

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Botânica
Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal

Dissertação de Mestrado

**Filogenia molecular de *Acianthera* Scheidw.
(Orchidaceae) com ênfase nas espécies rupícolas do
gênero e variabilidade genética do complexo *Acianthera*
prolifera Lindl.**

ANTÔNIO MASSENSINI JÚNIOR

ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Eric Camargo Smidt

Belo Horizonte – Minas Gerais

Mai de 2013

ANTÔNIO MASSENSINI JÚNIOR

**Filogenia molecular das espécies rupícolas de
Acianthera Scheidw. (Orchidaceae) e variabilidade
genética do complexo *Acianthera prolifera* Lindl.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Vegetal da
Universidade Federal de Minas Gerais
como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Belo Horizonte – Minas Gerais

Mai de 2013

“Toda a ciência seria supérflua se a forma de manifestação (aparência) e a essência das coisas coincidissem diretamente.”

Karl Marx

AGRADECIMENTOS

Agradeço do fundo do meu coração aos meus pais, Antônio e Áurea, pelos exemplos de honestidade, de luta e de renúncia. Pelo carinho e amor com que nos criaram (quatro rebentos!). Agradeço aos meus irmãos (André, Júlio e Rogério), pelos exemplos de conduta, pelo incentivo fraterno e pelo companheirismo. Não poderiam ter sido melhores. Estendo minhas graças às suas famílias (Flávia, Adriana e Ana, Giogio, João, Maria) pela presença sempre alegre e importante em minha vida.

Agradeço à minha segunda família (Ladeira Lau), onde encontrei novas avós (Lucy e Edyr), pais (Rosilene e Bororó), irmãos (Lucas e Thiara), tios e primos. Grato pelo carinho, acolhimento e força, sempre. À Bruna, pelo companheirismo, estímulo, respeito e amor incondicionais.

Agradeço à minha terceira família (a dos amigos). À família Alvorada Esporte Clube (É o maior!), que permanece unida e cultiva a amizade através da paixão irrestrita por futebol e cerveja. Aos amigos do CEFET-MG, que fizeram da Química um caminho de inúmeras descobertas (e continuam fazendo). Em especial, ao G-5 (Alisson, Fernando, Ivan e Thiago) e às senhoritas Débora Dias e Lívia Ribeiro. Aos amigos da Biologia, que me receberam em seu hábito noturno de forma muito verdadeira. Aos amigos da Sistemática, pelas tardes de LSD (Laboratório de Sistemática Discute) e cafeína (cafés da Sistemática), pelos campos e pelos ensinamentos e ajudas constantes. Sou grato a todos, sem exceção, mas não posso deixar de agradecer especialmente à Aline “Rannala”, Fred Hughes, Bárbara, Cléber, Ana Cláudia, Bruno Carvalho, Eric Hattori, Cecília, Ana Paula, Ariane e Karina Proite.

Agradeço imensamente aos meus orientadores. Ao Eduardo, pelos ensinamentos, pelo exemplo de profissionalismo, pelo diálogo sempre franco e tão importante para a minha formação. Ao Eric, pela disposição, pela acolhida em Curitiba, pelo entusiasmo e pelas novidades no campo da sistemática filogenética, área pela qual me apaixonei.

Agradeço aos professores Fernando Aguiar, Fernando Silveira (Lelê), Leandro Assis, Élder Paiva, Denise Trombert, João Renato, Alexandre Salino, Rosy Isaias e João Batista, que de alguma forma, mesmo sem saber, ajudaram-me a enxergar mais longe. Principalmente, à Denise e ao João Renato pelo importante papel enquanto

coordenadores; e aos professores Leandro, Alexandre e João Batista pelos auxílios e trocas de ideias mais frequentes.

Gracias!

Índice

Resumo geral	7
Abstract	9
Introdução geral	11
Capítulo 1	
Evidências de múltiplas ocupações de ambientes rupestres no leste do Brasil por espécies de <i>Acianthera</i> Scheidw. (Pleurothallidinae, Orchidaceae)	25
Capítulo 2	
Variabilidade genética e circunscrição taxonômica no complexo <i>A. prolifera</i> Lindl. (Orchidaceae) no leste do Brasil	59
Considerações finais	94
Referências bibliográficas gerais	96

Resumo geral

A utilização de protocolos multidisciplinares tem sido importante para compreensão de processos evolutivos envolvidos em eventos de especiação e/ou divergência de linhagens. Processos de convergência/radiação adaptativa, isolamento reprodutivo e hibridação estão relacionados à especiação, sendo notadamente importantes em linhagens que ainda estão em processo de divergência. A avaliação de episódios de convergência/radiação em um contexto filogenético tem se mostrado importante para o entendimento dos fatores que atuam no processo de diversificação floral e, em última instância, de especiação. Além disso, os processos biogeográficos que moldaram a atual distribuição geográfica das espécies são raramente considerados em estudos dessa natureza, deixando uma lacuna no conhecimento da influência desses processos sobre os padrões de evolução floral observados. Esta abordagem foi adotada neste estudo, a partir de dados de filogenia, de biogeografia e de variabilidade genética, para: 1) testar a hipótese de monofiletismo das espécies rupícolas de *Acianthera* ocorrentes nos campos rupestres do leste do Brasil, um gênero de orquídeas exclusivamente neotropical, cuja maioria das espécies ocorre como epífita no domínio da Mata Atlântica; 2) investigar os fatores evolutivos e biogeográficos que moldaram a atual distribuição das espécies de *Acianthera* que ocupam os campos rupestres brasileiros; 3) delimitar as entidades que constituem o complexo *A. prolifera* no leste do Brasil. As espécies rupícolas de *Acianthera* foram recuperadas em três clados distintos, indicando que a ocupação dos afloramentos rupestres ocorreu, independentemente, pelo menos, três vezes. Esses clados correspondem aos complexos *A. teres* (quatro espécies), *A. ochreatea* (uma espécie e uma subespécie) e *A. prolifera* (cinco espécies), que são distinguidos apenas por caracteres morfológicos vegetativos. Os dois primeiros compreendem plantas com ramicaule mais curto do que as folhas, que são cilíndricas ou pouco conduplicadas e muito carnosas, sendo bastante diferentes das espécies do complexo *A. prolifera*, que possuem ramicaule achatado no ápice, tão ou mais longos que as folhas, que podem ser conduplicadas ou planas, carnosas, eretas ou dobradas em direção ao ramicaule, formando um gancho. De acordo com a distribuição atual das espécies que compõem esses complexos e suas espécies irmãs, é possível supor que o complexo *A. ochreatea* deve ter alcançado os campos rupestres a partir da porção norte da Mata Atlântica. Contrariamente, as espécies dos complexos *A. prolifera* e *A. teres* podem ter ocupado os ambientes rochosos pelo sudeste do Brasil, tendo, como populações fontes, inselbergs

localizados nesta região. A ocorrência de convergência de caracteres florais entre táxons de complexos distintos e de divergência entre táxons de um mesmo complexo, muito provavelmente devido à pressão exercida por polinizadores, sugere que a morfologia floral, ao contrário da vegetativa, não é boa indicadora de relações filogenéticas para esse grupo. A partir dos marcadores ISSR, *A. hamosa* e *A. modestissima* puderam ser reconhecidas como entidades distintas. Porém, não foi possível diferenciar geneticamente as populações de *A. limae* das de *A. prolifera*, que configuram um *continuum* morfológico. Dessa maneira, é sugerido que esses táxons, bem como os morfotipos similares a estes, sejam tratadas como uma ocoespécie, juntamente com *A. fornograndensis*, eventualmente também incluindo as populações ocorrentes nos Andes, frequentemente identificadas como *A. prolifera sensu lato*.

Palavras-chave: biogeografia, campos rupestres, filogenia molecular, genética de populações, ocoespécies.

Abstract

The use of multidisciplinary protocols has been important to understand the evolutionary factors involved in speciation/divergence events of plant lineages. Adaptive convergence/radiation, reproductive isolation and hybridization are related to speciation, being important in lineages that are still in divergence process. The evaluation of convergence/radiation episodes, in a phylogenetic context, has proved important for the understanding of the factors acting on floral diversification and, therefore, speciation. Besides, the biogeographic events that shaped the present distribution of species are rarely considered in studies of this nature, leaving a gap on the knowledge of the influence of these events over the observed floral evolution patterns. This approach was adopted in this study, using phylogenetic, biogeography and genetic variability data, in order to: 1) test the monophyly of rupicolous species of *Acianthera*, a Neotropical orchid genus, occurring in eastern Brazil, with most species occurring as epiphytes in the Atlantic Rain Forest; 2) investigate the evolutionary and biogeographic factors that shaped the present distribution of *Acianthera* species occurring in the Brazilian *campos rupestres*; and 3) delimitate the entities that constitute the *Acianthera prolifera* complex in eastern Brazil. The rupicolous species of *Acianthera* were recovered in three different clades, indicating that independent occupation of the rocky outcrops occurred at least three times. These clades correspond to *A. teres* (four species), *A. ochreata* (one species and one subspecies) and *A. prolifera* (five species) complexes, that can only be distinguished by vegetative morphological characters. The first two include plants with ramicaul shorter than leaves, which are cylindrical or slightly conduplicated and very fleshy, being different from the plants of *A. prolifera* complex, which have ramicaul flattened at apex, as long as or longer than leaves, which can be conduplicated or flat, fleshy, erect or turned to ramicaul, forming a hook. According to these complexes and their sister species current distribution, it is possible to suppose that *A. ochreata* complex probably reached the *campos rupestres* from the north portion of the Atlantic Rain Forest, in Northeastern Brazil. On the other hand, the species of *A. prolifera* and *A. teres* complexes may have occupied the rocky environments reaching from eastern Brazil, and having inselbergs located at this region as the source populations. The occurrence of floral convergence between *taxa* of distinct complexes and divergence between *taxa* of the same complex, probably due to pollinator's pressure, suggests that floral morphology, as opposite to vegetative, is not a

good indicator of phylogenetic relationships for this group. ISSR markers enabled the recognition of *A. hamosa* and *A. modestissima* as distinct entities. However, it was not possible to differentiate genetically *A. limae* from *A. prolifera*, which configure a morphological continuum. Thus, it is suggested that these *taxa*, as well as some morphotypes similar to them, be considered an ochloespecies, along with *A. fornograndensis*, and eventually also including Andean populations frequently identified as *A. prolifera sensu lato*.

Palavras-chave: biogeography, *campos rupestres*, molecular phylogeny, population genetics, ochloespecies.

Introdução geral

Com cerca de 25.000 espécies distribuídas em aproximadamente 800 gêneros, as Orchidaceae Juss. constituem uma das maiores e mais diversas famílias de angiospermas. Sua distribuição é cosmopolita, entretanto a maior diversidade da família concentra-se nos trópicos, principalmente em regiões montanhosas e úmidas (Pridgeon *et al.*, 2005). Pleurothallidinae Lindl. (Epidendreae, Epidendroideae) é a subtribo mais rica em espécies, com aproximadamente 4.100 espécies e 36 gêneros distribuídos ao longo dos neotrópicos, desde o sul da Flórida até o sul do Brasil e Argentina (Dressler, 1981; Luer, 1986a; Pridgeon *et al.*, 2005). No Brasil, a sua maior riqueza concentra-se no domínio da Mata Atlântica, onde grande parte das espécies é encontrada como epífita. Além disso, é possível encontrar algumas espécies rupícolas, principalmente em afloramentos rochosos, nas cadeias montanhosas do Sudeste e Nordeste do país, inseridos em matrizes vegetacionais associadas tanto aos biomas da Mata Atlântica, como também aos de Cerrado e Caatinga (Borba, Semir & Solferini, 2000; Borba, 2003; Mota, 2006; Azevedo & van den Berg, 2007a, 2007b; Melo & Borba, 2011). As Pleurothallidinae são um grupo majoritariamente miiófilo, podendo ser reconhecidas pelo hábito, ramos unifoliados não espessados em pseudobulbos e folhas conduplicadas (Dressler, 1981; Luer, 1986a).

Desde os primeiros tratamentos taxonômicos referentes à subtribo, foram discutidas algumas artificialidades em sua classificação, envolvendo principalmente o polifiletismo do megagênero *Pleurothallis* R.Br. (Dressler, 1981; Luer, 1986a). De acordo com Luer (1986b), este gênero possuiria cerca da metade das espécies de Pleurothallidinae, sendo um dos maiores dentro da família. Luer (1986a), ainda concordava com Dressler (1981) ao afirmar que tal gênero, por agrupar vários elementos conflitantes, deveria ser tratado como um conglomerado de gêneros ou subgêneros. Os mesmos autores que reforçaram o monofiletismo da subtribo acabaram por confirmar o polifiletismo de *Pleurothallis sensu* Luer, utilizando tanto caracteres morfológico/anatômicos (Neyland, Urbatsch & Pridgeon, 1995) quanto moleculares (Pridgeon, Solano & Chase, 2001). Após tais estudos, Pridgeon & Chase (2001) realizaram reorganizações na classificação de *Pleurothallis*, o desmembrando em vários outros gêneros, a fim de obter grupos monofiléticos. Uma das mudanças foi o

restabelecimento de *Acianthera* Scheidw., que possui atualmente cerca de 200 espécies, distribuídas pelas Américas Central e do Sul, sendo especialmente bem representada no sudeste brasileiro (Pridgeon *et al.*, 2005).

A ocorrência de homoplasias é apontada por Pridgeon *et al.*, (2001, 2005) como principal fator de discordância entre as relações filogenéticas dentro de *Pleurothallis sensu* Luer obtidas por ele, as obtidas por Neyland *et al.* (1995) e a classificação tradicional (Luer, 1986b). Ainda de acordo com Pridgeon & Chase (2001), diversos caracteres morfológicos surgiram independentemente na evolução do grupo. Dentre eles, podem ser citados caracteres florais diretamente relacionados com a polinização dessas plantas, e que tem passado por eventos de convergência e/ou irradiação, adaptados à polinização por Diptera (Dressler, 1981, 1993; Borba & Semir, 2001; Melo, Taucce & Borba, 2011). Além disso, parte da variabilidade encontrada nos caracteres vegetativos para a subtribo está fortemente ligada à influência do ambiente em que se encontram os espécimes, estando, portanto, sujeita a convergência pela pressão do habitat. Como exemplo, pode-se citar a forma das folhas, que são bastante carnosas, podendo ser até cilíndricas nas espécies que ocorrem como epífitas ou rupícolas, em áreas mais expostas, e, contrariamente, são bem delgadas ou pouco carnosas em ambientes mais úmidos no interior de florestas.

Essa enorme riqueza, aliada a uma grande diversidade morfológica e a uma ampla variedade de micro-habitats colonizáveis, faz deste grupo uma fonte praticamente inesgotável de questões biológicas, principalmente relacionadas à evolução dos mecanismos reprodutivos destas plantas e sua interação, bastante específica, com seus polinizadores, com a distribuição das espécies ao longo do globo (i.e., biogeografia) e com a variação de caracteres florais. Sistemas biológicos complexos envolvendo orquídeas têm despertado o interesse de pesquisadores desde Darwin, que desenvolveu obra pioneira contendo observações acerca da biologia reprodutiva/floral de orquídeas europeias e, também, neotropicais, incluindo espécies de Pleurothallidinae (Darwin, 1862). Entretanto, apesar da precocidade destes estudos, a grande quantidade de confusões taxonômicas, somada à imensidão da família e à falta de classificações robustas embasadas por estudos filogenéticos, levou a uma estagnação que só foi transposta através de estudos de filogenia molecular no início da década de 1990 (Fay & Chase, 2009). Além disso, vários estudos biosistemáticos também tiveram lugar, propiciando um acúmulo de dados a respeito de sistemas de reprodução,

biologia floral, dinâmica e estrutura populacional, variabilidade genética e taxonomia (Borba *et al.*, 2002; Barret & Freudenstein, 2011; Pessoa *et al.*, 2012).

Borba e colaboradores publicaram uma série de estudos biosistemáticos envolvendo as espécies rupícolas de *Acianthera*, ocorrentes nos campos rupestres brasileiros (Borba & Semir, 2001; Borba, Semir & Shepherd, 2001; Borba, Trigo & Semir, 2001; Borba *et al.*, 2000, 2001c, 2002, Melo *et al.*, 2011; Melo & Borba, 2011). Apesar de se tratar de um gênero majoritariamente epifítico, exibindo grande riqueza de espécies no domínio de Mata Atlântica, os grupos rupícolas constituídos pelo complexo *A. prolifera* [*A. hamosa* (Barb. Rodr.) Pridgeon & M.W. Chase, *A. limae* (Porto & Brade) Pridgeon & M.W. Chase, *A. modestissima* (Rchb.f. & Warm.) Pridgeon & M.W. Chase, *A. prolifera* (Herb. ex Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase, e *A. fornograndensis* L. Kollmann & A.P. Fontana], complexo *A. teres* [*A. adamantinensis* (Brade) Pridgeon & M.W. Chase, *A. johannensis* (Barb. Rodr.) Pridgeon & M.W. Chase, *A. fabriobarrosii* (Borba) F. Barros & F. Pinheiro, e *A. teres* (Lindl.) Borba] e complexo *A. ochreatea* [*A. ochreatea* (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase e *A. ochreatea* subsp. *cylindrifolia* (Borba & Semir) Borba] tem despertado o interesse de vários pesquisadores, em parte devido a dificuldade em delimitar as entidades taxonômicas que compõem tais grupos. Borba & Semir (2001) e Borba *et al.* (2001c, 2002), ao investigarem a biosistemática dos complexos de *A. teres* e *A. ochreatea*, sugeriram que caracteres florais das espécies estudadas não seriam informativos do ponto de vista filogenético, tratando-se, provavelmente, de exemplos de convergência das formas florais devido aos mecanismos de polinização similares entre as espécies envolvidas. Borba *et al.* (2002) sugerem ainda que os caracteres vegetativos seriam mais informativos sobre as relações filogenéticas entre as espécies do que os caracteres florais.

Melo & Borba (2011) e Melo *et al.* (2011) estudaram quatro das cinco espécies do complexo *Acianthera prolifera* (excetuando *A. fornograndensis*), que compreende espécies muito próximas morfologicamente e de difícil delimitação. Pabst & Dungs (1975) agruparam essas espécies na *A. hamosa* Alliance (seção *Brachystachyae*–*Longicaules* Pabst), devido ao ramicaule achatado e a posição ereta das plantas, que poderiam ter as folhas voltadas para trás, formando um gancho. Luer (1986b) inseriu essas mesmas espécies na subseção *Pectinatae* Luer (seção *Sicariae* Lindl.), juntamente com *A. pectinata*, por possuírem o ramicaule notadamente comprimido no ápice, sem, no entanto, fazer a distinção entre plantas eretas ou pêndulas.

Nesse complexo, dois pares de espécies podem ser distinguidos pela sua morfologia e tamanho das peças florais, sendo que, no entanto, alguma sobreposição pode ser observada em alguns casos. *A. prolifera*/*A. limae* possuem as maiores estruturas vegetativas e reprodutivas, em relação às demais espécies, sendo diferenciadas, entre si, pelo tamanho das flores e formato das folhas, conspicuamente conduplicadas em *A. prolifera*. Além disso, esta última ocorre sobre rochas expostas ao sol, enquanto *A. limae* é encontrada no interior de matas que compõe uma matriz vegetacional em torno daqueles afloramentos rochosos. *A. modestissima*/*A. hamosa* são de porte menor e possuem as flores bastante reduzidas, quando comparadas as do outro par de espécies. É bastante difícil diferenciar estas espécies, que têm sido separadas por suas distribuições geográficas e pelos habitats divergentes, com *A. hamosa* ocorrendo no interior de matas e *A. modestissima* em afloramentos expostos ao sol pleno. *Acianthera fornograndensis* possui a parte vegetativa semelhante à de *A. prolifera* e flores similares às de *A. hamosa* e *A. modestissima*, podendo ser distinguida pelas suas pétalas não serrilhadas, base do labelo estreita e linear, labelo não verrucoso e nem papiloso no lóbulo apical, ápice da coluna revoluto e distribuição (Kollman & Fontana, 2006).

Melo, Borba & Paiva (2010), Melo *et al.* (2011) e Melo & Borba (2011) desenvolveram investigações sobre biologia reprodutiva, micromorfologia e macromorfologia floral (através de análises morfométricas) deste complexo, a fim de esclarecer questões relacionadas à convergência e irradiação de estruturas morfológicas em função de processos de adaptação à miofilia, possível plasticidade fenotípica em caracteres vegetativos, possível ocorrência de hibridização entre taxa simpátricos e delimitação das espécies. As espécies do complexo *A. prolifera* apresentam auto-incompatibilidade, de maneira similar ao que tem sido observado com as espécies estudadas por Borba *et al.* (2001a) e ao que foi encontrado em outras espécies da subtribo (Christensen, 1992; Tremblay *et al.*, 2005). Esse tipo de auto-esterilidade geralmente contribui para a manutenção de uma alta variabilidade genética dentro das populações, principalmente por se tratar de espécies polinizadas por moscas, cujo comportamento favorece a autogamia (Melo *et al.*, 2011; Borba & Semir, 2001; Borba *et al.*, 2001a, 2001c).

Nesse mesmo grupo de orquídeas mioófilas, foi visto que algumas espécies poderiam sofrer processos de hibridação, por serem intercompatíveis, compartilharem

polinizadores e, em alguns casos, ocorrerem em simpatria. No entanto, barreiras genéticas pré-zigóticas foram observadas nessas espécies, mais fortemente, do que dentre as espécies que possuem efetivo isolamento reprodutivo por barreiras etológicas, ambientais ou mecânicas (Melo *et al.*, 2011). Entretanto, tais barreiras genéticas podem não ser suficientes para impedir a hibridação entre *A. limae* e *A. prolifera*, ocorrentes na Serra do Caraça. No caso, supõe-se existir uma barreira ecológica que evitaria o estabelecimento de híbridos intermediários próximos a *A. prolifera*, que ocorre em um ambiente com condições mais restritivas. Este tipo de isolamento visto por Smidt, Silva-Pereira & Borba (2006), se mostra como o único obstáculo ao fluxo gênico entre estas espécies e, de alguma forma, pode ser insuficiente, considerando-se principalmente o fato de alguns híbridos não serem mal sucedidos em se estabelecerem em ambientes extremos ou mais relacionados aos ambientes dos parentais (Rieseberg, 1995; Barton, 2001).

Já no ambiente típico de *A. limae*, indivíduos amostrados como sendo uma população de híbridos não puderam ser relacionados com nenhuma das espécies, levando a hipóteses: 1) a população de híbridos seria, na verdade, parte da população de *A. limae*, porém apresentando grande variação morfológica; 2) a população de híbridos não deve ser constituída exclusivamente de indivíduos da primeira geração (F1), mas de gerações seguintes e indivíduos com elementos introgridos (Melo & Borba, 2011). Outra questão diz respeito às relações entre *A. modestissima* e *A. hamosa*. Melo *et al.* (2011) e Melo & Borba (2011) discutem uma possível convergência adaptativa entre estas espécies, que possuem mecanismos de polinização parecidos, corroborando os resultados obtidos por Borba *et al.* (2002) para espécies alopátricas dos complexos *A. teres* e *A. ochreatea*. Outra hipótese seria a constituição destas populações por linhagens evolutivas distintas para uma mesma espécie biológica.

Além disso, parece ter havido eventos de convergência floral entre táxons menos relacionados filogeneticamente (*A. teres*, *A. ochreatea*, *A. hamosa* e *A. modestissima*) e que compõem as duas linhagens principais que se diversificaram e ocuparam os afloramentos rochosos do sudeste e nordeste do Brasil (notadamente a Cadeia do Espinhaço).

Estudos adicionais utilizando marcadores moleculares foram sugeridos (Melo & Borba, 2011) para tentar resolver tais questões, principalmente, no que diz respeito à

variabilidade genética das populações do complexo de *Acianthera prolifera*, aos eventos de hibridação entre *A. prolifera* e *A. limae*, e à delimitação de espécies morfológicamente muito próximas, como *A. hamosa* e *A. modestissima*. Amostragens que acessem a amplitude morfológica e geográfica das espécies do complexo *A. prolifera* podem auxiliar na resolução de questões envolvendo hibridação, principalmente em relação a possíveis grandes variações morfológicas entre populações de uma mesma espécie, como por exemplo *A. prolifera* e *A. limae*.

Marcadores moleculares dominantes muito variáveis (AFLP, RAPD e ISSR) têm sido utilizados na avaliação da diversidade genética de populações, delimitação de espécies e em trabalhos de genética da conservação (e.g., George, Sharma & Yadon, 2009; Oliveira, 2010; Barbosa, 2011; Cruz *et al.*, 2011; Lousada *et al.*, 2011, 2013; Ding *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.* 2012; Sharma *et al.*, 2013). Os marcadores ISSR (Zietkiewicz, Rafalski & Labuda, 1994) apresentam vantagens em relação a outros por não necessitarem de conhecimento prévio das seqüências flanqueadoras dos microssatélites, possuem boa reprodutibilidade e gerarem níveis altos de polimorfismo. Por isso mesmo tem se mostrado uma técnica mais rápida e barata que as outras. Esses marcadores foram utilizados na investigação de algumas das questões aqui apresentadas, principalmente na delimitação das espécies e levantamento da variabilidade genética de suas populações.

Utilizando tais ferramentas, pretende-se investigar algumas questões relacionadas ao complexo *A. prolifera*: 1) Quantas espécies podem ser reconhecidas, no leste do Brasil, com base nos marcadores utilizados e como elas podem ser delimitadas?; 2) Pode-se confirmar a ocorrência de eventos de hibridização entre espécies ocorrendo em simpatria, especialmente *A. limae* e *A. prolifera*?; 3) *A. hamosa* e *A. modestissima* constituem, realmente, espécies distintas?; e, 4) Como populações que apresentam morfologia incomum ou intermediária se relacionam geneticamente com as demais populações das espécies reconhecidas? Pretende-se também verificar se, apesar do comportamento das espécies de polinizadores que favorecem a auto-polinização, a ocorrência de auto-compatibilidade no grupo é capaz de manter níveis elevados de variabilidade genética nas populações, como observado para outras espécies de *Acianthera* (Borba *et al.*, 2001c).

Estudos filogenéticos em Orchidaceae, utilizando dados moleculares, se iniciaram na década de 1990, com alguns estudos sobre subfamílias e subtribos (e.g. Yukawa *et al.*, 1996; Cox *et al.*, 1997) e até mesmo para a família como um todo (e.g. Cameron *et al.*, 1999). Estes estudos pioneiros utilizaram, em sua grande maioria, apenas uma região do genoma para a construção da matriz de caracteres moleculares. Mais recentemente, com a maior facilidade em se obter dados de sequências de DNA, as filogenias moleculares têm sido produzidas a partir de um número cada vez maior de marcadores, chegando a incorporar genomas inteiros em alguns trabalhos (e.g. Doorduyn *et al.* 2011; Lee *et al.* 2011).

Trabalhos importantes, focados em Pleurothallidinae, clarificaram várias relações filogenéticas e resolveram inúmeros problemas taxonômicos (e.g. Pridgeon *et al.*, 2001; Chiron, Guiard & van den Berg, 2012) na subtribo, não sendo, entretanto, conclusivos sobre questões relacionadas a evolução de caracteres morfológicos e ocupação de habitats exclusivos em um nível infragenérico.

No presente trabalho, análises filogenéticas de sequências de DNA foram empregadas para testar a hipótese do monofiletismo do conjunto de espécies rupícolas de campos rupestres, tratando-se de uma linhagem que teria colonizado este ambiente uma única vez a partir do estoque presente na Mata Atlântica. Alternativamente, este grupo rupícola poderia ser constituído de mais linhagens com diferentes eventos histórico/evolutivos de ocupação desses ambientes, e estas linhagens seriam congruentes com os padrões baseados na morfologia vegetativa das espécies. Além disso, resultados de estudos anteriores (Borba & Semir, 2001; Borba *et al.*, 2002; Melo & Borba, 2011) sobre eventos de convergência e irradiação adaptativas de caracteres morfológicos puderam ser comparados com hipóteses de parentesco em comum (filogenia) e de eventos dispersivos/vicariantes, para as espécies rupícolas, complementando esses estudos e levantando novas questões sobre as relações entre síndromes de polinização, evolução de caracteres e especiação neste grupo.

Por fim, tendo em vista a enorme diversidade e riqueza das Pleurothallidinae no Brasil acrescidos dos inúmeros problemas taxonômicos dentro da subtribo, pode-se considerar que ainda são escassos os estudos envolvendo estimativas de diversidade genética e abordagens filogeográficas para o grupo. Se, além disso, for contabilizado o aumento das pressões antrópicas (principalmente da mineração) sobre ambientes

compostos por afloramentos rochosos nos últimos anos, tornam-se ainda mais patentes e necessárias investigações desse tipo, que contribuirão para elaborar práticas de manejo e conservação da biodiversidade nessas formações.

Referências bibliográficas

- Azevedo CO, van den Berg C. 2007a.** A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. *Hoehnea* **34**: 1–47.
- Azevedo CO, van den Berg C. 2007b.** Análise comparativa de áreas de campo rupestre da Cadeia do Espinhaço (Bahia e Minas Gerais, Brasil) baseada em espécies de Orchidaceae. *Sitientibus* **7**: 199–210.
- Barbosa AR. 2011.** Biossistemática do complexo *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) baseada em análise filogeográfica e genética de populações. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Barrett CF, Freudenstein J V. 2011.** An integrative approach to delimiting species in a rare but widespread mycoheterotrophic orchid. *Molecular Ecology* **20**: 2771–2786.
- Barton NH. 2001.** The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*. **10**: 551–568.
- Borba EL, Felix JM, Semir J, Solferini VN. 2000.** *Pleurothallis fabiobarrosii*, a new Brazilian species: morphological and genetic data with notes on the taxonomy of Brazilian rupicolous *Pleurothallis*. *Lindleyana* **15**: 2–9.
- Borba EL, Semir J. 2001.** Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany* **88**: 75–88.
- Borba EL, Semir J, Shepherd GJ. 2001a.** Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* **88**: 89–99.
- Borba EL, Trigo JR, Semir J. 2001b.** Variation of diastereoisomeric pyrrolizidine alkaloids in *Pleurothallis* (Orchidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **29**: 45–52.

- Borba EL, Felix JM, Solferini VN, Semir J. 2001c.** Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* **88**: 419–428.
- Borba EL, Shepherd GJ, 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.
- Borba EL. 2003.** Novas combinações em *Acianthera* (*Pleurothallis* s.l.; Orchidaceae: Pleurothallidinae) ocorrentes nos campos rupestres brasileiros. *Sitientibus, série Ciências Biológicas* **3**: 22–25.
- Cameron KM, Chase MW, Whitten WM, Kores PJ, Jarrell DC, Albert VA, Yukawa T, Hills HG, Goldman DG. 1999.** A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences. *American Journal of Botany* **86**: 208–224.
- Chiron GR, Guiard J, Van Den Berg C. 2012.** Phylogenetic relationships in Brazilian *Pleurothallis* sensu lato (Pleurothallidinae, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences. *Phytotaxa* **58**: 34–58.
- Christensen DE. 1992.** Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. *Lindleyana* **7**: 28–33.
- Cox AV, Pridgeon AM, Albert VA, Chase MW. 1997.** Phylogenetics of the slipper orchids (Cypripedioideae, Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution* **208**: 197–223.
- Cruz DT, Selbach-Schnadelbach A, Lambert SM, Ribeiro PL, Borba EL. 2011.** Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **294**: 87–98.

- Darwin CR. 1862.** *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing.* London: John Murray
- Ding G, Zhang D, Yu Y, Zhao L, Zhang B. 2012.** Population genetic diversity and divergence of the halobiotic herb *Limonium sinense* estimated by AFLP and ISSR, and implications for conservation. *Plant Systematics and Evolution* **299**: 131–138.
- Doorduyn L, Gravendeel B, Lammers Y, Ariyurek Y, Chin–a–woeng T, Vrieling K. 2011.** The complete chloroplast genome of 17 individuals of pest species *Jacobaea vulgaris*: SNPs, microsatellites and barcoding markers for population and phylogenetic studies. *DNA Research* **18**: 93–105.
- Dressler RL. 1981.** *The orchids: natural history and classification.* Cambridge: Harvard University Press.
- Dressler RL. 1993.** *Phylogeny and classification of the orchid family.* Portland: Dioscorides Press.
- Fay MF, Chase MW. 2009.** Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. *Annals of Botany* **104**: 359–364.
- George S, Sharma J, Yadon VL. 2009.** Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *American Journal of Botany* **96**: 2022–2030.
- Kollman LJC, Fontana AP. 2006.** *Acianthera fornograndensis* L. Kollmann & AP Fontana (Orchidaceae), uma nova espécie da Floresta Atlântica do Estado do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão* **20**: 27–31.
- Lee EK, Cibrian–Jaramillo A, Kolokotronis S–O, Katari MS, Stamatakis A, Ott M, Chiu JC, Little DP, Stevenson DW, McCombie WR, Martienssen RA, Coruzzi G, Desalle R. 2011.** A functional phylogenomic view of the seed plants. *PLoS Genetics* **7**: 1–13.

- Lousada JM, Borba EL, Ribeiro KT, Ribeiro LC, Lovato MB. 2011.** Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica* **139**: 431–440.
- Lousada JM, Lovato MB, Borba EL. 2013.** High genetic divergence and low genetic variability in disjunct populations of the endemic *Vellozia compacta* (Velloziaceae) occurring in two edaphic environments of Brazilian *campos rupestres*. *Brazilian Journal of Botany* **36**: DOI 10.1007/s40415-013-0001-x.
- Luer CA. 1986a.** Icones Pleurothallidinarum I. Systematics of the Pleurothallidinae. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* **15**: 1–86.
- Luer CA. 1986b.** Icones Pleurothallidinarum III. Systematics of *Pleurothallis*. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. **20**: 1–116.
- Melo MC, Borba EL, Paiva EAS. 2010.** Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* **286**: 141–151.
- Melo MC, Borba EL. 2011.** Morphological variability in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **293**: 135–145.
- Melo MC, Taucce PPG, Borba EL. 2011.** Reproductive biology and isolation mechanisms in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **293**: 161–176.
- Mota RC. 2006.** Orchidaceae na Serra do Caraça, Minas Gerais: levantamento florístico com ênfase no estudo taxonômico da subfamília Epidendroideae. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Neyland R, Urbatsch LE, Pridgeon AM. 1995.** A phylogenetic analysis of subtribe Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **117**: 13–28.
- Oliveira HO. 2010.** Biossistemática de *Cyrtopodium poecilum* (Orchidaceae): biologia reprodutiva, isolamento reprodutivo e variabilidade genética Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Pabst GFJ, Dungs F. 1975.** *Orchidaceae Brasilienses*, Vol. 1. Hildesheim: Brücke-Verlag.
- Pessoa E, Alves M, Alves–Araújo A, Palma–Silva C, Pinheiro F. 2012.** Integrating different tools to disentangle species complexes: a case study in *Epidendrum* (Orchidaceae). *Taxon* **61**: 721–734.
- Pinheiro LR, Rabbani ARC, Silva AVC, Silva Lédo A, Pereira KLG, Diniz LEC. 2012.** Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution* **298**: 1815–1825.
- Pridgeon AM, Chase MW. 2001.** A phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Lindleyana* **16**: 235–271.
- Pridgeon AM, Solano R, Chase MW. 2001.** Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* **88**: 2286–2308.
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. 2005.** *Genera Orchidacearum, Volume 4. Epidendroideae (Part 1)*. Oxford: Oxford University Press.
- Rieseberg LH. 1995.** The role hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* **82**: 944–953.
- Sharma SK, Kumaria S, Tandon P, Rao SR. 2013.** Assessment of genetic variation and identification of species-specific ISSR markers in five species of

Cymbidium (Orchidaceae). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **22**: 250-255.

Smidt EC, Silva-Pereira V, Borba EL. 2006. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. *Plant Species Biology* **21**: 85–91.

Tremblay RL, Ackerman JD, Zimmerman JK, Calvo RN. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**: 1–54.

Yukawa T, Ohba H, Cameron KM, Chase MW. 1996. Chloroplast DNA phylogeny of subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae): Insights from a combined analysis based on *rbcL* sequences and restriction site variation. *Journal of Plant Research* **109**: 169–176.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**: 176–183.

CAPÍTULO 1

Evidências de múltiplas ocupações de ambientes rupestres no leste do Brasil por espécies de *Acianthera* Scheidw. (Pleurothallidinae, Orchidaceae)

Introdução

Em angiospermas, a diversidade de formas florais e a frequência de eventos de especiação estão relacionadas às variações de regimes de seleção exercida por polinizadores, principalmente sobre caracteres reprodutivos (Niet & Johnson, 2012; Schiestl & Johnson, 2013). Quando, em sistemas de polinização especializados, mudanças de polinizadores são acompanhadas de variações florais, dois principais padrões podem ser identificados grosso modo: convergência, quando plantas não proximamente relacionadas filogeneticamente passam a interagir com um mesmo grupo de polinizadores, e radiação, quando linhagens proximamente aparentadas exibem uma diferenciação fenotípica mediada por mudanças em seus polinizadores. Como produtos desses processos de diversificação floral, surgem características florais que se relacionam a um determinado grupo funcional de polinizadores, conhecidas como síndromes de polinização (Faegri & van der Pijl, 1979).

A avaliação de ocorrências de convergência/radiação em um contexto filogenético têm se mostrado importantes para o entendimento dos fatores que atuam no processo de diversificação floral (Johnson, Steiner & Linder, 1998; Johnson, Alexandersson & Linder, 2003; Wilson *et al.*, 2007) e, em última instância, de especiação, já que o isolamento mediado por mudanças de polinizadores pode levar, em casos de populações com baixo fluxo gênico, à divergência entre linhagens via acúmulo de mutações e deriva. Estudos desta natureza têm revelado ainda que importantes caracteres definidores (i.e., especificados na descrição da espécie) surgiram de forma independente na história evolutiva de vários grupos, não sendo, portanto, fonte de sinal filogenético (van den Berg *et al.*, 2000; Chase *et al.*, 2009; Salazar, Cabrera & Figueroa, 2011). Os processos biogeográficos que moldaram a atual distribuição geográfica das espécies são raramente considerados nesses estudos (e.g., Duchon & Renner, 2010; Olesen *et al.*, 2012), deixando uma lacuna no conhecimento da influência de eventos, como dispersão a longa distância e colonização de ilhas oceânicas, sobre os padrões de evolução floral observados. Esta abordagem foi adotada aqui, relacionando dados de filogenia e biogeografia produzidos para este trabalho, com informações de polinização, sistemas reprodutivos e variabilidade de caracteres morfológicos obtidos em estudos anteriores (Borba & Semir, 2001; Borba, Semir & Shepherd, 2001a; Borba *et al.*, 2002; Melo & Borba, 2011; Melo, Taucce & Borba, 2011).

O gênero *Acianthera* Scheidw. (Epidendroideae: Pleurothallidinae) é exclusivamente neotropical, apresentando sua maior diversidade no Sudeste do Brasil, principalmente no domínio da Mata Atlântica, onde a grande maioria das espécies é encontrada como epífita (Pridgeon *et al.*, 2005). Além destas, é possível encontrar algumas espécies rupícolas em afloramentos rochosos em cadeias de montanhas do Sudeste e Nordeste do país, inseridas em matrizes vegetacionais associadas tanto aos biomas da Mata Atlântica, como também aos de Cerrado e Caatinga (figura 1.1), a maior parte delas dividida em três complexos de espécies, i.e. complexo *A. prolifera* (afloramentos rochosos no leste do Brasil, se estendendo até os Andes), complexo *A. teres* (afloramentos rochosos no sudeste do Brasil), e complexo *A. ochreatea* (campos rupestres na cadeia do Espinhaço e outros afloramentos rochosos no nordeste do Brasil) (Borba *et al.*, 2000; Borba, 2003; Mota, 2006; Azevedo & van den Berg, 2007a, 2007b; Melo & Borba, 2011).

As populações desses complexos constituem manchas em formações rupestres semelhantes a ilhas propícias à colonização, em meio a matrizes arbóreas ou campestres com condições pouco favoráveis (*inselbergs*, na Mata Atlântica; campos rupestres, no Cerrado e Caatinga) (Giulietti & Pirani, 1988; Porembski, 2007, Rapini *et al.*, 2008). Eventos de dispersão entre essas “ilhas” são responsáveis por moldar a distribuição atual de espécies rupícolas, sendo possível inferir as rotas pelas quais essas formações puderam ser alcançadas, inclusive revelando possíveis casos de dispersão a longa distância que poderiam explicar distribuições disjuntas como ocorre, por exemplo, no complexo *A. prolifera*. De outra forma, eventos históricos de retração e expansão desses três biomas, devido às flutuações climáticas do Quaternário, afetaram a distribuição passada de espécies na América do Sul (Carnaval & Moritz, 2008; Werneck, 2011). Estas oscilações restringiram a distribuição geográfica das espécies não adaptadas às condições extremas, levando-as a persistir em áreas onde o clima ainda permanecia favorável (Hipótese dos Refúgios do Pleistoceno; Haffer, 1969; Graham, Moritz & Williams, 2006).

Os complexos *A. teres* [*A. adamantinensis* (Brade) Pridgeon & M.W. Chase, *A. johannensis* (Barb. Rodr.) Pridgeon & M.W. Chase, *A. fabriobarrosii* (Borba) F. Barros & F. Pinheiro, e *A. teres* (Lindl.) Borba] e *A. ochreatea* [*A. ochreatea* (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase e *A. ochreatea* subsp. *cylindrifolia* (Borba & Semir) Borba] são compostos por espécies com ramicaule mais curto do que as folhas, que são cilíndricas ou

conduplicadas e bastante carnosas. Estas são bastante diferentes vegetativamente das espécies do complexo *A. prolifera* [*A. hamosa* (Barb. Rodr.) Pridgeon & M.W. Chase, *A. limae* (Porto & Brade) Pridgeon & M.W. Chase, *A. modestissima* (Rchb.f. & Warm.) Pridgeon & M.W. Chase, *A. fornograndensis* L. Kollmann & A.P. Fontana e *A. prolifera* (Herb. ex Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase], que possuem ramicaule achatado no ápice, tão ou mais longos que as folhas, que podem ser conduplicadas ou planas, muito carnosas, eretas ou dobradas em direção ao ramicaule, formando um gancho. Apesar destas distinções quanto à morfologia vegetativa, as estruturas florais de espécies de diferentes complexos são muito similares – provavelmente devido à adaptação à síndrome de polinização miiófila – e podem chegar a contrapor as relações hipotetizadas pela morfologia foliar (e.g., análises morfométricas demonstraram que *A. teres* exibe maior similaridade floral com *A. ochreatea*, *A. modestissima* e *A. hamosa* do que com quaisquer das outras espécies do mesmo complexo; Melo & Borba, 2011). Estes três grupos rupícolas são constituídos por 11 táxons, e têm sido alvo de diversos estudos, em parte devido à dificuldade em delimitar as entidades taxonômicas que compõem tais grupos, e aos pouco usuais mecanismos de polinização, sistemas de reprodução e variabilidade genética encontrados, quando comparado com a maior parte das orquídeas.

Pabst & Dungs (1975) propuseram uma classificação baseada em caracteres vegetativos na qual cada complexo foi inserido em uma seção distinta - complexo *A. teres* na seção *Leptotefolia* Pabst (*A. leptotifolia* Alliance), *A. ochreatea* na seção *Longiracemosae* Pabst (*A. glumacea* Alliance) e o complexo *A. prolifera* na seção *Brachystachyae-Longicaules* Pabst (*A. hamosa* Alliance) – principalmente, devido à forma das folhas e comprimento relativo da inflorescência. Posteriormente, Luer (1986) agrupou as espécies dos complexos *A. teres* e *A. ochreatea* na abrangente seção *Brachystachyae*, desconsiderando a morfologia vegetativa em sua classificação. Este mesmo autor ainda inseriu as espécies do complexo *A. prolifera* na seção *Sicariae* subseção *Pectinatae*, juntamente com *A. pectinata* (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase, por possuírem o ramicaule notadamente comprimido no ápice, sem, no entanto, fazer a distinção entre plantas eretas (complexo *A. prolifera*) ou pêndulas (*A. pectinata*).

A ocorrência de homoplasias é apontada por Pridgeon *et al.* (2001, 2005) como principal fator de discordância entre as relações filogenéticas dentro de *Pleurothallis* *sensu* Luer obtidas por ele, as obtidas por Neyland *et al.* (1995) e a classificação

tradicional (Luer, 1986b). Ainda de acordo com Pridgeon *et al.* (2001), diversos caracteres morfológicos surgiram independentemente na evolução do grupo. Dentre eles, podem ser citados caracteres florais diretamente relacionados com a polinização dessas plantas, e que tem passado por eventos de convergência e/ou irradiação, adaptados à polinização por Diptera (Dressler, 1981, 1993; Borba & Semir, 2001; Melo, *et al.*, 2011). Além disso, parte da variabilidade encontrada nos caracteres vegetativos para a subtribo está fortemente ligada à influência do ambiente em que se encontram os espécimes, estando, portanto, sujeita a convergência pela pressão do habitat. Como exemplo, pode-se citar a morfologia das folhas, que são bastante carnosas, podendo ser até cilíndricas nas espécies que ocorrem como epífitas ou rupícolas em áreas mais expostas e, contrariamente, são bem delgadas ou pouco carnosas em ambientes mais úmidos no interior de florestas (Melo & Borba, 2011).

Borba & Semir (2001), Borba *et al.* (2001, 2002), Melo & Borba (2011) e Melo *et al.* (2011), ao investigarem a biosistemática de tais complexos, sugeriram que os caracteres reprodutivos dessas espécies não seriam informativos do ponto de vista filogenético, tratando-se, provavelmente, de exemplos de radiação e/ou convergência das formas florais entre táxons menos relacionados filogeneticamente, devido à adaptação a mecanismos similares de polinização por grupos de dípteros. Eles sugerem, portanto, que os caracteres vegetativos seriam mais informativos sobre as relações filogenéticas das espécies que se diversificaram e ocuparam os afloramentos rochosos no Brasil, notadamente, na Cadeia do Espinhaço. Borba *et al.* (2002) chamaram a atenção para o sinal filogenético carregado nos caracteres vegetativos dentro do complexo *A. teres*, onde as relações de parentesco entre *A. teres* e *A. johannensis*, espécies que atraem espécies de polinizadores de diferentes famílias de Diptera (Borba & Semir (2001), são refletidas mais claramente por suas características foliares do que pelas florais. A partir destes resultados, Melo & Borba (2011) sugeriram ainda que os três grupos rupícolas de *Acianthera* deveriam constituir distintos clados divergentes no gênero.

Os diversos estudos filogenéticos focados em Pleurothallidinae esclareceram várias relações filogenéticas e resolveram diversos problemas taxonômicos na subtribo (e.g., Pridgeon *et al.*, 2001; Chiron, Guiard & van den Berg, 2012), porém não endereçaram questões relacionadas a evolução de caracteres morfológicos e ocupação de habitats exclusivos em um nível infragenérico.

No presente trabalho, análises filogenéticas de sequências de DNA foram empregadas para testar a hipótese do monofiletismo do conjunto de espécies rupícolas de campos rupestres, tratando-se de uma linhagem que teria colonizado este ambiente uma única vez a partir do estoque presente na Mata Atlântica. Alternativamente, este grupo rupícola poderia ser constituído de mais linhagens com diferentes eventos histórico/evolutivos de ocupação desses ambientes, e estas linhagens seriam congruentes com os padrões baseados na morfologia vegetativa das espécies. Além disso, resultados de estudos anteriores (Borba & Semir, 2001, Borba *et al.*, 2002; Melo & Borba, 2011) sobre eventos de convergência e irradiação adaptativas de caracteres morfológicos puderam ser comparados com hipóteses de parentesco em comum (filogenia) e de eventos dispersivos/vicariantes, para as espécies rupícolas, complementando esses estudos e levantando novas questões sobre as relações entre síndromes de polinização, evolução de caracteres e especiação neste grupo.

Materiais e métodos

Táxons amostrados

Para o grupo interno foram amostrados 63 terminais, sendo 28 terminais epífitas (22 espécies), 35 terminais rupícolas (nove espécies e uma sub-espécie) (Tabela 1.1). Dentre estes, há 27 terminais (10 espécies e uma sub-espécie) da seção *Tricarinatae*, sendo 13 terminais do complexo *A. teres* (quatro espécies) e sete terminais do complexo *A. ochreatea* (uma espécie e uma sub-espécie) (Figuras 1.1; 1.2). Há 22 terminais (nove espécies) da seção *Sicariae*, sendo 15 terminais (cinco espécies) do complexo *A. prolifera*. Foram inseridos de um a três *taxa* de cada uma das outras seções de *Acianthera* propostas por Chiron & van den Berg (2012), com exceção da seção *Cryptophoranthae* (Luer) Chiron & van den Berg, o que não interfere na representatividade da amostra (tanto da diversidade morfológica quanto da amplitude de ocorrência das espécies de *Acianthera*), já que a seção *Cryptophoranthae* inclui apenas seis espécies pouco relacionadas às espécies dos complexos rupícolas (Chiron & van den Berg, 2012; Chiron *et al.*, 2012). Para a escolha do grupo externo, foram levadas em consideração as relações filogenéticas dos gêneros pertencentes à Pleurothallidinae, recuperadas por Pridgeon *et al.* (2001). Como grupo externo mais distante, foram escolhidas *Octomeria gracilis* Lodd ex. Lindl. e *O. grandiflora* Lindl. Como grupo externo mais próximo, indicada naquele trabalho como pertencente ao grupo irmão do grande clado onde se insere o gênero *Acianthera*, foi escolhido *Myoxanthus ruschii* Fraga & L.Kollmann.

Extração de DNA genômico, teste de primers, amplificação de fragmentos específicos e sequenciamento de DNA

A extração de DNA total foi realizada a partir de amostras frescas, seguindo o protocolo de Doyle & Doyle (1987), acrescido de uma extração adicional com clorofórmio, a fim de obter amostras com menos compostos secundários e proteínas, ao final do processo. Foram escolhidas duas regiões nucleares (ITS e ETS) e duas plastidiais (*psbD-trnT* e *atpL-atpH*), com taxas moderadas de variação, como sendo as mais aplicáveis ao presente trabalho. A região ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) foi amplificada utilizando-se o par de *primers* ITS75/ITS92 (Desfeaux *et al.*, 1996). Para o ETS, foi

utilizado o par de *primers* ETS18S (Baldwin Markos, 1998) /ETS_orchid (Monteiro *et al.*, 2010) ou ETS18S/ETS*Aci* (desenhado para este estudo), quando o par original falhou ao amplificar algumas amostras. Os *primers* utilizados para os marcadores plastidiais, *psbD-trnT* e *atpL-atpH*, foram os descritos por Shaw *et al.* (2007).

As reações de amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) para o ITS foram realizadas em um volume final de 30 μ L, com *mix* composto por: tampão de reação 1X (Phoneutria Ltda., Belo Horizonte, Brasil), $MgCl_2$ a 1,5 mM, dNTP a 0,4 mM, *primers* a 1 μ M cada, 3 μ g de BSA (Albumina Bovina Sérica), DMSO (Dimetil Sulfóxido) a 2%, Betaína a 1 M, 2 unidades de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria Ltda.), 1 μ L de DNA total diluído 1:10 e água ultrapura (q.s.p). Para a região ETS, foi utilizado o seguinte mix de reação com 25 μ L de volume final: tampão de reação 1X (Phoneutria Ltda.), $MgCl_2$ a 1,5 mM, dNTP a 0,2 mM, *primers* a 0,4 μ M cada, 5 μ g de BSA, 1,75 unidades de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria Ltda.), 1 μ L de DNA total e água ultrapura (q.s.p). Para a amplificação das regiões plastidiais, a reação foi realizada em um volume final de 25 μ L, com os seguintes componentes: tampão de reação 1X (Phoneutria Ltda.), $MgCl_2$ a 1,5 mM, dNTP a 0,2 mM, *primers* a 0,8 μ M cada, 1,25 μ g de BSA, 1,25 unidades de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria Ltda.), 1 μ L de DNA total e água ultrapura (q.s.p). Em algumas ocasiões, amostras de difícil amplificação foram amplificadas utilizando 0,4 unidades de *Taq* polimerase Platinum e tampão de reação 1X (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Califórnia, EUA). Os produtos da reação de PCR foram quantificados através de comparação com marcadores de massa (Low Mass) por eletroforese em gel de agarose. As amostras com massa suficiente foram purificadas e enviadas à Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul) para sequenciamento.

Tratamento das sequências nucleotídicas (alinhamento e codificação de gaps)

A edição das sequências foi realizada no pacote Staden 1.7.0 (Staden, 1996). As sequências consenso foram, então, alinhadas pelo programa Muscle (Edgard, 2004) implementado no programa MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando-se os parâmetros propostos pelo *default* do programa. Foram realizados ajustes manuais em alguns pontos do alinhamento. A fim de utilizar o sinal filogenético contido nos gaps (i.e., sinal advindo de processos de inserções e deleções), estes foram codificados por meio do programa SeqState (Müller, 2005), aplicando a codificação simples proposta

por Simmons & Ochoterena (2000). Esta forma de codificação parece apresentar um bom desempenho, quando comparada com a exclusão dos sítios contendo gaps ou com a codificação desses como quinto estado (Simmons, Müller & Norton, 2007). Além disso, este procedimento não requer suposições tão fortes a respeito da origem dos gaps (i.e., eventos mutacionais que levam a variação no comprimento das sequências), quanto à codificação complexa CIC (Simmons & Ochoterena, 2000) ou sua forma modificada (MCIC), proposta por Müller (2006). Para a realização das análises filogenéticas, as sequências foram concatenadas utilizando-se o programa Bioedit (Hall, 1999), a fim de se obter sete matrizes finais: uma para cada região em separado, uma para os marcadores de cpDNA combinados, uma para as regiões nucleares combinadas e uma contendo todas as regiões (Matriz combinada).

Análises filogenéticas

Dois critérios de otimização, Máxima Parcimônia e Máxima Probabilidade Posterior (Análise Bayesiana), foram adotados com o intuito de verificar a ocorrência de possíveis falhas relacionadas ao método de inferência filogenética, como, por exemplo, atração de ramos longos (pelo critério da parcimônia) e repulsão de ramos curtos (critérios que utilizam modelos explícitos) (Felsenstein, 1978; Swofford, 2001; Bergsten, 2005). Além disso, pode-se verificar também a congruência metodológica, quando critérios de otimização completamente distintos recuperam as mesmas relações entre os grupos.

As análises de inferência filogenética pelo critério da Parcimônia foram realizadas no programa TNT (Goloboff *et al.* 2003), utilizando-se a matriz de gaps codificados adicionada a matriz original. Para cada uma das sete matrizes, foram realizadas 100 buscas por árvores de Wagner (Farris, 1970), retendo até 10 árvores por busca, com todos os caracteres não ordenados e com pesos iguais (Fitch, 1971). As árvores retidas foram submetidas a três rodadas de rearranjo de ramos (TBR) e os ramos de comprimento mínimo igual a zero foram colapsados (regra 1). Foi gerada uma árvore de consenso estrito de todas as árvores mais parcimoniosas (MPT), na qual foram plotados os valores de suporte de grupos (Jackknife). Os suportes foram determinados pelo programa TNT, sendo que para o Jackknife (Farris *et al.*, 1996) foram realizadas 10.000 réplicas, com probabilidade de remoção igual a 0,37.

Os melhores modelos de evolução nucleotídica, determinados pelo programa jModeltest 2.1.1 (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba *et al.*, 2012) e escolhidos pelos seus valores de Critério de Informação Bayesiano (BIC), foram aplicados em cada partição (tabela 1.2). Para os dados de gaps codificados, foi implementado um modelo para dados binários (similar ao F81) com a codificação para caracteres variáveis em todos os sítios (lset coding = variable). Os valores de verossimilhança foram calculados para os 24 modelos implementados no Mr. Bayes 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012), utilizando como árvore guia uma produzida pelo próprio programa a partir do critério de Máxima Verossimilhança. As análises bayesianas foram realizadas no programa Mr. Bayes 3.2 utilizando-se a matriz original concatenada à dos gaps codificados. Duas análises independentes, com quatro cadeias cada, foram iniciadas de pontos aleatórios no espaço amostral e correram por 10^7 gerações, sendo amostradas a cada 500 gerações ($4,0 \times 10^4$ gerações amostradas). A convergência das cadeias foi avaliada por meio do monitoramento do desvio padrão médio das frequências das bifurcações das árvores (ASDSF), do fator de redução potencial de escala (PSRF) e do tamanho efetivo das amostras (ESS). Valores de ASDSF menores que 0,01, de PSRF entre 0,98 e 1,02 e de ESS maiores que 500 foram considerados como indicadores de estacionariedade. O burn-in aplicado foi de 25%, o que permitiu que cerca de 3×10^4 árvores fossem utilizadas para gerar um consenso de maioria, onde foram plotados os valores de probabilidade posterior, tomados como uma medida de suporte dos grupos.

Resultados

Os resultados das análises, para cada um dos marcadores separadamente, foram congruentes com os obtidos nas análises das matrizes combinadas (nuclear e plastidial) e de evidência total, à exceção de uma incongruência topológica obtida na análise da região *atpL-H*. Dessa forma, serão apresentados aqui os resultados apenas das inferências feitas a partir dos dados combinados.

A matriz de marcadores nucleares combinados possui 66 táxons, 1.300 caracteres, dos quais 372 (28,6%) são informativos para parcimônia (PIC). Foram codificados 84 gaps, o que corresponde a 6,5% do total de caracteres obtidos. A análise de máxima parcimônia recuperou nove árvores mais parcimoniosas (MPT), com o comprimento total de 1.143, Índice de Consistência (CI) igual a 0,63 e Índice de Retenção (RI) igual a 0,85. Por sua vez, a matriz contendo as sequências plastidiais alinhadas contém, para 66 táxons, 2.054 caracteres, dentre os quais 288 (14%) são parcimônia informativos e 162 (7,9%) advém da codificação de gaps. O número de árvores mais curtas retidas para essa matriz (13.806) foi muito superior ao encontrado para a matriz de dados nucleares. O comprimento destas MPT foi de 795 passos, com CI = 0,76 e RI = 0,88. Por fim, a concatenação das sequências nucleares e plastidiais rendeu uma matriz alinhada (aqui tratada por matriz de evidência total) de comprimento igual a 3.354 caracteres. Destes, 660 (19,7%) eram informativos para parcimônia e 246 (7,3%) originam da codificação de gaps. O número de árvores retidas para a matriz combinada foi de 180, com comprimento igual a 2.009, CI = 0,66 e RI = 0,85.

As relações obtidas pelas análises bayesianas foram congruentes às obtidas através do critério da parcimônia para todas as partições. O número de clados com alto suporte na bayesiana (PP > 95) foi bem superior à quantidade de clados bem sustentados (JK > 85) obtidos nas análises de máxima parcimônia (tabela 1.2). Os modelos escolhidos para cada partição (tabela 1.2) e os parâmetros utilizados levaram a convergência das cadeias em todas as análises.

Marcadores nucleares e plastidiais

As espécies rupícolas da seção *Tricarinatae* formaram dois clados: o complexo *A. teres* (Clado A, figura 1.3), composto por *A. adamantinensis*, *A. fabriobarrosii*, *A.*

johannensis e *A. teres*, tendo na base *A. tricarinata* (PP = 0,84), e o complexo *A. ochreatea* (Clado B, figura 1.3), composto por *A. ochreatea* subsp. *ochreatea* e *A. ochreatea* subsp. *cylindrifolia*, com *A. glumacea* na base (PP = 1,0 e JK = 97). Estes dois grupos (Clado A+A. *tricarinata* e Clado B+A. *glumacea*) aparecem como grupo irmãos (PP = 1,0 e JK = 99). Para os marcadores plastidiais (figura 1.3), as relações neste grupo não foram bem resolvidas, sendo que apenas o complexo *A. ochreatea* (clado B; PP = 1,0 e JK = 83) foi recuperado. O complexo *A. prolifera* (*A. prolifera*, *A. hamosa*, *A. limae*, *A. modestissima* e *A. aff. fornograndensis*) formou um clado bem sustentado (Clado C), tanto para os dados nucleares (PP = 1,0 e JK = 97) quanto para os plastidiais (PP = 1,0 e JK = 93). Este complexo apresenta como grupo irmão *A. pectinata*, espécie epífita em Mata Atlântica, constituindo com esta a seção *Pectinatae* (PP = 1,0 e JK = 100).

Matriz combinada

As espécies de *Acianthera* rupícolas formaram três cladogramas (figura 1.4). As espécies rupícolas da seção *Tricarinatae* formaram um grupo monofilético (PP = 1,0 e JK = 88) irmão de *A. tricarinata*. Este clado se subdivide em dois grupos menores, correspondentes aos complexos *A. teres* (clado A) e *A. ochreatea* (clado B), constituídos, respectivamente, por *A. adamantinensis*, *A. fabriobarrosii*, *A. johannensis* e *A. teres* (PP = 0,91 e JK = 53), e por *A. glumacea*, *A. ochreatea* subsp. *ochreatea* e *A. ochreatea* subsp. *cylindrifolia* (PP = 1,0 e JK = 99). *Acianthera glumacea*, espécie de hábito epifítico, apareceu como espécie irmã do complexo *A. ochreatea*. As espécies do complexo *A. prolifera* formaram um clado (PP = 1,0 e JK = 99), que tem como espécie irmã *A. pectinata*. Da mesma forma como observado para as análises das partições separadamente, a resolução obtida não possibilitou recuperar as relações entre as espécies deste grupo.

Tabela 1.1: *Taxa, vouchers* e localidades para os *taxa* utilizados nas análises filogenéticas de espécies de *Acianthera*, com ênfase para as espécies ocorrentes nos campos rupestres brasileiros.

#	Espécie	Voucher	Localidade
1	<i>Acianthera macropoda</i>	W.S. Mancinelli 1281; UPCB	Joinville, SC
2	<i>Acianthera saurocephala</i>	F. Barros s.n.; SP 401852	Poços de Caldas, MG
3	<i>Acianthera saurocephala</i>	F. Barros s.n.; SP 401843	Cananéia, SP
4	<i>Acianthera hygrophila</i>	W.S. Mancinelli 1276; UPCB	Três Barras, SC
5	<i>Acianthera purpureoviolacea</i>	Sem voucher	
6	<i>Acianthera crinita</i>	W.S. Mancinelli 953	Ponta Grossa, PR
7	<i>Acianthera hystrix</i>	Sem voucher	
8	<i>Acianthera gracilisepala</i>	W.S. Mancinelli 952	Ponta Grossa, PR
9	<i>Acianthera bragae</i>	W.S. Mancinelli 1351	Adrianópolis, PR
10	<i>Acianthera saundersiana</i>	E.C. Smidt 991; UPCB	Cananéia, SP
11	<i>Acianthera saundersiana</i>	E.C. Smidt 995; UPCB	Penha, SC
12	<i>Acianthera</i> aff. <i>fornograndensis</i>	L.F.A de Paula 346; BHCB	Teófilo Otoni, MG
13	<i>Acianthera hamosa</i>	E.C. Smidt	Guartelá, PR
14	<i>Acianthera hamosa</i>	M.C. Melo 8; BHCB	Carrancas, MG
15	<i>Acianthera hamosa</i>	A. Massensini Jr. 16; BHCB	Tiradentes, MG
16	<i>Acianthera hamosa</i>	A. Massensini Jr. 62; BHCB	Rio de Contas, BA
17	<i>Acianthera hamosa</i>	B.M. Carvalho 55; BHCB	Ilicínea, MG
18	<i>Acianthera limae</i>	M.C. Melo 5; BHCB	Santa Bárbara, MG
19	<i>Acianthera limae</i>	M.C. Melo 7; BHCB	Nova Lima, MG
20	<i>Acianthera modestisima</i>	M.C. Melo 3; BHCB	Caeté, MG
21	<i>Acianthera modestisima</i>	F. Barros s.n.; SP 401818	Serra Negra, SP
22	<i>Acianthera modestisima</i>	F. Barros s.n.; SP 401882	São Tomé Das Letras, MG
23	<i>Acianthera recurva</i>	F. Barros s.n.; SP 401809	Lençóis, BA
24	<i>Acianthera modestissima</i>	W.S. Mancinelli 941	Tibagi, PR
25	<i>Acianthera pectinata</i>	R.P. Romanini 291; SP	Cananéia, SP
26	<i>Acianthera pectinata</i>	N.F.O. Mota <i>et al.</i> 516; BHCB	Virginópolis, MG
27	<i>Acianthera prolifera</i>	M.C. Melo 4; BHCB	Santa Bárbara, MG
28	<i>Acianthera prolifera</i>	A. Massensini Jr. 75; BHCB	Palmeiras, BA
29	<i>Acianthera prolifera</i>	coleção viva Ibt-SP 14888	Colômbia
30	<i>Acianthera aphotosa</i>	F. Barros s.n.; SP 401833	ES
31	<i>Acianthera aphotosa</i>	H.J. Targa s.n.; SP 401876	Sardinha, RJ
32	<i>Acianthera magalhanesii</i>	F. Barros s.n.; SP 401838	BA
33	<i>Acianthera exarticulata</i>	F. Barros s.n.; SP 401878	Parati, RJ
34	<i>Acianthera luteola</i>	E.C. Smidt 916	Curitiba, PR
35	<i>Acianthera dutrae</i>	J. Klein 82	Bom Jesus, RS
36	<i>Acianthera adamantinensis</i>	A. Massensini Jr. <i>et al.</i> 27; BHCB	Diamantina, MG
37	<i>Acianthera adamantinensis</i>	Sem voucher	Rio Preto, MG
38	<i>Acianthera adamantinensis</i>	J.A.N. Batista 2829; BHCB	Grao Mogol, MG
39	<i>Acianthera aveniformis</i>	E.C. Smidt 999	Curitiba, PR

40	<i>Acianthera fabriobarrosii</i>	E.L. Borba <i>et al.</i> 512; BHCB	Grão Mogol, MG
41	<i>Acianthera fabriobarrosii</i>	J.A.N. Batista 2862; BHCB	Diamantina, MG
42	<i>Acianthera fabriobarrosii</i>	E.L. Borba <i>et al.</i> 513; BHCB	Serra do Cabral, MG
43	<i>Acianthera glumacea</i>	s.c. BHCB 145168	Buerarema, BA
44	<i>Acianthera johannensis</i>	E.L. Borba 504; UEC	S. João Del Rei, MG
45	<i>Acianthera johannensis</i>	E.L. Borba s.n. ; BHCB 145171	Bom Jardim de Minas, MG
46	<i>Acianthera johannensis</i>	E.L. Borba 511; UEC	Conceição de Ibitipoca, MG
47	<i>Acianthera leptotifolia</i>	Coleção viva MHNJB-MG 1148	Carrancas, MG
48	<i>Acianthera leptotifolia</i>	F. Barros s.n.; SP 401868	Atibaia, SP
49	<i>Acianthera ochreatea</i>	A. Massensini Jr. 22; BHCB	Mucugê, BA
50	<i>Acianthera ochreatea</i>	A. Massensini Jr. 18; BHCB	Morro do Chapéu, BA
51	<i>Acianthera ochreatea</i>	A. Massensini Jr. 23; BHCB	Brejo da Madre de Deus, PE
52	<i>Acianthera ochreatea</i>	A. Massensini Jr. 61; BHCB	Rio de Contas, BA
53	<i>Acianthera ochreatea</i>	L.P. Félix 13276	PB
54	<i>Acianthera ochreatea</i> subsp. <i>cylindrifolia</i>	E.L. Borba 1320; UEC	Grão Mogol, MG
55	<i>Acianthera ochreatea</i> subsp. <i>cylindrifolia</i>	J.M. Costa 1061, BHCB	Serra Nova , MG
56	<i>Acianthera sonderana</i>	W.S. Mancinelli 1181; UPCB	Lapa, PR
57	<i>Acianthera sonderana</i>	W.S. Mancinelli 1293	Joinville, SC
58	<i>Acianthera teres</i>	J.A.N. Batista <i>et al.</i> 2874; BHCB	Diamantina, MG
59	<i>Acianthera teres</i>	J.A.N. Batista <i>et al.</i> 2747; BHCB	Moeda, MG
60	<i>Acianthera teres</i>	Sem voucher	Rio Vermelho, MG
61	<i>Acianthera teres</i>	M. Pereira 895; BHCB	Santana do Riacho, MG
62	<i>Acianthera tricarinata</i>	W.S. Mancinelli 1013; UPCB	Adrianópolis, PR
63	<i>Acianthera alborosea</i>	W.S. Mancinelli 1013	Joinville, SC
	<i>Octomeria gracilis</i>	EC. Smidt 947	Pontal do Paraná, PR
	<i>Octomeria grandiflora</i>	W.S. Mancinelli 1372	Joinville, SC
	<i>Myoxanthus ruschii</i>	C.N. Fraga 780; MBML	Santa Teresa, ES

Tabela 1.2: principais parâmetros das análises de reconstrução filogenética (Parcimônia e Bayesiana) para cada conjunto de dados analisado. MPT = árvores mais parcimoniosas.

Parâmetro	ITS	ETS	<i>atpL- atpH</i>	<i>psbD- trnT</i>	Nuclear combinados	Plastidiais combinados	Evidência total	
Número de táxons	66	62	64	66	66	66	66	
Número total de caracteres (Gaps codificados)	737(49)	563(34)	1034(88)	1020(74)	1300(84)	2054(162)	3354(246)	
Caracteres variáveis	289	280	317	241	569	558	1127	
Caracteres informativos para parcimônia	182	190	184	104	372	288	660	
% Caracteres informativos para parcimônia	24.7	33.7	17.8	10.2	28.6	14	19.7	
Comprimento das MPT	632	499	442	324	1143	795	2009	
Número de MPT retidas	12.144	18	10.800	32	9	13.806	180	
Número de clados no consenso estrito	30	35	32	33	48	33	47	
Número de clados com JK \geq 85	14	17	16	13	24	15	26	
Número de clados com PP \geq 95	23	25	23	24	38	28	41	
Índice de Consistência (CI)	0,59	0,7	0,79	0,79	0,63	0,76	0,66	
Índice de Retenção (RI)	0,84	0,88	0,91	0,88	0,85	0,88	0,85	
Modelo implementado	HKY + Γ (ITS1, ITS2); K80 + I (5.8S)		HKY + Γ	GTR + Γ	GTR + Γ	Misto	Misto	Misto

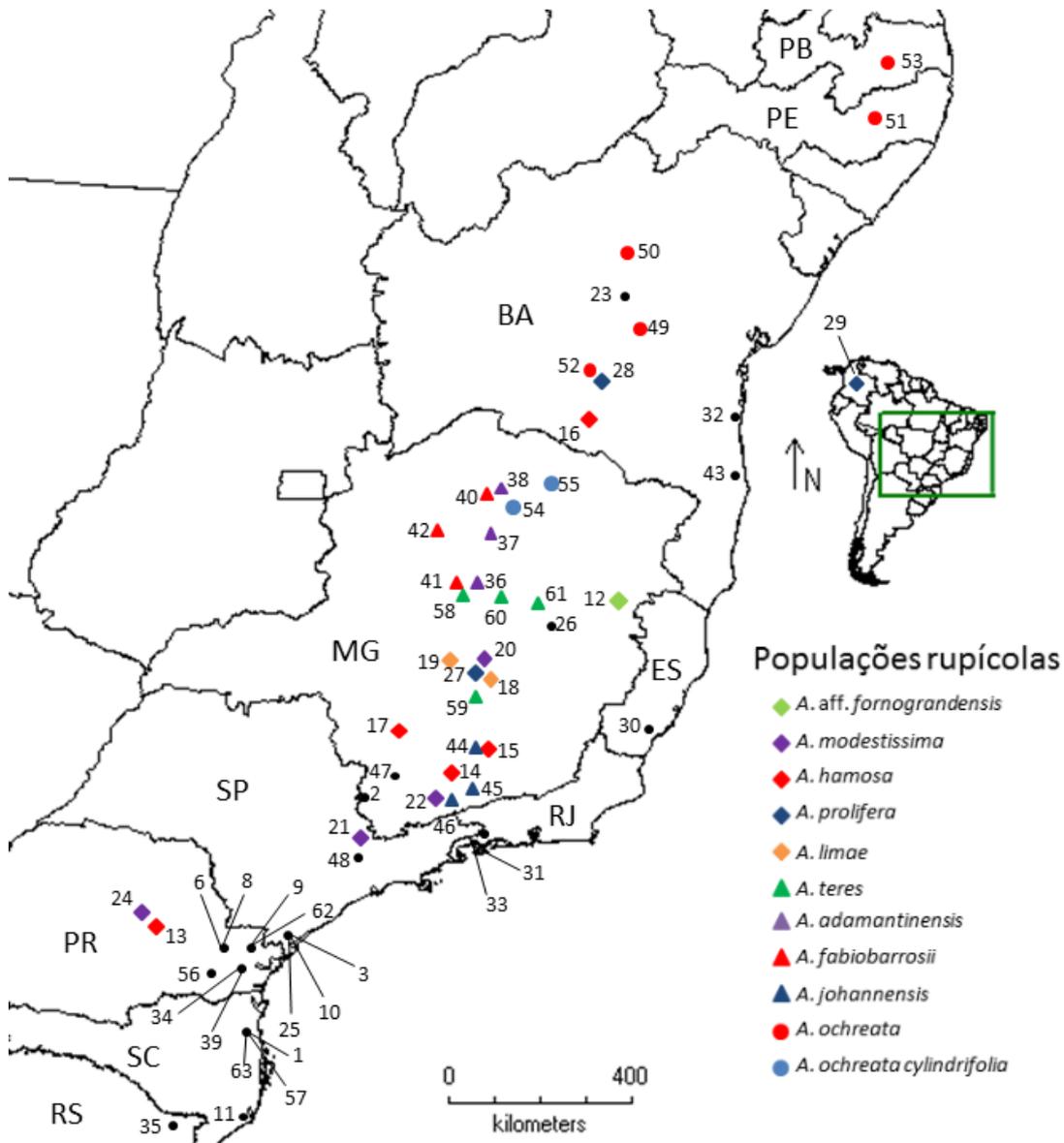


Figura 1.1: Distribuição geográfica dos *taxa* utilizados nas análises filogenéticas de espécies de *Acianthera*, com ênfase para as espécies ocorrentes nos campos rupestres brasileiros. Os números correspondem aos *taxa* listados na tabela 1.2. Acrônimos para os estados brasileiros: BA = Bahia; ES = Espírito Santo; MG= Minas Gerais; PB = Paraíba; PR = Paraná; PE = Pernambuco; RG = Rio Grande do Sul; RJ = Rio de Janeiro; SP = São Paulo; SC = Santa Catarina.



Figura 1.2: Variação da morfologia vegetativa e floral nos complexos rupícolas de *Acianthera* ocorrentes nos campos rupestres do leste do Brasil. (A-H) Complexo *Acianthera teres*: *A. adamantinensis* (A, B); *A. fabriobarrosii* (C, D); *A. johannensis* (E, F); *A. teres* (G, H). (I-L) Complexo *A. ochreatea*: *A. ochreatea* subsp. *ochreatea* (I, J); *A. ochreatea* subsp. *cylindrifolia* (K, em simpatria com *A. fabriobarrosii* - folhas vermelhas, L). (M-T) Complexo *A. prolifera*: *A. limae* (M, N); *A. hamosa* (O, P); *A. prolifera* (Q, R); *A. modestissima* (S, T).

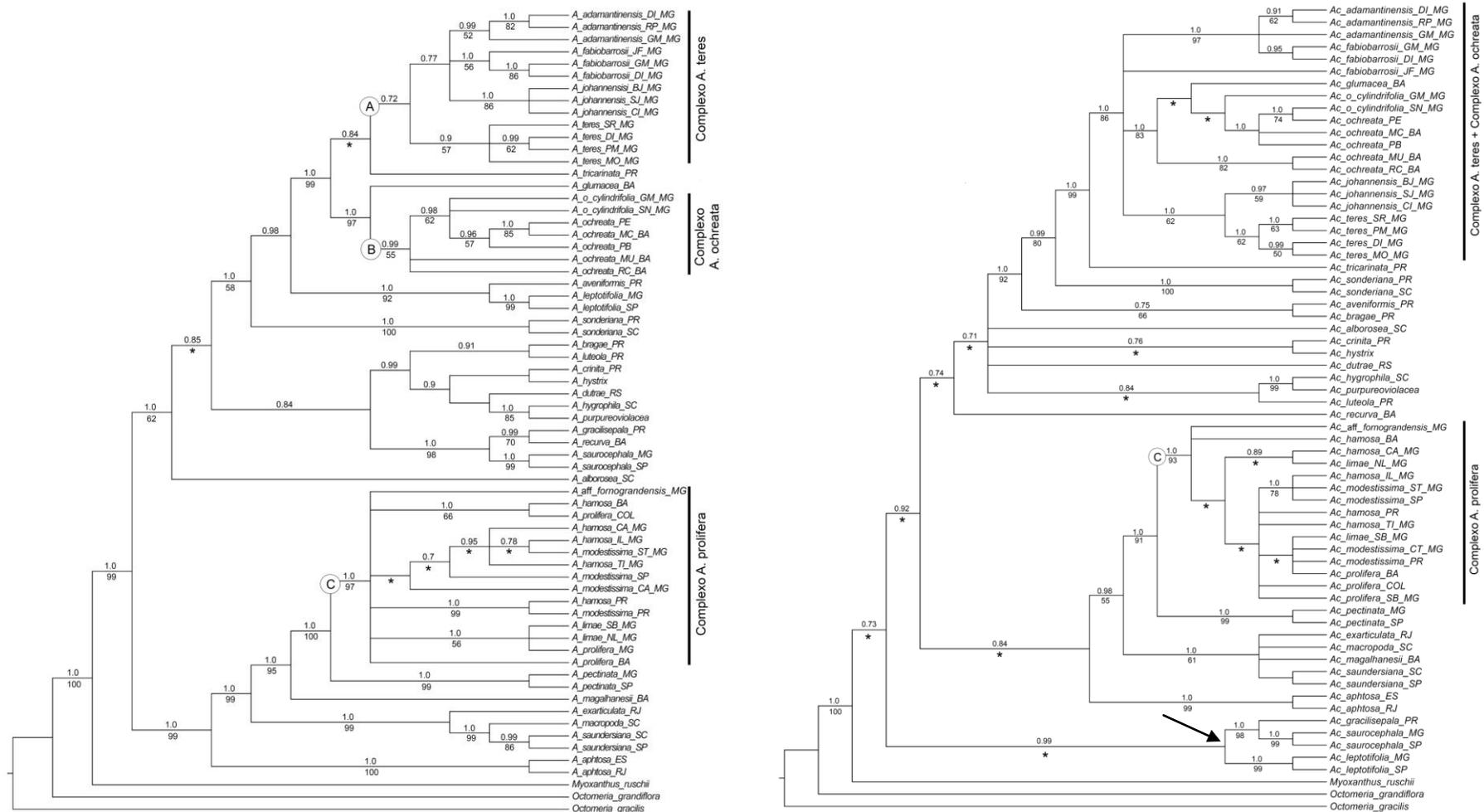


Figura 1.3: Árvores de consenso de maioria de 30.000 árvores obtidas na análise bayesiana a partir da matriz combinada de seqüências nucleares (esquerda) e da matriz combinada de seqüências plastidiais (direita), para espécies de *Acianthera*, com ênfase para as espécies ocorrentes nos campos rupestres brasileiros. Os números acima dos ramos indicam valores de probabilidade posterior (PP) dos clados e os abaixo dos ramos correspondem aos suportes de *Jackknife* (JK) obtidos em análise de máxima parcimônia. Valores de PP abaixo de 0,7 e de JK abaixo de 50 foram omitidos. Os ramos que, para a análise de parcimônia, colapsaram no consenso estrito estão marcados com asterisco (*). **A**, Complexo *A. teres*; **B**, Complexo *A. ochreate* e **C**, Complexo *A. prolifera*. Na árvore à direita, a seta indica o clado que se formou apenas em análises que incluem o marcador plastidial *atpL-H*.

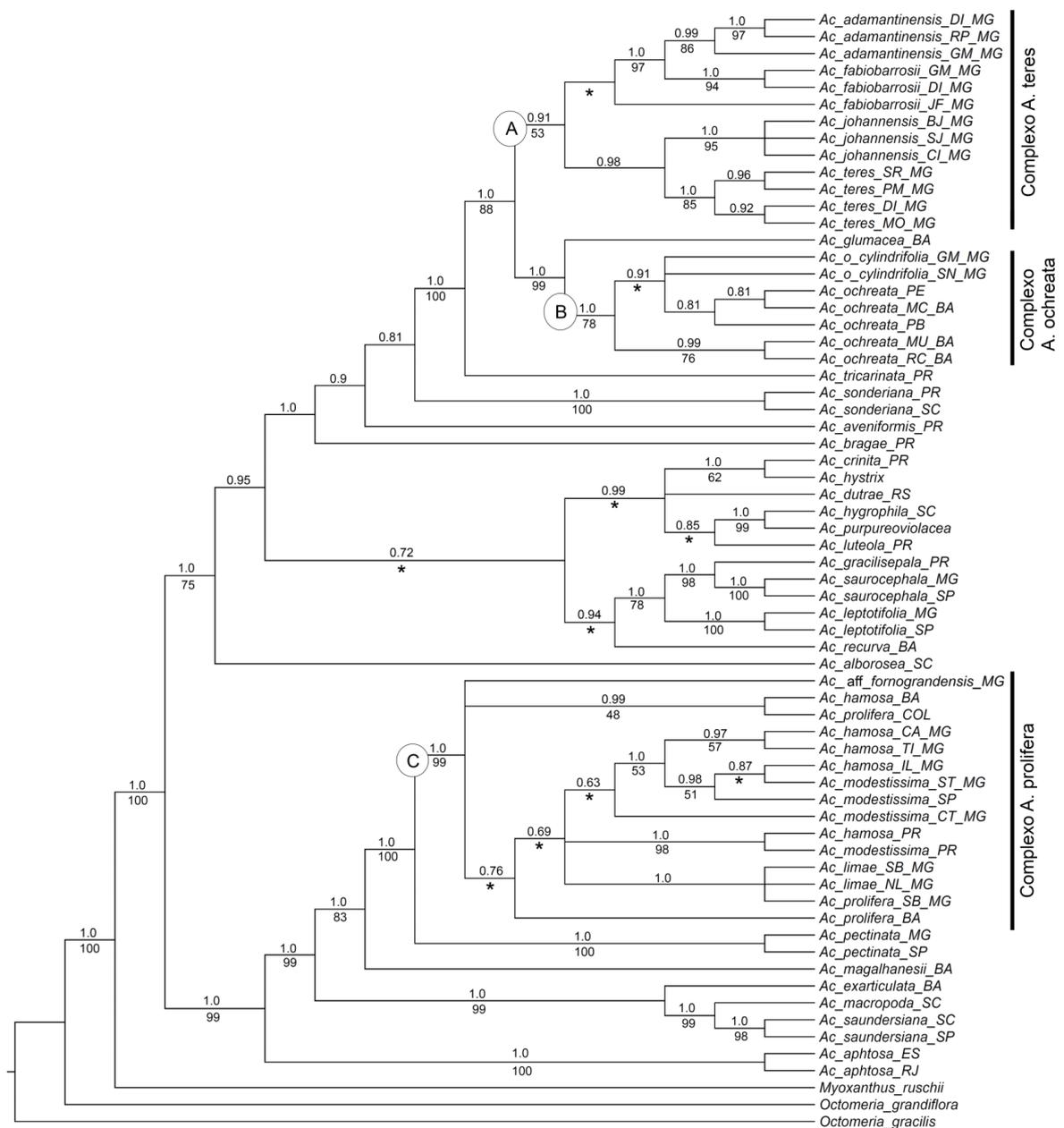


Figura 1.4: Árvore de consenso de maioria de 30.000 árvores obtidas na análise bayesiana a partir da matriz combinada de sequências nucleares e plastidiais (evidência total), para espécies de *Acianthera*, com ênfase para as espécies ocorrentes nos campos rupestres brasileiros. Os números acima dos ramos indicam valores de probabilidade posterior (PP) dos clados e os abaixo dos ramos correspondem aos suportes de *Jackknife* (JK) obtidos em análise de máxima parcimônia. Valores de PP abaixo de 0,7 e de JK abaixo de 50 foram omitidos. Os ramos que, para a análise de parcimônia, colapsaram no consenso estrito estão marcados com asterisco (*). A, Complexo *A. teres*; B, Complexo *A. ochreatea* e C, Complexo *A. prolifera*.

Discussão

As hipóteses filogenéticas inferidas pelas análises de máxima parcimônia e bayesiana demonstram que as espécies rupícolas do gênero *Acianthera* não constituem um grupo monofilético. Para todas as partições analisadas, os resultados mostram que, pelo menos, três grupos são necessários para acomodar essas espécies (mais de três para os dados plastidiais combinados), o que corresponderia a, pelo menos, três eventos independentes de invasão do ambiente rupícola por espécies de *Acianthera*: i) do complexo *A. prolifera* a partir de um ancestral comum com *A. pectinata*; ii) do complexo *A. ochreata*, tendo derivado de um ancestral comum com *A. glumacea*; iii) do complexo *A. teres* a partir de um ancestral comum de *A. tricarinatae*. Outra possibilidade, tão parcimoniosa quanto esta, seria a ocupação de ambientes rupestres por um ancestral de todas as espécies rupícolas da seção *Tricarinatae* (complexos *A. teres* e *A. ochreata*) e um retorno posterior à condição de epífita na mata Atlântica a partir de ancestral rupícola (*A. glumacea*).

A posição basal de *Acianthera glumacea*, bem como sua similaridade morfológica com as espécies do complexo *A. ochreata* (sendo diferenciada basicamente pelo seu epifitismo), sugerem que as espécies desse grupo, que hoje ocorrem em formações rupestres, podem ter derivado de uma linhagem de *A. glumacea*, provavelmente epífita na Mata Atlântica, e que a divergência (especiação) no grupo deve ter sido desencadeada pela mudança de hábitat do interior de matas para a exposição em ambientes rochosos abertos. Esta mudança pode ter sido acompanhada de eventos dispersivos levando a ocupação de afloramentos mais internos, localizados principalmente nos campos rupestres da cadeia do Espinhaço. A distribuição atual de *A. glumacea* (ocorrente na Mata Atlântica ao longo de toda a costa brasileira; Barros *et al.*, 2013) e do complexo *A. ochreata* (ver figura 1.1) sugerem uma possível rota de ocupação dos campos rupestres a partir do nordeste do Brasil, com uma expansão posterior no sentido norte-sul até alcançar a Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais. Investigações adicionais com uma amostragem mais abrangente do complexo *A. ochreata*, empregando análises filogeográficas poderiam elucidar a possível rota de invasão dos campos rupestres por estas espécies e os fatores que moldaram a sua distribuição.

A transição de hábitat nesse complexo parece não ter sido acompanhada por adaptações na morfologia floral, sendo possível que essas espécies compartilhem os mesmos polinizadores. No entanto, mecanismos de isolamento reprodutivo podem ter se desenvolvido entre essas espécies, que estão geograficamente isoladas, levando à diferenciação genética por meio do acúmulo de mutações ou pela ação da deriva (Turelli, Barton & Coyne, 2001; Rieseberg & Blackman, 2010). Sendo assim, estudos de biologia floral e sistemas de reprodução seriam muito importantes para elucidar o grau de isolamento entre *A. glumacea* e os táxons do complexo *A. ochreatea*, além de fornecer evidências de mecanismos que podem ter atuado na diversificação deste grupo, durante a transição do hábito epifítico para o rupícola.

Processos similares podem ter sido responsáveis pela origem e diversificação do complexo *A. teres* a partir de um ancestral comum, provavelmente, ocorrente em afloramentos rochosos na região de Mata Atlântica. *Acianthera tricarinata* está limitada à Mata Atlântica no sudeste e sul do Brasil (ver figura 1.1; Barros *et al.*, 2013), indicando que as espécies do complexo *A. teres* podem ter alcançado os afloramentos rupestres de Minas Gerais pela porção sudeste/leste do estado, hipótese que é reforçada pela ocorrência de espécies rupícolas do complexo em *inselbergs* na mata Atlântica nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (Borba, 2003).

Nossos resultados corroboram a sugestão feita por Borba & Semir (2001) de que os pares de espécies com morfologia e odores florais mais parecidos (*A. johannensis*/*A. fabriobarrosii* e *A. ochreatea*/*A. teres*) não corresponderiam aos táxons mais aparentados, sendo as características florais produto de convergência entre táxons menos relacionados e de divergência entre táxons mais próximos. Exemplos de convergência e irradiação adaptativa são frequentes na família Orchidaceae (e.g., Johnson, Linder & Steiner, 1998; Peakall *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011;) e sua origem está, muitas vezes, relacionada a interação da planta com seus polinizadores. As relações de parentesco encontradas para esse grupo evidenciam a ocorrência de evento de especiação alopátrica entre *A. johannensis* e *A. teres*, taxa irmãos que não possuem distribuição geográfica sobreposta (ocorrendo inclusive em formações geológicas distintas). Já o outro par de espécies desse complexo (*A. fabriobarrosii* e *A. adamantinensis*) possui distribuição sobreposta, inclusive ocorrendo sintopicamente (em Grão Mogol-MG e Diamantina-MG). Estas espécies possuem morfologia floral bastante distinta (Borba *et al.*, 2002),

além de produzirem odores diferentes e atraírem polinizadores distintos (Borba & Semir, 2001). Esses dados combinados às relações obtidas nas análises filogenéticas sugerem a ocorrência de especiação simpátrica entre o último par de espécies, a partir de isolamento reprodutivo via atração de diferentes grupos de polinizadores (i.e., uma barreira ao fluxo determinada por fatores ecológicos e não geográficos, Savolainen *et al.*, 2006).

O complexo *A. prolifera*, por apresentar uma diferenciação genética muito pequena em relação ao táxon irmão (*A. pectinata*), deve ter passado por um processo de divergência (especiação) muito recente, haja vista inclusive a dificuldade em delimitar os táxons que constituem este complexo (Melo & Borba, 2011; Capítulo 2). Os processos que dirigem a diversificação neste complexo devem ser muito parecidos com os que ocorrem nos demais grupos de *Acianthera* aqui estudados. No entanto, a baixa resolução encontrada não permite induzir quais mecanismos evolutivos estariam atuando nesse sistema em particular. Provavelmente, fatores relacionados ao habitat, fenologia e polinizadores devem guiar esses eventos especiativos, sendo responsáveis por uma barreira inicial de isolamento reprodutivo pré-zigótico.

O posicionamento do terminal proveniente da Colômbia e a pequena taxa de diferenciação entre os táxons deste complexo reforçam a hipótese de que fatores históricos importantes como eventos recentes de dispersão a longas distâncias devem ter tido lugar na evolução deste grupo (contrariamente ao sugerido para a família por Christenhusz & Chase, 2013). Aparentemente, a diversificação neste grupo iniciou-se tão recentemente que, nem mesmo marcadores moleculares mais variáveis (ISSR, Capítulo 2) ou acúmulo de enormes volumes de sequências nucleotídicas (Kunze *et al.*, dados não publicados) conseguem evidenciar com clareza a delimitação das entidades envolvidas. Esta pequena divergência molecular em relação ao demais complexos estudados aqui sugerem ainda que eventos de ocupação dos campos rupestres podem ter se dado em momentos diferentes na história evolutiva de *Acianthera*.

Em uma escala mais inclusiva, podem ser percebidos os mesmos fatores evolutivos atuando. Quando a morfologia floral e as relações de parentesco são analisadas entre os complexos, percebe-se que a similaridade morfológica floral encontrada entre espécies (e.g., *A. hamosa*, *A. modestissima*, *A. teres* e *A. ochreatea*; veja

Melo & Borba, 2011; Borba *et al.*, 2002) não corresponde à proximidade filogenética observada. Estes achados suportam a hipótese de que a similaridade floral deve-se a convergência adaptativa, relacionada a compartilhamento de polinizadores ou sobreposição de mecanismos reprodutivos em espécies não aparentadas entre os complexos. Sendo assim, estes caracteres homoplásticos devem conter um sinal enviesado, não sendo bons indicadores de relações filogenéticas, como visto em vários exemplos para outros grupos em Orchidaceae (e.g., van den Berg *et al.*, 2000; Chase *et al.*, 2009; Waterman *et al.*, 2009; Salazar *et al.*, 2011). Além disso, nossos dados mostram, a partir de um contexto filogenético, que relações específicas entre plantas e determinados grupos de polinizadores podem ser refletidos em atributos florais (Stebbins, 1970; Faegri & van der Pijl, 1979), o que fortalece a hipótese da seleção de sistemas de polinização especializados e possibilita o reconhecimento de síndromes de polinização (Jurgens, Witt & Gottsberger, 1996; Johnson *et al.*, 1998; Goldblatt, Manning & Bernhardt, 2001; Ollerton *et al.*, 2003).

A despeito da grande quantidade de sinal filogenético contido em alguns marcadores moleculares, o uso de uma única região em análises filogenéticas tem sido substituído por abordagens multiloci, que possibilitam a incorporação de volumes cada vez maiores de dados e de avaliações de fontes independentes de informação. No entanto, pode haver incongruências entre as partições utilizadas, principalmente devido à separação incompleta de linhagens contendo polimorfismos ancestrais, à hibridação ou à presença de cópias paralogas (Pamilo & Nei, 1988; de Queiroz, Donoghue & Kim, 1995; Brower, deSalle & Vogler, 1996). As inferências filogenéticas realizadas neste estudo demonstram a ocorrência de uma forte incongruência proveniente de um dos marcadores plastidiais (*atpL_H*), sendo sua origem possivelmente relacionada a um acúmulo de polimorfismos nas três espécies envolvidas (*A. gracilisepala*, *A. saurocephala* e *A. leptotifolia*). Hipóteses alternativas como a ocorrência de polimorfismo ancestral permitindo a coalescência entre alelos de espécies menos aparentadas (incomplete lineage sorting) ou a possibilidade de hibridação parecem ser menos plausíveis. A decisão de analisar as diferentes partições separadamente e depois combinar todas as regiões, tomando os resultados das análises combinadas como melhor evidência da filogenia mais provável, parece ter sido acertada. Esta metodologia, proposta por Wiens (1998), leva em consideração o maior número de caracteres

disponíveis (Kluge, 1989), mas sem desconsiderar possíveis incongruências presentes entre as partições. Desta forma, foi possível avaliar melhor as informações a respeito de eventos que moldaram o genoma dos organismos em estudo (Degnan & Rosenberg, 2009) sem perder informações congruentes entre as partições (de Queiroz *et al.*, 1995; Wiens, 1998) que possibilitaram obter árvores mais resolvidas e com relações mais sustentadas.

As relações filogenéticas obtidas aqui corroboram, de um modo geral, as obtidas por Chiron *et al.* (2012), reforçando a tese de que o espaçador ITS é um dos mais variáveis e universais marcadores moleculares utilizados, sendo uma importante fonte de sinal filogenético em estudos com plantas (Baldwin *et al.*, 1995; Feliner & Rosselló, 2007; Poczai & Hyvönen, 2010; mas veja Alvarez & Wendel, 2003). As pequenas divergências em relação àquele trabalho devem-se, principalmente, ao acúmulo de caracteres advindos da inclusão de três novas regiões (o ITS responde por cerca de apenas 30% dos caracteres utilizados) e ao foco amostral distinto adotado neste trabalho. A porção externa do espaçador nuclear (ETS) mostrou-se congruente com o ITS, sendo mais polimórfica e permitindo recuperar árvores mais resolvidas e suportadas que o espaçador interno (Logacheva *et al.*, 2010). Apesar do uso infrequente deste marcador (e.g., Devos *et al.*, 2006; Monteiro *et al.*, 2010), estes achados corroboram as sugestões feitas por Calonje *et al.* (2009) e por Poczai & Hyvonen (2010), de que o ETS seria um marcador interessante para estudos de evolução e de inferência filogenética, principalmente, de grupos com divergência recente.

Conclusões

Nossos resultados fornecem evidências claras de múltiplas invasões de ambientes rupestres por três linhagens de *Acianthera*. Como os padrões de distribuição de espécies podem ser avaliados do ponto de vista histórico e contemporâneo (Graham *et al.*, 2006), análises futuras, empregando métodos de filogeografia poderiam esclarecer como eventos vicariantes relacionados às flutuações climáticas afetaram a história evolutiva dos complexos rupícolas estudados neste trabalho. Considerando-se as similaridades morfológica e genética entre *A. glumacea* e *A. ochreatea* e a amplitude de ocorrência destas espécies, o complexo *A. ochreatea* (*A. glumacea* incluída) seria um

bom modelo para estudos multidisciplinares visando esclarecer quais fatores evolutivos estariam relacionados à transição do hábito epífita para o hábito rupícola. As síndromes de polinização e a seleção de sistemas especializados de polinização foram corroboradas e parecem ser o padrão, pelo menos para *Acianthera*. Estudos adicionais, que abarquem um número representativo de representantes de Pleurothallidinae, combinando dados de biologia reprodutiva e de inferências filogenéticas seriam importantes para clarificar a relação existente entre variações em sistemas de polinização e eventos de especiação neste grupo.

Referências bibliográficas

- Álvarez I, Wendel JF. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 417–434.
- Azevedo CO, van den Berg C. 2007a. A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. *Hoehnea* **34**: 1–47.
- Azevedo CO, van den Berg C. 2007b. Análise comparativa de áreas de campo rupestre da Cadeia do Espinhaço (Bahia e Minas Gerais, Brasil) baseada em espécies de Orchidaceae. *Sitientibus, série Ciências Biológicas* **7**: 199–210.
- Baldwin BG, Markos S. 1998. Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S–26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **10**: 449–463.
- Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN, Pessoa EM, Forster W. 2013. Orchidaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11043>)
- Bergsten J. 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics* **21**: 163–193.
- Borba EL, Felix JM, Semir J, Solferini VN. 2000. *Pleurothallis fabiobarrosii*, a new Brazilian species: morphological and genetic data with notes on the taxonomy of Brazilian rupicolous *Pleurothallis*. *Lindleyana* **15**: 2–9.
- Borba EL, Semir J. 2001. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany* **88**: 75–88.
- Borba EL, Semir J, Shepherd GJ. 2001. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* **88**: 89–99.

- Borba EL, Shepherd GJ, 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.
- Borba EL. 2003.** Novas combinações em *Acianthera* (*Pleurothallis* s.l.; Orchidaceae: Pleurothallidinae) ocorrentes nos campos rupestres brasileiros. *Sitientibus, série Ciências Biológicas* **3**: 22–25.
- Brower AVZ, DeSalle R, Vogler A. 1996.** Gene trees, species trees, and systematics: a cladistic perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**: 423–450.
- Calonje M, Martín-Bravo S, Dobeš C, Gong W, Jordon-Thaden I, Kiefer C, Kiefer M, Paule J, Schmickl R, Koch MA. 2008.** Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction. *Plant Systematics and Evolution* **282**: 257–280.
- Carnaval AC, Moritz C. 2008.** Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* **35**: 1187–1201.
- Chase MW, Williams NH, De Faria AD, Neubig KM, Amaral MDCE, Whitten WM. 2009.** Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. *Annals of Botany* **104**: 387–402.
- Chiron GR, van den Berg C. 2012.** Révision taxinomique du genre *Acianthera* (Orchidaceae , Pleurothallidinae). *Richardiana* **12**: 59–77.
- Chiron GR, Guiard J, Van Den Berg C. 2012.** Phylogenetic relationships in Brazilian *Pleurothallis* sensu lato (Pleurothallidinae, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences. *Phytotaxa* **58**: 34–58.
- Christenhusz MJM, Chase MW. 2013.** Biogeographical patterns of plants in the Neotropics - dispersal rather than plate tectonics is most explanatory. *Botanical Journal of the Linnean Society* **171**: 277–286.

- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012.** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**:772.
- Degnan JH, Rosenberg NA. 2009.** Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology & Evolution* **24**: 332–340.
- Desfeux C, Maurice S, Henry J-P, Lejeune B, Gouyon P-H. 1996.** Evolution of reproductive systems in the genus *Silene*. *Proceedings of the Royal Society, series B, Biological Sciences* **263**: 409–414.
- Devos N, Raspé O, Oh SH, Tyteca D, Jacquemart AL. 2006.** The evolution of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) allotetraploid complex: insights from nrDNA sequences and cpDNA PCR-RFLP data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 767–778.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13–15.
- Dressler RL. 1981.** *The Orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Dressler RL. 1993.** *Phylogeny and classification of the orchid family*. Portland: Dioscorides Press.
- Duchen P, Renner SS. 2010.** The evolution of *Cayaponia* (Cucurbitaceae): repeated shifts from bat to bee pollination and long-distance dispersal to Africa 2-5 million years ago. *American Journal of Botany* **97**: 1129–1141.
- Edgar RC. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792–1797.
- Faegri K, van der Pijl L. 1979.** *The principles of pollination ecology*, 3rd ed. Oxford: Pergamon Press.
- Farris JS. 1970.** Methods for computing Wagner trees. *Systematic Zoology* **19**: 83–92.

- Farris JS, Albert VA, Källersjö M, Lipscomb D, Kluge AG. 1996.** Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* **12**: 99–124.
- Feliner GN, Rosselló JA. 2007.** Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**: 911–919.
- Felsenstein J. 1978.** Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Biology* **27**: 401–410.
- Fitch WM. 1971.** Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* **20**: 406–416.
- Giulietti AM, Pirani JR. 1988.** Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Heyer WR, Vanzolini PE (eds) *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.
- Goldblatt P, Manning J, Bernhardt P. 2001.** Radiation of pollination systems in *Gladiolus* (Iridaceae: Crocoideae) in southern Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **88**: 713–734.
- Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC . 2003.** TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* **24**: 774–786.
- Graham CH, Moritz C, Williams SE. 2006.** Habitat history improves prediction of biodiversity in rainforest fauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 632–636.
- Guindon S, Gascuel O. 2003.** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696–704.
- Haffer J. 1969.** Speciation in Amazonian forest birds. *Science* **165**: 131–137.
- Johnson S, Linder H, Steiner K. 1998.** Phylogeny and radiation of pollination systems in *Disa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **85**: 402–411.

- Johnson S, Alexandersson R, Linder H. 2003.** Experimental and phylogenetic evidence for floral mimicry in a guild of fly-pollinated plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **80**: 289–304.
- Jurgens A, Witt T, Gottsberger G. 1996.** Reproduction and pollination in Central European populations of *Silene* and *Saponaria* species. *Botanica Acta* **109**: 316–324.
- Kluge AG. 1989.** A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among *Epicrates* (Boidae, Serpentes). *Systematic Zoology* **38**:7–25.
- Logacheva MD, Valiejo-Roman CM, Degtjareva G V, Stratton JM, Downie SR, Samigullin TH, Pimenov MG. 2010.** A comparison of nrDNA ITS and ETS loci for phylogenetic inference in the Umbelliferae: an example from tribe Tordylieae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **57**: 471–476.
- Luer CA. 1986.** Icones Pleurothallidarum III. Systematics of *Pleurothallis*. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. **20**: 1–116.
- Melo MC, Borba EL. 2011.** Morphological variability in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **293**: 135–145.
- Melo MC, Taucce PPG, Borba EL. 2011.** Reproductive biology and isolation mechanisms in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **293**: 161–176.
- Monteiro SHN, Selbach-Schnadelbach A, Oliveira RJ, van den Berg C. 2010.** Molecular phylogenetics of *Galeandra* (Orchidaceae: Catasetinae) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Systematic Botany* **35**: 476–486.
- Mota RC. 2006.** Orchidaceae na Serra do Caraça, Minas Gerais: levantamento florístico com ênfase no estudo taxonômico da subfamília Epidendroideae. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Müller K, 2005.** SeqState: primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. *Applied Bioinformatics* **4**: 65–69.
- Müller K. 2006.** Incorporating information from length–mutational events into phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 667–676.
- Neyland R, Urbatsch LE, Pridgeon AM. 1995.** A phylogenetic analysis of subtribe Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **117**: 13–28.
- Olesen JM, Alarcón M, Ehlers BK, Aldasoro JJ, Roquet C. 2012.** Pollination, biogeography and phylogeny of oceanic island bellflowers (Campanulaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **14**: 169–182.
- Ollerton J, Johnson SD, Cranmer L, Kellie S. 2003.** The pollination ecology of an assemblage of grassland asclepiads in South Africa. *Annals of Botany* **92**: 807–834.
- Pabst GFJ, Dungs F. 1975.** *Orchidaceae Brasilienses*, Vol. 1. Hildesheim: Brücke-Verlag.
- Pamilo P, Nei M. 1988.** Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution* **5**: 568–583.
- Peakall R, Ebert D, Poldy J, Barrow RA, Francke W, Bower CC, Schiestl FP. 2010.** Pollinator specificity, floral odour chemistry and the phylogeny of Australian sexually deceptive *Chiloglottis* orchids: implications for pollinator-driven speciation. *New Phytologist* **188**: 437–450.
- Poczai P, Hyvönen J. 2010.** Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Molecular Biology Reports* **37**: 1897–1912.
- Porembski S. 2007.** Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Revista Brasileira de Botânica* **30**: 579–586.

- Pridgeon AM, Solano R, Chase MW. 2001.** Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* **88**: 2286–2308.
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. 2005.** *Genera Orchidacearum, Volume 4. Epidendroideae (Part 1)*. Oxford: Oxford University Press.
- de Queiroz A, Donoghue MJ, Kim J. 1995.** Separate versus combined analysis of phylogenetic evidence. *Annual Review of Ecology and Systematics* **26**: 657–681.
- Rapini A, Ribeiro PL, Lambert S, Pirani JR. 2008.** A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* **4**: 16-24.
- Rieseberg LH, Blackman BK. 2010.** Speciation genes in plants. *Annals of Botany* **106**: 439–455.
- Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012.** MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**: 539–542.
- Salazar GA., Cabrera LI, Figueroa C. 2011.** Molecular phylogenetics, floral convergence and systematics of *Dichromanthus* and *Stenorrhynchos* (Orchidaceae: Spiranthinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **167**: 1–18.
- Savolainen V, Anstett M-C, Lexer C, Hutton I, Clarkson JJ, Norup M V, Powell MP, Springate D, Salamin N, Baker WJ. 2006.** Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature* **441**: 210–213.
- Schiestl FP, Johnson SD. 2013.** Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology and Evolution* **28**: 305-315.

- Shaw J, Lickey E, Schilling EE, Small RL. 2007.** Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* **94**: 275–288.
- Simmons MP, Ochoterena H. 2000.** Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analysis. *Systematic Biology* **49**: 369–381.
- Simmons MP, Müller K, Norton AP. 2007.** The relative performance of indel-coding methods in simulations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**: 724–740.
- Staden R. 1996.** The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology* **5**: 233–241.
- Stebbins GL. 1970.** Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1**: 307–326.
- Swofford D, Waddell P, Huelsenbeck J. 2001.** Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. *Systematic Biology* **50**: 525–539.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.
- Turelli M, Barton N, Coyne J. 2001.** Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 330–343.
- van den Berg C, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Arenas MAS, Culham A, Chase MW. 2000.** A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96–114.

- van der Niet T, Johnson SD. 2012.** Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution* **27**: 353–361.
- Xu S, Schlüter PM, Scopece G, Breitkopf H, Gross K, Cozzolino S, Schiestl FP. 2011.** Floral isolation is the main reproductive barrier among closely related sexually deceptive orchids. *Evolution* **65**: 2606–2620.
- Waterman RJ, Pauw A, Barraclough TG, Savolainen V. 2009.** Pollinators underestimated: a molecular phylogeny reveals widespread floral convergence in oil-secreting orchids (sub-tribe Coryciinae) of the Cape of South Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **51**: 100–110.
- Werneck FP. 2011.** The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews* **30**: 1630–1648.
- Wiens JJ. 1998.** Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology* **47**: 568–581.
- Wilson P, Wolfe AD, Armbruster WS, Thomson JD. 2007.** Constrained lability in floral evolution: counting convergent origins of hummingbird pollination in *Penstemon* and *Keckiella*. *New Phytologist* **176**: 883–890.

CAPÍTULO 2

Variabilidade genética e circunscrição taxonômica no complexo *A. prolifera* Lindl. (Orchidaceae) no leste do Brasil

Introdução

A utilização de protocolos multidisciplinares tem sido importante para compreensão de fatores evolutivos envolvidos em eventos de especiação e/ou divergência de linhagens (Barret & Freudenstein, 2011; Palma-Silva *et al.*, 2011; Pessoa *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.* 2013). Processos de convergência e radiação adaptativa, isolamento reprodutivo e hibridação estão relacionados à especiação, sendo, notadamente importantes, em eventos recentes ou em linhagens que ainda estão em processo de divergência (Rieseberg & Willis, 2007). A ocorrência de convergência e radiação adaptativa tem sido observada em vários grupos de orquídeas (e.g., Borba & Semir, 2001; Azevedo *et al.*, 2007; Waterman *et al.*, 2009), sendo atribuída, respectivamente, ao compartilhamento de polinizadores e às adaptações a diferentes mecanismos reprodutivos ou a polinizadores diferentes, no caso de espécies irmãs ou que ocorrem em simpatria (Brown & Kodric-Brown, 1979; Johnson, Linder & Steiner, 1998; Martén-Rodríguez *et al.*, 2011). Nestes últimos cenários, a radiação adaptativa pode ser fruto de mudanças evolutivas guiadas por competição de recursos (e.g., polinizadores), caracterizando um fenômeno conhecido como Deslocamento de Caracteres Ecológicos (Brown & Wilson, 1956).

Fatores bióticos (e.g., adaptação a diferentes polinizadores; distanciamento fenológico; variação da morfologia floral) e abióticos (e.g., condições edáficas; barreiras geográficas) têm sido identificados como causas primárias de isolamento reprodutivo pré-zigótico em plantas (Xu *et al.*, 2011). Em casos de especiação alopátricas, o surgimento dessas barreiras reprodutivas é o gatilho que permite, via seleção disruptiva e/ou deriva genética, a divergência entre populações e o surgimento de mecanismos genéticos de isolamento pós-zigóticos mais efetivos (e.g., modelo de incompatibilidade genética de Bateson–Dobzhansky–Muller). Em populações onde linhagens que tenham passado por mudanças fenéticas ocorrem em simpatria (e.g., mudança da morfologia floral mediada por competição por polinizadores, variação da morfologia vegetativa devido a adaptações a condições edáficas diferentes), a existência desse polimorfismo pode fornecer a base para que a seleção atue evitando a formação de indivíduos intermediários/híbridos mal adaptados (Reforço de Dobzhansky, 1937), culminando em isolamento genético e posterior especiação (Niet, Johnson & Linder, 2006; Savolainen *et al.*, 2006). Apesar disso, o cruzamento entre linhagens/espécies

distintas (i.e., hibridação) está envolvido em uma porção significativa dos eventos de especiação (Mallet, 2007; Soltis & Soltis, 2009). Nestes casos, espera-se que os híbridos sejam ao mesmo tempo bem adaptados e isolados reprodutivamente da linhagem parental, condições mais comuns de serem observadas nos híbridos poliploides do que em híbridos homoploides (Abbott & Rieseberg, 2012).

Alguns exemplos de especiação simpátrica vêm sendo encontrados para vários grupos de plantas (Papadopulos *et al.*, 2011) através do uso integrado de dados de fenologia, ecologia, morfologia e filogenia molecular. Achados recentes sugerem, inclusive, que este tipo de processo deve ser importante para a manutenção da diversidade, sendo mais prováveis de ocorrer em áreas onde sub-populações possam ocupar diferentes nichos ecológicos (Coyne, 2011), de maneira similar ao que ocorre nas formações brasileiras de campos rupestres, ora cercadas por matrizes florestais, ora por matrizes de gramíneas.

O complexo *Acianthera prolifera* [*A. prolifera* (Herb. ex Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase, *A. modestissima* (Rchb.f. & Warm.) Pridgeon & M.W. Chase, *A. hamosa* (Barb. Rodr.) Pridgeon & M.W. Chase, *A. limae* (Porto & Brade) Pridgeon & M.W. Chase e *A. fornograndensis* L.Kollmann & A.P.Fontana] é constituído por espécies bastante similares morfologicamente, especialmente em caracteres vegetativos, com distribuição geográfica sobreposta e eventos de simpatria entre algumas espécies e de difícil delimitação taxonômica. Esse complexo forma um clado na seção *Sicariae* (Capítulo 1), e ocorre de forma disjunta em afloramentos rochosos da Mata Atlântica e Cerrado no leste do Brasil, se estendendo até os Andes, com registros para Bolívia, Venezuela e Colômbia (Luer, 1986; Melo & Borba, 2011; Chiron & van den Berg, 2012).

Nesse complexo, dois pares de espécies têm sido distinguidos pela morfologia e tamanho das peças florais. No entanto, alguma sobreposição pode ser observada em alguns casos, caracterizando um *continuum* morfológico. *Acianthera prolifera*/*A. limae* possuem as maiores estruturas vegetativas e reprodutivas em relação às demais espécies, sendo diferenciadas, entre si, pelo tamanho das flores e formato das folhas e do ramicaule, conspicuamente conduplicadas e dobradas em direção ao ramicaule, formando um gancho, em *A. prolifera*, e planas e com formato lanceolado em *A. limae*

(veja figura 1 em Melo & Borba, 2011 e Melo *et al.*, 2011). Além disso, *A. prolifera* ocorre sobre rochas expostas ao sol, enquanto *A. limae* é encontrada no interior de matas que compõe uma matriz vegetacional em torno daqueles afloramentos rochosos. *Acianthera modestissima/A. hamosa* são de porte menor e possuem as folhas planas e as flores bastante reduzidas, quando comparadas as do outro par de espécies. Não tem sido possível diferenciar este último par de espécies baseado na morfologia floral (Melo & Borba, 2011), que têm sido distintas pela distribuição geográfica e pelos habitats divergentes, com *A. hamosa* com folhas patentes e ocorrendo no interior de matas e *A. modestissima* com folhas eretas e ocorrendo em afloramentos expostos ao sol pleno. Melo & Borba (2011) sugerem a ocorrência de convergência adaptativa entre estas espécies, que possuem mecanismos de polinização parecidos, similar ao observado por Borba *et al.* (2002) para espécies alopátricas dos complexos *A. teres* e *A. ochreatea*. Alternativamente, aqueles autores discutem a possibilidade destas populações serem constituídas por linhagens divergentes de uma mesma espécie biológica, apresentando adaptações vegetativas à ocorrência em habitats distintos, e sugerem que estudos de genética de populações seriam necessários para testar estas hipóteses.

Acianthera fornograndensis foi descrita recentemente a partir de espécimes restritos aos afloramentos rochosos da Mata Atlântica no Espírito Santo (Kollman & Fontana, 2006). Esta espécie possui a parte vegetativa semelhante à de *A. prolifera* e flores similares às de *A. hamosa* e *A. modestissima*, podendo ser distinguida pelas suas pétalas não serrilhadas, base do labelo estreita e linear, labelo não verrucoso e nem papiloso no lóbulo apical, ápice da coluna revoluto e distribuição. Melo *et al.* (2011) observaram que as espécies do complexo *A. prolifera* são, ao menos, parcialmente autoincompatíveis, o que ocorre com outras espécies do gênero (Borba, Semir & Shepherd, 2001), e configura característica comum na subtribo (Borba *et al.*, 2011). Essa autoesterilidade deve contribuir para a manutenção de uma alta variabilidade genética dentro das populações, principalmente por serem polinizadas por espécies de Diptera, cujo comportamento favorece a autopolinização (Borba & Semir, 2001; Borba *et al.*, 2001b; Melo *et al.*, 2011).

Nesse mesmo complexo, foi sugerido que algumas espécies poderiam hibridizar, por serem intercompatíveis, compartilharem polinizadores e, em alguns casos, ocorrerem em simpatria, como *A. limae* e *A. prolifera* (Melo *et al.*, 2011). No caso,

supõe-se existir uma barreira ecológica que evitaria o estabelecimento de híbridos no ambiente mais exposto ao sol em áreas abertas (junto à *A. prolifera*). Já na borda de matas onde ocorrem *A. limae*, foram encontrados indivíduos com morfologia intermediária que não puderam ser identificados inequivocamente como nenhuma destas espécies (supostos híbridos), suscitando duas hipóteses: 1) todos os indivíduos presentes nas matas constituem apenas uma espécie com plasticidade fenotípica e os supostos híbridos seriam, na verdade, parte da população de *A. limae*, porém apresentando grande variação morfológica em função da maior exposição ao sol (borda das matas); 2) hibridação efetivamente ocorre, e a população de híbridos não seria constituída exclusivamente de indivíduos de primeira geração (F1), mas de gerações seguintes e indivíduos com introgressão (Melo & Borba, 2011).

Com base na diferenciação e na estruturação da variabilidade genética das populações, pretende-se investigar algumas questões relacionadas ao complexo *A. prolifera*: 1) Quantas espécies podem ser reconhecidas, no leste do Brasil, com base nos marcadores utilizados e como elas podem ser delimitadas?; 2) Pode-se confirmar a ocorrência de eventos de hibridização entre espécies ocorrendo em simpatria, especialmente *A. limae* e *A. prolifera*; 3) *A. hamosa* e *A. modestissima* constituem, realmente, espécies distintas?; e, 4) Como populações que apresentam morfologia incomum ou intermediária se relacionam geneticamente com as demais populações das espécies reconhecidas? Pretende-se também verificar se, apesar do comportamento das espécies de polinizadores que favorecem a autopolinização, a ocorrência de autoincompatibilidade no grupo é capaz de manter a variabilidade genética elevada nas populações, como observado para outras espécies de *Acianthera* (Borba *et al.*, 2001a, 2001b).

Para isto, foram utilizados marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats, Zietkiewicz *et al.*, 1994), uma técnica que acessa rapidamente elevados níveis de polimorfismo e que possui boa reprodutibilidade. Esses marcadores dominantes têm sido utilizados para investigar hipóteses relacionadas às deste estudo, como a avaliação da diversidade genética e estrutura de populações, delimitação de espécies e genética da conservação (e.g., George, Sharma & Yadon, 2009; Oliveira, 2010; Barbosa, 2011; Cruz *et al.*, 2011; Lousada *et al.*, 2011, 2013; Ding *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.* 2012; Sharma *et al.*, 2013). Apesar de algumas limitações no tipo de informação gerada, este

marcador foi escolhido devido às dificuldades encontradas durante o desenvolvimento de marcadores microssatélites variáveis para o grupo, após tentativa de aplicação do método de Provan & Wilson (2007).

Materiais e métodos

Amostragem populacional

Foram coletadas folhas jovens de 173 indivíduos provenientes de 12 populações (tabela 2.1; figura 2.1), com amostras variando de 4 a 20 indivíduos por população (média de 14,5), em função do número de indivíduos encontrados. As folhas foram conservadas frescas à 4°C até o momento da extração de DNA total. Os espécimes coletados distavam, no mínimo, em 5 metros uns dos outros, a fim de evitar amostragem de folhas provenientes de clones por reprodução vegetativa. As populações englobam a variabilidade morfológica (seis morfotipos) do grupo em questão no leste do Brasil, especialmente o estado de Minas Gerais, incluindo representantes de quatro das cinco espécies constituintes do complexo *A. prolifera* (excetuando representantes com morfologia típica de *A. fornograndensis*). Os morfotipos coletados para cada uma das espécies foram delimitados, morfológicamente, de acordo com as descrições originais das espécies.

A fim de identificar possíveis eventos de hibridização e/ou introgressão entre táxons do complexo, populações simpátricas de *A. prolifera* e *A. limae* na Serra do Caraça (Santa Bárbara-MG) e de *A. prolifera* e *A. modestissima* na Serra da Piedade (Caeté-MG) foram amostradas. Além disso, uma população, vegetativamente afim a *A. prolifera*, porém com morfologia floral bastante distinta das outras espécies do complexo, foi coletada no Morro do Pai Inácio (Palmeiras-BA) para verificar o seu grau de diferenciação genética e confirmação do seu status taxonômico, sendo a priori aqui tratada com *A. aff. prolifera*. *Acianthera hamosa* (quatro populações) e *A. modestissima* (duas populações) foram amostradas nas localidades onde o tipo das espécies foi coletado (Tiradentes-MG e Caeté-MG, respectivamente), visando elucidar suas identidades. Não foi possível amostrar populações nas localidades do tipo de *A. prolifera* (Rio de Janeiro-RJ) e de *A. limae* (Macaé-RJ), populações com registro muito antigo ou de difícil acesso.

Apesar de alguns espécimes serem facilmente distinguíveis como pertencendo a diferentes espécies, algumas populações apresentam indivíduos com morfologia intermediária, levantando dúvidas sobre a existência de todas estas espécies

distintamente ou sugerindo a ocorrência de hibridação no grupo. Por exemplo, a população de Teófilo Otoni-MG apresenta morfologia floral similar a de *A. hamosa* (flores diminutas), mas morfologia vegetativa similar à de *A. prolifera* (folhas conduplicadas, formando um gancho), no aspecto geral se assemelhando mais a *A. fornograndensis*, porém com diferenças nos detalhes da morfologia floral, sendo aqui tratada como *A. aff. fornograndensis*. Na população de Ilicínea-MG, os indivíduos possuem flores muito parecidas com as de *A. hamosa* e *A. modestissima*, mas morfologia vegetativa variando de folhas lanceoladas e ramicaule alongado, típico de *A. limae*, a folhas cordadas e ramicaule mais curto, típicos de *A. hamosa*.

Extração de DNA genômico, teste e amplificação de primers

A extração de DNA total foi realizada a partir de amostras frescas de folhas (ca. 200 mg), seguindo o protocolo de Doyle & Doyle (1987), acrescido de uma extração adicional com clorofórmio, a fim de obter amostras com menos compostos secundários e proteínas ao final do processo. Foram testados 26 *primers* a fim de escolher aqueles com maior quantidade de bandas reprodutíveis e com boa visibilidade. Ajustes de temperatura e concentrações de componentes da PCR (polymerase chain reaction) foram realizados, a fim de determinar a melhor condição de amplificação para cada marcador. As reações de amplificação por PCR foram realizadas em um volume final de 19 µL, com *mix* composto por: tampão de reação 1X (Phoneutria Ltda., Belo Horizonte, Brasil), MgCl₂ a 1,0 mM, dNTP a 0,2 mM, primer a 1 µM, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Phoneutria Ltda.), 1 µL de DNA total diluído 1:10 e água bidestilada (q.s.p). Os programas consistem em uma etapa inicial de denaturação a 94°C por 4 minutos; 38 ciclos a 94°C por 1 min., 46-55°C (dependendo do primer, ver tabela 2.2) por 2 min. e 72°C por 2 min.; e uma extensão final a 72° por 7 minutos. Controles negativos (sem a adição do DNA) foram sempre realizados para cada bloco de reações. Todo o volume da PCR foi aplicado em um gel de agarose (1,5%) e submetido a eletroforese em um meio contendo tampão TAE (0,5%), juntamente com marcadores de 100 bp, usados para avaliar o tamanho dos fragmento amplificados na leitura do gel. Ao final da eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio, revelado e fotografado sob luz UV.

Análise dos dados

Os fragmentos de DNA (bandas) distinguíveis e não ambíguos foram codificados em uma matriz de presença (1) e ausência (0), com o auxílio do programa Transformer-3 (Caujapé-Castells & Baccarani-Rosas, 2005). Por se tratar de um marcador dominante, cada banda codificada foi assumida como um locus contendo dois alelos (Maguire *et al.*, 2002), no qual a presença indica tanto genótipos dominantes homozigotos quanto heterozigotos e a ausência indica um homozigoto recessivo. Esta matriz binária de marcadores de ISSR foi analisada no programa GenAlEx v.6.5 (Peak & Smouse, 2006, 2012) para obtenção dos parâmetros de diversidade genética, como: porcentagem de loci polimórficos (P), índice de informação de Shannon (I) e heterozigosidade média esperada (H_e). O índice de Shannon foi calculado para cada população como a média da informação em seus loci $I = -1[p_A \cdot \ln(p_A) + p_a \cdot \ln(p_a)]$, onde p_i = frequência de um alelo i , onde $i = A$ ou a , e a heterozigosidade média esperada como $H_e = 1 - \sum p_i^2$.

Uma análise Bayesiana para avaliar a estruturação genética das populações foi conduzida no programa Structure v. 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003), via cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC). Para cada uma das possibilidades de agrupamentos genéticos (K entre 1 e 12) foram realizadas 15 corridas independentes, com 1.000.000 de iterações cada, com burn-in inicial de 100.000 e assumindo o modelo admixture com alelos correlacionados entre populações e estimando os parâmetros α e λ durante as corridas. Para identificar o número de agrupamentos genéticos (K), os valores de probabilidade posterior dos dados dado o K [$\text{LnP}(D)$], obtidos no Structure, foram utilizados para calcular a medida de segunda ordem da variação de $\text{LnP}(D)$, pela estatística ΔK proposta por Evanno *et al.* (2005), implementada na versão *online* do programa Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012).

Uma matriz de distância genética entre indivíduos foi calculada utilizando GenAlEx, pelo método de Huff *et al.* (1993), o qual presume a distância entre dois indivíduos como sendo equivalente à diferença entre os estados dos seus dois padrões multiloci [$D = n \cdot (1 - 2n_{xy}/2n)$, onde n = número total de bandas e n_{xy} = número de bandas compartilhadas]. Esta distância é uma métrica de distância euclidiana, sendo,

portanto, mais apropriada para análises como análise de coordenadas principais (PCO) e análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier, Smouse & Quattro, 1992; Peakall, Smouse & Huff, 1995; Michalakis & Excoffier, 1996). Essa matriz foi utilizada para a realização de uma AMOVA, a partir da qual foi avaliada a partição da variação genética total em três níveis (dentro da população, entre populações e entre grupos). Uma AMOVA foi realizada para os seis grupos estabelecidos de acordo com a morfologia dos espécimes coletados: *A. hamosa*, *A. limae*, *A. modestissima*, *A. prolifera*, *A. aff. fornograndensis* e *A. aff. prolifera*. Outra AMOVA foi realizada para os grupos genéticos determinados (K) na análise de agrupamento bayesiana. O ϕ_{PT} – uma estatística para dados dominantes análoga à estatística F de Wright (Wright, 1931) – foi estimado através da AMOVA, o que possibilitou obter valores de significância estatística desses coeficientes de diferenciação entre populações. Aquela mesma matriz de distância genética foi utilizada ainda em uma análise de coordenadas principais (PCO), para facilitar a visualização das relações de dissimilaridade entre os indivíduos, através de sua acomodação no espaço dimensional. O teste de Mantel foi conduzido no programa GenAlEx para avaliar a correlação entre a matriz de ϕ_{PT} par-a-par e as distâncias geográficas entre as populações.

A matriz triangular de ϕ_{PT} par-a-par obtida na AMOVA e a matriz de distância não enviesada de Nei (Nei, 1978), calculadas para todos os pares de populações no programa GenAlEx, foram utilizadas para inferir as relações fenéticas entre as populações no programa MEGA 5.1 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando o algoritmo de agrupamento *neighbor-joining*. Para avaliar o suporte dos dados, 1.000 matrizes foram geradas no programa AFLP_SURV (Vekemans *et al.*, 2002), a partir das quais 1.000 novos fenogramas foram contruídos usando o módulo NEIGHBOR no programa PHYLIP 3.69 (Felsenstein, 2006). A partir daí, o módulo CONSENSE foi utilizado para estimar um consenso de maioria a partir do qual os valores de Bootstrap foram obtidos.

Resultados

A partir dos oito *primers* selecionados, foram obtidas 110 bandas nítidas, das quais 101 (92%) apresentaram polimorfismo (tabela 2.2). O número de fragmentos

obtidos por primer variou de oito (BECKY) a 18 (UBC_848), com porcentagem de loci polimórficos variando de 82% (MANNY) a 100% (MAO e UBC_808). Por população, a porcentagem de loci polimórficos variou entre 17,27% (AaF_TO) e 61,82% (AP_SB), com média de 47,50% (tabela 2.3). O índice de informação de Shannon (I) e a heterozigidade média esperada (H_e) para as populações foram, respectivamente, 0,243 e 0,162. A população AaF_TO apresentou a menor diversidade, com $I = 0,099$ e $H_e = 0,067$, muito abaixo dos valores obtidos para as demais populações. A população AP_SB apresentou maior diversidade com $I = 0,305$ e $H_e = 0,202$ (tabela 2.3).

O gráfico contendo os valores médios da probabilidade dos dados para cada K plotados em relação aos K avaliados [$\ln P(D) \times K$], obtidos no Structure, mostra um incremento acentuado até $K=3$, e em seguida tendência à estabilização. Aplicado o método de ΔK de Evanno, ficou evidente que $K = 3$ seria o número de agrupamentos genéticos para os dados analisados (figura 2.2). Quase todos os indivíduos da maioria das populações apresentaram uma grande homogeneidade genética, exceto os das populações AH_IL e AL_NL. Um grupo genético é constituído exclusivamente por todos os indivíduos da população AaP_PA. Outro grupo é formado por todos os indivíduos das populações AH_CI e AH_TI, bem como alguns indivíduos de AH_CA, AH_IL e AL_NL, mas nestes últimos casos os indivíduos sempre são caracterizados como mistura com outro grupo gênico (figura 2.2).

A AMOVA realizada para os grupos relativos aos seis morfotipos mostrou que uma proporção maior da variação total encontra-se entre populações dentro dos grupos (18%, $\phi_{PR} = 0,198$) em relação à variação situada entre os grupos (7%, $\phi_{RT} = 0,069$). Para a AMOVA com três grupos (referentes aos agrupamentos indicados pela análise bayesiana), a variação encontrada entre os grupos (17%, $\phi_{RT} = 0,165$) passou a ser maior que a variação encontrada entre as populações dentro dos grupos (14%, $\phi_{PR} = 0,171$) (tabela 2.4).

Os menores valores das distâncias não enviesadas de Nei encontradas foram entre as populações AL_SB e AP_SB (0,022) e entre AM_CT e AM_BH (0,031), e os maiores entre as populações AaP_PA e AaF_TO e AaP_PA e AH_TI (ambos 0,198). Na análise de PCO, 53,12% da variação foi explicada nos dois primeiros eixos (eixo1 = 30,06%, eixo2 = 23,06%). O eixo 1 (figura 2.3) permite distinguir os indivíduos da

população AaP_PA, ficando as demais populações totalmente sobrepostas; já o segundo eixo permite separar o grupo formado pelos indivíduos das populações AH_CI e AH_TI do restante. O teste de Mantel mostrou haver correlação significativa positiva ($r = 0,33$, $p = 0,001$) entre as matrizes de ϕ_{PT} e de distâncias geográficas.

O dendrograma obtido a partir da matriz de distâncias não enviesadas de Nei mostra agrupamentos concordantes com os obtidos na PCO e na análise bayesiana. A população AaP_PA se posiciona próximo às populações de *A. limae* e *A. prolifera* da Serra do Caraça. Para a estatística ϕ_{PT} , o menor valor foi observado entre as populações AL_SB e AP_SB ($0,028$, $p = 0,079$) e o maior entre AH_TI e AaF_TO ($0,461$, $p < 0,001$) (tabela S.1, apêndice). Nesta análise, porém, a população de AaP_PA se agrupou com AaF_TO. Os grupos restantes foram os mesmos encontrados para o dendrograma utilizando a matriz de distâncias de Nei. Para as duas métricas de dissimilaridade usadas para inferir relações fenéticas, apenas os pares AM_BH/AM_CT e AH_CI/AH_TI obtiveram bootstrap superiores a 70% sustentando seus agrupamentos (fig. 2.4).

Tabela 2.1: Populações do complexo *A. prolifera* utilizadas no estudo. *N* = número de indivíduos amostrados em cada população. Vouchers depositados no herbário BHCB.

Espécie (ou morfotipo) Localidade	Código	Coordenadas	<i>N</i>	Voucher
<i>A. hamosa</i>				
Carrancas-MG	AH_CA	21°28'14"S, 44°40'55"O	12	M.C. Melo, 8
Conceição do Ibitipoca-MG	AH_CI	21°52'33"S, 43°46'10"O	20	B.S.S. Leal s.n.
Tiradentes-MG	AH_TI	21°06'23"S, 44°11'44"O	14	A. Massensini Jr., 16
Ilicínea-MG	AH_IL	20°53'50"S, 45°42'16"O	20	B.M Carvalho, 55
<i>A. limae</i>				
Nova Lima-MG	AL_NL	20°05'35"S, 43°59'01"O	14	M.C. Melo, 7
Santa Bárbara-MG	AL_SB	20°05'36"S, 43°28'29"O	12	M.C. Melo, 5
<i>A. modestissima</i>				
Caeté-MG	AM_CT	19°49'17"S, 43°40'53"O	12	M.C. Melo, 3
Belo Horizonte-MG	AM_BH	19°58'13"S, 43°55'43"O	15	M.C. Melo, 6
<i>A. aff. prolifera</i>				
Palmeiras-BA	AaP_PA	12°27'31"S, 41°28'19"O	17	A. Massensini Jr., 75
<i>A. prolifera</i>				
Caeté-MG	AP_CT	19°49'17"S, 43°40'53"O	15	M.C. Melo, 2
Santa Bárbara-MG	AP_SB	20°05'36"S, 43°28'29"O	18	M.C. Melo, 4
<i>A. aff. fornograndensis</i>				
Teófilo Otoni-MG	AaF_TO	17°51'40"S, 41°32'36"O	4	L.F.A de Paula, 346

Tabela 2.2: Sequências, temperaturas de anelamento ótimas (T), número de bandas distinguíveis e confiáveis obtidas (N) e a porcentagem de *loci* polimórficos (P) dos *primers* utilizados na composição de perfil fenotípico de ISSR em análises de variabilidade genética do complexo *A. proliferata*.

<i>Primer</i>	Sequência	T(°C)	<i>N</i>	<i>P</i> (%)
BECKY	5'-(CA)7YC-3'	55,0	8	88
MANNY	5'-(CAC)4RC-3'	47,5	17	82
MAO	5'-(CTC)4RC-3'	47,5	14	100
OMAR	5'-(GAG)4RC-3'	50,0	13	85
SSR6	5'-GCGC(AC)8-3'	55,0	12	92
UBC_808	5'-(AG)8C-3'	55,0	13	100
UBC_848	5'-(CA)8RG-3'	47,5	18	94
UBC_898	5'-(CA)6RY-3'	46,0	15	93
Total	--	--	110	92

Tabela 2.3: Parâmetros de diversidade genética encontrados para as espécies (morfortipos) e para as 12 populações do complexo *A. prolifera*, ocorrentes em afloramentos rochosos brasileiros, a partir de 110 *loci* de ISSR. *I* = índice de informação de Shannon; *H_e* = heterozigosidade esperada; *P* (%) = porcentagem de *loci* polimórficos. SD = desvio padrão, entre parênteses. Para nomes das populações, consulte a tabela 2.1.

Espécie (ou morfortipo) População	<i>I</i> (±SD)	<i>H_e</i> (±SD)	<i>P</i> (%)
<i>A. hamosa</i>	0,339(±0,026)	0,224(±0,019)	75,45
AH_CA	0,214(±0,027)	0,144(±0,019)	40,91
AH_CI	0,252(±0,027)	0,167(±0,019)	51,82
AH_TI	0,201(±0,026)	0,134(±0,018)	39,09
AH_IL	0,258(±0,026)	0,170(±0,018)	52,73
<i>A. limae</i>	0,320(±0,026)	0,212(±0,019)	64,55
AL_NL	0,287(±0,027)	0,191(±0,019)	56,36
AL_SB	0,278(±0,027)	0,185(±0,019)	52,73
<i>A. modestissima</i>	0,295(±0,027)	0,195(±0,019)	62,73
AM_BH	0,259(±0,028)	0,176(±0,020)	47,27
AM_CT	0,255(±0,027)	0,170(±0,019)	50,91
<i>A. aff. prolifera</i>	0,279(±0,027)	0,186(±0,019)	54,55
AaP_PA	0,279(±0,027)	0,186(±0,019)	54,55
<i>A. prolifera</i>	0,308(±0,026)	0,203(0,018)	63,64
AP_CT	0,224(±0,026)	0,148(±0,018)	44,55
AP_SB	0,305(±0,027)	0,202(±0,019)	61,82
<i>A. aff. fornograndensis</i>	0,099(±0,021)	0,067(±0,015)	17,27
AaF_TO	0,099(±0,021)	0,067(±0,015)	17,27

Tabela 2.4: Análise de variância molecular (AMOVA) para dois tipos diferentes de agrupamento (1. baseado nos seis morfotipos definidos a priori, e 2. baseado nos três grupos gênicos definidos a partir da análise bayesiana de estruturação genética implementada no programa Structure) avaliados para 12 populações do complexo *A. prolifera*, ocorrentes no leste do Brasil. d.f. = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; VE = variância estimada; * = $p < 0,001$.

Fonte da variação	d.f.	SQ	VE	Variância (%)	Estatística ϕ
1. Seis grupos morfológicos (morfotipos)					
Entre grupos	5	394,01	1,08	7	$\phi_{RT} = 0,069^*$
Entre populações	6	336,71	2,91	18	$\phi_{PR} = 0,198^*$
Dentro das populações	161	1896,34	11,78	75	$\phi_{PT} = 0,253^*$
2. Três grupos gênicos					
Entre grupos	2	325,30	2,80	17	$\phi_{RT} = 0,165^*$
Entre populações	9	405,42	2,42	14	$\phi_{PR} = 0,171^*$
Dentro das populações	161	1896,34	11,78	69	$\phi_{PT} = 0,307^*$

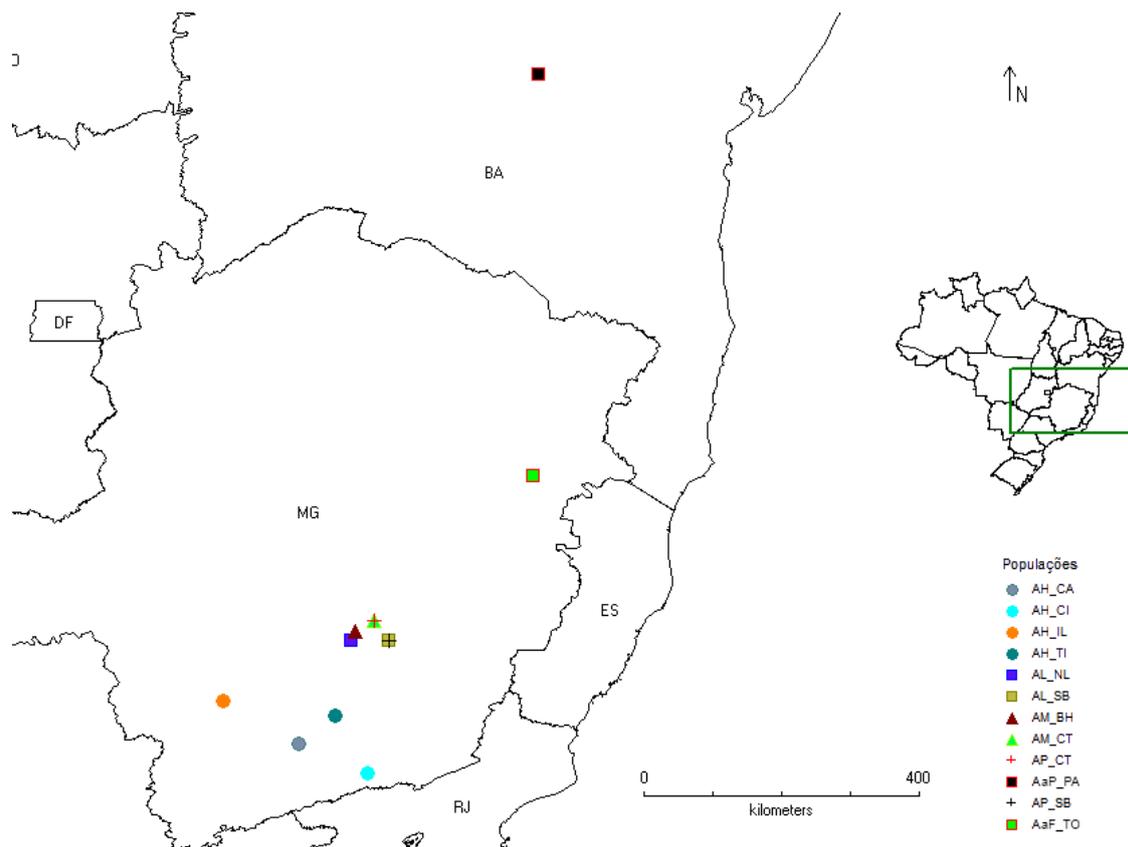


Figura 2.1: Distribuição geográfica das populações do complexo *Acianthera prolifera* incluídas no estudo de variabilidade genética: *A. hamosa* (AH_CA, AH_CI, AH_TI e AH_IL), *A. limae* (AL_NL e AL_SB), *A. modestissima* (AM_CT e AM_BH), *Acianthera* aff. *prolifera* (AaP_PA), *Acianthera prolifera* (AP_CT e AP_SB) e *Acianthera* aff. *forograndensis* (AaF_TO). Acrônimos para os estados brasileiros: MG= Minas Gerais; BA = Bahia; ES = Espírito Santo; RJ = Rio de Janeiro; DF = Distrito Federal. Para código das populações, consulte a tabela 2.1.

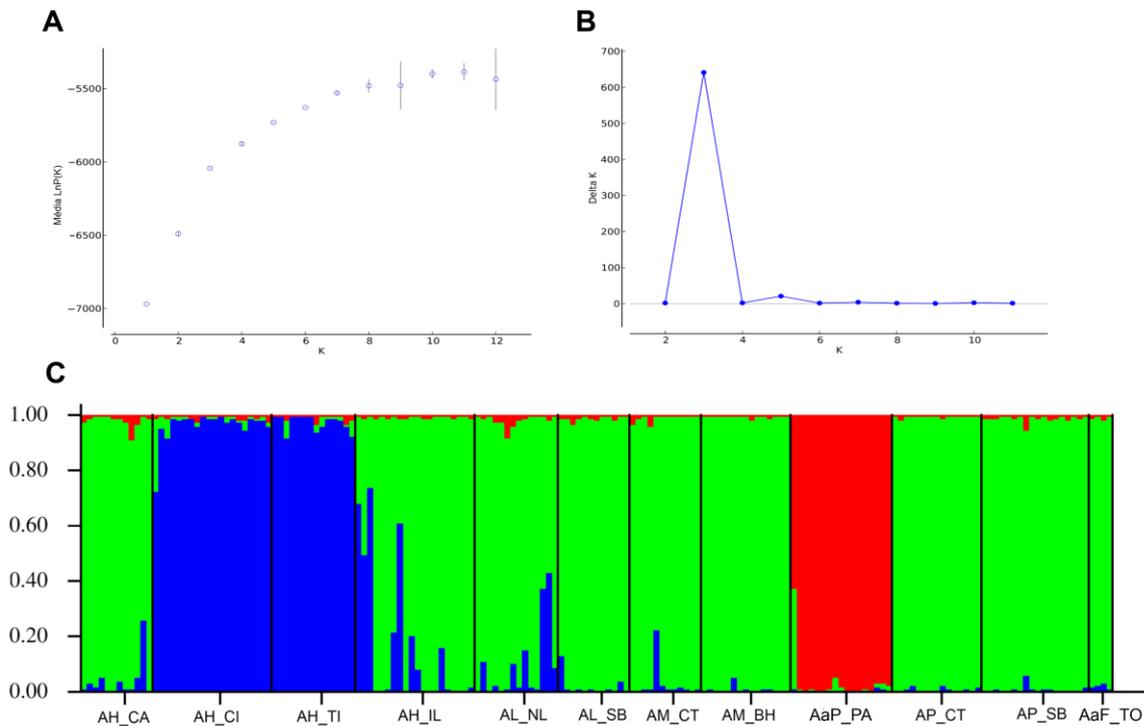


Figura 2.2: Análise bayesiana de estruturação genética para doze populações do complexo *Acianthera prolifera*, a partir de 110 loci de marcadores ISSR: *A. hamosa* (AH_CA, AH_CI, AH_TI e AH_IL), *A. limae* (AL_NL e AL_SB), *A. modestissima* (AM_CT e AM_BH), *Acianthera* aff. *prolifera* (AaP_PA), *Acianthera prolifera* (AP_CT e AP_SB) e *Acianthera* aff. *fornograndensis* (AaF_TO). **A.** média da verossimilhança $\ln(K)$ por valores de K (1-12) para 15 iterações; **B.** gráfico de ΔK ; **C.** máxima probabilidade posterior de atribuição para 173 espécimes. Cada barra representa um indivíduo, sendo a extensão das cores em cada barra indicativas da proporção de cada *pool* gênico em sua composição. Consulte a tabela 2.1 para nomes das populações.

Análise de Coordenadas Principais (PCO)

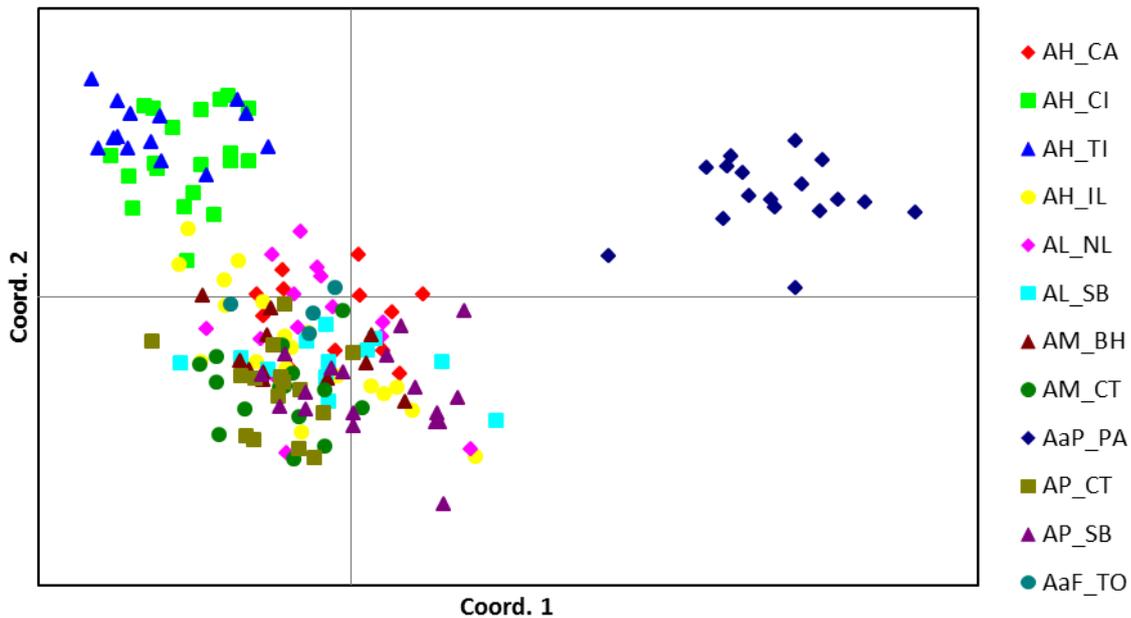


Figura 2.3: Análise de Coordenadas Principais (PCO) de matriz de distância genética de 173 indivíduos, para doze populações do complexo *Acianthera proliferata*, obtida a partir de 110 loci ISSR: *A. hamosa* (AH_CA, AH_CI, AH_TI e AH_IL), *A. limae* (AL_NL e AL_SB), *A. modestissima* (AM_CT e AM_BH), *Acianthera* aff. *prolifera* (AaP_PA), *Acianthera proliferata* (AP_CT e AP_SB) e *Acianthera* aff. *fornograndensis* (AaF_TO). Os eixos 1 e 2 explicam 53,12% da variação total encontrada (eixo 1 = 30,06%, eixo 2 = 23,06%). Consulte a tabela 2.1 para nomes das populações.

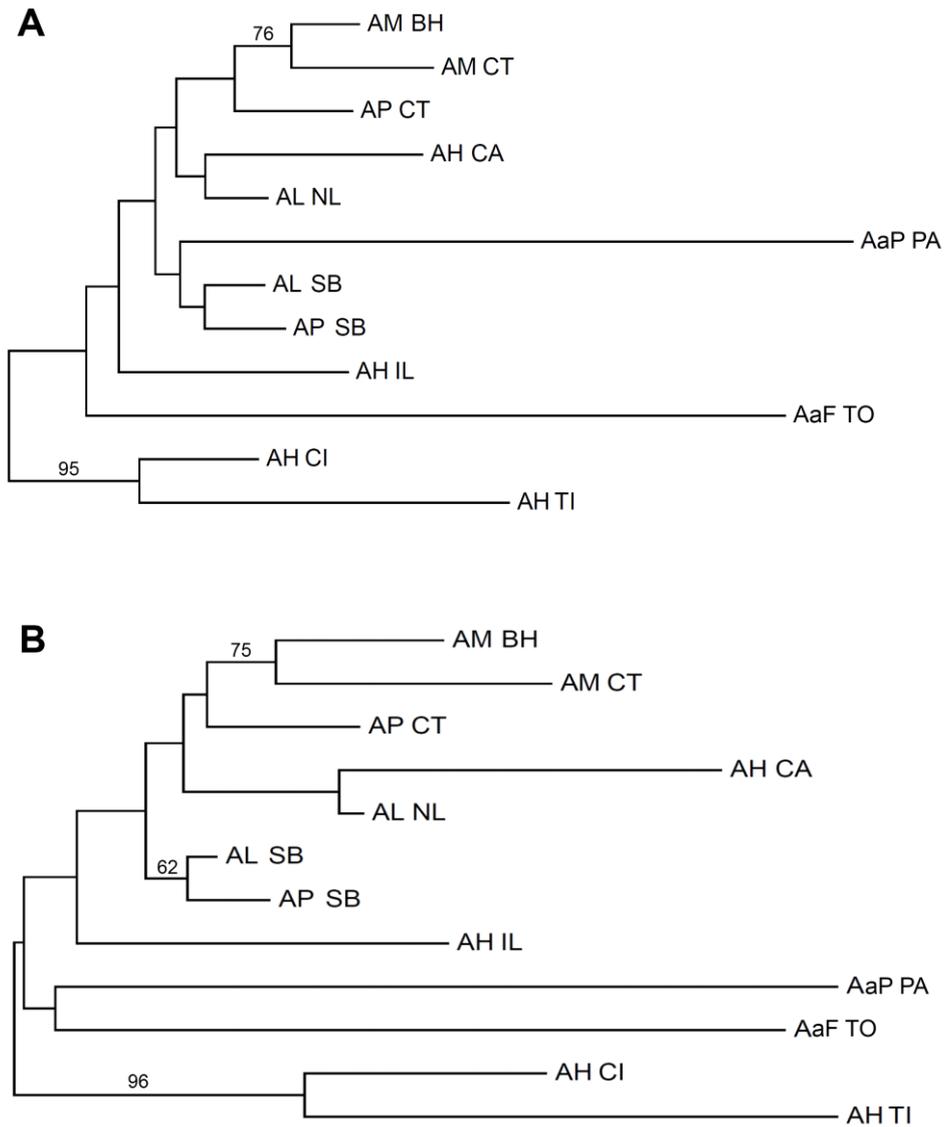


Figura 2.4: Dendrogramas representando relações fenéticas para doze populações do complexo *Acianthera proliferata*, inferidos a partir de 110 *loci* de ISSR, utilizando *neighbor-joining* como algoritmo de agrupamento: *A. hamosa* (AH_CA, AH_CI, AH_TI e AH_IL), *A. limae* (AL_NL e AL_SB), *A. modestissima* (AM_CT e AM_BH), *Acianthera* aff. *prolifera* (AaP_PA), *Acianthera proliferata* (AP_CT e AP_SB) e *Acianthera* aff. *fornograndensis* (AaF_TO). **A.** dendrograma inferido a partir de matriz de distância não enviesada de Nei. **B.** relações obtidas para matriz de ϕ_{PT} par-a-par. Valores sobre os ramos indicam o suporte dos grupos (*bootstrap*, 1.000 réplicas). Consulte tabela 2.1 para nomes das populações.

Discussão

A divergência genética, encontrada entre as populações de *A. modestissima* e duas das populações de *A. hamosa* (incluídas as populações das localidades tipos de ambas as espécies), somada à existência de caracteres diagnósticos consistentes (ecológico: diferença do habitat; morfológico: folhas eretas em *A. modestissima* e patentes em *A. hamosa*, além do próprio formato e tamanho das folhas) sugerem a existência de duas linhagens distintas, que podem ser considerados táxons distintos. A diferenciação vegetativa observada pode ser associada à radiação provocada pela adaptação a habitats distintos (Johnson *et al.*, 1998; Goldblatt, Manning & Bernhardt, 2001), já que *A. modestissima* ocorre em ambientes com maior incidência de radiação solar, enquanto *A. hamosa* é encontrada em sub-bosques de capões de matas em campos rupestres. Assim sendo, a morfologia floral deve ter se mantido coesa devido ao compartilhamento de polinizadores (Melo *et al.*, 2011). Estudos de sistemas de reprodução com amostragem mais ampla e que avaliem a ocorrência de incompatibilidade entre essas espécies seriam interessantes para elucidar os fatores que estariam atuando no processo de divergência dessas espécies.

A partir dos marcadores empregados, não é possível diferenciar geneticamente as populações de *A. limae* das de *A. prolifera* ocorrentes em Minas Gerais. Em ecótonos, onde é possível encontrá-las em simpatria (e.g., Santa Bárbara-MG), a formação de indivíduos com morfologia intermediária parece estar relacionada à plasticidade fenotípica, o que explicaria a ocorrência de indivíduos com morfologia intermediária apenas em bordas de matas, na zona de transição entre áreas sombreadas e áreas de afloramentos rochosos expostos ao sol. A ausência de indícios de mistura gênica, que caracterizaria a ocorrência de híbridos, é coerente com o reconhecimento de apenas uma espécie polimórfica, contendo linhagens em processo de divergência diferenças genéticas detectáveis. Melo *et al.* (2011) observaram que as duas espécies são intercompatíveis, o que estaria de acordo com um modelo de especiação simpátrica no qual, inicialmente, existiria apenas um mecanismo de isolamento pré-zigótico gerado por preferências de micro-habitats diferentes, mas posteriormente um acúmulo de incompatibilidade genética inviabilizaria a fecundação via seleção de reforço (Niet *et al.*, 2006; Savolainen *et al.*, 2006; Coyne, 2011). Este cenário parece razoável para espécies com habitat reduzidos a manchas, semelhantes a ilhas em áreas de vegetação

heterogênea (e.g., campos rupestres e inselbergs na Mata Atlântica), podendo compor um fator importante na constituição e manutenção da diversidade nesses ambientes.

Uma análise filogenética molecular incluindo os táxons do complexo *A. prolifera*, que constitui um clado, indicou ter ocorrido apenas uma invasão do ambiente rupícola por este grupo, muito provavelmente a partir de um ancestral epifítico de Mata Atlântica (Capítulo 1). No entanto, a partir da ocupação do habitat rupestre por essas plantas, mais de uma linhagem pode ter se diversificado e migrado para os campos rupestres (i.e., afloramentos ocorrentes no bioma cerrado), adotando rotas diferentes. Assumindo este panorama, eventos dispersivos podem ter levado a colonização de ambientes rupestres com condições ambientais diversas, o que favoreceria ocorrências de irradiação (e.g., da morfologia floral de *A. prolifera* e as demais espécies; da morfologia vegetativa entre *A. modestissima* e *A. hamosa*) e convergência (e.g. da morfologia floral entre *A. modestissima*, *A. hamosa* e *A. limae*), mediadas, principalmente, por pressão de polinizadores, condições edáficas e grau de exposição à luz (Wilson *et al.*, 2007; Martén_Rodríguez *et al.*, 2011). A morfologia incomum das populações AH_IL e AH_CA (intermediária entre *A. hamosa* e *A. limae*) e os resultados de estrutura genética obtidos aqui sugerem que essas populações poderiam ter origem híbrida, através do cruzamento de indivíduos provenientes de linhagens divergentes, sendo necessário, no entanto, o emprego de abordagens filogeográficas para elucidar tais questões.

A estruturação genética mais acentuada entre as populações localizadas em extremos de distribuição das populações amostradas (AaF_TO, ϕ_{PT} médio = 0,341; AaP_PA, ϕ_{PT} médio = 0,346; AH_TI, ϕ_{PT} médio = 0,336; e AH_CI, ϕ_{PT} médio = 0,266) pode ser explicada por fatores históricos envolvendo isolamento por distância. A localização geográfica parece ser um fator importante na delimitação das espécies do complexo *A. prolifera*, sendo mais informativos do que aspectos da morfologia e ecologia das espécies em alguns casos. A grande diferenciação genética da população de Palmeiras (AaP_PA) é coerente com o esperado em situações de isolamento por distância e, assim como visto para outras espécies, pode estar relacionada às barreiras ao fluxo gênico impostas pela interrupção da cadeia do Espinhaço entre os estados de Minas Gerais e Bahia (Ribeiro *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2012). Porém, os indivíduos desta população são similares aos indivíduos das populações de *A. prolifera* ocorrentes

em Minas Gerais (AP_CT e AP_SB), podendo ser diferenciados pelo maior número de flores por inflorescência e pelo tamanho reduzido das peças florais e sua coloração. Em espécies de outro grupo de *Acianthera*, particularmente *A. teres*, Borba *et al.* (2001b) notaram que populações de campos rupestres com grande disjunção da área core de distribuição do táxon, apresentam elevada diferenciação genética, em níveis usualmente observados apenas entre espécies distintas. Porém, devido à ausência de caracteres morfológicos diagnósticos, tem sido assumida uma postura conversadora por estes autores, não segregando tais populações em espécies separadas (Borba *et al.*, 2001b). Estudos adicionais que investiguem a biologia floral, os sistemas reprodutivos e a constituição genética (principalmente envolvendo marcadores de herança matrilinear) de outras populações ocorrentes na porção norte do Espinhaço, em outras regiões do Brasil e de outros países da América do Sul, podem esclarecer a relação destas plantas com as espécies estabelecidas no sudeste do Brasil, e determinar se esta população merece um status taxonômico específico, como pode ser indicado pelos resultados dos marcadores ISSR.

A população de Teófilo Otoni-MG também se mostrou bastante distinta geneticamente das demais populações. Esta população é mais relacionada morfológicamente e geograficamente às populações ocorrentes no Espírito Santo, para onde *A. fornograndensis* foi descrita recentemente e, provavelmente, constitui uma população dessa espécie, que por pressão do ambiente (mais seco) e de possíveis mudanças na guilda de polinizadores pode ter assumido pequenas variações morfológicas (e.g., labelo verrucoso/papiloso de base não-linear e ramicaules curtos sustentando folhas conspicuamente conduplicadas e reflexas, formando um gancho). Algumas destas modificações podem mesmo ter ocorrido por deriva genética, uma vez que pequenas alterações florais (tais como pétalas não serrilhadas) podem não ter qualquer influência na atração do polinizador e na polinização, e são facilitadas pelo isolamento pela distância entre estas populações associado ao baixo fluxo gênico polínico pela limitação de voo do polinizador (Borba & Semir, 2001; Borba *et al.*, 2001b; Melo *et al.*, 2011). A fim de esclarecer os fatores histórico-evolutivos que estão atuando sobre a população de *A. aff. fornograndensis*, seria importante a realização de estudos filogeográficos e de biologia reprodutiva, que incluíssem outras populações da espécie, ocorrentes em afloramentos rochosos no leste do Brasil.

A baixa congruência observada entre marcadores moleculares, morfológicos e ecológicos impossibilitam delimitar de forma inequívoca as entidades que compõem o complexo *A. prolifera*. Este padrão fortemente polimórfico, mas ao mesmo tempo fracamente politípico, dificulta a realização de uma classificação formal hierárquica (i.e., em espécies ou subespécies), frequentemente levando a uma grande proliferação de nomes para acomodar todos os variantes. Grupos assim caracterizam, de acordo com Cronk (1998), os complexos de espécies intratáveis taxonomicamente, que White (1962) chamou de ocloespécies. Diante das evidências obtidas neste estudo e tendo em vista as características propostas por Cronk (1998) para se identificar uma ocloespécie, uma possibilidade seria considerar as populações dos morfotipos *A. prolifera*, *A. limae*, *A. fornograndensis*, *A. aff. prolifera*, e eventualmente, os táxons ocorrentes nos Andes, como uma espécie única e altamente variável. Apesar de parecer uma solução pouco atraente quando se comparam os extremos morfológicos (e.g., *A. prolifera* e *A. limae* na Serra do Caraça-Santa Bárbara), esta pode ser tomada como uma decisão prudente quando se observa a variação ao longo de todo o gradiente. Em alguns grupos de espécies ocorrentes nestas ilhas de afloramentos rochosos em campo rupestres do leste do Brasil, aparentemente esta parece ser a única decisão prática do ponto de vista taxonômica de ser tomada, como podemos observar em *Vellozia hirsuta* (Barbosa *et al.*, 2012).

Os parâmetros de diversidade encontrados ($H_e = 0,162$ e $I = 0,243$; valores médios) são similares aos encontrados para orquídeas melitófilas (e.g., Silva, 2008; Cruz *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012; mas veja Oliveira, 2010). Estes achados não permitem rejeitar a hipótese de que mecanismos de autoincompatibilidade evitariam a depreciação da variabilidade genética nas espécies do complexo *A. prolifera*, em que a ocorrência de autofecundação, favorecida pela síndrome de polinização por Diptera, é apontada como fator preponderante para a diminuição da diversidade intrapopulacional (Melo *et al.*, 2011; Borba *et al.*, 2001). Por outro lado, estudos utilizando marcadores codominantes (alozimas) em orquídeas miiófilas encontraram variabilidade mais elevada (apesar deste ser um marcador que usualmente apresenta valores muito inferiores de variabilidade) (Azevedo *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2008), inclusive em espécies de *Acianthera* (Borba *et al.*, 2001), o que pode ser explicado pela ocorrência, mesmo que pouco frequente, de autofecundação nas espécies do complexo *A. prolifera*.

Além disso, a ocorrência em populações pequenas, restritas a manchas em afloramentos rochosos, e a raridade de eventos dispersivos ou fluxo polínico entre as populações poderiam ser responsáveis pela diminuição da variabilidade genética, como visto para outras espécies (Rodrigues, 2010; Sun & Wong, 2001; Pereira *et al.*, 2007). Estas populações, frequentemente constituídas por poucas dezenas de indivíduos, ou mesmo menos, são muito menores que as das espécies do complexo *A. teres*, que possuem variabilidade elevada e podem ter centenas de indivíduos (Borba *et al.*, 2001b, 2002).

A baixa variabilidade encontrada na população AaF_TO em relação às demais pode estar relacionada ao pequeno tamanho desta população, o que proporcionou uma baixa amostragem ($N = 4$), ou à coleta de indivíduos muito aparentados, principalmente considerando o fato desses indivíduos ocorrerem em ambientes que favorecerem a dispersão vegetativa à curta distância. Esta população pode ter derivado de um pequeno número de fundadores advindos de uma colonização muito recente (efeito de fundador), ou ainda, ter sofrido uma redução em seu tamanho efetivo (efeito gargalo), em ambos os casos, ficando mais sujeita ao efeito da deriva genética (Templeton, 2006). Entretanto, apenas análises com amostragens mais representativas podem esclarecer quais fatores estariam atuando nesta população.

Mesmo estando próximo à média dos valores encontrados para a família, os níveis de estruturação encontrados aqui são típicos de espécies raras, de populações fragmentadas com tamanho efetivo pequeno, com baixo fluxo de sementes entre manchas distantes de população (Phillips, Dixon & Peakal, 2012), sendo, no entanto, muito maiores que o valor médio observado para a família por Hamrick & Godt (1996). Esses atributos populacionais forneceria condições para a atuação da deriva genética, reduzindo a variabilidade intra-populacional e aumentando a estruturação inter-populacional. Além disso, eventos de fundação de novas populações, seguidos de um fluxo gênico limitado, favoreceriam o aumento da diferenciação entre populações devido ao acúmulo de mutações ou aos efeitos da deriva (Gravilets & Hastings, 1996; Turelli *et al.*, 2001).

Quando a estruturação genética é observada apenas entre as populações de *A. prolifera*, *A. limae*, *A. fornograndensis*, *A. aff. prolifera* os valores passam a ser muito mais baixos do que o encontrado para outras espécies de Orchidaceae (Phillips *et al.*,

2012), corroborando o tratamento dessas espécies como uma única espécie amplamente variável (i.e., ocloespécie). Espera-se que o emprego de abordagens filogeográficas, além de amostragens mais abrangentes desses morfotipos (incluindo populações extra-brasileiras e populações das localidades tipo de *A. limae* e *A. prolifera*), possam auxiliar na delimitação das entidades que o compõem e na compressão dos processos evolutivos que atuam sobre esta ocloespécie.

Referências bibliográficas

- Abbott RJ, Rieseberg LH. 2012.** Hybrid speciation. In: eLS. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001753.pub2
- Azevedo MTA, Borba EL, Semir J, Solferini VN. 2007.** High genetic variability in Neotropical myophilous orchids. *Botanical Journal of the Linnean Society* **153**: 33–40.
- Barrett CF, Freudenstein J V. 2011.** An integrative approach to delimiting species in a rare but widespread mycoheterotrophic orchid. *Molecular Ecology* **20**: 2771–2786.
- Barbosa A, Fiorini CF, Silva-Pereira V, Mello-Silva R, Borba EL. 2012.** Geographical genetic structuring and phenotypic variation in the *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) ochlospecies complex. *American Journal of Botany* **99**: 1477–1488.
- Borba EL, Semir J. 2001.** Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany* **88**: 75–88.
- Borba EL, Semir J, Shepherd GJ. 2001a.** Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* **88**: 89–99.
- Borba EL, Felix JM, Solferini VN, Semir J. 2001b.** Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* **88**: 419–428.
- Borba EL, Shepherd GJ, 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.
- Brown Jr WL, Wilson EO. 1956.** Character displacement. *Systematic Zoology* **5**: 49–64.

- Brown J, Kodric-Brown A. 1979.** Convergence, competition, and mimicry in a temperate community of hummingbird-pollinated flowers. *Ecology* **60**: 1022–1035.
- Caujapé-Castells J, Baccarani-Rosas M. 2005.** Transformer-3: a program for the analysis of molecular population genetic data. Exegen Software & Jardim Botánico Canario "Viera & Clavijo".
- Chiron GR, van den Berg C. 2012.** Révision taxinomique du genre *Acianthera* (Orchidaceae, Pleurothallidinae). *Richardiana* **12**: 59–77.
- Coyne JA. 2011.** Speciation in a small space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 12975–12976.
- Cronk QCB. 1998.** The ochlopecies concept. In Huxley CR, Lock JM, Cutler DF [eds.], *Chorology, taxonomy and ecology of the Floras of Africa and Madagascar*. 155–170. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Cruz DT, Selbach-Schnadelbach A, Lambert SM, Ribeiro PL, Borba EL. 2011.** Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **294**: 87–98.
- Ding G, Zhang D, Yu Y, Zhao L, Zhang B. 2012.** Population genetic diversity and divergence of the halobiotic herb *Limonium sinense* estimated by AFLP and ISSR, and implications for conservation. *Plant Systematics and Evolution* **299**: 131–138.
- Dobzhansky T. 1937.** *Genetics and the origin of species*. New York: Columbia University Press.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11–15.
- Earl DA, vonHoldt BM. 2012.** STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**: 359–361.

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611–2620.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **491**: 479–491.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003.** Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567–1587.
- Felsenstein J. 2006.** PHYLIP: phylogeny inference package, version 3.66, July 2006. University of Washington, Seattle. Available for download at <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>.
- Gavrilets S, Hastings A. 1996.** Founder effect speciation: a theoretical reassessment. *American Naturalist* **147**: 466–491.
- George S, Sharma J, Yadon VL. 2009.** Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *American Journal of Botany* **96**: 2022–2030.
- Goldblatt P, Manning J, Bernhardt P. 2001.** Radiation of pollination systems in *Gladiolus* (Iridaceae: Crocoideae) in southern Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **88**: 713–734.
- Hamrick J, Godt MJW. 1996.** Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*. **351**: 1291–1298.
- Huff DR, Peakall R, Smouse PE. 1993.** RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theoretical and Applied Genetics* **86**: 927–934.
- Johnson S, Linder H, Steiner K. 1998.** Phylogeny and radiation of pollination systems in *Disa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **85**: 402–411.

- Kollman LJC, Fontana AP. 2006.** *Acianthera fornograndensis* L. Kollmann & AP Fontana (Orchidaceae), uma nova espécie da Floresta Atlântica do Estado do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão* **20**: 27–31.
- Lousada JM, Borba EL, Ribeiro KT, Ribeiro LC, Lovato MB. 2011.** Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica* **139**: 431–440.
- Lousada JM, Lovato MB, Borba EL. 2013.** High genetic divergence and low genetic variability in disjunct populations of the endemic *Vellozia compacta* (Velloziaceae) occurring in two edaphic environments of Brazilian *campos rupestres*. *Brazilian Journal of Botany* **36**: DOI 10.1007/s40415-013-0001-x.
- Luer CA. 1986.** Icones Pleurothallidinarum III. Systematics of *Pleurothallis*. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. **20**: 1–116.
- Maguire TL, Peakall R, Saenger P. 2002.** Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. *TAG. Theoretical and Applied Genetics* **104**: 388–398.
- Mallet J. 2007.** Hybrid speciation. *Nature* **446**: 279–283.
- Martén-Rodríguez S, Kress WJ, Temeles EJ, Meléndez-Ackerman E. 2011.** Plant-pollinator interactions and floral convergence in two species of *Heliconia* from the Caribbean Islands. *Oecologia* **167**: 1075–1083.
- Melo MC, Borba EL. 2011.** Morphological variability in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **293**: 135–145.
- Melo MC, Taucce PPG, Borba EL. 2011.** Reproductive biology and isolation mechanisms in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **293**: 161–176.

- Michalakis Y, Excoffier L. 1996.** A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* **1**: 5–8.
- Nei M. 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583–590.
- Niet T, Johnson S, Linder H. 2006.** Macroevolutionary data suggest a role for reinforcement in pollination system shifts. *Evolution* **60**: 1596–1601.
- Oliveira HO. 2010.** Biossistemática de *Cyrtopodium poecilum* (Orchidaceae): biologia reprodutiva, isolamento reprodutivo e variabilidade genética Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbará T, Fay MF, Cozzolino S, Lexer C. 2011.** Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology* **20**: 3185–3201.
- Papadopulos AST, Baker WJ, Crayn D, Butlin RK, Kynast RG, Hutton I, Savolainen V. 2011.** Speciation with gene flow on Lord Howe Island. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 13188–13193.
- Peakall R, Smouse P, Huff D. 1995.** Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Molecular Ecology* **4**: 135–147.
- Peakall R, Smouse PE. 2006.** GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288–295.
- Peakall R, Smouse P. 2012.** GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* **1**: 6–8.
- Pereira ACS, Borba EL, Giuletta AM. 2007.** Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society* **153**: 401–416.

- Pessoa E, Alves M, Alves-Araújo A, Palma-Silva C, Pinheiro F. 2012.** Integrating different tools to disentangle species complexes: a case study in *Epidendrum* (Orchidaceae). *Taxon* **61**: 721–734.
- Phillips RD, Dixon KW, Peakall R. 2012.** Low population genetic differentiation in the Orchidaceae: implications for the diversification of the family. *Molecular Ecology* **21**: 5208–5220.
- Pinheiro LR, Rabbani ARC, Silva AVC, Silva Lédo A, Pereira KLG, Diniz LEC. 2012.** Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution* **298**: 1815–1825.
- Pinheiro F, Cozzolino S, de Barros F, Gouveia TMZM, Suzuki RM, Fay MF, Palma-Silva C. 2013.** Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. *Evolution* DOI: 10.1111/evo.12085
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–959.
- Provan J, Wilson PJ. 2007.** Development of microsatellites for the peat moss *Sphagnum capillifolium* using ISSR cloning. *Molecular Ecology Notes* **7**: 254–256.
- Ribeiro PL, Borba EL, Smidt EC, Lambert SM, Schnadelbach AS, van den Berg C. 2008.** Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution* **270**: 109–137.
- Rieseberg LH, Willis JH. 2007.** Plant speciation. *Science* **317**: 910–914.
- Rodrigues JF. 2010.** Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) Van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

- Savolainen V, Anstett M-C, Lexer C, Hutton I, Clarkson JJ, Norup M V, Powell MP, Springate D, Salamin N, Baker WJ. 2006.** Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature* **441**: 210–213.
- Sharma SK, Kumaria S, Tandon P, Rao SR. 2013.** Assessment of genetic variation and identification of species-specific ISSR markers in five species of *Cymbidium* (Orchidaceae). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **22**: 250-255.
- Silva JRS. 2008.** Variabilidade populacional de *Cattleya pfisteri* (Pabst & Senghas) Van den Berg (Orchidaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Soltis PS, Soltis DE. 2009.** The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 561–588.
- Sun M, Wong K. 2001.** Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *American Journal of Botany* **88**: 2180–2188.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.
- Templeton AR. 2006.** *Population genetics and microevolutionary theory*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Turelli M, Barton N, Coyne J. 2001.** Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 330–343.
- Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldán-Ruiz I. 2002.** Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* **11**: 139–151.
- Xu S, Schlüter PM, Scopece G, Breitkopf H, Gross K, Cozzolino S, Schiestl FP. 2011.** Floral isolation is the main reproductive barrier among closely related sexually deceptive orchids. *Evolution* **65**: 2606–2620.

- Waterman RJ, Pauw A, Barraclough TG, Savolainen V. 2009.** Pollinators underestimated: a molecular phylogeny reveals widespread floral convergence in oil-secreting orchids (sub-tribe Coryciinae) of the Cape of South Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **51**: 100–110.
- White F. 1962.** Geographic variation and speciation in Africa with particular reference to *Diospyros*. In: Taxonomy and Geography. The Systematics Association Publication **4**: 71–103.
- Wilson P, Wolfe AD, Armbruster WS, Thomson JD. 2007.** Constrained lability in floral evolution: counting convergent origins of hummingbird pollination in *Penstemon* and *Keckiella*. *New Phytologist* **176**: 883–890.
- Wright S. 1931.** Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* **16**: 97–159.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994.** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**: 176–183.

Apêndice

Tabela S.1: Matrizes dos valores par-a-par de ϕ_{PT} calculados a partir de 110 *loci* de ISSR (abaixo da diagonal) e das distâncias geográficas em quilômetros para doze populações do complexo *Acianthera prolifera*: *A. hamosa* (AH_CA, AH_CI, AH_TI e AH_IL), *A. limae* (AL_NL e AL_SB), *A. modestissima* (AM_CT e AM_BH), *A. aff. prolifera* (AaP_PA), *A. prolifera* (AP_CT e AP_SB) e *A. aff. fornograndensis* (AaF_TO). Consulte tabela 2.1 para nomes e figura 2.1 para localização das populações.

	AH_CA	AH_CI	AH_TI	AH_IL	AL_NL	AL_SB	AM_BH	AM_CT	AaP_PA	AP_CT	AP_SB	AaF_TO
AH_CA	–	105	65	124	169	198	184	210	1054	210	198	518
AH_CI	0,27	–	96	228	199	200	212	228	1071	228	200	502
AH_TI	0,41	0,21	–	159	114	135	129	152	1000	152	135	455
AH_IL	0,27	0,28	0,32	–	200	249	212	242	1037	242	249	551
AL_NL	0,10	0,17	0,28	0,19	–	53	15	44	887	44	53	357
AL_SB	0,19	0,23	0,30	0,14	0,08	–	49	37	872	37	0	320
AM_BH	0,22	0,25	0,32	0,24	0,12	0,09	–	31	872	31	49	343
AM_CT	0,23	0,27	0,36	0,24	0,14	0,14	0,12	–	849	0	37	313
AaP_PA	0,34	0,38	0,42	0,36	0,28	0,29	0,33	0,36	–	849	872	599
AP_CT	0,19	0,25	0,34	0,18	0,11	0,06	0,11	0,13	0,34	–	37	313
AP_SB	0,21	0,26	0,28	0,13	0,10	0,03	0,12	0,15	0,28	0,08	–	320
AaF_TO	0,46	0,34	0,46	0,30	0,32	0,29	0,29	0,35	0,41	0,26	0,27	–

Considerações finais

O emprego de marcadores ISSR possibilitou, com base na variabilidade e estruturação genética do complexo *A. prolifera*, reconhecer *Acianthera hamosa* e *A. modestissima* como entidades distintas. Além da divergência genética encontrada entre essas espécies, elas possuem características morfológicas e ecológicas que permitem sua distinção. A partir dos marcadores empregados, não foi possível diferenciar geneticamente as populações de *A. limae* das de *A. prolifera* ocorrentes em Minas Gerais. Além disso, não foram obtidas evidências de hibridização entre esses morfotipos nas populações AL_SB e AP_SB, que ocorrem em simpatria na Serra do Caraça (Santa Bárbara–MG), estando a formação de indivíduos com morfologia intermediária relacionada à plasticidade fenotípica. Este padrão fortemente polimórfico, mas ao mesmo tempo fracamente politípico, que se estende também aos morfotipos *A. fornograndensis*, *A. aff. prolifera* e, eventualmente, aos táxons ocorrentes nos Andes, levou-nos a sugerir o tratamento dessas entidades como uma ocloespécie. Espera-se que o emprego de abordagens filogeográficas, além de amostragens mais abrangentes desses morfotipos (incluindo populações extra-brasileiras e populações das localidades tipo de *A. limae* e *A. prolifera*) possam auxiliar na compressão das entidades que o compõem e dos processos evolutivos que atuam sobre esta ocloespécie.

Os parâmetros de diversidade inferidos para o complexo *A. prolifera*, apontam para ocorrência, mesmo que pouco frequente, de autofecundação nas espécies do complexo *A. prolifera*. A autofertilização juntamente com fatores demográficos e baixa taxa de fluxo gênico entre populações poderiam explicar a baixa variabilidade em relação a outras espécies de orquídeas miiófilas.

Por outro lado, a adoção de métodos de inferência filogenéticos permitiu a recuperação das espécies rupícolas de *Acianthera* em três clados distintos, sugerindo que a ocupação dos afloramentos rupestres ocorreu, pelo menos, em três eventos independentes a partir de ancestrais epífitos em Mata Atlântica. Além disso, a comparação das relações de parentesco obtidas com os dados disponíveis de biologia reprodutiva possibilitou sugerir a ocorrência convergência de caracteres florais entre táxons distantes e de divergência entre táxons mais próximos, muito provavelmente devido à pressão exercida pelo compartilhamento de polinizadores e pelo ambiente.

Sendo assim, a morfologia floral não seria um bom indicador de parentesco para essas espécies, devendo ser utilizados com muita cautela em inferências filogenéticas para o gênero.

Apesar de sua rara utilização em estudos de filogenia, o espaçador nuclear externo (ETS) mostrou-se mais informativo que o espaçador ITS neste trabalho. Dessa forma, sugerimos a utilização do ETS em estudos de evolução e de inferência filogenética, principalmente, de grupos com divergência recente. A incongruência topológica encontrada para a região *atpL-atpH* demonstrou a importância de abordagens *multiloci* em trabalhos de filogenia molecular. Fenômenos como separação incompleta de linhagens contendo polimorfismos ancestrais, hibridação ou presença de cópias paralogas podem enviesar o sinal filogenético contido em marcadores moleculares, sendo muito importante a adoção de critérios explícitos para detecção de incongruências.

Os dados de ISSR e de sequência foram congruentes ao apontar a baixa divergência genética entre os *taxa* que compõem o complexo *A. prolifera* (principalmente entre *A. limae* e *A. prolifera*). Estes achados apontam para uma diversificação recente deste grupo, provavelmente iniciada a partir de sua transição para o ambiente rupestre. Os morfotipos de morfologia incomuns (*A. aff fornograndensis* e *A. aff prolifera*) mostraram-se bem diferenciados dos demais morfotipos, sugerindo isolamento reprodutivo por distância, dado suas distribuições.

As perspectivas de trabalhos futuros geradas aqui são diversas e envolvem hipóteses a serem testadas em áreas como: biologia reprodutiva, evolução de sistemas de polinização, filogenia, datação molecular, filogeografia, biogeografia histórica, genética de populações, anatomia e fisiologia vegetal. Espera-se que essas linhas de pesquisa possam ajudar a responder, dentre outras, questões como: 1) Como os sistemas de polinização se relacionam com eventos de especiação em *Acianthera*?; 2) Quais as rotas de ocupação do ambiente rupestre por espécies de *Acianthera*?; 3) Como mudanças paleo-climáticas afetaram a distribuição das espécies de *Acianthera* nos neotrópicos?; 4) Hibridização e introgressão participam da evolução do complexo *A. prolifera*?; 5) Quais as possíveis novidades evolutivas (anatômicas e fisiológicas) propiciaram a adaptação das espécies de *Acianthera* ao hábito rupícola.

Referências bibliográficas gerais

- Abbott RJ, Rieseberg LH. 2012.** Hybrid speciation. In: eLS. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001753.pub2
- Álvarez I, Wendel JF. 2003.** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 417–434.
- Azevedo MTA, Borba EL, Semir J, Solferini VN. 2007.** High genetic variability in Neotropical myophilous orchids. *Botanical Journal of the Linnean Society* **153**: 33–40.
- Azevedo CO, van den Berg C. 2007a.** A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. *Hoehnea* **34**: 1–47.
- Azevedo CO, van den Berg C. 2007b.** Análise comparativa de áreas de campo rupestre da Cadeia do Espinhaço (Bahia e Minas Gerais, Brasil) baseada em espécies de Orchidaceae. *Sitientibus, série Ciências Biológicas* **7**: 199–210.
- Baldwin BG, Markos S. 1998.** Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S–26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **10**: 449–463.
- Barbosa AR. 2011.** Biosistemática do complexo *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) baseada em análise filogeográfica e genética de populações. Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Barbosa A, Fiorini CF, Silva-Pereira V, Mello-Silva R, Borba EL. 2012.** Geographical genetic structuring and phenotypic variation in the *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) ochlospecies complex. *American Journal of Botany* **99**: 1477–1488.
- Barrett CF, Freudenstein J V. 2011.** An integrative approach to delimiting species in a rare but widespread mycoheterotrophic orchid. *Molecular Ecology* **20**: 2771–2786.
- Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN, Pessoa EM, Forster W. 2013.** Orchidaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Rio de

Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
(<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11043>)

- Barton NH. 2001.** The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*. **10**: 551–568.
- Bergsten J. 2005.** A review of long-branch attraction. *Cladistics* **21**: 163–193.
- Borba EL, Felix JM, Semir J, Solferini VN. 2000.** *Pleurothallis fabiobarrosii*, a new Brazilian species: morphological and genetic data with notes on the taxonomy of Brazilian rupicolous *Pleurothallis*. *Lindleyana* **15**: 2–9.
- Borba EL, Semir J. 2001.** Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany* **88**: 75–88.
- Borba EL, Semir J, Shepherd GJ. 2001a.** Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* **88**: 89–99.
- Borba EL, Felix JM, Solferini VN, Semir J. 2001b.** Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* **88**: 419–428.
- Borba EL, Felix JM, Solferini VN, Semir J. 2001c.** Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* **88**: 419–428.
- Borba EL, Shepherd GJ, 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.
- Borba EL. 2003.** Novas combinações em *Acianthera* (*Pleurothallis* s.l.; Orchidaceae: Pleurothallidinae) ocorrentes nos campos rupestres brasileiros. *Sitientibus, série Ciências Biológicas* **3**: 22–25.
- Brower AVZ, DeSalle R, Vogler A. 1996.** Gene trees, species trees, and systematics: a cladistic perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**: 423–450.

- Brown Jr WL, Wilson EO. 1956.** Character displacement. *Systematic Zoology* **5**: 49–64.
- Brown J, Kodric-Brown A. 1979.** Convergence, competition, and mimicry in a temperate community of hummingbird-pollinated flowers. *Ecology* **60**: 1022–1035.
- Calonje M, Martín-Bravo S, Dobeš C, Gong W, Jordon-Thaden I, Kiefer C, Kiefer M, Paule J, Schmickl R, Koch MA. 2008.** Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction. *Plant Systematics and Evolution* **282**: 257–280.
- Cameron KM, Chase MW, Whitten WM, Kores PJ, Jarrell DC, Albert VA, Yukawa T, Hills HG, Goldman DG. 1999.** A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences. *American Journal of Botany* **86**: 208–224.
- Carnaval AC, Moritz C. 2008.** Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography* **35**: 1187–1201.
- Caujapé-Castells J, Baccarani-Rosas M. 2005.** Transformer-3: a program for the analysis of molecular population genetic data. Exegen Software & Jardim Botánico Canario "Viera & Clavijo".
- Chase MW, Williams NH, De Faria AD, Neubig KM, Amaral MDCE, Whitten WM. 2009.** Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. *Annals of Botany* **104**: 387–402.
- Chiron GR, van den Berg C. 2012.** Révision taxinomique du genre *Acianthera* (Orchidaceae , Pleurothallidinae). *Richardiana* **12**: 59–77.
- Chiron GR, Guiard J, Van Den Berg C. 2012.** Phylogenetic relationships in Brazilian *Pleurothallis* sensu lato (Pleurothallidinae, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences. *Phytotaxa* **58**: 34–58.
- Christenhusz MJM, Chase MW. 2013.** Biogeographical patterns of plants in the Neotropics - dispersal rather than plate tectonics is most explanatory. *Botanical Journal of the Linnean Society* **171**: 277–286.

- Christensen DE. 1992.** Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. *Lindleyana* **7**: 28–33.
- Cox AV, Pridgeon AM, Albert VA, Chase MW. 1997.** Phylogenetics of the slipper orchids (Cypripedioideae, Orchidaceae): nuclear rDNA ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution* **208**: 197–223.
- Coyne JA. 2011.** Speciation in a small space. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 12975–12976.
- Cronk QCB. 1998.** The ochlopecies concept. In Huxley CR, Lock JM, Cutler DF [eds.], *Chorology, taxonomy and ecology of the Floras of Africa and Madagascar*. 155–170. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Cruz DT, Selbach-Schnadelbach A, Lambert SM, Ribeiro PL, Borba EL. 2011.** Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **294**: 87–98.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012.** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**:772.
- Darwin CR. 1862.** *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing*. London: John Murray
- Degnan JH, Rosenberg NA. 2009.** Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology & Evolution* **24**: 332–340.
- Desfeux C, Maurice S, Henry J-P, Lejeune B, Gouyon P-H. 1996.** Evolution of reproductive systems in the genus *Silene*. *Proceedings of the Royal Society, series B, Biological Sciences* **263**: 409–414.
- Devos N, Raspé O, Oh SH, Tyteca D, Jacquemart AL. 2006.** The evolution of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) allotetraploid complex: insights from nrDNA sequences and cpDNA PCR-RFLP data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 767–778.

- Ding G, Zhang D, Yu Y, Zhao L, Zhang B. 2012.** Population genetic diversity and divergence of the halobiotic herb *Limonium sinense* estimated by AFLP and ISSR, and implications for conservation. *Plant Systematics and Evolution* **299**: 131–138.
- Dobzhansky T. 1937.** *Genetics and the origin of species*. New York: Columbia University Press.
- Doorduyn L, Gravendeel B, Lammers Y, Ariyurek Y, Chin–a–woeng T, Vrieling K. 2011.** The complete chloroplast genome of 17 individuals of pest species *Jacobaea vulgaris*: SNPs, microsatellites and barcoding markers for population and phylogenetic studies. *DNA Research* **18**: 93–105.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11–15.
- Dressler RL. 1981.** *The Orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Dressler RL. 1993.** *Phylogeny and classification of the orchid family*. Portland: Dioscorides Press.
- Duchen P, Renner SS. 2010.** The evolution of *Cayaponia* (Cucurbitaceae): repeated shifts from bat to bee pollination and long-distance dispersal to Africa 2-5 million years ago. *American Journal of Botany* **97**: 1129–1141.
- Earl DA, vonHoldt BM. 2012.** STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**: 359–361.
- Edgar RC. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792–1797.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611–2620.

- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **491**: 479–491.
- Faegri K, van der Pijl L. 1979.** *The principles of pollination ecology*, 3rd ed. Oxford: Pergamon Press.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003.** Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567–1587.
- Farris JS. 1970.** Methods for computing Wagner trees. *Systematic Zoology* **19**: 83–92.
- Farris JS, Albert VA, Källersjö M, Lipscomb D, Kluge AG. 1996.** Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* **12**: 99–124.
- Fay MF, Chase MW. 2009.** Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. *Annals of Botany* **104**: 359–364.
- Feliner GN, Rosselló JA. 2007.** Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**: 911–919.
- Felsenstein J. 1978.** Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Biology* **27**: 401–410.
- Felsenstein J. 2006.** PHYLIP: phylogeny inference package, version 3.66, July 2006. University of Washington, Seattle. Available for download at <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>.
- Fitch WM. 1971.** Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* **20**: 406–416.
- Gavrilets S, Hastings A. 1996.** Founder effect speciation: a theoretical reassessment. *American Naturalist* **147**: 466–491.
- George S, Sharma J, Yadon VL. 2009.** Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *American Journal of Botany* **96**: 2022–2030.

- Giulietti AM, Pirani JR. 1988.** Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. *In: Heyer WR, Vanzolini PE (eds) Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns.* Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.
- Goldblatt P, Manning J, Bernhardt P. 2001.** Radiation of pollination systems in *Gladiolus* (Iridaceae: Crocoideae) in southern Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **88**: 713–734.
- Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC . 2003.** TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* **24**: 774–786.
- Graham CH, Moritz C, Williams SE. 2006.** Habitat history improves prediction of biodiversity in rainforest fauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 632–636.
- Guindon S, Gascuel O. 2003.** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696–704.
- Haffer J. 1969.** Speciation in Amazonian forest birds. *Science* **165**: 131–137.
- Hamrick J, Godt MJW. 1996.** Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical transactions of the Royal Society of London.* **351**: 1291–1298.
- Huff DR, Peakall R, Smouse PE. 1993.** RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theoretical and Applied Genetics* **86**: 927–934.
- Johnson S, Linder H, Steiner K. 1998.** Phylogeny and radiation of pollination systems in *Disa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **85**: 402–411.
- Johnson S, Alexandersson R, Linder H. 2003.** Experimental and phylogenetic evidence for floral mimicry in a guild of fly-pollinated plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **80**: 289–304.
- Jurgens A, Witt T, Gottsberger G. 1996.** Reproduction and pollination in Central European populations of *Silene* and *Saponaria* species. *Botanica Acta* **109**: 316–324.

- Kluge AG. 1989.** A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among *Epicrates* (Boidae, Serpentes). *Systematic Zoology* **38**:7–25.
- Kollman LJC, Fontana AP. 2006.** *Acianthera fornograndensis* L. Kollmann & AP Fontana (Orchidaceae), uma nova espécie da Floresta Atlântica do Estado do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão* **20**: 27–31.
- Lee EK, Cibrian-Jaramillo A, Kolokotronis S-O, Katari MS, Stamatakis A, Ott M, Chiu JC, Little DP, Stevenson DW, McCombie WR, Martienssen RA, Coruzzi G, Desalle R. 2011.** A functional phylogenomic view of the seed plants. *PLoS Genetics* **7**: 1–13.
- Logacheva MD, Valiejo-Roman CM, Degtjareva G V, Stratton JM, Downie SR, Samigullin TH, Pimenov MG. 2010.** A comparison of nrDNA ITS and ETS loci for phylogenetic inference in the Umbelliferae: an example from tribe Tordylieae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **57**: 471–476.
- Lousada JM, Borba EL, Ribeiro KT, Ribeiro LC, Lovato MB. 2011.** Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica* **139**: 431–440.
- Lousada JM, Lovato MB, Borba EL. 2013.** High genetic divergence and low genetic variability in disjunct populations of the endemic *Vellozia compacta* (Velloziaceae) occurring in two edaphic environments of Brazilian *campos rupestres*. *Brazilian Journal of Botany* **36**: DOI 10.1007/s40415-013-0001-x.
- Luer CA. 1986a.** Icones Pleurothallidinarum I. Systematics of the Pleurothallidinae. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* **15**: 1–86.
- Luer CA. 1986b.** Icones Pleurothallidinarum III. Systematics of *Pleurothallis*. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. **20**: 1–116.
- Maguire TL, Peakall R, Saenger P. 2002.** Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae)

detected by AFLPs and SSRs. *TAG. Theoretical and Applied Genetics* **104**: 388–398.

Mallet J. 2007. Hybrid speciation. *Nature* **446**: 279–283.

Martén-Rodríguez S, Kress WJ, Temeles EJ, Meléndez-Ackerman E. 2011. Plant-pollinator interactions and floral convergence in two species of *Heliconia* from the Caribbean Islands. *Oecologia* **167**: 1075–1083.

Melo MC, Borba EL, Paiva EAS. 2010. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* **286**: 141–151.

Melo MC, Borba EL. 2011. Morphological variability in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **293**: 135–145.

Melo MC, Taucce PPG, Borba EL. 2011. Reproductive biology and isolation mechanisms in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **293**: 161–176.

Michalakis Y, Excoffier L. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* **1**: 5–8.

Monteiro SHN, Selbach-Schnadelbach A, Oliveira RJ, van den Berg C. 2010. Molecular phylogenetics of *Galeandra* (Orchidaceae: Catasetinae) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Systematic Botany* **35**: 476–486.

Mota RC. 2006. Orchidaceae na Serra do Caraça, Minas Gerais: levantamento florístico com ênfase no estudo taxonômico da subfamília Epidendroideae. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais.

Müller K, 2005. SeqState: primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. *Applied Bioinformatics* **4**: 65–69.

Müller K. 2006. Incorporating information from length–mutational events into phylogenetic analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 667–676.

- Nei M. 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583–590.
- Neyland R, Urbatsch LE, Pridgeon AM. 1995.** A phylogenetic analysis of subtribe Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **117**: 13–28.
- Niet T, Johnson S, Linder H. 2006.** Macroevolutionary data suggest a role for reinforcement in pollination system shifts. *Evolution* **60**: 1596–1601.
- Olesen JM, Alarcón M, Ehlers BK, Aldasoro JJ, Roquet C. 2012.** Pollination, biogeography and phylogeny of oceanic island bellflowers (Campanulaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **14**: 169–182.
- Oliveira HO. 2010.** Biosistemática de *Cyrtopodium poecilum* (Orchidaceae): biologia reprodutiva, isolamento reprodutivo e variabilidade genética Dissertação, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Ollerton J, Johnson SD, Cranmer L, Kellie S. 2003.** The pollination ecology of an assemblage of grassland asclepiads in South Africa. *Annals of Botany* **92**: 807–834.
- Pabst GFJ, Dungs F. 1975.** *Orchidaceae Brasilienses*, Vol. 1. Hildesheim: Brücke-Verlag.
- Palma-Silva C, Wendt T, Pinheiro F, Barbará T, Fay MF, Cozzolino S, Lexer C. 2011.** Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology* **20**: 3185–3201.
- Pamilo P, Nei M. 1988.** Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution* **5**: 568–583.
- Papadopulos AST, Baker WJ, Crayn D, Butlin RK, Kynast RG, Hutton I, Savolainen V. 2011.** Speciation with gene flow on Lord Howe Island. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 13188–13193.

- Peakall R, Smouse P, Huff D. 1995.** Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Molecular Ecology* **4**: 135–147.
- Peakall R, Smouse PE. 2006.** GenAIEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288–295.
- Peakall R, Ebert D, Poldy J, Barrow RA, Francke W, Bower CC, Schiestl FP. 2010.** Pollinator specificity, floral odour chemistry and the phylogeny of Australian sexually deceptive *Chiloglottis* orchids: implications for pollinator-driven speciation. *New Phytologist* **188**: 437–450.
- Peakall R, Smouse P. 2012.** GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* **1**: 6–8.
- Pereira ACS, Borba EL, Giulietti AM. 2007.** Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society* **153**: 401–416.
- Pessoa E, Alves M, Alves-Araújo A, Palma-Silva C, Pinheiro F. 2012.** Integrating different tools to disentangle species complexes: a case study in *Epidendrum* (Orchidaceae). *Taxon* **61**: 721–734.
- Phillips RD, Dixon KW, Peakall R. 2012.** Low population genetic differentiation in the Orchidaceae: implications for the diversification of the family. *Molecular Ecology* **21**: 5208–5220.
- Pinheiro LR, Rabbani ARC, Silva AVC, Silva Lédo A, Pereira KLG, Diniz LEC. 2012.** Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. *Plant Systematics and Evolution* **298**: 1815–1825.
- Pinheiro F, Cozzolino S, de Barros F, Gouveia TMZM, Suzuki RM, Fay MF, Palma-Silva C. 2013.** Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. *Evolution* DOI: 10.1111/evo.12085

- Poczai P, Hyvönen J. 2010.** Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Molecular Biology Reports* **37**: 1897–1912.
- Porembski S. 2007.** Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. *Revista Brasileira de Botânica* **30**: 579–586.
- Pridgeon AM, Chase MW. 2001.** A phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Lindleyana* **16**: 235–271.
- Pridgeon AM, Solano R, Chase MW. 2001.** Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* **88**: 2286–2308.
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. 2005.** *Genera Orchidacearum, Volume 4. Epidendroideae (Part 1)*. Oxford: Oxford University Press.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–959.
- Provan J, Wilson PJ. 2007.** Development of microsatellites for the peat moss *Sphagnum capillifolium* using ISSR cloning. *Molecular Ecology Notes* **7**: 254–256.
- de Queiroz A, Donoghue MJ, Kim J. 1995.** Separate versus combined analysis of phylogenetic evidence. *Annual Review of Ecology and Systematics* **26**: 657–681.
- Rapini A, Ribeiro PL, Lambert S, Pirani JR. 2008.** A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* **4**: 16-24.
- Ribeiro PL, Borba EL, Smidt EC, Lambert SM, Schnadelbach AS, van den Berg C. 2008.** Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution* **270**: 109–137.
- Rieseberg LH. 1995.** The role hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* **82**: 944–953.

- Rieseberg LH, Willis JH. 2007.** Plant speciation. *Science* **317**: 910–914.
- Rieseberg LH, Blackman BK. 2010.** Speciation genes in plants. *Annals of Botany* **106**: 439–455.
- Rodrigues JF. 2010.** Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) Van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.
- Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012.** MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**: 539–542.
- Salazar GA., Cabrera LI, Figueroa C. 2011.** Molecular phylogenetics, floral convergence and systematics of *Dichromanthus* and *Stenorrhynchos* (Orchidaceae: Spiranthinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **167**: 1–18.
- Savolainen V, Anstett M-C, Lexer C, Hutton I, Clarkson JJ, Norup M V, Powell MP, Springate D, Salamin N, Baker WJ. 2006.** Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature* **441**: 210–213.
- Schiestl FP, Johnson SD. 2013.** Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology and Evolution* **28**: 305-315.
- Sharma SK, Kumaria S, Tandon P, Rao SR. 2013.** Assessment of genetic variation and identification of species-specific ISSR markers in five species of *Cymbidium* (Orchidaceae). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **22**: 250-255.
- Shaw J, Lickey E, Schilling EE, Small RL. 2007.** Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* **94**: 275–288.
- Silva JRS. 2008.** Variabilidade populacional de *Cattleya pfisteri* (Pabst & Senghas) Van den Berg (Orchidaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana.

- Simmons MP, Ochoterena H. 2000.** Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analysis. *Systematic Biology* **49**: 369–381.
- Simmons MP, Müller K, Norton AP. 2007.** The relative performance of indel-coding methods in simulations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**: 724–740.
- Smidt EC, Silva-Pereira V, Borba EL. 2006.** Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. *Plant Species Biology* **21**: 85–91.
- Soltis PS, Soltis DE. 2009.** The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology* **60**: 561–588.
- Staden R. 1996.** The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology* **5**: 233–241.
- Stebbins GL. 1970.** Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1**: 307–326.
- Sun M, Wong K. 2001.** Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. *American Journal of Botany* **88**: 2180–2188.
- Swofford D, Waddell P, Huelsenbeck J. 2001.** Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods. *Systematic Biology* **50**: 525–539.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.
- Templeton AR. 2006.** *Population genetics and microevolutionary theory*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Tremblay RL, Ackerman JD, Zimmerman JK, Calvo RN. 2005.** Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**: 1–54.

- Turelli M, Barton N, Coyne J. 2001.** Theory and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 330–343.
- Van den Berg C, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Arenas MAS, Culham A, Chase MW. 2000.** A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96–114.
- van der Niet T, Johnson SD. 2012.** Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution* **27**: 353–361.
- Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldán-Ruiz I. 2002.** Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* **11**: 139–151.
- Xu S, Schlüter PM, Scopece G, Breitkopf H, Gross K, Cozzolino S, Schiestl FP. 2011.** Floral isolation is the main reproductive barrier among closely related sexually deceptive orchids. *Evolution* **65**: 2606–2620.
- Waterman RJ, Pauw A, Barraclough TG, Savolainen V. 2009.** Pollinators underestimated: a molecular phylogeny reveals widespread floral convergence in oil-secreting orchids (sub-tribe Coryciinae) of the Cape of South Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **51**: 100–110.
- Werneck FP. 2011.** The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews* **30**: 1630–1648.
- White F. 1962.** Geographic variation and speciation in Africa with particular reference to *Diospyros*. In: Taxonomy and Geography. The Systematics Association Publication **4**: 71–103.
- Wiens JJ. 1998.** Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology* **47**: 568–581.
- Wilson P, Wolfe AD, Armbruster WS, Thomson JD. 2007.** Constrained lability in floral evolution: counting convergent origins of hummingbird pollination in *Penstemon* and *Keckiella*. *New Phytologist* **176**: 883–890.

Wright S. 1931. Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* **16**: 97–159.

Yukawa T, Ohba H, Cameron KM, Chase MW. 1996. Chloroplast DNA phylogeny of subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae): Insights from a combined analysis based on rbcL sequences and restriction site variation. *Journal of Plant Research* **109**: 169–176.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**: 176–183.