma grande” possuem iniciadores com 4 nucleotídeos extras, 3 nucleotídeos extras para “genoma regular” e 2 para “genoma pequeno” (Applied Biosystems, 2000). Testes realizados por Fay *et al.* (2005) utilizaram plantas com tamanho de genoma distintos e iniciadores para genoma pequeno (2 nucleotídeos extras) e genoma regular (3 nucleotídeos extras). Os resultados mostraram que a utilização de iniciadores para genoma pequeno tende a produzir maior número de fragmentos em genomas pequenos, porém sem acréscimo na quantidade de polimorfismos detectados. Iniciadores para genoma regular produziram maior quantidade de fragmentos em plantas de genoma grande, resultado inesperado pois estes iniciadores tendem a amplificar menor número de fragmentos. Ainda assim, a quantidade de polimorfismos detectados não apresentou diferenças expressivas entre os diferentes genomas amostrados. Testes precisam ser realizados com ambos os tipos de iniciadores antes de qualquer trabalho com AFLP, medindo-se a qualidade dos fragmentos obtidos e os polimorfismos detectados, pois o tamanho do genoma pode ter influência distinta de acordo com a planta em estudo (Fay *et al.*, 2005). De um modo geral, iniciadores para genoma regular podem ser utilizados em plantas com valor de 1C entre 0,3 a 12,0 pg (Fay *et al.*, 2005). Em plantas com valores de 1C inferiores, a utilização de iniciadores para genoma

pequeno pode elevar a quantidade de fragmentos produzidos mas, não necessariamente, aumentar a quantidade de polimorfismos detectados (Fay *et al.*, 2005).

A uniformização do tecido de onde o DNA é extraído também é importante, já que diferentes tecidos podem conter graus diferentes de metilação, que podem afetar a clivagem por enzimas de restrição (Donini *et al.*, 1997).

Os dados obtidos numa análise por AFLP não podem ser compartilhados com outros pesquisadores como ocorre com seqüências de nucleotídeos (Crawford & Mort, 2004; Robinson & Harris, 1999). Tanto a clivagem do DNA por enzimas de restrição como a amplificação dos fragmentos obtidos podem ser afetados, principalmente por substâncias inibidoras presentes nos tecidos utilizados (Ferreira & Grattapaglia, 1995, Fang *et al.*, 1992), provocando diferenças no número de fragmentos produzidos, mesmo em ensaios utilizando um mesmo indivíduo (Fig. 6). Os parâmetros envolvidos na estabilização dessas reações, procurando uniformizar os resultados do conjunto amostral, são complexos e envolvem diversas variáveis que nem sempre podem ser discriminadas nas publicações científicas, tornando inapropriado o intercâmbio deste tipo de dado. Apesar de o seqüenciamento de nucleotídeos também necessitar de atenção quanto à qualidade de seus resultados, o tipo de dado produzido pode ser avaliado de uma maneira mais objetiva quanto à sua qualidade: se a seqüência da região desejada tiver uma qualidade ruim, ela é descartada, se tiver uma qualidade boa, é aceita e compartilhada com outros pesquisadores. Em análises baseadas em presença e ausência de fragmentos de DNA, como AFLP, fragmentos com boa qualidade são produzidos na maioria das reações, mas pode ocorrer uma grande variação no número de fragmentos aproveitáveis (Fig. 6).

Os diferentes iniciadores disponíveis para a técnica tendem a dificultar ainda mais o intercâmbio de dados de AFLP já que diferentes combinações são necessárias para cada grupo taxonômico em estudo. Em Orchidaceae, os diversos grupos de espécies analisados com AFLP utilizaram diferentes combinações de iniciadores (Fay & Krauss, 2003; Forrest *et al.*, 2004; Hedrén *et al.*, 2001; Qamaruz-Zaman *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2004) e, dependendo do tamanho do grupo, o grau de especificidade pode ser diferente mesmo dentro de um gênero. Fragmentos produzidos por AFLP só podem ser comparados quando produzidos por um mesmo par de iniciadores, já que diferentes iniciadores amplificam diferentes regiões do DNA (Robinson & Harris, 1999).

A padronização necessária dos resultados obtidos por AFLP, num conjunto de amostras, melhorou significativamente com a utilização de seqüenciadores automáticos de DNA e programas de computador especialmente criados para este fim, já que existe a possibilidade de se estabelecerem parâmetros objetivos que auxiliam na detecção dos fragmentos produzidos nas amostras e a discriminação dos fragmentos que devem participar das análises daqueles que podem ser fruto de artifícios ou contaminação (Fig. 7) (Crawford & Mort, 2004; Robinson & Harris, 1999). No início da utilização da técnica, os fragmentos eram detectados na forma de presenças de bandas num gel de poliacrilamida, após um processo de eletroforese (Fig. 8) (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Porém, a intensidade das bandas nesses géis pode ser bastante variável, e não há métodos objetivos para determinar quais bandas possuem boa qualidade e quais devem ser descartadas (Robinson & Harris, 1999).

A homologia entre os fragmentos obtidos por AFLP e por outras técnicas semelhantes é uma questão em debate entre diversos autores. Em princípio, a homologia entre os fragmentos é contestada porque não se conhece, de fato, a seqüência de nucleotídeos que compõe cada fragmento, tornando tal homologia discutível (Robinson & Harris, 1999). A técnica possui passos bastante restritivos, que visam minimizar a presença de artifícios, como clivagem do DNA por duas enzimas de restrição diferentes, utilização de adaptadores com seqüência complementar aos iniciadores e temperaturas elevadas para o anelamento de iniciadores (Applied Biosystems, 2000; Mueller & Wolfenbarger, 1999; Ferreira & Grattapaglia, 1995). No momento apenas o trabalho de Ruppe-van der Voort *et al.* (1997) tentou averiguar a homologia dos fragmentos produzidos por AFLP, e verificou que 95% dos fragmentos obtidos possuíam a mesma seqüência de nucleotídeos. Segundo Rieseberg (1996), a homologia entre os fragmentos de AFLP pode ser proporcional à proximidade taxonômica entre os grupos em questão. Lacerteau & Szmidi (1999), utilizando AFLP, confirmaram as relações de parentesco entre espécies próximas de *Pinus*, porém com a inclusão de táxons distantes, obtendo resultados incongruentes. Robinson & Harris (1999) afirmaram que, acima do nível hierárquico de espécie, a utilização de AFLP não é aconselhável.

Por outro lado, resultados produzidos por AFLP têm sido corroborados por dados produzidos por seqüenciamento de nucleotídeos, gerando dendrogramas com topologias muito semelhantes (Giannasi *et al.*, 2001; Hedren *et al.*, 2001; Kropf *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004). Apesar de a homologia entre os fragmentos produzidos por AFLP ser incerta, a

semelhança entre estas duas fontes de dados pode indicar que os fragmentos possuem alto grau de homologia e podem representar relações evolutivas entre os organismos utilizados (Crawford & Mort, 2004; Després, *et al.*, 2003; Pelsler *et al.*, 2003).

A incerteza sobre a homologia dos dados produzidos por AFLP possui implicações nas técnicas utilizadas para a análise dos dados. A utilização de métodos cladísticos, como parcimônia e máxima verossimilhança exigem que os caracteres utilizados atendam a pressupostos que, a princípio, não são atendidos pelos dados produzidos por AFLP, como a certeza sobre a homologia dos caracteres e sua independência (Swofford & Olsen, 1990).

Os dados de presença e ausência de fragmentos entre amostras de AFLP são convertidos numa matriz de presença e ausência, com códigos "0" (ausência) e 1 (presença). Um evento de inserção pode provocar modificações num fragmento, aumentando seu tamanho. Porém, na matriz de presenças e ausências, este único evento pode ter um duplo efeito, já que pode ser codificado como ausência de um fragmento menor e presença de um maior. O mesmo pode-se afirmar para eventos de deleção. Todas estas modificações aparecem na matriz com um peso maior que as demais, apesar de terem sido geradas por eventos únicos. Por isso caracteres gerados por AFLP não são considerados independentes (Robinson & Harris, 1999)

A análise dos dados de AFLP por métodos fenéticos, como agrupamento e ordenação, não possui restrições porque estes são métodos numéricos que utilizam diversos tipos de algoritmos matemáticos para estabelecer as relações de similaridade ou distância entre as amostras, utilizando todos os caracteres disponíveis sem levar em consideração os eventos evolutivos que produziram a similaridade observada (Duncan & Baum, 1981). Métodos fenéticos são bastante úteis em estudos populacionais e de circunscrição de espécies. Nestes casos, os padrões de similaridade obtidos podem representar as relações evolutivas entre os grupos envolvidos (Duncan & Baum, 1981).

Apesar das diferenças entre métodos fenéticos e cladísticos, existem trabalhos que utilizaram ambos, num mesmo conjunto de dados produzidos por AFLP, obtendo resultados muito semelhantes (Gobert *et al.*, 2002; Pelsler *et al.*, 2003).

O objetivo deste trabalho é esclarecer qual a influência que a análise visual dos eletroferogramas, a padronização de suas intensidades e a utilização de diferentes

combinações de pares de iniciadores possui num estudo de variação intra e interespecífica em espécies de *Epidendrum* L. (Orchidaceae), das subseções *Carinata* e *Tuberculata*.

## Material e Métodos

Foram utilizados 87 espécimes no total, 24 da subseção *Carinata* (Tab. 1) e 63 da subseção *Tuberculata* (Tab. 2). Maiores detalhes sobre a distribuição geográfica e taxonomia das espécies integrantes podem ser obtidos em Pinheiro & Barros (capítulos 4 e 5) e Pinheiro *et al.*, (capítulo 3).

### Procedimento para as reações efetuadas

As extrações de DNA foram realizadas a partir de material fresco, proveniente de folhas jovens, procedimento adotado para todos os indivíduos incluídos na análise, buscando uma padronização tanto do tecido utilizado quanto das quantidades utilizadas para a extração, procurando restringir a possibilidade de problemas nas etapas posteriores (Donini *et al.*, 1997). O protocolo utilizado é uma modificação daquele apresentado por Ferreira & Grattapaglia (1995) e Fang *et al.* (1992) e consta no Anexo 1.

Um problema pode surgir, mesmo quando a aparência do "pellet" e do DNA ressuspenso são favoráveis, por se apresentarem incolores sem a presença aparente de outras substâncias secundárias. Quando a eletroforese em gel de agarose 1% é realizada, para verificar a qualidade da extração, grande parte do DNA pode ficar retida nos poços onde as amostras foram aplicadas (Fig. 9). Esse problema pode ser devido ao excesso de polissacarídeos que permanece na amostra, dificultando a migração do DNA no gel e, principalmente, as etapas posteriores do trabalho, como a clivagem do DNA por enzimas de restrição e as amplificações (Ferreira & Grattapaglia, 1995). No protocolo de extração utilizado (Anexo 1) foram incluídas etapas de purificação do DNA, visando principalmente a remoção de polissacarídeos, como a precipitação do DNA em isopropanol e solução salina (Fang *et al.*, 1992).

Após a extração, o DNA foi quantificado em fluorômetro (Dyna Quant, Pharmacia), já que é preciso iniciar as reações de digestão com quantidades de DNA semelhantes entre as

amostras, para que não ocorram digestões incompletas em algumas das amostras, fato que poderia influenciar o resultado final da técnica (Applied Biosystems, 2000).

Nas reações de digestão do DNA foram utilizadas as enzimas *Eco* RI e *Mse* I (Invitrogen™). O tampão utilizado para a reação de digestão não pode conter grande quantidade de sais pois estes podem inibir a ação da enzima *Mse* I (Cristoffanni, com. pess.). Por isso, foi empregado o tampão 5X DNA Ligase Reaction Buffer (Invitrogen™) que acompanha a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen™). Alternativamente, pode ser utilizado também o tampão que acompanha a própria enzima *Mse* I, o React I (Invitrogen™) já que ambos os tampões possuem quantidades reduzidas de sais e podem ser utilizados nas reações de digestão. O protocolo utilizado (Anexo 2) foi adaptado de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen™) e do protocolo AFLP Plant Mapping Protocol (Applied Biosystems, 2000), além de ser baseado nos diversos testes realizados, variando principalmente o tempo e as temperaturas das reações de digestão. Se o tempo estimado para as reações de digestão for insuficiente, o DNA será digerido parcialmente e isso provocará efeitos negativos nas etapas posteriores, já que o DNA não digerido não participa das reações subsequentes. Por outro lado, um tempo muito longo pode provocar comportamento inespecífico das enzimas, ou seja, as enzimas de restrição, principalmente a *Eco* RI, passam a realizar clivagens em pontos não específicos do DNA comprometendo os resultados finais.

A reação de ligação dos adaptadores foi realizada utilizando a enzima T4 DNA Ligase e o tampão 5X DNA Ligase Reaction Buffer (Invitrogen™), NaCl 0,5M, BSA 1 mg/mL (bovine serum albumin) (Invitrogen™) e adaptadores *Eco* RI e *Mse* I (Applied Biosystems, 2000). O protocolo utilizado (Anexo 3) foi adaptado de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen™) e do protocolo AFLP Plant Mapping Protocol (Applied Biosystems, 2000).

Nas etapas de amplificação pré-seletiva e seletiva, todos os reagentes envolvidos fazem parte do kit AFLP Plant Mapping Kit da Applied Biosystems. O protocolo utilizado (Anexo 4) foi baseado nas instruções presentes no AFLP Plant Mapping Protocol (Applied Biosystems, 2000) e em testes realizados, variando principalmente a concentração das amostras nas reações de amplificação e a quantidade de iniciadores. Foram utilizadas três combinações de iniciadores, do kit para genoma pequeno, *Eco* RI-AC e *Mse* I-CTA, *Eco* RI-

TG e *Mse* I-CTC e *Eco* RI-AG e *Mse* I-CTT, nos quais as letras indicam os nucleotídeos extras que os iniciadores possuem.

A separação e a detecção dos fragmentos nas amostras foi realizada com o seqüenciador automático de DNA ABI Prism 310 da Applied Biosystems. Os procedimentos de operação do seqüenciador, bem como do preparo das amostras para a corrida, foram baseados no protocolo AFLP Plant Mapping Protocol (Applied Biosystems, 2000) e no manual ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, 2001b). O seqüenciador automático de DNA apresentou bom rendimento e poucas amostras foram perdidas por falhas na operação do equipamento. Para que os fragmentos detectados pelo seqüenciador pudessem ser classificados quanto ao seu tamanho em pares de bases, em cada amostra foram adicionados fragmentos de DNA padrão que possuíam tamanhos conhecidos, o Genescan 500 ROX Standard (Fig. 7) (Applied Biosystems, 2000). Esse padrão foi lido junto com os fragmentos das amostras e, através de comparação por uma linha de regressão, o tamanho em pares de bases dos fragmentos da amostra foi determinado (Fig. 10).

#### Análise dos dados obtidos

Os dados brutos, colhidos pelo seqüenciador, passaram por uma primeira análise, realizada pelo programa Genescan Analysis Software 3.1 (Applied Biosystems, 1998). Esse programa classifica os fragmentos quanto ao tamanho e permite que se escolha a intensidade mínima dos fragmentos, em unidades de fluorescência (unidades arbitrárias) que participarão efetivamente das análises posteriores. Valores mínimos muito baixos podem incluir fragmentos duvidosos, muitas vezes originados por artifícios das reações de amplificação, geralmente não confiáveis. Valores mínimos muito elevados podem eliminar vários polimorfismos, já que maior número de fragmentos será excluído das análises. O valor recomendado pelo Genescan Analysis Software 3.1 (Applied Biosystems, 1998) e pelos técnicos da Applied Biosystems, está entre 50 e 100 unidades de fluorescência, tendo sido adotado, neste trabalho, o valor de 50 unidades de fluorescência como mínimo para inclusão de fragmentos na análise.

A análise seguinte consistiu na conversão dos eletroferogramas com os fragmentos selecionados, em matrizes de presença e ausência (matriz do tipo 0 e 1) realizada pelo programa ABI Prism Genotyper 2.5 Software (Applied Biosystems, 2001a). É neste ponto que

as matrizes podem ser modificadas manualmente, numa tentativa de remover diversos tipos de artifícios contidos nos eletroferogramas, como:

- picos que, apesar de estarem presentes no eletroferograma, acabam excluídos das análises porque sua intensidade possui valor inferior ao mínimo determinado, porém, quando o pico está claramente presente no eletroferograma, ele precisa ser incluído manualmente na análise, podendo resultar num acréscimo de variação ou eliminação de falsos polimorfismos (Fig. 11);
- picos que não estão claramente presentes num eletroferograma, numa posição em que, nos demais eletroferogramas, aparecem picos bem delimitados (Fig. 12); nestes casos, recomenda-se desconsiderar a presença destes picos em todas as amostras, já que sua presença ou ausência em determinadas amostras é duvidosa;
- regiões do eletroferograma que possuem muito ruído (Fig. 13) e devem ser analisadas com muita cautela, já que a presença ou ausência de fragmentos, nestes casos, têm maior chance de ser causada por artifícios presentes na amostra;
- amostras que não se alinham perfeitamente com as demais (Fig. 14), dando a falsa impressão de que possuem fragmentos de tamanhos distintos, chegando tais fragmentos, em casos mais extremos, a ser classificados com tamanhos distintos (Fig. 15). No programa ABI Prism Genotyper 2.5 Software (Applied Biosystems, 2001a) é possível organizar os eletroferogramas de modo que fragmentos com mesmo tamanho em pares de bases apareçam alinhados (Fig. 10), porém, muitas amostras podem sofrer erros de leitura pelo seqüenciador, apresentando uma migração diferencial que pode gerar pequenas modificações na classificação dos fragmentos obtidos, já que este problema também pode afetar o padrão.

Polimorfismos confiáveis são aqueles revelados por regiões do eletroferograma que contêm picos bem delimitados contrapostos a linhas de base sem ruído (Fig. 16).

A análise manual dos eletroferogramas de AFLP é uma etapa bastante subjetiva, que precisa levar em consideração os diferentes tipos de artifícios que podem estar presentes em cada caso (Applied Biosystems, 2001a). A subjetividade desta etapa pode ser comparada à do alinhamento de seqüências de nucleotídeos, realizado também de forma manual.

Para testar a influência da análise manual dos eletroferogramas, foram realizadas análises com as espécies das subseções *Carinata* e *Tuberculata* produzindo dois conjuntos de

dados: matrizes geradas apenas com a utilização do programa ABI Prism Genotyper 2.5 Software (Applied Biosystems, 2001a) (Figs. 17A e 18A) e matrizes geradas pelo programa e analisadas também manualmente (Figs. 17B e 18B). Tanto a quantidade de polimorfismos encontrada em cada uma das análises deste trabalho (Tab. 3) como em trabalhos semelhantes já publicados (Tab. 4) foi quantificada. As intensidades dos eletroferogramas nessas análises foram padronizadas.

A importância da uniformização das intensidades dos eletroferogramas foi testada utilizando um grupo de indivíduos da subseção *Tuberculata*. Foram analisados dois eletroferogramas por indivíduo, que possuíam intensidades distintas (Figs. 19). Nestas análises os eletroferogramas não foram analisados manualmente, já que o objetivo era verificar a influência dos artifícios produzidos por ampliações desiguais nas análises.

Utilizando espécies da subseção *Carinata*, foram realizadas análises das três combinações de iniciadores em separado (Fig. 20, 21, 22) e em conjunto (Fig. 23), para avaliar a influência de cada par de iniciadores nas relações de parentesco produzidas. Nestas análises os eletroferogramas apresentam intensidades semelhantes e foram analisados manualmente.

Foram empregados dois métodos de agrupamento para a análise dos dados: UPGMA com coeficiente de Dice, e Ward utilizando o coeficiente Bray – Curtis. Para a aplicação das análises multivariadas, foi utilizado o programa FITOPAC (Shepherd, 1996).

## Resultados

Como as análises de agrupamento apresentaram resultados bastante semelhantes, apenas os dendrogramas produzidos pelo método de Ward serão apresentados.

Na subseção *Carinata*, a influência da análise manual dos eletroferogramas foi pequena (Figs. 17A, 17B). Tanto o dendrograma gerado a partir do conjunto de dados analisado apenas com o programa Genotyper (Fig. 17A) como o dendrograma construído a partir dos dados analisados manualmente (Fig. 17B) produziram agrupamentos semelhantes, reunindo indivíduos de uma mesma espécie em agrupamentos distintos. Nos dois dendrogramas existem dois agrupamentos principais, um que reúne *E. ibaguense*, *E.*

*calanthum* e *E. incisum* e outro que inclui *E. denticulatum*, *E. cinnabarinum*, *E. fulgens* e *E. radicans* (Figs. 17A, 17B). A maior diferença entre os dendrogramas esta no posicionamento de *E. incisum* (Figs. 17A, 17B). No dendrograma gerado a partir dos dados analisados apenas pelo programa Genotyper, *E. incisum* situa-se dentro do agrupamento que reúne indivíduos de *E. ibaguense* (Fig. 17A), enquanto no dendrograma construído a partir de dados analisados manualmente, *E. incisum* ocupa posição externa ao agrupamento formado por indivíduos de *E. calanthum* (Fig. 17B).

As análises produzidas a partir da subseção *Tuberculata* apresentaram diferenças maiores que as da subseção *Carinata* (Figs. 18A, 18B). No dendrograma construído a partir de dados analisados apenas com o programa Genotyper, indivíduos de *E. secundum* procedentes da Cadeia dos Andes e do Planalto Brasileiro não formaram agrupamentos distintos, mas sim grupos mistos com indivíduos procedentes das duas regiões (Fig. 18A). No dendrograma gerado a partir de dados analisados manualmente, espécimes procedentes da Cadeia dos Andes e plantas do Planalto Brasileiro reuniram-se em agrupamentos distintos (Fig. 18B). *E. xanthinum* e espécimes de *E. secundum* com características intermediárias com espécies da subseção *Carinata* formaram agrupamentos semelhantes nos dois dendrogramas (Figs. 18A, 18B).

A quantidade de polimorfismos obtidos nas análises envolvendo as duas subseções foi baixa (Tab. 3) se comparada com as quantidades obtidas em trabalhos que também utilizaram AFLP (Tab. 4). O número de polimorfismos obtidos na subseção *Carinata* foi maior que na subseção *Tuberculata* (Tab. 3). A análise manual dos eletroferogramas gerou uma diminuição na quantidade de polimorfismos nas duas subseções, sendo mais acentuada na subseção *Tuberculata* (Tab. 3).

Na análise de amostras originadas de um mesmo indivíduo, que possuíam eletroferogramas com intensidades distintas, não houve agrupamentos que reunissem amostras de um mesmo indivíduo (Fig. 19). Amostras de alguns indivíduos chegaram a ocupar regiões bastante distintas do dendrograma, não formando grupos entre si (Fig. 19).

Os dendrogramas gerados a partir de cada uma das combinações de iniciadores em separado revelaram resultados semelhantes (Figs. 20, 21, 22) aos da análise produzida utilizando os três pares de iniciadores em conjunto (Fig. 23). Nas análises envolvendo os pares de iniciadores em separado (Figs. 20, 21, 22), nem todos os agrupamentos formados

reuniram indivíduos de uma mesma espécie. Nestas análises existe, também, uma diferença no posicionamento de cada agrupamento nos dendrogramas gerados. Na análise baseada nos três pares de iniciadores em conjunto (Fig. 23), indivíduos de uma mesma espécie formaram agrupamentos distintos, podendo ser identificados dois agrupamentos principais: um que reúne *E. radicans*, *E. cinnabarinum*, *E. denticulatum* e *E. fulgens* e o outro que inclui *E. incisum*, *E. calanthum* e *E. ibaguense*.

## Discussão

A análise manual dos eletroferogramas mostrou ser uma opção importante nas análises realizadas (Figs. 17A, 17B, 18A, 18B), produzindo resultados superiores na subseção *Tuberculata*, que envolve diferentes populações de uma mesma espécie (Figs. 18A, 18B). As matrizes de dados geradas apenas com a utilização do programa Genotyper, sem a análise manual, incluíram na análise polimorfismos que dificultaram a interpretação dos resultados, como mostram os dendrogramas obtidos (Figs. 17A, 18A), ao contrário das análises realizadas manualmente, que produziram resultados que possuem relação direta com a procedência e morfologia das espécies em questão (Figs. 17B, 18B). Mesmo nas análises realizadas com a subseção *Carinata*, em que os resultados foram bastante semelhantes (Figs. 17A, 17B), o posicionamento de *E. incisum* no dendrograma baseado nos dados gerados apenas pelo programa Genotyper não permitiu sua identificação como uma espécie distinta das demais (Fig. 17A), ao contrário do que ocorreu nos dados gerados por análise manual (Fig. 17B). Na subseção *Tuberculata*, as diferenças entre os tipos de análise foram mais evidentes, com uma clara relação entre procedência e morfologia nos dendrogramas baseados em dados analisados manualmente (Fig. 18B). Indivíduos de *E. secundum* procedentes da Cadeia dos Andes e do Planalto Brasileiro formaram agrupamentos distintos, assim como os espécimes com morfologias intermediárias, prováveis híbridos entre *E. secundum* e espécies da subseção *Carinata* (Fig. 18B), um padrão que não ficou evidente no dendrograma gerado sem análise manual (Fig. 18A).

Fay & Krauss (2003) e Fay *et al.* (2005) concluíram que a utilização de iniciadores com dois nucleotídeos extras, integrantes do "kit" para genoma pequeno AFLP Plant Mapping

Kit da Applied Biosystems, pode produzir grande quantidade de fragmentos sem, no entanto, gerar uma grande quantidade de polimorfismos. Nestes casos, fragmentos de um mesmo tamanho (em pares de bases) podem estar sendo gerados em diferentes regiões do genoma, não apresentando homologia entre si e mascarando polimorfismos que podem estar presentes entre os espécimes já que, como estão presentes em todas as amostras, serão retirados das análises posteriores por não serem polimórficos (Robinson & Harris, 1999; Fay & Krauss, 2003). Este fato pode ser observado na quantidade de polimorfismos obtida nas análises realizadas neste trabalho (Tab. 3) e em trabalhos realizados utilizando iniciadores com um número maior de nucleotídeos extras (Tab. 4), que tende a diminuir a influência de fragmentos não homólogos, conferindo maior resolução às análises efetuadas por gerarem maior quantidade de polimorfismos (Fay & Krauss, 2003).

A padronização da intensidade dos eletroferogramas que integram as análises também se revelou importante, já que amostras de um mesmo indivíduo, com intensidades distintas, ocuparam diferentes posições no dendrograma (Fig. 19). A padronização das intensidades dos eletroferogramas gerados é importante porque, dependendo das condições em que as reações de PCR são realizadas, um número diferente de picos pode estar na faixa acima de 50 unidades de fluorescência, gerando matrizes com composições diferentes de fragmentos que não refletem as relações genéticas entre as amostras, e sim artifícios gerados por reações de PCR com rendimentos distintos.

Diferentes combinações de iniciadores de AFLP podem amostrar diferentes regiões do genoma dos organismos em questão, gerando resultados que refletem relações de parentesco baseadas no genoma total destes organismos (Robinson & Harris, 1999; Crawford & Mort, 2004). Os resultados obtidos confirmam estas afirmações já que as análises realizadas com os pares de iniciadores em separado não foram idênticas (Figs. 20, 21, 22), refletindo relações de parentesco de regiões distintas dos espécimes em questão. Quando os resultados produzidos pelos diferentes pares de iniciadores foram reunidos numa única análise, os agrupamentos obtidos permitiram uma interpretação mais clara, revelando relações com outras fontes de dados como morfologia e procedência das espécies (Fig. 23). O agrupamento formado por *E. denticulatum*, *E. fulgens* e *E. cinnabarinum* mostraram relação direta com a procedência destas espécies, que ocorrem em vegetação de restinga ao longo do litoral do Brasil (capítulo 4). *E. radicans*, que forma um grupo externo ao anterior, possui uma distribuição geográfica

bastante distinta, ocorrendo desde a América Central até a cadeia dos Andes (capítulo 4). Porém, morfologicamente, é bastante próximo às espécies que ocorrem no litoral do Brasil, principalmente *E. fulgens* (capítulo 4). O outro grande grupo reúne *E. ibaguense*, *E. calanthum* e *E. incisum*, espécies que se distribuem, principalmente, na Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas, exibindo também grande semelhança morfológica entre si (Fig. 23) (capítulo 4). Além disso, todos os indivíduos de uma mesma espécie formaram agrupamentos entre si (Fig. 23), fato que não ocorreu nas análises geradas por combinações de iniciadores em separado (Fig. 20, 21, 22), ou seja, a utilização conjunta de diferentes combinações de iniciadores pode aumentar a resolução das análises e auxiliar na interpretação de relações de parentesco entre espécies próximas.

Existem diversos trabalhos na literatura comprovando a eficiência de dados gerados por AFLP no estabelecimento de relações de parentesco entre plantas, em diferentes níveis taxonômicos (Gobert *et al.*, 2002; Marhold *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2003; Pelsler *et al.*, 2003; Tremetsberger *et al.*, 2003; Lihová *et al.*, 2004). Os passos envolvidos com a obtenção deste tipo de marcador precisam ser padronizados para que artifícios não comprometam as análises, como mostram os resultados aqui obtidos. A análise manual dos eletroferogramas, a padronização de sua intensidade e a utilização de mais de uma combinação de iniciadores são pontos importantes que devem ser levados em consideração em trabalhos que tenham como objetivo esclarecer relações de parentesco entre grupos vegetais. Como existem poucos trabalhos com o objetivo de realizar testes para avaliar o desempenho da técnica de AFLP (Donini *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1999; Fay *et al.*, 2005) outros ainda são necessários para que a técnica seja empregada de uma forma adequada e possa gerar resultados cada vez mais confiáveis.

Tabela 1: Espécies da subseção *Carinata* utilizados nas análises moleculares. N = Número de indivíduos analisados.

Espécie	Código nas análises	N	Procedência e Registro no Orquidário do Instituto de Botânica
<i>E. calanthum</i> Rchb.f. & Warsc.	88A, 93A, 128A	3	Equador e Serra Pacaraima (RR) - 17856, 18026, 18027
<i>E. cinnabarinum</i> Salzm.	53A, 55A, 75A	3	Camocim de São Félix (PE) e Camaçari (BA) - 17465, 17475, 17611.
<i>E. denticulatum</i> Barb. Rodr.	28A, 63A, 64A, 107A	4	Bertioga (SP), São Gonsalo do Rio Abaixo (MG) e Araruama (RJ) - 17651, 17621, 17622, 17904
<i>E. fulgens</i> Brongn.	51A, 52A	2	Ilha do Cardoso (SP) - 17872, 17873
<i>E. ibaguense</i> H.B.K.	57A, 77A, 83A, 84A, 85A, 86A, 87A	7	Venezuela e Serra Pacaraima (RR) - 17704, 18031, 18032, 18033, 18034, 18035, 18036
<i>E. radicans</i> Pavón ex Lindl.	60A, 61A, 123A, 124A	4	Equador, México e Panamá - 17707, 17861, 17894, 18028
<i>E. incisum</i> Vell.	92A	1	Equador - 17859
<b>Total</b>		<b>24</b>	

Tabela 2: Espécies da subseção *Tuberculata* utilizadas nas análises moleculares. N = Número de indivíduos analisados.

Espécie	Código nas análises	N	Procedência e Registro no Orquidário do Instituto de Botânica
<i>E. secundum</i> Jacq.	1A - 4A	4	Diamantina (MG) - 8900, 8831, 8833, 8832
	5A - 8A	4	Pindamonhangaba (SP) - 17308, 17306, 17309, 17307
	12A, 14A, 40A, 13A, 16A, 102A, 111A, 127A	3	Nova Friburgo (RJ) - 17835, 17837, 17597, 17838, 17840, 9943, 9944, 9945,
	18A - 22A	5	Santana do Riacho (MG) - 15286 - 15290
	23A	1	Alto Paraíso (GO) - 17600
	25A, 31A, 33A, 35A, 36A, 37A, 43A, 48A	4	Santa Bárbara (MG) - 17494, 17491, 17497, 17495, 17490, 17506, 17492, 17505
	30A, 34A, 32A	1	Santo Antônio do Itambé (MG) - 17480, 17672, 17674
	54A	1	Itatiaia (RJ) - 17879
	41A, 42A	1	Biritiba Mirim (SP) - 17602, 17603
	46A	1	Mucugê (BA) - 17883
	44A	1	Atibaia (SP) - 17599
	71A	1	Peru - 18039
	72A, 73A	1	Venezuela - 18040, 18041
	66A, 67A	2	Bolívia - 18045, 18046
	90A, 96A	1	Equador - 17857, 17860
	74A	1	Caieiras (SP) - 16472
	89A	1	Monte Roraima (RR) - 17593
	108A, 109A, 112A, 115A	3	Ubatuba (SP) - 17953, 17954, 17664
	68A, 121A, 122A	1	Apiaí (SP) - 11117
	3	Santo André (SP) - sem registro, coleção particular	
<i>E. xanthinum</i> Lindl.	9A, 11A, 15A, 17A	4	Nova Friburgo (RJ) - 17832 - 17834, 17643
	38A, 39A, 45A	3	Santa Bárbara (MG) - 17496, 17493, 17615
	26A	1	Santo Antônio do Itambé (MG) - 17482
	91A	1	Equador - 17858
<b>Total</b>		<b>63</b>	



Tabela 3: Quantidade de fragmentos produzida com iniciadores contendo diferentes combinações, em análises de AFLP realizadas com espécies das subseções *Carinata* e *Tuberculata*. A = número total de fragmentos produzidos, polimórficos e não polimórficos; B = número de fragmentos polimórficos resultantes da análise realizada apenas pelo programa Genotyper; C = número de fragmentos polimórficos resultantes da análise em conjunto realizada pelo programa Genotyper e visualmente.

	<i>Carinata</i>			<i>Tuberculata</i>		
	A	B (%)	C (%)	A	B (%)	C (%)
AC - CTA	234	62 (26,4)	50 (21,3)	224	50 (22,3)	22 (9,8)
AG - CTT	174	44 (25,2)	25 (14,3)	176	47 (26,7)	7 (3,9)
TG - CTC	251	66 (26,2)	51 (20,3)	268	40 (14,9)	11 (4,1)
<b>Total</b>	<b>659</b>	<b>172 (26,1)</b>	<b>126 (19,1)</b>	<b>668</b>	<b>137 (20,5)</b>	<b>40 (5,9)</b>

Tabela 4: Porcentagem de polimorfismos obtidos com marcadores AFLP em trabalhos semelhantes, utilizando iniciadores com três bases adicionais (kit de genoma grande - Applied Biosystems).

Autor	Família	Marcadores obtidos entre:	Polimorfismos
Cardoso <i>et al.</i> , 2000	Arecaceae	populações de uma espécie	92%
Gaudel <i>et al.</i> , 2000	Apiaceae	populações de uma espécie	54%
van der Merwe <i>et al.</i> , 2000	Cupressaceae	populações de uma espécie	56%
Kjaer <i>et al.</i> , 2004	Arecaceae	populações de uma espécie	48%
Kardolus <i>et al.</i> , 1998	Solanaceae	espécies de um gênero	40%
Gobert <i>et al.</i> , 2002	Lamiaceae	espécies de um gênero	56%
Despres <i>et al.</i> , 2003	Ranunculaceae	espécies de um gênero	75%
Tremetsberger <i>et al.</i> , 2003	Asteraceae	espécies de um gênero	24%

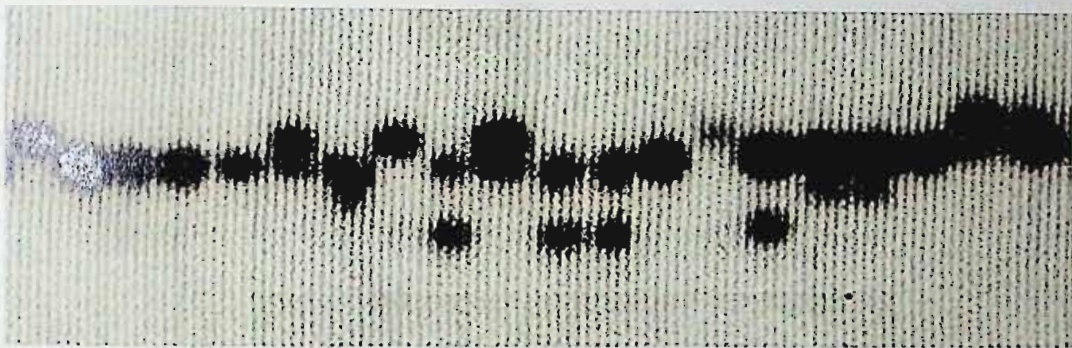


Figura 1: Gel de amido mostrando a presença de bandas provenientes da atividade enzimática de isoenzimas presentes na amostra. Modificado de Ferreira & Grattapaglia (1995).

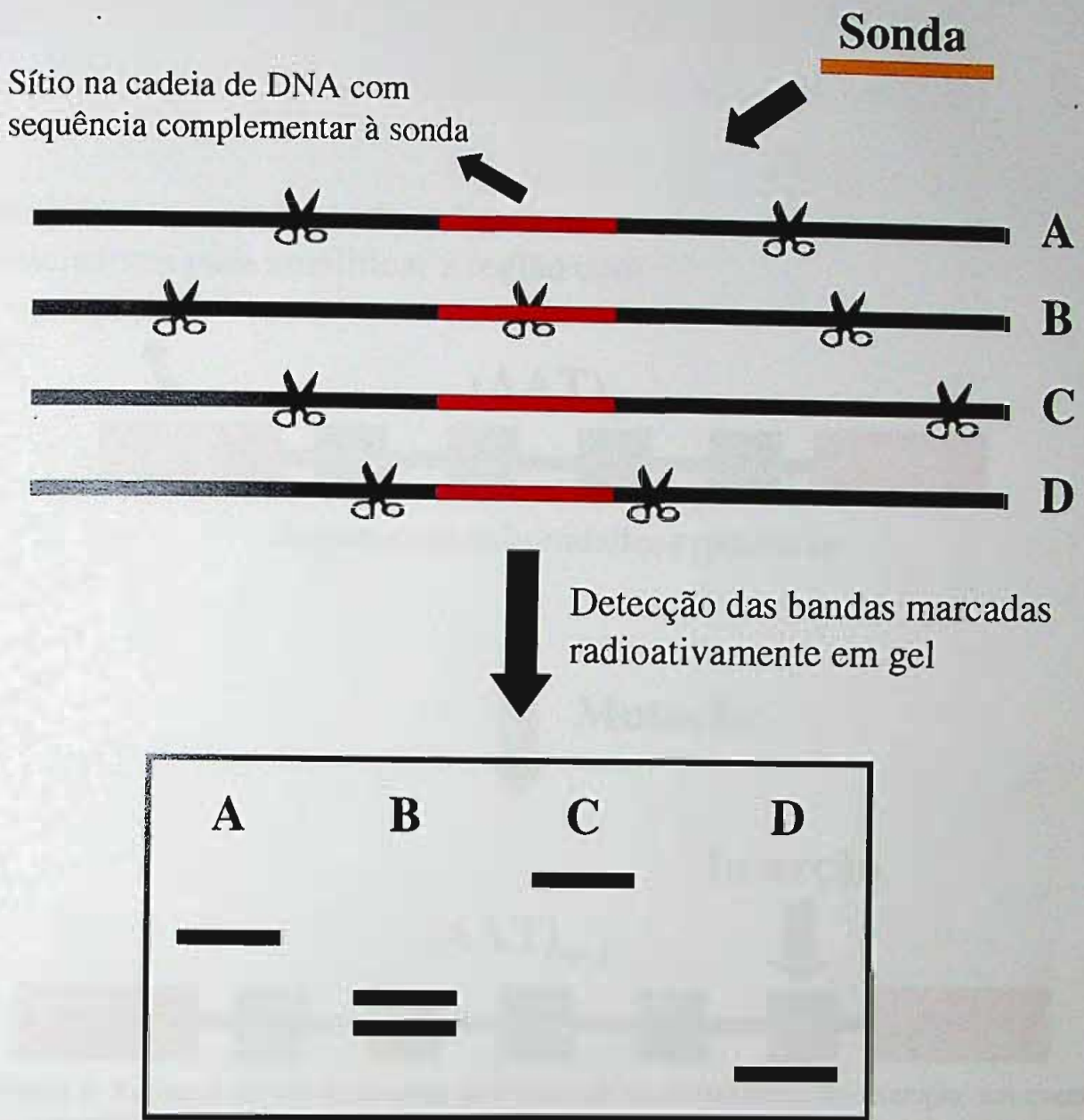
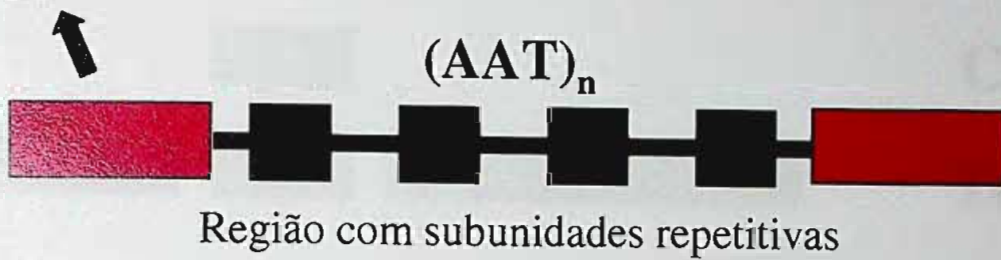


Figura 2: Esquema representando o funcionamento da técnica RFLP. As tesouras simulam as enzimas de restrição. A: as enzimas de restrição produzem um fragmento que está ligado a uma sonda, por possuir um sítio com a sequência complementar; B: a região com sequência complementar à sonda também possui um sítio de restrição, que foi clivado por uma enzima, produzindo dois fragmentos marcados; C: provavelmente um evento de inserção provocou um aumento no tamanho deste fragmento; D: provavelmente um evento de deleção provocou uma diminuição no tamanho deste fragmento. Modificado de Ferreira & Grattapaglia (1995).

Região conservada, onde se ligam os iniciadores para amplificar a região com repetições



Mutação

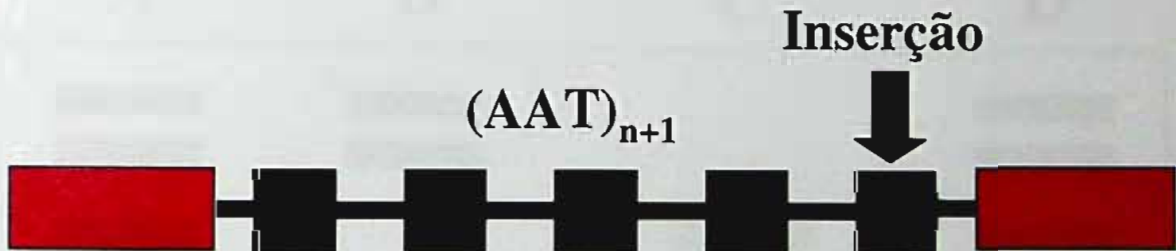
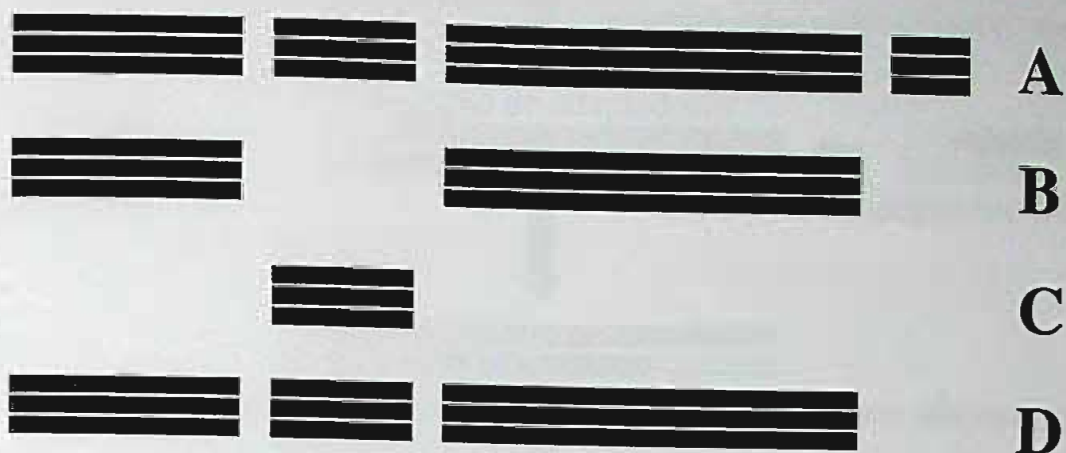


Figura 3: Esquema de funcionamento da técnica de microssatélites. No exemplo, um evento de inserção provoca um polimorfismo no fragmento, alterando o número de subunidades repetitivas, causando um aumento no tamanho do fragmento, que será detectado por eletroforese em gel ou por seqüenciador automático de DNA. Modificado de Robinson & Harris (1999).

Fragmentos de DNA amplificados com tamanhos diferentes



Verificação em gel da presença de fragmentos amplificados

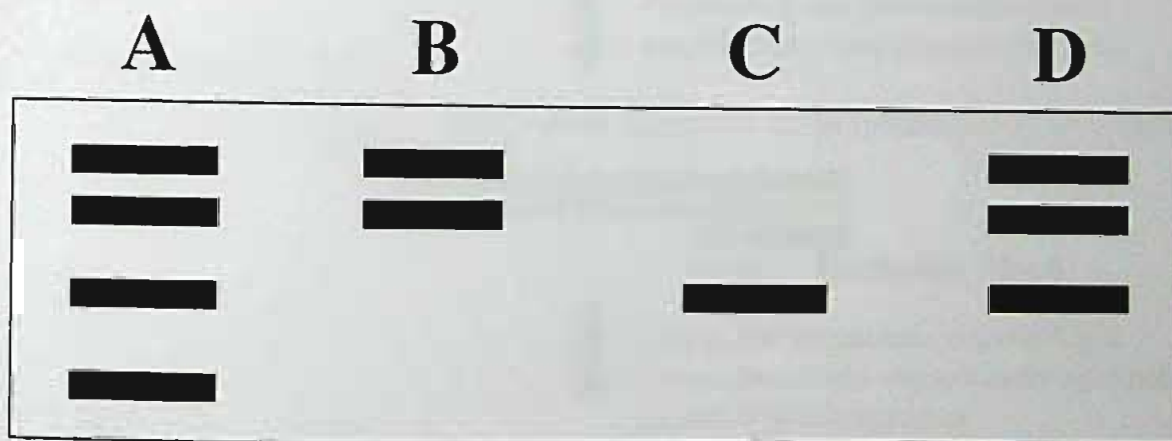


Figura 4: Esquema representando o funcionamento da técnica RAPD. Regiões do DNA compreendidas entre seqüências complementares aos iniciadores são amplificadas, gerando fragmentos que são visualizados em gel, após eletroforese. A presença ou ausência de determinadas bandas, por modificações da cadeia de DNA entre as amostras, constitui o polimorfismo detectado pela técnica.

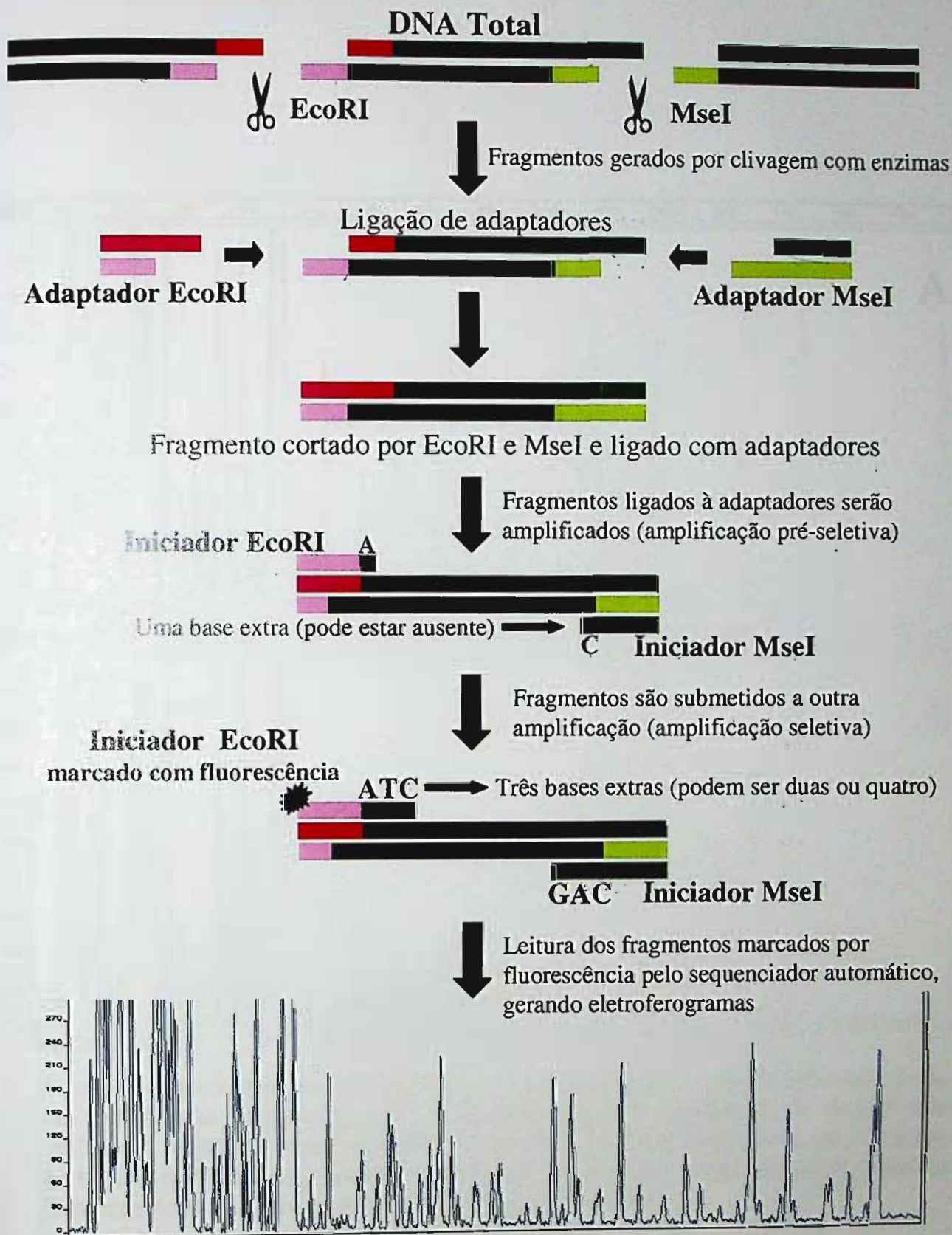


Figura 5: Esquema representando o funcionamento da técnica AFLP. O DNA total do organismo é clivado por enzimas de restrição. Fragmentos resultantes são ligados a adaptadores, que possuem sequência complementar aos iniciadores que farão a amplificação destes fragmentos. Após duas rodadas de amplificação, os fragmentos marcados por fluorescência são detectados num sequenciador automático de DNA, gerando eletroferogramas, nos quais os picos indicam a presença dos fragmentos.

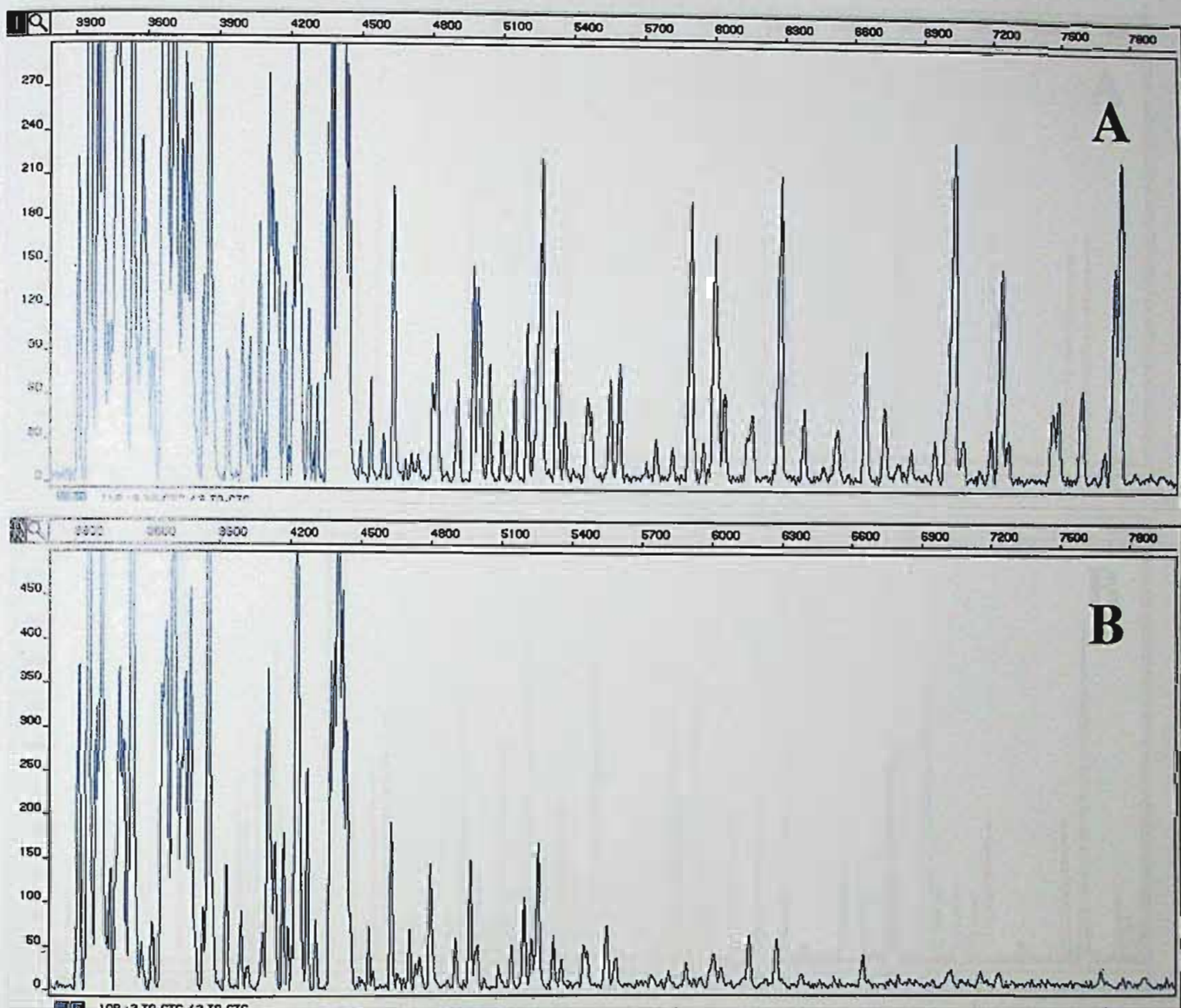


Figura 6: Eletroferogramas de AFLP, de uma mesma amostra, exibindo diferentes perfis. A: amplificação satisfatória, com grande quantidade de fragmentos; B: amplificação deficiente, mostrando fragmentos com intensidade reduzida, ocasionada por inibidores, problemas de diluição ou quantidade insuficiente de iniciadores. Foto da tela do programa Genescan Analysis Software 3.1 (Applied Biosystems, 1998).

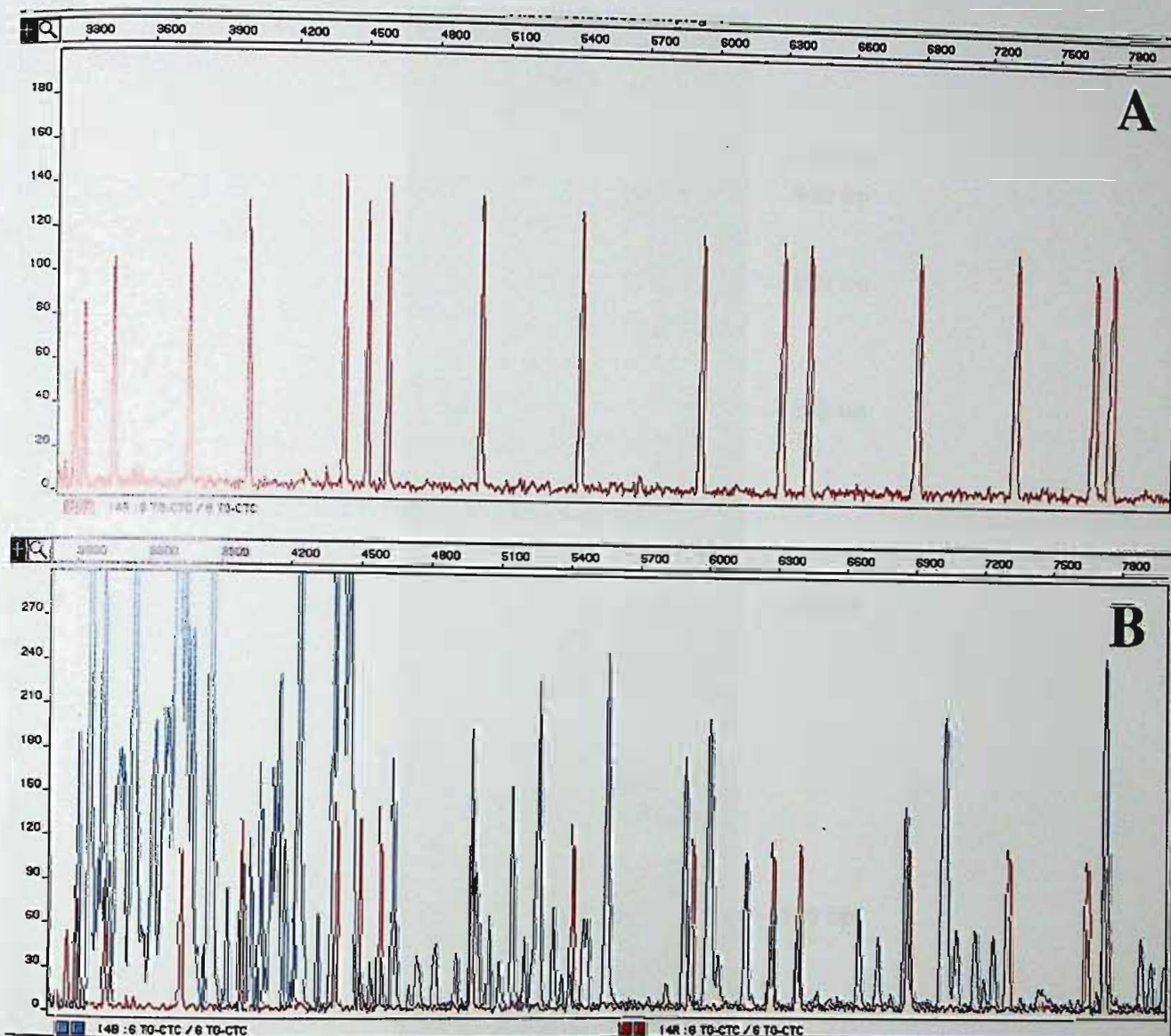


Figura 7: Eletroferogramas de AFLP. A: Conjunto de fragmentos com tamanho (em pares de bases) conhecido, que é adicionado a cada amostra a ser analisada pelo seqüenciador automático, para que os fragmentos da amostra sejam classificados quanto ao seu tamanho; B: Eletroferograma mostrando os picos correspondentes aos fragmentos da amostra (azul) e aos fragmentos do padrão (vermelho). Foto da tela do programa Genescan Analysis Software 3.1 (Applied Biosystems, 1998).



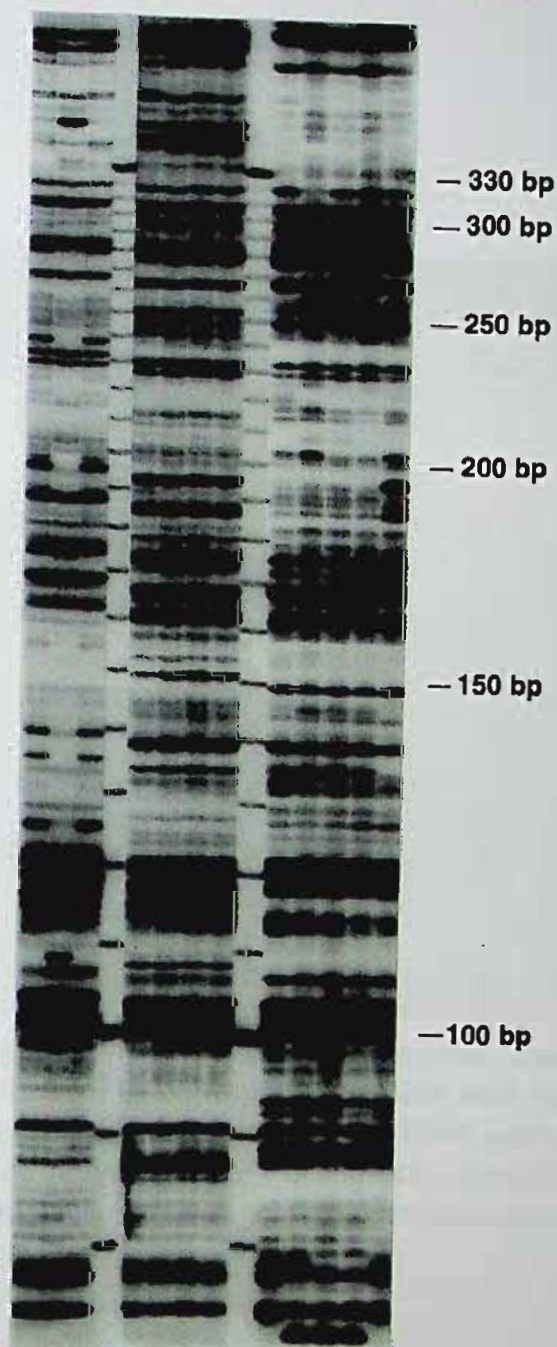


Figura 8: Foto de gel de poliacrilamida de AFLP mostrando bandas após eletroforese, com marcação radioativa. Os números indicam faixas de tamanho dos fragmentos, em pares de bases. Modificado de Chen *et al.* (1999).

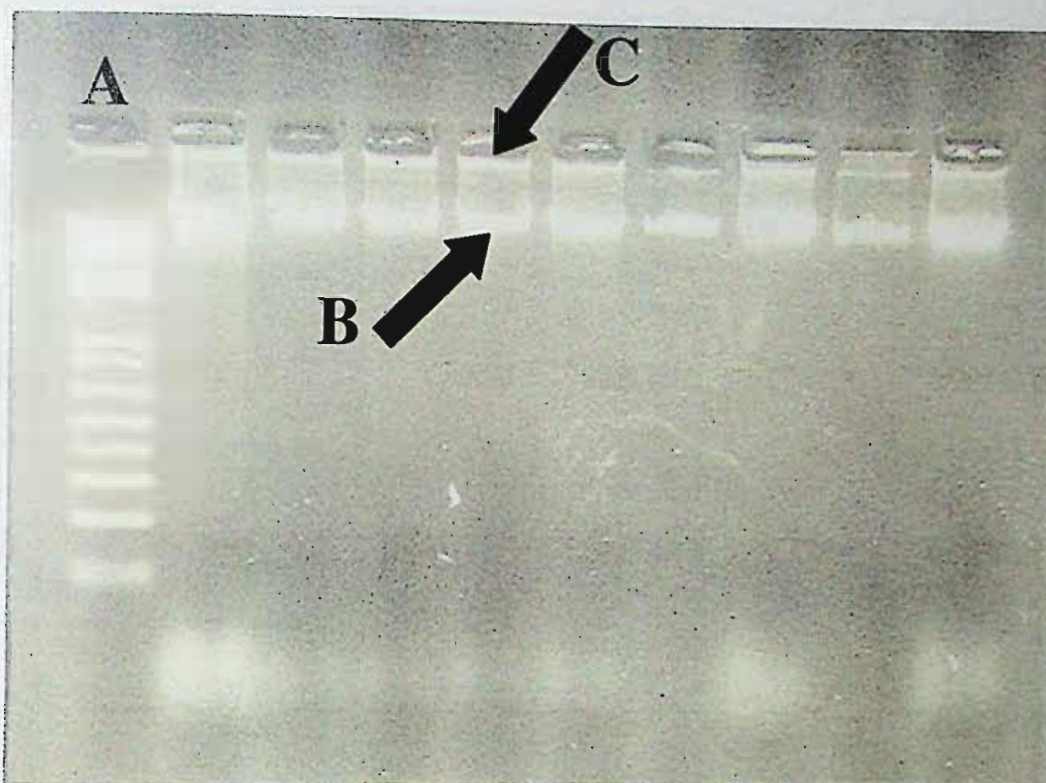


Figura 9: Foto de gel de agarose após eletroforese de amostras contendo extrações de DNA total. A: DNA-padrão; B: banda que corresponde ao DNA total da amostra, apresentando boa qualidade pois não possui sinais de degradação; C: DNA retido no poço do gel onde a amostra foi aplicada, devido provavelmente a quantidades elevadas de polissacarídeos na amostra, que dificultam a migração do DNA pelo gel durante a eletroforese.

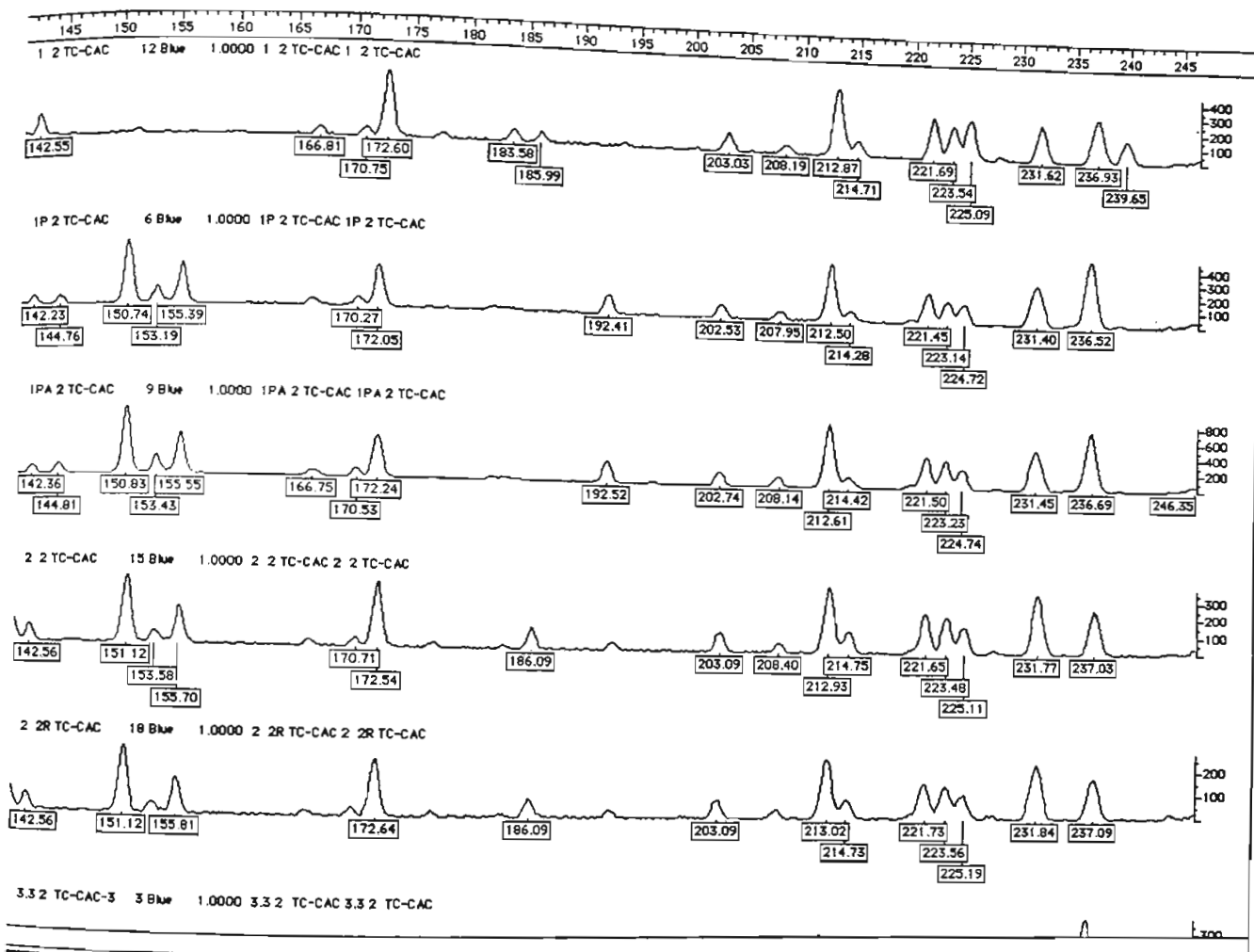


Figura 10: Eletroferogramas de diferentes amostras de AFLP, com fragmentos classificados quanto ao seu tamanho, em pares de bases. Os eletroferogramas são alinhados de acordo com o tamanho dos fragmentos que os picos representam. Foto da tela do programa ABI Prism Genotyper 2.5 Software (Applied Biosystems, 2001).

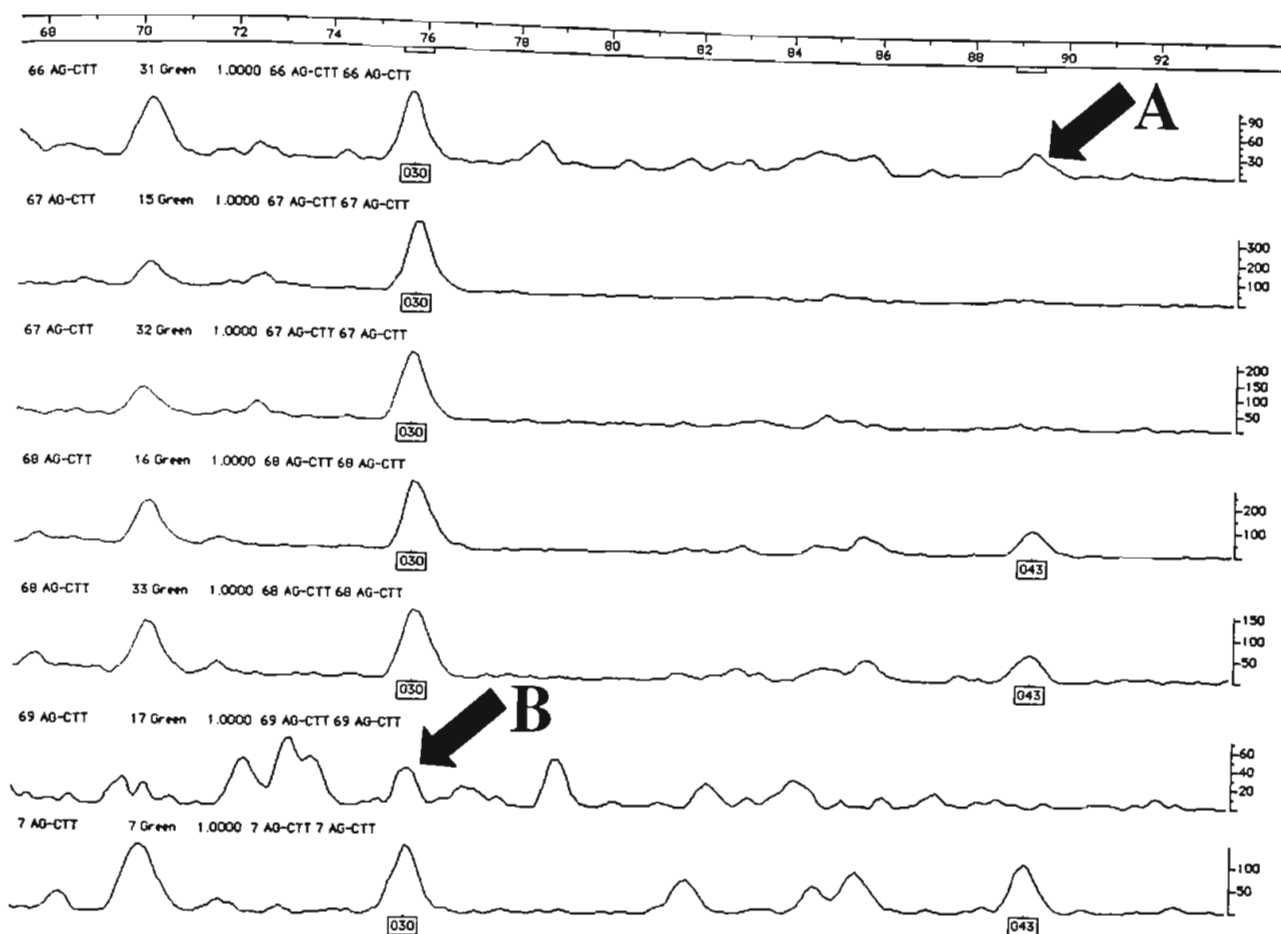


Figura 11: Eletroferogramas de diferentes amostras de AFLP. As setas indicam picos bem delimitados, com intensidades inferiores ao valor mínimo estipulado, não sendo reconhecidos pelo programa. A: Este pico pode ser integrado manualmente ao conjunto de polimorfismos, tornando as análises mais apuradas; B: Com a inclusão manual deste pico, a categoria inteira se torna não polimórfica, já que passa a estar presente em todas as amostras, constituindo um falso polimorfismo. Foto da tela do programa ABI Prism Genotyper 2.5 Software (Applied Biosystems, 2001).

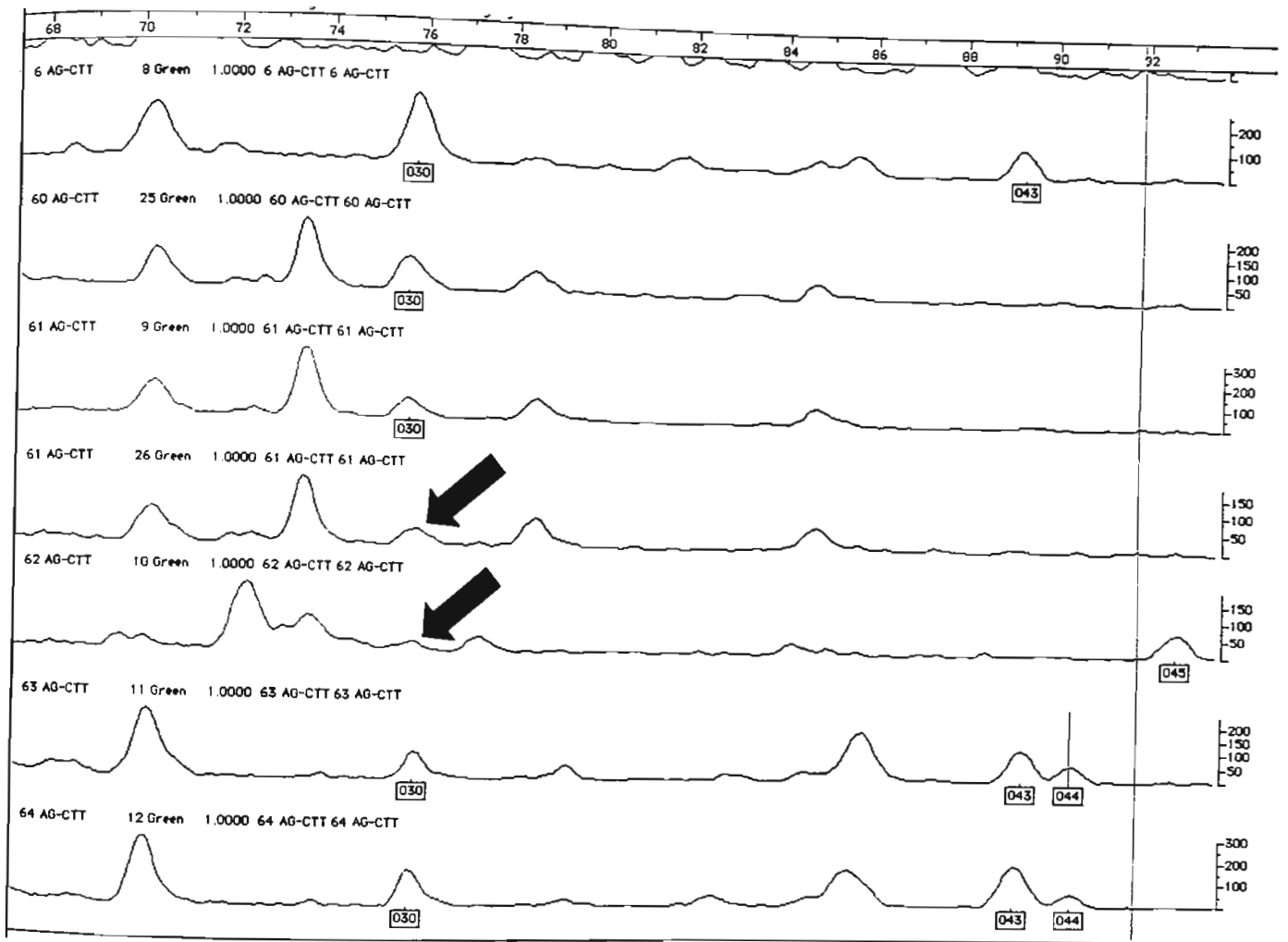


Figura 12: Eletroferogramas de diferentes amostras de AFLP. As setas indicam picos com delimitação incerta, com intensidades inferiores ao valor mínimo estipulado, não sendo reconhecidos pelo programa. Em casos duvidosos como este, recomenda-se a eliminação de toda a categoria, já que não é possível fazer a distinção entre picos e ruídos da amostra. Foto da tela do programa ABI Prism Genotyper 2.5 Software (Applied Biosystems, 2001).

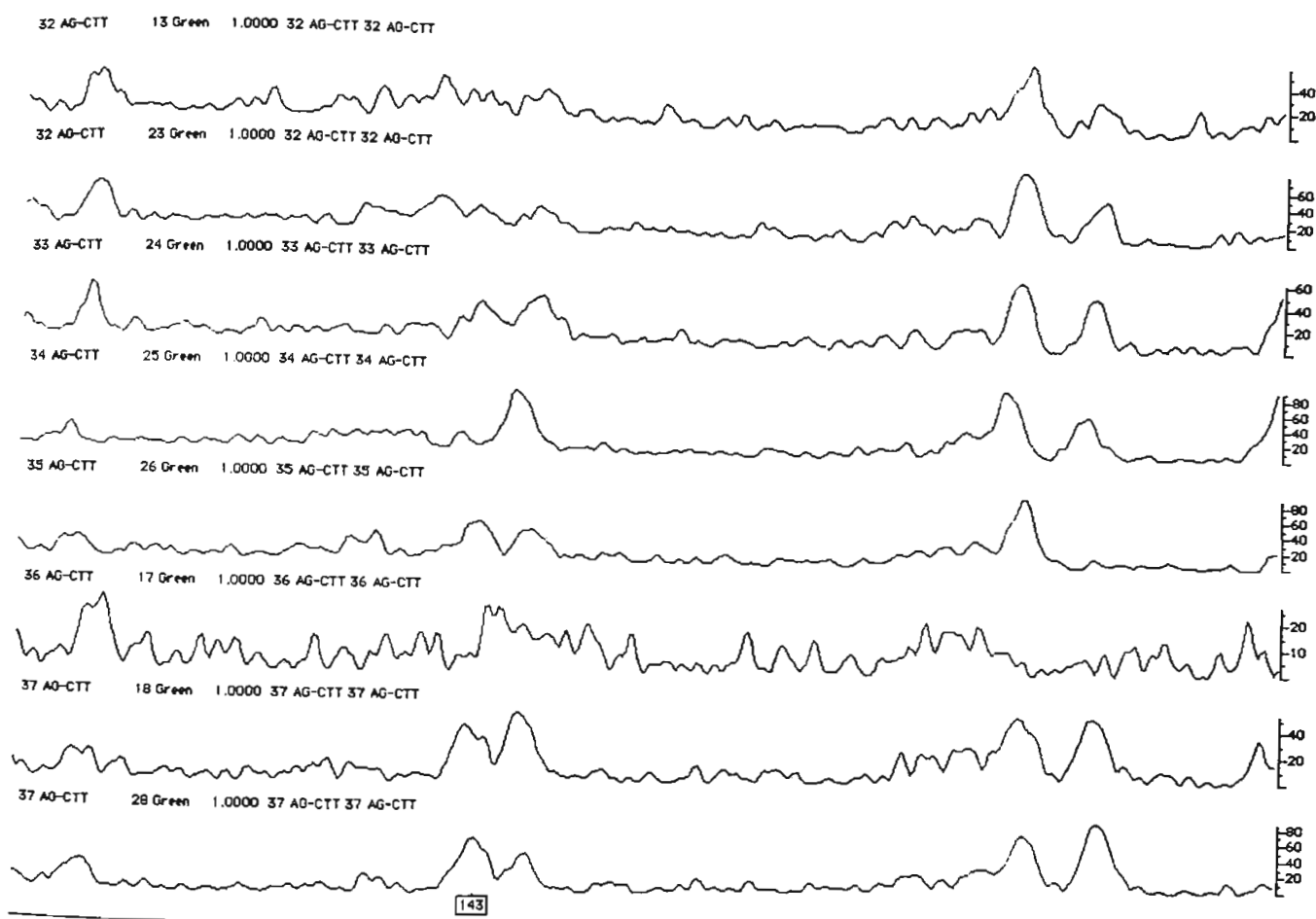


Figura 13: Eletroferogramas de diferentes amostras de AFLP. O grande número de picos de baixa intensidade sugere grande quantidade de artifícios nesta região dos eletroferogramas. É preciso muita cautela em considerar picos presentes nestas regiões. Foto da tela do programa ABI Prism Genotyper 2.5 Software (Applied Biosystems, 2001).

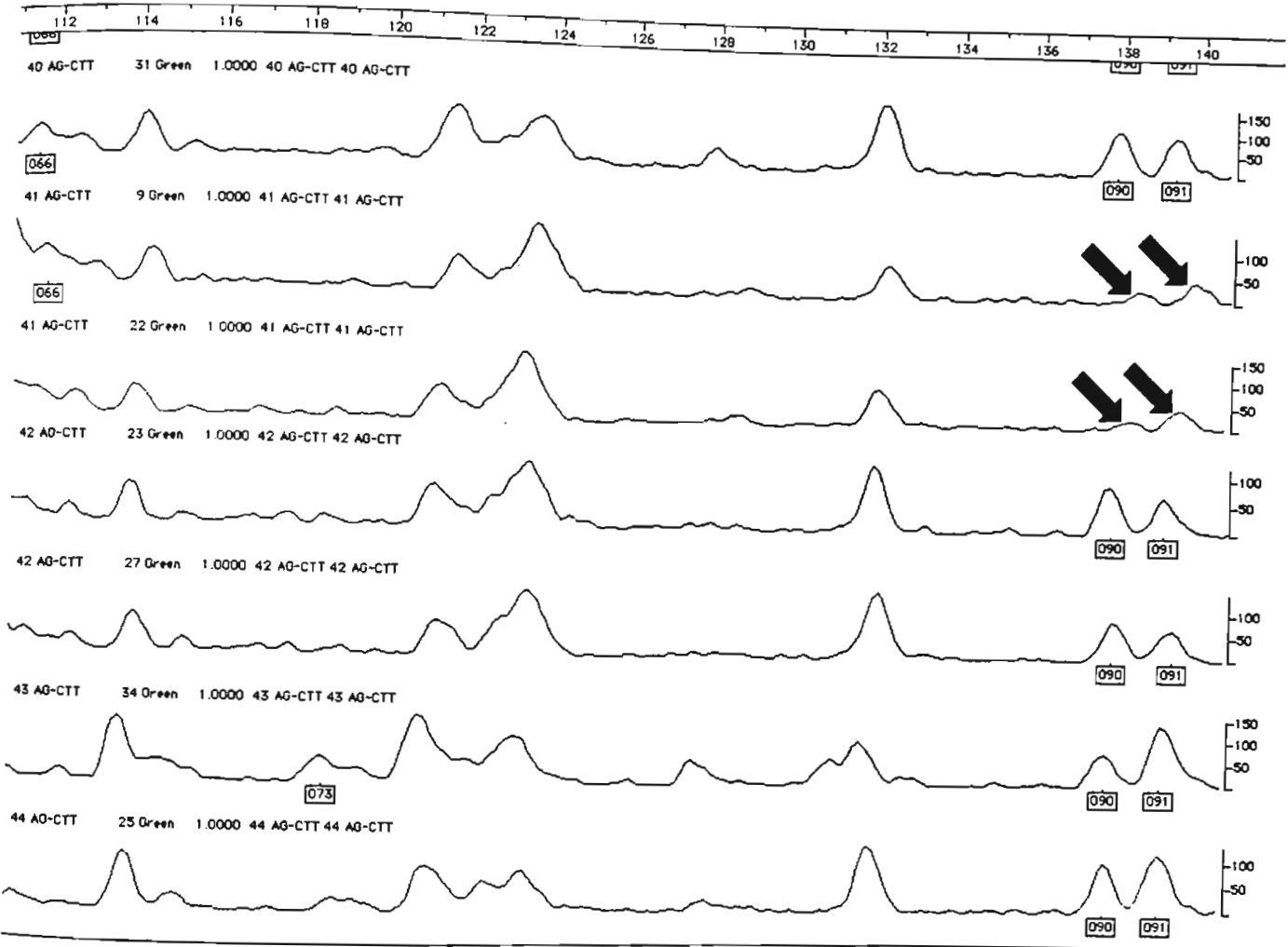


Figura 14: Eletroferogramas de diferentes amostras de AFLP. As setas indicam picos com delimitação incerta, com intensidades inferiores ao valor mínimo estipulado, não sendo reconhecidos pelo programa. Estes picos não estão alinhados em relação aos picos correspondentes nos demais eletroferogramas, possivelmente por problemas na leitura das amostras pelo seqüenciador automático de DNA. Foto da tela do programa ABI Prism Genotyper 2.5 Software (Applied Biosystems, 2001).

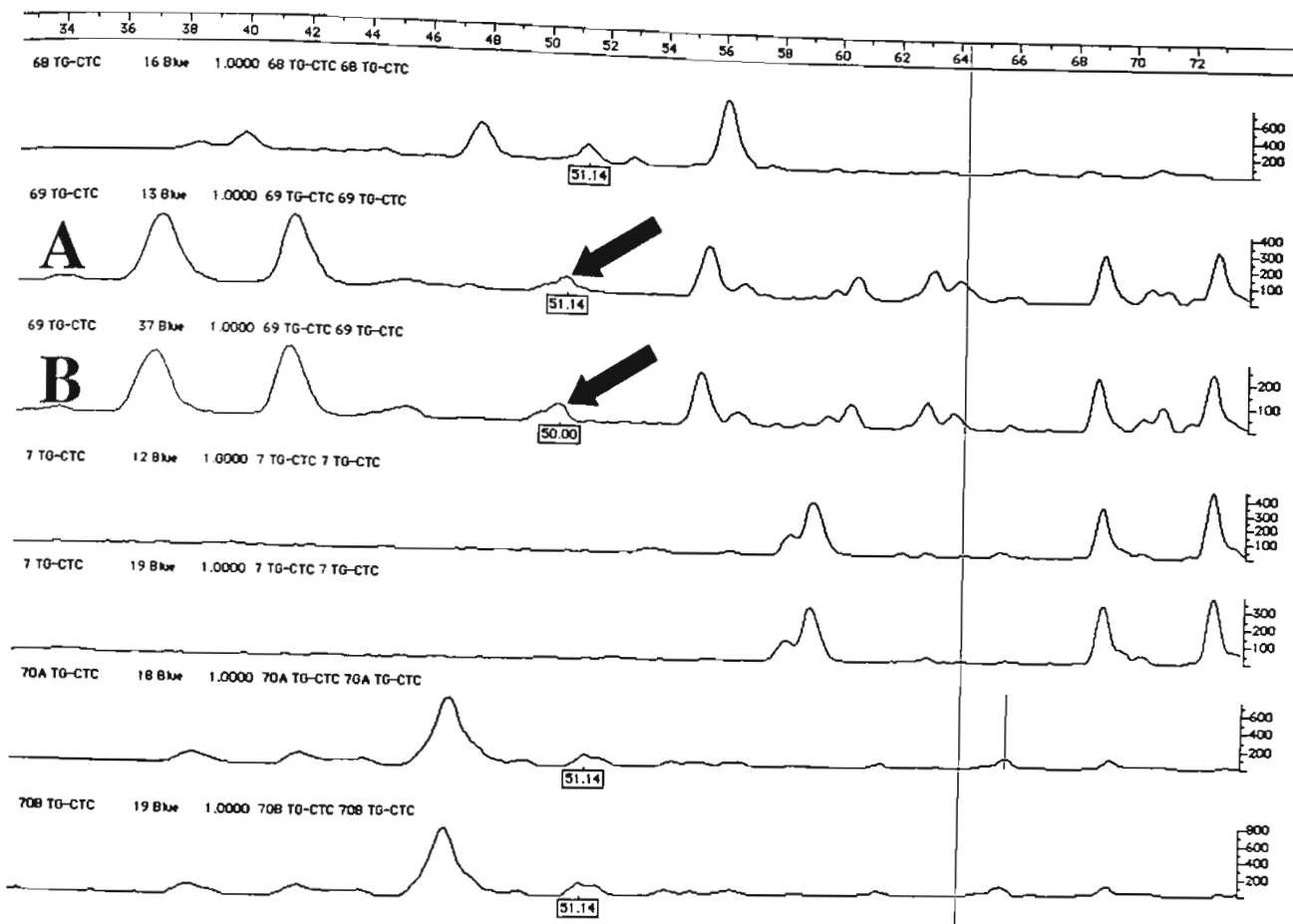


Figura 15: Eletroferogramas de diferentes amostras de AFLP, exceto A e B, que correspondem a duplicatas de uma mesma amostra. Os picos indicados pelas setas não estão alinhados em relação aos picos correspondentes nos demais eletroferogramas, possivelmente por problemas na leitura das amostras pelo sequenciador automático de DNA, porém, sua posição diferente nos eletroferogramas fez com que o programa os classificasse de maneira distinta. Como A e B correspondem à mesma amostra, o problema pode ser detectado. Foto da tela do programa ABI Prism Genotyper 2.5 Software (Applied Biosystems, 2001).



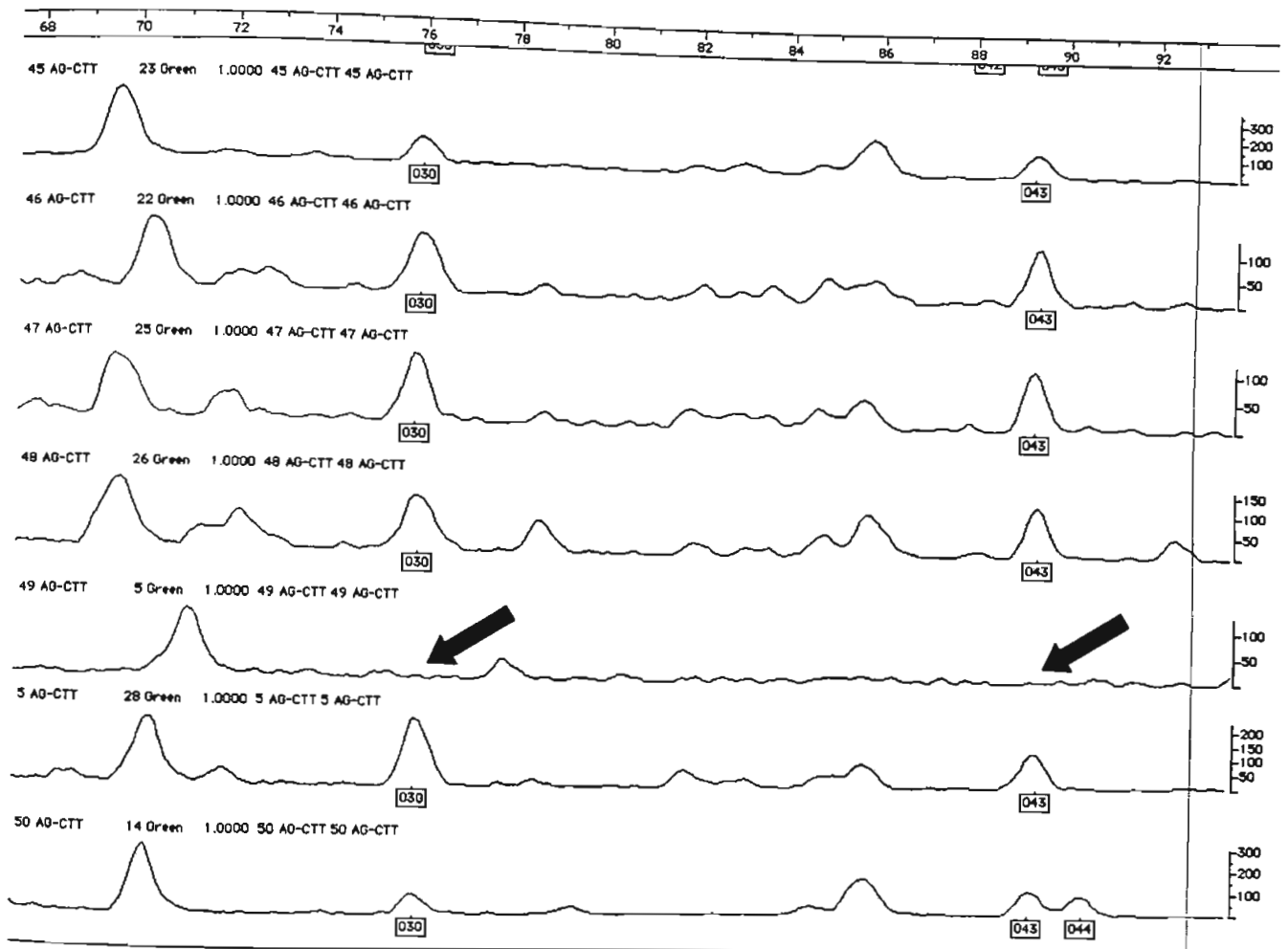


Figura 16: Eletroferogramas de diferentes amostras de AFLP. As setas indicam regiões do eletroferograma que não possuem picos e nenhum sinal de ruído, característica desejável pois confere maior segurança na aceitação dos picos presentes na mesma posição também nos demais eletroferogramas, situação que caracteriza um polimorfismo verdadeiro. Foto da tela do programa ABI Prism Genotyper 2.5 Software (Applied Biosystems, 2001).

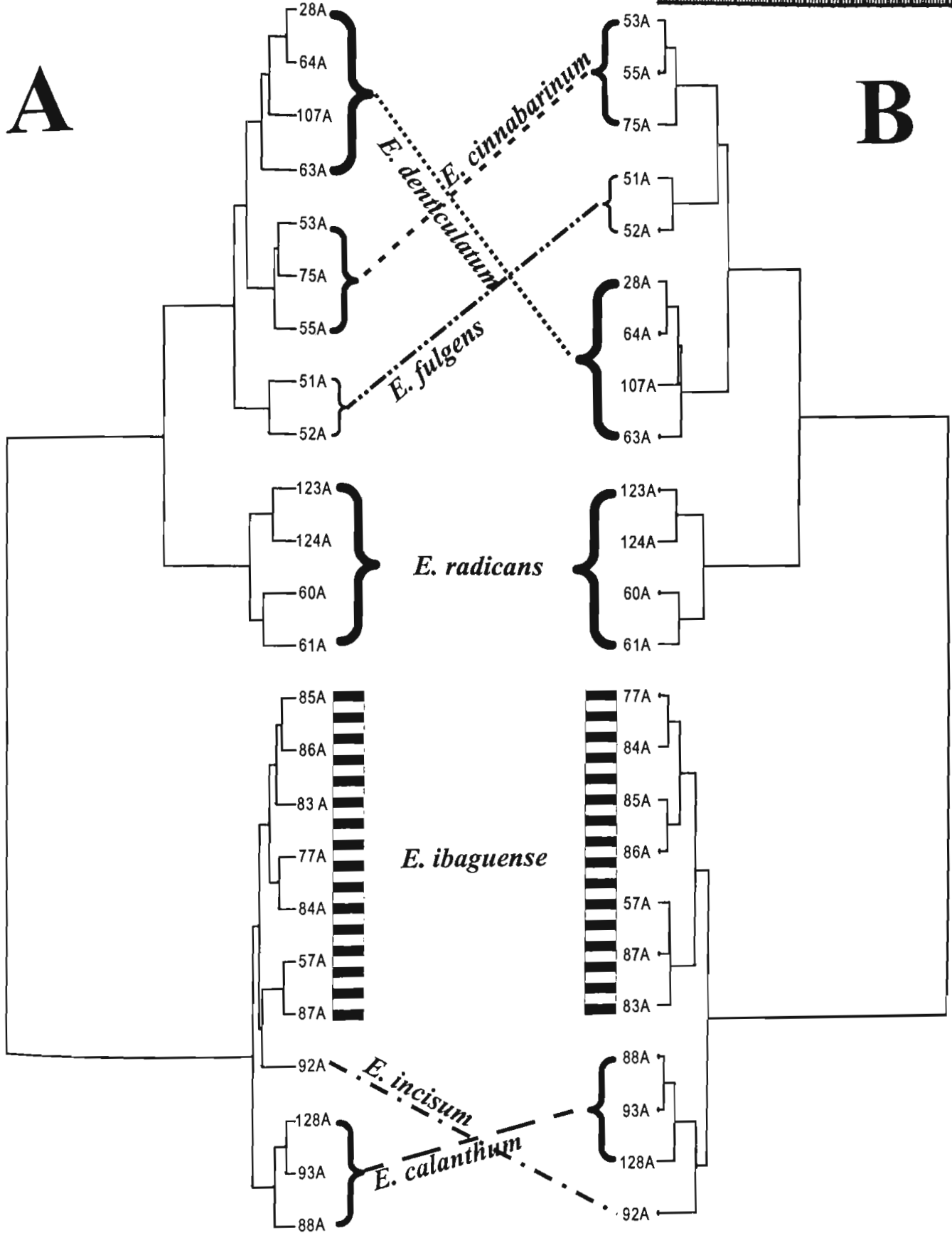
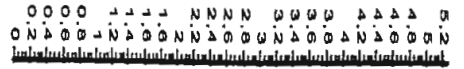
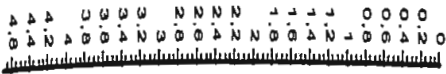


Figura 17: Análises utilizando o método de Ward de espécies da subseção *Carinata*. A = Eletroferogramas analisados apenas com o programa Genotyper; B = Eletroferogramas analisados manualmente. Correlações cofenéticas: A = 0,85; B = 0,87.

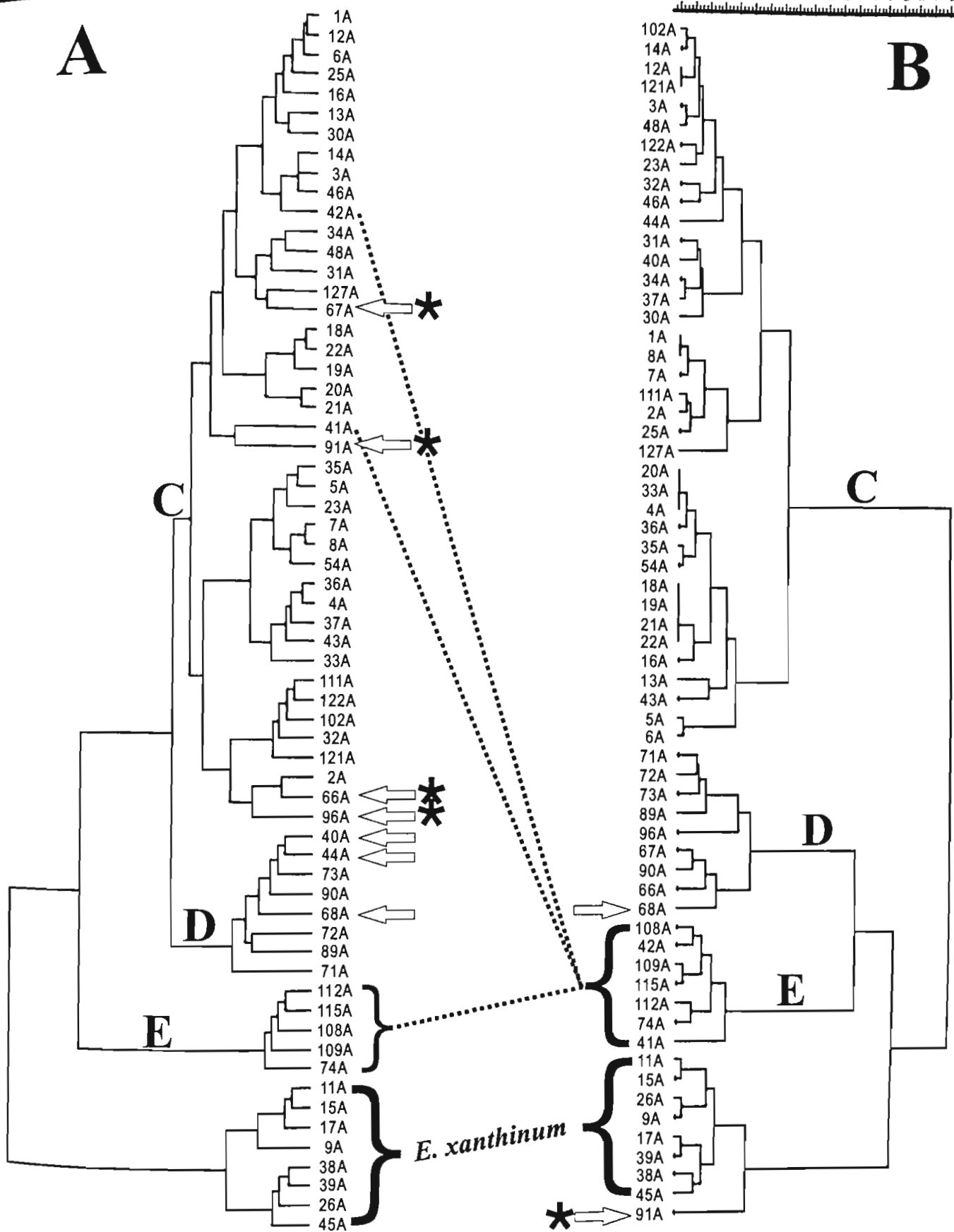
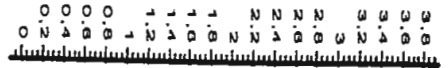


Figura 18: Análises utilizando o método de Ward de espécies da subseção *Tuberculata*: A = Eletroferogramas analisados apenas com o programa Genotyper; B = Eletroferogramas analisados manualmente. C = Espécimes de *E. secundum* provenientes do Planalto Brasileiro; D = Indivíduos de *E. secundum* procedentes da Cadeia dos Andes; E = Indivíduos com morfologias intermediárias entre *E. secundum* e espécies da subseção *Carinata* (*E. fulgens*, *E. denticulatum*). As setas com asterisco indicam indivíduos procedentes da Cadeia dos Andes. As setas sem asterisco indicam indivíduos procedentes do Planalto Brasileiro. Correlações cofenéticas: A=0,57; B=0,64.

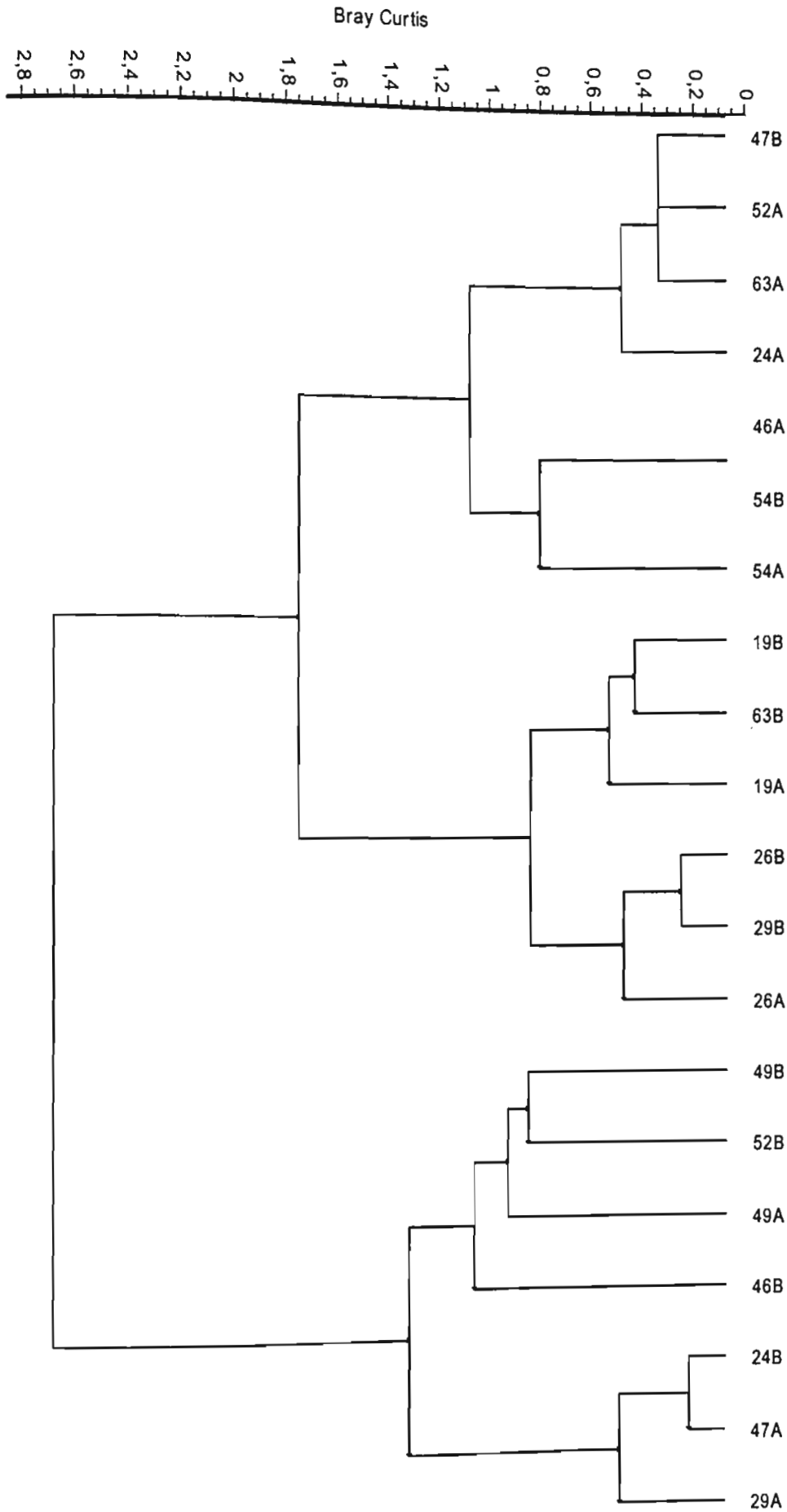


Figura 19: Análise utilizando o método de Ward com espécimes de *E. secundum*. As letras A e B indicam os pares de indivíduos que possuem eletroferogramas com diferentes intensidades. Os mesmos indivíduos ocupam posições distintas no dendrograma. Correlação cofenética = 0,75.

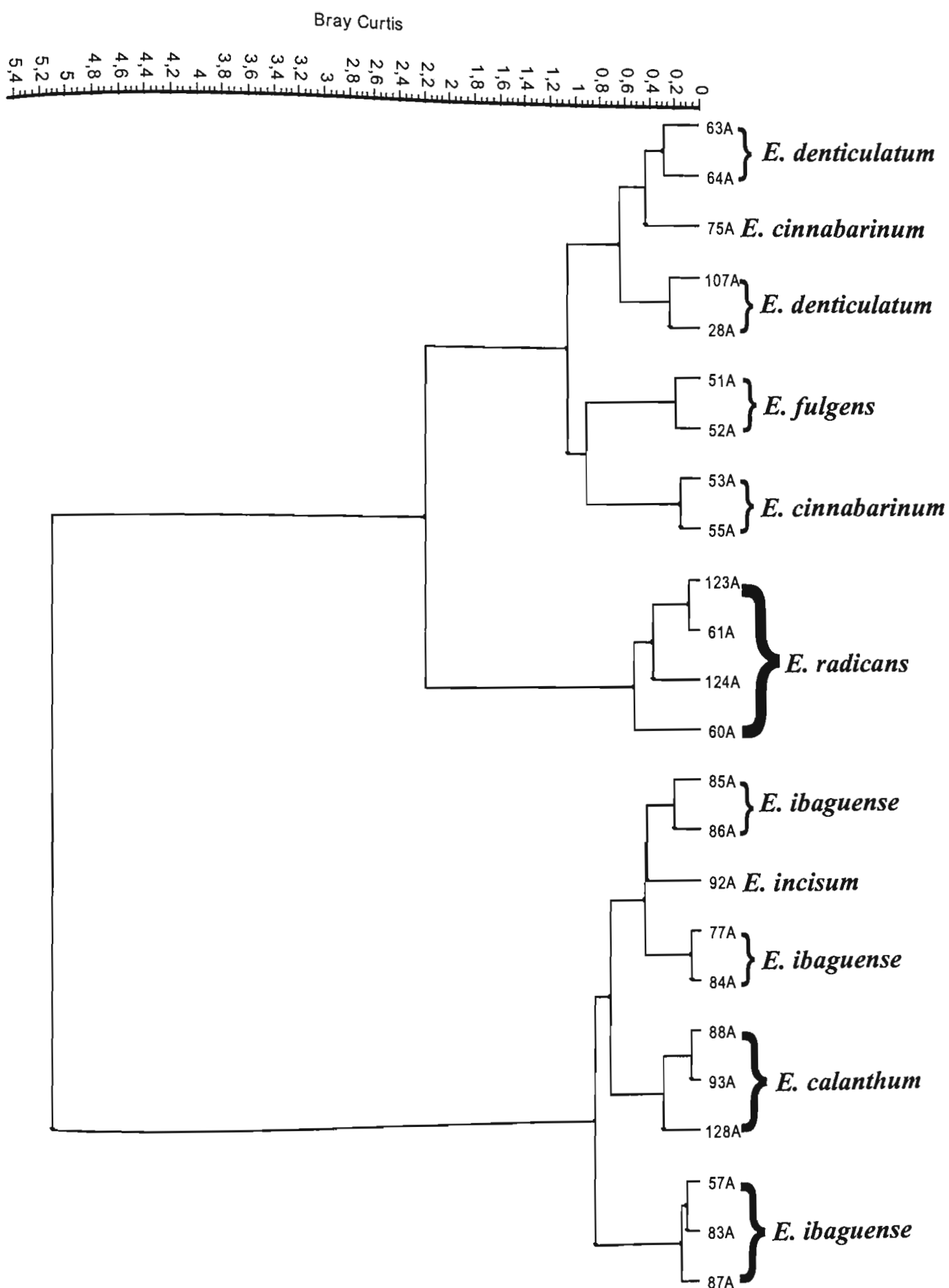


Figura 20: Análise utilizando o método de Ward de espécies da subseção *Carinata*, utilizando o par de iniciadores AC - CTA. Em vários casos, indivíduos de uma mesma espécie formam agrupamentos distintos. Correlação Cofenética = 0,86.

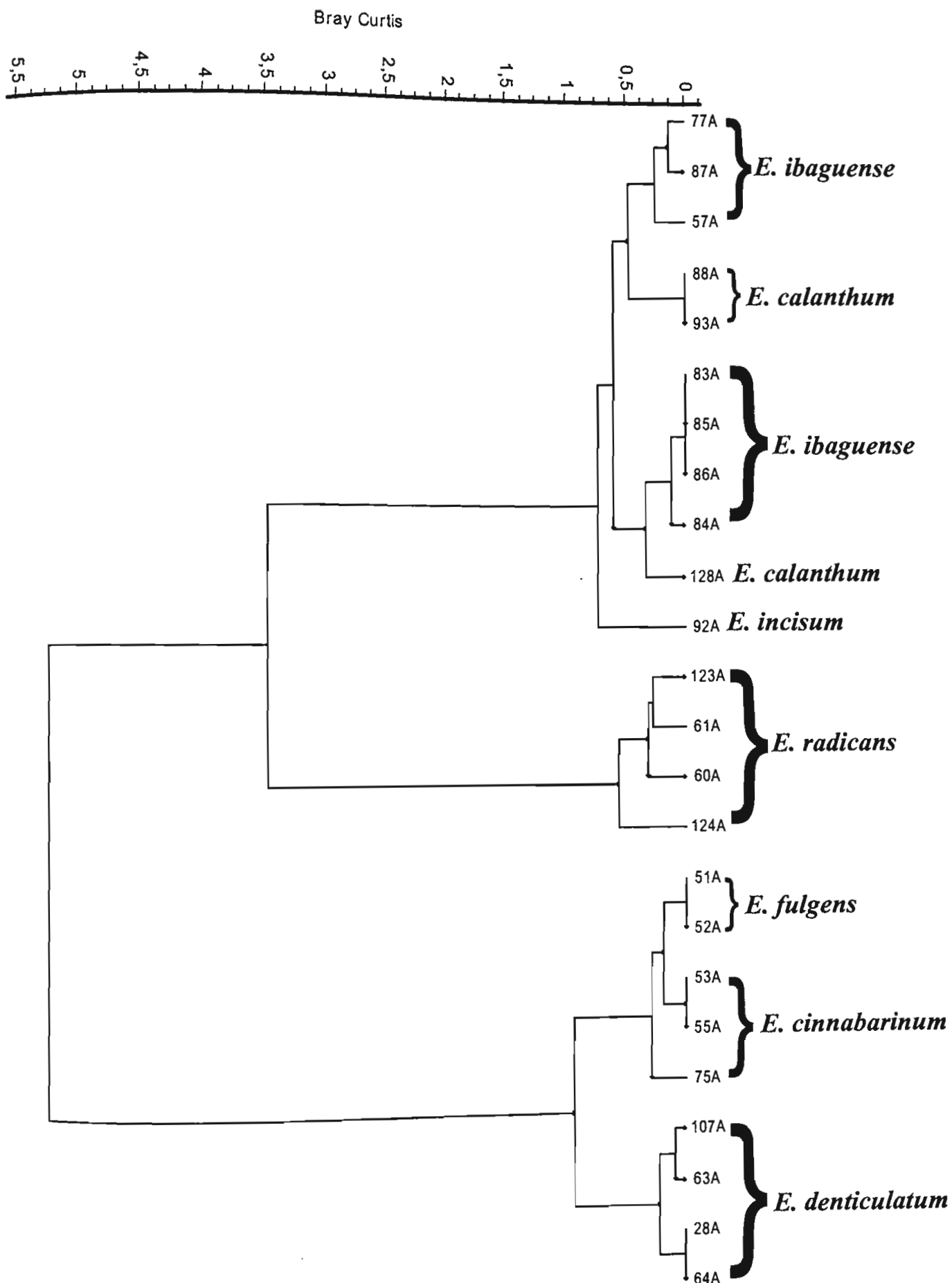


Figura 21: Análise utilizando o método de Ward de espécies da subseção *Carinata*, utilizando o par de iniciadores AG - CTT. Em vários casos, indivíduos de uma mesma espécie formam agrupamentos distintos. Correlação Cofenética = 0,84.

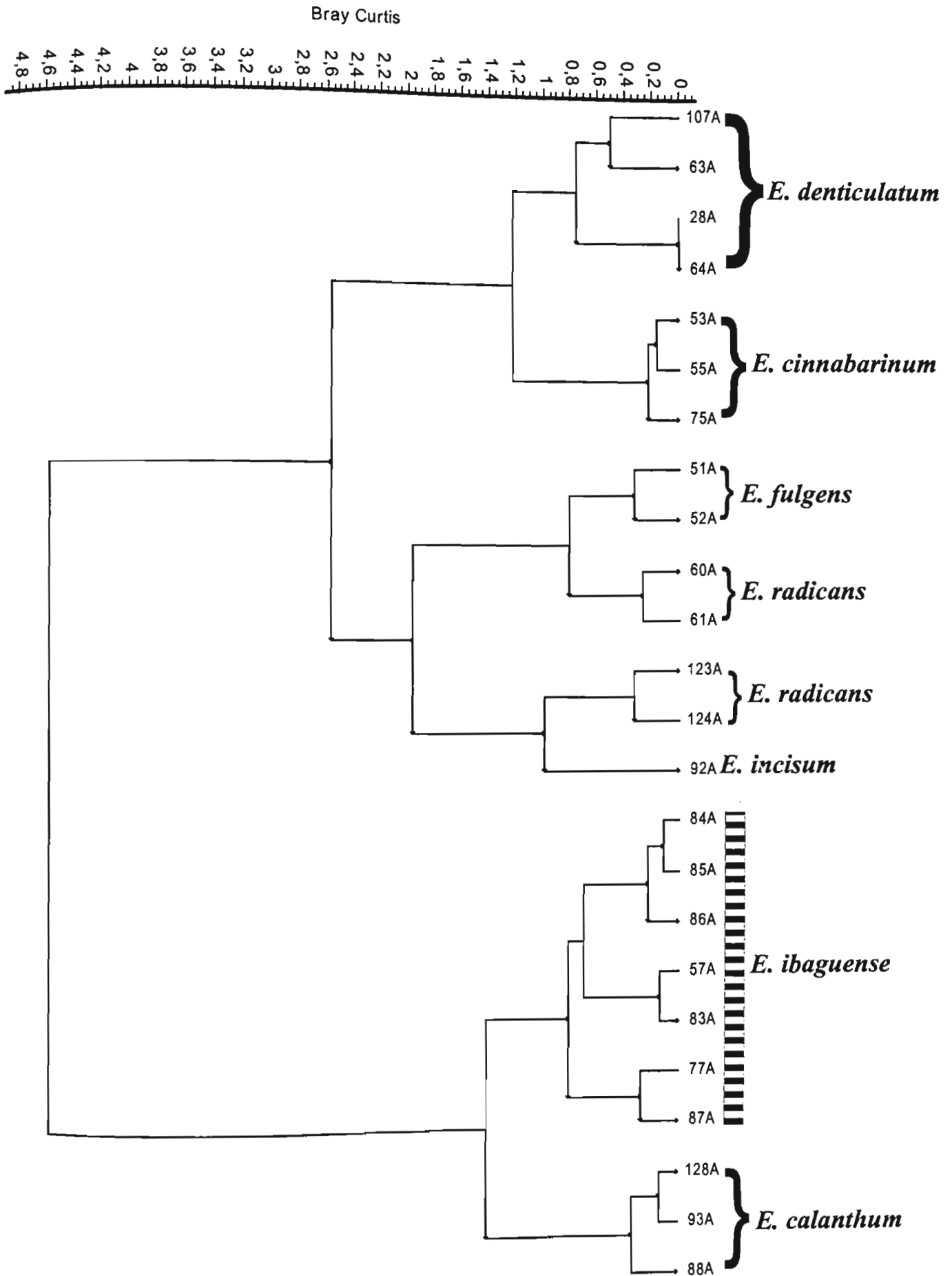


Figura 22: Análise utilizando o método de Ward de espécies da subseção *Carinata*, utilizando o par de iniciadores TG - CTC. Em vários casos, indivíduos de uma mesma espécie formam agrupamentos distintos. Correlação Cofenética = 0,79.

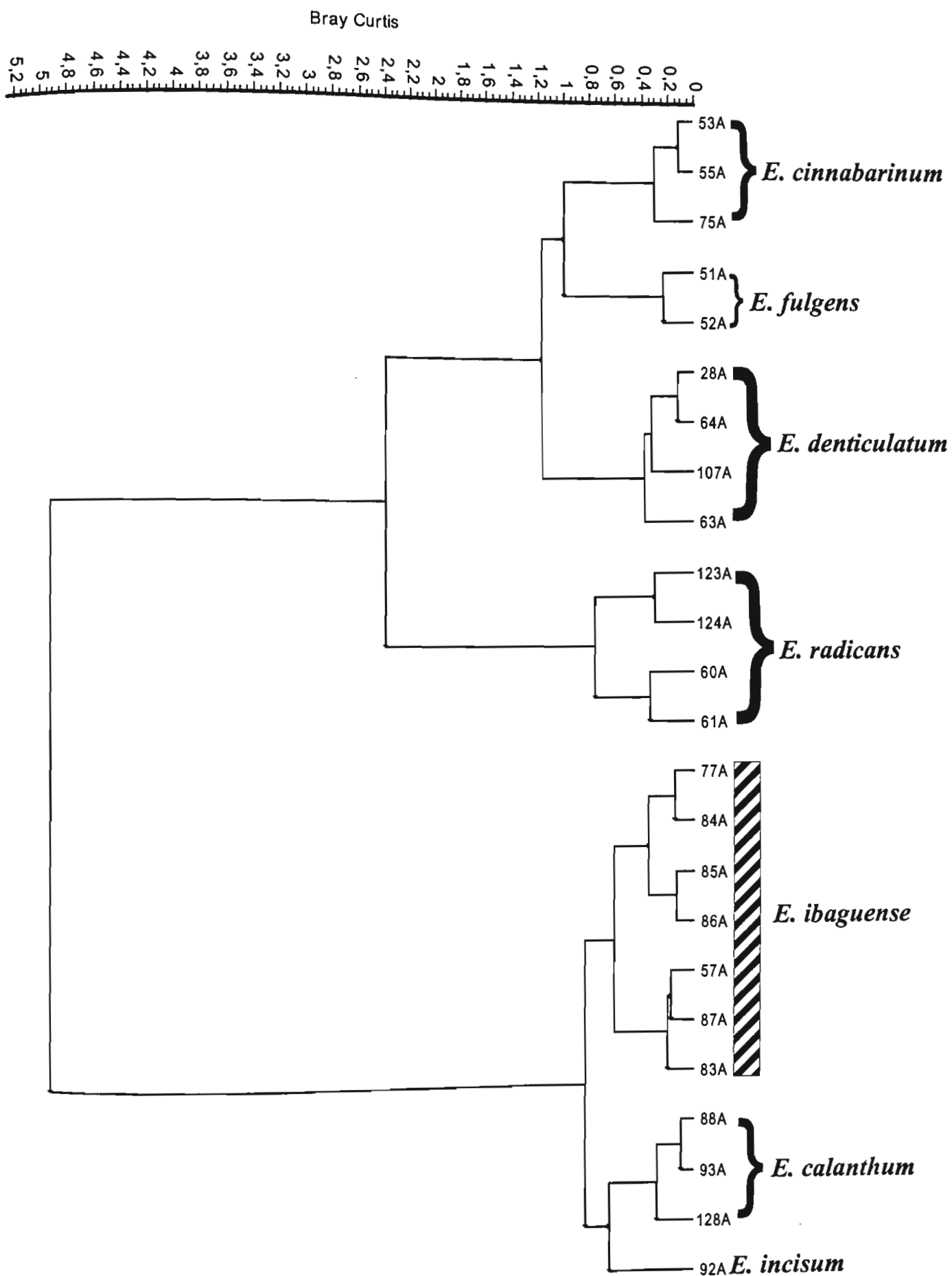


Figura 23: Análise utilizando o método de Ward de espécies da subseção *Carinata*, utilizando três pares de iniciadores: AC/CTA, AG/CTT e TG/CTC. Indivíduos de uma mesma espécie formam grupos entre si. Correlação Cofenética = 0,87.



## Anexo 1

Protocolo para extração de DNA de plantas, modificado de Ferreira & Grattapaglia (1995).

1. Pese 30-50 mg de tecido seco e macere-o, num eppendorf, utilizando um pilãozinho de plástico duro (ou bastão de vidro) através de nitrogênio líquido, até o tecido se tornar um pó fino;
2. Adicione então 700 µl de Solução Tampão de Extração e misture (com palito de dentes esterilizado) para umedecer o tecido;
3. Encube os tubos em banho-maria a uma temperatura de 60-65 °C por 60 minutos. Durante a incubação, agite cuidadosamente os tubos a cada 20 minutos para homogeneizar a suspensão;
4. Retire os tubos do banho-maria e deixe-os esfriar por 5 minutos;
5. Extraia com solvente orgânico adicionando 600 µl de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1). Agite os tubos em vórtex por ca. 5 minutos ou até fazer uma emulsão homogênea;
6. Centrifugue os tubos em microcentrífuga a velocidade máxima (12000-15000 rpm) durante 5 minutos;
7. Retire os tubos da centrífuga cuidadosamente, evitando perturbar a interface entre as duas fases formadas. Pipete a fase superior (aquosa) para um novo tubo;
8. Repita os passos 5, 6 e 7;
9. Adicione ao novo tubo ½ volume de NaCl 5M e 2 volumes de isopropanol frio (-20 °C). Misture gentilmente para precipitar os ácidos nucleicos. Leve os tubos ao freezer (-20 °C) e deixe-os por no mínimo 3 dias;
10. Centrifugue os tubos a 7000 rpm por 5 minutos;
11. Descarte o sobrenadante sem perder o pellet, que pode ser bastante translúcido e de difícil visualização;

12. Adicione 1 ml de etanol 70% e deixe em repouso por 10 minutos;
13. Centrifugue os tubos a 7000 rpm por 3 minutos;
14. Descarte o sobrenadante sem perder o pellet;
15. Repita os passos 12, 13 e 14;
16. Ressuspenda o pellet em 300 µl de H<sub>2</sub>O milliQ por 1 hora a 37 °C;
17. Adicione 150 µl de acetato de amônio 7,5 M, misturar levemente por inversão para homogeneizar a solução. Incube na geladeira por 15 minutos;
18. Centrifugue por 30 minutos a 10000 rpm a 4 °C. Transfira o sobrenadante para um novo tubo;
19. Adicione 2 volumes de etanol absoluto ao sobrenadante e misture suavemente por inversão. Incube por 1 hora a -20 °C;
20. Centrifugue por 10 minutos a 5000 rpm a 4 °C;
21. Descarte o sobrenadante sem perder o pellet;
22. Repita os passos 12, 13 e 14 por 2 vezes;
23. Adicione 1 ml de etanol absoluto. Deixe o pellet imerso por 3 minutos. Retire o sobrenadante sem perder o pellet;
24. Seque o pellet em centrífuga a vácuo ou em capela de exaustão;
25. Ressuspenda o pellet em 50 µl de H<sub>2</sub>O milliQ por 1 hora a 37 °C;
26. Acrescente 2 µl de RNase em cada tubo. Incube-os em banho-maria a 37 °C por 1 hora, para que haja digestão do RNA.

## Anexo 2

Protocolo para a reação de clivagem de DNA total pelas enzimas *Eco* RI e *Mse* I

1. O DNA a ser utilizado precisa ser quantificado, em ng/µl;
  2. O volume total da reação deve conter 10 µl e, a concentração do DNA nesta reação deve ser de, aproximadamente, 20 ng/µl;
  3. Quantidades para uma reação:
    - *Eco* RI (10 U/µl) - 0,5 µl
    - *Mse* I (5 U/µl) - 0,25 µl
    - Tampão\* 2,0 µl

Total 2,75 µl + amostra = 10 µl
  4. A amostra, que corresponde a 7,25 µl, será composta de H<sub>2</sub>O e DNA. A solução de DNA que será utilizada nesta reação deverá ser diluída (ou não) em H<sub>2</sub>O para que a concentração final, da reação total, seja de 20 ng/µl;
  5. Misturar bem os componentes da reação, evitando fazer bolhas;
  6. Colocar a reação por 2 horas a 37 °C, preferencialmente em estufa (como alternativa, pode-se utilizar termociclador);
  7. Retirar da estufa e inativar as enzimas de restrição, aquecendo as reações a 70 °C por 15 minutos, preferencialmente em termociclador;
  8. Guardar as reações a -20 °C ou continuar com a etapa de ligação de adaptadores;
- \* - O tampão utilizado foi o 5X DNA Ligase Reaction Buffer (Invitrogen™). Alternativamente, pode-se utilizar o tampão que acompanha a enzima *Mse* I, o REact 1. O tampão utilizado não pode conter grandes quantidades de sais, para que a atividade da *Mse* I não seja prejudicada.

### Anexo 3

#### Protocolo para a reação de ligação de adaptadores *Eco* RI e *Mse* I

1. Será utilizado 5,5 µl do produto da reação de digestão do DNA;
2. Quantidades para uma reação:
  - 5X DNA Ligase reaction Buffer - 2,0 µl
  - NaCl 0,5M - 1,0 µl
  - BSA 1 mg/ml - 0,5 µl
  - \*Adaptador *Mse* I - 1,0 µl
  - \*Adaptador *Eco* RI - 1,0 µl
  - T4 DNA Ligase (1 U/µl) - 1,0 µlTotal 6,5 µl + 5,5 µl da amostra = 12 µl
3. Misturar bem os componentes, evitando fazer bolhas;
4. Deixar overnight a temperatura ambiente, 17 °C a 20 °C. Temperaturas muito elevadas inibem a atividade da T4 DNA ligase;
5. Guardar as amostras a – 20 °C ou continuar coma etapa de pré-amplificação.

\*- Os adaptadores, antes de serem utilizados, precisam ser ativados. Aquecer a quantidade que será utilizada a 95 °C por 5 minutos, preferencialmente em termociclador. Depois deixar 10 minutos em repouso e dar um spin.

### Anexo 4

#### Protocolo para amplificação pré-seletiva e seletiva para AFLP

##### Amplificação Pré-Seletiva

1. A solução de adaptadores precisa ser diluída em H<sub>2</sub>O antes de se utilizada. É necessário fazer testes para saber qual a melhor diluição. A princípio, diluições de 1:10 e 1:5 são bem sucedidas;
2. Quantidades para uma reação:
  - \*Iniciadores *Eco* RI e *Mse* I - 0,5 µl
  - Core Mix - 7,5 µl
  - Amostra diluída - 2,0 µlTotal 10,0 µl
3. Misturar muito bem os componentes, evitando fazer bolhas ou movimentos bruscos;
4. Enquanto as reações não são colocadas no termociclador, devem permanecer no gelo;
5. A programação do termociclador consta no AFLP Plant Mapping Protocol (Applied Biosystems, 2000);
6. Guardar as amostras a – 20 °C ou continuar com a etapa de amplificação seletiva

##### Amplificação seletiva

1. O produto da amplificação pré-seletiva precisa ser diluído em H<sub>2</sub>O para ser utilizado na amplificação seletiva. É necessário fazer testes para saber qual a melhor diluição. A princípio, diluições de 1:10 e 1:5 são bem sucedidas;
2. Quantidades para uma reação:
  - \*Iniciador *Eco* RI - 0,5 µl
  - \*Iniciador *Mse* I - 0,5 µl
  - Core Mix - 7,5 µl
  - Amostra diluída 1,5 µlTotal 10,0 µl
3. Misturar muito bem os componentes, evitando fazer bolhas ou movimentos bruscos;
4. Enquanto as reações não são colocadas no termociclador, devem permanecer no gelo;
5. Tanto as reações para amplificação como os frascos com os iniciadores não devem ser expostos excessivamente à luz pois a marcação por fluorescência pode ser afetada;
6. A programação do termociclador consta no AFLP Plant Mapping Protocol (Applied Biosystems, 2000);
7. Guardar as amostras a - 20 °C.

\* - Nos dois tipos de amplificação, a quantidade dos iniciadores, em cada reação, pode ser modificada, buscando uma melhora nos resultados, podendo-se dobrar ou triplicar a quantidade de iniciadores.

### Capítulo 3

#### Avaliação das relações intra e interespecíficas no complexo *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) e espécies afins, através de AFLP

Fábio Pinheiro<sup>1,2</sup>, Fábio de Barros<sup>1</sup>, Maria Luiza Faria Salatino<sup>2</sup>, Antonio Salatino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Botânica – Seção de Curadoria do Herbário. <sup>2</sup>Instituto de Biociências, Departamento de Botânica - USP

#### Resumo

*Epidendrum* é um dos maiores gêneros de Orchidaceae e um dos mais variáveis, apresentando diversas dúvidas quanto ao seu posicionamento taxonômico e delimitação de suas espécies, principalmente nas subseções *Carinata* e *Tuberculata*, talvez os grupos mais variáveis e incertos do gênero. O objetivo deste trabalho foi avaliar as relações intra e interespecíficas em espécies integrantes da subseção *Carinata* e de diversas populações do complexo *E. secundum*, pertencentes à subseção *Tuberculata*, utilizando a técnica de AFLP. Os resultados foram analisados utilizando métodos de análise multivariada de agrupamento (UPGMA e Ward). Os resultados indicam que a existência de duas subseções distintas, *Carinata* e *Tuberculata*, não é consistente, pois não se repete nas análises realizadas. Indivíduos do complexo *E. secundum* procedentes da Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas exibem uma tendência de diferenciação em relação às populações procedentes do Planalto Central Brasileiro. Espécimes com flores lilases, vermelhas, laranja e brancas formam agrupamentos mistos, sem uma relação com sua procedência ou caracteres morfológicos sendo, portanto, tratadas como pertencentes a uma única espécie, *E. secundum*. Indivíduos de flores amarelas formam agrupamentos distintos em todas as análises realizadas, exibindo uma clara descontinuidade genética em relação a *E. secundum*, devendo ser identificadas como *E. xanthinum*.

## Abstract

*Epidendrum* is one of the largest genera of Orchidaceae, and one of the most variable, presenting many uncertainties regarding its taxonomic position and the distinction among species, mainly in the subsections *Carinata* and *Tuberculata*, which are possibly among the more variable and complex groups within the genus. This work aimed to evaluate intra- and interspecific relationships among species of the subsection *Carinata*, and of populations of the *E. secundum* complex, which belongs to the subsection *Tuberculata*. By usage of AFLP technique, data were analyzed by clustering methods of multivariate analysis (UPGMA and Ward). The results pointed out that the distinction of the two subsections, (*Carinata* and *Tuberculata*) is likely to be artificial. Plants from the *E. secundum* complex found from the Andes and the Guyana Plateau have a tendency to split in relation to populations from the Brazilian Plateau. Specimens with lilac, red, orange or white flowers form mixed groups, in spite of their provenance or morphological features, and should be treated as belonging to a single species, *i.e.* *E. secundum*. On the other hand, individuals with yellow flowers form distinct groups in all analyses, showing a clear discontinuity in relation to *E. secundum*, and thus must be identified as *E. xanthinum*.

## Introdução

*Epidendrum* L. é o maior gênero da família Orchidaceae na região Neotropical, com 1125 espécies e o terceiro maior da família Orchidaceae no mundo, sendo superado apenas por *Bulbophyllum* (1789) e *Dendrobium* (1184) (Chase *et al.*, 2003). Apesar do número expressivo de espécies, não há trabalhos envolvendo espécies de *Epidendrum* com o propósito de esclarecer as relações de parentesco e os padrões evolutivos dentro do gênero, utilizando técnicas como o sequenciamento de nucleotídeos e análises de fragmentos de DNA, como já vem ocorrendo com diversos outros gêneros neotropicais da família (van den Berg, 2000; Whitten *et al.*, 2000; Pridgeon *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001; Koehler *et al.*, 2002; Higgins *et al.*, 2003).

O tamanho do gênero é proporcional aos problemas taxonômicos que o cercam, já que existe uma grande variabilidade morfológica entre seus integrantes, em diversos níveis hierárquicos, tornando sua delimitação genérica e a posição sistemática de muitas de suas espécies alvo de controvérsias (Dressler, 1967, 1984; Brieger, 1976-1977; Hágsater, 1993).

Um dos grupos de espécies mais variável morfológicamente foi delimitado primeiramente por Lindley (1852-1859), constituindo o subgênero *Amphiglottium*, o qual possuía diversas seções, dentre elas a seção *Schistochila*. As espécies da seção *Schistochila* foram distribuídas em duas subseções segundo a morfologia do calo do labelo (Fig. 1): subseção *Carinata*, com calo em forma de quilha e projetado longitudinalmente sobre o disco (Fig. 1a), e subseção *Tuberculata*, com calo carnosos, variadamente recortado, geralmente no centro do disco (Fig. 1b). Cogniaux (1898-1902), Pabst & Dungs (1975) e Brieger (1976-1977) também formularam sistemas de classificação para este grupo que repetiram, em grande parte, a classificação de Lindley (1852-1859). Apesar de ter trabalhado com um número reduzido de espécies (*Epidendrum cinnabarinum* Salzm., *E. ibaguense* H.B.K. e *E. secundum* Jacq.), van den Berg *et al.* (2000) mostraram que a seção *Amphiglottium* forma um grupo monofilético. Estudos com diferentes abordagens metodológicas já foram realizados na seção *Schistochila*, revelando grande variação no número cromossômico das espécies (Blumenschein, 1957), caracteres anatômicos pouco informativos para delimitação das espécies (Baker, 1972), agentes polinizadores não específicos e alta intercompatibilidade entre as espécies (Pansarin, 2000).

Dentro da subseção *Tuberculata* o “complexo *Epidendrum secundum*” é um dos grupos menos compreendidos taxonomicamente (Brieger, 1976-1977; Dunsterville, 1979). São plantas extremamente polimorfas e amplamente distribuídas na América do Sul. A complexidade do grupo é refletida no grande número de nomes a ele associados, tratados, às vezes como sinônimos de *E. secundum*, às vezes como espécies autônomas (*E. elongatum* Jacq., *E. crassifolium* Lindl., *E. ellipticum* Grah., *E. ansiferum* Rchb. f., *E. versicolor* Hoehne & Schltr., *E. xanthinum* Lindl., entre outras).

Cada autor tem um ponto de vista sobre como tratar as variações apresentadas pelas espécies que compõem o complexo *E. secundum*: alguns considerando cada morfo ou coloração de flor como pertencente a uma espécie distinta (Pabst & Dungs, 1975; Brieger, 1976-1977; Sastre, 1990a, 1990b), e outros partindo do pressuposto de que as variações são

contínuas e fazem parte de uma mesma espécie polimorfa (Dressler, 1989; Dunsterville & Garay, 1961; Garay & Sweet, 1974). Como estes trabalhos se basearam em amostragens reduzidas e exclusivamente na morfologia floral para delimitar as espécies do grupo, as incertezas quanto à delimitação das espécies do grupo permaneceram.

Os problemas taxonômicos não estão restritos a este complexo. Na subseção *Carinata* existem espécies que, apesar de não pertencerem, "a priori", ao complexo *E. secundum*, são muito próximas e, igualmente, variáveis e de difícil delimitação; é o caso de *E. denticulatum* Barb. Rodr., *E. fulgens* Brongn., *E. cinnabarinum* Salzm., *E. incisum* Vell., *E. ibaguense* H.B.K., *E. calanthum* Rchb.f. & Warsc. e *E. radicans* Pavón ex Lindl., entre outras.

Incertezas taxonômicas relacionadas com caracteres morfológicos contínuos, informações ecológicas escassas e ausência de padrões biogeográficos claros são comuns em Orchidaceae. Para tentar esclarecer as relações de parentesco apresentadas por grupos de espécies com estas características, diversos trabalhos utilizando dados morfológicos (Onishi, 1974; Bateman & Denholm, 1983, 1985; Reinhammar, 1995; van den Berg, 1996; Borba *et al.*, 2002; Palestina & Sosa, 2002) e dados moleculares (Wallace & Case, 2000; Borba *et al.*, 2001; Hedrén *et al.*, 2001; Squirrel *et al.*, 2002; Gustafsson & Lonn, 2003; Chung *et al.*, 2004; Forrest *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004) foram publicados, apresentando resultados bastante interessantes. O principal ponto em comum destes trabalhos foi a estratégia amostral adotada por seus autores: incluir um número de indivíduos e populações suficientes para que a variação morfológica e a distribuição geográfica do grupo estivessem representadas nas análises.

Estudos que tentam esclarecer os limites entre espécies próximas ou quantificar a variação existente entre populações são importantes porque revelam o padrão de evolução dos caracteres envolvidos na divergência dessas linhagens, ligados ao processo de especiação (Crawford & Mort, 2004). Neste sentido, a amostragem dos trabalhos é extremamente importante já que a evolução abaixo do nível de espécie tende a ser reticulada (Paton & Smith, 1994). A inclusão de apenas um indivíduo por espécie ou população pode gerar padrões discordantes, de difícil interpretação, já que híbridos ou poliplóides podem estar participando das análises (Seehausen, 2004). A maior parte dos trabalhos parte do princípio de que o conjunto de indivíduos que está sendo analisado é

monofilético, não realizando testes para confirmar tais relações, como amostrar mais de um indivíduo por espécie ou incluir espécies próximas (Funk & Omland, 2003).

Muitos problemas de diferenciação intra e interespecífica têm sido analisados através de sequenciamento de bases de DNA do núcleo ou de organelas, como cloroplastos e mitocôndrias (Stappen *et al.*, 2002), porém com uma resolução insuficiente (Crawford & Mort, 2004). Técnicas baseadas na análise de fragmentos de DNA produzem uma quantidade de polimorfismos bastante elevada, sendo indicadas para estudos populacionais e de circunscrição de espécies próximas (Wolfe & Liston, 1998; Rieseberg, 1998).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) é uma técnica recente, descrita por Vos *et al.* (1995) baseada na amplificação seletiva de fragmentos de restrição previamente selecionados. Segmentos de DNA, originados por clivagem com enzimas de restrição, se ligam a adaptadores específicos que são reconhecidos por iniciadores, sendo posteriormente amplificados. Os produtos amplificados podem ser marcados por fluorescência e lidos num seqüenciador automatizado (Karp *et al.*, 1996; Wolfe & Liston, 1998). Se comparado com técnicas semelhantes, como RFLP e RAPD, a técnica AFLP permite produzir maior quantidade de fragmentos de restrição, mapeando, portanto, uma quantidade maior de polimorfismos, além de ser mais fácil a reprodução dos dados obtidos (Wolfe & Liston, 1998).

A homologia entre os fragmentos obtidos por AFLP é contestada porque não se conhece, de fato, a seqüência de nucleotídeos que compõe cada fragmento, tornando tal homologia discutível (Robinson & Harris, 1999). No momento, apenas o trabalho de Rouppe-van der Voort *et al.* (1997) tentou averiguar a homologia dos fragmentos produzidos por AFLP, e verificou que 95% dos fragmentos obtidos possuíam a mesma seqüência de nucleotídeos. Segundo Rieseberg (1996), a homologia entre os fragmentos de AFLP pode ser proporcional à proximidade taxonômica entre os grupos em questão. Resultados produzidos por AFLP têm sido corroborados por dados produzidos por seqüenciamento de nucleotídeos, gerando dendrogramas com topologias muito semelhantes (Giannasi *et al.*, 2001; Hedren *et al.*, 2001; Kropf *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004).

A incerteza quanto à homologia dos dados produzidos por AFLP tem implicações nas técnicas utilizadas para a análise dos dados. A utilização de métodos cladísticos, como parcimônia e máxima verossimilhança exigem que os caracteres utilizados atendam a

pressupostos que, a princípio, não são atendidos pelos dados produzidos por AFLP, como a certeza sobre a homologia dos caracteres e sua independência (Swofford & Olsen, 1990). A análise utilizando métodos fenéticos, como agrupamento e ordenação, não possui restrições porque estes são métodos numéricos que utilizam diversos tipos de algoritmos matemáticos para estabelecer as relações de similaridade ou distância entre as amostras (Duncan & Baum, 1981). Em estudos populacionais e de circunscrição de espécies, métodos fenéticos podem representar as relações evolutivas entre os grupos envolvidos (Duncan & Baum, 1981). Apesar das diferenças entre métodos fenéticos e cladísticos, existem trabalhos que utilizaram ambos, num mesmo conjunto de dados produzidos por AFLP, obtendo resultados muito semelhantes (Gobert *et al.*, 2002; Pelsler *et al.*, 2003).

O objetivo deste trabalho foi esclarecer as relações intra e interespecíficas no complexo *Epidendrum secundum*, pertencente à subseção *Tuberculata*, utilizando a técnica de AFLP. Foram incluídos nesta análise indivíduos que representam a variação morfológica encontrada no grupo bem como sua distribuição geográfica. Espécies próximas ao complexo, pertencentes à subseção *Carinata*, também foram analisadas, numa tentativa de avaliar a consistência destas subseções.

### Material e Métodos

Foi analisado um total de 89 indivíduos, classificados nas subseções *Tuberculata* ou *Carinata* de acordo com a morfologia do calo do labelo (Fig. 1), seguindo a classificação de Brieger (1976-1977).

Na subseção *Carinata*, a maioria das espécies é constituída por complexos de indivíduos bastante variáveis, assim como ocorre na subseção *Tuberculata*. Devido a essa grande variação, que ocorre tanto na coloração das flores quanto em sua morfologia, foi adotada uma delimitação das espécies num sentido amplo, já que não foi possível, com o material disponível, avaliar previamente se tais variações seriam suficientemente importantes para definirem espécies distintas. A subdivisão aqui proposta foi baseada nas obras de Dunsterville & Garay (1961), Brieger (1976-1977) & Pabst & Dungs (1975) e consta na Tabela 1, assim como o número de indivíduos utilizados, código utilizado nas

análises de agrupamento e procedência. Como não foi possível obter representantes de *E. flexuosum* G. Mey., esta espécie não participou das análises.

Para a subseção *Tuberculata*, já existem resultados prévios, utilizando morfometria, que indicam não ser possível separar os indivíduos em agrupamentos de espécies distintas (Pinheiro & Barros, capítulo 4). Por esse motivo, todos os indivíduos utilizados na presente análise foram considerados integrantes de apenas uma mesma espécie - *Epidendrum secundum*, e foram separados apenas segundo o tipo de coloração da flor que apresentavam (Tab. 2). Algumas populações tiveram mais de um indivíduo amostrado para que as relações entre as populações fossem mais consistentes. Os indivíduos utilizados cobrem grande parte da distribuição geográfica do grupo bem como da diversidade morfológica encontrada nas populações.

A variação encontrada na coloração das flores de indivíduos utilizados nas análises, de ambas subseções, foi documentada através de fotografias (Figs. 2, 3).

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1995) e as reações envolvidas com a obtenção dos marcadores AFLP foram realizadas de acordo com o protocolo AFLP Plant Mapping Protocol (Applied Biosystems, 2000). A digestão do DNA foi realizada com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Mse* I (Invitrogen™). Os fragmentos resultantes foram ligados aos adaptadores e passaram por duas reações de amplificação. Nas etapas de amplificação pré-seletiva e seletiva, todos os reagentes envolvidos fazem parte do kit AFLP Plant Mapping Kit da Applied Biosystems. O protocolo utilizado foi baseado nas instruções presentes no AFLP Plant Mapping Protocol (Applied Biosystems, 2000). Foram utilizadas três combinações de iniciadores do AFLP Plant Mapping Kit para genoma pequeno da Applied Biosystems, que utiliza iniciadores com duas bases adicionais, *Eco* RI-AC e *Mse* I-CTA, *Eco* RI-TG e *Mse* I-CTC e *Eco* RI-AG e *Mse* I-CTT, nos quais as letras indicam os nucleotídeos extras que os iniciadores possuem. As amostras foram analisadas pelo sequenciador automático de DNA ABI Prism 310 da Applied Biosystems, o qual produz eletroferogramas individuais para cada amostra, que indicam a presença e o respectivo tamanho dos fragmentos, em pares de bases. Os eletroferogramas resultantes foram analisados pelos softwares GeneScan e Genotyper, da Applied Biosystems, produzindo uma matriz binária, que representa a presença e ausência de fragmentos polimórficos entre as amostras. Os eletroferogramas

também foram analisados visualmente, para que artifícios pudessem ser removidos das amostras. Detalhes sobre as reações e procedimentos envolvidos nas análises dos eletroferogramas podem ser obtidos em Pinheiro & Lopes (capítulo 2).

Para aplicação das análises multivariadas, foi utilizado o programa FITOPAC (Shepherd, 1996). Foram empregados dois métodos de agrupamento: UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) utilizando o coeficiente de Dice, e o método de Ward empregando o coeficiente Bray Curtis. UPGMA e Ward possuem estratégias de agrupamento distintas e sua utilização em conjunto visa aprimorar a interpretação dos dados obtidos. UPGMA tende a agrupar os indivíduos em grupos preexistentes, favorecendo a formação de agrupamentos numerosos. Ward tende a produzir grupos compactos e esféricos, mesmo num conjunto de dados onde a distribuição é contínua, por isso é interessante que seja utilizado junto com outros métodos (Shepherd, 1994). Resultados semelhantes produzidos por métodos distintos podem indicar uma grande estruturação dos dados analisados, enquanto que resultados diferentes podem indicar que os dados não possuem uma estrutura evidente, devendo ser interpretados com cautela (Manly, 1994). Para cada análise foi calculada a Correlação Cofenética (Tab. 3), que é uma medida da distorção dos agrupamentos em relação à matriz de distâncias original (Sneath & Sokal, 1973). Valores superiores a 0,7 indicam boa representação da matriz de distâncias no método de agrupamento utilizado (Shepherd, 1994).

O total de indivíduos amostrados foi subdividido em três conjuntos principais. Em cada conjunto foi construída uma matriz, que foi analisada em separado por UPGMA e Ward. Os critérios para esta subdivisão estão relacionados com os objetivos do trabalho:

1. Análise I: reuniu indivíduos das subseções *Carinata* e *Tuberculata* para que fosse avaliada a consistência destas subseções (Figs. 4, 5);
2. Análise II: participaram desta análise apenas indivíduos da subseção *Tuberculata*, representando a maior parte da variação morfológica e distribuição geográfica encontrada no grupo, tendo o objetivo de avaliar as relações genéticas entre indivíduos desta subseção (Figs. 6, 7);
3. Análise III: igual à anterior, porém com um número menor de indivíduos, considerando apenas aqueles que representavam extremos de variação e de

distribuição geográfica dentro do complexo *E. secundum*, numa tentativa de obter padrões que não tivessem sido revelados na análise anterior (Figs. 8, 9).

Para construir as matrizes de presença e ausência destas análises, os eletroferogramas das respectivas amostras que compõem cada conjunto foram analisados em separado, já que o número de polimorfismos pode variar de acordo com o número de indivíduos nas análises e sua relação de parentesco. A quantidade de polimorfismos produzida por cada par de iniciador utilizado, foi determinada em cada tipo de análise (Tab. 4). Foi realizado, também, um levantamento na literatura para comparar a quantidade de polimorfismos obtida em trabalhos semelhantes que utilizaram AFLP (Tab. 5).

## Resultados

Na Figura 2 estão representadas as espécies integrantes da subseção *Carinata* utilizadas neste trabalho. Existe uma grande variação morfológica entre elas, principalmente dentro de algumas espécies, como *E. fulgens* e *E. ibaguense* (Fig. 2).

Dentro da subseção *Tuberculata* a variação na coloração e morfologia das flores é bastante elevada (Fig. 3). Tanto indivíduos procedentes da região andina como do Planalto Brasileiro exibem os mesmos padrões de variação (Fig. 2A, 2B). A variação inter e intrapopulacional também é elevada, considerando apenas indivíduos de flores lilases (Fig. 2C, 2D, 2E) ou indivíduos de flores amarelas (Fig. 2F). Em algumas populações, foram encontrados indivíduos que exibiam morfologia bastante distinta dos indivíduos ao redor, muitas vezes com padrões intermediários em relação a espécies da subseção *Carinata*, como *E. denticulatum* e *E. fulgens* (Fig. 2G).

Os métodos de UPGMA e Ward produziram resultados semelhantes nos tipos de análises A, B e C (Figs. 4-9). Os valores de correlação cofenética das análises de UPGMA foram superiores aos valores obtidos para o método de Ward (Tab. 3).

### Análise I

No dendrograma produzido por UPGMA as espécies pertencentes à subseção *Carinata* não formaram um agrupamento distinto (Fig. 4). *E. funckii*, *E. martianum*, *E.*



*campestre* e *E. anceps* ocuparam a posição mais externa no dendrograma (Fig. 4). As espécies que possuem mais de um indivíduo na análise formaram grupos distintos (Fig. 4). *E. cinnabarinum*, *E. denticulatum* e *E. fulgens*, espécies encontradas exclusivamente no Brasil, formaram um grupo e foram as espécies da subseção *Carinata* que ocuparam uma posição mais próximas do grupo formado pela subseção *Tuberculata* (Fig. 4). Os indivíduos da subseção *Tuberculata* formaram um agrupamento distinto, no qual podem ser reconhecidos três subgrupos principais: o primeiro formado por indivíduos com flores amarelas, o segundo formado por plantas com flores lilases, laranja e brancas procedentes do Planalto Brasileiro e, o terceiro formado por indivíduos com flores lilases, laranja e brancas procedentes, em sua maioria, da região andina (Fig. 4). Um dos indivíduos procedentes da região andina (96A) ocupou posição externa aos demais da subseção *Tuberculata* (Fig. 4).

No método de Ward, é possível reconhecer dois agrupamentos principais, que correspondem às subseções *Carinata* e *Tuberculata* (Fig. 5). Dentro da subseção *Carinata*, a relação entre as espécies foi diferente daquela obtida em UPGMA, porém, indivíduos de uma mesma espécie continuaram formando grupos distintos (Fig. 5). Na subseção *Tuberculata*, os agrupamentos são os mesmos que em UPGMA (Fig. 5).

#### Análise II

Na análise de UPGMA, indivíduos provenientes da região andina e Planalto Brasileiro ocuparam diversas regiões no dendrograma, não formando agrupamentos consistentes (Fig. 6). A porção mais externa do dendrograma possui alguns padrões interpretáveis, como o grupo que reúne indivíduos com morfologias intermediárias de diversas populações no Brasil, prováveis híbridos entre *E. secundum* X *E. fulgens* e *E. secundum* X *E. denticulatum*, e o agrupamento de indivíduos de flores amarelas (Fig. 6). Na porção interna do dendrograma está a maior parte das plantas provenientes do Planalto Brasileiro, com flores lilases, laranja e brancas, sendo que indivíduos de uma mesma população não formaram grupos distintos, com exceção da população da Serra do Cipó (Fig. 6).

No método de Ward, nota-se dois agrupamentos principais: o primeiro reúne plantas procedentes do Planalto Brasileiro com flores lilases, laranja e brancas, sendo novamente a

população da Serra do Cipó a única que forma um agrupamento distinto entre as populações amostradas (Fig. 7); o segundo possui alguns subgrupos, constituídos por indivíduos procedentes da região andina com flores lilases, laranja e brancas, plantas que podem ser híbridos entre *E. secundum* X *E. fulgens* e *E. secundum* X *E. denticulatum*, e indivíduos com flores amarelas, um dos quais procedente do Equador (Fig. 7).

#### Análise III

Na porção mais externa do dendrograma de UPGMA estão os indivíduos procedentes da região andina, subdivididos em alguns agrupamentos (Fig. 8). Em seguida está o grupo formado por plantas que podem ser híbridos entre *E. secundum* X *E. fulgens* e *E. secundum* X *E. denticulatum* (Fig. 8). O agrupamento mais interno do dendrograma reuniu indivíduos procedentes do Planalto Brasileiro, de flores lilases, laranja e brancas (Fig. 8). Os dois únicos indivíduos de flores amarelas nesta análise formaram um agrupamento distinto que se situa entre plantas de flores com cores diversas (Fig. 8).

No método de Ward foram produzidos os mesmos agrupamentos que na análise anterior (Fig. 9). A única diferença é a reunião dos indivíduos procedentes da região andina num agrupamento distinto e a inserção de um indivíduo procedente da Bolívia junto às plantas procedentes do Planalto Brasileiro (Fig. 9).

#### **Discussão**

A existência da subseção *Carinata* é duvidosa, pois os métodos utilizados apresentaram resultados distintos (Figs. 4, 5). Na Figura 4, as espécies que ocupam a posição mais externa no dendrograma (*E. funckii*, *E. martianum*, *E. campestre*, *E. anceps*, *E. myrmecophorum* e *E. purpureum*) são também aquelas mais distantes morfologicamente das demais espécies, já que possuem a margem do labelo inteira (Fig. 2). Existe uma hipótese na literatura de que *E. purpureum* seja um híbrido entre *E. myrmecophorum* e *E. denticulatum* (Miranda, 1993). Apesar de todas as espécies envolvidas ocorrerem em simpatria (Cabo Frio – RJ) e do fenótipo intermediário que *E. purpureum* possui entre as prováveis espécies parentais (Fig. 2G, 2J, 2K), não foi possível, com os dados aqui obtidos,



explicação para seu parentesco genético seria o fato destas populações terem ocorrido de maneira contínua num período pretérito. Dispersão de sementes a longa distância, ao contrário do que se pensa, não parece ser um fenômeno comum em Orchidaceae, mesmo entre populações próximas (Barkman & Simpson, 2001; Borba *et al.*, 2001; Cozzolino *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2004) sendo eventos históricos os mais prováveis por moldar os padrões observados no presente (Borba *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2004). Indivíduos de flores amarelas também ocorrem na Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas mas, como apenas um indivíduo participou das análises, não foi possível verificar com segurança o parentesco de plantas destas regiões com as populações do Planalto Brasileiro. Até o momento, portanto, apenas plantas de flores amarelas, de populações provenientes do Planalto Brasileiro, podem ser identificadas com segurança como *E. xanthinum*.

Indivíduos com características morfológicas intermediárias entre *E. secundum* e *E. denticulatum*, e *E. secundum* e *E. fulgens* (Fig. 3G), formaram agrupamentos consistentes em todas as análises em que estiveram presentes (Figs. 6-9). Estas plantas foram coletadas em populações onde há predomínio de indivíduos de *E. secundum* de flores lilases. Algumas dessas populações exibem sobreposição de ocorrência com populações de *E. fulgens* e *E. denticulatum*, podendo ser híbridos, já que estas espécies são compatíveis entre si (Pansarin, 2000), e há, nas regiões de ocorrência, disponibilidade de novos ambientes para serem colonizados como margens de rodovias e áreas desmatadas (Rieseberg, 1997; Seehausen, 2004). Existem casos de indivíduos híbridos que, mesmo sendo provenientes de regiões distintas e tendo sido originados por eventos de hibridização independentes, revelaram similaridades genéticas entre si (Levin, 2001; Gross *et al.*, 2003). Pode também ser um caso de especiação induzida por reorganização cromossômica sem a participação de espécies próximas (Lewis, 1966, Murray, 2005), gerando aloploplóides que estariam diretamente isolados reprodutivamente dos demais indivíduos da população (Seehausen, 2004), propiciando, com o passar das gerações, o aparecimento de linhagens evolutivamente distintas (Hedrén *et al.*, 2001). Porém, como o cariótipo destes indivíduos não é conhecido, não é possível inferir sobre os processos responsáveis pela diferenciação morfológica e genética observadas.

Em várias análises, indivíduos provenientes da região andina e plantas de populações do Planalto Brasileiro formaram grupos distintos (Figs. 4, 5, 7, 9). Não há

caracteres morfológicos que sustentem tal separação (Fig. 3A, 3B), já que a variação observada no grupo está presente em ambas regiões geográficas. Os dois grupos também mostram grande similaridade genética, já que, na maioria das análises, indivíduos provenientes do Planalto Brasileiro apareceram dentro do grupo da região andina e vice-versa (Fig. 4, 5, 6, 7, 9). Este padrão pode representar um estágio inicial de divergência entre linhagens, influenciada pela distribuição disjunta entre as populações das duas principais regiões, Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas de uma lado, e Planalto Brasileiro do outro. Como ainda não foram identificadas regiões de contato entre estes dois grandes grupos, o fluxo gênico entre eles deve ser limitado, auxiliando o processo de diferenciação entre as linhagens (Avice & Wollenberg, 1997). Mesmo sem a interrupção do fluxo gênico, linhagens distintas podem surgir, principalmente em populações pequenas, periféricas, através de deriva genética (Irwin, 2002). A hibridização com espécies próximas pode ter papel decisivo na diferenciação de linhagens pois pode facilitar processos de irradiação adaptativa, já que híbridos podem ter um sucesso reprodutivo superior em novos habitats (Seehausen, 2004). Porém, nem sempre modificações no genótipo originam fenótipos distintos, uma vez que diferentes linhagens podem estar submetidas às mesmas pressões ecológicas, resultando em padrões morfológicos semelhantes (Levin, 2001).

As diversas populações amostradas não formaram grupos distintos, com indivíduos de uma mesma população ocupando diferentes posições nos dendrogramas (Figs. 6-9). Não há uma relação aparente entre distribuição geográfica (Tab. 2) e características morfológicas (Fig. 3C, 3D, 3E) com os grupos obtidos nas análises (Figs. 6-9). A grande proximidade genética encontrada entre as populações pode ser devida a um intenso fluxo gênico entre elas, que tende a diminuir as diferenças genéticas. Porém, trabalhos que comparam populações de Orchidaceae não encontraram evidências de elevado fluxo gênico entre populações, que poderia ser causado principalmente por dispersão de sementes (Cozzolino *et al.*, 2003; Chung *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004) inclusive em regiões da Cadeia do Espinhaço, onde foram coletadas algumas populações estudadas no presente trabalho (Borba *et al.*, 2001). A razão mais provável para a falta de resolução está na baixa quantidade de polimorfismos encontrados (Tab. 4) se comparada com resultados obtidos em trabalhos semelhantes (Tab. 5). A baixa quantidade de polimorfismos pode estar relacionada à presença de uma grande quantidade de fragmentos não homólogos que

participaram das reações, já que a quantidade total de fragmentos obtida foi elevada (Tab. 4). A utilização do kit para genoma pequeno da Applied Biosystems pode produzir este padrão: grande quantidade de fragmentos porém com baixa quantidade de polimorfismos, gerando baixa resolução (Fay *et al.*, 2005). A utilização do kit de genoma grande, apesar de mais restritivo, produzindo menor quantidade de fragmentos, poderia gerar uma quantidade maior de polimorfismos, conferindo maior resolução às análises (Fay *et al.*, 2005).

Com exceção de *E. xanthinum*, que formou um grupo à parte em todas as análises, os demais indivíduos não apresentaram nenhuma relação entre polimorfismos florais, seja na morfologia ou na coloração das flores, e variação genética. Indivíduos com flores lilases, laranja e brancas ocuparam diversas posições nas análises realizadas (Fig. 4-9), sem um padrão evidente. A presença de indivíduos com colorações de flor intermediárias nas populações naturais pode ser um indício de que ocorra fluxo gênico entre plantas com flores de diferentes colorações, envolvendo inclusive *E. xanthinum*. Esses híbridos podem manter-se nas populações quando o hábitat é heterogêneo e possibilita a exploração de diferentes recursos (Rieseberg, 1997). A manutenção de polimorfismos florais em populações naturais é um fenômeno que pode ser mantido através de relações pleiotrópicas de genes relacionados com outros aspectos da biologia do organismo, influenciados por pressões seletivas distintas daquelas que atuam diretamente sobre a flor, como defesa contra herbivoria (Frey, 2004). A grande variação de padrões florais presentes numa espécie pode ser também uma estratégia para inibir o aprendizado do polinizador, em flores que não oferecem recurso, já que o polinizador não consegue estabelecer uma ligação entre um padrão floral específico e a ausência de recurso (Andersson *et al.*, 2002).

Os dados obtidos revelaram que existe uma tendência de diferenciação genética entre indivíduos provenientes da Cadeia dos Andes e do Planalto Brasileiro, porém não suficiente para que as linhagens sejam consideradas como espécies distintas, já que não há padrões morfológicos (Fig. 3A, 3B) e mesmo genéticos entre alguns indivíduos (Fig. 4, 5, 6, 7, 9), que possibilitem estabelecer uma divisão de forma segura; isso sugere que a divergência é recente e, portanto, difícil de ser estabelecida (Paton & Smith, 1994). Existem diversos critérios para definir espécies (Sites & Marshall, 2004), relacionados ao tempo e aos processos que cada um enfatiza (Queiroz, 1998). Diferentes critérios para definir o que seja espécie tendem a ser complementares, pois cada um descreve um estágio diferente de

diversificação das linhagens envolvidas (Queiroz, 1998). Cada conceito de espécie pode ser proporcional ao nível de generalização que se pretende do sistema de classificação em que está inserido, assim como ocorre com mapas, os quais nada mais são do que generalizações cartográficas, simplificações do mundo (O'Hara, 1993).

Este trabalho é a primeira tentativa de se conhecer as relações genéticas dentro do complexo *E. secundum*. Muitos padrões foram encontrados, alguns inesperados. Trabalhos que considerem outras populações, métodos distintos e diferentes fontes de dados são necessários para uma melhor compreensão do grupo. Até o momento, as evidências de variação genética e morfológica (capítulo 4) sugerem que apenas uma espécie pode ser delimitada com segurança, *E. secundum*, compreendendo indivíduos com flores lilases, laranja e brancas, bem como seus intermediários, com ocorrência tanto na Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas como no Planalto Brasileiro.

Tabela 1: Espécies da subseção *Carinata* utilizados nas análises moleculares. N = Número de indivíduos analisados.

Espécie	Código nas análises	N	Procedência e Registro no Orquidário do Instituto de Botânica
<i>E. anceps</i> Jacq.	65A	1	Marabá (PA) - 17703
<i>E. calanthum</i> Rchb.f. & Warsc.	88A, 93A, 128A	3	Equador e Serra Pacaraima (RR) - 17856, 18026, 18027
<i>E. campestre</i> Lindl.	49A	1	Santana do Riacho (MG) - 7070
<i>E. cinnabarinum</i> Salzm.	53A	1	Camocim de São Félix (PE) - 17465
<i>E. denticulatum</i> Barb. Rodr.	95A	1	Bertioga (SP) - 17910
<i>E. fulgens</i> Brongn.	50A, 79A	2	Ilha do Cardoso (SP) - 17872, 17873
<i>E. funkii</i> Rchb.f.	70A	1	Peru - 18038
<i>E. myrmecophorum</i> Barb. Rodr.	27A, 58A, 62A	3	Salvador, Lençóis (BA) e Mangaratiba (RJ) - 17612, 17698, 17709
<i>E. ibaguense</i> H.B.K.	84A, 87A	2	Serra Pacaraima (RR) - 18031, 18032
<i>E. martianum</i> Lindl.	59A	1	Santana do Riacho (MG) - 7041
<i>E. purpureum</i> Barb. Rodr.	76A	1	Araruama (RJ) - 17891
<i>E. radicans</i> Pavón ex Lindl.	61A, 123A, 124A	3	Equador e México - 17861, 17894, 18028
<i>E. incisum</i> Vell.	92A	1	Equador - 17859
<b>Total</b>		<b>21</b>	

Tabela 2: Indivíduos da subseção *Tuberculata* utilizados nas análises moleculares. N = Número de indivíduos analisados.

Coloração da flor	Código nas análises	N	Procedência e Registro no Orquidário do Instituto de Botânica
lilás	1A - 4A	4	Diamantina (MG) - 8900, 8831, 8833, 8832
	5A - 8A	4	Pindamonhangaba (SP) - 17308, 17306, 17309, 17307
	10A, 12A, 14A, 40A	4	Nova Friburgo (RJ) - 17841, 17835, 17837, 17597
	18A - 22A	5	Santana do Riacho (MG) - 15286 - 15290
	23A	1	Alto Paraíso (GO) - 17600
	25A, 31A, 33A, 35A	4	Santa Bárbara (MG) - 17494, 17491, 17497, 17495
	32A	1	Santo Antônio do Itambé (MG) - 17480
	54A	1	Itatiaia (RJ) - 17879
	41A	1	Biritiba Mirim (SP) - 17602
	46A, 47A	2	Mucugê (BA) - 17883, 17884
	44A	1	Atibaia (SP) - 17599
	71A	1	Peru - 18039
	73A	1	Venezuela - 18040
	66A, 67A	2	Bolívia - 18045, 18046
	94A, 96A	2	Equador - 17862, 17857
	74A	1	Caieiras (SP) - 16472
	89A	1	Monte Roraima (RR) - 17593
	108A, 109A, 112A	3	Ubatuba (SP) - 17953, 17954, 17664
	115A	1	Apiá (SP) - 11117
laranja	36A, 37A, 43A, 48A	4	Santa Bárbara (MG) - 17490, 17506, 17492, 17505
	30A, 34A	2	Santo Antônio do Itambé (MG) - 17672, 17674
	42A	1	Biritiba Mirim (SP) - 17603
	90A	1	Equador - 17860
	68A, 121A, 122A	3	Santo André (SP) - sem registro, coleção particular
	13A, 16A, 102A	3	Nova Friburgo (RJ) - 17838, 17840, 9945
	9A, 11A, 15A, 17A, 24A	5	Nova Friburgo (RJ) - 17832 - 17834, 17643, 17601
amarela	38A, 39A, 45A	3	Santa Bárbara (MG) - 17496, 17493, 17615
	26A, 29A	2	Santo Antônio do Itambé (MG) - 17482, 17673
	91A	1	Equador - 17858
	72A	1	Venezuela - 18041
branco	111A, 127A	2	Nova Friburgo (RJ) - sem registro, coleção particular
<b>Total</b>		<b>68</b>	

Tabela 3: Valores de correlação cofenética das análise de agrupamento realizadas.

	<b>Análise A</b>	<b>Análise B</b>	<b>Análise C</b>
<b>UPGMA</b>	0,90	0,86	0,80
<b>Ward</b>	0,63	0,64	0,57

Tabela 4: Quantidade de fragmentos produzido por cada combinação de iniciadores nas análises de AFLP. \* = Número de fragmentos produzidos; \*\* = Número de fragmentos polimórficos e porcentagem do total.

Iniciadores	<b>Análise A</b>		<b>Análise B</b>		<b>Análise C</b>	
	<b>Total*</b>	<b>polimórf.**</b>	<b>Total</b>	<b>polimórf.</b>	<b>Total</b>	<b>polimórf.</b>
AC/CTA	302	43 (14%)	224	22 (10%)	193	19 (10%)
AG/CTT	230	41 (18%)	176	7 (4%)	139	10 (7%)
TG/CTC	315	50 (16%)	268	11 (4%)	240	11 (5%)
<b>Total</b>	<b>847</b>	<b>134 (16%)</b>	<b>668</b>	<b>40 (6%)</b>	<b>572</b>	<b>40 (7%)</b>

Tabela 5: Porcentagem de polimorfismos obtidos com marcadores AFLP em trabalhos semelhantes, utilizando iniciadores com três bases adicionais (kit de genoma grande - Applied Biosystems).

Autor	Família	Marcadores obtidos entre:	Polimorfismos
Cardoso <i>et al.</i> , 2000	Arecaceae	populações de uma espécie	92%
Gaudel <i>et al.</i> , 2000	Apiaceae	populações de uma espécie	54%
van der Merwe <i>et al.</i> , 2000	Cupressaceae	populações de uma espécie	56%
Kjaer <i>et al.</i> , 2004	Arecaceae	populações de uma espécie	48%
Kardolus <i>et al.</i> , 1998	Solanaceae	espécies de um gênero	40%
Gobert <i>et al.</i> , 2002	Lamiaceae	espécies de um gênero	56%
Despres <i>et al.</i> , 2003	Ranunculaceae	espécies de um gênero	75%
Tremetsberger <i>et al.</i> , 2003	Asteraceae	espécies de um gênero	24%

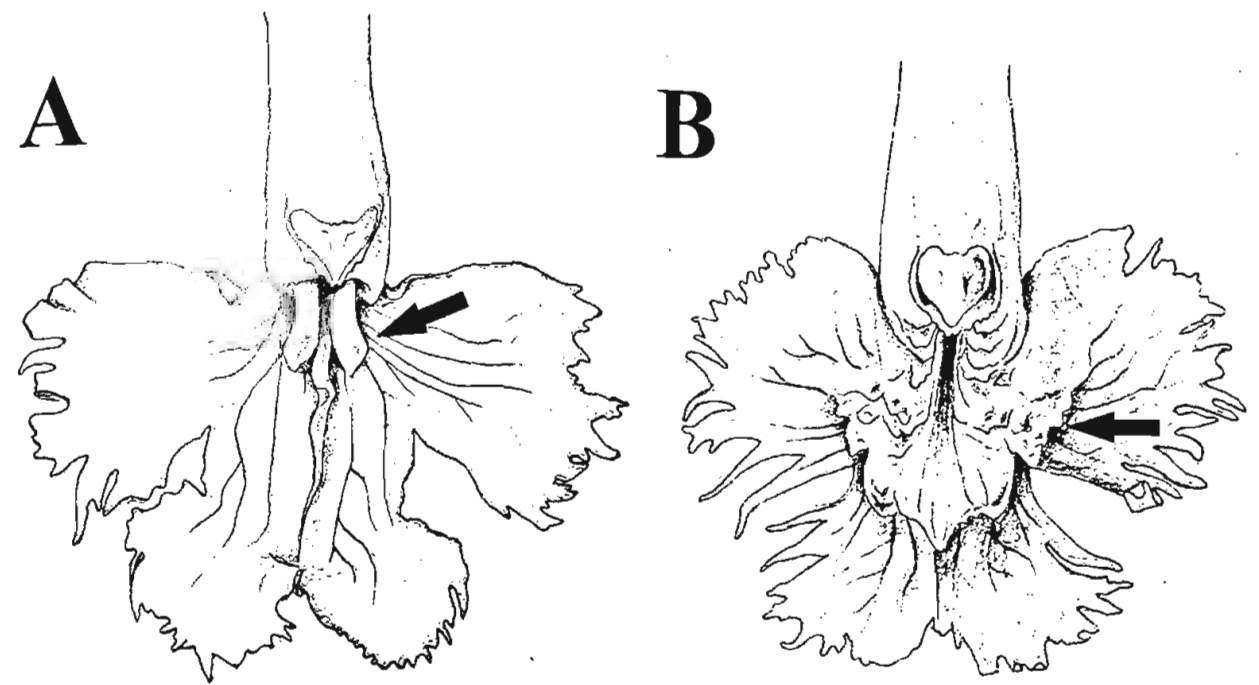


Figura 1: Esquema do labelo mostrando o calo característico, indicado pela seta, dos representantes da subseção *Carinata* (A) e *Tuberculata* (B).



Figura 2: Espécies da subseção *Carinata* utilizadas neste trabalho. A = *E. anceps*; B = *E. campestre*; C = *E. funckii*; D = *E. martianum*; E = *E. cinnabarinum*; F = *E. fulgens*; G = *E. denticulatum*; H = *E. incisum*; I = *E. radicans*; J = *E. myrmecophorum*; K = *E. purpureum*; L = *E. ibaguense*; M = *E. calanthum*. Escala = 1cm.





Figura 3: Indivíduos pertencentes à subseção *Tuberculata*. A = Plantas procedentes do Planalto Brasileiro e Planalto das Guianas; C, D, E = Brasileiro; B = Indivíduos procedentes da Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas; C = Diamantina (MG); D = Espécimes provenientes de populações do Planalto Brasileiro; E = Atibaia (SP); F = *E. xanthinum*; G = Indivíduos com morfologias Caraguatatuba (SP); E = Atibaia (SP); F = *E. xanthinum*; G = Indivíduos com morfologias intermediárias entre espécies da subseção *Carinata*, prováveis híbridos entre *E. secundum* X *E. fulgens* ou *E. secundum* X *E. denticulatum*. Escala = 1 cm, iguais entre os indivíduos de A-E, F e G.

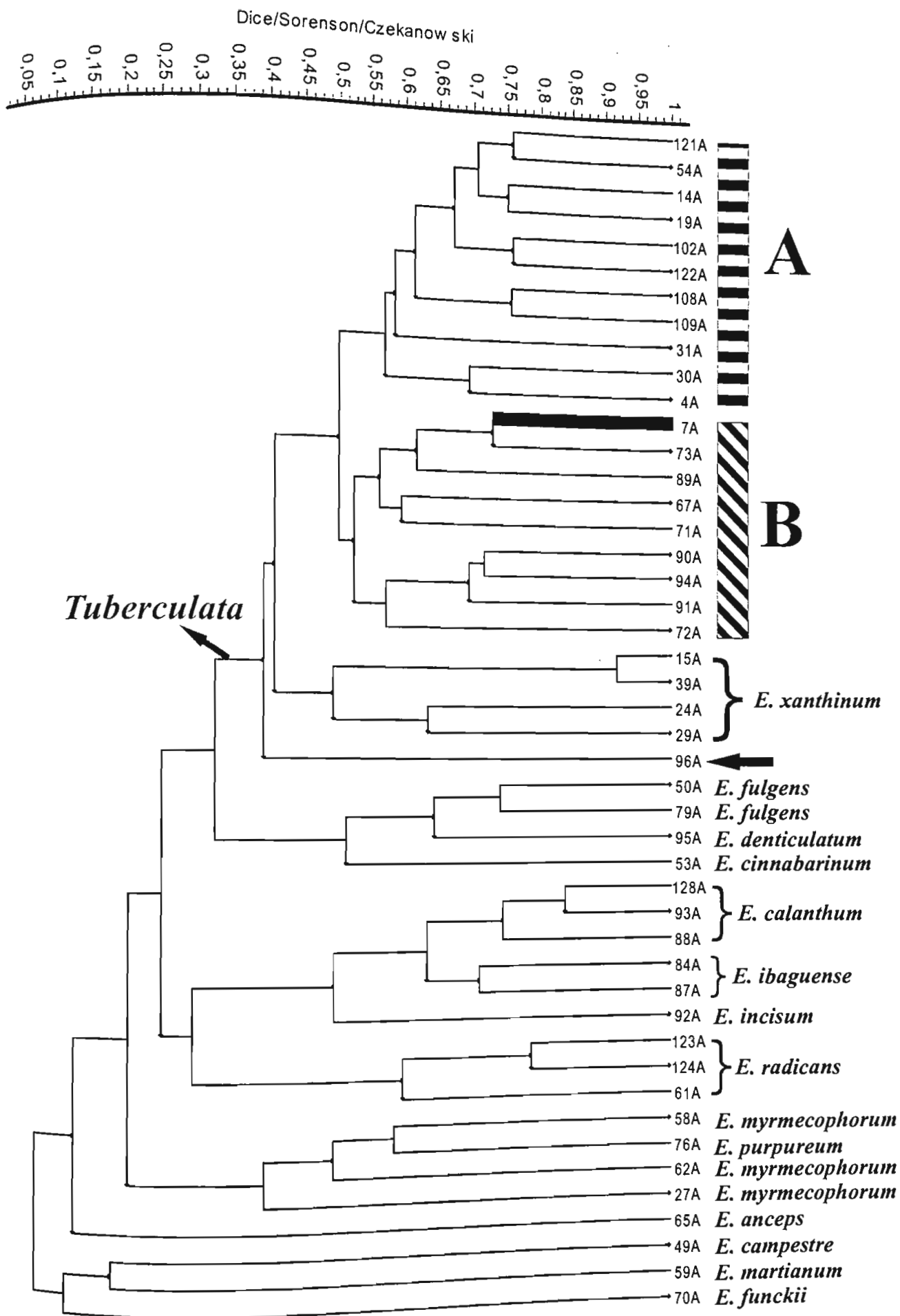


Figura 4: Análise I, com indivíduos das subseções *Carinata* e *Tuberculata*, utilizando UPGMA. A = Plantas procedentes do Planalto Brasileiro; B = Indivíduos procedentes da Cadeia dos Andes e Plantas procedentes do Planalto das Guianas. O terminal sublinhado se refere a um indivíduo procedente do Equador. A seta indica a identificação de cada indivíduo é apresentada nas Tabelas 1 e 2.

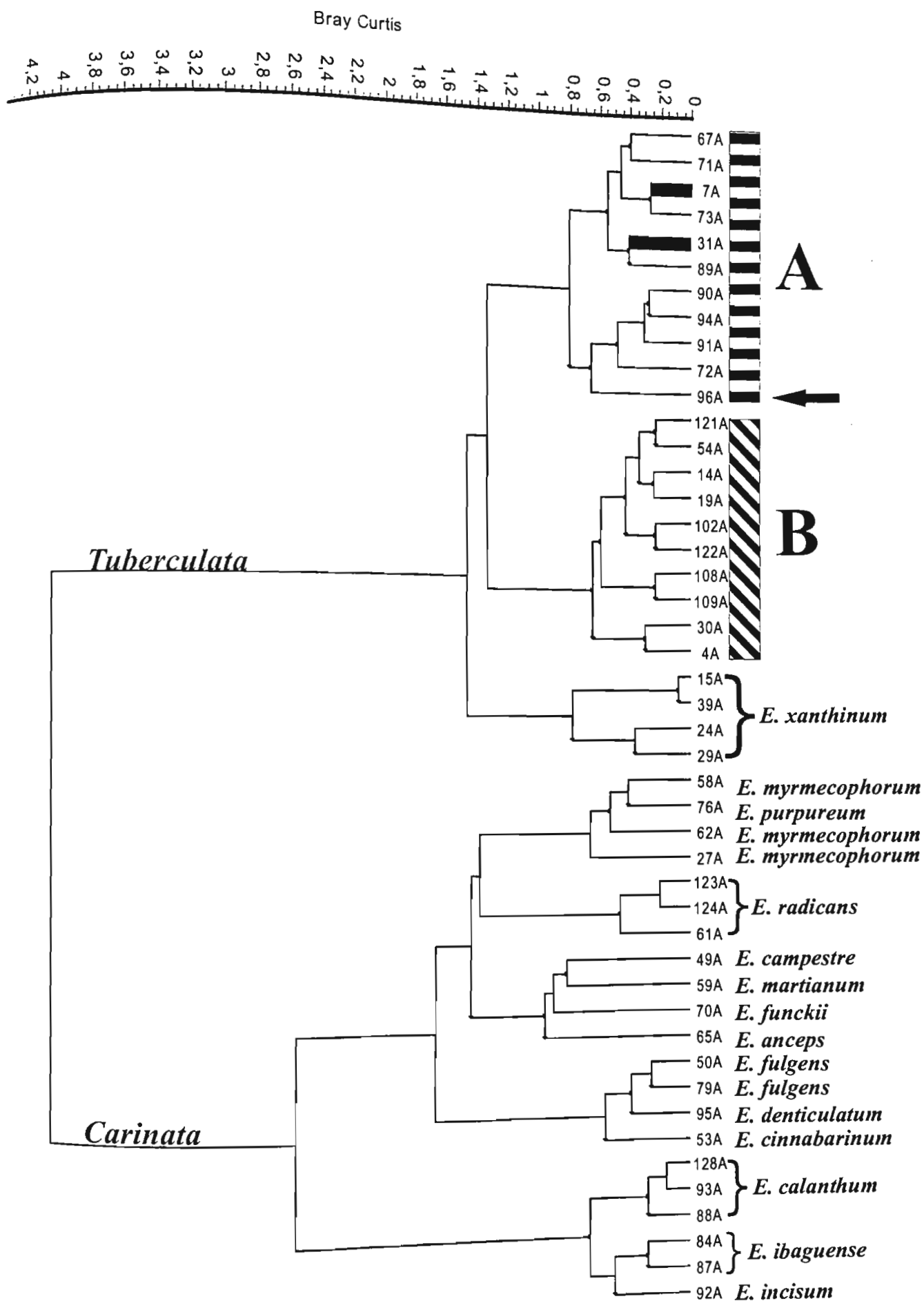


Figura 5: Análise I, com indivíduos das subseções *Carinata* e *Tuberculata*, utilizando o método de Ward. A = Indivíduos procedentes da Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas; B = Plantas procedentes do Planalto Brasileiro. A seta indica um indivíduo procedente do Equador, indicado também na figura 4. Os terminais sublinhados se referem a indivíduos procedentes do Brasil incluídos no grupo de plantas da região andina. A identificação de cada indivíduo é apresentada nas Tabelas 1 e 2.

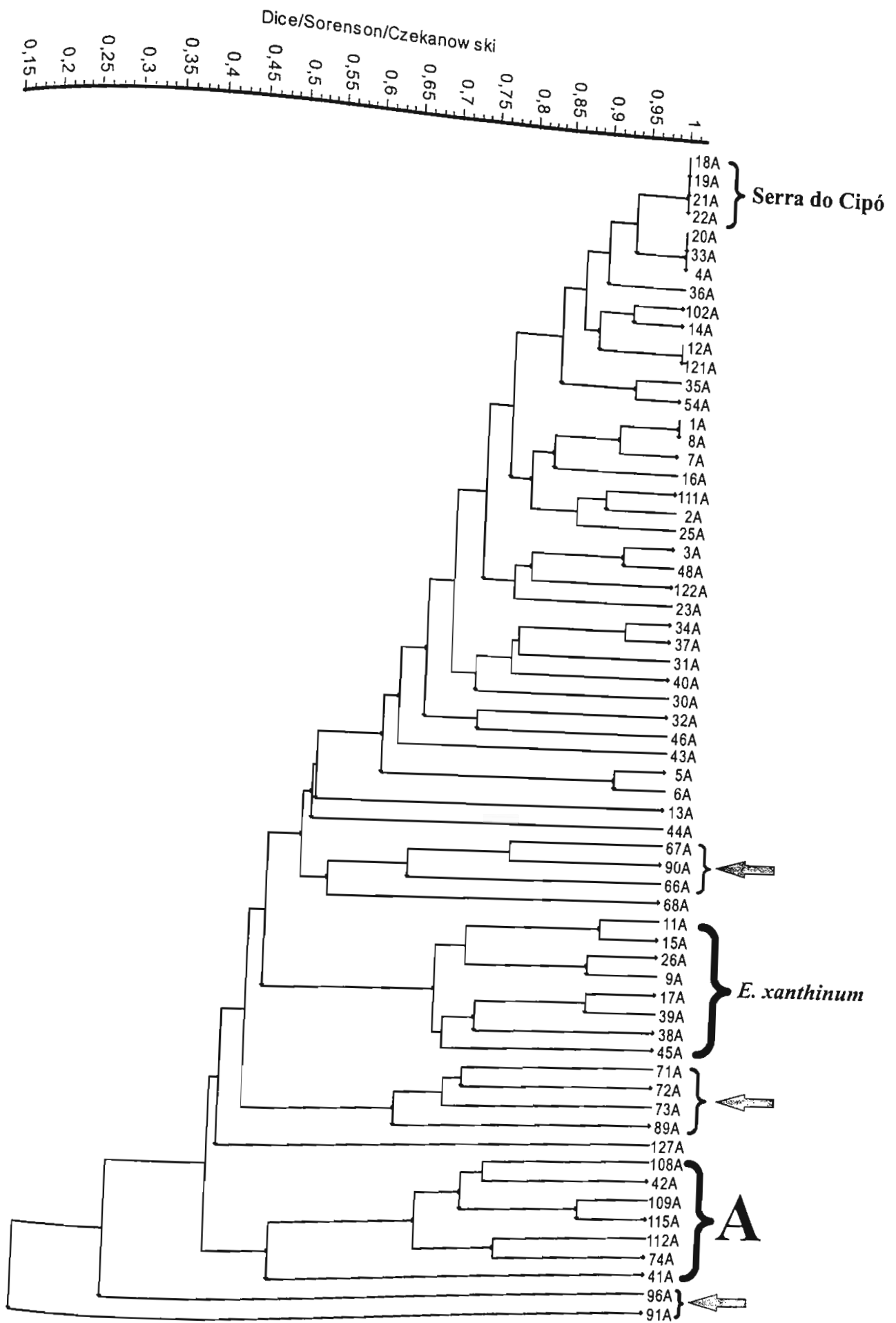


Figura 6: Análise II, apenas com indivíduos da subseção *Tuberculata*, utilizando UPGMA. A = Indivíduos com morfologias intermediárias entre espécies da subseção *Carinata*. As setas = indivíduos procedentes da Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas. A identificação de cada indivíduo é apresentada na Tabela 2.

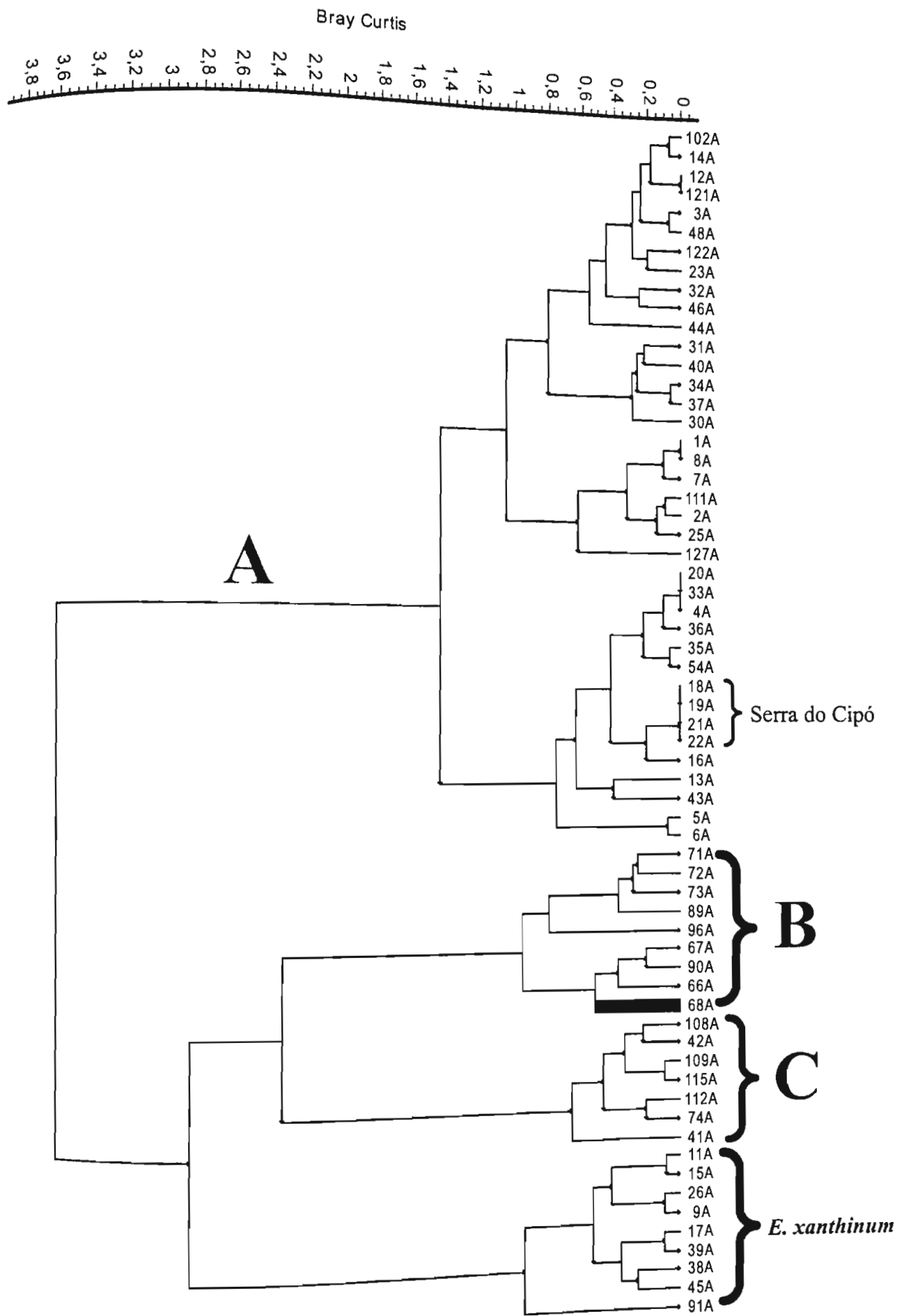


Figura 7: Análise II, apenas com indivíduos da subseção *Tuberculata*, utilizando o método de Ward. A = Indivíduos procedentes do Planalto Brasileiro; B = Plantas procedentes da Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas; C = Indivíduos com morfologias intermediárias entre espécies da subseção *Carinata*. O terminal sublinhado se refere a um indivíduo procedente do Brasil incluído no grupo de plantas da região andina. A identificação de cada indivíduo é apresentada na Tabela 2.

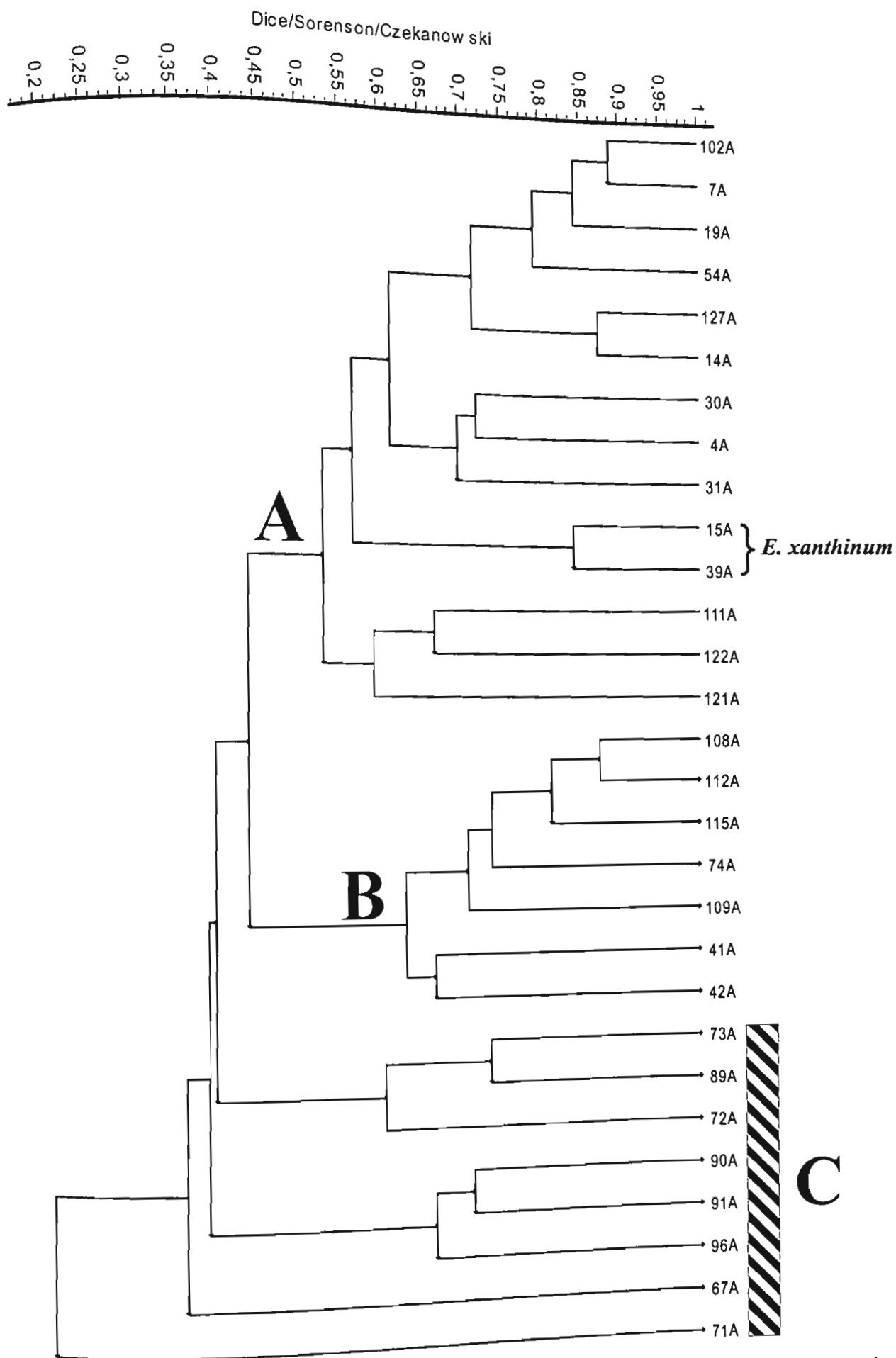


Figura 8: Análise III, apenas com indivíduos da subseção *Tuberculata* que representam extremos de variação morfológica e de distribuição geográfica, utilizando UPGMA. A = Indivíduos procedentes do Planalto Brasileiro; B = Indivíduos com morfologias intermediárias entre espécies da subseção *Carinata*; C = Plantas procedentes da Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas. A identificação de cada indivíduo é apresentada na Tabela 2.

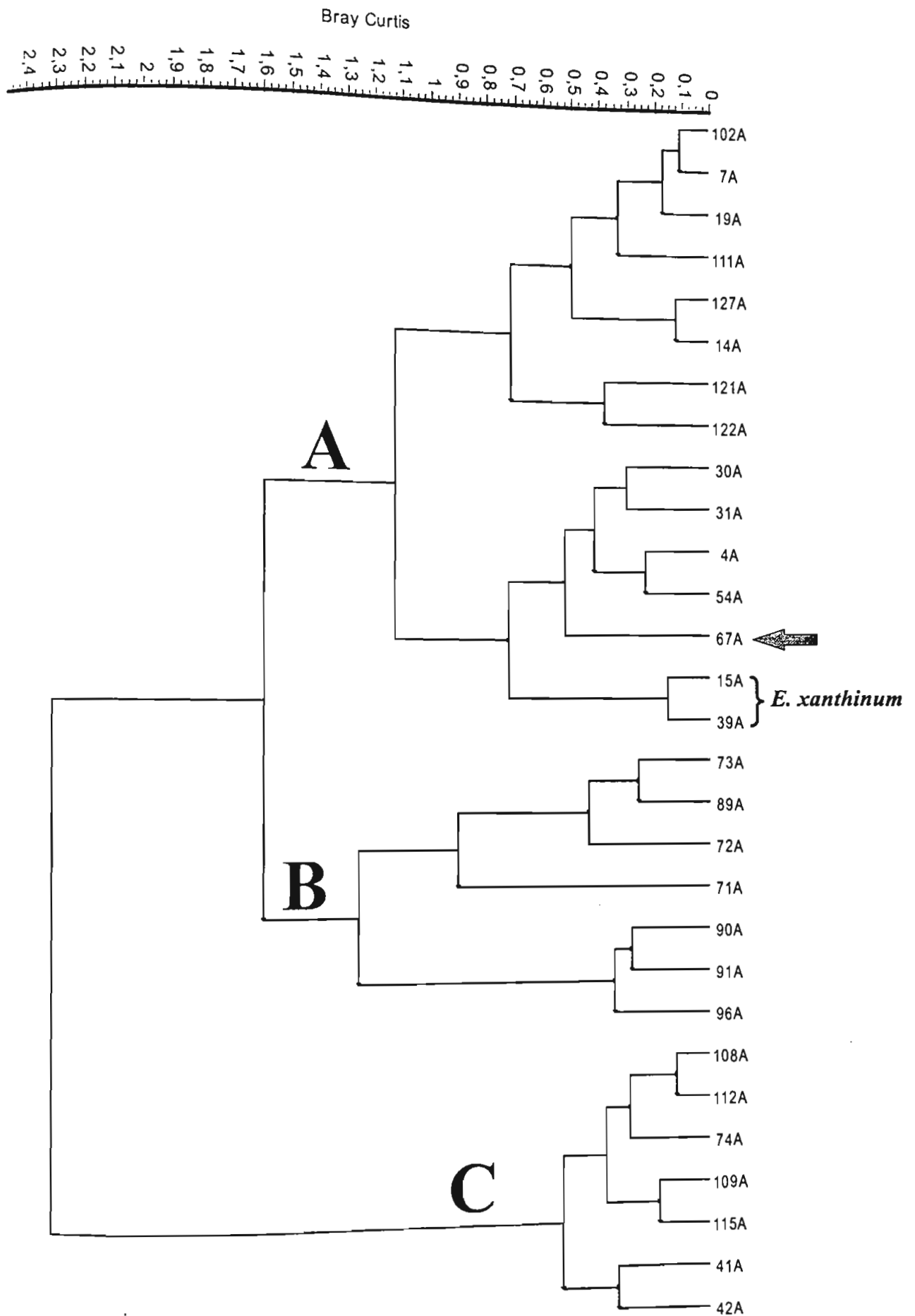


Figura 9: Análise III, apenas com indivíduos da subseção *Tuberculata* que representam extremos de variação morfológica e de distribuição geográfica, utilizando o método de Ward. A = Indivíduos procedentes do Planalto Brasileiro; B = Plantas procedentes da Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas; C = Indivíduos com morfologias intermediárias entre espécies da subseção *Carinata*. A seta indica um indivíduo procedente da região andina incluído no grupo de plantas do Brasil. A identificação de cada indivíduo é apresentada na Tabela 2.

## Capítulo 4

### Análise morfométrica do complexo *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) e espécies afins no Brasil

Fábio Pinheiro<sup>1,2</sup> & Fábio de Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Botânica – Seção de Curadoria do Herbário. <sup>2</sup>Instituto de Biociências, Departamento de Botânica - USP

#### Resumo

*Epidendrum* é um dos maiores gêneros de Orchidaceae e um dos mais variáveis, apresentando diversas dúvidas quanto ao seu posicionamento taxonômico e delimitação de suas espécies, principalmente nas subseções *Carinata* e *Tuberculata*, talvez os grupos mais variáveis e incertos dentro do gênero. O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise morfométrica das espécies integrantes da subseção *Carinata* e de diversas populações do complexo *E. secundum*, pertencente à subseção *Tuberculata*, utilizando técnicas de análise multivariada de agrupamento (UPGMA e Ward) e ordenação (PCA e PCO). Na subseção *Carinata* foi encontrada uma clara descontinuidade morfológica entre as espécies analisadas, apesar da grande variação presente. Entre os indivíduos analisados na subseção *Tuberculata*, não foi possível identificar padrões de agrupamento que possam ser utilizados para delimitar espécies distintas. Foram encontradas apenas tendências de uma maior diferenciação entre indivíduos de flores amarelas e plantas procedentes de afloramentos rochosos. Com base nos caracteres utilizados, é possível reconhecer apenas um táxon neste complexo de espécies: *E. secundum*.

#### Abstract



*Epidendrum* is one of the largest as well as one of the most variable genera of Orchidaceae, presenting many uncertainties regarding its taxonomic position and the boundaries among species, mainly regarding the subsections *Carinata* and *Tuberculata*, which are probably the most variable and complex groups within the genus. The objective of the present work was to perform a morphometric analysis of the species of subsection *Carinata* and some populations of the *E. secundum* complex which belongs to subsection *Tuberculata*. Cluster methods of multivariate analysis (UPGMA and Ward) and ordination (PCA and PCO) were used. Within the subsection *Carinata* a clear morphological discontinuity among species was found, despite the large variation of the species. Among individuals of subsection *Tuberculata*, it was not possible to establish groups which may be used to circumscribe distinct species. Only a tendency of differentiation between individuals with yellow flowers and plants that come from rocky outcrops were found. Based on the characters used, only one taxon can be recognized in this complex: *E. secundum*.

### Introdução

O gênero *Epidendrum* L. é um dos maiores da família Orchidaceae, com cerca de 1125 espécies (Chase *et al.*, 2003) e um dos mais variáveis e problemáticos, já que sua delimitação genérica e a de muitas espécies é duvidosa (Dressler, 1967, 1984; Brieger, 1976-1977; Hágsater, 1993).

Um dos grupos mais variáveis e confusos quanto à delimitação entre suas espécies, a subseção *Tuberculata*, foi caracterizado primeiramente por Lindley (1852-1859), ao criar o subgênero *Amphiglottium*, o qual possui diversas seções, dentre elas a seção *Schistochila*, com as subseções *Tuberculata* e *Carinata*, as quais contêm as espécies de interesse para este trabalho. Cogniaux (1898-1902), ao estudar o gênero na "Flora Brasiliensis", utilizou a classificação de Lindley, reunindo praticamente as mesmas espécies na subseção *Amphiglottidae*. Pabst & Dungs (1975) aceitaram o "grupo" *Amphiglottidae* e subdividiram as espécies em seções. Brieger (1976-1977) repetiu, em grande parte, a classificação de Lindley (1852-1859), considerando a seção *Amphiglottium* e distribuindo as espécies em subseções segundo a morfologia do calo central do disco do labelo: subseção *Carinata*,

com calo em forma de quilha e estendido longitudinalmente pelo disco do labelo, e subseção *Tuberculata*, com calo carnosos, variadamente recortado, geralmente no centro do disco do labelo. Apesar de ter trabalhado com uma amostra reduzida, em termos de número de espécies (*Epidendrum cinnabarinum* Salzm., *E. ibaguense* H.B.K. e *E. secundum* Jacq.), van den Berg (2000) mostrou que essas plantas formam um grupo monofilético.

O "complexo *Epidendrum secundum*" é um dos grupos de espécies mais problemáticos dentro da subseção *Tuberculata* (Brieger, 1976-1977). São plantas extremamente polimorfas e amplamente distribuídas no Brasil. A complexidade do grupo é refletida no grande número de nomes a ele associados, tratados, às vezes como sinônimos de *E. secundum*, às vezes como espécies autônomas (*E. elongatum* Jacq., *E. crassifolium* Lindl., *E. ellipticum* Grah., *E. ansiferum* Rchb. f., *E. versicolor* Hoehne & Schltr., *E. xanthinum* Lindl., entre outras).

Os problemas taxonômicos não estão restritos a este complexo. Na subseção *Carinata* existem espécies que, apesar de não pertencerem ao complexo *E. secundum*, são muito variáveis e de difícil delimitação, como *E. denticulatum* Barb. Rodr., *E. fulgens* Brongn., *E. cinnabarinum*, *E. purpureum* Barb. Rodr., *E. incisum* Vell. e *E. ibaguense* H.B.K.

Há, pelo menos, dois pontos de vista opostos sobre como tratar as variações apresentadas pelas espécies que compõem as subseções em discussão; alguns autores consideram cada variação como uma boa característica para validar uma espécie (Pabst & Dungs, 1975; Brieger, 1976-1977; Sastre, 1990a, 1990b), e outros partem do pressuposto de que as variações fazem parte de uma mesma espécie polimorfa (Dressler, 1989; Dunsterville & Garay, 1961; Garay & Sweet, 1974; Vasquez & Ibsch, 2004). Problemas desse tipo sempre existirão pois o método pelo qual se elegem os caracteres a serem examinados, bem como sua importância relativa nas análises, é muito subjetivo já que se baseia, na maioria das vezes, apenas na observação e experiência do examinador.

É neste ponto que os métodos numéricos, como os de análise multivariada, vêm contribuir para os estudos em taxonomia (*e.g.* Sapir *et al.*, 2002; Marhold *et al.* 2002; Vanderhoeven, 2002), principalmente em Orchidaceae (*e.g.* Vencovsky, 1960; Oliveira, 1970; Martins, 1970; Chacur, 1973; Reinhammar, 1995; van den Berg, 1996; Shaw, 1998).

Sua vantagem, segundo Barros (1998) é a maneira objetiva com que os métodos numéricos tratam os dados, principalmente aqueles que possuem muitas variáveis envolvidas.

A tentativa de agrupar unidades taxonômicas em táxons com base nos seus estados de caráter, utilizando, para isso, métodos numéricos, é o que Sneath & Sokal (1973) denominam "Taxonomia Numérica". Estes métodos são bastante úteis em estudos populacionais e de circunscrição de espécies já que a similaridade total, nestes casos, pode representar traços de ancestralidade comum (Duncan & Baum, 1981). Isso pode ser observado em diversos trabalhos que obtiveram resultados bastante semelhantes utilizando dados morfométricos e dados moleculares (Lihová *et al.*, 2004; Marhold *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2003; Saarela *et al.*, 2003). Métodos de análise multivariada são métodos descritivos, utilizados de maneira exploratória, muito úteis principalmente em conjuntos de dados que não possuem uma estrutura evidente e que dificultam a formulação inicial de hipóteses (James & McCulloch, 1990). A escolha de se trabalhar simultaneamente com mais de um método de ordenação e agrupamento visa assegurar que os resultados obtidos representem, da melhor forma possível, a realidade. Segundo Ingrouille & Pearson (1987) os resultados de análises de agrupamento e ordenação podem validar-se mutuamente pelos seus enfoques divergentes. Vários trabalhos têm optado por utilizar diferentes métodos para discutir seus resultados com maior segurança (Aldasoro *et al.*, 1996; Ingrouille & Pearson, 1987; Loos, 1993; Marhold, 1996; Shaw, 1998), já que resultados semelhantes produzidos por métodos diferentes podem indicar que os resultados são consistentes. A freqüente utilização conjunta desses métodos também reflete as incertezas sobre a escolha do mais adequado (Kent & Ballard, 1988). Por isso a utilização de mais de um método auxilia a investigação de possíveis distorções produzidas por um determinado método individualmente (Everitt, 1978).

O objetivo deste trabalho é realizar uma análise exploratória entre indivíduos do complexo *E. secundum*, pertencentes à subseção *Tuberculata*, e espécies próximas classificadas na subseção *Carinata*, utilizando caracteres morfológicos contínuos, analisados por métodos de análise multivariada, numa tentativa de delimitar e esclarecer as relações de parentesco entre as espécies envolvidas.

## Material e Métodos

Antes de iniciar as análises, os indivíduos utilizados foram posicionados nas subseções *Carinata* e *Tuberculata* de acordo com a morfologia do calo do labelo (Fig. 1), classificação adotada tradicionalmente por diversos autores (Lindley, 1852-1859; Cogniaux, 1898-1902; Brieger, 1976-1977).

Na subseção *Carinata*, a maioria das espécies é constituída de complexos de indivíduos bastante variáveis, assim como ocorre na subseção *Tuberculata*. Devido a essa grande variação, que ocorre tanto na coloração das flores quanto em sua morfologia, foi adotada uma delimitação das espécies num sentido amplo, já que não foi possível, com o material disponível, avaliar se tais variações seriam suficientemente importantes para definirem espécies distintas. A subdivisão aqui proposta foi baseada nas obras de Dunsterville & Garay (1961), Brieger (1976-1977) & Pabst & Dungs (1975) e consta na tabela 1, assim como o número de indivíduos utilizados e sua procedência.

Para a subseção *Tuberculata*, já existem resultados prévios, utilizando morfometria, que indicam não ser possível separar os indivíduos em agrupamentos de espécies distintas (Pinheiro & Barros, em prep.). Por esse motivo, todos os indivíduos utilizados na presente análise foram considerados integrantes de apenas uma mesma espécie - *Epidendrum secundum* Jacq. -, e foram separados apenas segundo o tipo de coloração da flor (Tab. 2), visando cruzar as informações entre os dados quantitativos (morfométricos) e qualitativos (cor das flores). Os indivíduos utilizados no presente trabalho são diferentes daqueles utilizados no trabalho de Pinheiro & Barros (em prep.), principalmente quanto à procedência, que abrange a maior parte das regiões em que o grupo ocorre no Brasil, e à coloração das flores, que inclui as mais diversas tonalidades encontradas nas populações naturais amostradas. A procedência dos indivíduos utilizados bem como a cor de suas flores, constam na tabela 2.

Tanto indivíduos que representaram extremos de variação como indivíduos semelhantes mas de procedências distintas, foram fotografados (Figs. 2-9) para que a coloração das flores e sua morfologia fossem registradas para uma análise em conjunto com os dados de morfometria. Também foram fotografados, no Orquidário do Departamento de Genética da ESALQ - USP, híbridos artificiais interespecíficos primários entre diversas

espécies da subseção *Carinata* e da subseção *Tuberculata*, produzidos pelo Dr. F.G. Brieger (Fig. 10).

Os indivíduos utilizados para tomada das medidas estavam depositados nas coleções vivas do Orquidário do Instituto de Botânica, no Orquidário do Departamento de Genética da ESALQ - USP e em algumas coleções particulares, nas quais considerou-se que a procedência dos indivíduos era confiável (Tabs. 1 e 2). Foram coletados indivíduos de algumas populações naturais das quais não havia representantes nessas coleções vivas (Tabs. 1 e 2).

Foram selecionadas três flores por indivíduo, sempre aquelas de maiores dimensões, as quais foram conservadas em álcool 70% para posterior tomada de medidas em laboratório. Foram utilizados 16 caracteres florais, relacionados na tabela 3. As medidas foram tomadas nas regiões onde a caráter apresentava maior dimensão. Dos valores obtidos, de três flores em cada indivíduo, foi calculada a média aritmética, que correspondeu ao valor final utilizado nas análises multivariadas. Através do acompanhamento de exemplares em cultivo no Orquidário do Instituto de Botânica, foi possível notar que as medidas das estruturas vegetativas, como caule e folhas, variam com o tipo de ambiente em que a planta cresce. Por isso, caracteres vegetativos não foram utilizados neste trabalho.

As análises multivariadas foram realizadas utilizando dois métodos de agrupamento, UPGMA e Ward, e dois métodos de ordenação, PCA e PCO.

Nas análises de agrupamento foi utilizado o coeficiente de distância euclidiana e, em PCO, foi utilizado o coeficiente de distância Manhattan. Nas análises de agrupamento foi obtida a Correlação Cofenética (Tab. 4), que é uma medida da distorção dos agrupamentos em relação à matriz de distâncias original (Sneath & Sokal, 1973). Valores entre 0,7 e 0,9 indicam boa representação da matriz de distâncias no agrupamento (Shepherd, 1994).

Nas análises de ordenação, os três primeiros autovalores foram calculados e constam na tabela 5. Valores elevados nos primeiros eixos de uma ordenação são bons indicadores da análise pois revelam que a maior parte da variação foi resumida em poucos componentes, sendo possível sua representação gráfica em 2 ou 3 dimensões (James & McCulloch, 1990)

Antes de iniciar as análises, os dados quantitativos foram estandardizados para que todos os caracteres tivessem o mesmo peso.

Foram realizadas análises, de agrupamento e ordenação, envolvendo:

1. os indivíduos das duas subseções conjuntamente, para verificar a separação ou não dos indivíduos em agrupamentos que correspondessem às subseções;
2. indivíduos da subseção *Carinata*, para verificar a relação morfológica entre as espécies utilizadas;
3. indivíduos da subseção *Tuberculata*, para tentar identificar agrupamentos ou variações contínuas entre os indivíduos, além de verificar a relação dessas variações com a coloração das flores e a procedência dos indivíduos;
4. indivíduos da subseção *Tuberculata* juntamente com indivíduos de *E. denticulatum* Barb. Rodr. (pertencentes à subseção *Carinata*) já que, apesar das diferenças marcantes na morfologia do calo do labelo, esta espécie ainda é bastante confundida com os integrantes do complexo *E. secundum*.

Para realizar as análises multivariadas foram utilizados os softwares Fitopac (Shepherd, 1996) e PC ORD (McCune & Mefford, 1999).

Os registros em herbário de espécies da subseção *Carinata* no Brasil e, da subseção *Tuberculata* para a América do Sul como um todo, foram feitos nos herbários SP, SPF, UEC, R, HB e RB (Anexo 1). Com base nesses materiais, na procedência das plantas em cultivo nos Orquidários do Instituto de Botânica e no Departamento de Genética da ESALQ - USP, e dados de literatura (Dunsterville & Garay, 1961; Dunsterville, 1979; Garay & Sweet, 1974), foram elaborados mapas de distribuição geográfica para as espécies analisadas (Figs. 11, 12, 13). Para facilitar a visualização dos grupos envolvidos, foram confeccionados três mapas:

1. Mapa indicando a distribuição de *E. cinnabarinum*, *E. denticulatum* e *E. fulgens* (Fig. 11);
2. Mapa indicando a distribuição de indivíduos do complexo *E. secundum* com flores lilases na América do Sul (Fig. 12);
3. Mapa indicando a distribuição de indivíduos do complexo *E. secundum* com flores amarelas, vermelhas e brancas no Brasil (Fig. 13).

## Resultados

Através das fotografias, foi possível notar que todas as espécies envolvidas incluem indivíduos bastante variáveis, tanto na coloração das flores como na morfologia (Figs. 2 - 9). Nas flores dos indivíduos híbridos, produzidos pelo Dr. F.G. Brieger, resultantes do cruzamento entre espécies de ambas as subseções, é possível notar uma grande variação de formas e cores (Fig. 10).

Nos indivíduos que compõem a subseção *Tuberculata*, a variação morfológica dos indivíduos ocorre de maneira independente da sua distribuição geográfica (Figs. 8 e 9). Indivíduos com morfologias bastante semelhantes ocorrem em populações completamente disjuntas (Fig. 8, A e B / C e D / E e F / G e H / I e J / K e L), enquanto formas bastante distintas podem ser encontradas numa mesma população (Fig. 8, M, N, O, e P / Q, R, S e T / U, V, W e X). Quanto à cor, apesar da subdivisão realizada (Tab. 2), nota-se uma variação quase contínua entre as tonalidades (Fig. 9).

Apesar das diferenças nos valores de correlação cofenética entre as análises de UPGMA e Ward (Tab. 4), os resultados revelaram-se bastante semelhantes (Figs. 14 - 21).

Nas análises de agrupamento envolvendo indivíduos de ambas subseções (Figs. 14 e 15) não é possível individualizar as subseções em agrupamentos distintos. Indivíduos de ambas as subseções ocupam posições variadas, em várias regiões dos dendrogramas (Figs. 14 e 15). Indivíduos da subseção *Tuberculata* também aparecem dispersos em vários pontos do dendrograma (Figs. 14 e 15).

Analisando somente a subseção *Carinata* (Figs. 16 e 17), é possível notar que indivíduos de uma mesma espécie formam agrupamentos entre si, revelando uma descontinuidade morfológica entre as espécies analisadas. Ou seja, o método confirmou as espécies previamente aceitas. As posições de algumas espécies diferem em certos aspectos quando se comparam as análises utilizando UPGMA e Ward (Figs. 16 e 17).

Dentro da subseção *Tuberculata*, notam-se dois agrupamentos interessantes. Um deles reúne indivíduos de flores amarelas, coletados em Santa Bárbara, na Serra da Caraça (MG), e o outro agrupa plantas de flores lilases coletadas em afloramentos rochosos, tanto em campos rupestres (Cadeia do Espinhaço) como em inselbergs (Pedra Grande, Atibaia-

SP). Os demais indivíduos distribuem-se pelo dendrograma sem apresentar uma relação aparente com a coloração das flores ou a origem geográfica das plantas (Figs. 18 e 19).

A inclusão de indivíduos de *E. denticulatum* na análise da subseção *Tuberculata* mostra um agrupamento distinto separando *E. denticulatum* dos indivíduos pertencentes à subseção *Tuberculata* (Figs. 20 e 21).

Nas análises de ordenação, foram utilizados apenas os dois primeiros autovalores, tanto em PCA como em PCO, pois estes mostraram valores bastante elevados em relação ao terceiro autovalor (Tab. 5). Assim como nas análises de agrupamento, PCA e PCO mostraram resultados muito similares (Figs. 22 - 29).

Nas análises envolvendo indivíduos de ambas as subseções, não é possível reconhecer uma separação entre indivíduos da subseção *Carinata* e indivíduos da subseção *Tuberculata* (Figs. 22 e 23). A maior parte deles encontra-se dispersa pelo gráfico, com sobreposições evidentes de indivíduos das duas subseções e agrupamentos de indivíduos de uma mesma subseção em posições opostas (Figs. 22 e 23).

Dentro da subseção *Carinata*, pode-se notar uma separação evidente entre as espécies consideradas (Figs. 24 e 25). Em *E. cinnabarinum*, ocorre uma subdivisão entre os indivíduos, não relacionada com a procedência nem com qualquer aspecto morfológico evidente, o mesmo ocorrendo com alguns indivíduos em *E. denticulatum* (Figs. 24 e 25).

Na subseção *Tuberculata* ocorre uma descontinuidade marcante entre indivíduos de flores amarelas provenientes de Santa Bárbara, Serra do Caraça (MG) e o restante dos indivíduos (Figs. 26 e 27). Estes últimos distribuem-se de maneira contínua pelo gráfico, não exibindo qualquer tipo de padrão relacionado à coloração das flores ou à procedência. Um dos extremos dessa variação contínua engloba indivíduos de flores lilases procedentes de afloramentos rochosos: campos rupestres da Cadeia do Espinhaço e inselbergs, como o da pedra Grande em Atibaia (SP) (Figs. 26 e 27).

A inclusão de indivíduos de *E. denticulatum* nas análises da subseção *Tuberculata* revelou uma descontinuidade entre indivíduos de ambas as subseções, com a formação de um agrupamento que separa os indivíduos de *E. denticulatum* dos demais (Figs. 28 e 29).

*E. cinnabarinum* ocorre apenas na região Nordeste do Brasil, de maneira contínua na vegetação de restinga e, com algumas ocorrências no interior, tanto em áreas de caatinga, em inselbergs, como em campo rupestre, na Chapada Diamantina (Fig. 11).

*E. denticulatum* apresenta uma distribuição geográfica bastante interessante, ocorrendo de maneira disjunta em duas grandes áreas. A primeira corresponde à vegetação de restinga desde o Sul da Bahia até o município do Rio de Janeiro (RJ), com uma ocorrência pontual mais ao Sul, em Bertioga (SP) (Fig. 11). A segunda corresponde às áreas de cerrado do Sul de Minas Gerais e São Paulo (Fig. 11). Nos dois casos, a planta cresce sobre substrato bastante arenoso.

*E. fulgens* ocorre exclusivamente em restingas, desde Parati (RJ) até o litoral do Rio Grande do Sul, crescendo sobre rochas ou diretamente na areia. No Rio Grande do Sul também ocorre em alguns afloramentos rochosos do interior, como em Porto Alegre.

Indivíduos do complexo *E. secundum* ocorrem de maneira disjunta em quatro grandes regiões (Fig. 12). A primeira corresponde ao Planalto das Guianas, principalmente nos "tepuis", sobre rochas ou no interior de matas de porte baixo (Fig. 12). A segunda corresponde à Cordilheira dos Andes, na face Oriental, desde a Venezuela até a Bolívia, em áreas bastante úmidas com vegetação de porte baixo ou rasteiro (Fig. 12). A terceira região, apesar de ser mais restrita que as demais, é bastante importante devido ao seu isolamento, e corresponde às Pequenas Antilhas, nas ilhas de maior altitude de origem vulcânica (não representadas nos mapas). A quarta região corresponde ao Planalto Brasileiro (Fig. 12), onde a espécie pode ser encontrada principalmente nos campos rupestres, inselbergs e brejos de altitude. O limite de ocorrência, ao Norte, é a Serra do Baturité, em Maranguape (CE). Ocorre também na faixa de Mata Atlântica desde as serras do Espírito Santo indo, em direção Sul, até Santa Catarina, sempre em vegetação de altitude ao longo da serra do mar. No Planalto Brasileiro as ocorrências mais a Oeste situam-se em Alto Paraíso (GO) e Dourados (MS). É bastante comum nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, em inselbergs e serras altas tanto sob o domínio da caatinga como aquelas situadas mais ao Sul, como a Serra dos Órgãos (RJ), Serra da Mantiqueira (SP), Serra de Paranapiacaba (SP) e Serra do Rio do Rastro (SC). Em todos os casos, ocorre em regiões de altitude, no interior de matas nebulares ou em áreas abertas, sobre rochas. Existem poucos registros de ocorrências ao nível do mar, em paredões e barrancos em áreas de restinga. Indivíduos com flores lilases são muito mais abundantes que indivíduos com flores de outras colorações (Figs. 12 e 13). Indivíduos com flores vermelhas, amarelas e brancas ocorrem de maneira

pontual, em poucos locais ao longo da ampla distribuição do grupo como um todo (Fig. 13).

## Discussão

Com base nos resultados obtidos até o momento, não foi possível distinguir grupos morfológicamente distintos dentro do complexo *E. secundum*. Com exceção da população de flores amarelas na Serra da Caraça, que forma um grupo distinto dos demais, e dos indivíduos provenientes de afloramentos rochosos, que exibem uma tendência de maior diferenciação (Figs. 18, 19, 26, 27), os demais indivíduos distribuem-se de maneira contínua nas análises, não sendo possível estabelecer relações com a cor das flores ou a procedência dos indivíduos.

A extensa distribuição do grupo pode ser um fator importante para a variação encontrada (Figs. 12 e 13). O grupo pode ser encontrado em diversos tipos de ambientes, crescendo como epífita, sobre o solo ou como rupícola, tanto no interior de matas como em ambientes abertos. Estes diversos tipos de ambiente podem estar oferecendo recursos diferentes, que impõem pressão seletiva diferenciada em cada hábitat, já que podem ser interpretadas como novas oportunidades ecológicas (Wright, 1982). A presença de tais pressões diferenciadas pode levar os indivíduos de um mesmo local a ocupar picos adaptativos distintos sem, no entanto, promover eventos de especiação, já que isto depende da persistência destas condições diferenciadas (Avice & Wollenberg, 1997). A divergência entre sub-populações pode ser bastante grande quando está envolvida seleção disruptiva (ocupação de diferentes picos adaptativos), desde que as diferenças no habitat sejam previsíveis (Templeton, 1981). Variações ambientais transitórias favorecem a existência de uma única espécie bastante generalista (Templeton, 1981).

*Dactylorhiza* Nevski talvez seja o gênero em Orchidaceae com a maior quantidade de estudos populacionais em níveis inter e intra-específico (Bateman & Denholm, 1983, 1985, 1988, 1989; Hedrén, 1996a, 1996b, 1996c, 1996d; Hedrén *et al.* 2001). É um grupo com ampla distribuição geográfica e grande variação morfológica. A existência de diversas populações que exibem caracteres intermediários entre espécies a priori distintas é um dos

pontos de maior controvérsia na taxonomia do grupo, pois esses prováveis eventos de hibridização provocam também introgressão nas populações das espécies parentais (Bateman & Denholm, 1989; Hedrén *et al.*, 2001). O fluxo gênico, aqui, possui papel fundamental na difusão dessa variação, que também é acompanhada por variações no cariótipo, tornando bastante complexa a tarefa de identificar as espécies.

A relação entre ampla variação morfológica e extensa distribuição geográfica também é comum em outros grupos vegetais, como mostrado nos trabalhos de Fritsch & Lucas (2000), Kephart *et al.* (1999), Lihová *et al.* (2004), Saarela *et al.* (2003) e Sapir *et al.* (2002), nos quais a dificuldade em se estabelecer descontinuidades morfológicas fica evidente nas análises de morfometria realizadas pelos autores.

A população amostrada em Nova Friburgo (RJ) é uma das mais variáveis e complexas, seja morfológicamente, seja na coloração das flores (Figs. 8D e J, 9A, B, C, E, F, H e K), pois indivíduos com flores das mais variadas tonalidades são encontrados crescendo lado a lado. No Pico do Itambé (MG) e na Serra da Caraça (MG), esse fato também foi observado, apesar de, nas análises, os indivíduos com flores amarelas desta última localidade terem se isolado bastante (Figs. 18, 19, 26, 27). Este fato também é observado em outras regiões como Venezuela (Dunsterville, 1979) e Peru (F. Rivadavia, com. pess.). Populações com flores de diversas cores e tonalidades intermediárias podem ser uma indicação da ocorrência de intenso fluxo gênico entre elas, apesar das diferenças apresentadas pelos indivíduos. Pansarin (2000) verificou que os polinizadores do grupo (espécies de Lepidoptera) podem visitar diferentes espécies, promovendo, inclusive, eventos de hibridização. É possível observar, na figura 10, a grande variação que foi produzida nas flores de indivíduos híbridos. Apesar desses híbridos terem sido obtidos artificialmente, algo semelhante pode estar ocorrendo nas populações naturais, uma vez que as diferentes espécies envolvidas possuem zonas de sobreposição em sua distribuição geográfica (Figs. 11, 12, 13), onde eventos de hibridização podem ocorrer, já que o agente polinizador pode ser compartilhado.

A população de flores amarelas da Serra da Caraça é encontrada apenas no topo dos picos (a população amostrada foi coletada no Pico do Sol). Indivíduos com flores lilases são encontrados desde as regiões mais baixas da serra até o alto, entrando em contato com indivíduos de flores amarelas. Nessa região de contato, foram observados indivíduos com

flores alaranjadas. Porém, somente os indivíduos de flores amarelas exibem uma descontinuidade morfológica marcante, podendo representar uma espécie distinta.

Nas análises, a tendência ao agrupamento apresentada pelos indivíduos de afloramentos rochosos (Figs. 18, 19, 26, 27) não pode ser interpretada como consequência de fatores ambientais pois, as flores utilizadas foram coletadas tanto de indivíduos em ambientes naturais como em cultivo. As características morfológicas quantitativas mantiveram-se nos indivíduos em cultivo. Por outro lado, vários indivíduos provenientes de afloramentos rochosos ocuparam posições diferentes nas análises. Tal variação pode ser observada nas populações naturais, como a da Pedra Grande (SP), onde ocorrem indivíduos de pequeno porte, crescendo sobre rochas a pleno sol, e plantas com porte maior, crescendo sombreadas por arbustos. Pode existir uma grande variação genética entre indivíduos de uma mesma população, já que os diferentes micro-ambientes podem representar diferentes oportunidades ecológicas, agindo sobre os indivíduos como pressões seletivas distintas (Wright, 1982).

Os dados de morfometria não sustentam a existência de subseções distintas (Figs. 14, 15, 22, 23). Porém, no presente trabalho, espécies bastante diferentes foram incluídas numa mesma análise, procedimento que não é recomendado por alguns autores (Duncan & Baum, 1981; Jensen, 2003), já que os resultados obtidos podem ser distorcidos pela grande disparidade morfológica.

As espécies consideradas como pertencentes à subseção *Carinata* revelaram grande descontinuidade morfológica nas análises realizadas (Figs. 16, 17, 24, 25), apesar da grande variação exibida por cada uma isoladamente (Figs. 2 -7). Muitas delas, devido à grande variação exibida, possuem seus próprios "complexos", já que a delimitação das espécies é bastante confusa (Dressler, 1989; Dunsterville & Garay, 1961). Os padrões observados na subseção *Carinata* podem ser importantes para a interpretação da variação observada na subseção *Tuberculata*. Conhecer a maneira como as espécies estão delimitadas na subseção *Carinata* poderá auxiliar na delimitação das espécies da subseção *Tuberculata*.

*E. denticulatum*, pertencente à subseção *Carinata*, é uma espécie bastante confundida com indivíduos integrantes do complexo *E. secundum*, da subseção *Tuberculata*. Em registros de herbário, são encontrados diversas exsicatas identificadas de maneira equivocada. Uma análise mais precisa das procedências e ambientes de onde as

plantas provêm (Figs. 11, 12, 13) revela que não foram encontradas, até o momento, localidades onde a ocorrência de *E. denticulatum* se sobreponha à de indivíduos do complexo *E. secundum*. Os dois grupos ocorrem em tipos de vegetação bastante diferentes, porém existem locais onde o fluxo gênico seria possível, como no município do Rio de Janeiro (RJ), onde *E. denticulatum* ocorre nas restingas, ao nível do mar, e plantas do complexo *E. secundum* crescem em afloramentos no litoral, como Corcovado e Pedra da Gávea (Anexo 1). Nas análises realizadas, *E. denticulatum* apresentou uma significativa descontinuidade morfológica em relação aos indivíduos do complexo *E. secundum*, não existindo evidências, no presente trabalho, de possíveis híbridos entre eles.

Tabela 1: Espécies, procedência e número de indivíduos utilizados da subseção *Carinata*. \* = Proveniente de cultivo; \*\* = Proveniente de ambiente natural.

Espécie	Número de indivíduos	Procedência
<i>E. fulgens</i> Brongn.	38	Cananéia, Ilha do Cardoso (SP)**
<i>E. radicans</i> Pavón ex Lindl.	3	Serra Pacaraima (RR)*
<i>E. ibaguense</i> H.B.K.	12	Serra Pacaraima (RR)*
<i>E. cinnabarinum</i> Salzm.	5	Rio Grande do Norte *
	2	Camocim de São Félix (PE)*
	1	Porto Seguro (BA)*
<i>E. calanthum</i> Rchb.f. & Warsc.	2	Serra Pacaraima (RR)*
<i>E. denticulatum</i> Barb. Rodr.	2	Espírito Santo **
	2	Mogi-Guaçú (SP)*
	5	Itirapina (SP)**
	1	Delfinópolis (MG)*
	2	São Gonçalo do Rio Abaixo (MG)*
	14	Araruama (RJ)**
<b>Total</b>	<b>89</b>	

Tabela 2: Coloração da flor, procedência e número de indivíduos utilizados da subseção *Tuberculata*. \* = Coletada em cultivo; \*\* = Coletada em ambiente natural.

Coloração da flor	Número de indivíduos	Procedência
lilás	1	Alto Paraíso (GO)*
	1	Congonhas do Norte (MG)*
	1	Mariana (MG)*
	1	Pedra Azul (MG)*
	4	Santa Bárbara, Serra da Caraça (MG)**
	4	Santana do Riacho (MG)*
	1	Santo Antônio do Itambé (MG)**
	1	São Tomé das Letras (MG)*
	2	Diamantina (MG)*
	1	Paraíba *
	1	Guaíra (PR)*
	6	Nova Friburgo (RJ)**
	10	Atibaia, Pedra Grande (SP)*
	1	Biritiba Mirim (SP)*
	1	Botucatu (SP)*
	1	Caraguatatuba (SP)*
	1	Mairinque (SP)*
	3	Pindamonhangaba (SP)*
	5	Salesópolis (SP)**
	2	Santo André (SP)*
6	São Bernardo do Campo (SP)*	
1	São Paulo (SP)*	
vermelha ou laranja	1	Ubatuba (SP)*
	2	Dourados (MS)*
	4	Santa Bárbara, Serra da Caraça (MG)**
	3	Santo Antônio do Itambé (MG)**
	2	São Tomé das Letras (MG)*
	4	Nova Friburgo (RJ)**
	1	Santo André (SP)*
	3	São Sebastião (SP)*
amarela ou creme	8	Santa Bárbara, Serra da Caraça (MG)**
	6	Nova Friburgo (RJ)**
	1	Santo André (SP)*
branca	5	Santo André (SP)*
	1	Santo André (SP)*
<b>Total</b>	<b>95</b>	

Tabela 3: Caracteres utilizados nas análises multivariadas de agrupamento e ordenação.

Caráter
1. Comprimento do pedicelo
2. Comprimento da sépala dorsal
3. Largura da sépala dorsal
4. Comprimento da sépala lateral
5. Largura da sépala lateral
6. Comprimento da pétala
7. Largura da pétala
8. Comprimento do labelo
9. Largura do labelo
10. Comprimento da coluna
11. Comprimento dos lobos laterais do labelo
12. Largura dos lobos laterais do labelo
13. Comprimento do lobo central do labelo
14. Largura do lobo central do labelo
15. Comprimento do calo do labelo
16. Largura do calo do labelo



Tabela 4: Correlação cofenética das análises de agrupamento realizadas. A – envolvendo todos os indivíduos; B – envolvendo apenas a subseção *Carinata*; C - envolvendo apenas a subseção *Tuberculata*; D – envolvendo a subseção *Tuberculata* e indivíduos de *E. denticulatum*.

Indivíduos envolvidos	UPGMA	Ward
A	0,72	0,5
B	0,83	0,7
C	0,74	0,6
D	0,73	0,54

Tabela 5: Autovalores das análises de ordenação realizadas. Em PCA, os valores são expressos em porcentagem. A – envolvendo todos os indivíduos; B – envolvendo apenas a subseção *Carinata*; C - envolvendo apenas a subseção *Tuberculata*; D – envolvendo a subseção *Tuberculata* e indivíduos de *E. denticulatum*.

Indivíduos envolvidos	Autovalores de PCA			Autovalores de PCO		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
A	57,8	15,3	7,2	24397	5244	2852
B	53	26,8	8,3	10923	4690	1552
C	69,7	10,5	4,6	14559	1694	624
D	59,5	14	8	16336	3201	1801

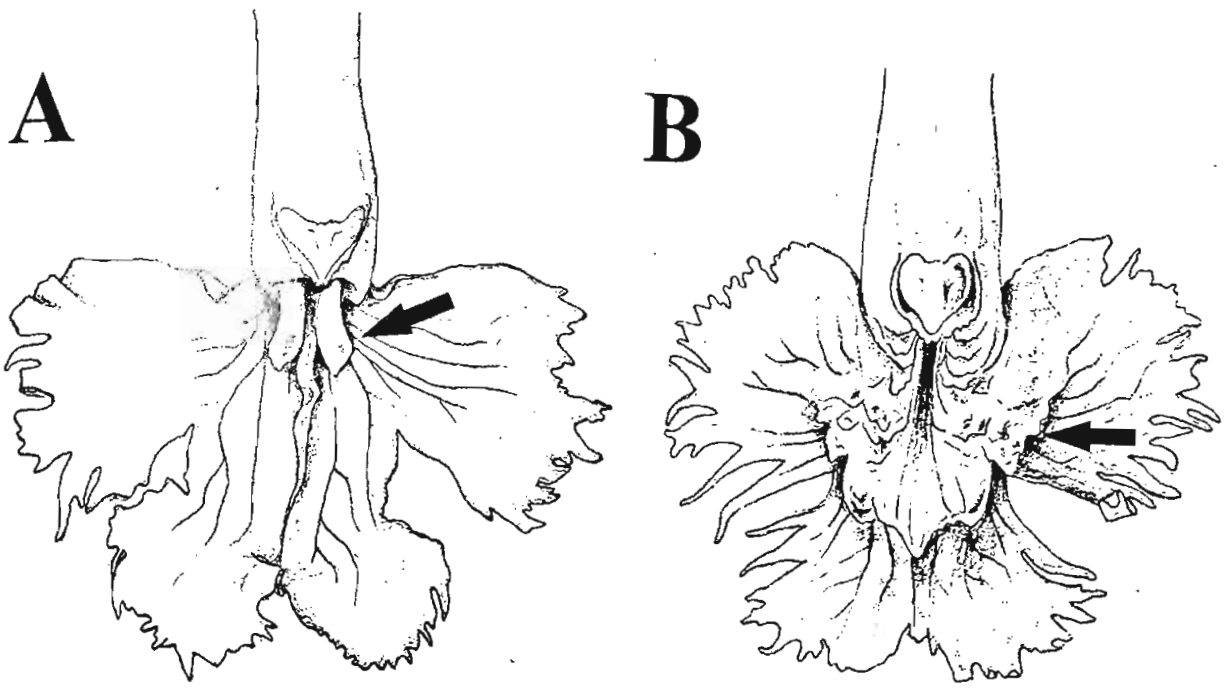


Figura 1: Esquema do labelo mostrando o calo característico, indicado pela seta, dos representantes da subseção *Carinata* (A) e *Tuberculata* (B).

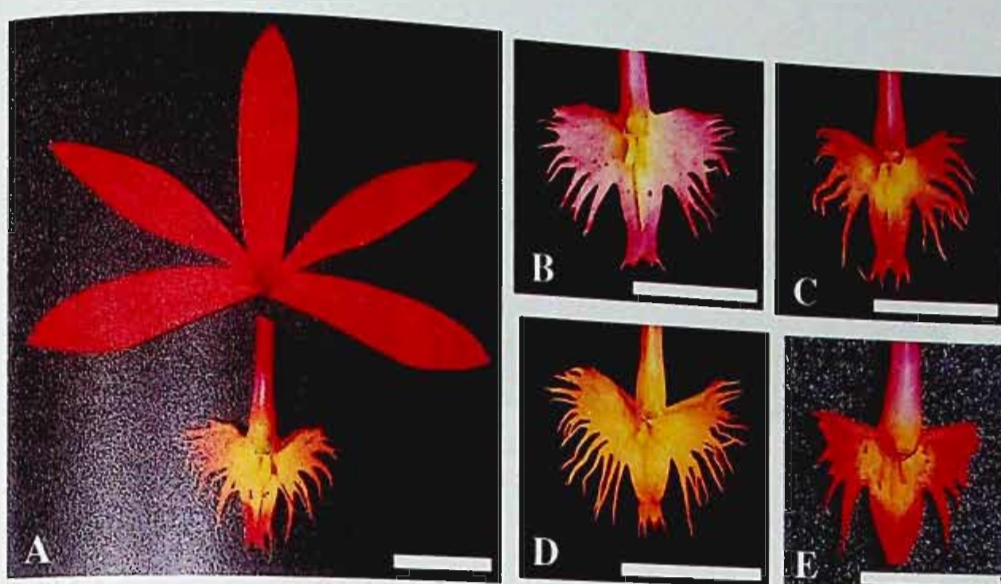


Figura 2: Variação floral em *E. cinnabarinum*. Procedência: A - Camocim de São Félix (PE); B, C e D - Rio Grande do Norte; E - Pernambuco. Escala = 1 cm.



Figura 3: Variação floral em *E. denticulatum*. Procedência dos indivíduos, da esquerda para direita: Itirapina (SP); Mogi-Guaçu (SP); São Gonçalo do Rio Abaixo (MG); Araruama (RJ). Escala=1 cm.



Figura 4: Variação floral em *E. fulgens*. Procedência: Cananéia, Ilha do Cardoso (SP). Escala=1 cm.



Figura 5: Variação floral em *E. calanthum*. Procedência: Serra Pacaraima (RR). Escala=1 cm.



Figura 6: Variação floral em *E. ibaguense*. Procedência: Serra Pacaraima (RR). Escala=1 cm.



Figura 7: *E. radicans*. Procedência: México. Escala=1 cm.



Figura 8: Variação floral no complexo *E. secundum*, em indivíduos de flores lilases. A - Itararé (SP); B - Pedra Azul (MG); C - Sto. Antônio do Itambé (MG); D - Nova Friburgo (RJ); E - Paraíba; F - Santa Catarina; G - Botucatu (SP); H - Pico das Almas (BA); I - Itararé (SP); J - Nova Friburgo (RJ); K - Alto Paraíso (GO); L - Mucugê (BA); M, N, O, P - Diamantina (MG); Q, R, S, T - Santo André (SP); U, V, W, X - Caraguatatuba (SP). Escala = 1 cm.

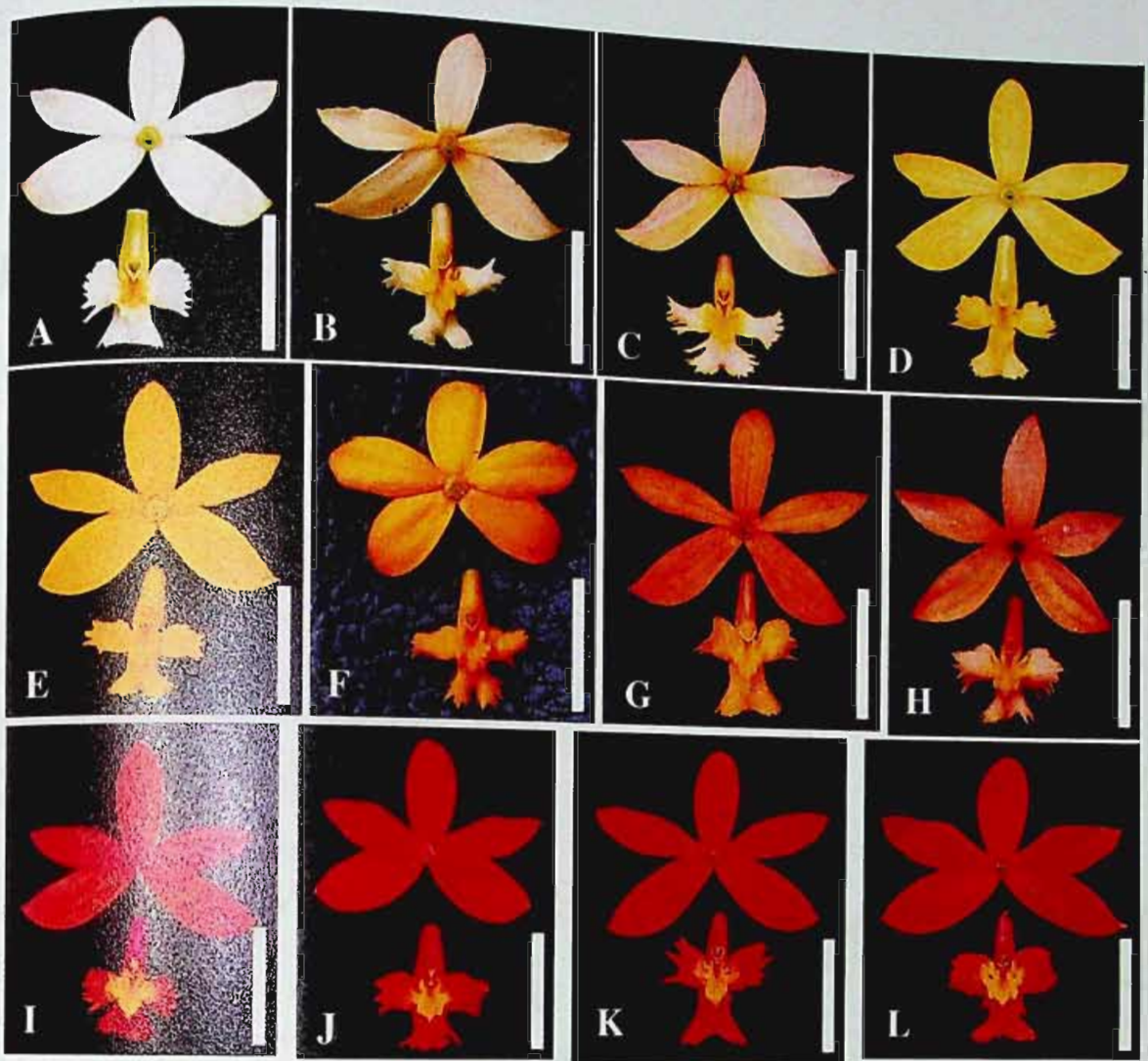


Figura 9: Variação floral no complexo *E. secundum*, em indivíduos de flores brancas, vermelhas e amarelas. A, B, C, E, F, H, K-Nova Friburgo (RJ); D, I-Santo André (SP); G-Vieira Machado (ES); J-Dourados (MS); L-São Tomé das Letras (MG). Escala=1 cm.

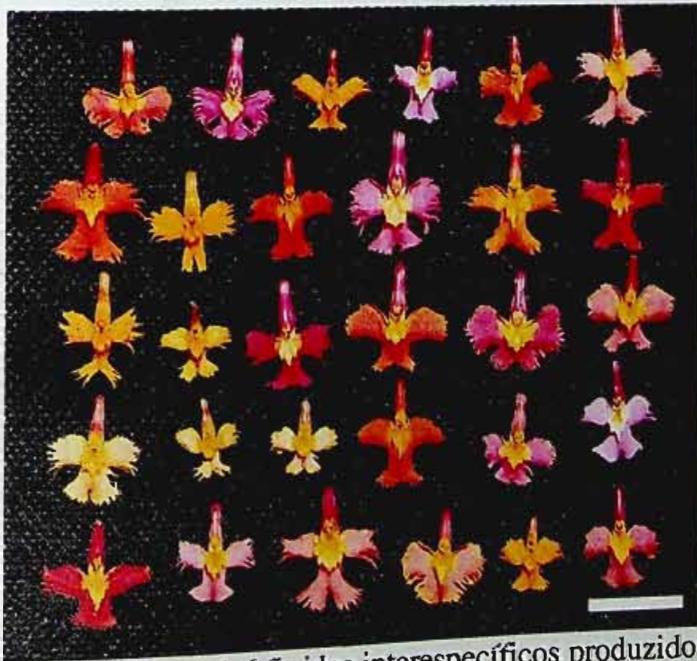


Figura 10: Labelo e coluna de híbridos interespecíficos produzidos por F.G. Brieger, em cultivo no Orquidário do Departamento de Genética da ESALQ. Escala=1 cm.

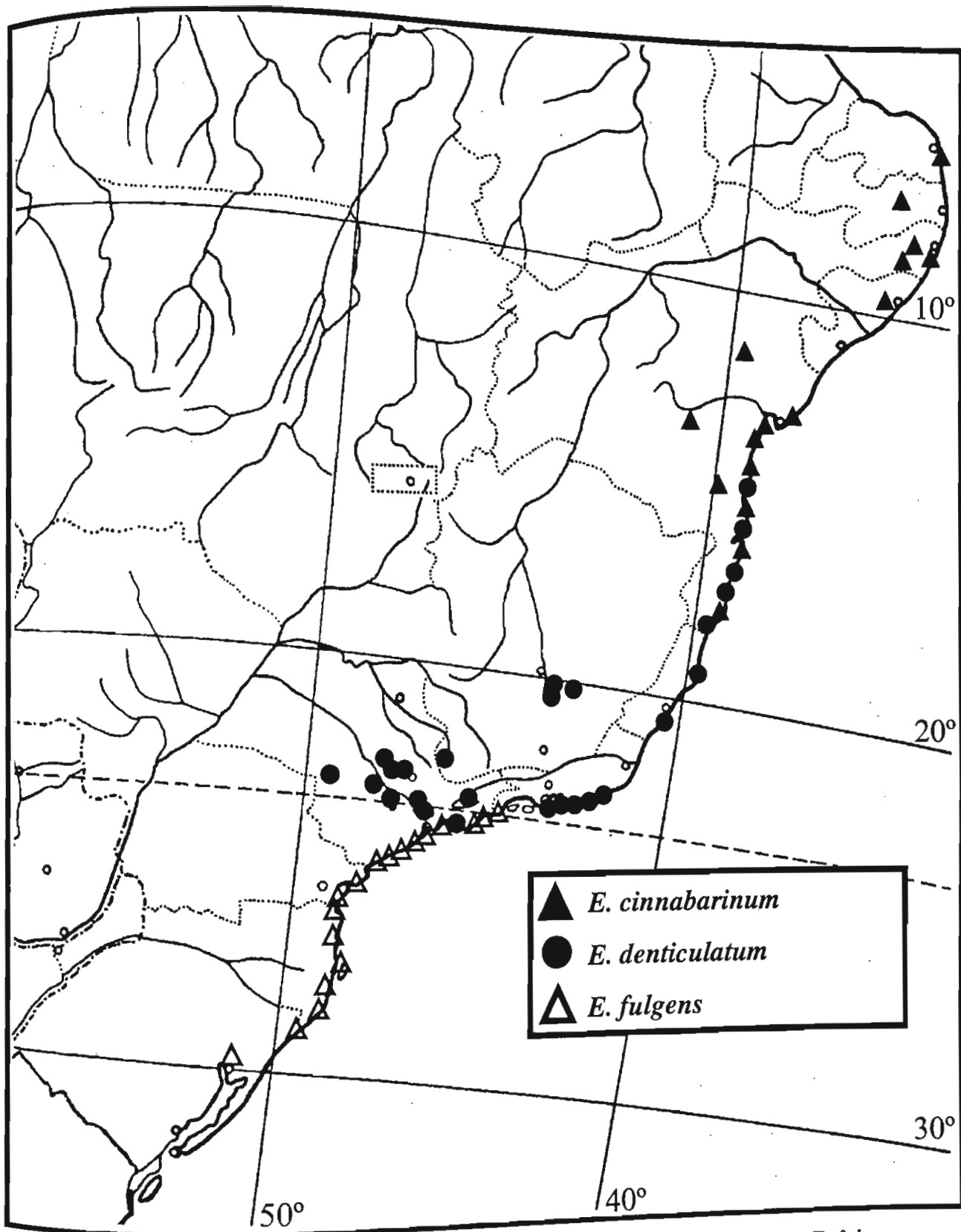


Figura 11: Distribuição geográfica de *E. cinnabarinum*, *E. denticulatum* e *E. fulgens*.

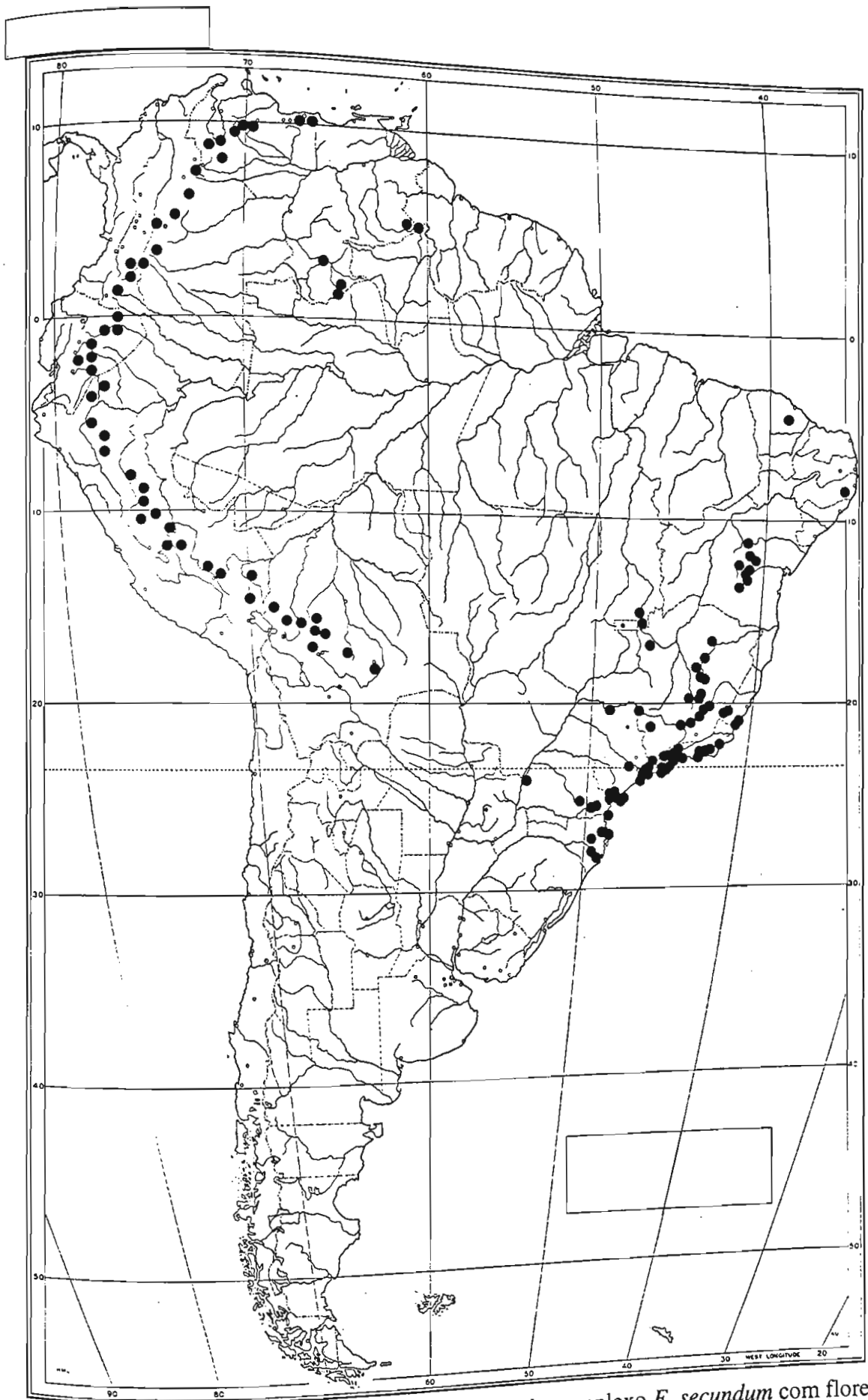


Figura 12: Distribuição geográfica de indivíduos do complexo *E. secundum* com flores lilases.



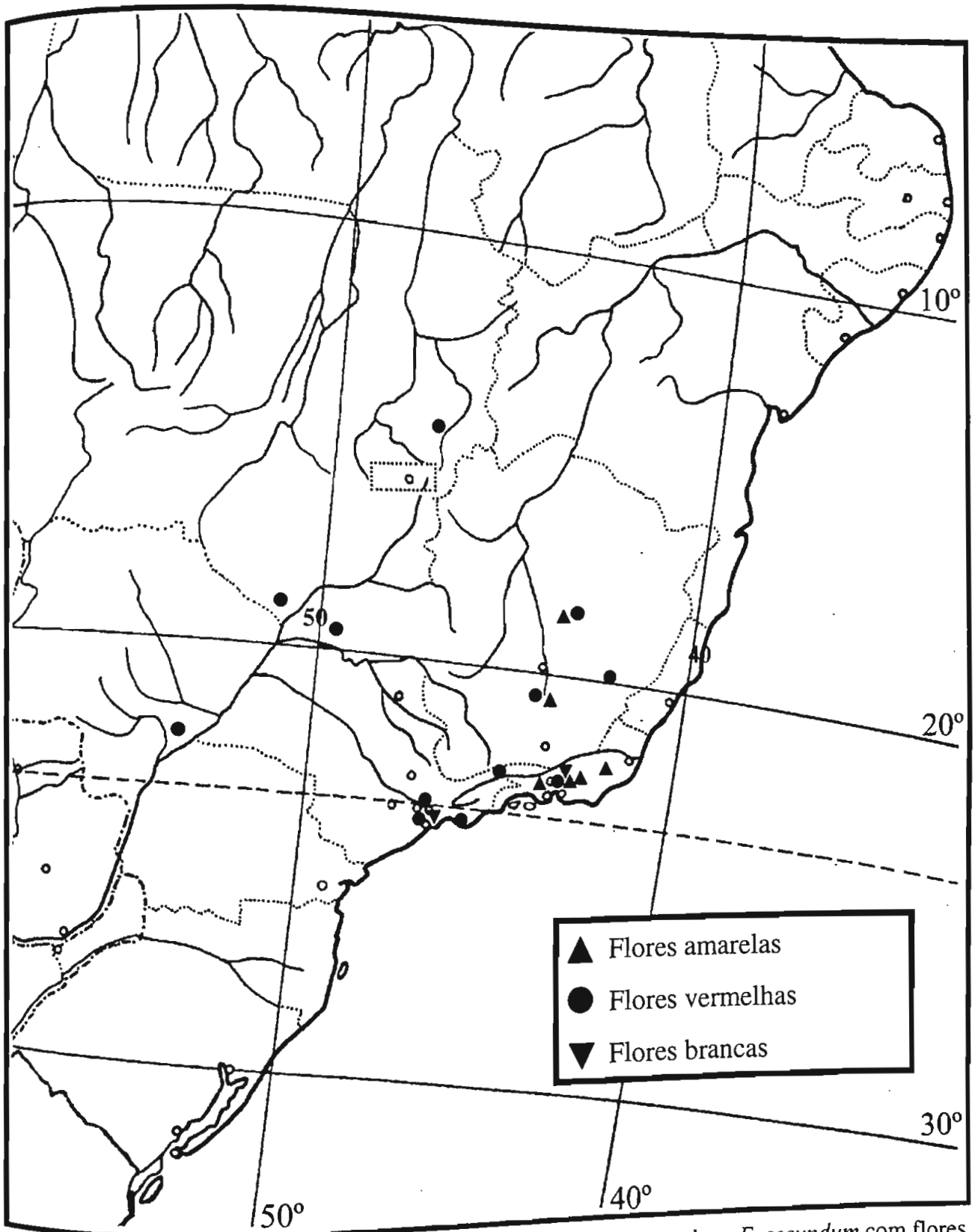


Figura 13: Distribuição geográfica, no Brasil, de indivíduos do complexo *E. secundum* com flores amarelas, vermelhas e brancas.

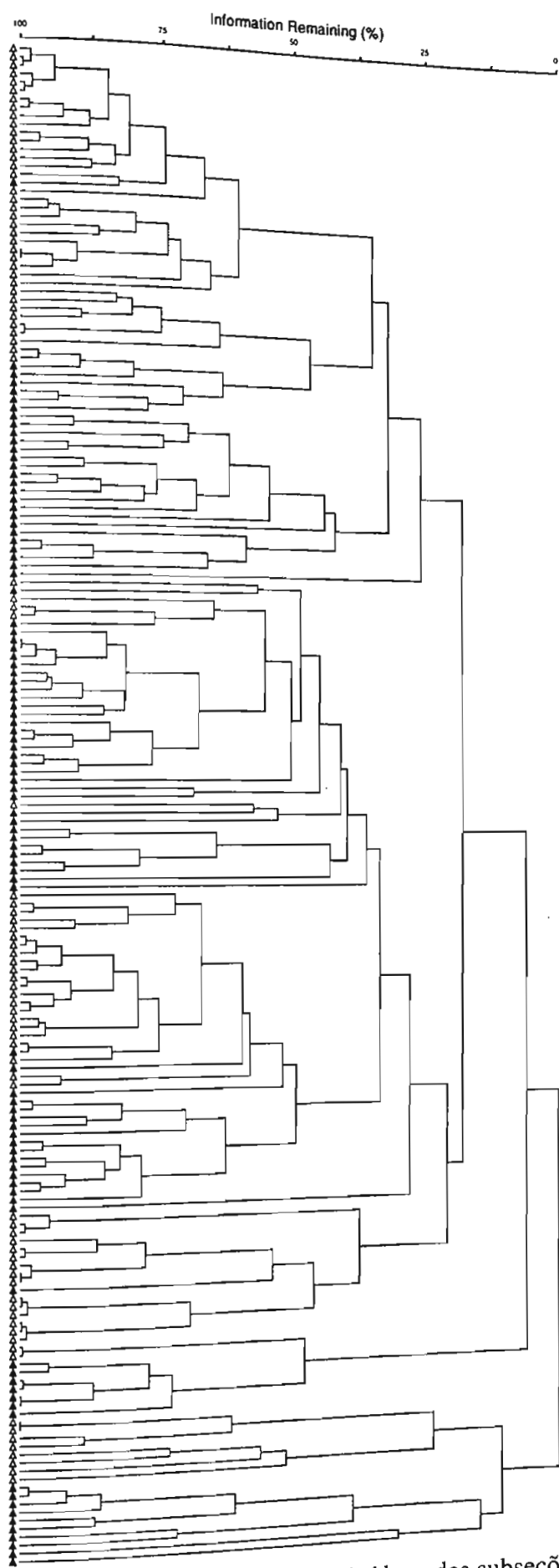


Figura 14: Análise utilizando UPGMA de indivíduos das subseções *Tuberculata* (▲) e *Carinata* (△).

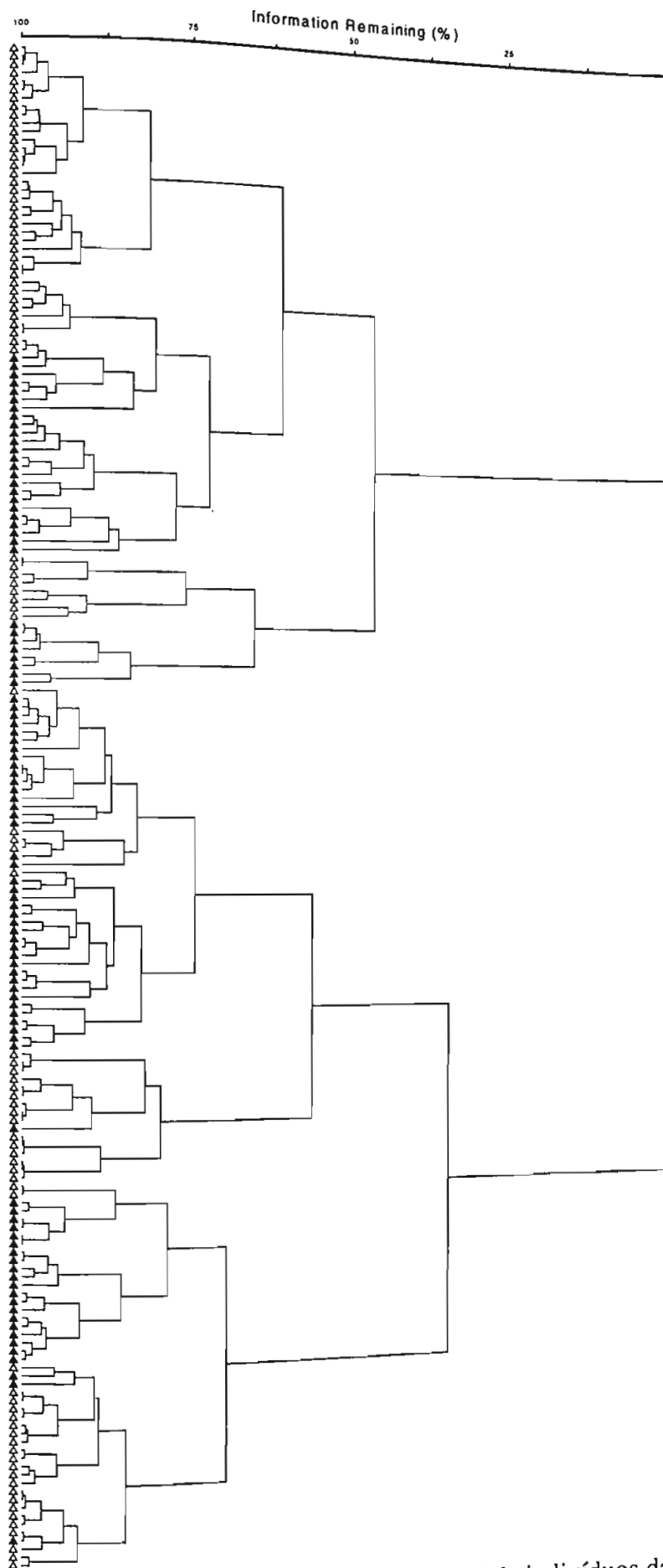


Figura 15: Análise utilizando o método de Ward de indivíduos das subseções *Tuberculata* (▲) e *Carinata* (Δ).

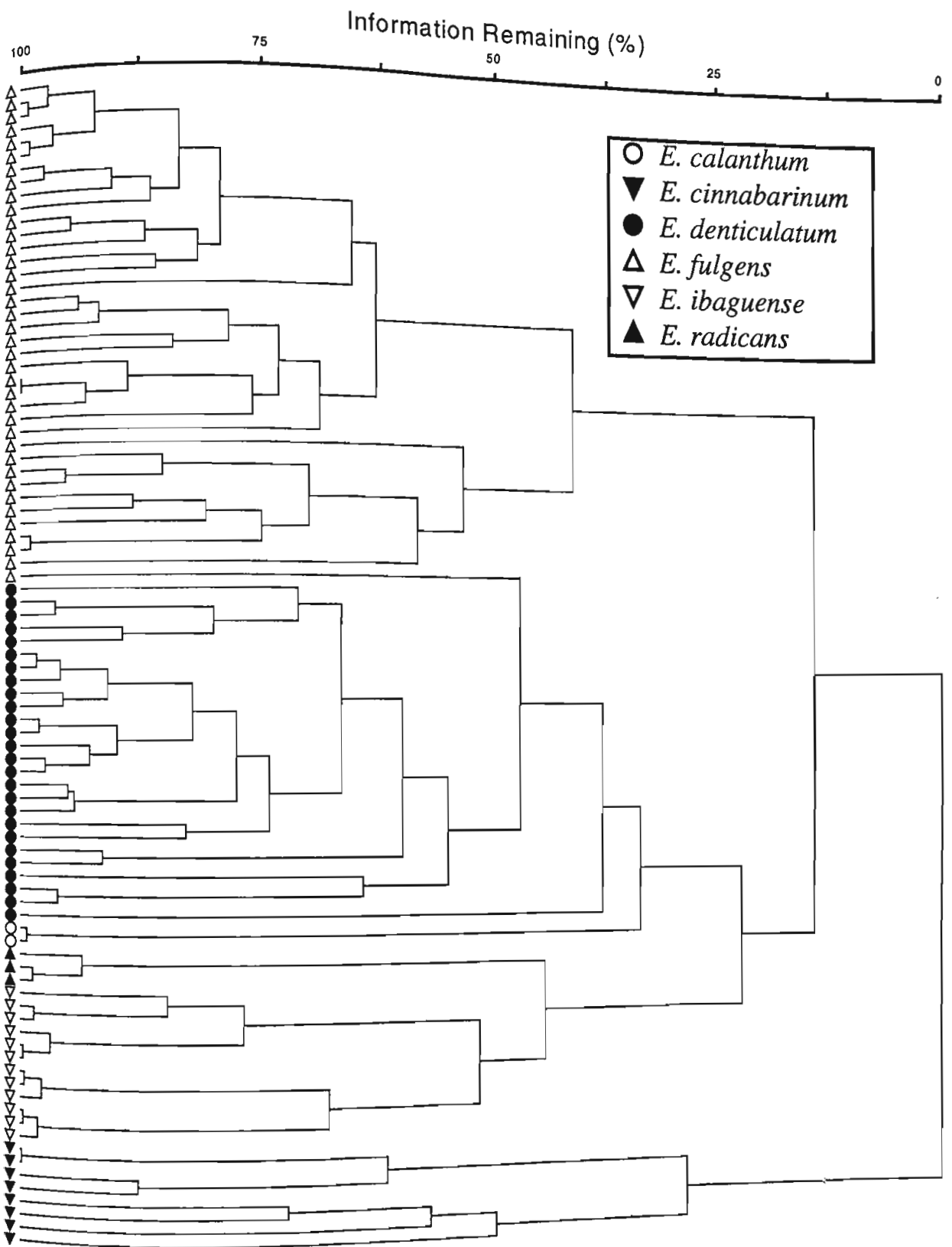


Figura 16: Análise utilizando UPGMA de espécies da subseção *Carinata*.

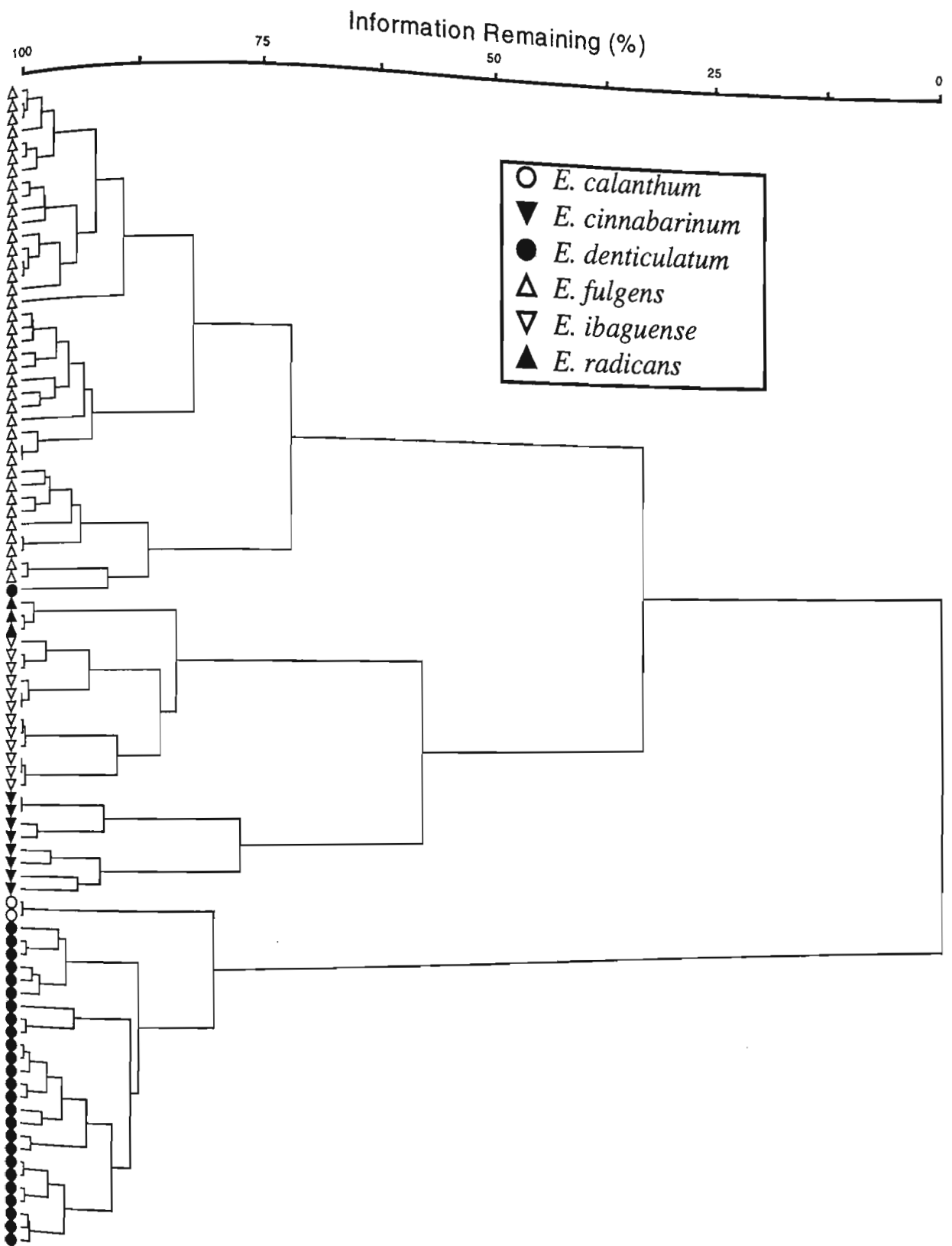


Figura 17: Análise utilizando o método de Ward de espécies da subseção *Carinata*.

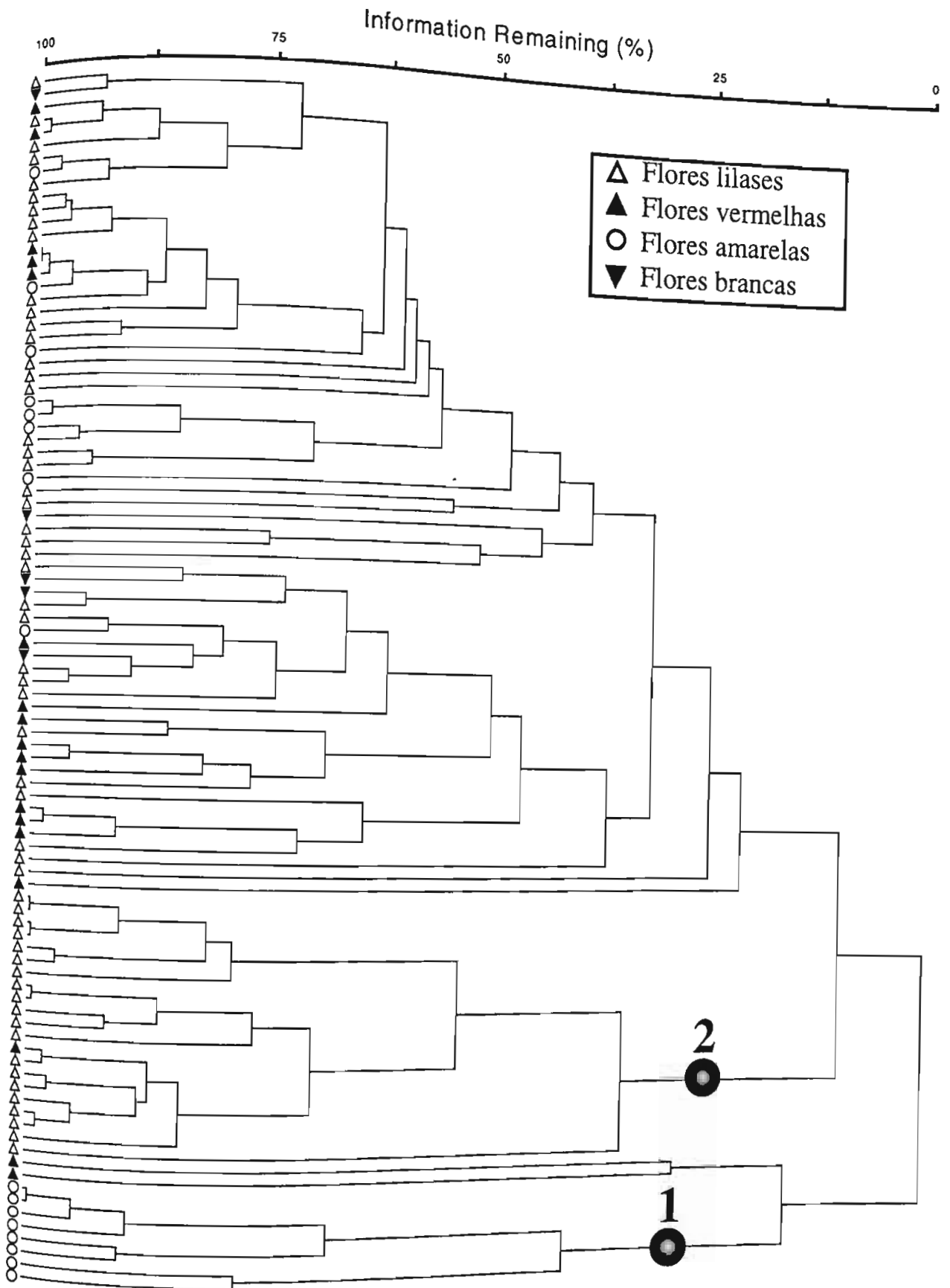


Figura 18: Análise utilizando UPGMA de indivíduos do complexo *E. secundum*. 1 - Indivíduos com flores amarelas provenientes da Serra da Caraça (MG); 2 - Indivíduos com flores lilases provenientes de afloramentos rochosos (campos rupestres e inselbegs).

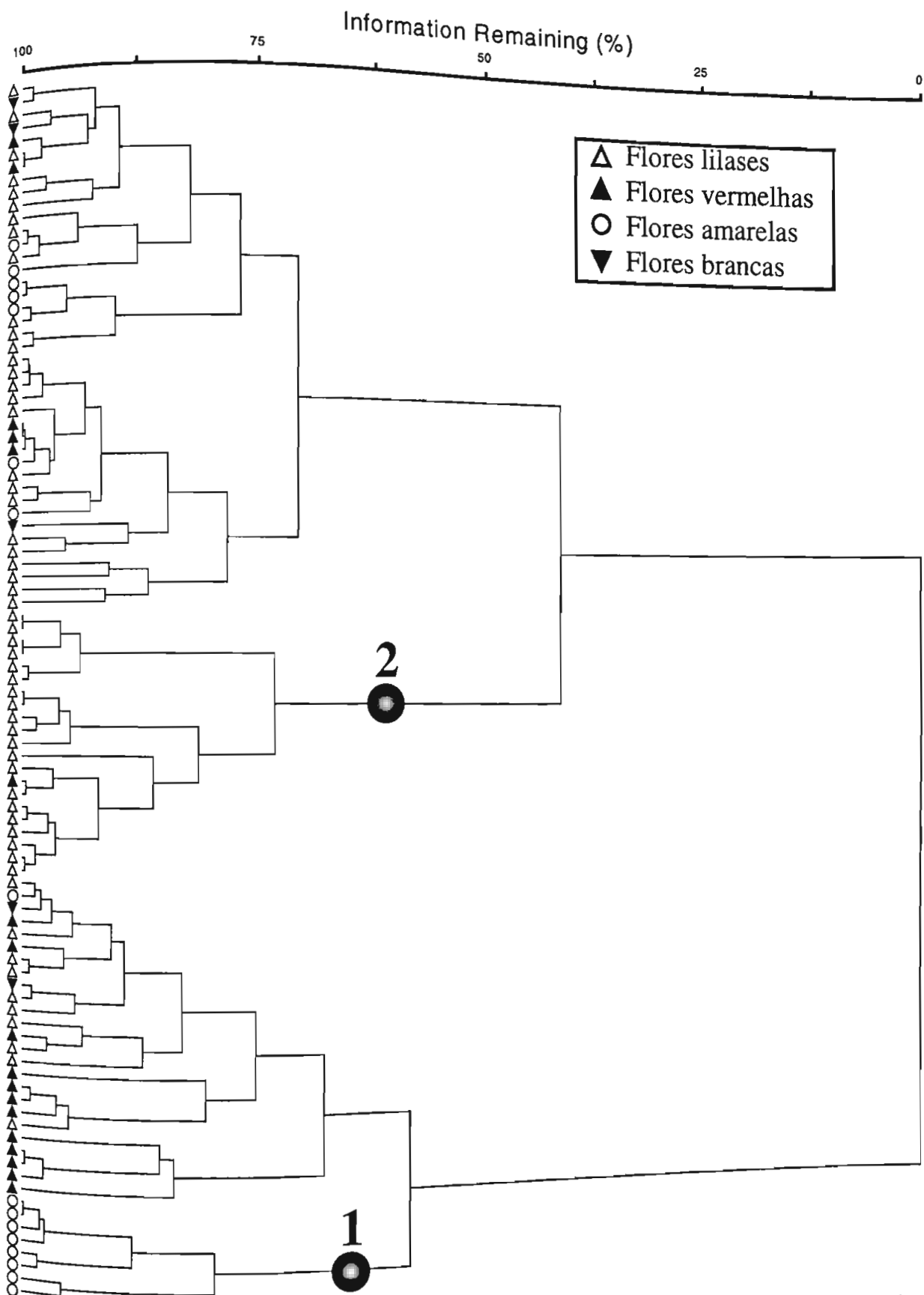


Figura 19: Análise utilizando o método de Ward de indivíduos do complexo *E. secundum*.  
 1 - Indivíduos com flores amarelas provenientes da Serra da Caraça (MG); 2 - Indivíduos  
 com flores lilases provenientes de afloramentos rochosos (campos rupestres e inselbegs).

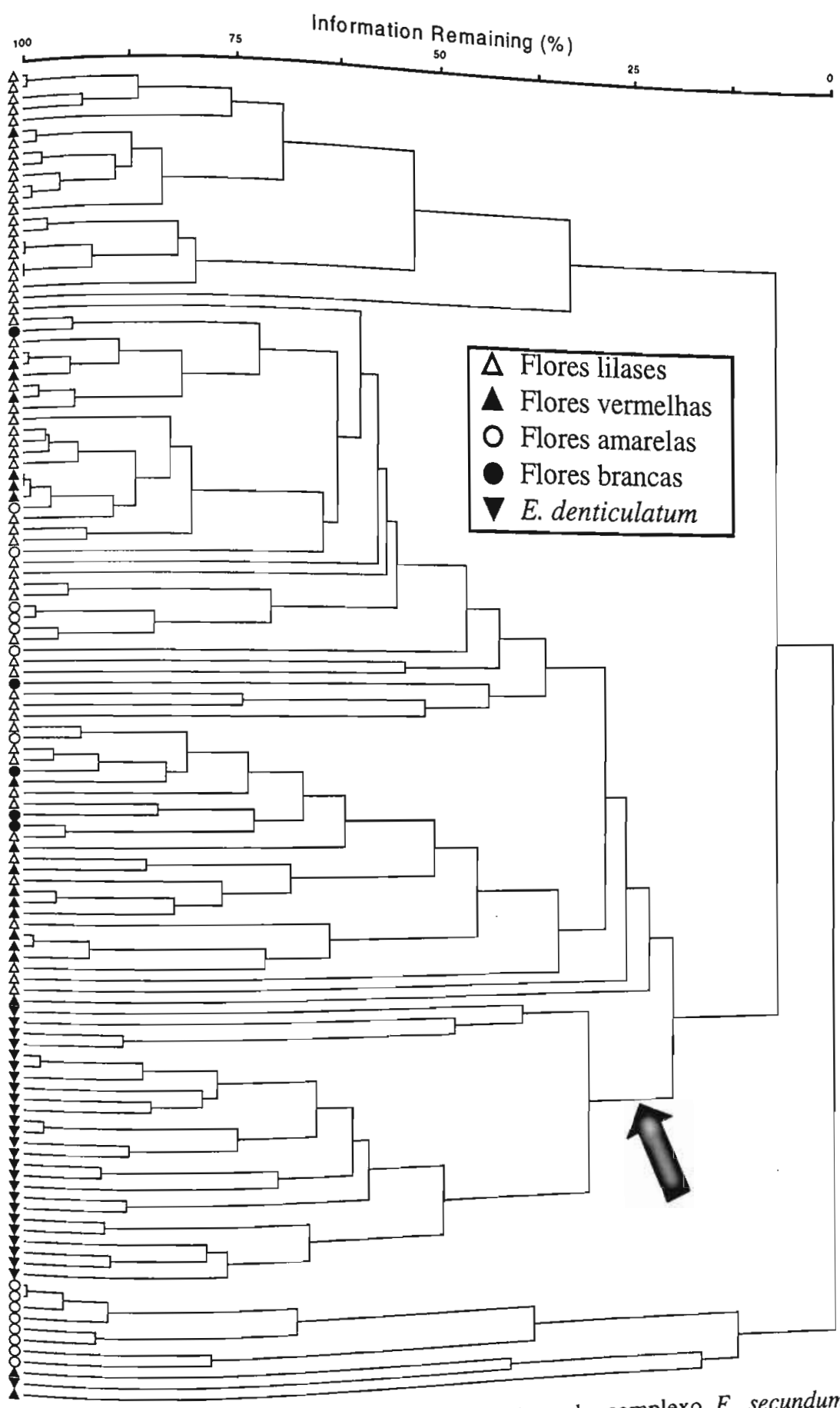


Figura 20: Análise utilizando UPGMA de indivíduos do complexo *E. secundum* e *E. denticulatum*. A seta indica o agrupamento que contém os indivíduos de *E. denticulatum*.



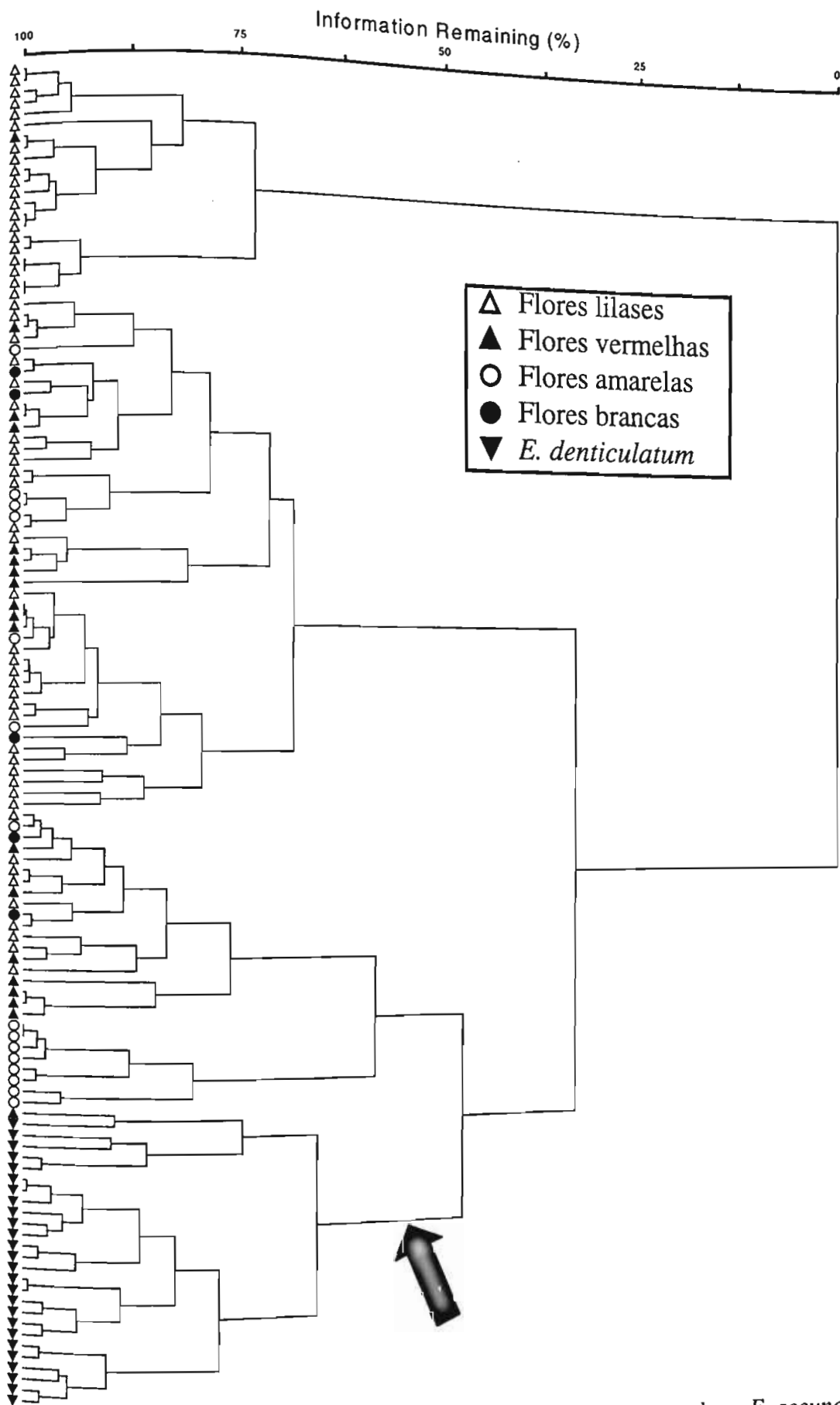


Figura 21: Análise utilizando o método de Ward de indivíduos do complexo *E. secundum* e *E. denticulatum*. A seta indica o agrupamento que contém os indivíduos de *E. denticulatum*.

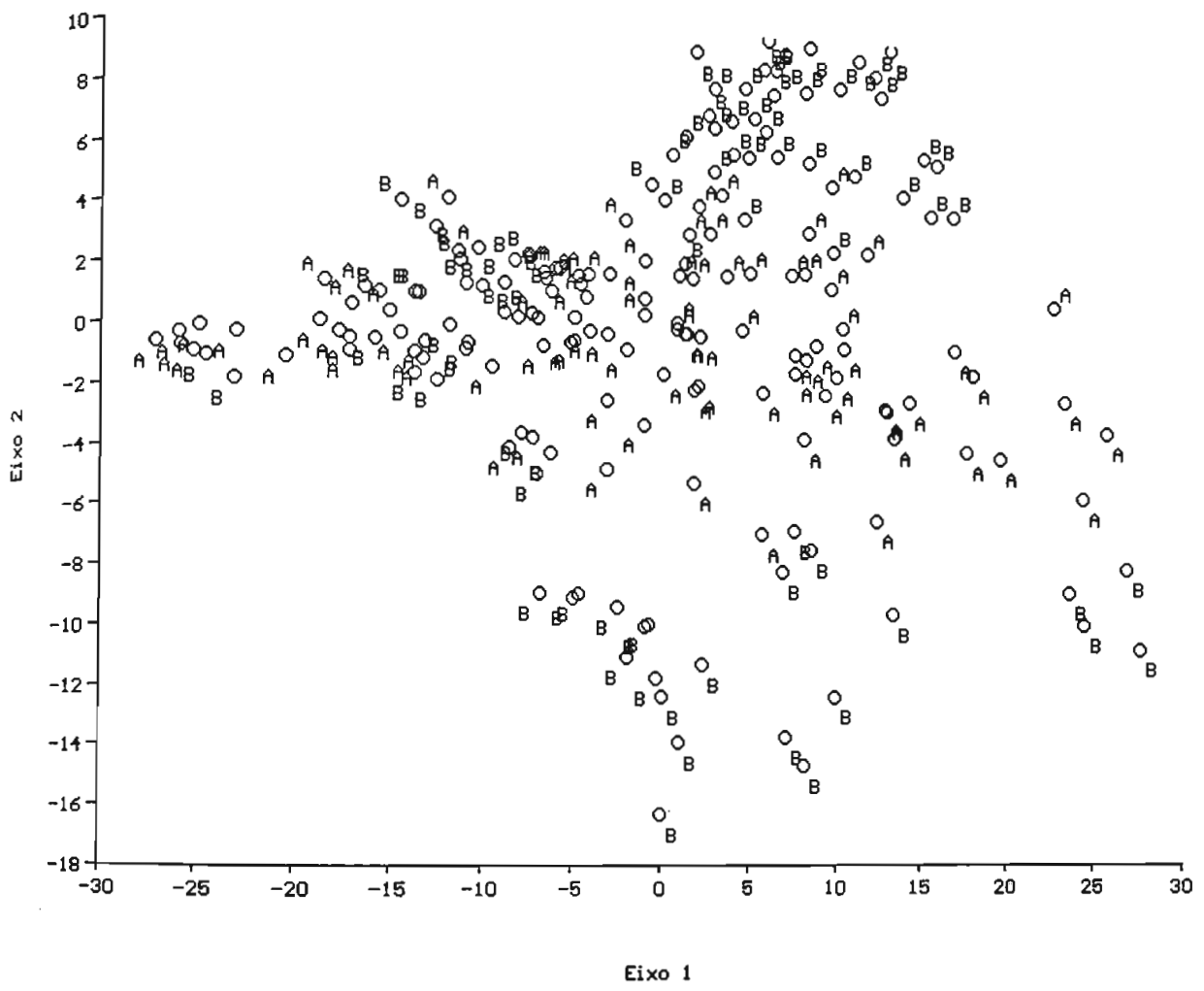


Figura 22: PCO de indivíduos das subseções *Tuberculata* (A) e *Carinata* (B).

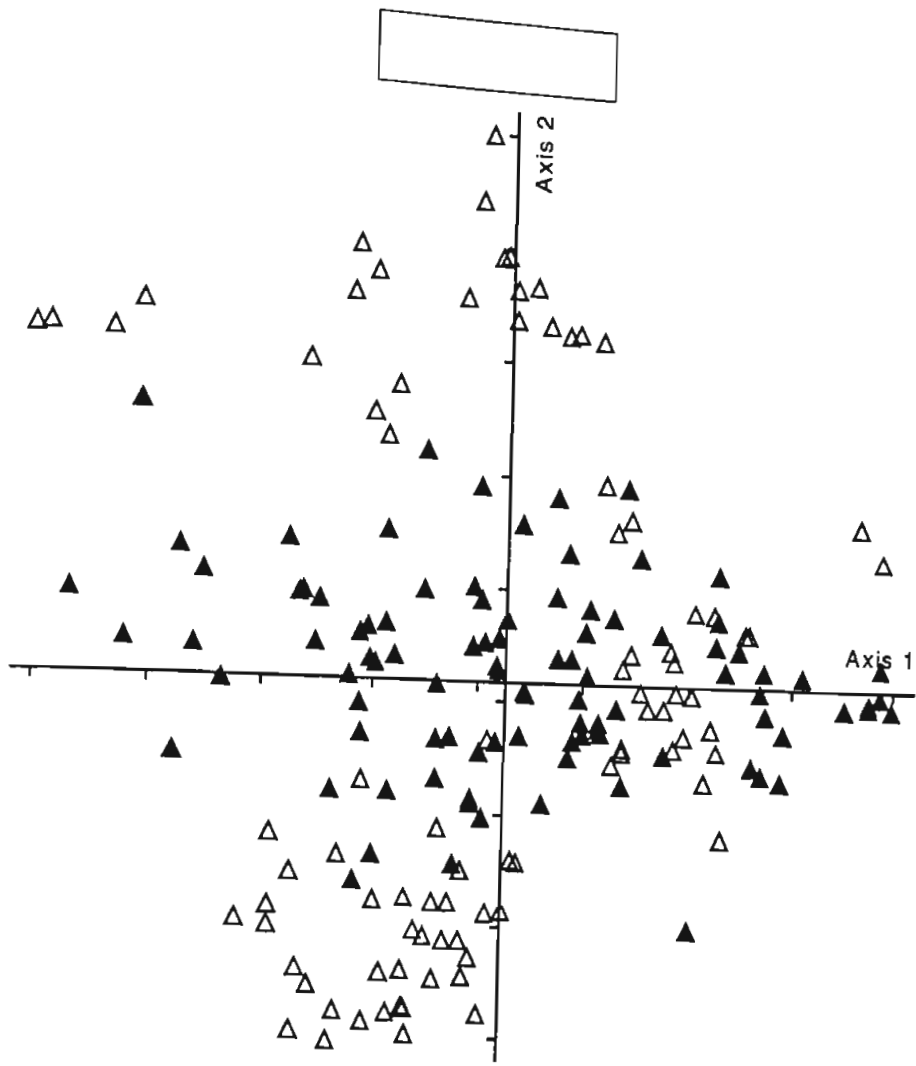


Figura 23: PCA de indivíduos das subseções *Tuberculata* (▲) e *Carinata* (△).

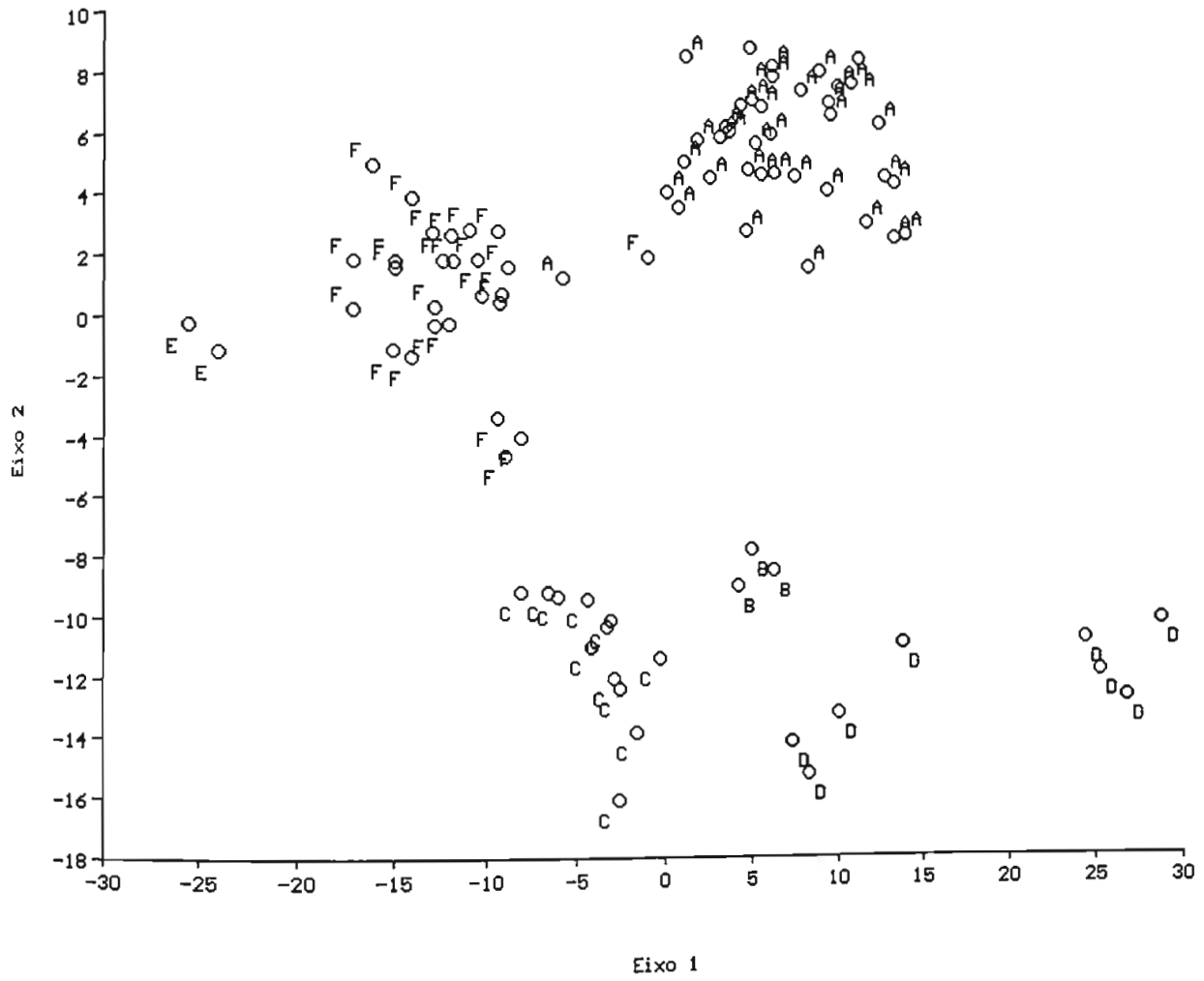


Figura 24: PCO de indivíduos da subseção *Carinata*. A - *E. fulgens*; B - *E. radicans*; C - *E. ibaguense*; D - *E. cinnabarinum*; E - *E. calanthum*; F - *E. denticulatum*.

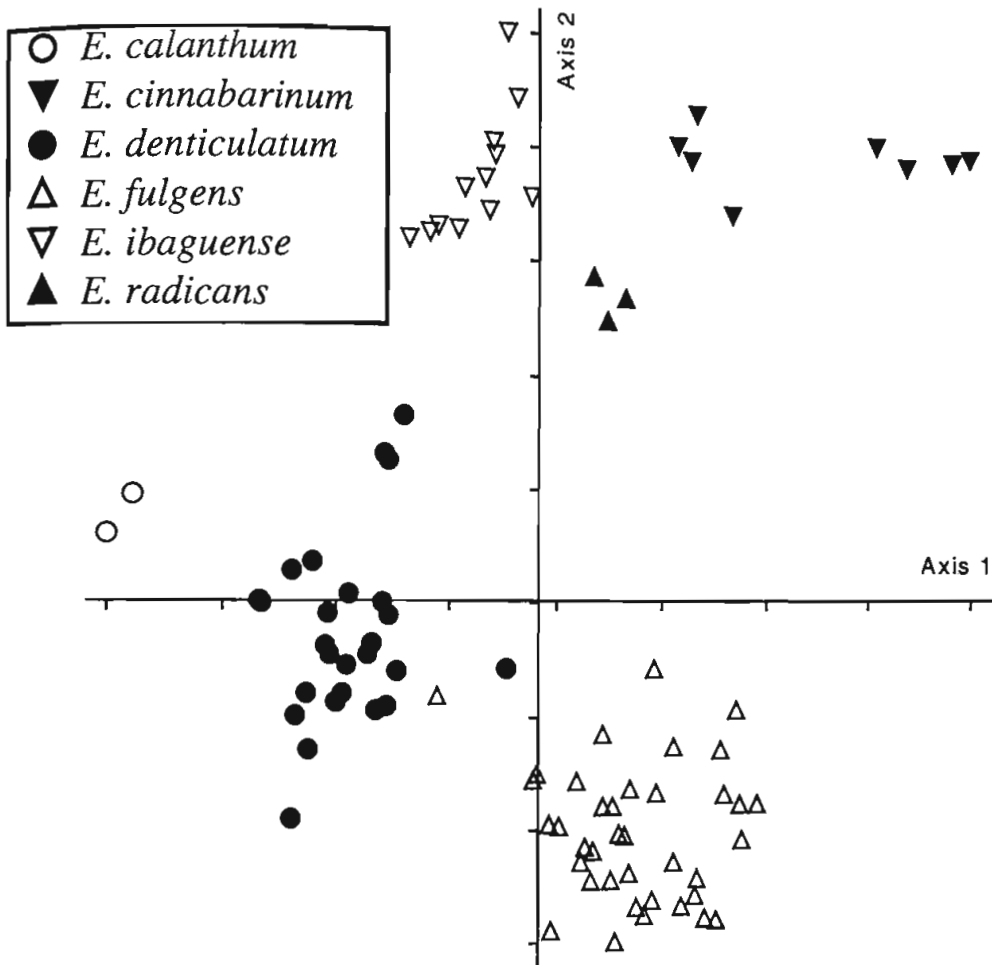


Figura 25: PCA de indivíduos da subseção *Carinata*.

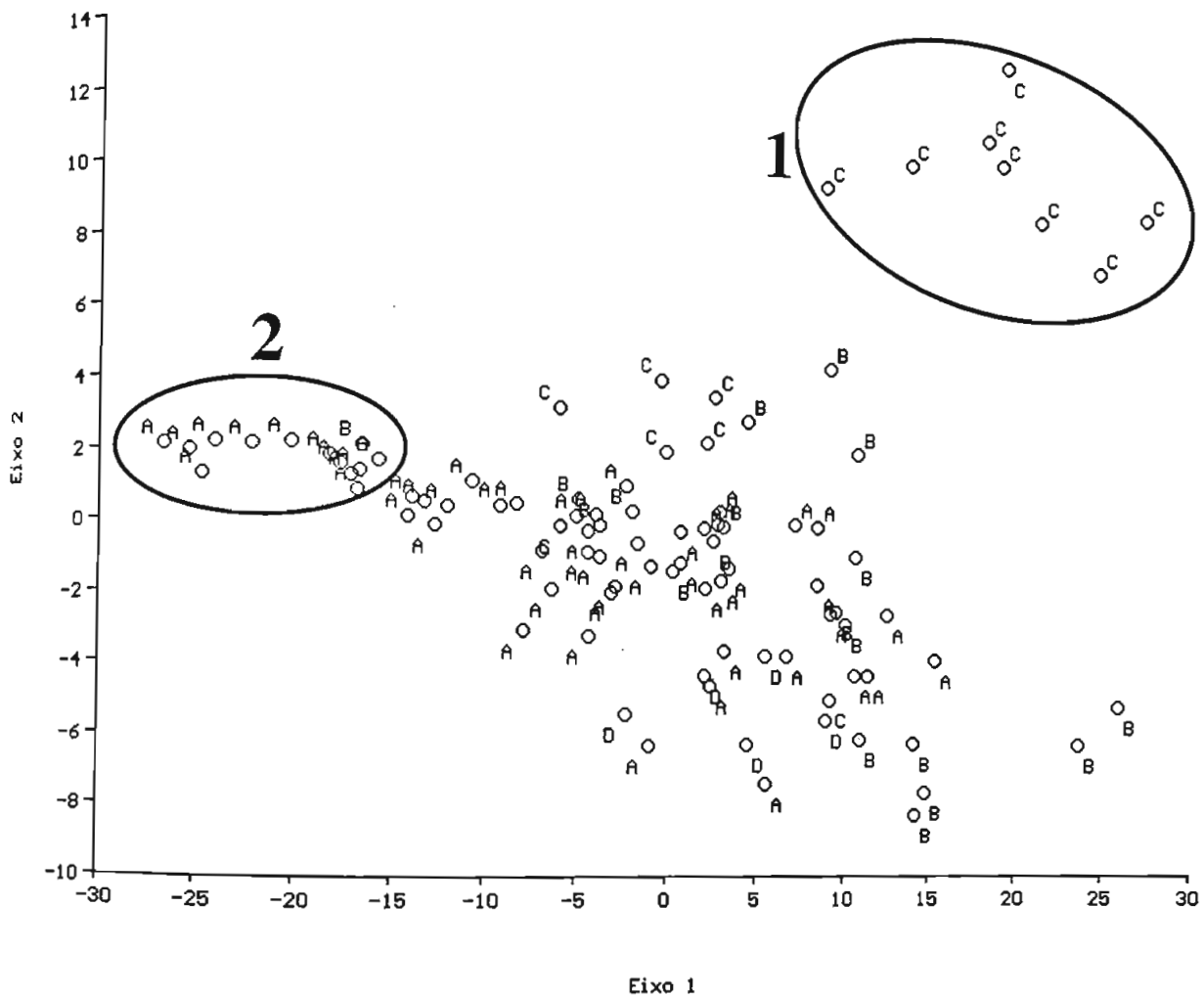


Figura 26: PCO de indivíduos do complexo *E. secundum*. A - Flores lilases; B - Flores vermelhas; C - Flores amarelas; D - Flores brancas; 1 - Indivíduos com flores amarelas provenientes da Serra da Caraça (MG); 2 - Indivíduos com flores lilases provenientes de afloramentos rochosos (campos rupestres e inselbogs).

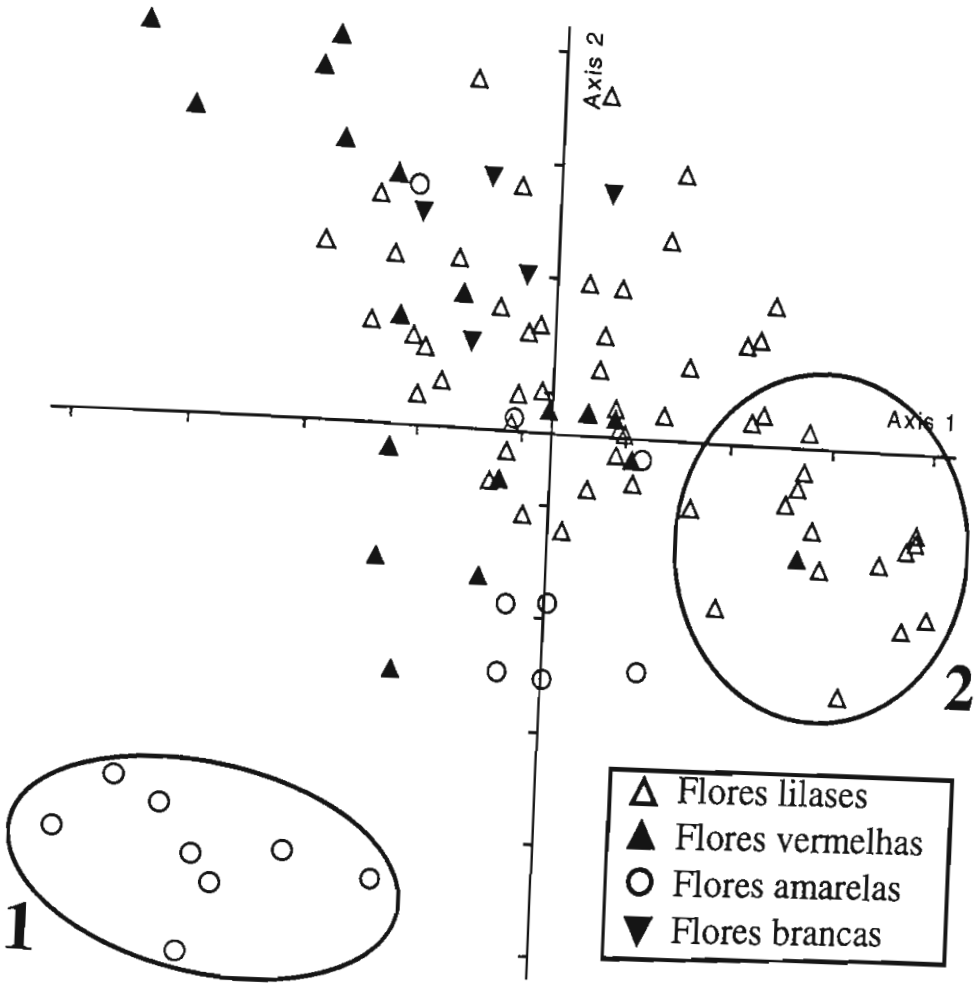


Figura 27: PCA de indivíduos do complexo *E. secundum*. 1 - Indivíduos com flores amarelas provenientes da Serra da Caraça (MG); 2 - Indivíduos com flores lilases provenientes de afloramentos rochosos (campos rupestres e inselbegs).

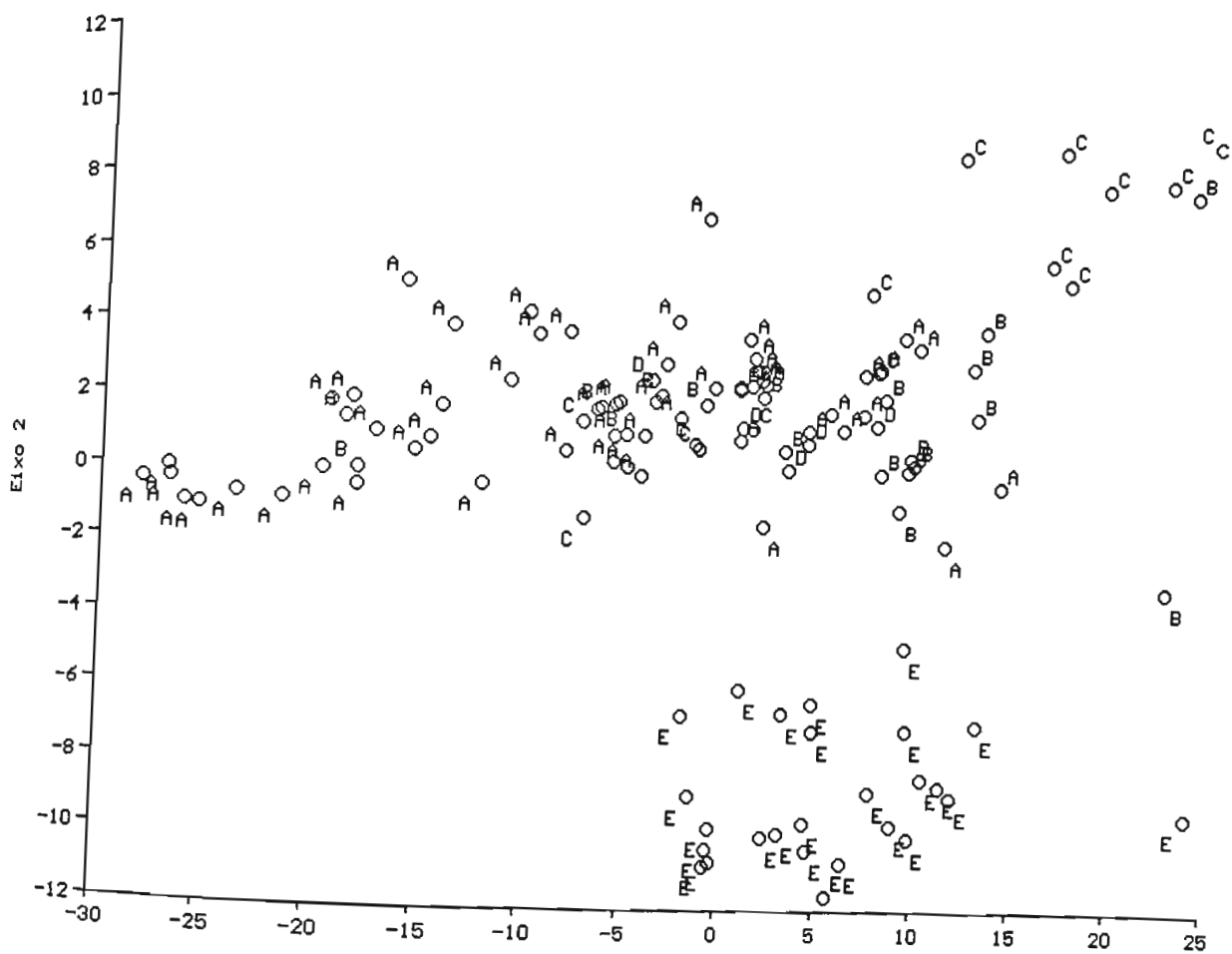


Figura 28: PCO de indivíduos do complexo *E. secundum* e *E. denticulatum*. A - Flores lilases; B - Flores vermelhas; C - Flores amarelas; D - Flores brancas; E - *E. denticulatum*.



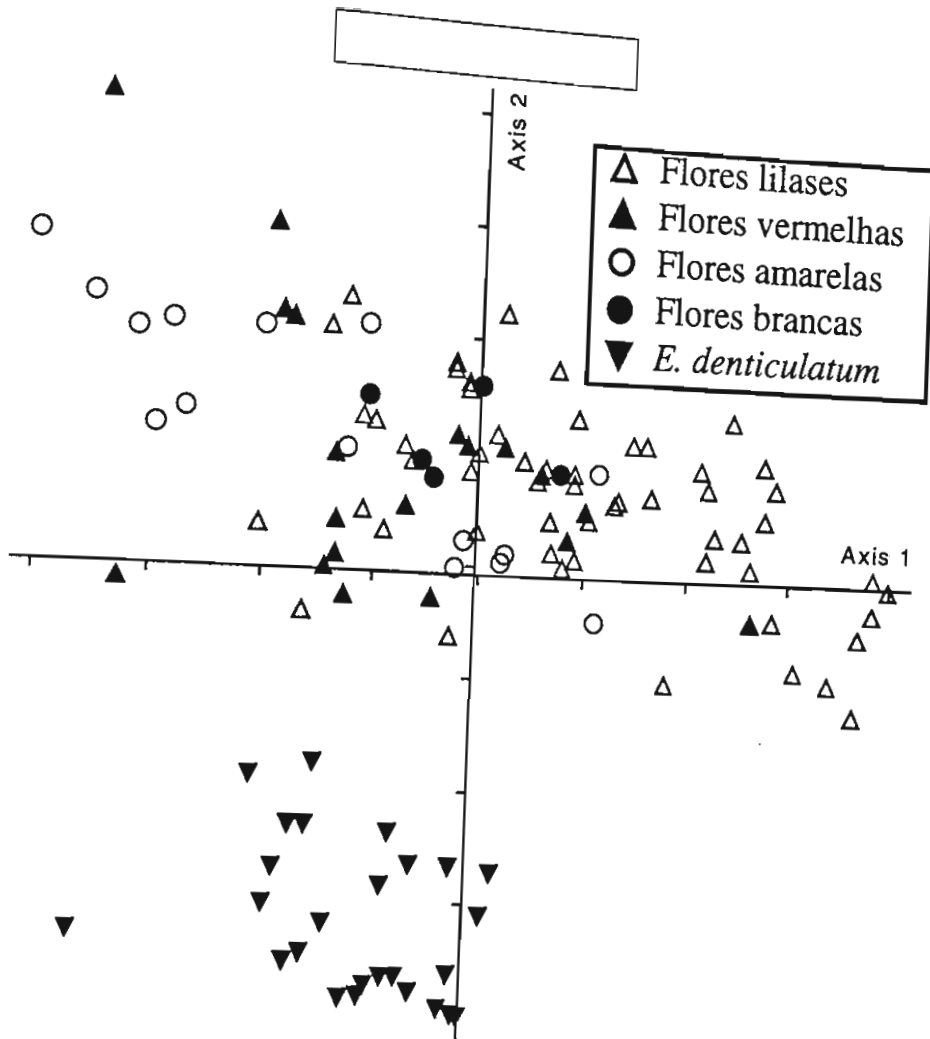


Figura 29: PCA de indivíduos do complexo *E. secundum* e *E. denticulatum*.

## Anexo 1

### Complexo *E. secundum* – flores lilases

BRASIL. BAHIA: Abaíra, III.1992, *T. Laessoe & T. Silva s.n.* (SPF89121); Pico das Almas, XII.1988, *R.M. Harley 27270 & D.J.N. Hind* (SPF); Andaraí, II.1977, *R.M. Harley 18757* (SPF); Barra da Estiva, Morro do Ouro, VII.1981, *A.M. Giuliatti et al. s.n.* (SP195343); Delfino, III.1974, *R.M. Harley 17012* (SPF); Jacobina, X.1990, *A. Freire-IX.1994, M.L. Guedes et al. s.n.* (SPF103600); Morro do Chapéu, Cachoeira do Ferro Doido, XI.1980, *A. Furlan et al. s.n.* (SP195363); Mucugê, II.1994, *R.M. Harley et al. s.n.* (SPF94905); Palmeiras, I.1997, *A.A. Conceição 229* (SPF); Rio de Contas, II.1987, *R.M. Harley et al. 24454* (SPF); Rui Barbosa, X.1978, *E.F. Almeida 24* (RB); Santa Terezinha, Serra da Pioneira, VI.1984, *L. Noblick et al. 3315* (SP). ESPÍRITO SANTO: Castelo, V.1949, *A.C. Brade 19778* (RB); Santa Teresa, VIII.1996, *A.L.B. Sartori 142 et al.* (UEC). GOIÁS: Alto Paraíso, Chapada dos Veadeiros, II.1966, *H.S. Irwin et al. s.n.* (SP110656); Formosa, Fazenda dos Pernambucanos, III.1996, *M.A. Silva et al. 2883* (SP). MINAS GERAIS: Araxá, Serra da Canastra, II.1978, *G.J. Shepherd et al. 7147* (UEC); Bom Jardim de Minas, II.1998, *J.H.A. Dutilh 60 & W.M. Ferreira* (UEC); Caeté, Serra da Piedade, I.1971, *H.S. Irwin 30243 et al.* (HB); Caldas, Pedra Branca, I.1919, *F.C. Hoehne s.n.* (SP2902); Cantoni, III.1970, *H.S. Irwin 27236 et al.* (HB); Caparaó, Serra do Caparaó, X.1941, *A.C. Brade 17142* (RB); Carrancas, VII.1987, *L.S. Kinoshita-Gouvea et al. s.n.* (UEC47676); Conceição do Rio Verde, VI.1957, *G.F.J. Pabst 4128* (HB); Congonhas do Norte, III.1998, *R.C. Forzza et al. 690* (SPF); Congonhas, Serra da Moeda, IV.1957, *E. Pereira 3117 & G.F.J. Pabst* (HB); Datas, I.1988, *R. Mello-Silva et al. s.n.* (SPF63898); Descoberto, VIII.2002, *R.M. Castro 583 et al.* (RB); Diamantina, I.1995, *N.S. Ávila s.n.* (SPF96281); Dolores do Turvo, IV.1926, *F.C. Hoehne & A. Gehrt s.n.* (SP17561); Gouveia, VI.1991, *R. Mello-Silva et al. 397* (SPF); Itabirito, Pico do Itabirito, II.1968, *H.S. Irwin 19856* (HB); Itacambira, II.1988, *J.R. Pirani et al. 2281* (SPF); Joaquim Felício, IV.1981, *L. Rossi et al. s.n.* (SP195414); Lavras, XII.1980, *H.F. Leitão-Filho et al. 11940* (UEC); Miguel Burnier, I.1921, *F.C. Hoehne s.n.* (SP5122); Nazareno, IV.1996, *E.L. Borba 181* (UEC); Ouro Preto, Itacolomi, II.1892, *E. Ulle 284* (R); Paraopeba, V.1956, *E.P. Heringer 5162* (HB); Rio Acima, Gandarela, VII.1972, *L. Emygdio 3383 et al.* (R); Santa Bárbara, Serra da Caraça, I.1921, *F.C. Hoehne s.n.* (SP5061); Santana do Riacho, II.1991, *M.M. Arbo et al. 4943* (SPF); Santo Antônio do Itambé, Pico do Itambé, II.1972, *W.R. Anderson et al. 35707* (HB); São João Del Rey, I.1994, *A.M. Giuliatti et al. s.n.* (SPF92669); São Roque de Minas, VII.1999, *M.A. Farinaccio et al. 365* (SPF); São Tomé das Letras, XI.1984, *I. Cordeiro et al. s.n.* (SPF35571); Serro, III.1963, *M. Magalhães 18948* (HB); Tiradentes, II.1980, *P.G. Windish 2620* (HB); Trinta-Réis, I.1986, *H.L. Wagner et al. s.n.* (SPF41627); Unaí, Fazenda São Miguel, XI.1993, *M.A. Silva et al. 1751* (SP). PARANÁ: Campo Largo, Serra do Purunã, III.1981, *R. Kummrow 1510* (SP); Guaratuba, Alto da Serra, II.1980, *P.I. Oliveira 202* (SP); Jaguariaíva, IV.1994, *J. Noschang et al. s.n.* (UEC83328); Palmeira, Rio Tibagi, II.1982, *P.I. Oliveira 371* (SP). PERNAMBUCO: Caruaru, Brejo da Madre de Deus, XI.1968, *A. Burle & G. Ferreira 4* (HB). RIO DE JANEIRO: Angra dos Reis, IX.1964, *Z.A. Trinta 880 & E. Fromm* (R); Itatiaia, IV.1926, *A.J. Sampaio 4074* (R); Magé, Serra da Estrela, II.1917, *C. Diogo 649* (R); Mauá, IV.1962,

I.E. Pabst s.n. (HB19810); Nova Friburgo, I.1951, J. Moura 51 (HB); Penedo, VII.1988, s.c. (SP254759); Petrópolis, 1947, O.C. Góes 68 (RB); Pirai, Serra das Araras, VI.1961, G.F.J. Pabst 5614 (HB); Rio de Janeiro, Corcovado, III.1973, D. Araújo 160 (RB); Santa Maria Madalena, Pedra do Desengano, III.2002, C.G. Gomes et al. 147 (SPF); Teresópolis, VII.1918, F.C. Hoehne s.n. (SP2320). SANTA CATARINA: Apeiúna, II.1966, H.D. Bicalho 101 (SP); Itajaí, IV.1954, R. Reitz & R.M. Klein 1820 (HB); Lauro Muller, s.d., R. Reitz & R.M. Klein 8781 (HB); Pilões, I.1956, R. Reitz & R.M. Klein 2526 (HB); Rio do Sul, VIII.1958, R. Reitz & R.M. Klein 6975 (HB). SÃO PAULO: Alto da Serra, II.1899, G. Edwall s.n. (SP29354); Amparo, VIII.1943, M. Kuhlmann 980 (SP); Atibaia, Pedra Grande, II.2001, F. Pinheiro 202 & M.C.C. Inês (SP); Bananal, Serra da Bocaina, IX.1994, E.A. Rodrigues et al. 248 (SP); Biritiba-Mirim, Estação Biológica de Boracéia, IX.1984, S. Romaniuc Neto & A. Custodio Filho 218 (SP); Caieiras, VIII.1994, A.M. Giuliatti et al. 1194 (SPF); Caraguatatuba, VI.1963, H.D. Bicalho s.n. (SP168402); Cotia, VI.1926, F.C. Hoehne s.n. (SP29342); Cunha, III.1994, J.B. Baitello 485 (SP); Eldorado, IX.1995, R.R. Rodrigues et al. 136 (SP); Iguape, XII.1992, L. Rossi et al. 1233 (SP); Iporanga, Fazenda Intervalles, V.1996, C.B. Costa, et al. 250 (SP); Itapeva, VI.1994, V.C. Souza et al. 6030 (SP); Itararé, Bonsucesso de Itararé, VI.1994, V.C. Souza et al. 6074 (SP); Jeriquara, IX.1965, H.D. Bicalho 64 (SP); Jundiá, Serra do Japi, IX.1983, S.C. Chiea 350 (SP); Lavrinhas, IV.1995, L.S. Kinoshita 951 & G.J. Shepherd (UEC); Mogi das Cruzes, IX.1983, M. Kirizawa et al. 1046 (SP); Mongaguá, III.1972, T. Yamagushi s.n. (SP118046); Piquete, V.1996, G.F. Árbocz et al. 2809 (SP); Ribeirão Pires, II.1982, O. Handro 2304 (SP); Salesópolis, Estação Biológica de Boracéia, A. Custodio Filho & T.M. Cerati 1373 (SP); Santo André, IX.1976, P.H. Davis et al. s.n. (SP154616); São Bernardo do Campo, II.2001, F. Pinheiro 226 & M.C.C. Inês (SP); São Francisco Xavier, VIII.1994, J.Y. Tamashiro et al. 513 (SP); São José do Barreiro, Parque Nacional da Bocaina, E.L.M. Catharino & L. Rossi, 1047 (SP); São Paulo, Butantan, VI.1917, F.C. Hoehne s.n. (SP214); Serra da Bocaina, IV.1894, A. Loefgren & G. Edwall s.n. (SP29347); Ubatuba, IV.1991, M. Kirizawa & E.A. Lopes 2440 (SP); Votorantim, XII.1998, A.M.G.A. Tozzi et al. 222 (UEC).

Complexo *E. secundum* – flores vermelhas

Brasil. Goiás: Alto Paraíso, XII.1968, G.M. Barroso et al. 512 (HB); Jataí, VII.1951, A. Macedo 3340 (RB). MINAS GERAIS: Ituiutaba, II.1950, A. Macedo 2111 (RB); Santa Bárbara, Serra da Caraça, XII.2002, F. Pinheiro et al. 191 (SP). SÃO PAULO: Cruzeiro, Pico dos Marins, Y. Nagatani s.n. (GORO17876); Ibiúna, VIII.1995, O.T. Aguiar & J.A. Pastore 579 (SP); Itapecerica da Serra, V.1936, A. Gehrt s.n. (SP35294); Miracatú, XI.1984, P. Martuscelli 86 (SP); São Paulo, Instituto de Botânica, II.1961, C.G. Fonseca 6 (SP); Tapiraí, Sítio da Pedra, X.1994, K.D. Barreto et al. 3091 (SP)

Complexo *E. secundum* – flores amarelas

BRASIL. MINAS GERAIS: Ouro Preto, Itacolomi, II.1892, E. Ulle 284 (RB); Santa Bárbara, Serra da Caraça, I.1971, H.S. Irwin et al. 29073 (HB); Santo Antônio do Itambé, Pico do Itambé, II.1972, W.R. Anderson et al. 35877 (SPF). RIO DE JANEIRO: Itaipava, I.1963, G.F.J. Pabst 7242 (HB); Nova Friburgo, I.1960, G.F.J. Pabst 5234 (HB); Petrópolis, Cascatinha, I.1933, C. Spannagel 361 (SP); Santa Maria Madalena, II.1934,

A.C. Brade 13320 & S. Lima (RB); Teresópolis, I.1977, B. Orssich s.n. (HB66531); Trajano de Moraes, XII.1965, E. Santos 2218 & B. Flaster (HB).

*Epidendrum denticulatum*

BRASIL. BAHIA: Alcobaça, I.1977, R.M. Harley 18001 (SPF); Caravelas, V.1967, J.P. Lanna Sobrinho 1430 (HB); Ilhéus, VIII.1996, A.L.B. Sartori 240 et al. (UEC); Itabuna, XII.1992, M.M. Arbo 5574 (SPF); Porto Seguro, IV.1991, R.P. Cyralemos 1881 & G.L. Esteves (SPF); Santa Cruz Cabrália, III.1974, R.M. Harley 17050 (SPF); Una, V.1965, R.P. Belém & M. Magalhães 1074 (HB). ESPÍRITO SANTO: Guarapari, II.1988, W.W. Thomas et al. s.n. (SPF63900); Linhares, VIII.1996, A.L.B. Sartori 187 et al. (UEC). MINAS GERAIS: Caeté, I.1921, F.C. Hoehne s.n. (SP5110); Poços de Caldas, I.1981, L.S.K. Gouvea 767 et al. (UEC); Ritópolis, IV.1995, M. Barbosa 2269 (RB); Sabará, III.1957, E. Pereira 2472 (HB); Tiradentes, V.1987, R.J.V. Alves 18 (RB). RIO DE JANEIRO: Araruama, II.2003, M. Moraes 591 et al. (RB); Macaé, IX.1964, Z.A. Trinta 965 & E. Fromm (HB); Maricá, VI.1987, M. Souza 1696 et al. (R); Rio de Janeiro, I.1965, N. Santos et al. 241 (HB). SÃO PAULO: Águas de Santa Bárbara, V.1989, J.A.A. Meira Neto 388 (UEC); Altinópolis, III.1994, W. Marcondes-Ferreira 784 et al. (UEC); Angatuba, I.1968, G.F.J. Pabst 9084 (HB); Atibaia, VII.1910, Duarte s.n. (SP29336); Botucatu, I.1973, A. Amaral Júnior 1356 (BOTU); Caieiras, VIII.1994, A.M. Giuliatti et al. 1194 (SP); Itirapina, Cerrado do Valério, II.1994, J.Y. Tamashiro & J.C. Galvão 436 (SP); Itú, XII.1897, A. Russel 221 (SP); Mogi-Guaçu, Reserva Biológica da Fazenda Campininha, I.1981, M. Sugiyama & W. (SP); Mogi-Mirim, Horto Florestal, V.1989, E.R. Gonçalves s.n. (ESA11144); São Carlos, VI.1963, G.M. Felipe 3 & F.M.R. Magalhães (HB); São José dos Campos, I.1962, I. Mimura 205 (SP); São José dos Campos, III.1962, G. Eiten & I. Mimura 3564-D (SP); São Paulo, V.1905, A. Usteri s.n. (SP29311).

*Epidendrum fulgens*

BRASIL. PARANÁ: Guaratuba, XII.1971, P.I.S. Braga 2313 et al. (RB); Paranaguá, XI.1986, S.M. Silva & R.M. Britez 24738 (UEC). RIO GRANDE DO SUL: Porto Alegre, I.1964, E. Pereira 8491 & G.F.J. Pabst (HB); Torres, Furnas, XII.1995, E.L. Borba et al. 165 (SP). RIO DE JANEIRO: Angra dos Reis, III.1970, G.F.J. Pabst 9369 (HB); Parati, V.2001, G. Cattán 93 (RB). SANTA CATARINA: Florianópolis, XI.1966, R.M. Klein & V.2001, G. Cattán 93 (RB). SANTA CATARINA: Florianópolis, XI.1966, R.M. Klein & V.2001, G. Cattán 93 (RB). SANTA CATARINA: Florianópolis, XI.1966, R.M. Klein & V.2001, G. Cattán 93 (RB). SANTA CATARINA: Florianópolis, XI.1966, R.M. Klein & V.2001, G. Cattán 93 (RB). SANTA CATARINA: Florianópolis, XI.1966, R.M. Klein & V.2001, G. Cattán 93 (RB). SANTA CATARINA: Florianópolis, XI.1966, R.M. Klein & V.2001, G. Cattán 93 (RB). SÃO PAULO: Anunciação, E.A. & S. A. Nicolau 91 (SP); Bertoga, IV.1983, M.I.T.M. Guimarães et al. s.n. (BOTU11386); Cananéia, XII.1987, M. Kirizawa 1996 (SP); Caraguatatuba, Ilha Vitória, IV.1965, J.C. Gomes 3655 (SP); Guarujá, Ilha de Santo Amaro, IX.1962, M.A.B. Andrade s.n. (SPF86480); Iguape, Ilha Comprida, IV.1918, F.C. Hoehne s.n. (SP1853); Itanhaém, Ilha da Queimada Grande, IV.1996, V.C. Souza et al. 11049 (SP); Mongaguá, III.1967, G. Eiten & L.T. Eiten 8045 (SP); Peruíbe, Juréia, III.2000, S. Vieira & V.S. Oliveira 50 (SP); Praia Grande, III.1932, F.C. Hoehne s.n. (SP29361); São Sebastião, Ilha de Alcatrazes, IX.1988, L. Rossi et al. 439 (SP); Ubatuba, II.1996, H.F. Leitão Filho et al. 34656 (SP).

*Epidendrum cinnabarinum*

BRASIL. BAHIA: Belmonte, I.2002, T.S. Nunes 801 et al. (RB); Canavieiras, XI.1971, R.S. Pinheiro 1696 (HB); Cumuruxatiba, I.1977, R.M. Harley 18096 (HB); Ilhéus, II.1982, L.A.M. Silva et al. s.n. (SP179481); Itacaré, IV.1974, R.M. Harley 17615 (RB); Jacobina, X.1978, G. Martinelli 5172 (RB); Maraçás, I.1963, J. Becker 42 (HB); Maraú, I.1965, E. Pereira & G.F.J. Pabst 8510 (HB); Porto Seguro, XI.1963, A.P. Duarte 8041 (RB); Recôncavos, I.1956, E.P. Heringer s.n. (HB5072); Salvador, I.1960, G.F.J. Pabst 5258 (HB); Santa Cruz de Cabrália, I.1972, A. Eupunino 127 (HB); Uruçúca, VII.1979, G. Martinelli 6080 (RB); Valença, II.1975, T.S. Santos 2904 (HB). PARAÍBA: Esperança, XI.1958, J.C. Moraes s.n. (RB104083); Nova Floresta, X.1979, L. Emygdio s.n. (R169817); s.l., II.1933, R. von Ihering s.n. (SP30187). PERNAMBUCO: Garanhuns, I.1972, s.c. (RB151511); Prazeres, I.1931, D.B. Pickel s.n. (SP27858); s.l., s.d., G. Gardner 1163 (SP). RIO GRANDE DO NORTE: Natal, XII.1975, P. Bamps 5066 (RB). SERGIPE: Santo Amaro, II.1958, A. Franco Filho 1 (HB).

## Capítulo 5

### Estudo taxonômico do complexo *Epidendrum secundum* (Orchidaceae)

Fábio Pinheiro<sup>1,2</sup> & Fábio de Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Botânica – Seção de Curadoria de Herbário. <sup>2</sup>Instituto de Biociências, Departamento de Botânica - USP

#### Resumo

*Epidendrum* é um dos maiores gêneros de Orchidaceae e um dos mais variáveis, apresentando diversas dúvidas quanto ao seu posicionamento taxonômico e à delimitação de suas espécies, principalmente na subseção *Tuberculata*, um dos grupos de espécies mais variáveis do gênero, amplamente distribuído pela América do Sul, e com delimitação taxonômica das espécies bastante incerta. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo taxonômico do complexo *E. secundum*, com base em resultados obtidos através de análises morfométrica e de marcadores moleculares do tipo AFLP, incluindo na amostragem diversas populações que cobriram a distribuição geográfica do grupo e indivíduos que representaram a variação morfológica presente no grupo. Com os resultados obtidos, é possível reconhecer a existência de duas espécies: *E. secundum*, que ocorre na cadeia dos Andes, Planalto das Guianas, Pequenas Antilhas e Planalto Brasileiro, possuindo uma grande variação na forma e coloração das flores, que podem ser lilases, laranja, vermelhas e brancas, e *E. xanthinum*, que ocorre apenas no Planalto Brasileiro, em algumas montanhas da Serra dos Órgãos e Cadeia do Espinhaço, apresentando também uma grande variação na forma das flores, mas sempre apresentando – as com coloração amarela.

#### Abstract

*Epidendrum* is one of the largest genera of Orchidaceae, and one of the most variable, presenting many uncertainties regarding its taxonomic position and the boundaries among

species, mainly in subsections *Carinata* and *Tuberculata*, which are likely to be one of the most variable and complex groups within the genus. The aim of this work was to perform a taxonomic study of the *E. secundum* complex, based on morphometric and molecular data (AFLP). Several populations covering all the geographical distribution of the group and specimens covering the morphological variation in the group were analyzed. As a result, it was possible to recognize two species: *E. secundum*, that occurs in the Andes, Guyanas Plateau, Little Antilles and Brazilian Plateau, showing a large variation in shape and color of the flowers, which may be lilac, orange, red or white, and *E. xanthinum*, that occurs only at the Brazilian Plateau, in some of the mountains at "Serra dos Órgãos" and "Cadeia do Espinhaço", also showing a great variation in the shape of flowers, but always with yellow color.

### Introdução

O gênero *Epidendrum* L. é um dos maiores da família Orchidaceae, com cerca de 1125 espécies (Chase *et al.*, 2003). É bastante variável morfológicamente e mal compreendido taxonomicamente, já que sua delimitação genérica e a posição sistemática de muitas de suas espécies têm sido alvo de controvérsias (Dressler, 1967, 1984; Brieger, 1976-1977; Hágsater, 1993; Withner & Harding, 2004).

*Epidendrum* foi um dos primeiros gêneros descritos por Linnaeu, e sob esse nome foram descritas, inicialmente, todas as espécies com hábito epífita então conhecidas. Portanto, espécies epífitas hoje pertencentes a vários gêneros, foram originalmente tratadas como *Epidendrum*. Tal circunstância dificulta a delimitação precisa do número de espécies que compõem o gênero.

Levantamentos importantes de espécies de *Epidendrum* feitas no século XX (Schweinfurth, 1959; Dunsterville & Garay, 1959, 1961, 1965, 1966, 1972, 1976; Pabst & Dungs, 1975) consideraram *Amblostoma* Scheidw., *Lanium* (Lindl.) Benth., *Nanodes* Lindl. e outros, como gêneros autônomos. Por outro lado Dressler (1967, 1984) incluiu esses gêneros, e outros, em *Epidendrum* L., utilizando como argumento principal o fato de que as características utilizadas para diferenciá-los de *Epidendrum* L. poderem ser encontradas, também, em outros grupos de espécies claramente pertencentes a *Epidendrum*. Talvez a maneira artificial com que Pabst & Dungs (1975) e Brieger (1976-1977) uniram espécies em grupos e seções, dentro de *Epidendrum* L., tenha contribuído

para o mau entendimento das linhagens evolutivas. No caso de Pabst & Dungs (1975) o propósito dos autores foi a elaboração de um sistema que auxiliasse na identificação das espécies, como uma grande chave, sem dar importância às relações filogenéticas entre as espécies.

Um dos grupos de espécies mais variável morfológicamente foi delimitado primeiramente por Lindley (1852-1859), constituindo o subgênero *Amphiglottium*, composto por diversas seções, entre as quais a seção *Schistochila*. As espécies da seção *Schistochila* foram distribuídas em duas subseções segundo a morfologia do calo do labelo (Fig. 1): subseção *Carinata*, com calo em forma de quilha e projetado longitudinalmente pelo lobo central (Fig. 1a) e subseção *Tuberculata*, com calo carnosos, variadamente recortado, geralmente limitado ao centro do disco (Fig. 1b). Cogniaux (1898-1902) repetiu a classificação de Lindley, reunindo praticamente as mesmas espécies na subseção *Amphiglottidae*. Pabst & Dungs (1975) aceitaram o "grupo" *Amphiglottidae* e subdividiram as espécies em seções. Brieger (1976-1977) repetiu, em grande parte, a classificação de Lindley (1852-1859), aceitando a seção *Amphiglottium* e distribuindo as espécies nas subseções *Carinata* e *Tuberculata*, utilizando os mesmos critérios morfológicos de Lindley (1852-1859). Apesar de ter trabalhado com um número reduzido de espécies (*Epidendrum cinnabarinum* Salzm., *E. ibaguense* H.B.K. e *E. secundum* Jacq.), van den Berg *et al.* (2000) mostraram que a seção *Amphiglottium* forma um grupo monofilético.

A subseção *Tuberculata* é composta, em sua maior parte, pelo "complexo *Epidendrum secundum*" (Fig. 2), um dos grupos de espécies de *Epidendrum* menos compreendidos taxonomicamente (Brieger, 1976-1977). A primeira espécie descrita para o grupo foi *E. secundum* em 1760 por Jacquin, procedente de Martinica, nas Pequenas Antilhas (Jacquin, 1760, 1763). Ao longo dos anos *E. secundum* foi chamado em várias obras de *E. anceps* Jacquin, confusão devida ao fato de ambos estarem ilustrados na mesma obra (Jacquin, 1763). Só mais tarde, com a lectotipificação de *E. secundum* e *E. anceps* (Hágsater, 1993) este equívoco foi esclarecido.

São plantas extremamente polimorfas e amplamente distribuídas na América do Sul. A complexidade do grupo é refletida no grande número de nomes a ele associados. Há Ver, por exemplo, a série de sinônimos listados por Dunsterville & Garay (1961). Diferentes pontos de vista sobre como tratar as variações apresentadas pelos indivíduos que compõem o complexo *E. secundum*: alguns autores consideram cada morfo ou coloração como pertencentes a uma espécie distinta (Pabst & Dungs, 1975; Brieger, 1976-

1977; Sastre, 1990a, 1990b), e outros partindo do pressuposto de que as variações são contínuas e fazem parte de uma mesma espécie polimorfa (Dressler, 1989; Dunsterville & Garay, 1961; Garay & Sweet, 1974; Vasquez & Ibsch, 2004).

Evidências morfológicas baseadas em morfometria (Pinheiro & Barros, capítulo 4) e moleculares, obtidas através de AFLP (Pinheiro *et al.*, capítulo 3) não suportam a existência de mais de uma espécie no complexo *E. secundum*. Tanto os dados morfológicos como os moleculares revelam que existe uma variação contínua entre os indivíduos amostrados, sem uma relação aparente com características qualitativas, como coloração das flores ou procedência dos indivíduos (Pinheiro & Barros, capítulo 4; Pinheiro *et al.*, capítulo 3). Plantas com flores vermelhas, laranja, lilases e brancas não revelaram características que pudessem ser utilizadas de uma maneira segura para delimitar espécies distintas, sendo todos os exemplares identificados como *E. secundum*. Apenas indivíduos com flores amarelas, procedentes de populações localizadas no Planalto Brasileiro, exibiram descontinuidade marcante, justificando o status de espécie distinta: *E. xanthinum* Lindl.

O objetivo deste trabalho é apresentar um estudo taxonômico do complexo *E. secundum*, com a descrição das espécies que podem ser reconhecidas, *E. secundum* e *E. xanthinum*, discutindo sua distribuição geográfica e os caracteres morfológicos relevantes para suas identificações.

### Material e Métodos

O estudo foi baseado em exsicatas depositadas nos herbários HB, MBM, R, RB, SP, SPF e UEC. Foram analisados também indivíduos vivos cultivados nas coleções do Orquidário do Instituto de Botânica e do Orquidário do Departamento de Genética da ESALQ – USP.

Foram realizadas ilustrações do labelo de vários indivíduos de *E. secundum* e *E. xanthinum* para documentar a variação existente nas espécies, numa mesma população (Fig. 3) e em populações distintas (Figs. 4, 5). São apresentadas também ilustrações de materiais-tipo de algumas espécies descritas para o complexo *E. secundum* (Fig. 6).

Utilizando a procedência dos materiais analisados e dados de literatura, foram confeccionados mapas com a distribuição das espécies (Fig. 7, 8).

Com base nos trabalhos de Pinheiro & Barros (capítulo 4) e Pinheiro *et al.* (capítulo 3) podem ser reconhecidas apenas duas espécies dentro do complexo *E. secundum*: *E. secundum* e *E. xanthinum*.

O padrão de recortes apresentado pela margem e pelo calo do labelo são as principais características apontadas por diversos autores para justificar o reconhecimento de novas espécies relacionadas a *E. secundum* e *E. xanthinum* (Lindley, 1852-1859; Reichenbach, 1854; Schlechter, 1920). Porém, nota-se uma grande variação destas características até em indivíduos de uma mesma população (Fig. 3), bem como morfologias semelhantes entre plantas procedentes de regiões distintas (Fig. 4, 5). Algumas ilustrações de espécimes - tipo procedentes de regiões da Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas (Fig. 6) apresentam morfologias similares às dos indivíduos procedentes do Planalto Brasileiro (Fig. 3, 4), não sendo possível distingui-la morfológicamente com base apenas na sua procedência.

- Epidendrum secundum* Jacq., Enum. Syst. Pl. p. 29. 1760 (*et* Select. Stirp. Amer. Hist. p. 224, t. 137. 1763). Tipo: Martinica, (Lectótipo tab. 137, Select. Stirp. Amer. Hist. p. 224. 1763, designado por Hágsater, 1993).  
 = *E. elongatum* Jacq., Coll. 3:260, 1789. Tipo: VENEZUELA. Caracas, s.d., *Jacquin s.n.* (holótipo P).  
 = *E. ellipticum* Graham, Edinb. N. Phil. Hour. 1:171. 1826. Tipo: BRASIL. Rio de Janeiro, s.d., *Graham s.n.* (holótipo K).  
 = *E. crassifolium* Lindl., Gen. & Sp. Orch. Pl. p. 107. 1831. Tipo: BRASIL. Insula St. Vincentii, s.d., *Hooker s.n.* (holótipo K).  
 = *E. cochlidium* Lindl., Ann. Mag. Nat. Hist. 4:382. 1840. Tipo: PERU. Sem localidade, s.d., *Mathews 1868* (holótipo K).  
 = *E. lindenii* Lindl., Bot. Reg. 31 (misc.):48. 1845. Tipo: VENEZUELA. Merida, s.d., *L. Linden 636* (holótipo K).  
 = *E. brachyphyllum* Lindl., Fol. Orch. *Epidendrum* p. 72. 1853. Tipo: BOLÍVIA. Yungas, s.d., *Weddell 4255* (holótipo K).  
 = *E. fastigiatum* Lindl., Fol. Orch. *Epidendrum* p. 71, no. 224. 1853. Tipo: EQUADOR. Quito, s.d., *A Jamieson 1257* (holótipo K).  
 = *E. spinescens* Lindl., Folia Orch. *Epidendrum* p. 72. 1853. Tipo: BRASIL. Sem

- localidade, s.d., *Miers 3484* (holótipo K).
- = *E. ansiferum* Rchb. f., Bonpl. 2:111. 1854. Tipo: VENEZUELA. Caracas, *Otto 625* (holótipo W).
- = *E. fimbria* Rchb. f., Bonpl. 2:282. 1854. Tipo: COLOMBIA. Ocanna, s.d., *Schlim 990* (holótipo W).
- = *E. gracilicaule* Rchb. f. & Warsc., Bonpl. 2:111. 1854. Tipo: PERU. Sem localidade, s.d., *Warscewicz s.n.* (holótipo W).
- = *E. novogranatense* Rchb. f. & Warsc., Bonpl. 2:111. 1854. Tipo: COLOMBIA. Nova Granada, s.d., *Warscewicz s.n.* (holótipo W).
- = *E. xytriophorum* Rchb. f. & Warsc., Bonpl. 2:112. 1854. Tipo: PERU. Sem localidade, s.d., *Warscewicz s.n.* (holótipo W).
- = *E. incisum* Rchb. f. & Warsc., Bonpl. 2:112. 1854 ≡ *E. bulkeleyi* Hawkes, Orquidea 18:169. 1957 (non *E. incisum* Vell. 1827). Tipo: PERU. Sem localidade, s.d., *Warscewicz s.n.* (holótipo W).
- = *E. jamiesonis* Rchb. f., Bonpl. 4:327. 1856. Tipo: EQUADOR. Quito, s.d., *Jameson s.n.* (holótipo W).
- = *E. quitensium* Rchb. f., Walp. Ann. Bot. Syst. 6:392. 1862. Tipo: EQUADOR. Quito, s.d., *Jameson s.n.* (holótipo W).
- = *E. longihastatum* Barb. Rodr., Gen. Sp. Orch. Nov. 1:59. 1877. Tipo: BRASIL. Rio de Janeiro: Serra dos Órgãos, s.d., s.col., s.n. (holótipo R, provavelmente destruído).
- = *E. macrocyphum* Kraenzl., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 1:185. 1905. Tipo: PERU. Hualgayoc: Cajamarca, s.d., *Weberbauer 4119* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. herzogii* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 12:489. 1913. Tipo: BOLÍVIA. Rio San Mateo, IV.1911, *Herzog 2055* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. pedicellare* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 14:390. 1916. Tipo: EQUADOR. Quito, IX.1881, A. *Sodiro 51* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. pachyanthum* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 6:38. 1919. Tipo: VENEZUELA. Caracas, I.1904, *John s.n.* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. tricallosum* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 6:39. 1919. Tipo: VENEZUELA. Miranda, IX.1899, P. *Preub. 1681* (holótipo B, provavelmente destruído).

- = *E. antioquiense* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 7:125. 1920. Tipo: COLOMBIA. Antioquia, s.d., *Madero s.n.* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. dolichopus* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 7:131. 1920. Tipo: COLOMBIA. Cauca, s.d., *Madero s.n.* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. laxifoliatum* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 7:136. 1920. Tipo: COLOMBIA. Cauca, s.d., *Madero s.n.* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. melinanthum* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 7:139. 1920. Tipo: COLOMBIA. Cauca: Papagayeros, XI.1899, *Langlassé 11* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. pachyphyllum* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 7:140. 1920. Tipo: COLOMBIA. Cauca, s.d., *Madero s.n.* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. polyschistum* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 7:143. 1920. Tipo: COLOMBIA. Cauca, s.d., *Madero s.n.* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. quinquecallosum* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 7:145. 1920. Tipo: COLOMBIA. Cauca, s.d., *Madero s.n.* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. sterrophyllum* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 7:151. 1920. Tipo: COLOMBIA. Antioquia, s.d., *Madero s.n.* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. cuzcoense* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 9:82. 1921. Tipo: PERU. Cuzco: Sta. Anna, VI.1905, *Weberbauer 5005* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. haematanthum* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 9:86. 1921. Tipo: PERU. Tambo Cotani, VII.1902, *Weberbauer 1286* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. riobambae* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 8:85. 1921. Tipo: EQUADOR. Chimborazo, VIII.1913, *Mille 16* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. tarmense* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 9:94. 1921. Tipo: PERU. Huacapistana, XI.1902, *Weberbauer 1802* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. tunguraguae* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 8:87. 1921. Tipo: EQUADOR. Tunguragua, VI.1886, A. *Sodiro 69* (holótipo B, provavelmente destruído).

- = *E. versicolor* Hoehne & Schltr., Arch. Bot. Estad. S. Paulo 1(3):245. 1926. Tipo: BRASIL. São Paulo: Pico do Morro do Jaraguá, IV.1921, *Hoehne s.n.* (isótipo SP5470)
- = *E. coroicoense* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 27:60. 1929. Tipo: BOLÍVIA. La Paz: Coroico, XI.1912, *Buchtien 3692* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. syringodes* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 27:61, 1929. Tipo: BOLÍVIA. La Paz: Hacienda Casana, XII.1922, *Buchtien 7231* (holótipo B, provavelmente destruído).
- = *E. crassifolium* Lindl. var. *albescens* Pabst, Bradea 2(11):64. 1976. Tipo: BRASIL. São Paulo: São Paulo, Paranapiacaba, XII.1975, *Handro 2277* (holótipo HB).
- = *E. azulensis* D.E. Benn. & Christenson, Icones Orch Peruv. pl. 452. 1998. Tipo: PERU. Huanuco: Leoncio Prado, XI.1986, *Bennett et al. 3726* (holótipo USM).

Terrestre ou epífita. Caule simples, 6-1280cm, recoberto por bainhas amplexicaules, folhadas. Folhas dísticas, largamente lanceoladas a oblongo-lanceoladas, 32-170x10-43mm, ápice agudo. Inflorescência apical, simples, em corimbo, multifloro, 7-100cm compr., às vezes ramificada, produzindo outras inflorescências ou caules laterais, escapo muito mais longo que a raque, envolvido por bainhas 4-8cm compr.; brácteas 4-7mm compr.; pedicelo e ovário 11,4-28mm compr. Flores vermelhas, laranja, lilases ou brancas, com calo do labelo alvo e amarelo; sépalas oblongo-lanceoladas, a dorsal 6,8-13,4x1,3-5,1mm, ápice curtamente acuminado; sépalas laterais 4,5-14,3x2,9-6mm, ligeiramente falcadas; pétalas lanceoladas, 6,4-13,5x1,9-5,3mm, ápice curtamente acuminado; labelo trilobado, base em unguículo adnato à face ventral do ginostêmio, e lâmina livre, lâmina 3,4-7,1x5,6-13,7mm, margens denticuladas a fimbriadas, lobos laterais 1,8-4,9x1,6-6,9mm, orbiculares, lobo central 1,9-5,6x3,3-9,3mm, âmbito sub-obcordiforme a sub-orbicular, disco com calo de 2,2-5,4x1,5-5mm, sulcado longitudinalmente, recortado de diversas formas; coluna 4-6,9mm; antera terminal, polínias 4, ceróides, lateralmente achatadas com caudícula, rostelo fendido, paralelo ao eixo do ginostêmio.

Segundo Hagsäter (1993), apenas indivíduos procedentes das Pequenas Antilhas devem ser chamados de *E. secundum*, já que é a região onde o espécime tipo citado por Jacquin (1760) foi coletado. Porém, a flora destas ilhas é bastante semelhante à de diversas regiões continentais americanas, inclusive com a ocorrência das mesmas espécies tanto no continente como nas ilhas (Sastre, 1979; Lescure et al., 1991; Feldmann & Barré, 1993).

portanto, não há motivos para que indivíduos que ocorram no continente americano não sejam identificados como *E. secundum*, já que, aparentemente, as características de plantas das Pequenas Antilhas e plantas do continente são as mesmas (Garay & Sweet, 1974). *E. secundum* ocorre na Pequenas Antilhas e na América do Sul, em duas regiões principais, uma abrangendo a Cadeia dos Andes e o Planalto das Guianas e outra correspondendo ao Planalto Brasileiro (Fig. 7). Floresce o ano todo.

#### Espécimes examinados

*E. secundum* – flores lilases

BRASIL. BAHIA: Abaíra, III.1992, T. Laessoe & T. Silva s.n. (SPF89121); Água Quente, Pico das Almas, XII.1988, R.M. Harley 27270 & D.J.N. Hind (SPF), XII.1988, R.M. Harley 27270 & D.J.N. Hind (SPF); Andaraí, II.1977, R.M. Harley 18757 (SPF), XI.1983, L.R. Noblick & A. Pinto 2900 (SP); Barra da Estiva, Morro do Ouro, VII.1981, A.M. Giulietti et al. s.n. (SP195343), XI.1992, M.M. Arbo et al. 5709 (SPF); Delfino, III.1974, R.M. Harley 17012 (SPF); Jacobina, X.1990, A. Freire-Fierro et al. s.n. (SPF79937); Lagoinha, III.1974, R.M. Harley 17012 (HB); Lençóis, IX.1994, M.L. Guedes et al. s.n. (SPF103600), Morro do Pai Inácio, VII.1985, T.M. Cerati et al. 293 (SP), VIII.1996, A.A. Conceição 116 & A.A. Grillo (SPF), VIII.1996, A.A. Conceição 136 & A.A. Grillo (SPF), XII.1984, R. Mello-Silva et al. s.n. (SPF36979); Morro do Chapéu, Cachoeira do Ferro Doido, XI.1980, A. Furlan et al. s.n. (SP195363), Chapada Diamantina, IV.1976, G. Davidse & W.G. D'Arcy 11875 (SP), IV.1976, G. Davidse & W.G. D'Arcy 11913 (SP), X.1978, G. Martinelli 5284 et al. (RB), XI.1992, M.M. Arbo et al. 5397 (SPF); Mucugê, II.1994, R.M. Harley et al. s.n. (SPF94905), IX.1981, A. Furlan et al. s.n. (SPF18972), IX.1981, J.R. Pirani et al. s.n. (SP195383), IX.1981, J.R. Pirani et al. s.n. (SPF18912), VII.1985, T.M. Cerati et al. 330 (SP), XI.1980, A. Furlan et al. s.n. (SPF17976), XII.1980, A. Furlan et al. s.n. (SPF18035), XII.1984, G.P. Lewis et al. s.n. (SPF36868); Palmeiras, I.1997, A.A. Conceição 229 (SPF), I.1997, A.A. Conceição 330 (SPF), Morro do Pai Inácio, II.1997, A.A. Conceição 394 & F.P. Gomes (SPF), X.1994, A.M. Carvalho et al. s.n. (SPF104870); Rio de Contas, II.1987, R.M. Harley et al. 24454 (SPF), III.1977, R.M. Harley 19703 (SPF), Pico das Almas, Jussiape, XI.1988, R.M. Harley 26171 (SPF), XI.1988, R.M. Harley 26132 (SPF), XI.1988, R.M. Harley et al. 26132 (SPF); Rui Barbosa, X.1978, E.F. Almeida 24 (RB); Santa Terezinha, Serra da Pioneira, VI.1984, L. Noblick et al. 3315 (SP). CEARÁ: Serra de Maranguape, XI.1955, A. Lima s.n. HB19619. ESPÍRITO SANTO: Castelo, V.1949, A.C. Brade 19778 (RB), XI.1973, A. Seidel 1021 (HB); Pedra Azul, II.1970, R. Kautsky 230 (HB); Santa Teresa, VIII.1996, A.L.B. Sartori 142 et al. (UEC); Venda Nova, I.1976, L. Zapii 9 (HB). GOIÁS: Alto Paraíso, Chapada dos Veadeiros, II.1966, H.S. Irwin et al. s.n. (SP110656), II.1966, H.S. Irwin 12429 et al. (HB), II.1979, Gates & Estabrook s.n. (RB268632), III.1973, W.R. Anderson 6376 (HB), VI.1965, F.R. Rosa 42 (RB); Brasília, V.1964, E.P. Heringer 9679 (HB), s.d., E.P. Heringer 9991 (HB), I.1966, G.F.J. Pabst et al. 8745 (HB); Formosa, Fazenda dos Pernambucanos, III.1996, M.A. Silva et al. 2883 (SP); Sobradinho, X.1965, H.S. Irwin et al. 8850 (HB). MINAS GERAIS: Araxá, Serra da Canastra, II.1978, G.J. Shepherd et al. 7147 (UEC); Bom Jardim de Minas, II.1998, J.H.A. Dutilh 60 & W.M. Ferreira (UEC); Caeté, Serra da Piedade, I.1971, H.S. Irwin 30243 et al. (HB), Serra da Piedade, III.1957, E. Pereira 2667 & G.F.J. Pabst (HB); Caldas, Pedra Branca, I.1919, F.C. Hoehne s.n. (SP2902); Cantoni, III.1970, H.S. Irwin 27236 et al. (HB); Caparaó, Serra do Caparaó, X.1941, A.C. Brade 17142 (RB); Carrancas, VII.1987, L.S. Kinoshita-



Gouveia et al. s.n. (UEC47676); Conceição do Rio Verde, VI.1957, G.F.J. Pabst 4128 (HB); Congonhas do Norte, III.1998, R.C. Forzza et al. 690 (SPF); Congonhas, Serra da Moeda, IV.1957, E. Pereira 3117 & G.F.J. Pabst (HB); Datas, I.1988, R. Mello-Silva et al. s.n. (SPF63898), II.1998, A. Rapini et al. 499 (SPF); Descoberto, VIII.2002, R.M. Castro 583 et al. (RB); Diamantina, I.1995, N.S. Ávila s.n. (SPF96281), II.1998, A. Rapini et al. 494 (SPF), III.1970, H.S. Irwin et al. s.n. (SP141002), Serra de Biribiri, VII.1965, S.F. Glassman & J.C. Gomes Jr. s.n. (SP108363), VII.1996, L.R. Parra et al. 85 (SPF); Dolores do Turvo, IV.1926, F.C. Hoehne & A. Gehrt s.n. (SP17561); Gouveia, VI.1991, R. Mello-Silva et al. 397 (SPF); Itabirito, Pico do Itabirito, II.1968, H.S. Irwin 19856 (HB); Itacambira, II.1988, J.R. Pirani et al. 2281 (SPF); Joaquim Felício, IV.1981, L. Rossi et al. s.n. (SP195414), IV.1981, L. Rossi et al. s.n. (SPF23033); Lavras, XII.1980, H.F. Leitão Filho et al. 11940 (UEC); Miguel Burnier, I.1921, F.C. Hoehne s.n. (SP5122); Nazareno, IV.1996, E.L. Borba 181 (UEC); Ouro Preto, Itacolomi, II.1892, E. Ulle 284 (R); Paraopeba, V.1956, E.P. Heringer 5162 (HB); Rio Acima, Gandarela, VII.1972, L. Emygdio 3383 et al. (R); Santa Bárbara, I.1921, F.C. Hoehne s.n. (SP5061), I.1994, A.M. Giulietti et al. s.n. (SPF93872), I.1994, A.M. Giulietti et al. s.n. (SPF93874), III.1957, G.F.J. Pabst 4150 (HB); Santana do Riacho, II.1991, M.M. Arbo et al. 4943 (SPF); II.1996, R.C. Forzza et al. 175 (SPF), III.1982, I. Cordeiro et al. s.n. (SPF8180), III.1994, M.T.V.A. Campos & J.M. Arcanjo s.n. (SPF106625), III.2002, J.R. Pirani et al. 5031 (SPF), V.1990, M.M. Arbo 4255 (SPF), VII.1999, L.R. Lima et al. 40 (SPF); Santo Antônio do Itambé, II.1972, W.R. Anderson et al. 35707 (HB), II.1972, W.R. Anderson et al. 35955 (HB); São João Del Rey, I.1994, A.M. Giulietti et al. s.n. (SPF92669); São Roque de Minas, VII.1999, M.A. Farinaccio et al. 365 (SPF); São Tomé das Letras, XI.1984, I. Cordeiro et al. s.n. (SPF35571); Serro, III.1963, M. Magalhães 18948 (HB), Trinta Réis, I.1986, H.L. Wagner et al. s.n. (SP272746); Tiradentes, II.1980, P.G. Windish 2620 (HB), III.1986, R. Mello-Silva et al. s.n. (SPF42962), XI.1987, D.C. Zappi et al. s.n. (SPF46856), I.1986, H.L. Wagner et al. s.n. (SPF41627); Unaí, Fazenda São Miguel, XI.1993, M.A. Silva et al. 1751 (SP). PARANÁ: Campo Largo, Serra do Purunã, III.1981, R. Kummrow 1510 (SP); Guaraqueçaba, Rio do Cedro, X.1967, G. Hatschbach 17518 (MBM); Guaratuba, Alto da Serra, II.1980, P.I. Oliveira 202 (SP), Alto da Serra, IV.1982, R. Kummrow 1904 (SP); Jaguariaíva, IV.1994, J. Noschang et al. s.n. (UEC83328); Morretes, V.1966, G. Hatschbach 14469 (MBM); Palmeira, Rio Tibagi, II.1982, P.I. Oliveira 371 (SP). PERNAMBUCO: Caruaru, Brejo da Madre de Deus, XI.1968, A.B.G. Ferreira 4 (HB). RIO DE JANEIRO: Angra dos Reis, IX.1964, Z.A. Trinta 880 & E. Fromm (R); Itatiaia, IV.1926, A.J. Sampaio 4074 (R), VII.1902, P. Dusén 726 (R), XII.1952, N. Welter 49 (HB); Magé, Serra da Estrela, II.1917, C. Diogo 649 (R); Mauá, IV.1962, I.E. Pabst s.n. (HB19810); Nova Friburgo, I.1951, J. Moura 51 (HB), XI.1982, C. Farney 148 (RB); Parati, Morro do Cuscuzeiro, III.1995, L.C. Giordano et al. 1850 (RB); Penedo, VII.1988, s.c. (SP254759); Petrópolis, 1947, O.C. Góes 68 (RB), I.1968, D. Sucre 2253 & P.I.S. Braga (HB), II.1928, C. Spannagel 12 (SP), XII.1949, G.F.J. Pabst 463 (HB); Pirai, Serra das Araras, VI.1961, G.F.J. Pabst 5614 (HB); Rio de Janeiro, Corcovado, III.1973, D. Araújo 160 (RB), Pedra da Gávea, XI.1949, G.F.J. Pabst 455 (HB), Pico da Tijuca, VII.1944, F. Segadas-Vianna 592 (R), Serra da Carioca, IV.1975, G.F.J. Pabst 9611 (HB), Pedra da Gávea, II.1976, W.R. Anderson 11679 (HB); Santa Maria Madalena, Pedra do Desengano, III.2002, C.G. Gomes et al. 147 (SPF); Teresópolis, VII.1918, F.C. Hoehne s.n. (SP2320). SANTA CATARINA: Apeúna, II.1966, H.D. Bicalho 101 (SP); Itajaí, IV.1954, R. Reitz & R.M. Klein 1820 (HB); Joinville, II.1950, G.F.J. Pabst s.n. (HB516); Lauro Muller, s.d., R. Reitz & R.M. Klein 8781 (HB), Serra do Rio do Rastro, XII.1995, E.L. Borba et al. 175 (SP), XII.1995, E.L. Borba 175 et al. (UEC); Morro do Cambirela, VI.1953, P.J.A. Rohr s.n. (HB2058);

Pilões, I.1956, R. Reitz & R.M. Klein 2526 (HB); Rio do Sul, VIII.1958, R. Reitz & R.M. Klein 6975 (HB); Vidal Ramos, VII.1957, R. Reitz & Klein 4525 (HB). SÃO PAULO: Alto da Serra, II.1899, G. Edwall s.n. (SP29354); Amparo, VIII.1943, M. Kuhlmann 980 (SP); Atibaia, Pedra Grande, II.2001, F. Pinheiro 202 & M.C.C. Inês (SP), Pedra Grande, L.S. Kinoshita & A.M.G.A. Tozzi s.n. (SP295527); Bananal, Serra da Bocaina, IX.1994, E.A. Rodrigues et al. 248 (SP), Serra da Bocaina, IX.1994, E.L.M. Catharino et al. 2029 (SP); Biritiba-Mirim, Estação Biológica de Boracéia, IX.1984, S. Romaniuc Neto & A. Custodio Filho 218 (SP), IX.1983, A. Custodio Filho 1511 (SP), VIII.1983, A. Custodio Filho 1427 (SP), VIII.1983, A. Custodio Filho 1428 (SP), VIII.1983, A. Custodio Filho 1429 (SP), VIII.1983, A. Custodio Filho 1477 (SP), VIII.1984, A. Custodio Filho 2522 (SP); Caieiras, VIII.1994, A.M. Giulietti et al. 1194 (SPF); Caraguatatuba, VI.1963, H.D. Bicalho s.n. (SP168402); Cotia, VI.1926, F.C. Hoehne s.n. (SP29342), VI.1930, P. Gonçalves s.n. (SP25579); Cunha, III.1994, J.B. Baitello 485 (SP), III.1994, J.B. Baitello 570 (SP), Parque Estadual da Serra do Mar, III.1996, M. Kirizawa et al. 3250 (SP), XII.1996, J.P. Souza et al. 759 (SP); Eldorado, IX.1995, R.R. Rodrigues et al. 136 (SP), IX.1995, V.C. Souza et al. 9059 (SP); Iguape, XII.1992, L. Rossi et al. 1233 (SP); Iporanga, Fazenda Intervales, V.1996, C.B. Costa, et al. 250 (SP), Fazenda Intervales, VIII.1992, S.J.G. Silva et al. 337 (SP); Itapeva, VI.1994, V.C. Souza et al. 6030 (SP); Itararé, Bonsucesso de Itararé, VI.1994, V.C. Souza et al. 6074 (SP), Campos de São Pedro, X.1966, J. Matos 14040 (SP), Fazenda Santa Isabel, II.2000, F. Barros 3033 (SP), I.1996, V.C. Souza et al. 10614 (SP), V.1995, P.H. Miyagi et al. 582 (SP), VI.1994, V.C. Souza et al. 6177 (SP), XI.1993, V.C. Souza et al. 4793 (ESA); Jeriquara, IX.1965, H.D. Bicalho 64 (SP); Jundiá, Serra do Japi, IX.1983, S.C. Chiea 350 (SP), Serra do Japi, VII.1995, J.R. Pirani et al. s.n. (SP303111), Serra do Japi, VII.1995, J.R. Pirani et al. s.n. (SPF103258); Lavrinhas, IV.1995, L.S. Kinoshita 951 & G.J. Shepherd (UEC); Mogi das Cruzes, IX.1983, M. Kirizawa et al. 1046 (SP); Mongaguá, III.1972, T. Yamagushi s.n. (SP118046); Piquete, V.1996, G.F. Árbocz et al. 2809 (SP), VI.1995, A.M. Giulietti s.n. (SPF107094); Ribeirão Pires, II.1982, O. Handro 2304 (SP); Salesópolis, Estação Biológica de Boracéia, A. Custodio Filho & T.M. Cerati 1373 (SP), Estação Biológica de Boracéia, IV.1985, C.B. Toledo & M. Sugiyama 77 (SP), Estação Biológica de Boracéia, V.1985, T.P. Guerra et al. 98 (SP), Estação Biológica de Boracéia, VII.1983, T.M. Cerati, V.1985, T.P. Guerra et al. 98 (SP), Estação Biológica de Boracéia, VIII.1965, J. Matos 12456 & A. Custodio Filho 51 (SP), Estação Biológica de Boracéia, VIII.1983, A. Custodio Filho 1476 (SP), Estação Biológica de Boracéia, VIII.1998, R.C. Tardivo et al. 223 (SP), II.2001, F. Pinheiro 214 & Biológica de Boracéia, VIII.1998, R.C. Tardivo et al. 223 (SP), IX.1994, R. Simão-M.C.C. Inês (SP), IX.1991, S.J.G. Silva & E.P. Piacentin 231 (SP), VIII.1965, J. Mattos Bianchini et al. 480 (SP), IX.1994, R.T. Shirasuna et al. 39 (SP), VIII.1965, J. Mattos Bianchini et al. 480 (SP), IX.1976, P.H. Davis et al. s.n. (SP154616), Paranapiacaba, 12456 (SP); Santo André, IX.1976, P.H. Davis et al. s.n. (SP154616), São Bernardo do Campo, II.2001, F. X.1996, M. Kirizawa & E.A. Lopes 3310 (SP); São Francisco Xavier, VIII.1994, J.Y. Tamashiro et al. Pinheiro 226 & M.C.C. Inês (SP); São José do Barreiro, Parque Nacional da Bocaina, E.L.M. Catharino & L. 513 (SP); São José do Barreiro, Parque Nacional da Bocaina, E.L.M. Catharino & L. Rossi, 1047 (SP), V.1997, R. Simão-Bianchini & S. Bianchini 1166 (SP); São Paulo, Butantan, VI.1917, F.C. Hoehne s.n. (SP214), Marsilac, VI.1996, R.J.F. Garcia et al. 906 (SP), Núcleo Curucutu, I.1996, R. Simão-Bianchini et al. 921 (SP), Núcleo Curucutu, III.1998, P. Affonso et al. 181 (PMSP), Núcleo Curucutu, VIII.1995, S.A.P. Godoy et al. 746 (SP), Núcleo Curucutu, XI.1997, R.J.F. Garcia et al. 1395 (SP), Núcleo Curucutu, XII.1998, R.J.F. Garcia et al. 1687 (SP), Parelheiros, IV.1995, S.A.P. Godoy et al. 480 (SP), Serra da Cantareira, III.1932, F.C. Hoehne s.n. (SP30520), Mooca, A.C. Brade 7512 (HB); Serra da Bocaina, IV.1894, A. Loeffgren & G. Edwall s.n. (SP29347); Ubatuba, IV.1991, M. Kirizawa & E.A. Lopes 2440 (SP); Votorantim, XII.1998, A.M.G.A. Tozzi et al. 222 (UEC). VENEZUELA. Miranda, Santa Cruz, III.1978, J.A. Steyermark & G.

*Davidse 116643* (HB)

*E. secundum* – flores vermelhas ou laranja  
BRASIL. GOIÁS: Alto Paraíso, XII.1968, G.M. Barroso et al. 512 (HB); Brasília, Chapada da Contagem, VIII.1965, R.R. Santos & R. Souza 7872 (HB); Jataí, VII.1951, A. Macedo 3340 (RB); Taguatinga, VIII.1981, E.P. Heringer et al. 7351 (HB). MINAS GERAIS: Ituiutaba, II.1950, A. Macedo 2111 (RB); Santa Bárbara, Serra da Caraça, XII.2002, F. Pinheiro et al. 191 (SP). PERNAMBUCO: Canhotinho, XI.1968, Duch s.n. (HB42314). SANTA CATARINA: Itajaí, Morro da Fazenda, II.1955, R.Klein 1164 (HB). SÃO PAULO: Cruzeiro, Pico dos Marins, Y. Nagatani s.n. (GORO17876); Ibiúna, VIII.1995, O.T. Aguiar & J.A. Pastore 579 (SP), XI.1997, G. Hashimoto s.n. (GORO17875); Itapeçerica da Serra, V.1936, A. Gehrt s.n. (SP35294); Miracatú, XI.1984, P. Martuscelli 86 (SP); São Paulo, Instituto de Botânica, II.1961, C.G. Fonseca 6 (SP), Jardim Botânico, XI.1952, O. Handro 324 (SP); Tapiraí, Sítio da Pedra, X.1994, K.D. Barreto et al. 3091 (SP). EQUADOR. Pichincha, Tandapi, VIII.1978, G.L. Webster 22974 (MBM), Lloa, XII.1939, E. Asplund 10086 (R), Nanegal, VIII.1955, E. Asplund 17265 (R)

*Epidendrum xanthinum* Lindl., Bot. Reg. 30:(misc.)18. 1844 ≡ *E. ellipticum* var. *flavum* Lindl., Ann. Nat. Hist. 4:382, 1840. Tipo: BRASIL. Minas Gerais: Serro do Frio, s.d., Martius 5205 (holótipo K).

= *E. magelhaesii* Schltr. Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 16:445, 1920. Tipo: BRASIL. Minas Gerais: Serra do Ouro Preto, II.1894, M. Gomez 1947 (holótipo B, provavelmente destruído).

Terrestre ou epífita. Caule simples, 35-1750cm compr., recoberto por bainhas amplexicaules, folhadas. Folhas dísticas, largamente lanceoladas a oblongo-lanceoladas, 45-230x21-52mm, ápice agudo. Inflorescência apical, simples, em corimbo, multifloro, 18-94cm compr., às vezes ramificada, produzindo outras inflorescências ou caules laterais, escapo muito mais longo que a raque, envolvido por bainhas 4-8cm compr.; brácteas 3-7mm compr.; pedicelo e ovário 24,5-39mm compr. Flores amarelas; sépalas oblongo-lanceoladas, a dorsal 9,8-15,5x4,3-5,8mm, ápice curtamente acuminado; sépalas laterais 9,8-14,9x4,6-6,1mm, ligeiramente falcadas; pétalas lanceoladas, 10,1-15,5x3-6mm, ápice curtamente acuminado; labelo trilobado, base em unguículo adnato à face ventral do ginostêmio, lâmina livre, lâmina 4,6-6,5x8,7-11mm, margens denticuladas ou fimbriadas, lobos laterais 3,2-4,8x3,2-3,9mm, orbiculares, lobo central 2,2-4x5-8,9mm, âmbito sub-obcordiforme a sub-orbicular, disco com calo de 3,3-3,6x1,9-3,3mm, sulcado longitudinalmente, recortado de diversas formas; coluna 5,2-7,5mm compr.; antera

terminal, polínias 4, ceróides, lateralmente achatadas com caudícula, rostelo fendido, paralelo ao eixo do ginostêmio.

Pinheiro & Barros (capítulo 4) e Pinheiro et al. (capítulo 3) utilizaram em suas análises indivíduos com flores amarelas provenientes do Planalto Brasileiro. Dentro do complexo *E. secundum*, o nome mais antigo estabelecido para o Planalto Brasileiro, com flores amarelas, é *E. xanthinum* (Lindley, 1844), sendo adotado portanto este nome. Porém, plantas de flores amarelas também ocorrem na Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas e, identificar esses indivíduos como *E. secundum* ou *E. xanthinum* resultaria numa delimitação duvidosa já que estas plantas não fizeram parte das análises realizadas por Pinheiro & Barros (capítulo 4) e Pinheiro et al. (capítulo 3). Portanto, indivíduos de flores amarelas, procedentes da Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas devem ser classificados como *E. dichotomum* Presl., uma espécie descrita em 1827, procedente do Peru, até que plantas destas regiões sejam analisadas e seu parentesco com outras populações seja estabelecido. *E. xanthinum* ocorre no Planalto Brasileiro, em algumas serras na Cadeia do Espinhaço e na Serra dos Órgãos (Fig. 8). Floresce o ano todo.

#### Espécimes examinados

BRASIL. MINAS GERAIS: Ouro Preto, Itacolomi, II.1892, E. Ulle 284 (RB); Santa Bárbara, Serra da Caraça I.1971, H.S. Irwin et al. 29073 (HB), II.1974, H.E. Stang s.n. (HB60667), III.1976, R. Windisch & A. Ghillany 515 (HB), XII.2002, F. Pinheiro et al. 190 (SP); Santo Antônio do Itambé, Pico do Itambé, II.1972, W.R. Anderson et al. 35877 (SPF), IV.1982, A. Furlan et al. s.n. (SPF23256). RIO DE JANEIRO: Itaipava, I.1963, G.F.J. Pabst 7242 (HB); Nova Friburgo, I.1960, G.F.J. Pabst 5234 (HB), XI.1956, C. Vale 265 (HB), XI.1982, C. Farney 149 (RB); Petrópolis, Cascatinha, I.1933, C. Spannagel 361 (SP), V.1967, J. Fontella 169 (RB), XI.1967, P.I.S. Braga 7 (RB); Santa Maria Madalena, II.1934, A.C. Brade 13320 & S. Lima (RB), III.1935, A.C. Brade 14298 & S. Lima (RB), III.1955, E. Pereira 1288 (RB), VI.1989, G. Martinelli 13361 et al. (RB), X.1988, G. Martinelli 13127 et al. (RB), XII.1988, G. Martinelli 13215 et al. (RB), XII.1988, M. Leitman et al. 319 (RB); Teresópolis, I.1977, B. Orssich s.n. (HB66531); Trajano de Moraes, XII.1965, E. Santos 2218 & B. Flaster (HB), XII.1965, E. Santos 2213 & B. Flaster (R).

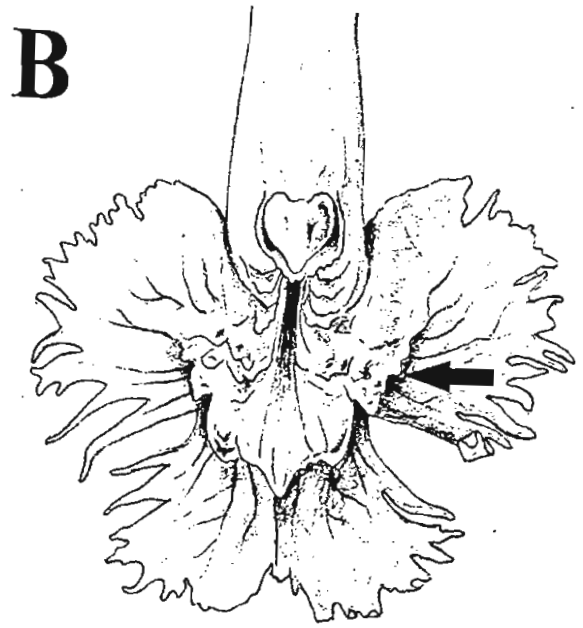
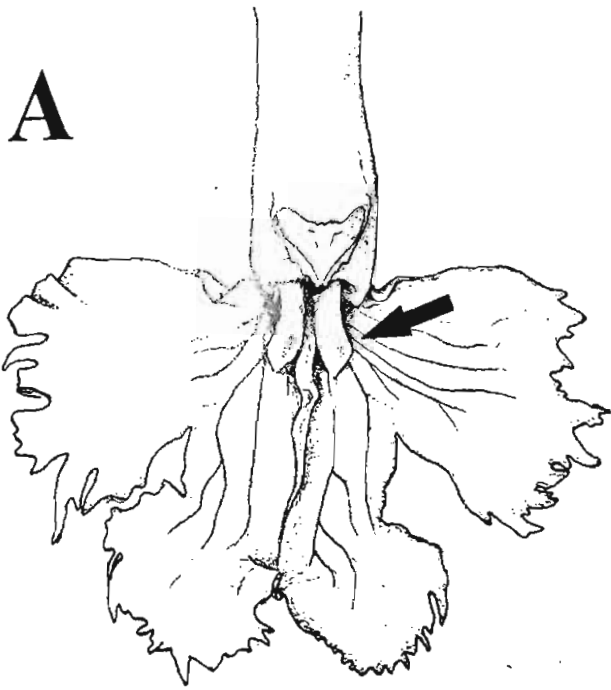


Figura 1: Esquema do labelo mostrando o calo característico, indicado pela seta, dos representantes da subseção *Carinata* (A) e *Tuberculata* (B).

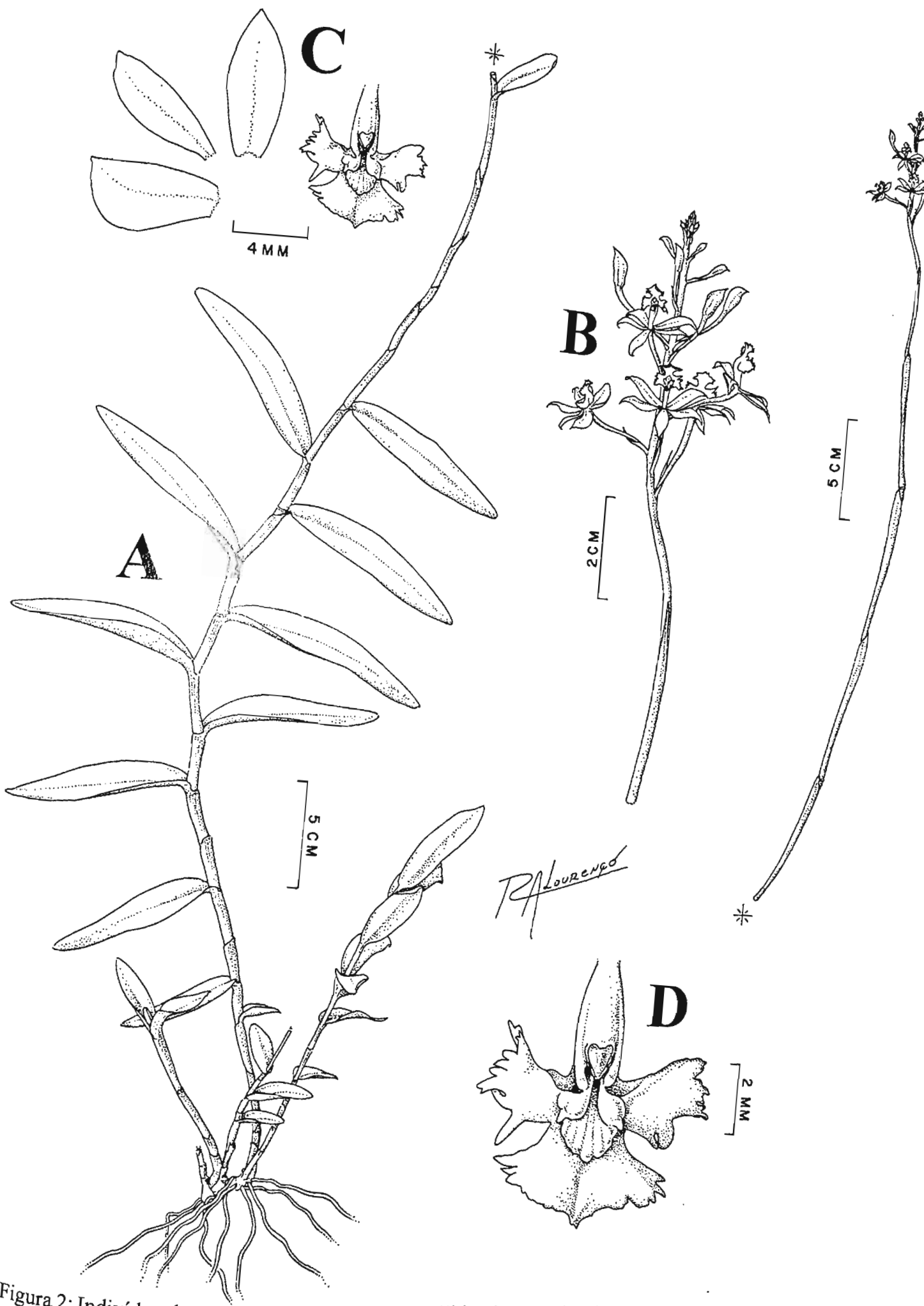


Figura 2: Indivíduo do complexo *E. secundum*. A = Hábito; B = Detalhe da inflorescência; C = Flor dissecada; D = Labelo e coluna.

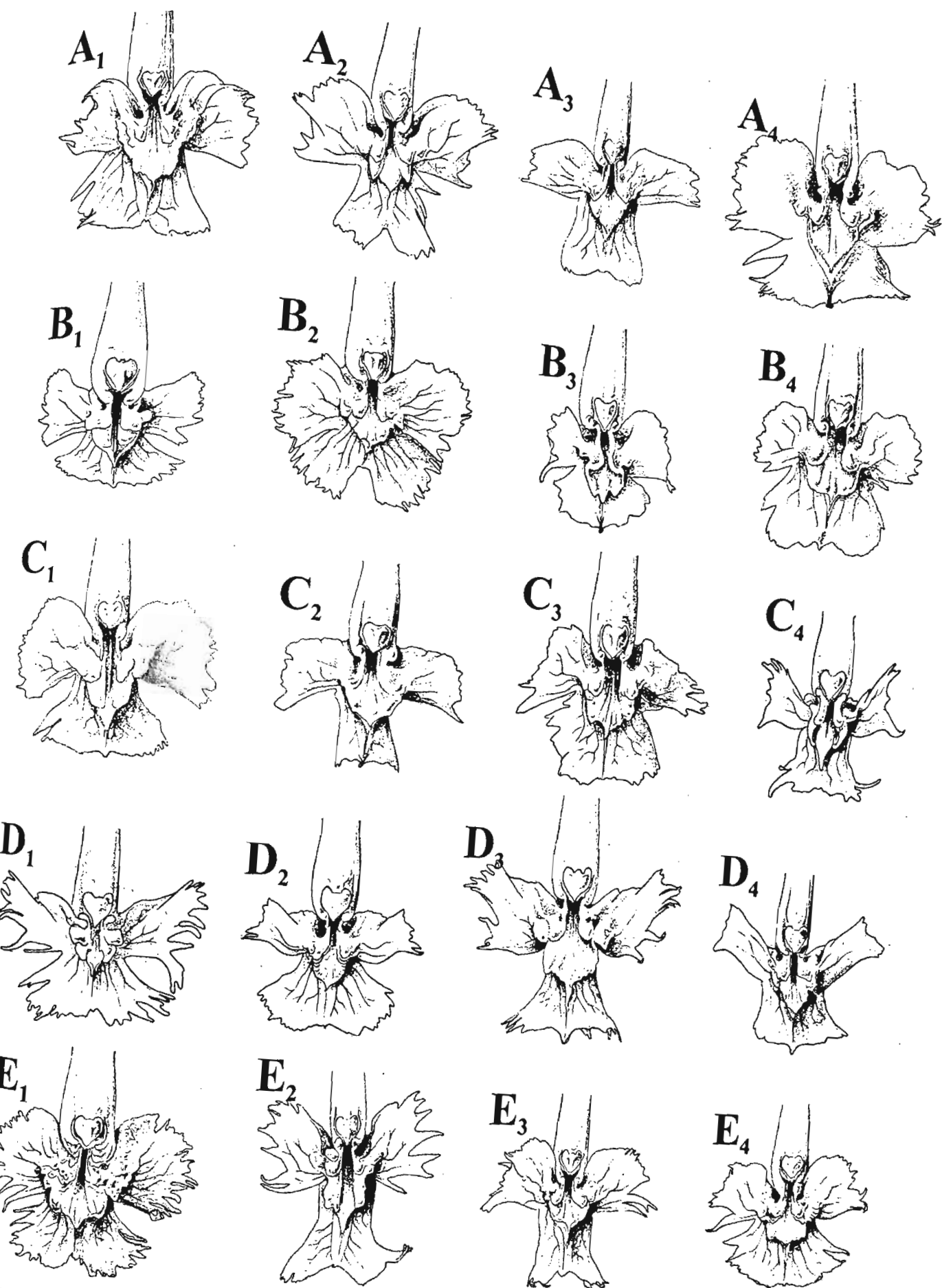


Figura 3: Variação morfológica intra e interpopulacional de indivíduos de *E. secundum*. A = Araguatatuba (SP); B = Rio de Contas (BA); C = Pindamonhangaba (SP); D = Santana do Riacho (RJ); E = Nova Friburgo (RJ).

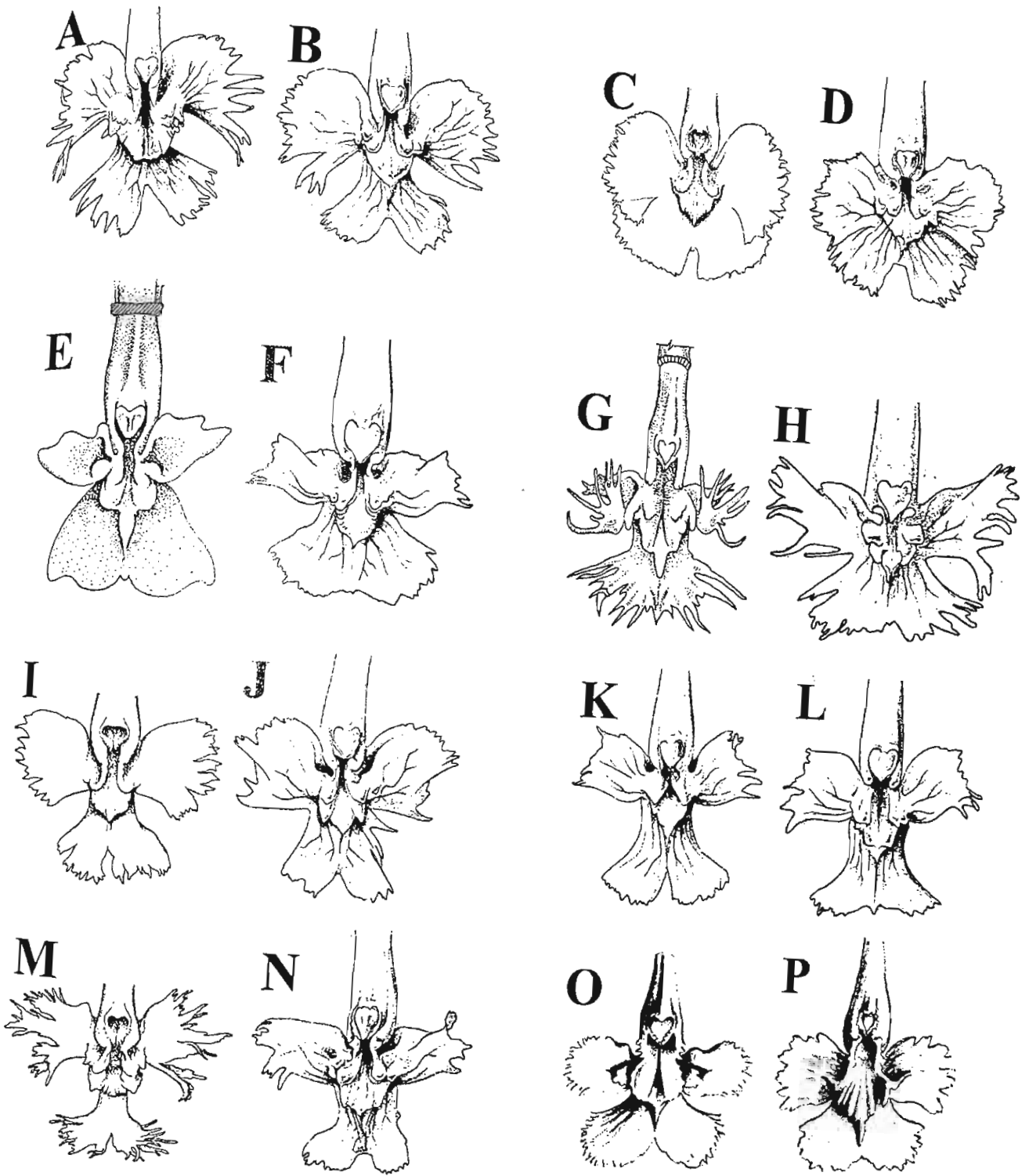


Figura 4: Ilustrações de indivíduos de *E. secundum* que, apesar de procederem de regiões distintas, possuem o mesmo padrão morfológico. A, C, E, G, I, K, M e O = Cadeia dos Andes; B, D, F, H, J, L, N e P = Planalto Brasileiro. C, I, M = Modificados de Dunsterville (1979); E = Modificado de Bennett & Christenson (1998); G = Modificado de Bennett & Christenson (1995); O, P = Modificados de ilustrações presentes nos espécimes - tipo depositados no Herbário K.

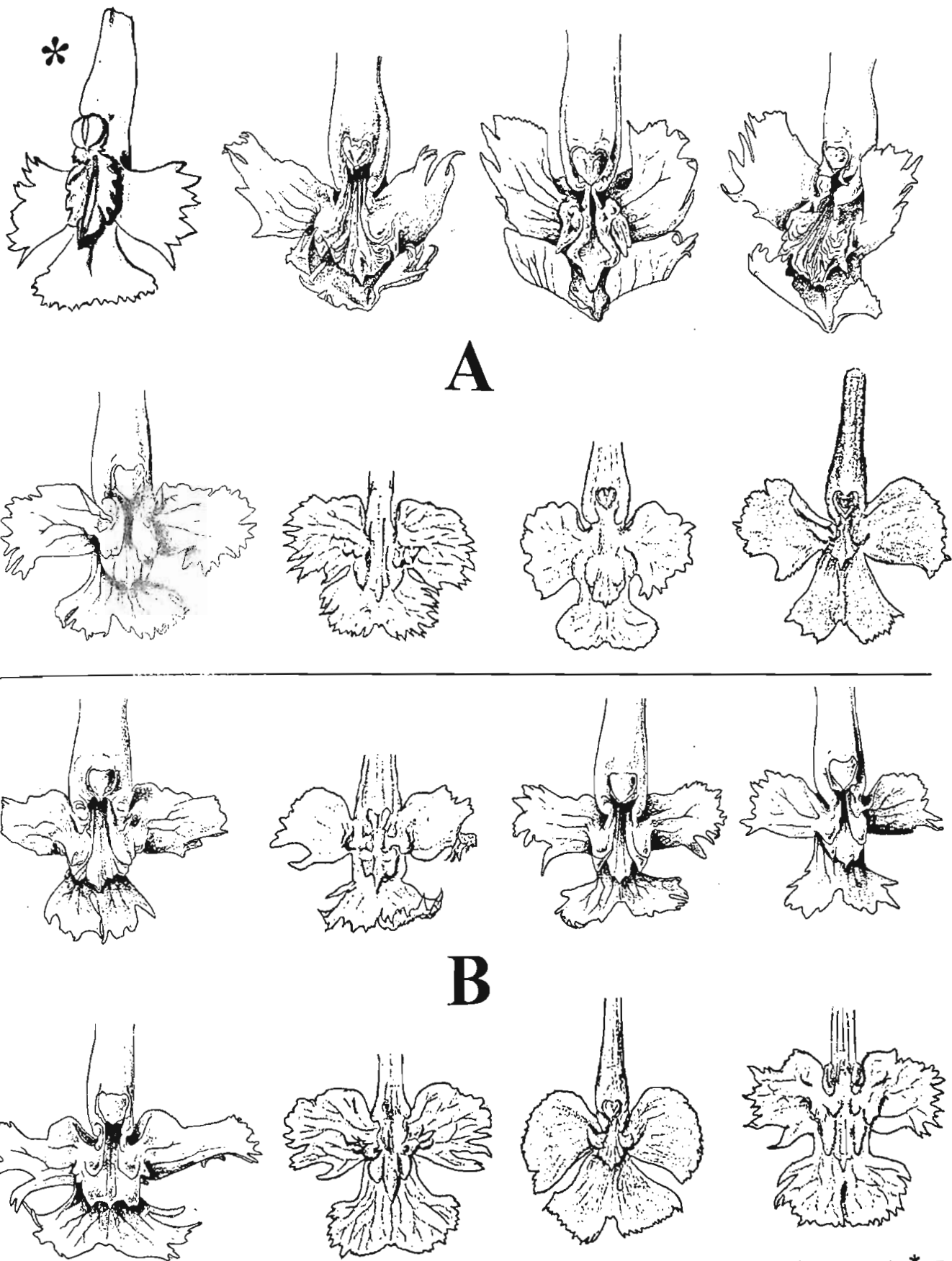


Figura 5: Indivíduos de *E. xanthinum*. A = Cadeia do Espinhaço (MG); B = Serra dos Órgãos (RJ); \* = Adaptado da ilustração presente no espécime - tipo depositado no herbário K.

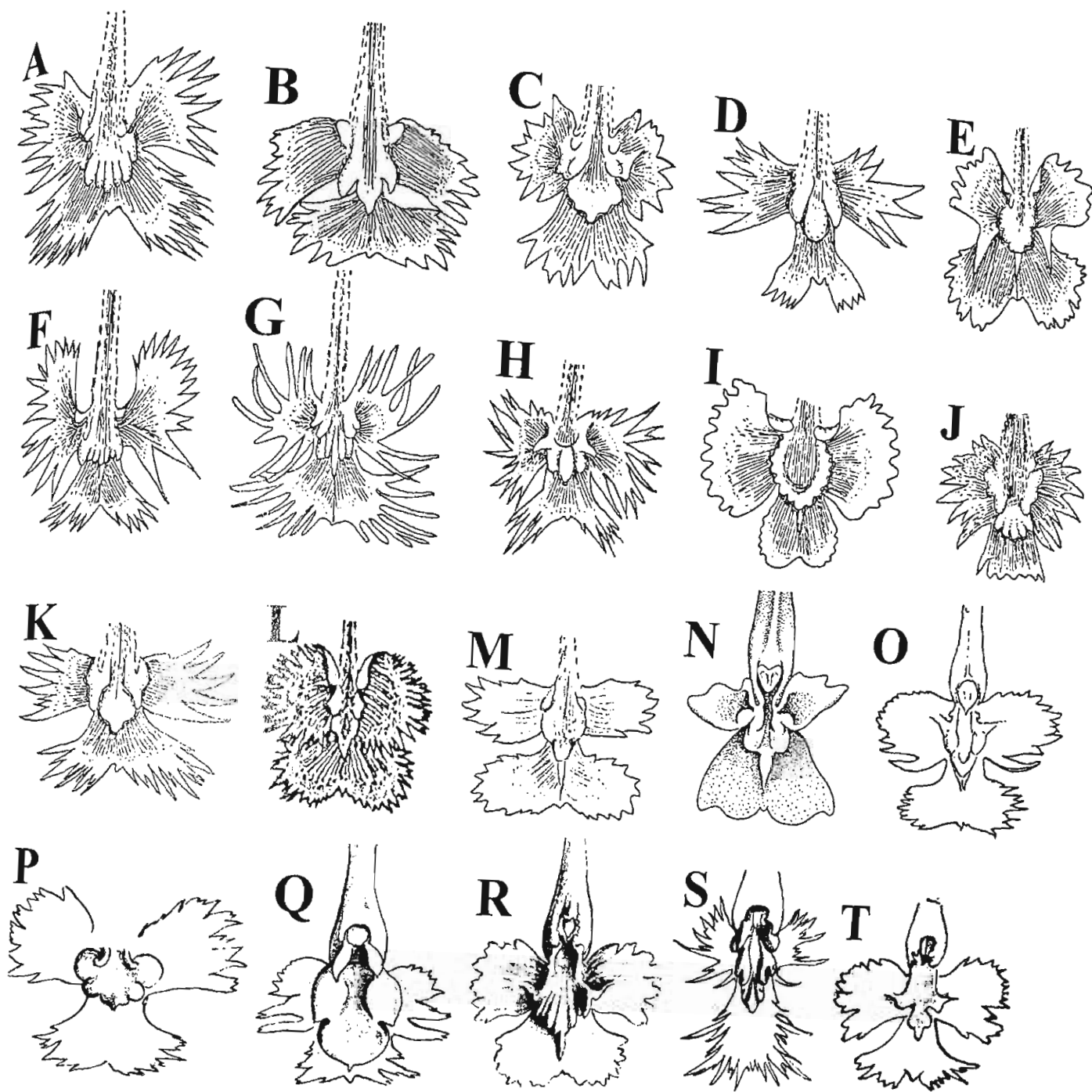


Figura 6: Ilustrações que representam espécimes - tipo de algumas espécies descritas para o complexo *E. secundum*. A = *E. dolichopus*; B = *E. tricallosum*; C = *E. cuzcoense*; D = *E. melinanthum*; E = *E. laxifoliatum*; F = *E. pachyphyllum*; G = *E. polyschistum*; H = *E. quinquecallosum*; I = *E. antioquiense*; J = *E. tarmense*; K = *E. sterrophyllum*; L = *E. herzogii*; M = *E. magelhaesii*; N = *E. azulensis*; O = *E. spinescens*; P = *E. lindenii*; Q = *E. cochlidium*; R = *E. crassifolium*; S = *E. fastigiatum*; T = *E. brachyphyllum*. A - K: Modificado de Mansfeld (1929); L e M: Modificado de Mansfeld (1930); N: Modificado de Bennet & Christenson (1998); O - T: Modificados de ilustrações presentes nos espécimes - tipo depositados no Herbário K.



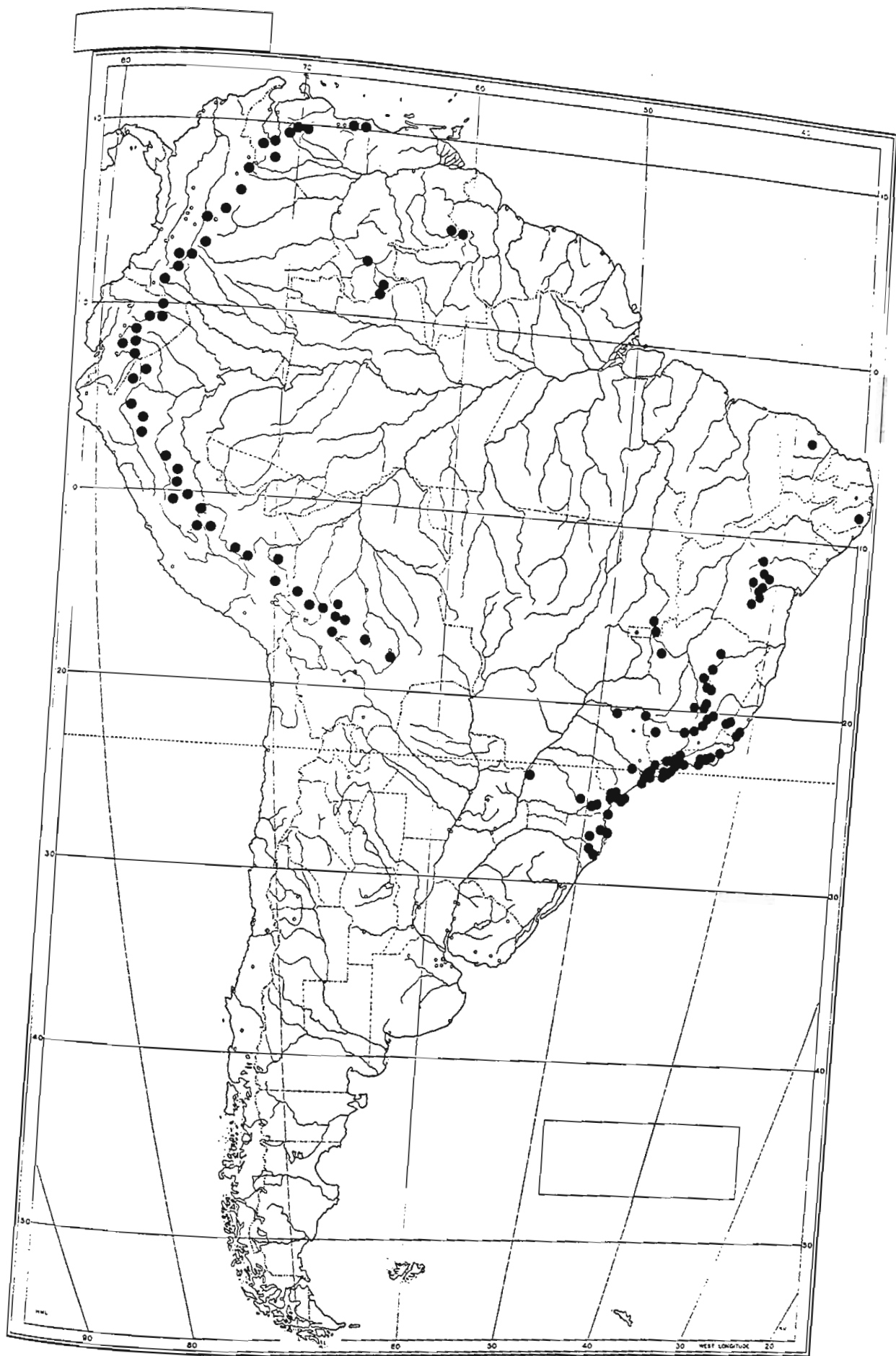


Figura 7: Distribuição geográfica de *E. secundum* na América do Sul.

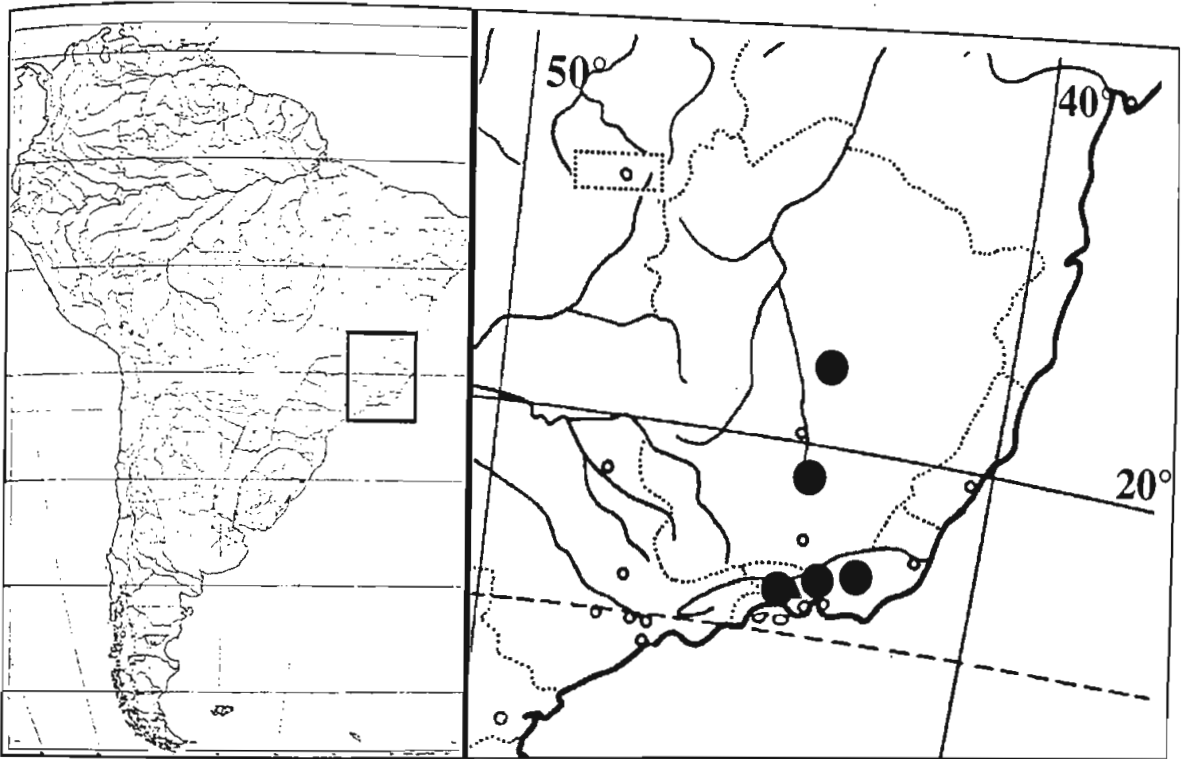


Figura 8: Distribuição geográfica de *E. xanthinum*.

## Capítulo 6

### Conclusões gerais

Fábio Pinheiro<sup>1,2</sup> & Fábio de Barros<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Botânica – Seção de Curadoria de Herbário. <sup>2</sup>Instituto de Biociências, Departamento de Botânica - USP

A utilização de mais de um método para levantar dados sobre a variação existente em um grupo de espécies revelou-se bastante útil. Em grande parte dos resultados obtidos, os padrões observados tanto em dados morfológicos como em dados moleculares foram congruentes, auxiliando muito as decisões taxonômicas.

A técnica de AFLP mostrou-se trabalhosa, exigindo diversas etapas de testes, tanto na extração do DNA como nas etapas de amplificação, além de uma rigorosa padronização dos resultados obtidos para que as amostras pudessem ser comparadas com segurança (capítulo 2). A análise dos resultados também se revelou uma etapa importante, e a participação do pesquisador na avaliação da qualidade dos fragmentos obtidos, através da análise manual dos eletroferogramas, melhorou a qualidade dos resultados obtidos (capítulo 2).

Os dados obtidos por AFLP para a subseção *Carinata* revelaram grande congruência com a distribuição geográfica e os táxons previamente reconhecidos (capítulos 2, 3). Nos casos em que mais de um indivíduo por espécie foi analisado, eles se agruparam entre si, mostrando descontinuidades na variação genética que corroboram a classificação taxonômica já existente. *E. anceps*, *E. martianum*, *E. funckii*, *E. campestre*, *E. myrmecophorum* e *E. purpureum* mostraram - se distantes das demais espécies da subseção, padrão sustentado pela morfologia, já que são espécies que possuem o labelo inteiro, não recortado. Espécies que se distribuem na Cadeia dos Andes (*E. ibaguense*, *E. incisum* e *E. calanthum*) formaram um grupo isolado daquelas que ocorrem no litoral brasileiro (*E. fulgens*, *E. denticulatum* e *E. cinnabarinum*).

Na subseção *Tuberculata*, a resolução obtida nas análises por AFLP não permitiu a formação de grupos distintos para cada população (capítulo 3). Os padrões que mais se repetiram nas análises permitiram a delimitação de duas espécies distintas (capítulo 5): *E. secundum*, que abrange indivíduos com flores lilases, vermelhas, laranja e brancas, procedentes tanto da Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas como do Planalto Brasileiro, e *E. xanthinum*, com flores amarelas, procedente apenas de algumas serras da Cadeia do Espinhaço e Serra dos Órgãos. Indivíduos com morfologias intermediárias entre *E. secundum* e espécies da subseção *Carinata* formaram grupos isolados na maior parte das análises realizadas, o que pode indicar que se tratam de híbridos; porém, estudos mais precisos são necessários para confirmar esta hipótese.

Os padrões obtidos através de morfometria para os indivíduos da subseção *Carinata* também revelaram descontinuidades entre as espécies previamente reconhecidas na literatura (capítulo 4), confirmando sua classificação como espécies distintas. Na subseção *Tuberculata*, indivíduos com flores lilases, vermelhas, laranja e brancas exibiram variação morfológica contínua, não sendo possível qualquer tipo de separação entre eles, confirmando a existência de apenas uma espécie, *E. secundum*. Indivíduos com flores amarelas exibiram tendência de separação, não sendo possível no entanto, delimitar *E. xanthinum* com base apenas em caracteres quantitativos.

Estudos que tentem esclarecer os processos biológicos que produziram e mantêm esta grande variação entre indivíduos de *E. secundum* e *E. xanthinum* ainda são necessários. É preciso concentrar os esforços em populações muito variáveis, como aquelas localizadas na Serra da Caraça (MG) e Nova Friburgo (RJ), onde uma grande variedade de formas e cores é observada crescendo lado a lado, inclusive com as duas espécies, *E. secundum* e *E. xanthinum*, crescendo juntas. Nessas populações, a biologia reprodutiva e a estrutura genética podem revelar quais os processos envolvidos na manutenção e produção da variabilidade floral observada. As populações que possuem indivíduos que representam possíveis híbridos entre espécies de ambas subseções também são importantes, já que podem esclarecer qual a participação deste fenômeno na produção da variabilidade observada e em prováveis eventos de especiação.

### Capítulo 1

- Arditti, J. 1992. **Fundamentals of Orchid Biology**. New York, John Wiley & Sons. 691p.
- Atwood, J.T. 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. **Selbyana** 9:171-186.
- Barkman, T.J. & Simpson, B.B. 2002. Hybrid origin and parentage of *Dendrochilum acuiferum* (Orchidaceae) inferred in a phylogenetic context using nuclear and plastid DNA sequence data. **Systematic Botany** 27(2):209-220.
- Bennett, D.E. & Christenson, E.A. 1998. **Icones Orchidacearum Peruvianum 3**. Florida, A.P. de Bennett. tab. 401-600
- Benzing, D.H. 1990. **Vascular epiphytes: general biology and related biota**. Cambridge, Cambridge University Press. 354p.
- Borba, E.L. & Semir, J. 2001. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: A multiple population approach. **Annals of Botany** 88(1):75-88.
- Borba, E.L., Felix, J.M., Solferini, V.N. & Semir, J. 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. **American Journal of Botany** 88(3):419-428.
- Brieger, F.G. 1958. **On the Phytogeography of orchids**. Proceedings of the Second World Orchid Conference. pp.189-200.
- Brieger, F.G. 1971. Conclusões paleográficas e paleoclimáticas baseadas na evolução filogenética e distribuição geográfica de plantas tropicais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 43:197-200.
- Brieger, F.G. 1976-1977. Gattungsreihe Epidendra. In **Schlechter, Die Orchideen** (F.G. Brieger, R. Maatsch & K. Senghas ed.). Berlin, Paul Parey, v.3(1). pp.509-549.
- Carson, H.L. & Templeton, A.R. 1984. Genetic revolutions in relation to speciation phenomena: the founding of new populations. **Annual Review of Ecology and Systematics** 15:97-131.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L. & Freudenstein, J.V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In **Orchid conservation** (K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett & P.J. Cribb, eds.). Sabah, Natural History Publications. pp.69-89.
- Dafni, A., Lehrer, M., Kevan, P.G. 1997. Spatial flower parameters and insect spatial vision. **Biological Review** 72:239-282.

- Darwin, C.R. 1892. **The various contrivances by which orchids are fertilised by insects.** New York, D. Appleton. 300p.
- Dressler, R.L. 1981. **The Orchids: Natural History and Classification.** Cambridge, Cambridge University Press. 332p.
- Dressler, R.L. 1989. Will the real *Epidendrum ibaguense* please stand up? **American Orchid Society Bulletin** 58(8):796-800.
- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and Classification of the orchid family.** Portland, Dioscorides Press. 314p.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1959. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 1.** London, Andre Deutsch. 448p.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1961. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 2.** London, Andre Deutsch. 360p.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1965. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 3.** London, Andre Deutsch. 348p.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1966. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 4.** London, Andre Deutsch. 344p.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1972. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 5.** London, Andre Deutsch. 334p.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1976. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 6.** London, Andre Deutsch. 463p.
- Funk, D.J. & Omland, K.E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics** 34:397-423.
- Garay, L.A. & Sweet, H. R. 1974. Orchidaceae. *In* **Flora of the Lesser Antilles** (Howard, R.A. ed.). Massachusetts, Harvard University. 235p.
- Gentry, A.H. & Dodson, C.H. 1987. Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 74:205-233.
- Gentry, A.H. 1982. Patterns of Neotropical plant species diversity. **Evolutionary Biology** 15:1-84.
- Gross, B.L., Schwarzbach, E. & Rieseberg, L.H. 2003. Origin(s) of the diploid hybrid species *Helianthus deserticola* (Asteraceae). **American Journal of Botany** 90(12):1708-1719.
- Hágsater, E. 1993. **Icones Orchidacearum 2, the Genus Epidendrum part 1: A century of new species in Epidendrum.** México, Asociación Mexicana de Orquideología. tab. 101-200.
- Hedré, M., Fay, M.F. & Chase, M.W. 2001. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). **American Journal of Botany** 88(10):1868-1880.
- Higgins, W.E., van den Berg, C., Whitten, M.A. 2003. Combined molecular phylogeny of *Encyclia* (Orchidaceae) and relationships within Laeliinae. **Selbyana** 24(2):165-179.
- Johnson, S.D. & Edwards, T.J. 2000. The structure and function of orchid pollinaria. **Plant Systematics and Evolution** 222:243-269.
- Koehler, S., Williams, N.H., Whitten, W.M. & Amaral, M.C.E. 2002. Phylogeny of the *Bifrenaria* (Orchidaceae) complex based on morphology and sequence data from nuclear rDNA internal transcribed spacers (ITS) and chloroplast *trnL-trnF* region. **International Journal of Plant Sciences** 163(6):1055-1066.
- Lihová, J., Marhold, K., Tribsch, A. & Stuessy, T.F. 2004. Morphometric and AFLP re-evaluation of tetraploid *Cardamine amara* (Brassicaceae) in the Mediterranean. **Systematic Botany** 29(1):134-146.
- Marhold, K., Lihová, J., Perný, M., Grupe, R. & Neuffer, B. 2002. Natural hybridization in *Cardamine* (Brassicaceae) in the Pyrenees: evidence from morphological and molecular data. **Botanical Journal of the Linnean Society** 139:275-294.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1975. **Orchidaceae Brasilienses v. 1.** Hildesheim, Kurt Schmersow. 408p.
- Palestina, R.A. & Sosa, V. 2002. Morphological variation in populations of *Bletia purpurea* (Orchidaceae) and description of the new species *B. riparia*. **Brittonia** 54(2):99-111.
- Pridgeon, A.M., Solano, R. & Chase, M.W. 2001. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. **American Journal of Botany** 88:2286-2308.
- Raven, P.H. & Axelrod, D.I. 1974. Angiosperm Biogeography and past continental movements. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 61:539-673.
- Rieseberg, L.H. 1997. Hybrid origins of plant species. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics** 28:359-389.
- Rudall, P.J. & Bateman, R.M. 2002. Roles of synorganisation, zygomorphy and heterotopy in floral evolution: the gynostemium and labellum of orchids and other lilioid monocots. **Biological Review** 77:403-441.
- Saarela, J.M., Peterson, P.M., Soreng, R.J. & Chapman, R.E. 2003. A taxonomic revision of the Eastern North American and Eastern Asian disjunct genus *Brachyelytrum* (Poaceae): evidence from morphology, phytogeography and AFLPs. **Systematic Botany** 28(4):674-692.

- Sapir, Y., Shmida, A., Fragman, O. & Comes, H.P. 2002. Morphological variation of the *Oncocyclus* irises (*Iris*: Iridaceae) in the Southern Levant. **Botanical Journal of the Linnean Society** 139:369-382.
- Sastre, C. 1990a. *Epidendrum* bambusiformes de Guadeloupe et de Martinique 1. **L'Orchidophile** 93:149-158.
- Sastre, C. 1990b. *Epidendrum* bambusiformes de Guadeloupe et de Martinique 2. **L'Orchidophile** 94:197-203.
- Schweinfurth, C. 1959. Orchids of Peru. **Fieldiana, Botany** 30(2):390-531.
- Seehausen, O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. **Trends in Ecology and Evolution** 19(4):198-207.
- Smith, S.D., Cowan, R.S., Gregg, K.B., Chase, M.W., Maxted, N. & Fay, M.F. 2004. Genetic discontinuities among populations of *Cleistes* (Orchidaceae, Vanilloideae) in North America. **Botanical Journal of the Linnean Society** 145:87-95.
- Tremetsberger, K., Stuessy, T.F., Guo, Y., Baeza, C.M., Weiss, H. & Samuel, R.M. 2003. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern South America. **Taxon** 52:237-245.
- van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Arenas, M.A.S., Culham, A. & Chase, M.W. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Lindleyana** 15(2):96-114.
- van der Pijl, L. 1972. **Principles of dispersal in higher plants**. Berlin, Springer-Verlag. 161p.
- van der Pijl, L. & Dodson, C.H. 1966. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. Coral Gables, University of Miami Press. 214p.
- Vasquez, R. & Ibsch, P.L. 2004. Subtribus Laeliinae, Polystachinae, Sobraliinae. *In* **Orquídeas de Bolívia II** (R. Vasquez & P.L. Ibsch eds.). Santa Cruz de la Sierra, Editorial FAN. 649p.
- Whitten, W.M., Williams, N.H. & Chase, M.W. 2000. Subtribal and generic relationships of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. **American Journal of Botany** 87(12):1842-1856.
- Williams, N.H., Chase, M.W., Fulcher, T. & Whitten, W.M. 2001. Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA sequence regions: expanded circumscription of *Cyrtorchilum*, *Erycina*, *Otoglossum* and *Trichocentrum* and a new genus (Orchidaceae). **Lindleyana** 16:113-139.
- Wright, S. 1982. Character change, speciation, and the higher taxa. **Evolution** 36(3):427-443.

## Capítulo 2

- Adell, C.C.A. 1999. **Utilização de marcadores moleculares RAPD no estudo da variabilidade genética de *Laelia* (Orchidaceae – subgênero *Parviflorae*)**. Dissertação de Mestrado, Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. 160p.
- APG. 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 85:531-553.
- Applied Biosystems. 1998. **Genescan Analysis Software 3.1 – User's Manual**. Foster City, Applied Biosystems. 418p.
- Applied Biosystems. 2000. **AFLP plant mapping protocol**. Foster City, Applied Biosystems. 52p.
- Applied Biosystems. 2001a. **ABI Prism Genotyper 2.5 Software – User's Manual**. Foster City, Applied Biosystems. 362p.
- Applied Biosystems. 2001b. **ABI Prism 310 Genetic Analyser – User's Manual**. Foster City, Applied Biosystems. 288p.
- Avice, J.C. & Wollenberg, K. 1997. Phylogenetics and the origin of species. **Proceedings of National Academy of Sciences** 94:7748-7755.
- Cardoso, S.R.S., Eloy, N.B., Provan, J., Cardoso, M.A. & Ferreira, P.C.G. 2000. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. **Molecular Ecology** 9:1753-1760.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L. & Freudenstein, J.V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. *In* **Orchid conservation** (K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett & P.J. Cribb eds.). Sabah, Natural History Publications. pp.69-89.
- Chase, M.W., Hanson, L., Albert, V.A., Whitten, W.M. & Williams, N.H. 2005. Life history evolution and genome size in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae). **Annals of Botany** 95:191-199.
- Crawford, D.J. & Mort, M.E. 2004. Single-locus molecular markers for inferring relationships at lower taxonomic levels: observations and comments. **Taxon** 53(3):631-635.
- Després, L., Gielly, L., Redoutet, B. & Taberlet, P. 2003. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 27:185-196.

- Donini, P., Elias, M.L., Bougourd, S.M. & Koebner, R.M.D. 1997. AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. **Genome** 40:521-526.
- Duncan, T. & Baum, B.R. 1981. Numerical phenetics: its uses in botanical systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 12:387-404.
- Fang, G., Hammar, S. & Grumet, R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. **Biotechniques** 13(1):52-54.
- Fay, M.F. & Krauss, S.L. 2003. Orchid conservation genetics in the molecular age. In **Orchid conservation** (K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett & P.J. Cribb eds.). Sabah, Natural History Publications. pp.91-112.
- Fay, M.F., Cowan, R.S. & Leitch, I.J. 2005. The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. **Annals of Botany** 95:237-246.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1995. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, Embrapa-Cenargen. 220p.
- Forrest, A.D., Hollingsworth, M.L., Hollingsworth, P.M., Sydes, C. & Bateman, R.M. 2004. Population genetic structure in European populations of *Spiranthes romanzoffiana* set in the context of other genetics studies on orchids. **Heredity** 92:218-227.
- Fritsch, P.W. & Lucas, S.D. 2000. Clinal variation in the *Halesia carolina* complex (Styracaceae). **Systematic Botany** 25(2):197-210.
- Gaudeul, M., Taberlet, P. & Till-Bottraud, I. 2000. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. **Molecular Ecology** 9:1625-1637.
- Giannasi, N., Thorpe, R.S. & Malhotra, A. 2001. The use of amplified fragment length polymorphism in determining species trees at fine taxonomic levels: analysis of a medically important snake, *Trimeresurus albolabris*. **Molecular Ecology** 10:419-426.
- Gobert, V., Moja, S., Colson, M. & Taberlet, P. 2002. Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. **American Journal of Botany** 89(12):2017-2023.
- Han, T., van Eck, H.J., De Jeu, M.J. & Jacobsen, E. 1999. Optimization of AFLP fingerprinting of organisms with a large-sized genome: a study on *Alstroemeria* spp. **Theoretical and Applied Genetics** 98:465-471.
- Hedrén, M., Fay, M.F. & Chase, M.W. 2001. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). **American Journal of Botany** 88(10):1868-1880.
- Kardolus, J.P., Van Eck, H.J. & Van den Berg, R.G. 1998. The potential of AFLP in Biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution** 210:87-103.
- Karp, A., Seberg, O. & Buiatti, M. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany** 78:143-149.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. & Hodgkin, T. 1997. **Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies**. IPGRI Technical Bulletin 2. Rome, International Plant Genetic Resources Institute. 47p.
- Kjaer, A., Barfod, A.S., Asmussen, C.B. & Seberg, O. 2004. Investigation of genetic and morphological variation in the sago palm (*Metroxylon sagu*; Arecaceae) in Papua New Guinea. **Annals of Botany** 94:109-117.
- Kropf, M., Kadereit, J.W. & Comes, H.P. 2003. Differential cycles of range contraction and expansion in European high mountain plants during the Late Quaternary: insights from *Pritzelago alpina* (L.) O. Kuntze (Brassicaceae). **Molecular Ecology** 12:931-949.
- Lerceteau, E. & Szmidt, A.E. 1999. Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. **Heredity** 82:252-260.
- Lihová, J., Marhold, K., Tribsch, A. & Stuessy, T.F. 2004. Morphometric and AFLP re-evaluation of tetraploid *Cardamine amara* (Brassicaceae) in the Mediterranean. **Systematic Botany** 29(1):134-146.
- Marhold, K., Lihová, J., Perný, M., Grupe, R. & Neuffer, B. 2002. Natural hybridization in *Cardamine* (Brassicaceae) in the Pyrenees: evidence from morphological and molecular data. **Botanical Journal of the Linnean Society** 139:275-294.
- Mueller, U.G. & Wolfenbarger, L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology and Evolution** 14(10):389-394.
- Murray, B.G. 2005. When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? **Annals of Botany** 95:119-125.
- Nason, J.D., Hamrick, J.L. & Fleming, T.H. 2002. Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a sonoran desert columnar cactus. **Evolution** 56(11):2214-2226.
- Nielsen, L.R., Cowan, R.S., Siegismund, H.R., Adersen, H., Philipp, M. & Fay, M.F. 2003. Morphometric, AFLP and plastid microsatellite variation in populations of *Scalesia divisa* and *S. incisa* (Asteraceae) from the Galápagos Islands. **Botanical Journal of the Linnean Society** 143:243-254.
- Pelser, P.B., Gravendeel, B. & van der Meijden, R. 2003. Phylogeny reconstruction in the gap

- between too little and too much divergence: the closest relatives of *Senecio jacobae* (Asteraceae) according to DNA sequences and AFLPs. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 29:613-628.
- Pryer, K.M., Schneider, H., Smith, A.R., Cranfill, R., Wolf, P.G., Hunt, J.S. & Sipes, S.D. 2001. Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. **Nature** 409:618-621.
- Qamaruz-Zaman, F., Fay, M.F., Parker, J.S. & Chase, M.W. 1998. The use of AFLP fingerprinting in conservation genetics: a case study of *Orchis simia* (Orchidaceae). **Lindleyana** 13(2):125-133.
- Rieseberg, L.H. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. **Molecular Ecology** 5:99-103.
- Rieseberg, L.H. 1998. Genetic mapping as a tool for studying speciation. In **Molecular systematics of plants 2: DNA sequencing** (D.E. Soltis, P.S. Soltis & J.J. Doyle ed.). Massachusetts, Kluwer Academic Publishers. pp.459-487.
- Rivadavia, F., Kondo, K., Kato, M. & Hasebe, M. 2003. Phylogeny of the sundews, *Drosera* (Droseraceae), based on chloroplast *trnK* and nuclear 18S ribosomal DNA sequences. **American Journal of Botany** 90(1):123-130.
- Robinson, J.P. & Harris, S.A. 1999. Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspective. In **Which DNA marker for which purpose?** (E.M. Gillet ed.). <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
- Roupe-van der Voort, J.N.A., van Zandvoort, P., van Eck, H.J., Folkertsma, R.T., Hutten, R.C.B., Draaistra, J., Gommers, F.J., Jacobsen, E., Helder, J. & Bakker, J. 1997. Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. **Molecular and General Genetics** 255:438-447.
- Shepherd, G. J. (ed.). 1996. **FITOPAC 1**. Campinas, Universidade Estadual de Campinas.
- Smith, S.D., Cowan, R.S., Gregg, K.B., Chase, M.W., Maxted, N. & Fay, M.F. 2004. Genetic discontinuities among populations of *Cleistes* (Orchidaceae, Vanilloideae) in North America. **Botanical Journal of the Linnean Society** 145:87-95.
- Squirrell, J., Hollingsworth, P.M., Bateman, R.M., Tebbitt, M.C. & Hollingsworth, M.L. 2002. Taxonomic complexity and breeding system transitions: conservation genetics of the *Epipactis leptochila* complex (Orchidaceae). **Molecular Ecology** 11:1957-1964.
- Swofford, D.L. & Olsen, G.J. 1990. Phylogeny reconstruction. In **Molecular Systematics** (D.M. Hillis & C. Moritz eds.). Massachusetts, Sinauer Associates. pp.407-514.
- Templeton, A.R. 1981. Mechanisms of speciation – a population genetic approach. **Annual Review of Ecology and Systematics** 12:23-48.
- Tremetsberger, K., Stuessy, T.F., Guo, Y., Baeza, C.M., Weiss, H. & Samuel, R.M. 2003. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern South America. **Taxon** 52:237-245.
- van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Arenas, M.A.S., Culham, A. & Chase, M.W. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Lindleyana** 15(2):96-114.
- van der Merwe, M., Winfield, M.O., Arnold, G.M. & Parker, J.S. 2000. Spatial and temporal aspects of the genetic structure of *Juniperus communis* populations. **Molecular Ecology** 9:379-386.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kupier, M. & Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** 23:4407-4414.
- Wallace, L.E. & Case, M.A. 2000. Contrasting allozyme diversity between Northern and Southern populations of *Cypripedium parviflorum* (Orchidaceae): implications for Pleistocene refugia and taxonomic boundaries. **Systematic Botany** 25(2):281-296.
- Winfield, M.O., Arnold, G.M., Cooper, F., Le Ray, M., White, J., Karp, A. & Edwards, K.J. 1998. A study of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the Upper Severn area of the UK using AFLP markers. **Molecular Ecology** 7:3-10.
- Wolfe, A.D. & Liston, A. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In **Molecular systematics of plants 2: DNA sequencing** (D.E. Soltis, P.S. Soltis & J.J. Doyle ed.). Massachusetts, Kluwer Academic Publishers. pp.43-86.

### Capítulo 3

- Andersson, S., Nilsson, L.A., Groth, I. & Bergstrom, G. 2002. Floral scents in butterfly-pollinated plants: possible convergence in chemical composition. **Botanical Journal of the Linnean Society** 140:129-153.
- Applied Biosystems. 2000. **AFLP plant mapping protocol**. Foster City, Applied Biosystems. 52p.



- Awise, J.C. & Wollenberg, K. 1997. Phylogenetics and the origin of species. **Proceedings of National Academy of Sciences** 94:7748-7755.
- Baker, R.K. 1972. **Foliar anatomy of the Laeliinae (Orchidaceae)**. PhD. Dissertation, Saint Louis, Washington University. 329p.
- Barkman, T.J. & Simpson, B.B. 2001. Origin of high-elevation *Dendrochilum* species (Orchidaceae) endemic to Mount Kinabalu, Sabah, Malaysia. **Systematic Botany** 26(3):658-669.
- Bateman, R.M. & Denholm, I. 1983. A reappraisal of the British and Irish dactylorchids, 1. The tetraploid marsh-orchids. **Watsonia** 14:347-376.
- Bateman, R.M. & Denholm, I. 1985. A reappraisal of the British and Irish dactylorchids, 2. The diploid marsh-orchids. **Watsonia** 15:321-355.
- Blumenschein, A. 1957. **Estudos citológicos na família Orchidaceae**. Tese de Doutorado, Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 88p.
- Borba, E.L., Felix, J.M., Semir, J. & Solferini, V.N. 2000. *Pleurothallis fabiobarrosii*, a new Brazilian species: morphological and genetic data with notes on the taxonomy of Brazilian rupicolous *Pleurothallis*. **Lindleyana** 15(1):2-9.
- Borba, E.L., Felix, J.M., Solferini, V.N. & Semir, J. 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. **American Journal of Botany** 88(3):419-428.
- Borba, E.L., Shepherd, G.J., van den Berg, C. & Semir, J. 2002. Floral and vegetative morphometrics of five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. **Annals of Botany** 90:219-230.
- Brieger, F.G. 1976-1977. Gattungsreihe Epidendra. In **Schlechter, Die Orchideen** (F.G. Brieger, R. Maatsch & K. Senghas ed.). Berlin, Paul Parey, v.3(1). pp.509-549.
- Cardoso, S.R.S., Eloy, N.B., Provan, J., Cardoso, M.A. & Ferreira, P.C.G. 2000. Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. **Molecular Ecology** 9:1753-1760.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L. & Freudenstein, J.V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In **Orchid conservation** (K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett & P.J. Cribb eds.). Sabah, Natural History Publications. pp. 69-89.
- Chung, M.Y., Nason, J.D. & Chung, M.G. 2004. Spatial genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Cephalanthera longibracteata* (Orchidaceae). **American Journal of Botany** 91(1):52-57.
- Cogniaux, A. 1898-1902. Orchidaceae. In **Flora Brasiliensis** (C.F.P. Martius, A.G. Eichler & I. Urban ed). 3(5):1-663.
- Cozzolino, S., Noce, M.E., Musacchio, A. & Widmer, A. 2003. Variation at a chloroplast minisatellite locus reveals the signature of habitat fragmentation and genetic bottlenecks in the rare orchid *Anacamptis palustris* (Orchidaceae). **American Journal of Botany** 90(12):1681-1687.
- Crawford, D.J. & Mort, M.E. 2004. Single-locus molecular markers for inferring relationships at lower taxonomic levels: observations and comments. **Taxon** 53(3):631-635.
- de Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. In **Endless forms: Species and speciation** (D.J. Howard & S.H. Berlocher eds.). New York, Oxford University Press. pp.57-75.
- Després, L., Gielly, L., Redoutet, B. & Taberlet, P. 2003. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 27:185-196.
- Dressler, R.L. 1967. The genera *Amblostoma*, *Lanium* and *Stenoglossum*. **Brittonia** 19:237-243.
- Dressler, R.L. 1984. La delimitación de géneros en el complejo *Epidendrum*. **Orquidea (Mexico)** 9(2):277-298.
- Dressler, R.L. 1989. Will the real *Epidendrum ibaguense* please stand up? **American Orchid Society Bulletin** 58(8):796-800.
- Duncan, T. & Baum, B.R. 1981. Numerical phenetics: its uses in botanical systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 12:387-404.
- Dunsterville, G.C. 1979. Orchids of Venezuela – *Epidendrum elongatum*. **American Orchid Society Bulletin** 48(5):447-454.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1961. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 2**. London, Andre Deutsch. 360p.
- Fabbro, T. & Korner, C. 2004. Altitudinal differences in flower traits and reproductive allocation. **Flora** 199:70-81.
- Fay, M.F., Cowan, R.S. & Leitch, I.J. 2005. The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. **Annals of Botany** 95:237-246.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. 1995. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, Embrapa-Cenargem. 220p.

- Forrest, A.D., Hollingsworth, M.L., Hollingsworth, P.M., Sydes, C. & Bateman, R.M. 2004. Population genetic structure in European populations of *Spiranthes romanzoffiana* set in the context of other genetics studies on orchids. **Heredity** 92:218-227.
- Frey, F.M. 2004. Opposing natural selection from herbivores and pathogens may maintain floral-color variation in *Claytonia virginica* (Portulacaceae). **Evolution** 58(11):2426-2437.
- Funk, D.J. & Omland, K.E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics** 34:397-423.
- Garay, L.A. & Sweet, H. R. 1974. Orchidaceae. In **Flora of the Lesser Antilles** (R.A. Howard ed.). Massachusetts, Harvard University. 235p.
- Gaudeul, M., Taberlet, P. & Till-Bottraud, I. 2000. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. **Molecular Ecology** 9:1625-1637.
- Giannasi, N., Thorpe, R.S. & Malhotra, A. 2001. The use of amplified fragment length polymorphism in determining species trees at fine taxonomic levels: analysis of a medically important snake, *Trimeresurus albolabris*. **Molecular Ecology** 10:419-426.
- Gobert, V., Moja, S., Colson, M. & Taberlet, P. 2002. Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. **American Journal of Botany** 89(12):2017-2023.
- Gross, B.L., Schwarzbach, E. & Rieseberg, L.H. 2003. Origin(s) of the diploid hybrid species *Helianthus deserticola* (Asteraceae). **American Journal of Botany** 90(12):1708-1719.
- Gustafsson, S. & Lonn, M. 2003. Genetic differentiation and habitat preference of flowering-time variants within *Gymnadenia conopsea*. **Heredity** 91:284-292.
- Hágsater, E. 1993. *Epidendrum anceps* or *Epidendrum secundum* ? **Orquidea** (Mexico) 13(1-2):153-158.
- Hedrén, M., Fay, M.F. & Chase, M.W. 2001. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). **American Journal of Botany** 88(10):1868-1880.
- Higgins, W.E., van den Berg, C. & Whitten, M.A. 2003. Combined molecular phylogeny of *Encyclia* (Orchidaceae) and relationships within Laeliinae. **Selbyana** 24(2):165-179.
- Irwin, D.E. 2002. Phylogeographic breaks without geographic barriers to gene flow. **Evolution** 56(12):2383-2394.
- Kardolus, J.P., Van Eck, H.J. & Van den Berg, R.G. 1998. The potential of AFLP in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (Solanaceae). **Plant Systematics and Evolution** 210:87-103.
- Karp, A., Seberg, O. & Buiatti, M. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany** 78:143-149.
- Kjaer, A., Barfod, A.S., Asmussen, C.B. & Seberg, O. 2004. Investigation of genetic and morphological variation in the sago palm (*Metroxylon sagu*; Areaceae) in Papua New Guinea. **Annals of Botany** 94:109-117.
- Koehler, S., Williams, N.H., Whitten, W.M. & Amaral, M.C.E. 2002. Phylogeny of the *Bifrenaria* (Orchidaceae) complex based on morphology and sequence data from nuclear rDNA internal transcribed spacers (ITS) and chloroplast trnL-trnF region. **International Journal of Plant Sciences** 163(6):1055-1066.
- Kropf, M., Kadereit, J.W. & Comes, H.P. 2003. Differential cycles of range contraction and expansion in European high mountain plants during the Late Quaternary: insights from *Pritzelago alpina* (L.) O. Kuntze (Brassicaceae). **Molecular Ecology** 12:931-949.
- Levin, D.A. 2001. The recurrent origin of plant races and species. **Systematic Botany** 26(2):197-204.
- Lewis, H. 1966. Speciation in flowering plants. **Science** 152:167-172.
- Lihová, J., Marhold, K., Tribsch, A. & Stuessy, T.F. 2004. Morphometric and AFLP re-evaluation of tetraploid *Cardamine amara* (Brassicaceae) in the Mediterranean. **Systematic Botany** 29(1):134-146.
- Lindley, J. 1852-1859. *Epidendrum*. In **Folia Orchidacea** (J. Lindley ed.). London, J. Matthews. pp.1-97.
- Marhold, K., Lihová, J., Perný, M., Grupe, R. & Neuffer, B. 2002. Natural hybridization in *Cardamine* (Brassicaceae) in the Pyrenees: evidence from morphological and molecular data. **Botanical Journal of the Linnean Society** 139:275-294.
- Miranda, F.E. 1993. *Epidendrum x ormindoi* Miranda hyb. nat. nov. **Bradea** 6(18):164-166.
- Murray, B.G. 2005. When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? **Annals of Botany** 95:119-125.
- O'Hara, R.J. 1993. Systematic generalization, historical fate, and the species problem. **Systematic Biology** 42(3):231-246.
- Onishi, E. 1974. **Sobre o polimorfismo do grupo *Maxillaria madida* (Orchidaceae, Maxillariinae)**. Tese de Doutorado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas. 118p.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1975. **Orchidaceae Brasilienses v. 1**. Hildesheim, Kurt Schmiersow. 408p.
- Palestina, R.A. & Sosa, V. 2002. Morphological variation in populations of *Bletia purpurea* (Orchidaceae) and description of the new species *B. riparia*. **Brittonia** 54(2):99-111.

- Pansarin, E.R. 2000. **Biologia reprodutiva e morfologia floral de espécies de Orchidaceae em diferentes ambientes no Estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas. 133p.
- Patton, J.L. & Smith, M.F. 1994. Paraphyly, polyphyly, and the nature of species boundaries in pocket gophers (genus *Thomomys*). **Systematic Biology** 43(1):11-26.
- Pelser, P.B., Gravendeel, B. & van der Meijden, R. 2003. Phylogeny reconstruction in the gap between too little and too much divergence: the closest relatives of *Senecio jacobae* (Asteraceae) according to DNA sequences and AFLPs. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 29:613-628.
- Pridgeon, A.M., Solano, R. & Chase, M.W. 2001. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. **American Journal of Botany** 88:2286-2308.
- Reinhammar, L. 1995. Evidence for two distinctive species of *Pseudorchis* (Orchidaceae) in Scandinavia. **Nordic Journal of Botany** 15(5):469-481.
- Rieseberg, L.H. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. **Molecular Ecology** 5:99-103.
- Rieseberg, L.H. 1997. Hybrid origins of plant species. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics** 28:359-389.
- Rieseberg, L.H. 1998. Genetic mapping as a tool for studying speciation. *In* **Molecular systematics of plants 2: DNA sequencing** (D.E. Soltis, P.S. Soltis & J.J. Doyle ed.). Massachusetts, Kluwer Academic Publishers. pp.459-487.
- Robinson, J.P. & Harris, S.A. 1999. Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspective. *In* **Which DNA marker for which purpose?** (E.M. Gillet ed.). <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>
- Roupe-van der Voort, J.N.A., van Zandvoort, P., van Eck, H.J., Folkertsma, R.T., Hutten, R.C.B., Draaistra, J., Gommers, F.J., Jacobsen, E., Helder, J. & Bakker, J. 1997. Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. **Molecular and General Genetics** 255:438-447.
- Sastre, C. 1990a. *Epidendrum bambusiformes* de Guadeloupe et de Martinique 1. **L'Orchidophile** 93:149-158.
- Sastre, C. 1990b. *Epidendrum bambusiformes* de Guadeloupe et de Martinique 2. **L'Orchidophile** 94:197-203.
- Schweinfurth, C. 1959. *Epidendrum* L. *In* Orchids of Peru. **Fieldiana, Botany** 30(2):390-531.
- Seehausen, O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. **Trends in Ecology and Evolution** 19(4):198-207.
- Shepherd, G.J. 1994. **FITOPAC 1**. Manual de usuário. Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas. 93p.
- Shepherd, G. J. (ed.). 1996. **FITOPAC 1**. Campinas, Universidade Estadual de Campinas.
- Sites, J.W. & Marshall, J.C. 2004. Operational criteria for delimiting species. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics** 35:199-227.
- Smith, S.D., Cowan, R.S., Gregg, K.B., Chase, M.W., Maxted, N. & Fay, M.F. 2004. Genetic discontinuities among populations of *Cleistes* (Orchidaceae, Vanilloideae) in North America. **Botanical Journal of the Linnean Society** 145:87-95.
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. 1973. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco, W.H. Freeman. 573p.
- Squirrell, J., Hollingsworth, P.M., Bateman, R.M., Tebbit, M.C. & Hollingsworth, M.L. 2002. Taxonomic complexity and breeding system transitions: conservation genetics of the *Epipactis leptochila* complex (Orchidaceae). **Molecular Ecology** 11:1957-1964.
- Stappen, J.V., Lopez, S.G., Davila, P. & Volckaert, G. 2002. Molecular evidence for the hybrid origin of a new endemic species of *Stylosanthes* Sw. (Fabaceae) from the Mexican Yucatán Peninsula. **Botanical Journal of the Linnean Society** 140:1-13.
- Swofford, D.L. & Olsen, G.J. 1990. **Phylogeny reconstruction**. *In* **Molecular Systematics** (D.M. Hillis & C. Moritz eds.). Massachusetts, Sinauer Associates. pp.407-514.
- Tremetsberger, K., Stuessy, T.F., Guo, Y., Baeza, C.M., Weiss, H. & Samuel, R.M. 2003. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern South America. **Taxon** 52:237-245.
- van den Berg, C. 1996. **Estudo dos padrões de variabilidade intra e interespecífica em espécies brasileiras de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae-Laeliinae)**. Dissertação de Mestrado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas. 154p.
- van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Arenas, M.A.S., Culham, A. & Chase, M.W. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Lindleyana** 15(2):96-114.

- van der Merwe, M., Winfield, M.O., Arnold, G.M. & Parker, J.S. 2000. Spatial and temporal aspects of the genetic structure of *Juniperus communis* populations. **Molecular Ecology** 9:379-386.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kupier, M. & Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** 23:4407-4414.
- Wallace, L.E. & Case, M.A. 2000. Contrasting allozyme diversity between Northern and Southern populations of *Cypripedium parviflorum* (Orchidaceae): implications for Pleistocene refugia and taxonomic boundaries. **Systematic Botany** 25(2):281-296.
- Whitten, W.M., Willians, N.H. & Chase, M.W. 2000. Subtribal and generic relationships of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. **American Journal of Botany** 87(12):1842-1856.
- Williams, N.H., Chase, M.W., Fulcher, T. & Whitten, W.M. 2001. Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA sequence regions: expanded circumscription of *Cyrtochilum*, *Erycina*, *Otoglossum* and *Trichocentrum* and a new genus (Orchidaceae). **Lindleyana** 16:113-139.
- Wolfe, A.D. & Liston, A. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In **Molecular systematics of plants 2: DNA sequencing** (D.E. Soltis, P.S. Soltis & J.J. Doyle eds.). Massachusetts, Kluwer Academic Publishers. 574p.

#### Capítulo 4

- Aldasoro, J.J., Aedo, C. & Muñoz-Garmendia, F. 1996. The genus *Pyrus* L. (Rosaceae) in South-west Europe and North Africa. **Botanical Journal of the Linnean Society** 121:143-158.
- Avise, J.C. & Wollenberg, K. 1997. Phylogenetics and the origin of species. **Proceedings of National Academy of Sciences** 94:7748-7755.
- Barros, F. 1998. **Análise multivariada da distribuição geográfica de espécies de orquídeas dos campos rupestres do Brasil**. Tese de Doutorado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas. 206p.
- Bateman, R.M. & Denholm, I. 1983. A reappraisal of the British and Irish dactylorchids, 1. The tetraploid marsh-orchids. **Watsonia** 14:347-376.
- Bateman, R.M. & Denholm, I. 1985. A reappraisal of the British and Irish dactylorchids, 2. The diploid marsh-orchids. **Watsonia** 15:321-355.

- Bateman, R.M. & Denholm, I. 1988. A reappraisal of the British and Irish dactylorchids, 3. The spotted orchids. **Watsonia** 17:319-349.
- Bateman, R.M. & Denholm, I. 1989. Morphometric procedure, taxonomic objectivity and marsh-orchid systematics. **Watsonia** 17:449-455.
- Brieger, F.G. 1976-1977. Gattungsreihe Epidendra. In **Schlechter, Die Orchideen** (F.G. Brieger, R. Maatsch & K. Senghas eds.). Berlin, Paul Parey, v.3(1). pp.509-549.
- Chacur, F. 1973. **Análise da variação e da taxonomia no gênero *Brassavola* R. Br. (Orchidaceae)**. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. 101p.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L. & Freudenstein, J.V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In **Orchid conservation** (K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett & P.J. Cribb eds.). Sabah, Natural History Publications. pp.69-89.
- Cogniaux, A. 1898-1902. Orchidaceae. In **Flora Brasiliensis** (C.F.P. Martius, A.G. Eichler & I. Urban eds.). 3(5):1-663.
- Dressler, R.L. 1967. The genera *Amblostoma*, *Lanium* and *Stenoglossum*. **Brittonia** 19:237-243.
- Dressler, R.L. 1984. La delimitación de géneros en el complejo *Epidendrum*. **Orquidea** (Mexico) 9(2):277-298.
- Dressler, R.L. 1989. Will the real *Epidendrum ibaguense* please stand up? **American Orchid Society Bulletin** 58(8):796-800.
- Duncan, T. & Baum, B.R. 1981. Numerical phenetics: its uses in botanical systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics** 12:387-404.
- Dunsterville, G.C.K. 1979. Orchids of Venezuela – *Epidendrum elongatum*. **American Orchid Society Bulletin** 48(5):447-454.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1961. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 2**. London, Andre Deutsch. 360p.
- Everitt, B.S. 1978. **Graphical techniques for multivariate data**. New York, North-Holland. 117p.
- Fritsch, P.W. & Lucas, S.D. 2000. Clinal variation in the *Halesia carolina* complex (Styracaceae). **Systematic Botany** 25(2):197-210.
- Garay, L.A. & Sweet, H.R. 1974. Orchidaceae. In **Flora of the Lesser Antilles** (R.A. Howard, ed.). Massachusetts, Harvard University. 235p.
- Hagsáter, E. 1993. *Epidendrum anceps* or *Epidendrum secundum*? **Orquidea** (Mexico) 13(1-2):153-158.

- Hedrén, M. 1996a. Genetic differentiation, polyploidization, and hybridization in northern European *Dactylorhiza* (Orchidaceae): evidence from allozyme markers. **Plant Systematics and Evolution** 201:31-55.
- Hedrén, M. 1996b. The allotetraploid nature of *Dactylorhiza praetermissa* (Orchidaceae) confirmed. **Watsonia** 21:113-118.
- Hedrén, M. 1996c. Electrophoretic evidence for allotetraploid origin of *Dactylorhiza purpurella* (Orchidaceae). **Nordic Journal of Botany** 16:127-134.
- Hedrén, M. 1996d. Notes on the esterase variation in Swedish *Dactylorhiza incarnata* s.l. (Orchidaceae). **Nordic Journal of Botany** 16:253-256.
- Hedrén, M., Fay, M.F. & Chase, M.W. 2001. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae). **American Journal of Botany** 88(10):1868-1880.
- Ingrouille, M.J. & Pearson, J. 1987. The pattern of morphological variation in the *Salicornia europaea* L. aggregate (Chenopodiaceae). **Watsonia** 16:269-281.
- James, F.C. & McCulloch, C.E. 1990. Multivariate analysis in ecology and systematics: panacea or Pandora's box? **Annual Review of Ecology and Systematics** 21:129-166.
- Jensen, R.J. 2003. The conundrum of morphometrics. **Taxon** 52:663-671.
- Kent, M. & Ballard, J. 1988. Trends and problems in the application of classification and ordination methods in plant ecology. **Vegetatio** 78:109-124.
- Kephart, S., Sturgeon, K., Lum, J. & Bledsoe, K. 1999. Varietal relationships in *Silene douglasii* (Caryophyllaceae): morphological variability at the population level. **Systematic Botany** 24(4):529-544.
- Lihová, J., Marhold, K., Tribsch, A. & Stuessy, T.F. 2004. Morphometric and AFLP re-evaluation of tetraploid *Cardamine amara* (Brassicaceae) in the Mediterranean. **Systematic Botany** 29(1):134-146.
- Lindley, J. 1852-1859. *Epidendrum*. In **Folia Orchidacea**. London, J. Matthews. pp.1-97.
- Loos, B.P. 1993. Morphological variation in *Lolium* (Poaceae) as a measure of species relationships. **Plant Systematics and Evolution** 188:87-99.
- Marhold, K. 1996. Multivariate morphometric study of the *Cardamine pratensis* group (Cruciferae) in the Carpathian and Pannonian area. **Plant Systematics and Evolution** 200:141-159.
- Marhold, K., Lihová, J., Perný, M., Grupe, R. & Neuffer, B. 2002. Natural hybridization in *Cardamine* (Brassicaceae) in the Pyrenees: evidence from morphological and molecular data. **Botanical Journal of the Linnean Society** 139:275-294.
- Martins, P.S. 1970. **Estudo da variação intra-específica no gênero *Miltonia* Lindl. (Orchidaceae)**. Tese de Doutorado, Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 65p.
- McCune, B. & Mefford, M.J. 1999. **Multivariate analysis of ecological data**. Oregon, MJM Software.
- Nielsen, L.R., Cowan, R.S., Siegismund, H.R., Adersen, H., Philipp, M. & Fay, M.F. 2003. Morphometric, AFLP and plastid microsatellite variation in populations of *Scalesia divisa* and *S. incisa* (Asteraceae) from the Galápagos Islands. **Botanical Journal of the Linnean Society** 143:243-254.
- Oliveira, H.L.G. 1970. **Padrões de Variação no Gênero *Cyrtopodium* R. Br. (Orchidaceae)**. Tese de Doutorado, Brasília, Universidade de Brasília. 58p.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1975. **Orchidaceae Brasilienses v. 1**. Hildesheim, Kurt Schmiersow. 408p.
- Pansarin, E.R. 2000. **Biologia reprodutiva e morfologia floral de espécies de Orchidaceae em diferentes ambientes no Estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas. 133p.
- Reinhammar, L. 1995. Evidence for two distinctive species of *Pseudorchis* (Orchidaceae) in Scandinavia. **Nordic Journal of Botany** 15(5):469-481.
- Saarela, J.M., Peterson, P.M., Soreng, R.J. & Chapman, R.E. 2003. A taxonomic revision of the Eastern North American and Eastern Asian disjunct genus *Brachyelytrum* (Poaceae): evidence from morphology, phytogeography and AFLPs. **Systematic Botany** 28(4):674-692.
- Sapir, Y., Shmida, A., Fragman, O. & Comes, H.P. 2002. Morphological variation of the *Oncocylus* irises (*Iris*: Iridaceae) in the southern Levant. **Botanical Journal of the Linnean Society** 139:369-382.
- Sastre, C. 1990a. *Epidendrum* bambusiformes de Guadeloupe et de Martinique 1. **L'Orchidophile** 93:149-158.
- Sastre, C. 1990b. *Epidendrum* bambusiformes de Guadeloupe et de Martinique 2. **L'Orchidophile** 94:197-203.
- Shaw, P.J.A. 1998. Morphometric analyses of mixed *Dactylorhiza* colonies (Orchidaceae) on industrial waste sites in England. **Botanical Journal of the Linnean Society** 128:385-401.
- Shepherd, G.J. 1994. **FITOPAC 1**. Manual de usuário. Departamento de Botânica, Universidade Estadual de Campinas. 93p.
- Shepherd, G. J. (ed.). 1996. **FITOPAC 1**. Campinas.

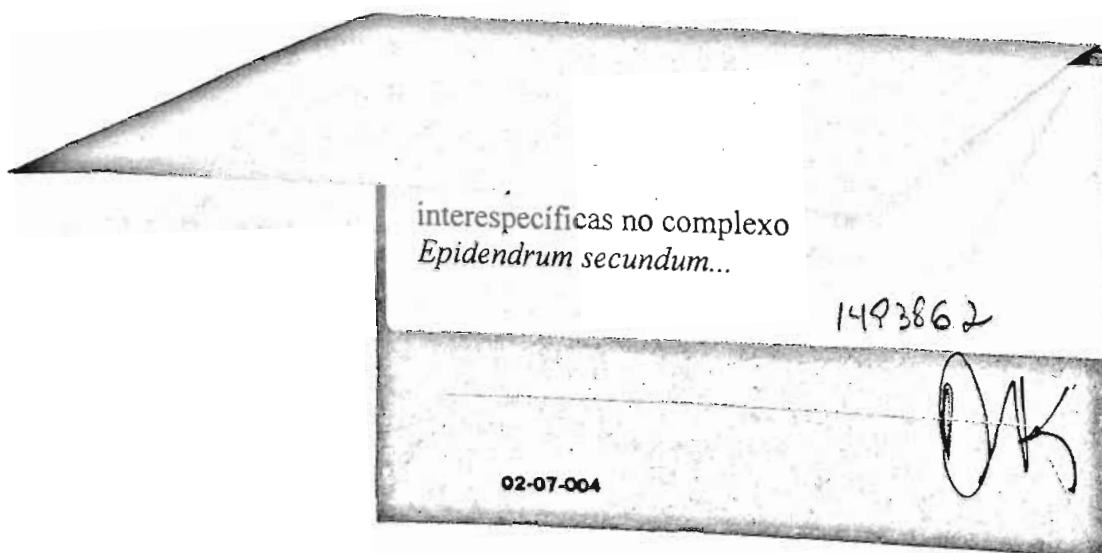
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. 1973. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco, W.H. Freeman. 573p.
- Templeton, A.R. 1981. Mechanisms of speciation – a population genetic approach. **Annual Review of Ecology and Systematics** 12:23-48.
- van den Berg, C. 1996. **Estudo dos padrões de variabilidade intra e interespecífica em espécies brasileiras de *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae-Laeliinae)**. Dissertação de Mestrado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas.
- van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Arenas, M.A.S., Culham, A. & Chase, M.W. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Lindleyana** 15(2):96-114.
- Vanderhoeven, S., Hardy, O., Vekemans, X., Lefévre, C., Loose, M., Lambinon, J. & Meerts, P. 2002. A morphometric study of populations of the *Centaurea jacea* complex (Asteraceae) in Belgium. **Plant Biology** 4:403-412.
- Vasquez, R. & Ibsch, P.L. 2004. Subtribus Laeliinae, Polystachinae, Sobraliinae. **In Orquídeas de Bolívia 2** (R. Vasquez & P.L. Ibsch eds.). Santa Cruz de la Sierra, Editorial FAN. 649p.
- Vencovsky, R. 1960. **Aplicação de Alguns Métodos Estatísticos à Sistemática**. Tese de Doutorado, Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 61p.
- Wright, S. 1982. Character change, speciation, and the higher taxa. **Evolution** 36(3):427-443.

## Capítulo 5

- Bennett, D.E. & Christenson, E.A. 1995. **Icones Orchidacearum Peruvianum 2**. Florida, A.P. de Bennett. tab. 201-400.
- Bennett, D.E. & Christenson, E.A. 1998. **Icones Orchidacearum Peruvianum 3**. Florida, A.P. de Bennett. tab. 401-600
- Brieger, F.G. 1976-1977. Gattungsreihe Epidendra. **In Schlechter, Die Orchideen** (F.G. Brieger, R. Maatsch & K. Senghas ed.). Berlin, Paul Parey, v.3(1). pp.509-549.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L. & Freudenstein, J.V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. **In Orchid conservation** (K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett & P.J. Cribb eds.). Sabah, Natural History Publications. pp.69-89.
- Cogniaux, A. 1898-1902. Orchidaceae. **In Flora Brasiliensis** (C.F.P. Martius, a.g. Eichler & I. Urban eds.) 3(5):1-663.

- Dressler, R.L. 1967. The genera *Amblostoma*, *Lanium* and *Stenoglossum*. **Brittonia** 19:237-243.
- Dressler, R.L. 1984. La delimitación de géneros en el complejo *Epidendrum*. **Orquidea (Mexico)** 9(2):277-298.
- Dressler, R.L. 1989. Will the real *Epidendrum ibaguense* please stand up? **American Orchid Society Bulletin** 58(8):796-800.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1959. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 1**. London, Andre Deutsch. 448p.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1961. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 2**. London, Andre Deutsch. 360p.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1965. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 3**. London, Andre Deutsch. 348p.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1966. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 4**. London, Andre Deutsch. 344p.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1972. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 5**. London, Andre Deutsch. 334p.
- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. 1976. **Venezuelan Orchids Illustrated v. 6**. London, Andre Deutsch. 463p.
- Feldmann, P. & Barré, N. 1993. Les orchidées des petites antilles: liste commentée actualisée. **L'Orchidophile** 106:68-80.
- Garay, L.A. & Sweet, H. R. 1974. Orchidaceae. **In Flora of the Lesser Antilles** (R.A. Howard, ed.). Massachusetts, Harvard University. 235p.
- Hagsáter, E. 1993. *Epidendrum anceps* or *Epidendrum secundum* ? **Orquidea (Mexico)** 13(1-2):153-158.
- Jacquin, N.J. 1760. **Enumeratio Systematica Plantarum**. Lugduni Batavorum, apud Theodorum Haak. p.29.
- Jacquin, N.J. 1763. **Selectarum Stirpium Americanarum Historia**. Vindobonae, Officina Krausiana. p.224.
- Lescure, J., Jeremie, J., Lourenço, W., Mauries, J.P., Pierre, J., Sastre, C. & Thibaud, J.M. 1991. Biogeographie et insularite: l'exemple des Petites Antilles. **Compte Rendu des Seances de la Societe de Biogeographie** 67(1):41-59.
- Lindley, J. 1852-1859. *Epidendrum*. **In Folia Orchidacea**. London, J. Matthews. pp.1-97.
- Mansfeld, R. 1929. Figuren Atlas zu den Orchideenfloren der Sudamerikanischen Kordillerenstaaten von R. Schlechter. **Repertorium specierum novarum regni vegetabilis Beihefte** 57:tab. 1-142.

- Mansfeld, R. 1930. Blütenanalysen neuer Orchideen von R. Schlechter: I – Südamerikanischen Orchideen. **Repertorium specierum novarum regni vegetabilis Beihefte** 58:tab. 1-60.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1975. **Orchidaceae Brasilienses v. 1.** Hildesheim, Kurt Schmiersow. 408p.
- Reichenbach, H.G. 1854. Die Wagener'schen orchideen. **Bonplandia** 2:111-112.
- Sastre, C. 1979. Considerations phytogeographiques sur les sommets volcaniques antillais. **Compte Rendu des Seances de la Societe de Biogeographie** 484:127-135.
- Sastre, C. 1990a. *Epidendrum bambusifformes* de Guadeloupe et de Martinique 1. **L'Orchidophile** 93:149-158.
- Sastre, C. 1990b. *Epidendrum bambusifformes* de Guadeloupe et de Martinique 2. **L'Orchidophile** 94:197-203.
- Schlechter, R. 1920. Die Orchideenfloren der südamerikanischen Kordillerenstaaten. **Repertorium Specierum Novarum Régni Vegetabilis** 7:125-155.
- Schweinfurth, C. 1959. *Epidendrum* L. Orchids of Peru. **Fieldiana, Botany** 30(2):390-531.
- van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Arenas, M.A.S., Culham, A. & Chase, M.W. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Lindleyana** 15(2):96-114.
- Vasquez, R. & Ibisch, P.L. 2004. Subtribus Laeliinae, Polystachinae, Sobraliinae. *In Orquídeas de Bolivia II* (R. Vasquez & P.L. Ibisch eds.). Santa Cruz de la Sierra, Editorial FAN. 649p.
- Withner, C.L. & Harding, P.A. 2004. **The Cattleyas and their relatives: The debatable Epidendrums.** Portland, Timber Press. 300p.



DEDALUS - Acervo - IB



12000022690