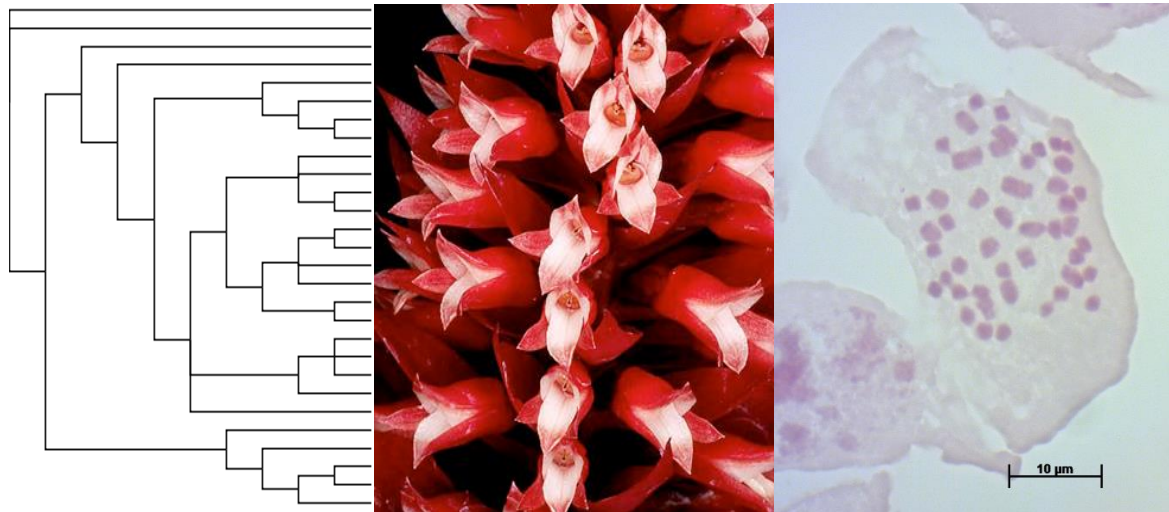


LEONARDO RAMOS SEIXAS GUIMARÃES

Filogenia e citotaxonomia do clado
***Stenorrhynchos* (Spiranthinae, Cranichideae,**
Orchidoideae, Orchidaceae)



Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de concentração de Plantas Vasculares.

SÃO PAULO

2014

LEONARDO RAMOS SEIXAS GUIMARÃES

Filogenia e citotaxonomia do clado
***Stenorrhynchos* (Spiranthinae, Cranichideae,**
Orchidoideae, Orchidaceae)

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de concentração de Plantas Vasculares.

ORIENTADOR: DR. FÁBIO DE BARROS (INSTITUTO DE BOTÂNICA, SÃO PAULO, BRASIL)

COORIENTADOR: DR. GERARDO A. SALAZAR (INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, D.F., MÉXICO)



Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Guimarães, Leonardo Ramos Seixas

G963fi Filogenia e citotaxonomia do clado *Stenorrhynchos* (Spiranthinae, Cranichideae, Orchidoideae, Orchidaceae) / Leonardo Ramos Seixas Guimarães -- São Paulo, 2014.
101 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2014

Bibliografia.

1. Orchidaceae. 2. Citogenética. 3. Sistemática molecular. I. Título

CDU: 582.594.2

Data de defesa: 9 Junho 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio de Barros (IBt, São Paulo-SP)

Prof. Dr. Rodolfo Aniceto Solano Gómez (CIIDIR Unidad Oaxaca, México)

Prof. Dr. João Aguiar Nogueira Batista (UFMG, Belo Horizonte-MG)

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins (UNICAMP, Campinas-SP)

Profa. Dra. Inês Cordeiro (IBt, São Paulo-SP)

Resultado final: **APROVADO**

"A esperança tem duas filhas lindas, a indignação e a coragem. A indignação nos ensina a não aceitar as coisas como estão; a coragem, a mudá-las."

(Santo Agostinho)

"The present-day multiplicity of species and the structure of the differences between them, first becomes intelligible when it is recognized that the differences have evolved in the course of phylogenesis; in other words, when the phylogenetic relationship of the species is understood."

(Willi Hennig, *Annual Review of Entomology* 10: 97. 1965)

*"Aceite o desafio e provoque o desempate
Desarme a armadilha e desmonte o disfarce
Se afaste do abismo
Faça do bom-senso a nova ordem"*

(Estrofe da Canção "Plantas Embaixo do Aquário" escrita por Renato Russo)

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, irmãos e minha amada família pela compreensão, confiança e incentivo depositados em mim, durante todas as etapas da realização desta pesquisa. Aos Souza Mathias, minha segunda família, pelos momentos agradáveis e divertidos.

Aos meus orientadores, Dr. Fábio de Barros (IBt) e Dr. Gerardo A. Salazar (IB/UNAM), não somente por me aceitarem como aluno, dando-me capacidade, coragem e esforço para desenvolver esta tese, como também pela amizade, atenção, companheirismo, confiança, disponibilidade, franqueza e paciência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão das bolsas de doutorado (Proc. # 2010/16353-1) e de estágio no exterior (Proc. # 2012/19778-9).

Ao Instituto de Botânica, particularmente aos Núcleos de Pesquisas: Orquidário do Estado, Curadoria do Herbário de São Paulo, e Biblioteca e Memória, pela infraestrutura e material disponíveis para a realização deste trabalho. E à Pós-Graduação do mesmo Instituto pela eficiência e pronto atendimento toda vez que necessitei os seus serviços.

A todos os (ex-)funcionários do Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado (NP-OE): Rosana, Sandra, Rogério, Rodrigo, João Carlos, Carlito, Yoshito, Romário e Joãozinho, e a todos os estagiários (foram tantos em quatro anos que preferi não nomeá-los) pela alegria, amizade, apoio, carinho, consideração, convivência, descontração, harmonia e prazer. Aos pesquisadores Dra. Andréa Macêdo Corrêa, Dr. Fábio Pinheiro, Dr. Eduardo Luís Martins Catharino e Dr. Rogério Mamoru Suzuki pelo aprendizado, conhecimento, ensinamentos e instrução. E aos alunos Ana Kelly Koch, Climbiê F. Hall, Luciano Zandoná, Monique C.R. Abrão, Ricardo P.G. Rosário, Tiago L. Vieira, Tiago M.Z.M. Gouveia e Vinicius T. Rodrigues pela ajuda, bondade, debate nas discussões científicas, divertimento e estima.

Ao Dr. Eduardo Luís Martins Catharino, curador da coleção viva do Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado pela permissão de análise e observação das espécies.

Aos (ex-)alunos, estagiários, funcionários e pesquisadores dos Núcleos de Pesquisa em Ficologia, em Fisiologia e Bioquímica, em Palinologia, e em Sementes pelos momentos alegres, divertidos e prazerosos. Aos alunos e estagiários do Núcleo Curadoria do Herbário por compartilhar memórias e discussões taxonômicas. E à Carolina B. Coelho (Palinologia), Camila F.S. Malone (Ficologia), Jackeline Jorge (Orquidário) e Luciana B. Benatti (Microscopia Eletrônica) pela amizade, apoio, incentivo e segredos confiados.

Às Dras. Maria das Graças Lapa Wanderley, Samantha Koehler e Vanessa de Oliveira Maekawa pelas valiosas e úteis sugestões, comentários, recomendações e observações feitas na aula de qualificação.

Aos colegas e assistentes no trabalho de campo: Climbiê F. Hall, Felipe F.A.V. Barberena, Jader O. Caetano, Rafael F. Almeida, Thiago V.S. Campacci e Túlio L. Laitano, durante as viagens de coleta.

Ao Dr. Jefferson Prado (IBt) pelas sugestões na tipificação no capítulo da sinopse taxonômica do clado.

Aos estagiários Fernanda Lo Schiavo e Leandro C.S. Ventura (NP-OE/IBt) e pesquisadores Dra. Andréa M. Corrêa (NP-OE/IBt) e Dr. Pedro Mercado-Ruaro (IB/UNAM) pela assistência e colaboração nos estudos citogenéticos.

Ao Departamento de Botânica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (IB/UNAM) pela infraestrutura e material disponíveis para a realização da extração, amplificação e sequenciamento do DNA. À Dra. Lidia I. Cabrera pela agradável convivência e assistência com o sequenciamento do DNA. Ao Eng. Eric Hágsater (Herbário AMO, Cidade do México) por fornecer material vegetal para esta tese. E à Sra. Gloria Ortiz Garcia pela hospedagem e disposição em contar histórias fantásticas da Cidade do México.

Aos estudantes do “Cubículo B-201” (IB/UNAM): Alejandra Martínez, Ana Gabriela Martínez, Claudia L. Montealegre, Coyolxauhqui Figueroa, Gabriela Cruz-Lustre, Héctor M. Huerta-Espinoza, Miguel Castañeda Zarate, Moisés Ávila e Thania Hernandez pela ajuda, bondade, debate nas discussões científicas, divertimento e estima. Aos MSc. Sergio E. Ramos-Castro e Dr. Eduardo A. Pérez Garcia do Departamento de Ecología y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias (UNAM) pelos ensinamentos e amizade. E à “mexileira” MSc. Aline Vale (UFMG) pela amizade, simpatia e recordações brasileiras no nosso estágio no México.

E um agradecimento especial a Gabriela Cruz-Lustre pelo inestimável e verdadeiro apreço, assistência, benevolência, companhia, convivência, fidelidade, lealdade, respeito e satisfação, por ensinar um pouco mais sobre a utilização e edição dos programas de análises filogenéticas, e pela leitura crítica e sugestões desta tese.

Muito obrigado e *muchas gracias!*

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	iv
APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO 1. Sistemática do clado <i>Stenorrhynchos</i> (Spiranthinae, Orchidaceae) baseada em análise filogenética molecular	8
CAPÍTULO 2. A taxonomic synopsis of the <i>Stenorrhynchos</i> clade (Spiranthinae, Orchidoideae, Orchidaceae)	29
CAPÍTULO 3. Chromosome studies in Spiranthinae and Cranichidinae (Orchidaceae)	69

RESUMO

A delimitação genérica da subtribo Spiranthinae tem sido objeto de controvérsias desde os sistemas de classificação mais antigos para Orchidaceae, porém só recentemente trabalhos baseados em relações filogenéticas têm esclarecido o posicionamento e os limites dos gêneros e grupamentos dentro da subtribo, em especial o trabalho de Salazar e colaboradores de 2003. Para as relações entre os gêneros, os dados das sequências nucleotídicas desse estudo permitiram identificar quatro clados principais em Spiranthinae: (a) o clado *Stenorrhynchos* s.s., (b) o clado formado pela maioria dos gêneros previamente atribuídos à “aliança *Pelexia*”; (c) o clado formado pelo par *Eurystyles* e *Lankesterella*; e (d) o clado formado por *Spiranthes* e outros gêneros na maior parte ou exclusivamente diversificados no limite norte dos Neotrópicos. O presente trabalho está dividido em três capítulos, sendo que no primeiro é apresentada a sistemática do clado *Stenorrhynchos* baseada em análise filogenética molecular dos marcadores nuclear (ITS) e plastidiais (*matK-trnK* e *trnL-F*), na qual foi possível detectar vários casos de gêneros não monofiléticos, como, por exemplo, *Pteroglossa*, *Skeptrostachys* e *Sacoila*. O capítulo 2 apresenta uma sinopse taxonômica do referido clado, em que são listados 10 gêneros e 64 espécies, além de serem exibidos dados sobre distribuição geográfica, notas taxonômicas e tipificações. O terceiro capítulo versa sobre estudos cromossômicos, e nele são apresentados números cromossômicos de dezoito espécies de Spiranthinae do Brasil e México e duas de Cranichidinae do Equador, sendo dezesseis deles inéditos.

ABSTRACT

The generic delimitation of the subtribe Spiranthinae has been controversial since the former classification systems for Orchidaceae, but only recently studies based on phylogenetic relationships have clarified the position and limits of genera and groups within the subtribe, in particular the work of Salazar and collaborators in 2003. Regarding the relationships among genera, the data of the nucleotide sequences of their study allowed the identification of four major clades in Spiranthinae: (a) the clade *Stenorrhynchos* s.s., (b) the clade formed by most of the genera previously assigned to the "*Pelexia* alliance"; (c) the clade formed by the pair *Eurystyles* and *Lankesterella*; and (d) the clade formed by *Spiranthes* and other genera mostly or exclusively diversified at the northern limit of the Neotropics. The present work is divided into three chapters, the first presents the systematics of the *Stenorrhynchos* clade based on molecular phylogenetics of nuclear (ITS) and plastid (*matK-trnK* and *trnL-F*) markers, in which several cases of non-monophyletic genera were detected, such as *Pteroglossa*, *Skeptrostachys* and *Sacoila*. Chapter 2 presents a taxonomic synopsis of the taxa belonging to the clade, in which 10 genera and 64 species are listed, as well as data on geographical distribution, taxonomic notes and typifications. The third chapter discusses chromosome numbers of eighteen species of Spiranthinae from Brazil and Mexico and two of Cranichidinae from Ecuador, being sixteen counts unpublished.

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Árvore de consenso estrito do clado *Stenorrhynchos* inferida por análise de máxima parcimônia de sequências de DNA nuclear (ITS) 24
- Figura 2.** Árvore de consenso estrito do clado *Stenorrhynchos* inferida por análise de máxima parcimônia de sequências de DNA plastidial (*matK-trnK*) 25
- Figura 3.** Árvore de consenso estrito do clado *Stenorrhynchos* inferida por análise de máxima parcimônia de sequências de DNA plastidial (*trnL-F*) 26
- Figura 4.** Árvore de consenso estrito do clado *Stenorrhynchos* inferida por análise de máxima parcimônia de sequências combinadas de DNA nuclear e plastidial (ITS + *matK-trnK* + *trnL-F*) 27
- Figura 5.** Árvore de consenso da análise bayesiana do clado *Stenorrhynchos* inferida por análise de sequências combinadas de DNA nuclear e plastidial (ITS + *matK-trnK* + *trnL-F*) 28

Capítulo 3

- Fig. 1** Chromosomes of species of Spiranthinae studied. **a** *Eltroplectris calcarata*, **b** *Eltroplectris triloba*, **c-d** *Mesadenella cuspidata* and **e** *Sauroglossum nitidum*..... 80
- Fig. 2** Ideograms of some species of Spiranthinae studied. **a** *Eltroplectris calcarata*, **b** *Eltroplectris triloba*, **c-d** *Mesadenella cuspidata* and **e** *Sauroglossum nitidum*..... 81
- Fig. 3** Chromosomes of species of Spiranthinae and Cranichidinae studied. **a** *Dichromanthus aurantiacus*, **b** *Sarcoglottis richardiana*, **c** *Sarcoglottis rosulata*, **d** *Sarcoglottis schaffneri*, **e** *Ponthieva andicola* and **f** *Ponthieva pilosissima*..... 82
- Fig. 4** Chromosomes of species of Spiranthinae studied. **a** *Aulosepalum riodelayense*, **b** *Aulosepalum tenuiflorum*, **c** *Cyclopogon luteoalbus*, **d** *Pelexia funckiana*, **e** *Sarcoglottis assurgens* and **f** *Sarcoglottis* cf. *grandiflora*..... 83
- Fig. 5** Chromosomes of species of Spiranthinae studied. **a** *Sarcoglottis sceptrodes*, **b** *Sarcoglottis scintillans*, **c** *Stenorrhynchos albidomaculatum* and **d** *Stenorrhynchos* cf. *speciosum*..... 84

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Táxons estudados, informação de <i>voucher</i> e acessos do GenBank.....	22
---	----

Capítulo 3

Table 1 List of species analysed of Spiranthinae and Cranichidinae with respective locality, vouchers and chromosome numbers ($2n$), previous counts and references.....	85
Table 2 Chromosome measures of <i>Mesadenella cuspidata</i>	87
Table 3 Chromosome measures of <i>Eltroplectris calcarata</i> , <i>E. triloba</i> and <i>Sauroglossum elatum</i> ...	88
Table 4 Karyological features of the species analysed.....	89

APRESENTAÇÃO

A família Orchidaceae

A família Orchidaceae é constituída por aproximadamente 25.000 espécies (Dressler 2005) distribuídas em 850 gêneros (Atwood 1986, Pridgeon *et al.* 1999, Chase *et al.* 2003). Tem distribuição cosmopolita, com exceção das regiões sempre cobertas por neve e desertos extremos, mas é mais abundante e diversificada em florestas tropicais e subtropicais úmidas. É caracterizada por incluir plantas herbáceas perenes, terrícolas ou, mais comumente, epífitas, e, morfológicamente, por possuir raízes com velame, flores trímeras, ovário ínfero, 1-(2-3) estames férteis, filete conerescido com o estilete formando um ginostêmio (coluna), pólen aglutinado em polínias, e fruto cápsula com grande número de sementes minúsculas.

Quanto à classificação, os sistemas mais recentes para Orchidaceae são aqueles propostos por Dressler (1993) e Pridgeon *et al.* (1999, 2001, 2003, 2005, 2009, 2014), este último também baseado em dados moleculares, propondo a divisão da família em cinco subfamílias: Apostasioideae, Vanilloideae, Cypripedioideae, Orchidoideae e Epidendroideae. Na subfamília Orchidoideae há seis tribos, sendo uma delas Cranichidinae, com seis subtribos: Cranichidinae, Galeottiellinae, Goodyerinae, Manniellinae, Pterostylidinae e Spiranthinae (Pridgeon *et al.* 2001, 2003).

A subtribo Spiranthinae

A subtribo Spiranthinae compreende cerca de 40 gêneros, quase exclusivamente restritos à região Neotropical, à exceção do gênero cosmopolita *Spiranthes* Rich. (Salazar 2003). Pode ser reconhecida pelas flores tubulares, margens do labelo aderentes aos lados da coluna, formando um nectário profundo, e pelas polínias macias e granuladas (Dressler 1993).

O primeiro sistema completo para as Spiranthinae foi esboçado na classificação de Orchidaceae publicada por Schlechter (1926), apresentada na forma de chaves dicotômicas. Nessa obra a subtribo Spiranthinae foi caracterizada pela antera dorsal, raízes fasciculadas e carnosas, folhas basais, e margens do labelo aderentes aos lados da coluna.

Dois revisões dos gêneros de Spiranthinae foram publicadas independentemente no início da década de 1980, por Garay (1980) e Balogh (1982); estas diferem no número de gêneros aceitos e na atribuição das espécies a esses gêneros. Garay (1980) reconheceu 44

gêneros em Spiranthinae, incluindo *Manniella*, posicionado por Schlechter (1926) em uma subtribo própria (Manniellinae), além de *Nothostele* e *Pseudocranichis*, transferidos subsequentemente para Cranichidinae e Prescottiinae, respectivamente (Dressler 1993, Szlachetko 1995). Garay (1980) não reconheceu grupos infragenéricos na subtribo. Por outro lado, Balogh (1982) aceitou apenas 17 gêneros em cinco alianças, e considerou cinco deles como isolados e não atribuíveis a nenhuma dessas alianças.

Szlachetko (1995) subdividiu Spiranthinae em três subtribos (Spiranthinae *sensu stricto*, Stenorrhynchidinae e Cyclopogoninae) baseado nas diferenças da estrutura do rostelo e viscido, referindo esses três grupos como “subclados”, porém não forneceu nenhuma indicação clara sobre quais características distinguem cada um deles. Esse autor apenas alegou que as diferenças entre essas subtribos estreitamente delimitadas são, por exemplo, maiores do que aquelas entre Spiranthinae e Prescottiinae.

Estudos filogenéticos em Spiranthinae e o clado *Stenorrhynchos*

Das classificações citadas anteriormente, nenhuma delas foi baseada em hipóteses explícitas de relações filogenéticas de subtribos ou gêneros. Dressler (1993) apresentou um diagrama filogenético da tribo Cranichideae (à qual pertence a subtribo Spiranthinae), com base nas características morfológicas, porém não incluiu as subtribos Manniellinae e Pachyplectroninae, e encontrou poucas características suportando as relações sugeridas. Outros estudos visando explorar as relações filogenéticas dos gêneros ou grupos de gêneros, como, por exemplo, a “aliança *Pelexia*” (Burns-Balogh & Robinson 1983) ou Prescottiinae (Vargas 1997), contaram com um pequeno número de caracteres provenientes da morfologia floral, que é homogênea e relativamente simples no grupo.

A primeira avaliação filogenética dos limites dos gêneros e subtribos de Spiranthinae, baseada em dados de sequências nucleotídicas de cinco regiões do DNA do núcleo e do plastídio, foi publicada por Salazar *et al.* (2003) e mostrou alguns padrões definidos. Os dados indicaram que *Galeottiella* não pertence às Spiranthinae, sendo grupo-irmão de um clado bem suportado, no qual a subtribo Manniellinae é grupo-irmão de um grupo monofilético formado por Prescottiinae, Cranichidinae e Spiranthinae. Com a exclusão do gênero *Galeottiella*, Spiranthinae (*sensu* Dressler 1993) torna-se monofilética e bem suportada por alta porcentagem de *bootstrap*. Os limites entre Cranichidinae e Prescottiinae não são claramente resolvidos, e poderá haver alguns rearranjos taxonômicos nessas subtribos, mas tais mudanças provavelmente não afetarão o *status* de Spiranthinae (Salazar *et al.* 2003).

Para as relações entre os gêneros, os dados das sequências nucleotídicas de Salazar *et al.* (2003) permitiram identificar quatro clados principais em Spiranthinae: (a) o clado *Stenorrhynchos s.s.* e outros gêneros tradicionalmente considerados estreitamente relacionados a ele ou combinados com ele, que são *Eltroplectris*, *Mesadenella*, *Pteroglossa* e *Sacoila*; (b) o clado formado pela maioria dos gêneros previamente atribuídos à “aliança *Pelexia*” (*sensu* Burns-Balogh & Robinson 1983) junto com a subtribo Cyclopogoninae (*sensu* Szlachetko 1995), incluindo *Cyclopogon s.l.*, *Pelexia*, *Sarcoglottis* e *Veyretia*, mais *Odontorrhynchus* e *Coccineorchis*; (c) o clado formado pelo par *Eurystyles* e *Lankesterella*; e (d) o clado formado por *Spiranthes* e outros gêneros na maior parte ou exclusivamente diversificados no limite norte dos Neotrópicos, como, por exemplo, *Aulosepalum*, *Beloglottis*, *Deiregyne*, *Dichromanthus*, *Funkiella*, *Mesadenus*, *Microthelys* e *Svenkoeltzia*. Os gêneros pertencentes a cada clado correspondem àqueles que constituem o tratamento de Spiranthinae proposto por Salazar (2003).

Embora existam, ainda, alguns gêneros ausentes nas análises moleculares, principalmente vários gêneros monoespecíficos com distribuição geográfica restrita, esses quatro clados são estáveis e bem suportados por altas porcentagens de *bootstrap* (Salazar *et al.* 2003).

Górniak *et al.* (2006) publicaram uma análise filogenética molecular de Spiranthinae, baseada em sequências de DNA ribossomal nuclear ITS, na qual demonstram que as subtribos Spiranthinae e Stenorrhynchidinae (*sensu* Szlachetko 1995) são polifiléticas, o que é congruente com o trabalho de Salazar *et al.* (2003). Recentemente, Batista *et al.* (2011) estudaram filogeneticamente o gênero *Nothostele* Garay e os resultados mostraram que ele é grupo-irmão do gênero *Eltroplectris* Raf., dentro do clado *Stenorrhynchos*. Por outro lado, Borba *et al.* (2014) mostraram que o gênero *Cotylolabium* Garay, originalmente incorporado dentro do clado *Stenorrhynchos*, é grupo-irmão do restante da subtribo Spiranthinae.

Diante do exposto, a fim de estimar as relações filogenéticas e estabelecer os limites dos gêneros dentro do clado *Stenorrhynchos*, uma análise filogenética do grupo é apresentada no Capítulo 1 desta tese de doutorado. O segundo capítulo fornece uma sinopse taxonômica das espécies pertencentes a este clado.

Citotaxonomia em Spiranthinae

A citotaxonomia é o estudo das características estruturais e numéricas dos cromossomos (Stace 1989). Dos parâmetros citotaxonômicos, o número cromossômico é o mais amplamente

conhecido para muitos táxons e, portanto, o mais utilizado como subsídio a estudos taxonômicos e evolutivos.

Para um melhor conhecimento das espécies vegetais e para subsidiar a análise do posicionamento taxonômico destas nos respectivos táxons, estudos biosistemáticos envolvendo observações de campo, juntamente com análises laboratoriais com diferentes enfoques, como, por exemplo, de compostos químicos, estruturas anatômicas, palinológicas ou de cromossomos das espécies, são essenciais e importantes (Stace 1989). A variação no número cromossômico é muito útil na verificação da integridade de uma espécie ou no reconhecimento de espécies distintas a partir de um grupo com grande variabilidade morfológica, fisiológica ou de distribuição geográfica (Pierozzi & Mendaçolli 1997, Bortoleti *et al.* 2002).

Apesar de investigações citogenéticas sobre a família Orchidaceae já estarem sendo realizadas desde há muitos anos, menos de 1% de suas espécies são conhecidas quanto ao número cromossômico, com informações em número ainda menor para seus ideogramas. E, ainda assim, os estudos disponíveis contemplam, de maneira preferencial, apenas os gêneros economicamente importantes.

Existem poucos trabalhos sobre a citotaxonomia da subtribo Spiranthinae, e estes se concentram especialmente no gênero *Spiranthes* (Vij & Vohra 1974, Tanaka & Kamemoto 1984, Sheviak 1982, Martínez 1985). Para as espécies neotropicais, as mais importantes contribuições foram feitas por Martínez (1981, 1985), Felix & Guerra (2005), Daviña *et al.* (2009) e Grabiele *et al.* (2010, 2013).

Inicialmente estava planejada a apresentação dos dados citotaxonômicos das espécies pertencentes ao clado *Stenorrhynchos*, e posterior análise dos números cromossômicos frente às árvores filogenéticas obtidas. Entretanto, devido à dificuldade, para algumas espécies, de obter raízes propícias para os procedimentos necessários à contagem cromossômica, optou-se por apresentar dados de outros táxons das subtribos Spiranthinae e Cranichidinae, para os quais foi possível a obtenção de raízes adequadas. No terceiro capítulo desta tese serão apresentados números cromossômicos de dezoito espécies de Spiranthinae do Brasil e do México e duas de Cranichidinae do Equador, sendo dezesseis deles inéditos.

Literatura citada

Atwood, J.T. 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9: 171-186.

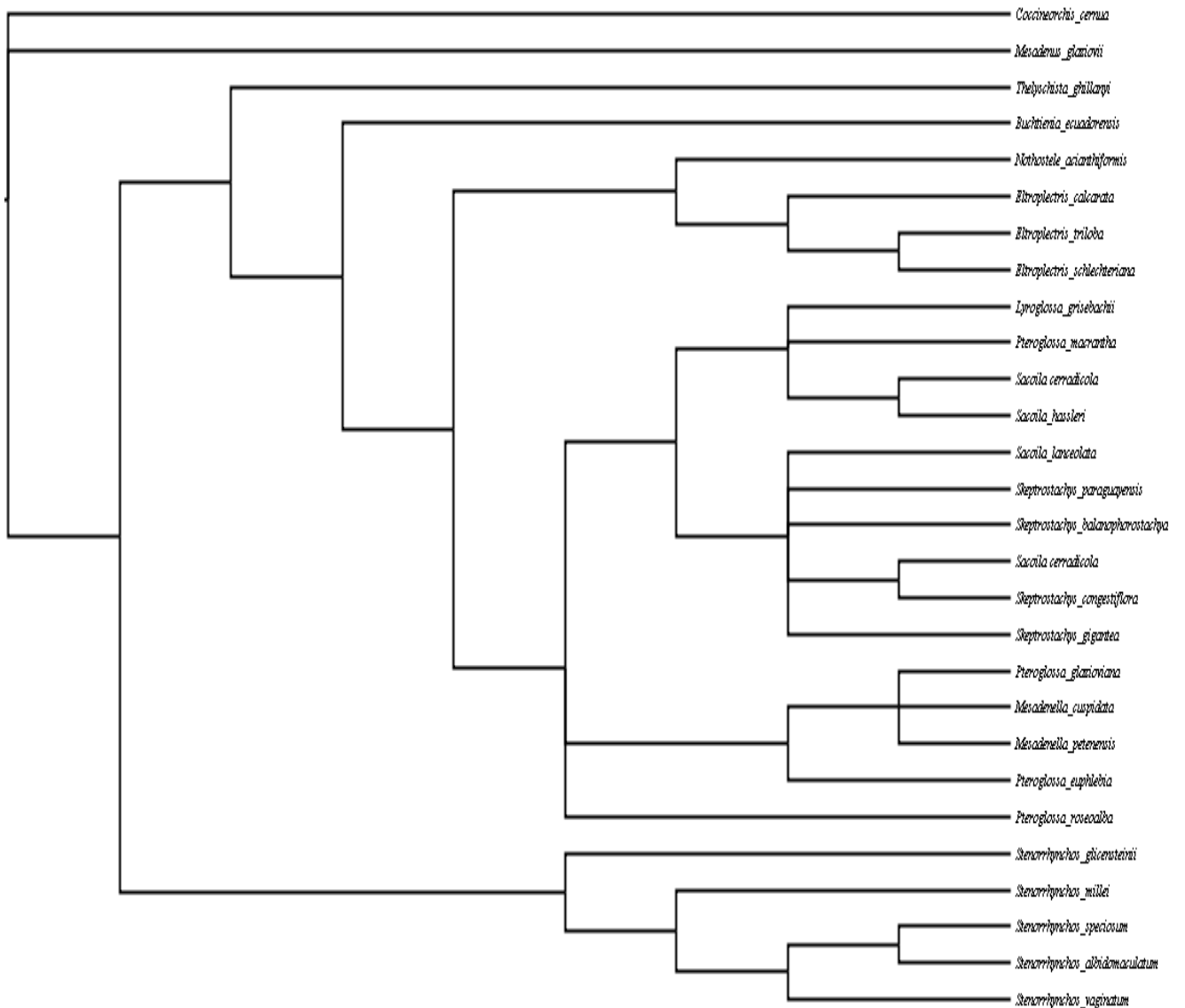
- Balogh, P.** 1982. Generic redefinition in subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 69: 1119-1132.
- Borba, E.L., Salazar, G.A., Mazzoni-Viveiros, S. & Batista, J.A.N.** 2014. Phylogenetic position and floral morphology of the Brazilian endemic, monospecific genus *Cotylolabium*: a sister group for the remaining Spiranthinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 175: 29-46.
- Bortoleti, K.C.A., Benko-Iseppon, C.A.M. & Gitaí, J.** 2002. Variabilidade citogenética intra e interpopulacional em *Genipa americana* L. detectada com os Fluorocromos CMA e DAPI. *In: Anais do 53º Congresso Nacional de Botânica*. Recife, PE.
- Burns-Balogh, P. & Robinson, H.** 1983. Evolution and phylogeny of the *Pelexia* alliance (Orchidaceae: Spiranthoideae: Spiranthinae). *Systematic Botany* 8: 263-268.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.S. & Freudstein, J.V.** 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. *In: K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett & P.J. Cribb (eds.). Orchid Conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, pp. 69-89.
- Daviña, J.R., Grabiele, M., Cerutti, J.C., Hojsgaard, D.H., Almada, R.D., Insaurrealde, I.S. & Honfi, A.I.** 2009. Chromosomes studies in Orchidaceae from Argentina. *Genetics and Molecular Biology* 32: 811-821.
- Dressler, R.L.** 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland.
- Dressler, R.L.** 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158.
- Felix, L.P. & Guerra, M.** 2005. Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. *Plant Systematics and Evolution* 254: 131-148.
- Garay, L.A.** 1980. A generic revision of the Spiranthinae. *Botanical Museum Leaflets* 28: 278-425.
- Górniak, M., Mytnik-Ejsmont, J., Rutkowski, P., Tukałło, P., Minasiewicz, J. & Szlachetko, D.L.** 2006. Phylogenetic relationships within the subtribe Spiranthinae *s.l.* (Orchidaceae) inferred from the nuclear ITS region. *Biodiversity Research and Conservation* 1-2: 18-24.
- Grabiele, M., Honfi, A.I., Cerutti, J.C., Fernandez, V., Franco, D. & Daviña, J.R.** 2010. Cytogenetic analysis in the terrestrial orchid *Sacoila argentina* (Griseb.) Garay from Paraguay. *Botanical Studies* 51: 337-342.

- Grabiele, M., Cerutti, J.C., Hojsgaard, D.H., Almada, R.D., Daviña, J.R. & Honfi, A.I.** 2013. Comparative cytogenetics in *Cyclopogon* (Orchidaceae). *Biologia (Bratislava)* 68: 48-54.
- Martínez, A.J.** 1981. Notas citotaxonómicas sobre el género *Cyclopogon* Presl. *Parodiana* 1: 139-148.
- Martínez, A.J.** 1985. The chromosomes of orchids VIII. Spiranthinae and Cranichidinae. *Kew Bulletin* 40: 139-147.
- Pierozzi, N.I. & Mendaçoli, S.L.J.** 1997. Karyotype and C-Band analysis in two species of *Genipa* L. (Rubiaceae, Gardenieae tribe). *Cytologia* 62: 81-90.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 1999. *Genera Orchidacearum*, v. 1: General Introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae. Oxford University Press, Oxford.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 2001. *Genera Orchidacearum*, v. 2: Orchidoideae (part 1). Oxford University Press, Oxford.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 2003. *Genera Orchidacearum*, v. 3: Orchidoideae (part 2), Vanilloideae. Oxford University Press, Oxford.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 2005. *Genera Orchidacearum*, v. 4: Epidendroideae (part one). Oxford University Press, Oxford.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 2009. *Genera Orchidacearum*, v. 5: Epidendroideae (part two). Oxford University Press, Oxford.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 2014. *Genera Orchidacearum*, v. 6: Epidendroideae (part three). Oxford University Press, Oxford.
- Salazar, G.A.** 2003. Subtribe Spiranthinae. *In*: A.M. Pridgeon, P.J. Cribb, M.W. Chase & F.N. Rasmussen (eds.). *Genera Orchidacearum*, v. 3: Orchidoideae (part 2), Vanilloideae. Oxford University Press, Oxford, pp. 164-168.
- Salazar, G.A., Chase, M.W., Soto Arenas, M.A. & Ingrouille, M.** 2003. Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 90: 777-795.
- Schlechter, R.** 1926. Das System der Orchidaceen. *Notizblatt des Botanischen Gartens und Museums zu Berlin-Dahlem* 9: 563-591.
- Sheviak, C.J.** 1982. Biosystematic study of the *Spiranthes cernua* complex. *Bulletin of the New York State Museum*. No. 48. The State Education Department, Albany, NY.

- Stace, C.A.** 1989. *Plant Taxonomy and Biosystematics*. 2nd ed. Cambridge University Press, New York.
- Szlachetko, D.L.** 1995. *Systema Orchidaliu. Fragmenta Floristica et Geobotanica Supplement 3*: 1-152.
- Tanaka, R. & Kamemoto, H.** 1984. Chromosomes in orchids: counting and numbers. *In*: J. Arditti (ed.). *Orchid biology: reviews and perspectives III*. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp. 323-410.
- Vargas, C.A.** 1997. Phylogenetic analysis of Cranichideae and Prescottiinae (Orchidaceae), with some taxonomic changes in Prescottiinae. M.Sc. Thesis. University of Missouri, St. Louis.
- Vij, S.P. & Vohra, N.** 1974. Cytomorphological studies in the genus *Spiranthes* Rich. *Cytologia* 39: 139-143.

Capítulo 1

Sistemática do clado *Stenorrhynchos* (Spiranthinae, Orchidaceae) baseada em análise filogenética molecular



Sistemática do clado *Stenorrhynchos* (Spiranthinae, Orchidaceae) baseada em análise filogenética molecular

Leonardo Ramos Seixas Guimarães^{1,3}, Gerardo A. Salazar² e Fábio de Barros¹

ABSTRACT – This study aimed to infer the phylogenetic relationships and elucidate the limits of the genera within the *Stenorrhynchos* clade through nuclear (ITS) and plastid (*matK-trnK* and *trnL-F*) markers. The *Stenorrhynchos* clade is monophyletic with weak support being *Thelyphschista ghillanyi* the sister group of the rest of the clade. Relationships within the clade are not fully resolved. *Pteroglossa*, *Sacoila* and *Skeprostachys* are polyphyletic. The genus *Stenorrhynchos* is monophyletic and the name *Stenorrhynchos millei* may be accepted for a species separate from *S. speciosum*. The lack of resolution in several parts of the phylogenetic trees suggests the need to incorporate more characters in order to achieve a clearer picture of the limits and relationships of the genera involved.

Keywords: ITS, *matK-trnK*, taxonomy, *trnL-F*

RESUMO – Este estudo teve como objetivo inferir as relações filogenéticas e elucidar os limites dos gêneros dentro do clado *Stenorrhynchos*, através de marcadores nuclear (ITS) e plastidiais (*matK-trnK* e *trnL-F*). O clado *Stenorrhynchos* é monofilético com um suporte fraco, sendo *Thelyphschista ghillanyi* o grupo-irmão do restante do clado. As relações internas do clado não estão completamente resolvidas. *Pteroglossa*, *Sacoila* e *Skeprostachys* são polifiléticos. O gênero *Stenorrhynchos* é monofilético e o nome *Stenorrhynchos millei* poderá ser aceito para uma espécie separada de *S. speciosum*. A carência de resolução em várias partes das árvores filogenéticas sugere a necessidade de incorporar mais caracteres para atingir uma imagem mais clara dos limites e das relações dos gêneros envolvidos.

Palavras-chaves: ITS, *matK-trnK*, taxonomia, *trnL-F*

1. Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado, Av. Miguel Stéfano, 3687, 04045-972, São Paulo, SP, Brasil

2. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Departamento de Botánica, Apartado Postal 70-367, 04510, Ciudad de México, D.F., México

3. Autor para correspondência: leo.rsguimaraes@hotmail.com

Introdução

A subtribo *Spiranthinae* Lindl. compreende cerca de 40 gêneros e 470 espécies quase exclusivamente restrita aos Neotrópicos, exceto o gênero cosmopolita *Spiranthes* Rich. (Garay 1982, Salazar 2003). Historicamente, a classificação da subtribo tem sido controversa e contrastante. Duas revisões dos gêneros da subtribo foram publicadas quase simultaneamente na década de 1980, diferenciando no número e abrangência dos gêneros aceitos (Balogh 1982, Garay 1982). Szlachetko (1995) dividiu *Spiranthinae* em três subtribos (*Spiranthinae sensu stricto*, *Cyclopogoninae* e *Stenorrhynchidinae*), referindo-se a estes grupos como “subclados”, porém não forneceu uma clara indicação sobre quais caracteres distinguem cada uma delas.

A primeira avaliação filogenética dos limites dos gêneros de *Spiranthinae*, baseada em dados de sequências nucleotídicas plastidiais (*rbcL*, *matK*, *trnL-F*) e nuclear (ITS), foi publicada por Salazar *et al.* (2003) e nela foram identificados quatro clados principais na subtribo: (i) o clado *Stenorrhynchos s.s.*, incluindo outros gêneros tradicionalmente considerados estreitamente relacionados a este (*Eltroplectris*, *Mesadenella*, *Pteroglossa* e *Sacoila*); (ii) o clado formado pela maioria dos gêneros previamente atribuídos à “aliança *Pelexia*” (Burns-Balogh & Robinson 1983) e à subtribo *Cyclopogoninae* (Szlachetko 1995), *i.e.* *Cyclopogon s.l.*, *Pelexia*, *Sarcoglottis* e *Veyretia*, mais *Odontorrhynchus* e *Coccineorchis*; (iii) o clado formado pelo par *Eurystyles* e *Lankesterella*; e (iv) o clado formado por *Spiranthes* e demais gêneros principalmente ou exclusivamente diversificados no limite norte dos Neotrópicos, como *p.ex.* *Aulosepalum*, *Deiregyne*, *Dichromanthus*, *Funkiella*, *Mesadenus* e *Microthelys*. Os gêneros pertencentes a cada clado correspondem àqueles que constituem o tratamento de *Spiranthinae* proposto por Salazar (2003). Górnaiak *et al.* (2006) publicaram uma análise filogenética de *Spiranthinae*, baseada em ITS ribossomal nuclear, a qual demonstra que as subtribos *Spiranthinae* e *Stenorrhynchidinae* (*sensu* Szlachetko 1995) são polifiléticas, sendo congruente com o trabalho de Salazar *et al.* (2003). Recentemente, Batista *et al.* (2011) estudaram filogeneticamente o gênero *Nothostele* Garay e os seus resultados mostraram que ele é grupo-irmão do gênero *Eltroplectris* Raf., dentro do clado *Stenorrhynchos*. Por outro lado, Borba *et al.* (2014) demonstraram que o gênero *Cotylolabium* Garay, originalmente considerado como parte do clado *Stenorrhynchos*, é o grupo-irmão do restante da subtribo *Spiranthinae*.

No clado *Stenorrhynchos*, a delimitação dos gêneros é controversa e muitos artigos taxonômicos tem sido publicado nas últimas três décadas propondo novos gêneros ou novas combinações (Balogh 1982, Burns-Balogh 1986, Burns-Balogh & Robinson 1983, Szlachetko

1992, 1993, 1994a, b, Szlachetko & González-Tamayo 1996, Szlachetko *et al.* 2001, Szlachetko & Rutkowski 2008). Entretanto, estes trabalhos são baseados em uma ponderação intuitiva de uns poucos caracteres morfológicos florais e carecem de uma hipótese filogenética explícita.

Nas recentes propostas filogenéticas para a subtribo *Spiranthinae* (Salazar *et al.* 2003, Górnjak *et al.* 2006), poucos representantes da flora brasileira foram amostrados; havendo, inclusive, gêneros inteiros ausentes nas análises moleculares, especialmente gêneros monoespecíficos com distribuição geográfica restrita, como, por exemplo, *Thelyphichia* Garay, endêmico do Brasil (Barros *et al.* 2014).

Com o objetivo de inferir as relações filogenéticas e elucidar os limites dos gêneros dentro do clado *Stenorrhynchos*, é apresentada aqui uma análise filogenética de sequências nucleotídicas de três regiões do DNA: nuclear e plastidial. A região nuclear inclui ITS1, o gene 5.8S e ITS2, a região plastidial compreende *matK-trnK* e *trnL-trnF*, além de serem realizadas análises combinadas entre elas. Estas regiões tiveram sucesso, isoladamente ou em combinação com outra ou outras regiões do DNA, em resolver relações filogenéticas intra- e intergênicas em *Spiranthinae* (Salazar *et al.* 2003, Górnjak *et al.* 2006, Figueroa *et al.* 2008, Salazar & Ballesteros-Barrera 2010, Batista *et al.* 2011, Salazar *et al.* 2011) e outras linhagens da subfamília *Orchidoideae* (Bellstedt *et al.* 2001, Kores *et al.* 2001, Clements *et al.* 2002; Bateman *et al.* 2003, Álvarez-Molina & Cameron 2009, Salazar *et al.* 2009).

Material e métodos

Amostragem dos táxons – Vinte e seis espécies representando 10 gêneros do clado *Stenorrhynchos* foram incluídas neste estudo. As espécies *Coccineorchis cernua* (Lindl.) Garay e *Mesadenus glaziovii* Schltr. foram usadas como grupo-externo com base em estudos filogenéticos moleculares prévios (Salazar *et al.* 2003, 2009). Uma lista dos táxons estudados com informação dos *vouchers* e acessos do GenBank é fornecido na Tabela 1. A matriz alinhada está disponível mediante pedido ao autor para correspondência.

Extração, amplificação e sequenciamento do DNA – O DNA genômico foi extraído do tecido vegetal fresco ou seco em sílica-gel usando um protocolo de 2× brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) baseado em Doyle & Doyle (1987), o qual foi modificado pela adição de 2% de polivinilpirrolidona (PVP) à solução tampão de extração. A amplificação (PCR) foi realizada utilizando um kit comercial (*Taq* PCRCore Kit, Qiagen Crawley, West Sussex, UK) seguindo os protocolos do fabricante, mas adicionando à mistura de reação 0,5 µL de uma solução aquosa

a 0,4% de albumina de soro bovino (BSA) para neutralizar inibidores potenciais (Kreader 1996) e, no caso de nrITS, 0,5 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a fim de reduzir problemas associados com a estrutura secundária do DNA. Os perfis de PCR foram os mesmos de Salazar *et al.* (2003). As leituras das sequências bidirecionais foram obtidas para ambas as regiões do DNA e os cromatogramas foram editados e montados com Sequencher versão 5.1 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, EUA). Para uma descrição detalhada dos protocolos de sequenciamento e amplificação do DNA utilizada aqui, ver Salazar *et al.* (2003).

Edição do alinhamento e análises filogenéticas – Para cada marcador, o alinhamento foi realizado de maneira independente utilizando o MAFFT versão 7 (Kato & Standley 2013), e editado manualmente através de inspeção visual no programa Mesquite versão 2.75 (Maddison & Maddison 2011), tentando maximizar a similaridade das sequências (Simmons 2004). Nenhum dado foi excluído da análise e as posições de *gaps* individuais foram tratadas como dados ausentes.

As análises de parcimônia foram conduzidas no programa PAUP* versão 4.02b (Swofford 2002) e consistiram de uma busca heurística com 1000 réplicas de adição aleatória de sequências para as árvores iniciais; troca de ramos usando o algoritmo de bissecção-reconexão de árvore (TBR: *tree bisection-reconnection*) e a opção ‘MULTREES’ selecionada, salvando todas as árvores mais parcimoniosas (MPTs: *most parsimonious trees*) encontradas. Todos os caracteres estiveram não ordenados e receberam o mesmo peso (parcimônia de Fitch; Fitch 1971). O suporte interno dos clados foi avaliado pelas 1000 réplicas de *bootstrap* (Felsenstein 1985), com buscas heurísticas consistindo de sequências aleatórias de adições de táxon e troca de ramos TBR, salvando até 20 MPTs por réplica heurística para reduzir o tempo gasto em troca nas grandes ilhas de árvores (Maddison 1991). Arbitrariamente, foram considerados os seguintes intervalos de porcentagens de *bootstrap* (BP): 51%-70% - como suporte fraco, 71%-84% - como suporte moderado, e 85%-100% como suporte forte.

Uma análise filogenética da matriz combinada baseada em modelo foi também realizada usando inferência bayesiana conforme implementada no MrBayes versão 3.1.2 (Ronquist *et al.* 2005). O modelo de evolução molecular escolhido para todos os conjuntos de dados de sequências, de acordo com o critério de informação de Akaike (Akaike 1974) utilizando o programa Modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998), foi GTR+I+GAMMA. Duas análises simultâneas, cada uma consistindo de quatro cadeias de Markov, foram executadas para 10.000.000 gerações, amostrando árvores a cada 1000 gerações. As primeiras 2.500.000 gerações de cada corrida foram descartadas como ‘*burn-in*’ e as árvores remanescentes de

ambas as análises foram agrupadas para a construção de uma árvore de consenso de maioria. Probabilidades posteriores (PP) de 0.95-1.00 foram consideradas como suporte forte, 0.90-0.94 como suporte moderado e < 0.90 como suporte fraco.

Resultados

Resultados da análise de ITS – A matriz alinhada de ITS compreendeu 665 caracteres, dos quais 529 (79,5%) são constantes e 64 (9,6%) potencialmente informativos para a parcimônia. A análise de parcimônia encontrou 54 MPTs com um comprimento de 210 passos, CI (excluindo caracteres não informativos) de 0,55 e RI de 0,73. A árvore de consenso estrito das 54 MPTs, na qual os suportes das análises de *bootstrap* são indicados, é mostrada na figura 1.

As relações dentro do clado *Stenorrhynchos* não foram completamente resolvidas. *Pteroglossa rosealba* (Rchb.f.) Salazar & M.W.Chase, *Thelyschista ghillanyi* (Pabst) Garay, *Buchtienia ecuadorensis* Garay, *Stenorrhynchos glicensteinii* Christenson e *Stenorrhynchos millei* Schltr. formam uma politomia com *Stenorrhynchos sensu stricto* e um clado fracamente suportado que inclui o restante das espécies (BP 59). Os gêneros *Pteroglossa* Schltr., *Skeptrostachys* Garay e *Sacoila* Raf. são polifiléticos. Isto é particularmente notável em *Pteroglossa*, no qual as espécies ocorrem em três distintas localizações na árvore. *Pteroglossa euphlexia* (Rchb.f.) Garay e *P. glazioviana* (Cogn.) Garay agrupam-se com as espécies do gênero *Mesadenella* Pabst & Garay (BP 98); *P. macrantha* (Rchb.f.) Schltr. é grupo-irmão de *Lyroglossa grisebachii* (Cogn.) Schltr. (BP 57); e *P. rosealba* está em uma posição isolada do restante do clado.

O gênero *Nothostele* Garay forma uma politomia com *Eltroplectris* Raf. e com o clado formado pelo gênero *Mesadenella*, juntamente com *P. euphlexia* e *P. glazioviana*. Nas outras análises, *Nothostele* agrupa-se com *Eltroplectris* corroborando os resultados de Batista *et al.* (2011).

Resultados da análise de *matK-trnK* – A matriz alinhada das sequências de *matK-trnK* é composta por 2007 caracteres, sendo 1817 (90,5%) constantes e 68 (3,3%) parcimoniosamente informativos. A análise de parcimônia encontrou 50 MPTs com um comprimento de 259 passos, CI (excluindo caracteres não informativos) de 0,79 e RI de 0,76. A árvore de consenso estrito das 50 MPTs, na qual os suportes das análises de *bootstrap* são indicados, é mostrada na figura 2.

Novamente, as relações dentro do clado *Stenorrhynchos* não estão totalmente resolvidas. *Mesadenus glaziovii*, *Thelyschista ghillanyi* e *Buchtienia ecuadorensis* formam uma politomia na base do clado. *Stenorrhynchos* é monofilético com um suporte fraco (BP 67). *Nothostele* é grupo-irmão de *Eltroplectris* (BP 57). Os gêneros *Pteroglossa*, *Skeprostachys* e *Sacoila* são polifiléticos. Assim como na análise de ITS, as espécies de *Pteroglossa* ocorrem em três diferentes localizações na árvore de *matK-trnK*. *Pteroglossa glazioviana* agrupa-se com *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay (BP 56), enquanto *P. roseoalba* e *P. macrantha* formam uma politomia com *Lyroglossa grisebachii* e *Mesadenella petenensis* (L.O. Williams) Garay.

Resultados da análise de *trnL-F* – A matriz resultante do sequenciamento da região *trnL-F* é composta por 1215 caracteres, dos quais 1069 (87,9%) são constantes e 42 (3,5%) potencialmente informativos para a parcimônia. A análise de parcimônia encontrou 1916 MPTs com um comprimento de 189 passos, CI (excluindo caracteres não informativos) de 0,59 e RI de 0,77. A árvore de consenso estrito das 1916 MPTs, na qual os suportes das análises de *bootstrap* são indicados, é mostrada na figura 3.

Mais uma vez não estão solucionadas as relações filogenéticas dentro do clado *Stenorrhynchos*. Assim como na análise de *matK-trnK*, *M. glaziovii*, *T. ghillanyi* e *B. ecuadorensis* formam uma politomia basal no clado. Os gêneros *Pteroglossa*, *Sacoila* e *Skeprostachys* são polifiléticos. *Stenorrhynchos* é monofilético com um suporte moderado (BP 84). *Nothostele* agrupa-se com *Eltroplectris* em um clado com forte suporte (BP 86). Novamente, é digno de nota o fato de as espécies de *Pteroglossa* estarem em variadas localizações na árvore. *Pteroglossa macrantha* forma uma politomia com *Sacoila cerradicola* Meneguzzo e *Sacoila hassleri* (Cogn.) Garay em um clado fracamente suportado (BP 53); *P. glazioviana* e *P. euphlexia* são espécies irmãs em um clado altamente suportado (BP 96); e *L. grisebachii*, *P. roseoalba*, *M. cuspidata*, *M. petenensis*, *Sacoila lanceolata* (Aubl.) Garay e *Skeprostachys balanophorostachya* (Rchb.f & Warm.) Garay agrupam-se em uma politomia.

Resultados das análises combinadas das regiões nuclear e plastidiais – A matriz alinhada combinada das regiões de DNA nuclear e plastidial é composta por 3888 caracteres, sendo 3415 (87,8%) constantes e 172 (4,4%) potencialmente informativos para a parcimônia. A análise de parcimônia encontrou 56 MPTs com um comprimento de 669 passos, CI (excluindo caracteres não informativos) de 0,56 e RI de 0,73. A árvore de consenso estrito das 56 MPTs, na qual os suportes das análises de *bootstrap* são indicados, é mostrada na figura 4.

O clado *Stenorrhynchos* é monofilético, porém obteve um suporte fraco (BP 66). *Thelyschista ghillanyi* é o grupo-irmão, fracamente suportado (BP 53), dos demais gêneros do clado, exceto *Stenorrhynchos*. O gênero *Eltroplectris* é monofilético e altamente suportado (BP 92), sendo grupo-irmão de *Nothosteale acianthiformis* (Rchb.f. & Warm.) Garay, também com alto suporte (BP 97). *Stenorrhynchos* é monofilético e altamente suportado (BP 93). Os gêneros *Pteroglossa*, *Sacoila* e *Skeptrostachys* são polifiléticos. *Pteroglossa euphlebia* e *P. glazioviana* agrupam-se com as espécies do gênero *Mesadenella* (BP 98), e *P. roseoalba* está em uma posição isolada das outras espécies do gênero. *Sacoila hassleri* é grupo-irmão de *Sacoila cerradicola* (BP 99), e este clado forma uma politomia com *P. macrantha* e *Lyroglossa grisebachii*. *Sacoila lanceolata* está inserida com as demais espécies de *Skeptrostachys* (BP 98).

A árvore de análise bayesiana é topologicamente similar à árvore de consenso estrito da análise combinada de parcimônia, diferindo, por exemplo, na separação entre *Lyroglossa grisebachii* e *Pteroglossa macrantha*, pois esta última forma um clado fracamente suportado (PP 0.72) com *Sacoila hassleri* e *Sacoila cerradicola* (figura 5), tendo *L. grisebachii* como grupo-irmão. O clado *Stenorrhynchos* é monofilético, porém recebeu um suporte fraco (PP 0.55). No geral, os padrões de resolução suportados foram semelhantes nas análises bayesiana e de máxima parcimônia combinada, e as relações intergenéricas dentro do clado foram idênticas em ambas as instâncias (figuras 4, 5).

Discussão

Os resultados aqui apresentados concordam, em geral, com as análises filogenéticas moleculares prévias da subtribo *Spiranthinae* (e.g. Salazar *et al.* 2003, 2011, Salazar & Ballesteros-Barrera 2010, Batista *et al.* 2011). Entretanto, o presente estudo, o qual inclui uma amostragem mais ampla dos táxons do clado *Stenorrhynchos* em relação às análises anteriores, permite detectar vários casos de gêneros não monofiléticos, como, por exemplo, *Pteroglossa*, *Skeptrostachys* e *Sacoila*. Em respeito ao polifiletismo de *Pteroglossa*, Szlachetko em Szlachetko & Rutkowski (2008) segregou *Pteroglossa roseoalba* em um novo gênero denominado *Callistanthos* Szlach., baseado nas folhas rosuladas e subsésseis e no labelo constricto. De acordo com os resultados aqui obtidos, uma vez que esta espécie não se agrupa com a espécie-tipo de *Pteroglossa* [*P. macrantha* (Rchb.f.) Schltr.], o táxon *Callistanthos roseoalbus* (Rchb.f.) Szlach. pode tornar-se um nome aceito, ao passo que *P. glazioviana* e *P.*

euphlebia poderiam ser acomodadas em um conceito mais amplo de *Mesadenella*, que é ainda suportado por pelo menos um caráter morfológico compartilhado, o labelo unguiculado.

Sacoila e *Skeptrostachys* são gêneros taxonomicamente problemáticos e é digno de nota que as análises identificaram dois clados separados que incluem membros de ambos os gêneros (figuras 1-5). Por um lado, *Sacoila hassleri* (Cogn.) Garay aparece como grupo-irmão de *Sacoila cerradicola* Meneguzzo, com um suporte alto (BP 99, PP 1.00; figuras 4, 5), e estes dois, por sua vez, estão inseridos em um clado que inclui *Pteroglossa macrantha* e *Lyroglossa grisebachii* (ambos sendo as espécies-tipo dos seus respectivos gêneros), clado esse altamente suportado (BP 88, PP 1.00; figuras 4, 5). Já *Sacoila lanceolata* (Aubl.) Garay, é grupo-irmão de *Skeptrostachys paraguayensis* (Rchb.f.) Garay (BP 63, PP 0.67; figuras 4, 5) e está inserida em um clado com as remanescentes espécies analisadas de *Skeptrostachys* (BP 98, PP 1.00; figuras 4, 5). *Sacoila* tem ampla distribuição geográfica (desde a Flórida, EUA até o Norte da Argentina), ausência de folhas na antese e nectário formato de um calcar cônico, enquanto *Skeptrostachys* é distribuído no Sul e Sudeste brasileiros e áreas adjacentes do Paraguai, Argentina e Uruguai, possui folhas conspícuas na antese e carece de calcar. Os resultados aqui apresentados sugerem que todos estes táxons poderiam ser fundidos em um gênero de delimitação mais ampla, porém existem importantes discrepâncias na morfologia floral e este problema carece de mais estudo.

Em todas as análises filogenéticas, com exceção daquela baseada na região ITS, o gênero *Stenorrhynchos* é monofilético com alto suporte na análise combinada de máxima parcimônia (BP 93; figura 4) e bayesiana (PP 1.00; figura 5), corroborando trabalhos prévios (e.g. Górnjak *et al.* 2008, Salazar *et al.* 2011). O nome *Stenorrhynchos millei* Schltr. é um sinônimo estabelecido de *Stenorrhynchos speciosum* (Jacq.) Rich., de acordo com vários autores (Garay 1978, Hamer 1985, Govaerts *et al.* 2010). Entretanto, *S. millei* surge em uma linhagem distinta de *S. speciosum* segundo os resultados da análise combinada (figuras 4, 5). Este resultado é consistente com as diferenças de hábito, tamanho das plantas, coloração das folhas e distribuição geográfica dessas espécies, pois *S. millei* é uma planta terrícola com mais de 60 cm de altura, com folhas verde-pálidas ou verde-escuras maculadas de branco e distribuída nos Andes da Colômbia e Equador, enquanto *S. speciosum* apresenta hábito epifítico, tem menos de 40 cm de altura, folhas verde-glaucas concolores e é conhecida unicamente das Antilhas. Assim, o nome *S. millei* pode ser aceito para uma espécie separada de *S. speciosum*.

Esta análise fornece a primeira visão geral das relações filogenéticas dentro do clado *Stenorrhynchos* que contém uma amostra genérica completa. Entretanto, a carência de

resolução em várias partes das árvores filogenéticas sugere a necessidade de incorporar mais caracteres nas análises para atingir uma imagem mais clara dos limites e das relações dos gêneros envolvidos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Lidia I. Cabrera e Gabriela Cruz-Lustre (Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México) pela assistência com o sequenciamento do DNA e com as análises filogenéticas, respectivamente. Financiamentos para este estudo foram obtidos através de bolsas de doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processos 2010/16353-1 e 2012/19778-9) para LRSG, além de bolsa de produtividade em pesquisa e Auxílio à Pesquisa (Universal) do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; processos 306889/2010-2 e 473722/2011-9, respectivamente) para FB.

Literatura citada

- Akaike, H.** 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716-723.
- Álvarez-Molina, A. & Cameron, K.M.** 2009. Molecular phylogenetics of Prescotttiinae s.l. and their close allies (Orchidaceae, Cranichideae) inferred from plastid and nuclear ribosomal DNA sequences. *American Journal of Botany* 96: 1020-1040.
- Balogh, P.** 1982. Generic redefinition in subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 69: 1119-1132.
- Barros, F., Vinhos, F., Rodrigues, V.T., Barberena, F.F.V.A., Fraga, C.N., Pessoa, E.M., Forster, W., Menini Neto, L., Furtado, S.G., Nardy, C., Azevedo, C.O. & Guimarães, L.R.S.** 2014. Orchidaceae. *In*: R.C. Forzza *et al.* (orgs.). Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179> (acesso em 18-VIII-2014).
- Bateman, R.M., Hollingsworth, P.M., Preston, J., Yi-bo, L., Pridgeon, A.M. & Chase, M.W.** 2003. Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 142: 1-40.
- Batista, J.A.N., Meneguzzo, T.E.C., Salazar, G.A., Ramalho, A.J. & Bianchetti, L.B.** 2011. Phylogenetic placement, taxonomic revision and a new species of *Nothostele*

- (Orchidaceae), an enigmatic genus endemic to the cerrado of central Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 165: 348-363.
- Bellstedt, D.U., Linder, H.P. & Harley, E.** 2001. Phylogenetic relationships in *Disa* based on non-coding *trnL/trnF* chloroplast sequences: evidence of numerous repeat regions. *American Journal of Botany* 88: 2088-2100.
- Borba, E.L., Salazar, G.A., Mazzoni-Viveiros, S. & Batista, J.A.N.** 2014. Phylogenetic position and floral morphology of the Brazilian endemic, monospecific genus *Cotylolabium*: a sister group for the remaining Spiranthinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 175: 29-46.
- Burns-Balogh, P.** 1986. A synopsis of Mexican Spiranthinae. *Orquídea (Mexico City)* 10: 76-96.
- Burns-Balogh, P. & Robinson, H.** 1983. Evolution and phylogeny of the *Pelexia* alliance (Orchidaceae: Spiranthoideae: Spiranthinae). *Systematic Botany* 8: 263-268.
- Clements, M.A., Jones, D.L., Sharma, I.K., Nightingale, M.E., Garratt, M.J., Fitzgerald, K.J., Mackenzie, A.M. & Molloy, B.P.J.** 2002. Phylogenetics of Diurideae (Orchidaceae) based on internal transcribed spacer (ITS) regions of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* 17: 135-171.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Figueroa, C., Salazar, G.A., Zavaleta, A. & Engleman, M.** 2008. Root character evolution and systematics in Cranichidinae, Prescottiinae and Spiranthinae (Orchidaceae, Cranichideae). *Annals of Botany* 101: 509-520.
- Fitch, W.M.** 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Botany* 20: 406-416.
- Garay, L.A.** 1978. 225(1).Orchidaceae: Cyripedioideae, Orchidoideae and Neottioideae. *In*: G.W. Harling & B. Sparre (eds.). *Flora of Ecuador*, No. 9. University of Göteborg & Swedish Museum of Natural History, Göteborg & Stockholm, pp. 1-305.
- Garay, L.A.** 1982. A generic revision of the Spiranthinae. *Botanical Museum Leaflets* 28: 278-425.
- Górniak, M., Mytnik-Ejsmont, J., Rutkowski, P., Tukałło, P., Minasiewicz, J. & Szlachetko, D.L.** 2006. Phylogenetic relationships within the subtribe Spiranthinae s.l.

- (Orchidaceae) inferred from the nuclear ITS region. *Biodiversity Research and Conservation* 1-2: 18-24.
- Górniak, M., Rutkowski, P. & Szlachetko, D.L.** 2008. The Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and Cyclopogoninae in the light of selected DNA fragment analyses. *In*: P. Rutkowski, D.L. Szlachetko & M. Górniak. (eds.). Phylogeny and taxonomy of the subtribes Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and Cyclopogoninae (Spiranthinae, Orchidaceae) in Central and South America. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk, pp. 79-102.
- Govaerts, R., Bernet, P., Kratochvil, K., Gerlach, G., Carr, G., Alrich, P., Pridgeon, A.M., Pfahl, J., Campacci, M.A., Holland Baptista, D., Tigges, H., Shaw, J., Cribb, P.J., George, A., Kreuz, K. & Wood, J.** 2010. World Checklist of Orchidaceae. Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em <http://apps.kew.org/wcsp/> (acesso em 14-III-2013).
- Hamer, F.** 1985. Orchids of Nicaragua, Part 6. *Icones Plantarum Tropicarum* 13: t. 1201-1300.
- Katoh, K. & Standley, D.M.** 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772-780.
- Kores, P.J., Molvray, M., Weston, P.H., Hopper, S.D., Brown, A.P., Cameron, K.M. & Chase, M.W.** 2001. A phylogenetic analysis of Diurideae (Orchidaceae) based on plastid DNA sequence data. *American Journal of Botany* 88: 1903-1914.
- Kreader, C.A.** 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 Gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1102-1106.
- Maddison, D.R.** 1991. The discovery and importance of multiple islands of most-parsimonious trees. *Systematic Zoology* 40: 315-328.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R.** 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. Disponível em <http://mesquiteproject.org>
- Posada, D. & Crandall, K.A.** 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. & van der Mark, P.** 2005. MrBayes 3.1.2 manual, draft 5/26/2005. Program documentation and manual. Disponível em <http://mrbayes.sourceforge.net/manual.php>
- Salazar, G.A.** 2003. Subtribe Spiranthinae. *In*: A.M. Pridgeon, P.J. Cribb, M.W. Chase & F.N. Rasmussen (eds.). *Genera Orchidacearum* vol. 3: Orchidoideae part 2, Vanilloideae. Oxford University Press, Oxford, pp. 164-278.

- Salazar, G.A. & Ballesteros-Barrera, C.** 2010. *Sotoa*, a new genus of Spiranthinae (Orchidaceae) from Mexico and the southern United States. *Lankesteriana* 9: 491-504.
- Salazar, G.A. & Dressler, R.L.** 2011. The leaves got right again: DNA phylogenetics supports a sister-group relationship between *Eurystyles* and *Lankesterella* (Orchidaceae: Spiranthinae). *Lankesteriana* 11: 337-348.
- Salazar, G.A. & Jost, L.** 2012. *Quechua*, a new monotypic genus of Andean Spiranthinae (Orchidaceae). *Systematic Botany* 37: 78-86.
- Salazar, G.A., Chase, M.W., Soto Arenas, M.A. & Ingrouille, M.** 2003. Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 90: 777-795.
- Salazar, G.A., Cabrera, L.I., Madriñán, S. & Chase, M.W.** 2009. Phylogenetic relationships of Cranichidinae and Prescottiinae (Orchidaceae, Cranichideae) inferred from plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany* 104: 403-416.
- Salazar, G.A., Cabrera, L.I. & Figueroa, C.** 2011. Molecular phylogenetics, floral convergence and systematics of *Dichromanthus* and *Stenorrhynchos* (Orchidaceae: Spiranthinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 167: 1-18.
- Simmons, M.P.** 2004. Independence of alignment and tree search. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 874-879.
- Swofford, D.L.** 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), v. 4.0 beta 10. Sinauer, Sunderland.
- Szlachetko, D.L.** 1992. Genera and species of the subtribe Spiranthinae (Orchidaceae): 3. Contribution to the revision of *Buchtienia*. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 37: 205-210.
- Szlachetko, D.L.** 1993. *Garaya* (Orchidaceae, Spiranthinae), a new orchid genus from Brazil. *Polish Botanical Studies* 5: 1-4.
- Szlachetko, D.L.** 1994a. Genera and species of the subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). 10. *Lyroglossa*. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 39: 121-127.
- Szlachetko, D.L.** 1994b. Studies on the Spiranthinae (Orchidaceae): 1. Miscellanea. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 39: 417-438.
- Szlachetko, D.L.** 1995. *Systema Orchidaliium*. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* (Supplement) 3: 1-152.
- Szlachetko, D.L. & Rutkowski, P.** 2008. Classification of Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and Cyclopogoninae. *In*: P. Rutkowski, D.L. Szlachetko & M. Górniak. (eds.). *Phylogeny and taxonomy of the subtribes Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and*

Cyclopogoninae (Spiranthinae, Orchidaceae) in Central and South America.
Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk, pp. 130-222.

Szlachetko, D.L. & González-Tamayo, R. 1996. *Ochyrella* (Orchidaceae, Stenorrhynchidinae), a new genus from South America. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 41: 697-700.

Szlachetko, D.L., González-Tamayo, R. & Rutkowski, P. 2001. *Pachygenium*, a new genus of the subtribe Cyclopogoninae (Orchidaceae). *Polish Botanical Journal* 46: 3-6.

Tabela 1. Táxons estudados, informação de *voucher* e acessos do GenBank.

Táxon	Voucher	Acesso GenBank		
		ITS	<i>matK-trnK</i>	<i>trnL-F</i>
<i>Buchtienia ecuadorensis</i> Garay	Peru, <i>Simpson s.n.</i> (FLAS)	Pendente	Pendente	Pendente
<i>Coccineorchis cernua</i> (Lindl.) Garay	Panamá, <i>Salazar et al. 6249</i> (MEXU, álcool)	AJ539502	AJ543930	AJ544485
<i>Eltroplectris calcarata</i> (Sw.) Garay & H.R.Sweet	Brasil, <i>Soares s.n.</i> (K, fotografia)	AJ519448	AJ519450	AJ519452
<i>Eltroplectris schlechteriana</i> (Porto & Brade) Pabst	Argentina, <i>Insaurralde s.n.</i> (MEXU)	Pendente	Pendente	Pendente
<i>Eltroplectris triloba</i> (Lindl.) Pabst	Argentina, <i>Jard. Bot. Munique 96/4474</i> (M)	FN641864	FN868835	FN641875
<i>Lyroglossa grisebachii</i> (Cogn.) Schltr.	Brasil, <i>Batista & Bianchetti 3108</i> (BHCB)	KF548545	KF548547	KF548549
<i>Mesadenella cuspidata</i> (Lindl.) Garay	Brasil, <i>van den Berg s.n.</i> (HUEFS)	Pendente	Pendente	Pendente
<i>Mesadenella petenensis</i> (L.O.Williams) Garay	México, <i>Salazar 6069</i> (MEXU)	AJ539503	AJ543931	AJ544486
<i>Mesadenus glaziovii</i> Schltr.	Brasil, <i>Batista 3158</i> (BHCB)	Pendente	Pendente	Pendente
<i>Nothostele acianthiformis</i> (Rchb.f. & Warm.) Garay	Brasil, <i>Viana 767</i> (BHCB)	FN868838	FN868833	FN868836
<i>Pteroglossa euphlebia</i> (Rchb.f.) Garay	Brasil, <i>Guimarães et al. 191</i> (SP)	Pendente	-	Pendente
<i>Pteroglossa glazioviana</i> (Cogn.) Garay	Argentina, <i>Radins s.n.</i> (MEXU)	Pendente	Pendente	Pendente
<i>Pteroglossa macrantha</i> (Rchb.f.) Schltr.	Brasil, <i>Batista 3172</i> (BHCB)	Pendente	Pendente	Pendente
<i>Pteroglossa roseoalba</i> (Rchb.f.) Salazar & M.W.Chase	El Salvador, <i>Salazar 6023</i> (MEXU)	FN868839	FN868834	FN868837
<i>Sacoila cerradicola</i> Meneguzzo	Brasil, <i>Batista et al. 1238</i> (CEN)	Pendente	Pendente	Pendente
<i>Sacoila hassleri</i> (Cogn.) Garay	Brasil, <i>Batista et al. 3137</i> (BHCB)	Pendente	Pendente	Pendente
<i>Sacoila lanceolata</i> (Aubl.) Garay	Panamá, <i>Förther 2545</i> (M) Brasil, <i>da Silva 874</i> (MG)	AJ539504 -	- AJ543933	- AJ544529
<i>Skeptrostachys balanophorostachya</i> (Rchb.f. & Warm.) Garay	Brasil, <i>Batista s.n.</i> (BHCB)	KF548544	KF548546	KF548548
<i>Skeptrostachys congestiflora</i> (Cogn.) Garay	Brasil, <i>van den Berg 1425</i> (HUEFS)	Pendente	Pendente	Pendente
<i>Skeptrostachys</i> cf. <i>congestiflora</i> (Cogn.) Garay	Brasil, <i>Batista et al. 2250</i> (BHCB)	Pendente	Pendente	Pendente
<i>Skeptrostachys gigantea</i> (Cogn.) Garay	Brasil, <i>Assis 372A</i> (BHCB)	Pendente	-	-
<i>Skeptrostachys paraguayensis</i> (Rchb.f.) Garay	Argentina, <i>Radins s.n.</i> (MEXU)	Pendente	Pendente	Pendente

<i>Stenorrhynchos albidomaculatum</i> Christenson	Costa Rica, <i>Salazar</i> 7662 (MEXU)	FN996948	Pendente	FN996960
<i>Stenorrhynchos glicensteinii</i> Christenson	México, <i>Salazar</i> 6090 (MEXU)	AJ539505	AJ543932	AJ544487
<i>Stenorrhynchos millei</i> Schltr.	Equador, <i>Portilla s.n.</i> (MEXU)	FN996946	Pendente	FN996958
<i>Stenorrhynchos specicosum</i> (Jacq.) Rich.	Ilhas Virgens, <i>Salazar</i> 7661 (MEXU)	FN996947	HG425364	FN996959
<i>Stenorrhynchos vaginatum</i> (Kunth) Spreng.	Colômbia, <i>Giraldo</i> 5 (COL)	Pendente	Pendente	Pendente
<i>Thelyschista ghillanyi</i> (Pabst) Garay	Brasil, <i>van den Berg</i> 1435 (HUEFS)	Pendente	Pendente	Pendente

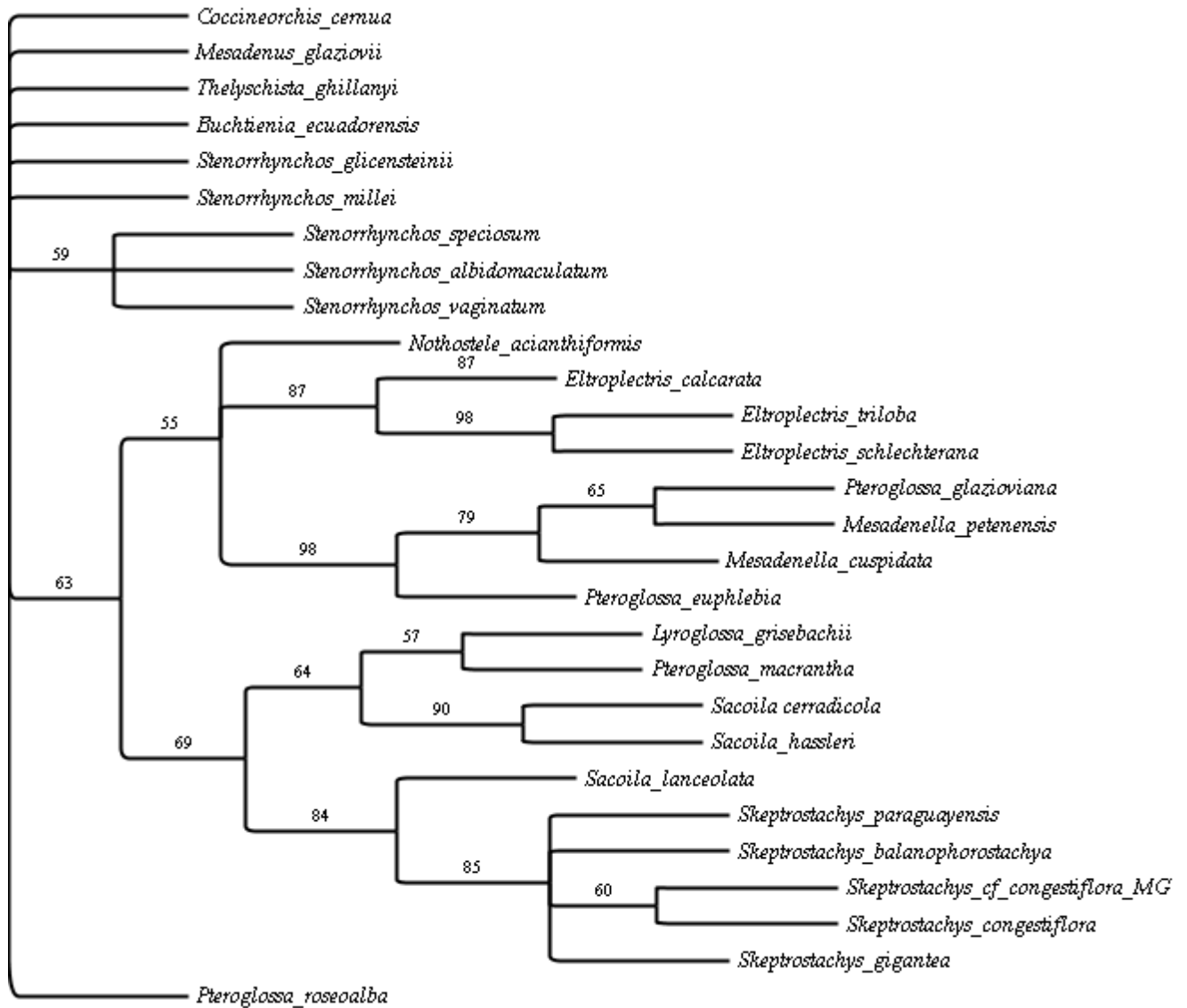


Figura 1. Árvore de consenso estrito do clado *Stenorrhynchos* inferida por análise de máxima parcimônia de sequências de DNA nuclear (ITS). Números acima dos ramos são valores de *bootstrap* > 50%.

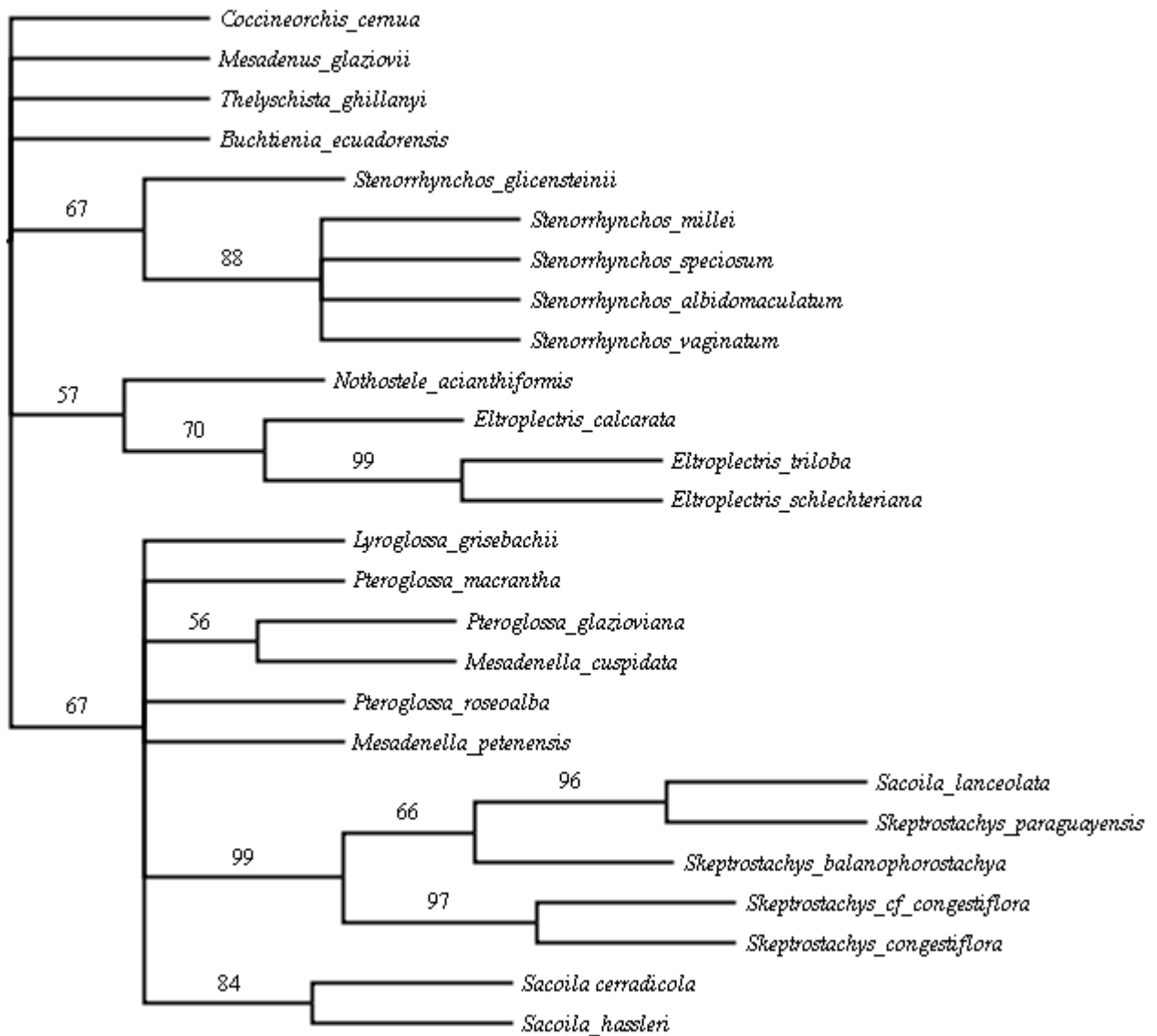


Figura 2. Árvore de consenso estrito do clado *Stenorrhynchos* inferida por análise de máxima parcimônia de sequências de DNA plastidial (*matK-trnK*). Números acima dos ramos são valores de *bootstrap* > 50%.

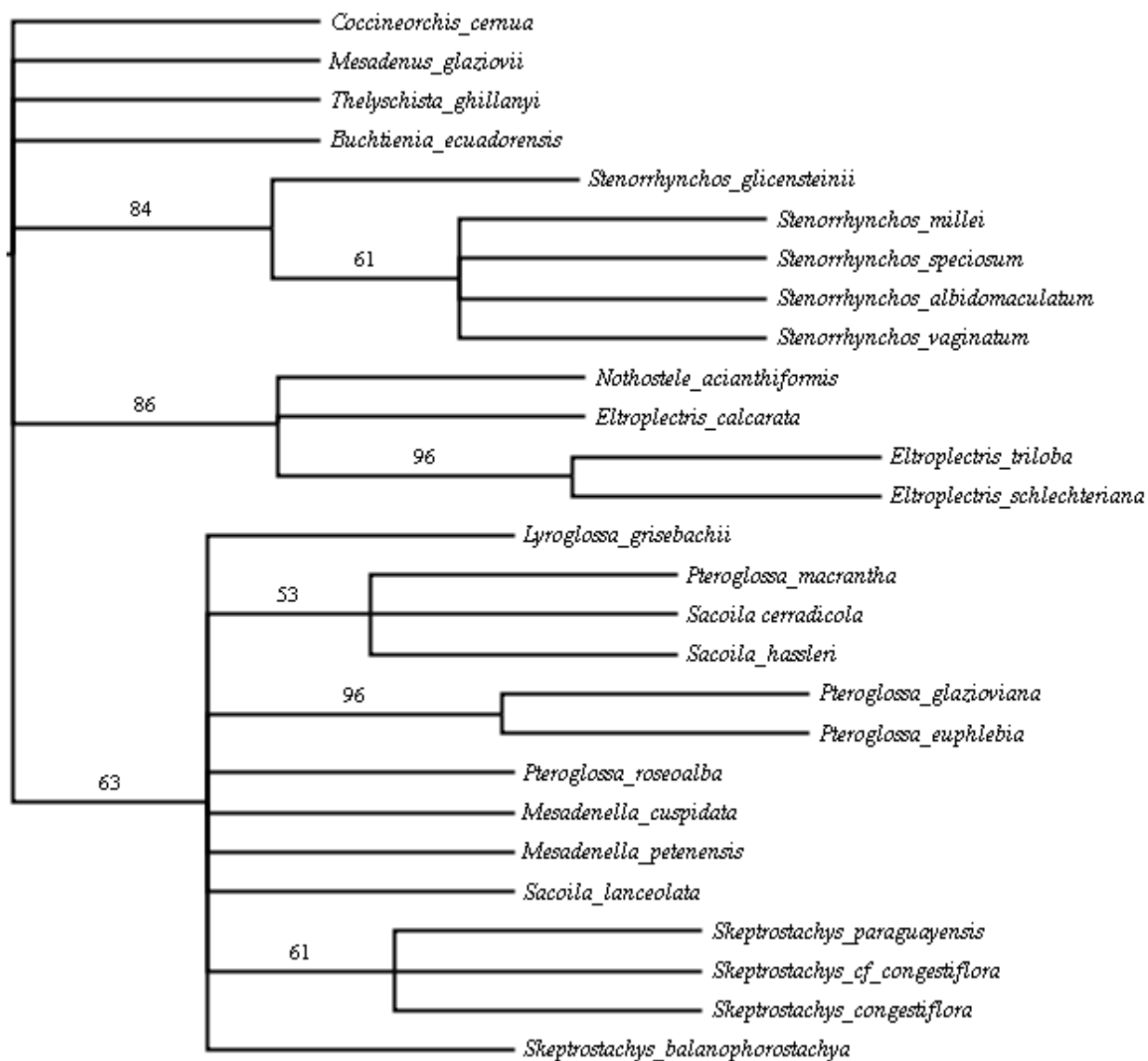


Figura 3. Árvore de consenso estrito do clado *Stenorrhynchos* inferida por análise de máxima parcimônia de sequências de DNA plastidial (*trnL-F*). Números acima dos ramos são valores de *bootstrap* > 50%.

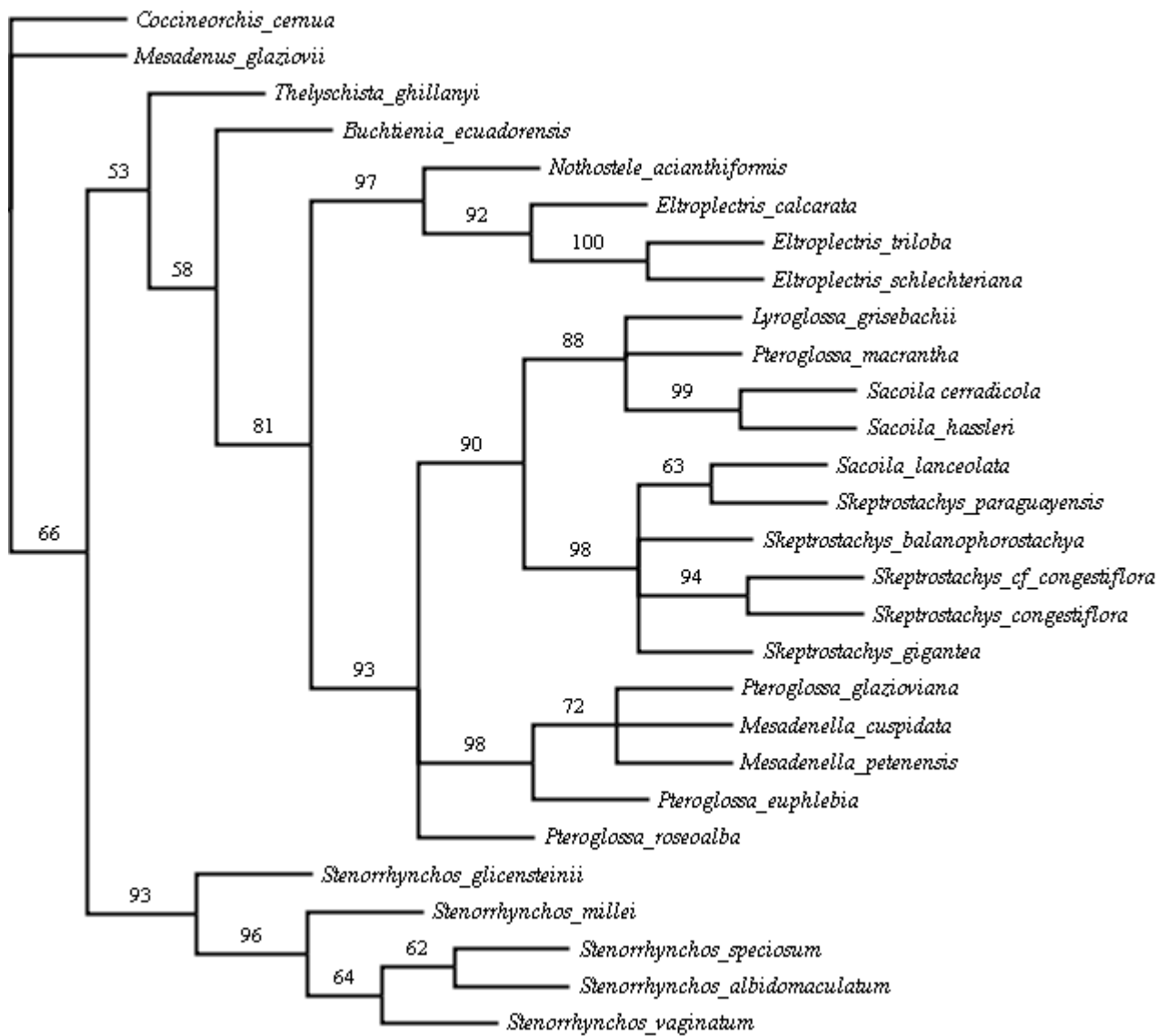


Figura 4. Árvore de consenso estrito do clado *Stenorrhynchos* inferida por análise de máxima parcimônia de seqüências combinadas de DNA nuclear e plastidial (ITS + *matK-trnK* + *trnL-F*). Números acima dos ramos são valores de *bootstrap* > 50%.

CAPÍTULO 2

A taxonomic synopsis of the *Stenorrhynchos* clade (Spiranthinae, Orchidoideae, Orchidaceae)

(Capítulo submetido no periódico *Phytotaxa*)



Stenorrhynchos glicensteinii Christenson. Foto: Gerardo A. Salazar.

A taxonomic synopsis of the *Stenorrhynchos* clade (Spiranthinae, Orchidoideae, Orchidaceae)

LEONARDO R. S. GUIMARÃES¹, GERARDO A. SALAZAR² & FÁBIO DE BARROS¹

¹*Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado, Instituto de Botânica, Av. Miguel Stéfano, 3687, Caixa Postal 68041, 04045-972, São Paulo, São Paulo, Brazil; email: leo.rsguimaraes@hotmail.com*

²*Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-367, 04510, México, D.F., México.*

Abstract

A taxonomic synopsis of the *Stenorrhynchos* clade, one of the four major lineages of the subtribe Spiranthinae, is presented. A total of 17 genera and 253 species have been proposed in the *Stenorrhynchos* clade, of which 10 genera and 64 species are accepted here, representing approximately 59% and 25% of their number of nominal taxa, respectively. Data on their distribution, and taxonomic and typification notes are presented. One species of *Sacoila* and one of *Stenorrhynchos* were not included in the list, being considered as *incertae sedis*. Fifteen lectotypifications and fourteen new synonyms are proposed.

Key words: lectotypifications, new synonyms, nomenclature

Introduction

The subtribe Spiranthinae Lindley (1840: 441, 462) comprises about 40 genera and 470 species almost exclusively restricted to the Neotropics (Garay 1982, Salazar 2003), except for the cosmopolitan genus *Spiranthes* Richard (1817: 20, 28, 36). Historically, the classification of the subtribe has been controversial. Two generic revisions of the subtribe were published almost simultaneously in the 1980s, differing in the number and composition of the genera accepted (Balogh 1982, Garay 1982). Szlachetko (1995a: 43) split Spiranthinae into three subtribes (Spiranthinae *sensu stricto*, Cyclopogoninae and Stenorrhynchidinae), referring to these groups as “subclades”, but the author did not give clear indication about which characters distinguish each one.

The first phylogenetic evaluation of the generic limits of Spiranthinae, based on nucleotide sequence data, was published by Salazar *et al.* (2003), which identified four major clades in the subtribe: (i) *Stenorrhynchos s.s.* and other genera traditionally considered closely related to that genus (*Eltroplectris*, *Mesadenella*, *Pteroglossa* and *Sacoila*); (ii) most of the genera previously assigned to the “*Pelexia* alliance” (Burns-Balogh & Robinson 1983) and to the subtribe Cyclopogoninae (Szlachetko 1995a), i.e., *Cyclopogon s.l.*, *Pelexia*, *Sarcoglottis* and *Veyretia*, plus *Odontorrhynchus* and *Coccineorchis*; (iii) the pair *Eurystyles* and *Lankesterella*; (iv) *Spiranthes* and other genera mostly or exclusively diversified in the northern limit of the Neotropics, such as *Aulosepalum*, *Deiregyne*, *Dichromanthus*, *Funkiella*, *Mesadenus* and *Microthelys*. Górnjak *et al.* (2006) published a phylogenetic analysis of Spiranthinae, based on nuclear ribosomal ITS, which sustain the non-monophyly of the subtribes Spiranthinae and Stenorrhynchidinae (*sensu* Szlachetko 1995a), being congruent with the work of Salazar *et al.* (2003). Recently, Batista *et al.* (2011) studied phylogenetically the genus *Nothosteale* Garay (1982: 339) and their results show that it is sister to the genus *Eltroplectris* Rafinesque (1837: 51), within the *Stenorrhynchos* clade. On the other hand, Borba *et al.* (2014) showed that the genus *Cotylolabium* Garay (1982: 307), originally considered as part of the *Stenorrhynchos* clade, is the sister of the rest of the subtribe Spiranthinae.

Within the *Stenorrhynchos* clade, generic delimitation is controversial and many taxonomic papers have been published in the last three decades proposing new genera or new combinations (Balogh 1982, Burns-Balogh 1983, 1986, Szlachetko 1992, 1993, 1994a, b, Szlachetko & González-Tamayo 1996, Szlachetko *et al.* 2001, Szlachetko & Rutkowski 2008). However, those works were based on intuitive weighting of few floral morphological characters and lacked explicit phylogenetic hypotheses. A molecular phylogenetic analysis of this clade is underway (Guimarães *et al.* in prep.) to clarify its phylogenetic relationships and to elucidate the generic limits within the *Stenorrhynchos* clade.

In this paper, we present a synopsis of the genera and species of the *Stenorrhynchos* clade. The study of many tropical orchids is severely hampered by the loss of all the holotypes of Schlechter’s species due to the bombing of the Berlin Herbarium during the World War II (Merrill 1943, Butzin 1978, 1981, Hiepko 1987). Likewise, there are evidence that the voucher specimens of Barbosa Rodrigues were lost when his herbarium, stored in the basement of the house of his son, was destroyed by a flash flood (Cribb & Toscano de Brito 1996). Luckily, extant isotypes and paratypes, and some published or unpublished illustrations are preserved and can be used as taxonomic references.

Material and methods

Type data were taken from the protologues and from the labels in the type material. The herbarium location of the types was compiled from the material examined, images of the types and the species' protologues.

The circumscription of the genera and species followed the phylogenetic results of Salazar *et al.* (2003) and Batista *et al.* (2011), as well as the expertise of the authors. Synonymy and distribution data were based on the World Checklist of Orchidaceae (Govaerts *et al.* 2010). Distribution data for the Brazilian states in which the species have been recorded were taken from Barros *et al.* (2013). Abbreviations for the Brazilian states are: AL, Alagoas; AM, Amazonas; AP, Amapá; BA, Bahia; DF, Distrito Federal; ES, Espírito Santo; GO, Goiás; MA, Maranhão; MG, Minas Gerais; MT, Mato Grosso; PA, Pará; PB, Paraíba; PE, Pernambuco; PR, Paraná; RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; SE, Sergipe; SP, São Paulo; and TO, Tocantins.

Specimens and digital images were examined from the following herbaria: AMES, AAU, B, BAB, BM, BR, CORD, CTES, FLAS, FTG, G, GOET, HBG, K, MBML, MO, MVFA, NY, P, R, RB, S, SP, UC, W and Z (acronyms according to Thiers 2012). Abbreviations of authorities for plant names follow Brummitt & Powell (1992), updated in the International Plant Names Index (2014).

Taxonomic treatment

1. *Buchtienia* Schlechter (1929: 33). Type species:—*Buchtienia boliviensis* Schlechter (1929: 34).

1.1. *Buchtienia boliviensis* Schlechter (1929: 34). Type:—BOLIVIA. La Paz: Tipuani Valley, Hacienda Casana, 1400 m, 26 September 1922, *Buchtien* 7236 (holotype B \dagger ; lectotype US, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 153; isolectotypes G [photo!], HBG [photo!], LD, MO).

Distribution:—Bolivia, Peru, Brazil (MT).

1.2. *Buchtienia claudiae* Chiron, Medeiros & Archila (2013: 246). Type:—BRAZIL. “*Na divisa de Resende (RJ) com Arapeí (SP), seguindo pela estrada de terra RJ 161 a esquerda (sentido Resende Arapeí) na última ilha de mata antes de entrar em Arapeí, em uma*

fazenda de gado que preservou um pequeno pedaço de ilha de mata”, 500 m, 2 September 2002, *Medeiros s.n.* (holotype HBR 54748).

Distribution:—Brazil (RJ / SP).

Note:—Known from the type specimen only.

1.3. *Buchtienia ecuadorensis* Garay (1978a: 234); *Buchtienia boliviensis* var. *ecuadorensis* (Garay) Szlachetko (1992: 209). Type:—ECUADOR. Napo: Pastaza, between Tena and Napo, 16 October 1939, *Asplund 9358* (holotype S).

Distribution:—Ecuador (Napo).

1.4. *Buchtienia rosea* Garay (1978b: 23); *Buchtienia boliviensis* var. *rosea* (Garay) Szlachetko (1992: 209). Type:—PERU. Cusco: Paucartambo, on road from Mistiana to Keros, 700 m, 27 July 1948, *Vargas-Calderón 7381* (holotype AMES [photo!]).

Distribution:—Peru.

Note:—A species known from the type specimen only.

2. *Eltroplectris* Rafinesque (1837: 51); *Stenorrhynchos* sect. *Eltroplectris* (Raf.) Balogh (1982: 1131). Type species:—*Eltroplectris acuminata* Rafinesque (1837: 51), *nom. illeg.*

Centrogenium Schlechter (1919: 54, 1920: 451). Lectotype (designated by Correa 1955: 81):—*Centrogenium calcaratum* (Swartz 1806: 1413) Schlechter (1920: 452).

Ochyrella Szlachetko & González-Tamayo (1996: 698), *pro parte*. Type species:—*Ochyrella lurida* (Correa 1972: 319) Szlachetko & González-Tamayo (1996: 700).

Notes:—Szlachetko & González-Tamayo (1996: 698) proposed the new genus *Ochyrella*, typified by a species that had been assigned by Garay (1982) to *Pteroglossa* (*P. lurida* (Correa 1972: 319) Garay (1982: 350)). As pointed out by Salazar (2003), the type species of *Ochyrella* and most of the other species show all the features of *Pteroglossa* and therefore, this genus should encompass *Ochyrella*. Nevertheless, Szlachetko & Rutkowski (2008: 166-167) proposed new combinations in the genus *Ochyrella*, this time based on species previously assigned to *Centrogenium* or *Eltroplectris*, without explaining the reasons for their decision, but probably following the previous paper of Szlachetko & González-Tamayo (1996).

2.1. *Eltroplectris assumcaoana* Campacci & Kautsky (1999: 108). Type:—BRAZIL. Espírito Santo: Domingos Martins, January 1992, fl. cult. April 1993, *Assumpção s.n.* (holotype SP 334524!).

Distribution:—Brazil (ES).

Note:—This species is known from the type collection only.

2.2. *Eltroplectris brachycentron* Szlachetko (1995b: 375); *Ochyrella brachycentron* (Szlach.) Szlachetko & González-Tamayo (1996: 700). Type:—BOLIVIA. Santa Cruz: Choreti, 3 miles from Comiri, a pumping station on the pipeline above Rio Perapeti, 20°00'S, 63°30'W, 13 September 1949, *Brooke 5634* (holotype BM).

Distribution:—Bolivia.

2.3. *Eltroplectris calcarata* (Sw.) Garay & Sweet (1972: 390); *Neottia calcarata* Swartz (1806: 1413); *Stenorrhynchos calcaratum* (Sw.) Richard (1817: 37); *Collea calcarata* (Sw.) Lindley (1823: sub t. 760); *Eltroplectris acuminata* Rafinesque (1837: 51), *nom. illeg.*; *Pelexia domingensis* Lindley (1840: 482); *Pelexia calcarata* (Sw.) Cogniaux (1909a: 328); *Centrogenium calcaratum* (Sw.) Schlechter (1920: 452); *Spiranthes calcarata* (Sw.) Jiménez (1962: 326). Type:—DOMINICAN REPUBLIC. S.l., s.d., *Swartz s.n.* (holotype S-R 3752 [photo!]).

Pelexia setacea Lindley (1840: 482); *Centrogenium setaceum* (Lindl.) Schlechter (1920: 453). Type:—BRAZIL. Espírito Santo: Rio Doce, near Mandioca, s.d., *Wied-Neuwied s.n.* (lectotype K-L, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 164; isoelectotypes M, W0024034 [photo!]).

Pelexia setacea var. *glabra* Cogniaux (1909b: 123). Type:—JAMAICA. Stony Hill, 1000 ft., 16 January 1900, *Harris 7863* (holotype BM [photo!]; isotype NY [photo!]).

Centrogenium rademarkeri Ruschi & La Gasa (1972: 2). Type:—BRAZIL. Espírito Santo: Aracruz, “Reserva Biológica de Comboios”, 12 July 1972, *la Gasa s.n.* (holotype MBML 403!).

Distribution:—United States (Florida), Bahamas, Cayman Islands, Cuba, Dominican Republic, Haiti, Jamaica, Puerto Rico, Trinidad, Suriname, Venezuela, Bolivia, Colombia, Ecuador, Peru, Brazil (PB, PE, BA, MG, ES, RJ, SP), Paraguay.

2.4. *Eltroplectris cogniauxiana* (Schltr.) Pabst (1974: 469); *Centrogenium cogniauxianum* Schlechter (1920: 452); *Pelexia longicornu* var. *minor* Cogniaux (1904-1906: 533);

Ochyrella cogniauxiana (Schltr.) Szlachetko & Rutkowski (2008: 166), *syn. nov.*
Type:—BRAZIL. Goiás: “Fazenda do Lambary”, 28 January 1895, *Glaziou 22154*
(lectotype BR [photo!] **designated here**; isoelectotypes G [photo!], K [photo!], P
[photo!]).

Distribution:—Brazil (TO, MT, GO, DF, MG, ES).

Notes:—Szlachetko & Rutkowski (2008: 166) indicated the specimen *Schwarzmaier*
32793 (BR), collected in August 1936, as the lectotype. However, this proposal is untenable
because this specimen was not cited in the protologue and there is no evidence that Cogniaux
examined this specimen. According to Article 9.19 of the International Code of Nomenclature
(McNeill *et al.* 2012): “The author who first designates (Art. 7.9 and 7.10) a lectotype or a
neotype... must be followed, but... the choice may also be superseded if one can show that (b)
it is in serious conflict with the protologue and another element is available that is not in conflict
with the protologue”. Thus, we designate here another specimen as lectotype.

2.5. *Eltroplectris dalessandroi* Dodson (1994: 141); *Ochyrella dalessandroi* (Dodson)
Szlachetko & González-Tamayo (1996: 700). Type:—ECUADOR. Loja: Santorum, near
Malacatos, 1400 m, 1 September 1986, *Dodson et al. 16637* (holotype RPSC; isotype
MO).

Distribution:—Ecuador (Loja).

2.6. *Eltroplectris janeirensis* (Porto & Brade) Pabst (1974: 469); *Centrogenium janeirensis*
Porto & Brade (1940: 33). Type:—BRAZIL. Rio de Janeiro: “Serra das Araras”, May
1936, *Brade 15775* (holotype RB!).

Distribution:—Brazil (MG, ES, RJ).

2.7. *Eltroplectris kuhlmanniana* (Hoehne) Szlachetko & Rutkowski (2008: 164);
Centrogenium kuhlmannianum Hoehne (1944: 133). Type:—BRAZIL. Espírito Santo:
Rio Doce, May 1934, *Kuhlmann 368* (holotype RB!).

Distribution:—Brazil (ES).

Note:—Known from the type specimen only.

2.8. *Eltroplectris longicornu* (Cogn.) Pabst (1974: 469); *Pelexia longicornu* Cogniaux (1896:
425); *Centrogenium longicornu* (Cogn.) Schlechter (1920: 453); *Ochyrella longicornu*
(Cogn.) Szlachetko & Rutkowski (2008: 166), *syn. nov.* Type:—BRAZIL. Goiás: Rio

Meia-Ponte, August 1892, *Ule 3118* (lectotype BR, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 166; isolectotype HBG [photo!]).

Distribution:—Brazil (MT, GO, MG).

Note:—Despite the fact that this species is endemic to Brazil, almost all the specimens are in European herbaria. There is, so far, only two exsiccatae deposited in the herbarium R (*Ule 87* and *229*).

2.9. *Eltroplectris macrophylla* (Schltr.) Pabst (1974: 469); *Centrogenium macrophyllum* Schlechter (1921b: 271). Type:—BRAZIL. Minas Gerais: Belo Horizonte, 1912, *Christian s.n.* (holotype B†; lectotype US **designated here**).

Distribution:—Brazil (MG).

Notes:—This species is known only from the type material. Szlachetko & Rutkowski (2008: 165) designated as lectotype the specimen *Christian s.n.* supposedly at B but destroyed, a clearly untenable proposal. Thus, we choose an isotype to be the lectotype specimen.

2.10. *Eltroplectris rossi* Dodson & Romero (1993: 197); *Ochyrella rossi* (Dodson & G.A.Romero) Szlachetko & Rutkowski (2008: 167), *syn. nov.* Type:—ECUADOR. Sucumbíos: Laguna de Imuya, 200 m, 15 September 1991, *Dodson 18901 & Romero* (holotype RPSC); Sucumbíos: Río Yasuni, Garza Cocha, 200 m, 1°5'S, 75°47'W, 12 April 1983, *Laweson et al. 43534* (paratype AAU [photo!]).

Distribution:—Ecuador.

2.11. *Eltroplectris schlechteriana* (Porto & Brade) Pabst (1974: 469); *Centrogenium schlechterianum* Porto & Brade (1940: 32). Type:—BRAZIL. São Paulo: Iguape, Rio Jacupiranga, April 1911, *Brade 5701* (lectotype HB, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 165; isolectotype SP); São Paulo: Iguape, Morro das Pedras, May 1926, *Brade 8468* (paratypes HB, SP).

Distribution:—Brazil (SP, PR), Argentina, Paraguay.

2.12. *Eltroplectris triloba* (Lindl.) Pabst (1974: 470); *Pelexia triloba* Lindley (1840: 483); *Centrogenium trilobum* (Lindl.) Schlechter (1920: 454); *Ochyrella triloba* (Lindl.) Szlachetko & González-Tamayo (1996: 700). Type:—BRAZIL. Rio de Janeiro: near Rio de Janeiro, August 1834, *Gardner 2/121* (lectotype K [photo!], designated by

Szlachetko & Rutkowski 2008: 165; isolectotypes SI, W-R); Rio de Janeiro, 1837, *Tweedie 1314* (paratype K [photo!]).

Distribution:—Brazil (BA, MG, ES, RJ, SP), Argentina (Chaco), Paraguay.

3. *Lyroglossa* Schlechter (1920: 448). Lectotype (designated by Angely 1973: 1277):—*Lyroglossa grisebachii* (Cogniaux 1893-1896: 207) Schlechter in Schlechter & Hoehne (1921: 27).

Stenorrhynchos sect. *Lyroglossa* (Schltr.) Balogh (1982: 1132). Type species:—*Lyroglossa bradei* Schlechter ex Mansfeld (1928: 245).

Notes:—Balogh (1982: 1131-1132) proposed eight sections in the genus *Stenorrhynchos*. One of them was section *Lyroglossa*, for which Balogh (1982) choose as type *Lyroglossa bradei*, a superfluous proposal, since the genus *Lyroglossa* had been lectotypified nine years earlier by Angely (1973: 1277).

3.1. *Lyroglossa grisebachii* (Cogn.) Schlechter in Schlechter & Hoehne (1921: 27); *Spiranthes grisebachii* Cogniaux (1893-1896: 207). Type:—FRENCH GUIANA. S.l., 1840, *Leprieur s.n.* (lectotype G-DC 7525 [photo!], designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 179; isolectotype P 00345573 [photo!]). FRENCH GUIANA. S.l., 1859, *Leprieur s.n.* (paratype F 1537616 [photo!]). BRAZIL. Minas Gerais: Ouro Preto, “*Serra de Lavras Novas*”, 1 January 1904, *Schwacke 7615* (paratypes B, BHCB). TRINIDAD. S.l., s.d., *Grisebach s.n.* (paratype K 894346 [photo!]).

Spiranthes bicolor Grisebach (1864: 641), *nom. illeg.* (non (Ker Gawler 1824: sub t. 794) Lindley 1824: sub t. 823); *Stenorrhynchos bicolor* (Griseb.) Schlechter (1919: 53), *nom. illeg.*; *Lyroglossa bicolor* (Griseb.) Schlechter (1920: 449), *nom. illeg.* Type:—TRINIDAD. Omara, 7 July 1848, *Crueger s.n.* (holotype GOET008579 [photo!]).

Spiranthes euglossa Kraenzlin (1915: 5); *Lyroglossa euglossa* (Kraenzl.) Hoehne & Schlechter in Schlechter & Hoehne (1922: 32); *Lyroglossa grisebachii* var. *euglossa* (Kraenzl.) Szlachetko (1994a: 124). Type:—BRAZIL. São Paulo: São Bernardo do Campo, December 1911, *Brade 5082* (lectotype S-R [photo!], designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 179; isolectotypes HB, HBG [photo!]).

Spiranthes spirata Hoehne (1919: 71); *Lyroglossa spirata* (Hoehne) Garay (1982: 333); *Lyroglossa grisebachii* var. *spirata* (Hoehne) Szlachetko (1994a: 124). Type:—BRAZIL.

São Paulo: Butantã, 10 December 1917, *Gehrt s.n.* (holotype SP 1041!; isotypes BM 77491 [photo!], NY 818242, R 13844).

Lyroglossa rodriguesii Schlechter ex Hoehne (1945: 336), *nom. nud.* Type:—BRAZIL. Minas Gerais: Itabira, 19 December 1916, *Porto 559* (holotype RB).

Distribution:—Trinidad, French Guiana, Guyana, Suriname, Venezuela, Colombia, Brazil (MT, GO, DF, MG, RJ, SP, PR, RS).

Notes:—A species quite variable, since it occurs in several discontinuous areas in South America. Szlachetko (1994a: 124) cited this species from Nicaragua and Paraguay, but no material was localized to sustain such claim.

3.2. *Lyroglossa pubicaulis* (L.O.Williams) Garay (1982: 333); *Spiranthes pubicaulis* Williams (1946: 234); *Schiedeella pubicaulis* (L.O.Williams) Balogh (1981: 39). Type:—MEXICO. Veracruz: Jaltipan, 5 July 1910, *Orcutt 5056* (holotype DS; iconotype AMES [photo!]).

Distribution:—Mexico (Veracruz), Belize.

4. *Mesadenella* Pabst & Garay (1952: 207); *Stenorrhynchos* sect. *Mesadenella* (Pabst & Garay) Balogh (1982: 1132). Lectotype (designated by Correa 1955: 68):—*Mesadenella esmeraldae* (Linden & Reichenbach 1862: 36) Pabst & Garay (1952: 208).

Garaya Szlachetko (1993: 4). Type species:—*Garaya atroviridis* (Barbosa Rodrigues 1882: 284) Szlachetko (1993: 4).

4.1. *Mesadenella angustisegmenta* Garay (1982: 285). Type:—VENEZUELA. Zulia: in forests of Rio Lora, between Camp Z and Boca del Rio del Norte, 18 December 1922, *Pittier 10985* (holotype AMES [photo!]; isotype P [photo!]).

Distribution:—Venezuela, Ecuador.

4.2. *Mesadenella atroviridis* (Barb.Rodr.) Garay (1982: 335); *Cyclopogon atroviridis* Barbosa Rodrigues (1882: 284); *Spiranthes atroviridis* (Barb.Rodr.) Cogniaux (1893-1896: 206); *Garaya atroviridis* (Barb.Rodr.) Szlachetko (1993: 4). Type:—BRAZIL. Minas Gerais: “*Serra da Capitinga*”, near Rio Sapucaí, May 1846, *Barbosa Rodrigues s.n.* (holotype RB†; lectotype designated by Buzatto *et al.* 2013: 614; illustration by Barbosa Rodrigues in his unpublished work “*Iconographie des Orchideés du Brésil 1: tab. 65B*”; original illustration RB, reproduced by Sprunger *et al.* 1996: 118, fig. B!).

Distribution:—Brazil (BA, MG, RJ, SP, SC).

4.3. *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay (1978a: 238); *Spiranthes cuspidata* Lindley (1840: 471); *Gyrostachys cuspidata* (Lindl.) Kuntze (1891: 664); *Cyclopogon cuspidatus* (Lindl.) Schlechter (1920: 387). Type:—BRAZIL. Rio Grande do Sul: Vila Viciosa, s.d., *Tweedie s.n.* (holotype K 573805 [photo!]).

Serapias pumila Vellozo (1831: t. 55). Type:—BRAZIL. Rio de Janeiro, s.d., *Vellozo s.n.* (lectotype original illustration in Vellozo 1831: t. 55!, **designated here**).

Cyclopogon albopunctatus Barbosa Rodrigues (1882: 281). Type:—BRAZIL. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, São Francisco Xavier, s.d., *Barbosa Rodrigues s.n.* (holotype RB†; lectotype designated by Buzatto *et al.* 2013: 610; illustration by Barbosa Rodrigues in his unpublished work “Iconographie des Orchideés du Brésil 1: tab. 51”; original illustration RB, reproduced by Sprunger *et al.* 1996: 104!).

Spiranthes esmeraldae Linden & Reichenbach (1862: 36); *Stenorrhynchos esmeraldae* (Linden & Rchb.f.) Cogniaux (1893-1896: 170); *Mesadenella esmeraldae* (Linden & Rchb.f.) Pabst & Garay (1952: 208). Type:—BRAZIL. Minas Gerais: Lagoa Santa, s.d., *Warming s.n.* (W-R?).

Spiranthes margaritifera Linden & Reichenbach (1866: 219); *Mesadenella margaritifera* (Linden & Rchb.f.) Garay (1982: 335). Type:—BRAZIL. São Paulo, s.d., *Linden 65* (holotype W-R).

Habenaria margaritacea Williams (1869: 17). Type: not located.

Liparis beckeri Alves (1991: 172), *syn. nov.* Type:—BRAZIL. Minas Gerais: Tiradentes, “*Serra de São José, prope Cachoeira do Mangue*”, 1100 m, 16 May 1988, *Alves 391 & Becker J.* (holotype RB).

Distribution:—Guyana, Suriname, Venezuela, Colombia, Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil (MT, GO, DF, MG, ES, RJ, SP, PR, SC, RS), Argentina (Misiones, Corrientes), Paraguay, and, according to Schinini (2010: 176), Uruguay.

Notes:—The analytical drawing in the protologue of *L. beckeri* shows that this plant is conspecific with *Mesadenella cuspidata*, and it is thus considered here as its synonym.

4.4. *Mesadenella meeae* Alves (1992: 64) [as “*meei*”]. Type:—BRAZIL. Minas Gerais: Tiradentes, “*Serra de São José, Bosque da Mãe d’Água*”, 18 June 1987, *Alves 690* (holotype RB!).

Distribution:—Brazil (MG).

Note:—This species is only known from the type collection.

4.5. *Mesadenella peruviana* Garay (1982: 286). Type:—PERU. Huánuco: Leoncio Prado, Quebrada Las Pavas, 5 km S of Tingo Maria on road to Las Palmas, 720 m, 24 March 1976, *Plowman 5713 & Kennedy* (holotype AMES [photo!]).

Distribution:—Peru.

4.6. *Mesadenella tonduzii* (Schltr.) Pabst & Garay (1952: 209); *Spiranthes tonduzii* Schlechter (1910: 26); *Stenorrhynchos tonduzii* (Schltr.) Schlechter (1920: 448). Type:—COSTA RICA. Puntarenas: Boruca, 460 m, fl. December 1891, *Tonduz 4645* (holotype B†; lectotype US **designated here**; iconotype AMES [photo!]).

Spiranthes petenensis Williams (1973a: 460); *Spiranthes umbraticola* Williams (1973b: 435), *nom. illeg. (nom. superfl.)*; *Mesadenella petenensis* (L.O.Williams) Garay (1982: 335); *Stenorrhynchos petenense* (L.O.Williams) Burns-Balogh & Greenwood in Burns-Balogh (1986: 93). Type:—GUATEMALA. Petén: Tikal National Park, “*en camino a Uaxactún, a 1 km de aloea*”, 6 January 1969, *Ortiz 3* (holotype F; isotypes EAP, NY, SEL, US).

Distribution:—Mexico (Campeche, Chiapas, Oaxaca, Veracruz), Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua.

Note:—Szlachetko & Rutkowski (2008: 161) designated as lectotype the specimen *Tonduz 4645* supposedly at B but destroyed, a clearly untenable proposal. Thus, we choose an isotype as the lectotype. Barros *et al.* (2013) list this Mesoamerican species for Pará, Brazil, but it is probably a misidentification.

4.7. *Mesadenella variegata* Bennett & Christenson (2001: t. 713). Type:—PERU. Piura: Ayabaca, along mule trail above Yanchala to Laguna Prieta, 3000 m, 8 November 1992, *Bennett 5838 & Campoverde* (holotype Herb. Bennettianum).

Distribution:—Peru.

Note:—Known from the type specimen only.

5. *Nothosteale* Garay (1982: 339). Type species:—*Nothosteale acianthiformis* (Reichenbach & Warming in Reichenbach 1881: 83) Garay (1982: 340).

5.1. *Nothostele acianthiformis* (Rchb.f. & Warm.) Garay (1982: 340); *Pelexia acianthiformis* Reichenbach & Warming in Reichenbach (1881: 83); *Stenorrhynchos acianthiformis* (Rchb.f. & Warm.) Cogniaux (1893-1896: 180); *Centrogenium acianthiforme* (Rchb.f. & Warm.) Hoehne (1945: 289). Type:—BRAZIL. Minas Gerais: Lagoa Santa, 18 August 1864, Warming *s.n.* (lectotype W-R 23938 [photo!], designated by Batista *et al.* 2011: 355; isoelectotypes BR 6572808 [photo!], C, P 345593 [photo!], W-R 23937 [photo!]).
Distribution:—Brazil (MG).

Note:—Endemic to the state of Minas Gerais, it has been registered from three areas only: Lagoa Santa, Serra da Calçada and Serra do Cipó (Batista *et al.* 2011).

5.2. *Nothostele brasiliaensis* Batista, Meneguzzo & Bianchetti in Batista *et al.* (2011: 356). Type:—BRAZIL. Distrito Federal: Brasília, “*Península Norte, ao lado do Clube Congresso*”, 25 August 1990, *Batista 103* (holotype CEN).
Distribution:—Brazil (DF, GO).

6. *Pteroglossa* Schlechter (1920: 450). Lectotype (designated by Angely 1973: 1277):—*Pteroglossa macrantha* (Reichenbach 1847: 378) Schlechter (1920: 450).
Pelexia sect. *Cogniauxiocharis* Schlechter (1920: 399, 412), *nom. nud.*; *Stenorrhynchos* sect. *Cogniauxiocharis* (Schltr.) Burns-Balogh (1983: 368). Type species:—*Pelexia glazioviana* Cogniaux (1893-1896: 157).
Cogniauxiocharis (Schltr.) Hoehne (1944: 132). Type species:—*Cogniauxiocharis glazioviana* (Cogn.) Hoehne (1944: 133).
Stenorrhynchos sect. *Pteroglossa* (Schltr.) Balogh (1982: 1132). Type species:—*Pteroglossa macrantha* (Rchb.f.) Schltr.
Ochyrella Szlachetko & González-Tamayo (1996: 698), *pro parte*. Type species:—*Ochyrella lurida* (M.N.Correa) Szlach. & R.González.
Callistanthos Szlachetko in Szlachetko & Rutkowski (2008: 165), *syn. nov.* Type species:—*Callistanthos roseoalbus* (“*roseoalba*”) (Reichenbach 1854: 11) Szlachetko in Szlachetko & Rutkowski (2008: 165).
Lyrochilus Szlachetko in Szlachetko & Rutkowski (2008: 178), *syn. nov.* Type species:—*Lyrochilus hilarianus* (Cogniaux 1904-1906: 541) Szlachetko in Szlachetko & Rutkowski (2008: 179).

Notes:—Szlachetko in Szlachetko & Rutkowski (2008) proposed two new genera, *Callistanthos* (p. 165) and *Lyrochilus* (p. 178). According to him, the former is closely related to *Cogniauxiocharis* (an established synonym under *Pteroglossa*) and *Eltroplectris*, and the latter is similar to *Lyroglossa* and *Pteroglossa*.

6.1. *Pteroglossa euphlebia* (Rchb.f.) Garay (1982: 350); *Spiranthes euphlebia* Reichenbach (1883: 13); *Cogniauxiocharis euphlebia* (Rchb.f.) Szlachetko & Rutkowski (2008: 167), *syn. nov.* Type:—BRAZIL. Rio de Janeiro, 28 November 1882, *Shuttleworth 6690* (holotype K [photo!]).

Distribution:—Brazil (ES, RJ).

6.2. *Pteroglossa glazioviana* (Cogn.) Garay (1982: 350); *Pelexia glazioviana* Cogniaux (1893-1896: 157); *Cogniauxiocharis glazioviana* (Cogn.) Hoehne (1944: 133). Type:—BRAZIL. Rio de Janeiro: “*Morro do Corcovado, Lagoinha*”, 16 March 1873, *Glaziou 6725* (holotype B†; lectotype C, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 167; isolectotypes K [photo!], P [photo!]).

Pelexia glazioviana var. *paraguayensis* Cogniaux (1907: 286). Type:—PARAGUAY. Caaguazú, March 1905, *Hassler 9290* (holotype G [photo!]; isotype CTES).

Distribution:—Argentina (Misiones), Brazil (ES, MG, RJ, SP, PR), Paraguay.

Note:—Barros *et al.* (2013) list this species for Pará, Brazil, but any material for that state was found to confirm this information.

6.3. *Pteroglossa hilariana* (Cogn.) Garay (1982: 350); *Stenorrhynchos hilarianum* Cogniaux (1904-1906: 541); *Pelexia hilariana* (Cogn.) Schlechter (1920: 402); *Lyrochilus hilarianus* (Cogn.) Szlachetko in Szlachetko & Rutkowski (2008: 179), *syn. nov.* Type:—BRAZIL. Minas Gerais, 1816-21, *Saint-Hilaire B1/1917* (holotype P [photo!]).

Lyroglossa bradei Schlechter ex Mansfeld (1928: 245). Type:—BRAZIL. São Paulo: Itirapina, September 1921, *Brade 8129* (holotype B†; lectotype SP! **designated here**; isolectotypes AMES [photo!], HB, R).

Distribution:—Brazil (GO, DF, MG, SP).

Note:—Besides the type specimen, there are no other collections known from the state of Minas Gerais up to this day.

6.4. *Pteroglossa lurida* (M.N.Correa) Garay (1982: 350); *Centrogenium luridum* Correa (1972: 319); *Eltroplectris lurida* (M.N.Correa) Pabst (1974: 470); *Ochyrella lurida* (M.N.Correa) Szlachetko & González-Tamayo (1996: 700). Type:—ARGENTINA. Salta: Orán, between Urundel and Colonia Santa Rosa, 10 April 1971, *Correa 4681*, *Vervoorst & Bacigalupo* (holotype BAB).

Distribution:—Brazil (SC), Argentina (Chaco, Salta), Paraguay.

6.5. *Pteroglossa luteola* Garay (1982: 288); *Cogniauxiocharis luteola* (Garay) Szlachetko in Szlachetko & Rutkowski (2008: 168), *syn. nov.* Type:—ARGENTINA. Corrientes: Mburucuyá, Estancia Santa Teresa, 27 April 1967, *Pedersen 8336* (holotype AMES [photo!]; isotypes C, CTES [photo!], K [photo!]).

Distribution:—Argentina (Corrientes).

6.6. *Pteroglossa macrantha* (Rchb.f.) Schlechter (1920: 450); *Spiranthes macrantha* Reichenbach (1847: 378); *Gyrostachys macrantha* (Rchb.f.) Kuntze (1891: 664); *Stenorrhynchos macranthum* (Rchb.f.) Cogniaux (1893-1896: 176). Type:—BRAZIL. Minas Gerais, 1838, *Claussen 391* (lectotype P [photo!] **designated here**).

Spiranthes albescens Barbosa Rodrigues (1877: 186). Type:—BRAZIL. Minas Gerais: Serra de Caldas, 4 October 1876, *Barbosa Rodrigues s.n.* (holotype RB†; lectotype designated by Buzatto *et al.* 2013: 616: illustration by Barbosa Rodrigues in his unpublished work “Iconographie des Orchideés du Brésil 1: tab. 52”; original illustration RB, reproduced by Sprunger *et al.* 1996: 105!).

Stenorrhynchos macranthum (Rchb.f.) Cogn. f. *robustior* Cogniaux in Chodat & Hassler (1903: 931). Type:—PARAGUAY. Amambay: Río Apa, 1901-02, *Hassler 8265* (lectotype G **designated here**; isolectotype BM).

Stenorrhynchos regium Kraenzlin (1911: 20); *Pteroglossa regia* (Kraenzl.) Schlechter (1920: 451), *syn. nov.* Type:—ARGENTINA. Misiones: Posadas, Loreto, San Ignacio, 30 January 1908, *Ekman 425* (lectotype S-R [photo!], designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 168; isolectotypes CTES, US).

Distribution:—Venezuela (Carnevali *et al.* 2008), Argentina (Misiones), Brazil (MT, TO, DF, GO, MG, RJ, SP, RS), Paraguay.

Notes:—Foster (1958: 60) lists this species for Bolivia, but no material for that country could be verified. Szlachetko & Rutkowski (2008: 168) indicated the specimen *Mosén 4419* (S), collected on 20 October 1895, as the lectotype for *P. macrantha*. However, this proposal is

untenable because this specimen was not cited in the protologue. Thus, here we designate another specimen as lectotype.

We did not find no evidence to consider *Pteroglossa regia* as a different species from *P. macrantha*. The material seen in Argentina is morphologically and genetically indistinguishable from *P. macrantha* of Brazil.

6.7. *Pteroglossa magnifica* Szlachetko (1996a: 49). Type:—PARAGUAY. Amambay: Sierra de Amambay, October 1907, *Hassler 10661a* (holotype BM); the same locality, *Hassler 10661* (paratypes BM, CTES, G); October 1912, *Hassler 11981* (paratypes BM, G).

Distribution:—Paraguay.

6.8. *Pteroglossa rhombipetala* Garay (1982: 289); *Cogniauxiocharis rhombipetala* (Garay) Szlachetko in Szlachetko & Rutkowski (2008: 168), *syn. nov.* Type:—PARAGUAY. Guairá: Itapé, s.d., *Schade s.n.* (holotype AMES 59610 [photo!]; isotype CTES). ARGENTINA. Santa Fé: Villa Guillermina, 16 April 1939, *Meyer 2624* (paratypes AMES [photo!], CTES, LIL).

Distribution:—Argentina, Paraguay.

6.9. *Pteroglossa roseoalba* (Rchb.f.) Salazar & Chase in Salazar *et al.* (2002: 176); *Pelexia roseoalba* Reichenbach (1854: 11); *Centrogenium roseoalbum* (Rchb.f.) Schlechter (1919: 54); *Eltroplectris roseoalba* (Rchb.f.) Hamer & Garay in Hamer (1974: 160); *Callistanthos roseoalbus* (“*roseoalba*”) (Rchb.f.) Szlachetko in Szlachetko & Rutkowski (2008: 165), *syn. nov.* Type:—VENEZUELA. Caracas, s.d., *Wagener s.n.* (lectotype W-R, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 165). COLOMBIA. S.l., s.d., *Moritz 237* (paratypes K-L, W-R).

Pelexia travassosii Rolfe (1892: 330); *Eltroplectris travassosii* (Rolfe) Garay (1982: 318); *Pteroglossa travassosii* (Rolfe) Salazar & Chase in Salazar *et al.* (2002: 176); *Callistanthos travassosii* (Rolfe) Szlachetko in Szlachetko & Rutkowski (2008: 166), *syn. nov.* Type:—BRAZIL. S.l., s.d., *Travassos s.n.* (holotype K 573790 [photo!]).

Distribution:—Mexico (Chiapas, Oaxaca), Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Venezuela, Bolivia, Colombia, Peru, Brazil (PE, BA, MG, ES, RJ, SP), Argentina, Paraguay.

7. *Sacoila* Rafinesque (1837: 86). Type species:—*Sacoila lurida* Rafinesque (1837: 86), *nom. illeg.*

Stenorrhynchos sect. *Stenorrhynchos* subsect. *Lanceolatus* (Aublet 1775: 821) Balogh (1982: 1131), *nom. nud.* Type species:—*Sacoila lanceolata* (Aubl.) Garay (1982: 352).

7.1. *Sacoila argentina* (Griseb.) Garay (1982: 351); *Stenorrhynchos argentinum* Grisebach (1879: 339). Type:—ARGENTINA. Córdoba: San Roque, Sierra Chica, 29 January 1876, *Hieronymus 354* (holotype GOET [photo!]; isotypes CORD [photo!], CTES).

Stenorrhynchos argentinum var. *minor* Cogniaux (1893-1896: 161). Type:—ARGENTINA. Misiones: Candelaria, Santa Ana, Campo Evé, s.d., *Niederlein s.n.* (holotype B?).

Distribution:—Bolivia, Argentina, Paraguay.

Note:—Schinini (2010: 234) cites the species for the south of Brazil, but any material was found to confirm this information.

7.2. *Sacoila cerradicola* Meneguzzo (2013: 25). Type:—BRAZIL. Goiás: Alto Paraíso de Goiás, Road GO-118, km 180, Alto Paraíso de Goiás to Teresina de Goiás, 1521 m, 14°02'06"S, 47°31'33"W, 14 August 2010, *Meneguzzo 571 & Serafim Sobrinho* (holotype RB!; isotypes BHCB, CEN, HUEFS, IAN, ICN, INPA, MBM, SP, UB, UEC).

Distribution:—Brazil (GO).

7.3. *Sacoila duseniana* (Kraenzl.) Garay (1982: 351); *Stenorrhynchos dusenianum* Kraenzlin (1911: 28). Type:—BRAZIL. Paraná: Balsa Nova, Tamanduá, 1 February 1909, *Dusén 7632 & 7648* (lectotype *Dusén 7648* [S, photo!], **designated here**; isolectotypes *Dusén 7632* [AMES, photo!], *Dusén 7648* [HBG, photo!]).

Stenorrhynchos bradei Schlechter in Schlechter & Hoehne (1922: 30). Type:—BRAZIL. São Paulo: São Paulo, Vila Mariana, 18 January 1914, *Brade 7765* (holotype HB).

Distribution:—Brazil (MG, SP, PR and probably SC).

Notes:—Szlachetko & Rutkowski (2008: 159) designated as lectotype both the syntypes (*Dusén 7632 & 7648*), a clearly untenable proposal. Thus, we choose only one of the syntypes (*Dusén 7648* at S) to be the lectotype.

7.4. *Sacoila hassleri* (Cogn.) Garay (1982: 351); *Stenorrhynchos hassleri* Cogniaux (1904-1906: 534). Type:—PARAGUAY. Concepción: Rio Apa, December 1901, *Hassler 8232*

(lectotype BR, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 159; isolectotypes CTES, G).

Distribution:—Suriname (Carnevali *et al.* 2007), Bolivia, Brazil (BA, GO, DF, MG, RJ, SP, PR), Paraguay.

7.5. *Sacoila lanceolata* (Aubl.) Garay (1982: 352); *Limodorum lanceolatum* Aublet (1775: 821); *Serapias neottia* Gmelin (1791: 59); *Neottia lanceolata* (Aubl.) Willdenow (1805: 73); *Stenorrhynchos lanceolatum* (Aubl.) Richard (1817: 37); *Gyrostachys lanceolata* (Aubl.) Kuntze (1891: 664); *Spiranthes lanceolata* (Aubl.) Léon (1946: 358). Type:—DOMINICAN REPUBLIC. S.l., s.d., Plumier *s.n.* (holotype original illustration in Plumier 1758: t. 181, fig. 2!).

Satyrium orchioides Swartz (1788: 118); *Neottia orchioides* (Sw.) Swartz (1806: 1411); *Ibidium crystalligerum* Salisbury (1812: 292), *nom. illeg.*; *Stenorrhynchos orchioides* (Sw.) Richard (1817: 37); *Spiranthes orchioides* (Sw.) Richard (1850: 252); *Gyrostachys orchioides* (Sw.) Kuntze (1891: 664). Type:—JAMAICA. S.l., s.d., Swartz *s.n.* (lectotype UPS 135051, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 160; isolectotypes B-W 16949 [photo!], U).

Neottia plantaginea Hooker (1827: t. 226), *nom. illeg.* (non Rafinesque 1818: 206); *Stenorrhynchos orchioides* var. *plantagineum* (Hook.) Lindley (1840: 478). Type:—TRINIDAD. S.l., s.d., van Schack *s.n.* (holotype K?).

Neottia aphylla Hooker (1828: t. 2797); *Stenorrhynchos aphyllum* (Hook.) Sweet (1830: 485); *Sacoila lurida* Rafinesque (1837: 86), *nom. illeg.*; *Gyrostachys aphylla* (Hook.) Kuntze (1891: 664). Type:—ST. VINCENT. S.l., s.d., Guilding *s.n.* (holotype K 573795 [photo!]).

Serapias aphylla Vellozo (1831: t. 57); *Pelexia aphylla* (Vell.) Schlechter (1920: 400); *Pachygenium aphyllum* (Vell.) Szlachetko, González-Tamayo & Rutkowski (2001: 4). Type:—BRAZIL. Rio de Janeiro, s.d., Vellozo *s.n.* (lectotype original illustration in Vellozo 1831: t. 57!, **designated here**).

Serapias coccinea Vellozo (1831: t. 48); *Stenorrhynchos coccineum* (Vell.) Hoehne (1952: 146). Type:—BRAZIL. Rio de Janeiro, s.d., Vellozo *s.n.* (lectotype original illustration in Vellozo 1831: t. 48!, designated by Buzatto *et al.* 2013: 616).

Serapias tomentosa Vellozo (1831: t. 51); *Pelexia tomentosa* (Vell.) Schlechter (1920: 406). Type:—BRAZIL. Rio de Janeiro, s.d., Vellozo *s.n.* (lectotype original illustration in Vellozo 1831: t. 51!, designated by Buzatto *et al.* 2013: 616).

Stenorrhynchos australe Lindley (1840: 477); *Gyrostachys stenorrhynchus* Kuntze (1891: 664); *Stenorrhynchos orchioides* var. *australe* (Lindl.) Kraenzlin in Kurtz (1893: 296); *Sacoila lanceolata* var. *australis* (Lindl.) Szlachetko (1994b: 437). Type:—BRAZIL. Rio Grande do Sul: Porto Alegre, s.d., *Tweedie* s.n. (holotype K-L).

Stenorrhynchos australe var. *luteoalbum* Reichenbach (1881: 83); *Spiranthes lanceolata* var. *luteoalba* (Rchb.f.) Luer (1972: 120); *Stenorrhynchos cinnabarinum* (Lexarca in La Llave & Lexarca 1825: 3) Lindley (1840: 479) var. *luteoalbum* (Rchb.f.) Schrenk (1977: 103); *Stenorrhynchos lanceolatum* var. *luteoalbum* (Rchb.f.) Schrenk (1977: 103); *Sacoila lanceolata* var. *luteoalba* (Rchb.f.) Sauleda, Wunderlin & Hansen (1984: 308); *Sacoila lanceolata* f. *luteoalba* (Rchb.f.) Meneguzzo (2010: 24). Type:—BRAZIL. Minas Gerais: Lagoa Santa, s.d., *Warming* s.n. (holotype W-R?).

Spiranthes jaliscana Watson (1891: 153); *Stenorrhynchos jaliscanum* (S.Watson) Nash (1895: 158). Type:—MEXICO. Morelos: Cuernavaca, 1500 m, 16 May 1898, *Pringle* 7563 (lectotype F, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 160); Jalisco: damp grassy slopes near San Marcos, 4 June 1893, *Pringle* 4391 (paratypes BM, E, F, P [photo!]).

Stenorrhynchos sancti-antonii Kraenzlin (1905: 8). Type:—ARGENTINA. Salta: Cuesta de San Antonio, 2800 m, January 1897, *Spegazzini* 102718 (holotype HBG [photo!]).

Stenorrhynchos apetalum Kraenzlin (1908: 23); *Sacoila apetalum* (Kraenzl.) Garay (1982: 351). Type:—BOLIVIA. Santa Cruz: “*Im Walde bei Yotau (Misiones de Guarayes)*”, 400 m, September 1907, *Herzog* 372 (holotype HBG [photo!]; isotype Z [photo!]).

Stenorrhynchos sancti-jacobi Kraenzlin (1908: 22); *Skeptrostachys sancti-jacobi* (Kraenzl.) Garay (1982: 360). Type:—BOLIVIA. “*In den campos von Santiago de Chiquitos*”, 600 m, s.d., *Herzog* 125 (holotype S).

Stenorrhynchos riograndense Kraenzlin (1911: 28); *Sacoila riograndensis* (Kraenzl.) Garay (1982: 352). Type:—BRAZIL. Rio Grande do Sul: “*Serra dos Tapes, Cascata*”, 13 December 1892, *Lindman* 941b (holotype S).

Stenorrhynchos guatemalense Schlechter (1918: 376, 432). Type:—GUATEMALA. Alta Verapaz: Cobán, 1000 m, s.d., *Lehmann* s.n. (holotype B†; iconotype AMES).

Stenorrhynchos secundiflorum Lillo & Hauman in Hauman (1920: 134); *Sacoila secundiflora* (Lillo & Hauman) Garay (1982: 352); *Sacoila lanceolata* var. *secundiflora* (Lillo & Hauman) Szlachetko (1994b: 437). Type:—ARGENTINA. Tucumán: El Manantial, 450 m, 5 December 1913, *Lillo* 18010 (holotype LIL; isotypes AMES [photo!], CTES).

Spiranthes lanceolata var. *paludicola* Luer (1971: 19); *Stenorrhynchos cinnabarinum* var. *paludicola* (Luer) Schrenk (1977: 99); *Stenorrhynchos lanceolatum* var. *paludicola*

(Luer) Schrenk (1977: 103); *Sacoila lanceolata* var. *paludicola* (Luer) Saulea, Wunderlin & Hansen (1984: 308); *Sacoila paludicola* (Luer) Brown (2008: 187). Type:—UNITED STATES. Florida: Collier County, Fahkahatchee Strand, June 1965, fl. 15 February 1969, *Luer s.n.* (holotype FTG 116574 [photo!]).

Sacoila lanceolata f. *albidaviridis* Catling & Sheviak (1993: 77). Type:—UNITED STATES. Florida: DeSoto County, May 1967 (holotype original photograph in Luer 1972: 121, t. 33, fig. 6!).

Sacoila lanceolata var. *lanceolata* f. *folsomii* Brown (1999: 170). Type:—UNITED STATES. Florida: Okeechobee County, along the Florida Turnpike, at mile marker 198.5, 27 May 1999, *Brown 99-527* (holotype FLAS [photo!]).

Sacoila lanceolata var. *paludicola* f. *aurea* Brown (2001: 95); *Sacoila paludicola* f. *aurea* (P.M.Br.) Brown (2008: 198). Type:—UNITED STATES. Florida: Collier County, Corkscrew Swamp Sanctuary, 20 March 2001, *Brown s.n.* (holotype original photograph in Brown 2001: 113, plate 9!).

Distribution:—United States (Florida), Mexico (Campeche, Chiapas, Chihuahua, Guerrero, Jalisco, Mexico, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosi, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatan), Belize, Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panama, Bahamas, Cuba, Cayman Islands, Haiti, Dominican Republic, Jamaica, Puerto Rico, Trinidad & Tobago, French Guiana, Suriname, Guyana, Venezuela, Colombia, Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil (AM, PA, AP, MT, MS, GO, DF, MA, PI, PB, CE, PE, AL, SE, BA, ES, MG, RJ, SP, PR, SC, RS), Argentina, Paraguay and probably Uruguay.

7.6. *Sacoila pedicellata* (Cogn.) Garay (1982: 352); *Stenorrhynchos pedicellatum* Cogniaux in Chodat & Hassler (1903: 932); *Sacoila lanceolata* var. *pedicellata* (Cogn.) Szlachetko (1994b: 437). Type:—PARAGUAY. Caaguazú: near Rio Tapiraguay, 1898-99, *Hassler 4323* (lectotype P, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 160; isolectotypes CTES, G).

Stenorrhynchos pedicellatum var. *major* Cogniaux in Chodat & Hassler (1903: 932). Type:—PARAGUAY. “*Iter ad Yerbales Montium, Sierra de Maracayu, in regione Vicine San Estanislao*”, 1898-99, *Hassler 4311* (lectotype G [photo!], **designated here**; isolectotypes BM [photo!], K [photo!], NY [photo!], P [photo!], UC [photo!], W).

Distribution:—Brazil (MT, GO, DF, MG, PR), Argentina (Salta), Paraguay.

7.7. *Sacoila squamulosa* (Kunth) Garay (1982: 352); *Neottia squamulosa* Kunth in Humboldt *et al.* (1816: 332); *Stenorrhynchos squamulosum* (Kunth) Sprengel (1826: 710); *Spiranthes squamulosa* (Kunth) León (1946: 357); *Sacoila lanceolata* var. *squamulosa* (Kunth) Szlachetko (1994b: 437). Type:—COLOMBIA. Bolívar: near Turbaco and Mahates, s.d., *Bonpland 1423 & Humboldt* (holotype P [photo!]).

Distribution:—United States (Florida), Costa Rica, Cayman Islands, Cuba, Jamaica, Colombia.

8. *Skeptrostachys* Garay (1982: 358). Type species:—*Skeptrostachys rupestris* (Lindley 1840: 474) Garay (1982: 360).

Stenorrhynchos sect. *Stenorrhynchos* subsect. *Paraguayenses* Burns-Balogh (1983: 368). Type species:—*Stenorrhynchos paraguayense* (Reichenbach 1852: 230) Cogniaux (1893-1896: 162).

8.1. *Skeptrostachys arechavaletanii* (Barb.Rodr.) Garay (1982: 359); *Stenorrhynchos arechavaletanii* Barbosa Rodrigues (1907: 99). Type:—URUGUAY. S.l., 1905, *Arechavaleta s.n.* (lectotype original illustration in Barbosa Rodrigues 1907: tab. 21!, designated by Buzatto *et al.* 2013: 616).

Stenorrhynchos exaltatum Kraenzlin (1911: 29). Type:—BRAZIL. Rio Grande do Sul: Pelotas, “*Serra dos Tapes, Cascata*”, 12 December 1892, *Lindman A941* (holotype S).

Stenorrhynchos lateritium Kraenzlin (1911: 21). Type:—BRAZIL. Rio Grande do Sul: Pelotas, “*Serra dos Tapes*”, 13 December 1893, *Lindman 781* (holotype S).

Distribution:—Brazil (GO, MG, SP, PR, SC, RS), Uruguay.

Note:—Pabst & Dungs (1975: 130) list the species for Argentina and Paraguay, but no material was found to confirm this.

8.2. *Skeptrostachys balanophorostachya* (Rchb.f. & Warm.) Garay (1982: 359); *Spiranthes balanophorostachya* Reichenbach & Warming in Reichenbach (1881: 84); *Gyrostachys balanophorostachya* (Rchb.f. & Warm.) Kuntze (1891: 664); *Stenorrhynchos balanophorostachyus* (Rchb.f. & Warm.) Cogniaux (1893-1896: 161). Type:—BRAZIL. Minas Gerais: Lagoa Santa, s.d., *Warming s.n.* (lectotype W-R, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 162; isolectotype P 362976 [photo!]).

Sarcoglottis multiflora Barbosa Rodrigues (1882: 287); *Spiranthes multiflora* (Barb.Rodr.) Jackson (1895: 966). Type:—BRAZIL. Minas Gerais: Caldas, “*Serra da Pedra Branca*”,

18 March 1849, *Regnell III/1688* (lectotype S 09-16728, designated by Buzatto *et al.* 2013: 615; islectotype P 362975 [photo!]).

Stenorrhynchos canterae Barbosa Rodrigues (1901: 48). Type:—URUGUAY. Rivera: Tranquera Station, s.d., *Cantera s.n.* (lectotype original illustration in Barbosa Rodrigues 1901: tab. 6, fig. C!, designated by Buzatto *et al.* 2013: 615).

Stenorrhynchos stenophyllum Cogniaux (1907: 289); *Skeptrostachys stenophylla* (Cogn.) Szlachetko (1994b: 418). Type:—BRAZIL. Rio Grande do Sul, 1816-21, *Saint-Hilaire C2/1834 bis* (lectotype P 345824 [photo!] **designated here**; islectotypes BR [photo!], P 362974 [photo!]).

Distribution:—Brazil (MT, MG, RJ, SP, PR, SC, RS), Paraguay, Uruguay.

Notes:—Pabst & Dungs (1975: 130) and Schinini (2010: 242) cited the species for Argentina, but no material could be corroborated for this country. Szlachetko & Rutkowski (2008: 164) designated as lectotype for *Stenorrhynchos stenophyllum* the specimen *Saint-Hilaire C2/1834 bis* supposedly at B but destroyed, a clearly untenable proposal. Therefore, we choose an isotype to be the lectotype.

8.3. *Skeptrostachys berroana* (Kraenzl.) Garay (1982: 359); *Stenorrhynchos berroanum* Kraenzlin (1911: 26); *Pelexia berroana* (Kraenzl.) Schlechter (1920: 400). Type:—URUGUAY. Lavalleja: Cerro Verdun, 4 December 1899, *Berro 1408* (lectotype S, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 162; islectotypes HBG [photo!], MVFA [photo!]).

Distribution:—Uruguay.

8.4. *Skeptrostachys congestiflora* (Cogn.) Garay (1982: 359); *Stenorrhynchos congestiflorum* Cogniaux (1904-1906: 539). Type:—BRAZIL. Minas Gerais: Ouro Preto, “*Pico do Itacolomi*”, 14 November 1891, *Schwacke 7444* (lectotype BR [photo!], designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 162); Minas Gerais: Ouro Preto, “*Pedra do Amolar*”, 2 November 1894, *Schwacke 11152* (paratypes BR [photo!], RB); Minas Gerais, 1816-21, *Saint-Hilaire B2/2125* (paratype P [photo!]).

Distribution:—Brazil (BA, MG, RS). It is likely that this species also occurs in the state of Goiás (Brazil), as the type of vegetation favoured by this species usually lives (rocky fields) is widespread there.

8.5. *Skeprostachys correana* Szlachetko (1996b: 857). Type:—ARGENTINA. Corrientes: Itatí, November 1895, *Spegazzini 109612* (holotype HBG).

Distribution:—Argentina (Corrientes).

8.6. *Skeprostachys disoides* (Kraenzl.) Garay (1982: 359); *Spiranthes disoides* Kraenzlin (1911: 33). Type:—BRAZIL. Paraná: Ponta Grossa, Vila Velha, 24 February 1910, *Dusén 9480* (lectotype S, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 163; isolectotypes AMES [photo!], MBM, MO [photo!], NY).

Stenorrhynchos densum Hauman (1917: 367). Type:—ARGENTINA. Misiones: Candelaria, Bonpland, March 1910, *Jørgensen-Hansen 671* (holotype BAB [photo!]).

Distribution:—Brazil (MG, PR), Argentina (Misiones), Paraguay.

8.7. *Skeprostachys gigantea* (Cogn.) Garay (1982: 359); *Stenorrhynchos giganteum* Cogniaux (1904-1906: 533). Type:—BRAZIL. Goiás: between the Brancas and the Pico da Piedade, 24 January 1895, *Glaziou 22165* (lectotype BR [photo!], designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 163; isolectotypes G [photo!], K [photo!], P [photo!]).

Distribution:—Brazil (TO, GO, DF, MG, SP and probably RS), Argentina (Corrientes, Misiones), Paraguay, Uruguay.

8.8. *Skeprostachys latipetala* (Cogn.) Garay (1982: 360); *Stenorrhynchos latipetalum* Cogniaux (1907: 286). Type:—BRAZIL. Minas Gerais, 1816-21, *Saint-Hilaire C1/245* (lectotype P [photo!] **designated here**; isolectotype BR [photo!]).

Distribution:—Brazil (BA, MG).

Note:—No material from the state of Minas Gerais has been gathered other than the type specimen.

8.9. *Skeprostachys montevidensis* (Barb.Rodr.) Garay (1982: 360); *Stenorrhynchos montevidense* Barbosa Rodrigues (1907: 98). Type:—URUGUAY. Montevideo: Pan d'Assucar, s.d., *Arechavaleta s.n.* (lectotype original illustration in Barbosa Rodrigues: 1907, tab. 20, fig. B!, designated by Buzatto *et al.* 2013: 615).

Stenorrhynchos polyanthum Kraenzlin (1911: 30). Type:—BRAZIL. Paraná: Ponta Grossa, Guabiroba River, 14 April 1909, *Dusén 7955* (lectotype S [photo!] **designated here**; isolectotype AMES [photo!]).

Distribution:—Brazil (MG, SP, PR, RS), Uruguay.

8.10. *Skeprostachys paraguayensis* (Rchb.f.) Garay (1982: 360); *Spiranthes paraguayensis* Reichenbach (1852: 230); *Stenorrhynchos paraguayense* (Rchb.f.) Cogniaux (1893-1896: 162). Type:—PARAGUAY. S.l., s.d., *Fleischer s.n.* (holotype B†; lectotype BR 5197668 [photo!], **designated here**; isoelectotype P 00362962 [photo!]).

Stenorrhynchos pachystachyum Kraenzlin (1911: 30). Type:—BRAZIL. Paraná: Ponta Grossa, Vila Velha, s.d., *Dusén 7661* (holotype S-R [photo!]).

Distribution:—Brazil (MG, SP, PR, SC, RS), Argentina (Chaco, Corrientes, Misiones), Paraguay, and probably Uruguay.

Note:—Szlachetko & Rutkowski (2008: 163) designated as lectotype a specimen *sine loco and coll.* supposedly at B but destroyed, a clearly untenable proposal. Therefore, we choose an isotype to be the lectotype.

8.11. *Skeprostachys paranahybae* (Kraenzl.) Garay (1982: 360); *Spiranthes paranahybae* Kraenzlin (1913: 110); *Stenorrhynchos paranahybae* (Kraenzl.) Pabst (1978: 260). Type:—BRAZIL. Paraná: Rio Paranaíba, s.d., *Pohl 770* (lectotype S, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 163; isoelectotype AMES [photo!]).

Distribution:—Brazil (PR).

Note:—According to Pabst & Dungs (1975: 130), it occurs also in the state of Minas Gerais, but there are no collections to confirm this.

8.12. *Skeprostachys rupestris* (Lindl.) Garay (1982: 360); *Spiranthes rupestris* Lindley (1840: 474); *Gyrostachys rupestris* (Lindl.) Kuntze (1891: 664); *Stenorrhynchos rupestre* (Lindl.) Cogniaux (1893-1896: 179). Type:—URUGUAY. Montevideo, s.d., *Tweedie 532* (holotype K [photo!]; isotype P).

Spiranthes rupestris var. *parviflora* Cogniaux (1893-1896: 214). Type:—BRAZIL. Minas Gerais: São João Del Rey, s.d., *Barbosa Rodrigues s.n.* (holotype RB†; lectotype illustration by Barbosa Rodrigues in his unpublished work “Iconographie des Orchideés du Brésil 1: tab. 68, fig. B”; original illustration RB, reproduced by Sprunger *et al.* 1996: 122!, **designated here**).

Distribution:—Suriname, Brazil (MG, SP, PR, RS), Paraguay, Uruguay.

8.13. *Skeprostachys stenorrhynchoides* Szlachetko (1994b: 418). Type:—BRAZIL. Minas Gerais, 1816-21, *Saint-Hilaire B2/2410* (holotype P [photo!]).

Distribution:—Brazil (MG).

Note:—Known only from the type material.

9. *Stenorrhynchos* Richard ex Sprengel (1826: 677, 709). Lectotype (designated by Britton & Millspaugh 1920: 86):—*Stenorrhynchos speciosum* (Jacquin 1790: 16, t. 600) Richard ex Sprengel (1826: 709).

Stenorrhynchos A. Richard in Bory de Saint-Vincent (1827: 309), *orth. var.*

Stenorrhynchos Lindley (1845: 386), *orth. var.*

9.1. *Stenorrhynchos albidomaculatum* Christenson (2005: 12). Type:—COLOMBIA. Santander: Quebrada de Pais, N of La Baja, 3200 m, 31 January 1927, *Killip 18776 & Smith* (holotype NY).

Spiranthes colorata var. *maculata* Brown (1883: 210), *syn. nov.* Type:—COLOMBIA. Norte de Santander: Ocaña, 5 January 1882, *Shutteworth s.n.* (holotype K 573800 [photo!]).

Distribution:—Colombia, Venezuela.

Note:—*Spiranthes colorata* var. *maculata* was considered synonym of *Stenorrhynchos speciosum* by some authors (Garay 1978a, Hamer 1985, Govaerts *et al.* 2010). However, both *S. colorata* var. *maculata* and *S. albidomaculatum* were originally described based on Colombian specimens and share the characteristic of presenting leaves with white macules, an attribute completely absent in *S. speciosum*. Therefore, we propose this new synonym.

9.2. *Stenorrhynchos austrocompactum* Christenson (2005: 16). Type:—PERU. Amazonas or San Martin, exported by Agroriente (Moyobamba), flowered in cultivation in Encinetas, California at Andy's Orchids, January 2004, *Christenson 2094* (holotype K).

Distribution:—Peru.

Note:—There are no actual field collections of this species, only the type specimen.

9.3. *Stenorrhynchos glicensteinii* Christenson (2005: 20). Type:—MEXICO. Chiapas: Pueblo Nuevo, Altamirano, 1800 m, 12 January 1988, *Pérez M. 144* (holotype NY; isotype MO).

Distribution:—Mexico (Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Oaxaca, Veracruz), Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panama.

9.4. *Stenorrhynchos millei* Schlechter (1917: 51). Type:—ECUADOR. Pichincha: towards Lloa, fl. July 1871 and May 1903, *Sodirol 143* (holotype QPLS; isotype B†); “*In regione andina prope Pifi*”, fl. May 1877, *Mille s.n.* (syntype B†).

Distribution:—Ecuador.

9.5. *Stenorrhynchos nutans* Kunth & Bouché in Link *et al.* (1848: 12); *Spiranthes nutans* (Kunth & C.D.Bouché) Garay & Dunsterville in Dunsterville & Garay (1976: 39); *Stenorrhynchos speciosum* var. *nutans* (Kunth & C.D.Bouché) Szlachetko (1994b: 419). Type:—VENEZUELA. Caracas, s.d., *Moritz s.n.* (holotype B†).

Distribution:—Venezuela.

9.6. *Stenorrhynchos speciosum* (Jacq.) Richard ex Sprengel (1826: 709); *Neottia speciosa* Jacquin (1790: 16, t. 600); *Serapias speciosa* (Jacq.) Gmelin (1791: 59); *Ibidium speciosum* (Jacq.) Salisbury (1812: 291); *Spiranthes speciosa* (Jacq.) Lilja (1842: 113), *nom. illeg.* (non (Presl 1827: 96) Lindley 1840: 475); *Spiranthes colorata* Brown (1883: 210), *nom. illeg.* (non (Blume 1825: 409) Hasskarl 1844: 47); *Spiranthes colorans* Hemsley (1884: 300), *orth. var.*; *Gyrostachys speciosa* (Jacq.) Kuntze (1891: 664); *Spiranthes richardi* Autran & Durand (1896: 351), *nom. illeg.*; *Ibidium coloratum* (N.E.Br.) House in Bailey (1915: 1636). Type:—*Sine loc.*, cultivated in the hothouses of Schönbrunn, *Jacquin s.n.* (lectotype W-R, designated by Szlachetko & Rutkowski 2008: 155; isolectotype W; iconotype P).

Distribution:—Cuba, Dominican Republic, Jamaica, Puerto Rico.

9.7. *Stenorrhynchos vaginatum* (Kunth) Sprengel (1826: 710); *Neottia vaginata* Kunth in Humboldt *et al.* (1816: 331); *Gyrostachys vaginata* (Kunth) Kuntze (1891: 664); *Spiranthes vaginata* (Kunth) Lindley ex Jackson (1895: 967). Type:—ECUADOR. Loja, s.d., *Humboldt 2120* (holotype P [photo!]).

Distribution:—Venezuela, Colombia, Ecuador, Peru.

10. *Thelyschista* Garay (1982: 377). Type species:—*Thelyschista ghillanyi* (Pabst 1977: 166) Garay (1982: 378).

10.1. *Thelyschista ghillanyi* (Pabst) Garay (1982: 378); *Odontorrhynchus ghillanyi* Pabst (1977: 166). Type:—BRAZIL. Bahia: Chapada da Calabocaria, between Mucugê and

Andaraí, 15 February 1974, *Ghillány 001/74* (holotype HB); Bahia, Lençóis, 800 m, 15 February 1974, *Ghillány s.n.* (paratype HB).

Distribution:—Brazil (BA, GO).

Incertae sedis

1. *Sacoila foliosa* (Schltr.) Garay (1982: 351); *Stenorrhynchos foliosum* Schlechter (1921a: 12).

Type:—BRAZIL. Rio de Janeiro: Petrópolis, September 1884, *Germain s.n.* (B†).

Distribution:—Brazil (RJ).

Notes:—The type collection of this species (*Germain s.n.*) was destroyed during World War II, as the most orchid types deposited at B (Merrill 1943, Butzin 1978, 1981, Hiepko 1987). Although Pabst & Dungs (1975) have cited this species to Brazil (Rio de Janeiro), they did not provide voucher information and/or illustrations supporting its presence. Unfortunately, Schlechter (1921a) only cited the specimen *Germain s.n.* in the protologue and not provided an illustration that could be considered as a candidate for a lectotype. No other specimens have been registered since then; thus, we are unable to recognise this species.

2. *Stenorrhynchos vulnerarium* Rojas Acosta (1918: 160). Type: not located.

Distribution:—Argentina (Corrientes).

Notes:—The description of this species is very poor, failing to indicate diagnostic characteristics to differentiate it. The type specimen was not located. The author's comments are about the medical proprieties and uses of the plant. Thus, we are not able to confirm the identity of this plant.

Acknowledgements

This paper is part of the first author's Ph.D. thesis at the Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente – Instituto de Botânica (IBt). We thank Jefferson Prado (SP) for suggestions on typification. LRSB thanks the São Paulo Research Foundation (FAPESP, projects 2010/16353-1 and 2012/19778-9) for his scholarship. FB thanks the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for his research productivity grant (project 306889/2010-2) and Research Grant (Universal, project 473722/2011-9).

References

- Alves, R.J.V. (1991) *Liparis beckeri* and *Pelexia phallocallosa* – two new species of Brazilian Orchidaceae. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 26: 171-179.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02912864>
- Alves, R.J.V. (1992) A new species of *Mesadenella* Pabst et Garay (*Spiranthinae* - Orchidaceae). *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 27: 61-67.
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02854655>
- Angely, J. (1973) *Flora Analítica e fitogeográfica do Estado de São Paulo, 6º volume*. Phytton, São Paulo, pp. 1085-1389.
- Aublet, J.B.C.F. (1775) *Histoire des plantes de la Guiane française. Tome Second*. Pierre-François Didot jeune, Londres/Paris, pp. 621-976.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.674>
- Autran, E.J.B. & Durand, T.A. (1896) *Hortus Boissierianus*. George & C^{ie}, Genève et Basel, 572 pp.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.10946>
- Bailey, L.H. (1915) *The standard cyclopedia of horticulture; Vol. III: F-K*. Macmillan & Co., New York, pp. 1201-1760.
- Balogh, P. (1981) Nomenclatural notes on the genus *Schiedeella* Schlechter (Orchidaceae). *Orquídea (Mexico City)* 8: 38-40.
- Balogh, P. (1982) Generic redefinition in subtribe *Spiranthinae* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 69: 1119-1132.
<http://dx.doi.org/10.2307/2443086>
- Barbosa Rodrigues, J. (1877) *Genera et species Orchidearum novarum quas collegit, descripsit et iconibus illustravit I*. Typographia Nacional, Sebastianopolis [Rio de Janeiro], 206 pp.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.585>
- Barbosa Rodrigues, J. (1882) *Genera et species Orchidearum novarum quas collegit, descripsit et iconibus illustravit II*. Typographia Nacional, Sebastianopolis [Rio de Janeiro], 295 pp.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.585>
- Barbosa Rodrigues, J. (1901) Orchidaceae Lindl. *Contributions du Jardin Botanique de Rio de Janeiro* 1: 47-53, t. 6.

- Barbosa Rodrigues, J. (1907) Ordo Orchidaceae Lindl. *Contributions du Jardin Botanique de Rio de Janeiro* 4: 97-104, t. 19-23.
- Barros, F., Vinhos, F., Rodrigues, V.T., Barberena, F.F.V.A., Fraga, C.N., Pessoa, E.M. & Menini Neto, L. (2013) Orchidaceae. In: Forzza, R.C. *et al.* (orgs.). *Lista de espécies da flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179> (accessed: 4 September 2013).
- Batista, J.A.N., Meneguzzo, T.E.C., Salazar, G.A., Ramalho, A.J. & Bianchetti, L.B. (2011) Phylogenetic placement, taxonomic revision and a new species of *Nothostele* (Orchidaceae), an enigmatic genus endemic to the cerrado of central Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 165: 348-363.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01113.x>
- Bennett, D.E., Jr. & Christenson, E.A. (2001) *Icones Orchidacearum Peruvianarum*. A. Pastorelli de Bennett, Lima, t. 601-800.
- Blume, C.L. (1825) *Bijdragen tot de Flora van Nederlandsch Indië, 8ste Stukken*. Lands Drukkerij, Batavia, pp. 355-434.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.395>
- Borba, E.L., Salazar, G.A., Mazzoni-Viveiros, S. & Batista, J.A.N. (2014) Phylogenetic position and floral morphology of the Brazilian endemic, monospecific genus *Cotylolabium*: a sister group for the remaining Spiranthinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 175: 29-46.
<http://dx.doi.org/10.1111/boj.12136>
- Bory de Saint-Vincent, J.B.G.M. (1827) *Dictionnaire classique d'histoire naturelle. Tome Douzième: NUA-PAM*. Rey et Gravier; Badouin frères, Paris, 634 pp.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.33901>
- Britton, N.L. & Millspaugh, C.F. (1920) *The Bahama Flora*. The authors, New York, 695 pp.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.1494>
- Brown, N.E. (1883) *Spiranthes colorata* var. *maculata*, N. E. Br. *The Gardeners' Chronicle* 19: 210.
- Brown, P.M. (1999) Recent taxonomic and distribution notes from Florida 2: A striking new color form of *Sacoila lanceolata*. *North American Native Orchid Journal* 5: 169-173.
- Brown, P.M. (2001) Recent taxonomic and distribution notes from Florida 9. *North American Native Orchid Journal* 7: 91-98.

- Brown, P.M. (2008) The genus *Sacoila* (Orchidaceae) in the continental United States and a new combination. *North American Native Orchid Journal* 14: 193-199.
- Brummitt, R.K. & Powell, C.E. (1992) *Authors of plant names*. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, 732 pp.
- Burns-Balogh, P. (1983) Nomenclatural notes in Spiranthinae (Orchidaceae). *Phytologia* 52: 367-368.
- Burns-Balogh, P. (1986) A synopsis of Mexican Spiranthinae. *Orquídea (Mexico City)* 10: 76-96.
- Burns-Balogh, P. & Robinson, H. (1983) Evolution and phylogeny of the *Pelexia* alliance (Orchidaceae: Spiranthoideae: Spiranthinae). *Systematic Botany* 8: 263-268.
<http://dx.doi.org/10.2307/2418480>
- Butzin, F. (1978) In Berlin vorhandene Typen von Schlechtens Orchideenarten. *Willdenowia* 8: 401-407.
- Butzin, F. (1981) Typenstudien im Berliner Orchideen-Herbar: Diverse markierte Typen. *Willdenowia* 11: 119-121.
- Buzatto, C.R., Singer, R.B., Romero-González, G.A., van den Berg, C. & Salazar, G.A. (2013) Typifications and taxonomic notes in species of Brazilian *Goodyerinae* and *Spiranthinae* (Orchidaceae) described by José Vellozo and Barbosa Rodrigues. *Taxon* 62: 609-621.
<http://dx.doi.org/10.12705/623.10>
- Campacci, M.A. & Kautsky, R.A. (1999) *Eltroplectris assumptaoana* Campacci & Kautsky sp. nov. *Boletim CAOB* 38: 108-111.
- Catling, P.M. & Sheviak, C.J. (1993) Taxonomic notes on some North American orchids. *Lindleyana* 8: 77-81.
- Carnevali, G., Christenson, E., Foldats, E., Ramírez-Morillo, I.M., Romero-González, G.A., Vargas, C.A. & Werkhoven, M. (2007) Orchidaceae. In: Funk, V.A., Berry, P.E., Alexander, S., Hollowell, T.H. & Kelloff, C.L. Checklist of the plants of the Guiana Shield (Venezuela: Amazonas, Bolivar, Delta Amacuro; Guyana, Surinam, French Guiana). *Contributions from the United States National Herbarium* 55: 118-149.
- Carnevali, G., Gerlach, G. & Romero-González, G.A. (2008) Orchidaceae. In: Hokche, O., Berry, P.E. & Huber, O. (eds.) *Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela*. Fundación Instituto Botánico de Venezuela, Caracas, pp. 753-789.
- Chiron, G.R., Medeiros, A.S. & Archila, F. (2013) Une nouvelle espèce de *Buchtienia* (Orchidaceae, Spiranthinae) du sud-est brésilien. *Richardiana* 13: 244-250.

- Chodat, R.L. & Hassler, E. (1903) *Plantae Hasslerianae* soit énumération des plantes récoltées au Paraguay par le D^r Émile Hassler, d'Aarau (Suisse) de 1885 à 1902. *Bulletin de l'Herbier Boissier*, 2^{me} série 3: 906-941.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.45112>
- Christenson, E.A. (2005) Drei neue *Stenorrhynchos*-Arten/Three new species of *Stenorrhynchos*. *Journal für den Orchideenfreund* 12: 5-25.
- Cogniaux, A.C. (1893-1896) Orchidaceae. In: Martius, C.F.P., Eichler, A.G. & Urban, I. (eds.). *Flora Brasiliensis. Volumen 3, Pars 4*. Typographia Regia, Monachii, pp. 1-672.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.454>
- Cogniaux, A.C. (1896) Aufzählung der neuen und pflanzengeographisch wichtigen Pflanzen der Ule'schen Sammlung. In: Taubert, P. Beiträge zur Kenntnis der Flora des centralbrasilianischen Staates Goyaz. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 21: 402-457.
- Cogniaux, A.C. (1904-1906) Orchidaceae. In: Martius, C.F.P., Eichler, A.G. & Urban, I. (eds.). *Flora Brasiliensis. Volumen 3, Pars 6*. Typographia Regia, Monachii, pp. 1-604.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.454>
- Cogniaux, A.C. (1907) Notes sur les Orchidées du Brésil et des régions voisines. *Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique* 43: 266-356.
- Cogniaux, A.C. (1909a) Orchidaceae. In: Urban, I. *Symbolae Antillanae seu Fundamenta Florae Indiae Occidentalis, Volumen 6*. Fratres Borntraeger, Lipsiae, pp. 293-696.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.144>
- Cogniaux, A.C. (1909b) Orchidées nouvelles de la Jamaïque, de l'Herbier "Krug et Urban", de Berlin. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 7: 121-123.
<http://dx.doi.org/10.1002/fedr.19090070709>
- Correa, M.N. (1955) Las orquídeas argentinas de la Tribu *Polychondreae* Schlechter, Subtribu *Spiranthinae* Pfitzer. *Darwiniana* 11: 24-88.
- Correa, M.N. (1972) Una nueva especie y dos nuevas citas de Orchidaceae para la flora de Jujuy. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 14: 319-324.
- Cribb, P.J. & Toscano de Brito, A. (1996) Introduction and history. In: Sprunger, S., Cribb, P.J. & Toscano de Brito, A. (eds.). *João Barbosa Rodrigues: Iconographie des orchidées du Brésil, Volume 1: The illustrations*. Friedrich Reinhardt Verlag, Basle, pp. 23-30.
- Dodson, C.H. (1994) *Eltroplectris dalessandroi* Dodson. *Orquideología* 19: 140-142.
- Dodson, C.H. & Romero, G.A. (1993) Three new orchid species from eastern Ecuador. *Lindleyana* 8: 193-197.

- Dunsterville, G.C.K. & Garay, L.A. (1976) *Venezuelan Orchids Illustrated, Volume VI*. Andre Deutsch/Harvard University Printing Office, Cambridge, 463 pp.
- Foster, R.C. (1958) A catalogue of the ferns and flowering plants of Bolivia. *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University* 184: 1-223.
- Garay, L.A. (1978a) 225(1).Orchidaceae: Cypripedioideae, Orchidoideae and Neottioideae. In: Harling, G.W. & Sparre, B. *Flora of Ecuador, No. 9*. University of Göteborg & Swedish Museum of Natural History, Göteborg & Stockholm, pp. 1-305.
- Garay, L.A. (1978b) Studies in American orchids X. *Botanical Museum Leaflets* 26: 1-38.
- Garay, L.A. (1982 [1980]) A generic revision of the Spiranthinae. *Botanical Museum Leaflets* 28: 278-425.
- Garay, L.A. & Sweet, H.R. (1972) Notes on West Indian Orchids, II. *Journal of the Arnold Arboretum* 53: 390-398.
- Gmelin, J.F. (1791) *Caroli a Linné, ... Systema naturae per regna tria naturae. Editio decima tertia, aucta, reformata. Tomus II, pars I*. Cura Jo. Frid. Gmelin, Leipzig, 884 pp.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.36932>
- Górniak, M., Mytnik-Ejsmont, J., Rutkowski, P., Tukałło, P., Minasiewicz, J. & Szlachetko, D.L. (2006) Phylogenetic relationships within the subtribe Spiranthinae s.l. (Orchidaceae) inferred from the nuclear ITS region. *Biodiversity: Research and Conservation* 1-2: 18-24.
- Govaerts, R., Bernet, P., Kratochvil, K., Gerlach, G., Carr, G., Alrich, P., Pridgeon, A.M., Pfahl, J., Campacci, M.A., Holland Baptista, D., Tigges, H., Shaw, J., Cribb, P.J., George, A., Kreuz, K. & Wood, J. (2010) *World Checklist of Orchidaceae*. Royal Botanic Gardens, Kew. Available from: <http://apps.kew.org/wcsp/> (accessed: 14 March 2013).
- Grisebach, A.H.R. (1864) *Flora of the British West Indian Islands, parts 6-7*. Lovell Reeve & Co., London, pp. 507-789.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.143>
- Grisebach, A.H.R. (1879) Symbolae ad Floram argentinam. *Abhandlungen der Königlichen Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen* 24: 1-345.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.60503>
- Hamer, F. (1974) *Las orquídeas de El Salvador. The orchids of El Salvador. Die Orchideen El Salvadors, volume 1*. Ministerio de Educación, Dirección de Publicaciones, San Salvador, 374 pp.
- Hamer, F. (1985) *Orchids of Nicaragua, Part 6*. Icones Plantarum Tropicarum 13: t. 1201-1300.

- Hasskarl, J.K. (1844) *Catalogus plantarum in Horto Botanico Bogoriensi cultarum alter*. Typis Officinae, Bataviae, 391 pp.
- Hauman, L.L. (1917) Quelques Orchidées de l'Argentine. *Anales del Museo Nacional de Historia Natural de Buenos Aires* 29: 353-389.
- Hauman, L.L. (1920) Orchidées argentines (deuxième série). *Anales de la Sociedad Científica Argentina* 90: 95-154.
- Hemsley, W.B. (1884) *Biologia Centrali-Americana. Botany, Vol. III*. R. H. Porter and Dulau & Co., London, 711 pp.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.730>
- Hiepko, P. (1987) The collections of the Botanical Museum Berlin-Dahlem (B) and their history. *Englera* 7: 219–252.
- Hoehne, F.C. (1919) Genero e especies novas e pouco conhecidas de Orchidaceas dos arredores da cidade de S. Paulo. *Arquivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro* 22: 71-75.
- Hoehne, F.C. (1944) Orchidaceas novas para a flora do Brasil, dos herbários do Inst. de Botânica, Jardim Botânico, Rio de Janeiro, e Comissão de Linhas Telegráficas, Estratégicas de Mato-Grosso ao Amazonas. *Arquivos de Botânica do Estado de São Paulo, nova série, formato maior* 1: 125-134.
- Hoehne, F.C. (1945) Orchidaceas. In: Hoehne, F.C. (ed.). *Flora Brasílica, Vol. 12, 2*. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo, São Paulo, pp. 1-389.
- Hoehne, F.C. (1952) As Orchidáceas referidas e desenhadas para a “Flora Fluminensis” de Frei José Mariano da Conceição Vellozo e sua atual nomenclatura. *Arquivos de Botânica do Estado de São Paulo, nova série, formato maior* 2: 141-156.
- Hooker, W.J. (1827) *Exotic flora. Vol. III*. William Blackwood, Edinburgh/T. Cadell, London, pl. 151-232.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.51264>
- Hooker, W.J. (1828) *Curtis's Botanical Magazine* 55: pl. 2791-2875.
- Humboldt, F.W.H.A., Bonpland, A.J.A. & Kunth, C.S. (1816 [1815]) *Nova genera et species plantarum. Tomus Primus*. Sumtibus Librariae Graeco-Latino-Germanicae, Lutetiae Parisiorum, 377 pp.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.640>
- International Plant Names Index. (2014) The International Plant Names Index. Available from: <http://www.ipni.org/> (accessed: 10 February 2014).
- Jackson, B.D. (1895) *Index Kewensis. Volume II, Part IV*. Clarendon Press, Oxford, pp. 657-1299.

- <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.66720>
- Jacquín, N.J. (1790) *Icones Plantarum Rariorum. Vol. III.* Christianum Fridericum Wappler; Londini/B. White et filium; Lugduni Batavorum/S. et J. Luchtman; Argentorati/ A. König, bibliopolas, Vindobonae [Wien], pp. 1-24, pl. 455-648.
- <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.329>
- Jiménez-A., J.J. (1962) Novelties in the flora of Santo Domingo (Hispaniola) II. *Phytologia* 8: 325-328.
- Ker Gawler, J.B. (1824) *Neottia bicolor. The Botanical Register, vol. 10.* James Ridgway, London, pl. 778-867.
- Kraenzlin, F.W.L. (1905) Orchidaceae americanae. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie. Beiblatt zu den Botanischen Jahrbüchern Nr. 80* 36: 7-10.
- Kraenzlin, F.W.L. (1908) *Orchidaceae novae Bolivienses. Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 6: 18-23.
- <http://dx.doi.org/10.1002/fedr.19080060107>
- Kraenzlin, F.W.L. (1911) Beiträge zur Orchideenflora Südamerikas. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar* 46: 1-105.
- Kraenzlin, F.W.L. (1913) Neue südamerikanische Orchideen. *Annalen des K.K. Naturhistorischen Hofsmuseums* 27: 109-112.
- Kraenzlin, F.W.L. (1915) Orchidaceae quaedam Americanae. *Arkiv för Botanik* 14: 1-8.
- Kuntze, C.E.O. (1891) *Revisio generum plantarum, Pars II.* Commissionem: Arthur Felix, Leipzig; Dulau & Co., London; U. Hoepli, Milano; Gust. E. Stechert, New York; Charles Klincksieck, Paris, pp. 377-1011.
- <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.327>
- Kurtz, F. (1893) Sertum Cordobense – observaciones sobre plantas nuevas, raras ó dudosas de la Provincia de Córdoba. *Revista del Museo de La Plata* 5: 281-303.
- La Llave, P. & Lexarca, J.J.M. (1825) Orchidianum opusculum. In: *Novorum vegetabilium descriptiones, Fasciculus II.* Apud Martinum Riveram, Mexici, pp. 1-43.
- León, H. (1946) Flora de Cuba: Gimnospermas, monocotiledoneas. Vol. 1. *Contribuciones ocasionales del Museo de Historia Natural del Colegio de La Salle* 8: 1-441.
- Lilja, N. (1842) *Handbok i de odlade vaxternas flora och deras kultur. Första häftet/ H. 1.* N.M. Lindhs Boktryckeri, Örebro, 131 pp.
- Linden, J.J. & Reichenbach, H.G. (1862) Ueber einige Garten-Orchideen. *Hamburger Garten- und Blumenzeitung* 18: 33-36.

- Linden, J.J. & Reichenbach, H.G. (1866) New Plants. *The Gardeners' Chronicle and Agricultural Gazette* 1866: 218-219.
- Lindley, J. (1823) *Ponthieva petiolata*. *The Botanical Register*, vol. 9. James Ridgway, London, pl. 690-777.
- Lindley, J. (1824) *Spiranthes cernua*. *The Botanical Register*, vol. 10. James Ridgway, London, pl. 778-867.
- Lindley, J. (1840) *The genera and species of orchidaceous plants, part 7*. Ridgways, Piccadilly, London, pp. 441-553.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.499>
- Lindley, J. (1845) LIV.—A century of new genera and species of orchidaceous plants. *The Annals and Magazine of Natural History* 15: 383-386.
<http://dx.doi.org/10.1080/037454809495353>
- Link, J.H.F., Bouché, P.C. & Kunth, C.S. (1848) *Index Seminum in Horto Botanico Berolinensi anno 1848 collectorum*. Typis C. Feisteri, Berlin, pp. 11-16.
- Luer, C.A. (1971) A variety of *Spiranthes lanceolata* in Florida. *The Florida Orchidist* 14: 19.
- Luer, C.A. (1972) *The Native Orchids of Florida*. New York Botanical Gardens/W. S. Cowell, Ipswich, 293 pp.
- Mansfeld, R. (1928) *Orchidaceae novae Bradeanae. Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 24: 243-246.
<http://dx.doi.org/10.1002/fedr.19280241411>
- McNeill J., Barrie, F.R., Buck, W.R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D.L., Herendeen, P.S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'homme van Reine, W.F., Smith, G.F., Wiersema, J.H., Turland, N.J. (2012) *International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011*. Koeltz Scientific Books, Koenigstein (Regnum Vegetabile 154), i-xxx, 240 pp.
- Meneguzzo, T.E.C. (2010) New combinations in Brazilian Orchidaceae. *Neodiversity* 5: 23-25.
- Meneguzzo, T.E.C. (2013) 752. *Sacoila cerradicola*: Orchidaceae. *Curtis's Botanical Magazine* 30: 18-27.
<http://dx.doi.org/10.1111/curt.12013>
- Merrill, E.D. (1943) Destruction of the Berlin Herbarium. *Science* 3: 490–491.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.98.2553.490>
- Nash, G.V. (1895) Notes on some Florida Plants. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 22: 141-161.

<http://dx.doi.org/10.2307/2477851>

- Pabst, G.F.J. (1974) Additamenta ad Orchideologiam brasiliensem – XVI. *Bradea* 1: 465-471.
- Pabst, G.F.J. (1977) Additamenta ad Orchideologiam brasiliensem – XXIV. *Bradea* 2: 165-171.
- Pabst, G.F.J. (1978) Notícias Orquidológicas – XVII. *Bradea* 2: 260.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. (1975) *Orchidaceae Brasiliensis, Band 1*. Kurt Schmiersow, Hildesheim, 407 pp.
- Pabst, G.F.J. & Garay, L.A. (1952) Studies on the Spiranthinae. *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 12: 205-211.
- Plumier, C. (1758) *Plantarum americanarum fasciculus octavus*. Gerard. Potvliet & Theodor. Haak, Leiden, pp. 169-194, pl. 176-201.
- Porto, P.C. & Brade, A.C. (1940 [1938]) Orchidaceae novae brasilienses III. *Anais da Reunião Sul-Americana de Botânica* 3: 31-50.
- Presl, C.B. (1827) *Reliquiae Haenkeanae, Tomus Primus*. Apud J. G. Calve bibliopolam, Pragae, 356 pp.
- <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.515>
- Rafinesque, C.S. (1818) Museum of Natural Sciences. *The American Monthly Magazine and Critical Review* 2: 202-207.
- Rafinesque, C.S. (1837 [1836]) *Flora Telluriana, Second Part*. Philadelphia, 112 pp.
- <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.7751>
- Reichenbach, H.G. (1847) Orchidiographische Beiträge. *Linnaea* 19: 369-379.
- Reichenbach, H.G. (1852) Orchidographische Beiträge. *Linnaea* 25: 225-232.
- Reichenbach, H.G. (1854) Die Wager'schen Orchideen. *Bonplandia* 2: 9-26.
- Reichenbach, H.G. (1881) VII. Novitiae Orchidaceae Warmingianae. *Otia Botanica Hamburgensia* 2: 78-95.
- <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.50465>
- Reichenbach, H.G. (1883) *Spiranthes euphlebia*. *Botanische Zeitung* 41: 13.
- Richard, A. (1850) Botanique – Plantes vasculaires. In: de la Sagra, R. (ed.) *Histoire physique, politique et naturelle de l'Ile de Cuba, volume 11*. Arthus Bertrand, Paris, 319 pp.
- Richard, L.C.M. (1817) *De Orchideis Europaeis Annotationes, praesertim ad genera dilucidanda spectantes*. Typographia A. Belin, Paris, 39 pp.
- <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.15465>
- Rojas Acosta, T. (1918) Addenda ad Floram regionis Chaco Australis (pars secunda). *Bulletin de Géographie Botanique* 28: 155-165.

- Rolfe, R.A. (1892) New or noteworthy plants. *The Gardeners' Chronicle, Third Series* 11: 330.
- Ruschi, A. & La Gasa, E. (1972) Orquidáceas novas do Estado do Espírito Santo. *Boletim do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão, Série Botânica* 77: 1-4.
- Salazar, G.A. (2003) Subtribe Spiranthinae. In: Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. (eds.). *Genera Orchidacearum, vol. 3: Orchidoideae (part 2), Vanilloideae*. Oxford University Press, New York, pp. 164-278.
- Salazar, G.A., Chase, M.W. & Soto Arenas, M.A. (2002) Galeottiellinae, a new subtribe and other nomenclatural changes in Spiranthinae (Orchidaceae: Cranichideae). *Lindleyana* 17: 172: 176.
- Salazar, G.A., Chase, M.W., Soto Arenas, M.A. & Ingrouille, M. (2003) Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 90: 777-795.
<http://dx.doi.org/10.3732/ajb.90.5.777>
- Sauleda, R.P., Wunderlin, R.P. & Hansen, B.F. (1984) Transfers in Florida orchids. *Phytologia* 56: 308.
- Salisbury, R.A. (1812) On the cultivation of rare plants, especially such as have been introduced since the death of Mr. Philip Miller. *Transactions of the Horticultural Society of London* 1: 261-366.
- Schinini, A. (2010) Orquídeas nativas del Paraguay. *Rojasiana* 9: 11-316.
- Schlechter, F.R.R. (1910) *Orchidaceae novae et criticae*. Decas XVI-XVII. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 9: 21-32.
<http://dx.doi.org/10.1002/fedr.19100090104>
- Schlechter, F.R.R. (1917) *Orchidaceae novae et criticae*. Decas XLIX-L. Additamenta ad Orchideologicam ecuadorensis III. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 15: 49-59.
<http://dx.doi.org/10.1002/fedr.19170150402>
- Schlechter, F.R.R. (1918) Kritische Aufzählung der bisher aus Zentral-Amerika bekanntgewordenen Orchidaceen. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt* 36: 321-520.
- Schlechter, F.R.R. (1919) Orchideenfloren der südamerikanischen Kordillerenstaaten: I. Venezuela. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis*. *Beihefte* 6: 1-100.
- Schlechter, F.R.R. (1920) Versuch einer systematischen Neuordnung der Spiranthinae. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt* 37: 317-454.
- Schlechter, F.R.R. (1921a) *Orchidaceae novae et criticae*. Decas LXVII. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 17: 12-18.

- Schlechter, F.R.R. (1921b) Orchidaceae novae et criticae. Decas LXX: Additamenta ad Orchideologiam Brasiliensem. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 17: 267-272.
<http://dx.doi.org/10.1002/fedr.19210171320>
- Schlechter, F.R.R. (1929) Orchidaceae Buchtienianae. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis* 27: 27-85.
<http://dx.doi.org/10.1002/fedr.4870270104>
- Schlechter, F.R.R. & Hoehne, F.C. (1921) Contribuições ao conhecimento das Orquidáceas do Brasil I (Beitraege zur Orchideenkunde Brasiliens). *Anexos das Memorias do Instituto de Butantan, Secção de Botânica* 1: 1-48.
- Schlechter, F.R.R. & Hoehne, F.C. (1922) Contribuições ao conhecimento das Orquidáceas do Brasil II (Beitraege zur Orchideenkunde Brasiliens). *Anexos das Memorias do Instituto de Butantan, Secção de Botânica* 1: 1-68.
- Schrenk, W.J. (1977) Zusammenstellung der Orchideenarten der Vereinigten Staaten von Amerika und der amerikanischen Jungferninseln. *Die Orchidee* 28: 98-104.
- Sprengel, K.P.J. (1826) *Caroli Linnaei, ... Systema Vegetabilium. Editio decima sexta. Volumen III*. Sumtibus Librariae Dieterichianae, Gottingae, 936 pp.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.822>
- Sprunger, S., Cribb, P. & Toscano de Brito, A. (1996) *João Barbosa Rodrigues: Iconographie des orchidées du Brésil, Volume 1: The illustrations*. Friedrich Reinhardt Verlag, Basle, 540 pp.
- Swartz, O. (1788) *Nova genera & species plantarum seu Prodrromus descriptionum vegetabilium*. M. Swederi, Holmiae, Upsaliae & Aboae, 158 pp.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.433>
- Swartz, O. (1806) *Flora Indiae occidentalis, Tomus III*. Jo. Jacobi Palmii, Erlangae, pp. 1232-1568.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.6152>
- Sweet, R. (1830) *Sweet's Hortus Britannicus*, ed. 2. James Ridgway, London, 624 pp.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.10527>
- Szlachetko, D.L. (1992) Genera and species of the subtribe Spiranthinae (Orchidaceae): 3. Contribution to the revision of *Buchtienia*. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 37: 205-210.
- Szlachetko, D.L. (1993) *Garaya* (Orchidaceae, Spiranthinae), a new orchid genus from Brazil. *Polish Botanical Studies* 5: 1-4.

- Szlachetko, D.L. (1994a) Genera and species of the subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). 10. *Lyroglossa*. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 39: 121-127.
- Szlachetko, D.L. (1994b) Studies on the Spiranthinae (Orchidaceae): 1. Miscellanea. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 39: 417-438.
- Szlachetko, D.L. (1995a) Systema Orchidaliium. *Fragmenta Floristica et Geobotanica Supplement* 3: 1-152.
- Szlachetko, D.L. (1995b) *Eltroplectris brachycentron* Szlachetko (Orchidaceae), a new orchid species from Bolivia. *Novon* 5: 375-378.
<http://dx.doi.org/10.2307/3391968>
- Szlachetko, D.L. (1996a) Eine neue Art der Gattung *Pteroglossa* aus Paraguay. *Die Orchidee* 3: 47-53.
- Szlachetko, D.L. (1996b) Studies on Spiranthinae (Orchidaceae): I. Varia. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 41: 845-863.
- Szlachetko, D.L. & Rutkowski, P. (2008) Classification of Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and Cyclopogoninae. In: Rutkowski, P., Szlachetko, D.L. & Górniak, M. *Phylogeny and taxonomy of the subtribes Spiranthinae, Stenorrhynchidinae and Cyclopogoninae (Spiranthinae, Orchidaceae) in Central and South America*. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk, pp. 130-222.
- Szlachetko, D.L. & González-Tamayo, R. (1996) *Ochyrella* (Orchidaceae, Stenorrhynchidinae), a new genus from South America. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 41: 697-700.
- Szlachetko, D.L., González-Tamayo, R. & Rutkowski, P. (2001) *Pachygenium*, a new genus of the subtribe Cyclopogoninae (Orchidaceae). *Polish Botanical Journal* 46: 3-6.
- Thiers, B.M. (2012) *Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associate staff*. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Available from: <http://sweetgum.nybg.org/ih/> (accessed: 20 June 2013).
- Vellozo, J.M.C. (1831 [1827]) *Flora Fluminensis Icones, Volume 9*. A. Senefelder, Parisiis, t. 1-128.
<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.70380>
- Watson, S. (1891) Contributions to American botany. *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 26: 124-163.
<http://dx.doi.org/10.2307/20013481>
- Willdenow, C.L. (1805) *Caroli a Linné Species Plantarum. Editio quarta, Tomus IV, pars I*. C.G. Nauk, Berolini, 629 pp.

<http://dx.doi.org/10.5962/bhl.title.727>

Williams, B.S. (1869) *Catalogue of new and rare plants, 1869, containing the most beautiful and select of the latest introduction and supplementary list of general collection*. Victoria and Paradise Nursery, London.

Williams, L.O. (1946) New and interesting Mexican orchids. *Botanical Museum Leaflets* 12: 225-254.

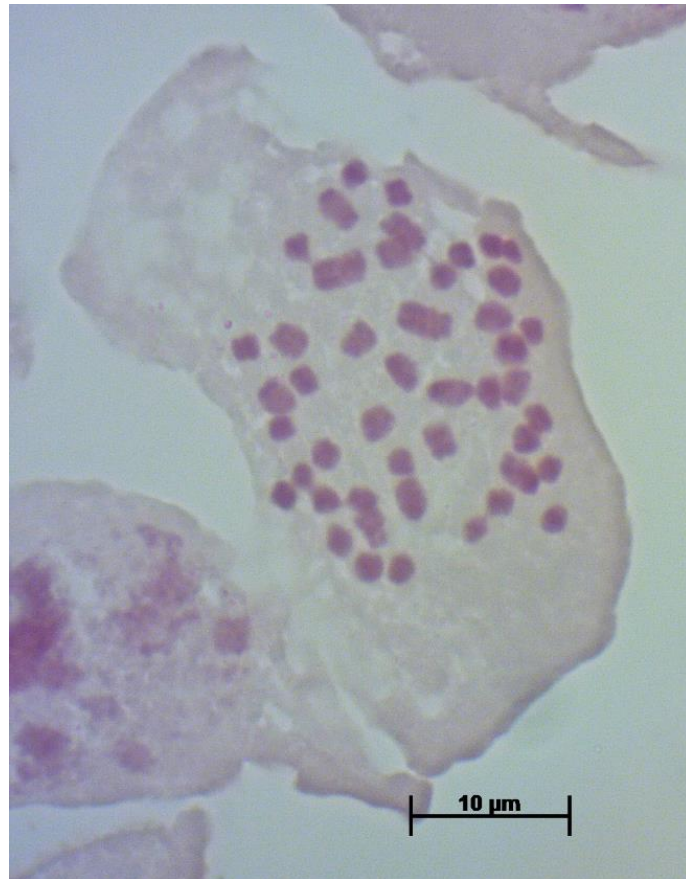
Williams, L.O. (1973a) Tropical American plants, XIII. *Phytologia* 25: 458-464.

Williams, L.O. (1973b) A new *Spiranthes* [Orchidaceae] from Guatemala. *Phytologia* 26: 435-436.

CAPÍTULO 3

Chromosome studies in Spiranthinae and Cranichidinae (Orchidaceae)

(Capítulo submetido no periódico *Brazilian Journal of Botany*)



Cromossomos de *Pelexia funckiana* (A.Rich. & Galeotti) Schltr.

Chromosome studies in Spiranthinae and Cranichidinae (Orchidaceae)

Leonardo R. S. Guimarães, Pedro Mercado-Ruaro, Andréa M. Corrêa, Gerardo A. Salazar & Fábio de Barros

Concise title: Chromosome studies in Orchidaceae

Corresponding author: Leonardo Ramos Seixas Guimarães, Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado, Instituto de Botânica, Caixa Postal 68041, 04045-972, São Paulo, SP, Brazil. Tel: +55 11 5067 6136. E-mail: leo.rsguimaraes@hotmail.com

Co-authors: Pedro Mercado-Ruaro, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-367, 04510, México, D.F., México.

Andréa Macêdo Corrêa, Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado, Instituto de Botânica, Caixa Postal 68041, 04045-972, São Paulo, SP, Brazil.

Gerardo A. Salazar, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-367, 04510, México, D.F., México.

Fábio de Barros, Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado, Instituto de Botânica, Caixa Postal 68041, 04045-972, São Paulo, SP, Brazil.

Abstract The chromosome numbers of eighteen species of Spiranthinae from Brazil and Mexico and two of Cranichidinae from Ecuador were analysed. Sixteen chromosome records are presented for the first time: *Aulosepalum riodelayense* ($2n = 64$), *A. tenuiflorum* ($2n = 60$), *Cyclopogon luteoalbus* ($2n = 36$), *Dichromanthus aurantiacus* ($2n = 40$), *Eltroplectris calcarata* ($2n = 42$), *Pelexia funckiana* ($2n = 46$), *Sarcoglottis assurgens* ($2n = 46$), *S. richardiana* ($2n = 50$), *S. rosulata* ($2n = 33$), *S. sceptrodes* ($2n = 46$), *S. schaffneri* ($2n = 46$), *S. scintillans* ($2n = 46$), *Stenorrhynchos albidomaculatum* ($2n = 46$), *S. cf. speciosum* ($2n = 46$), *Ponthieva andicola* ($2n = 26$) and *P. pilosissima* ($2n = \pm 42$). For *Mesadenella cuspidata* ($2n = 38/42$), a new cytotype was found. In addition, ideograms of five Brazilian species are presented. Chromosome data support phylogenetic relationships suggested by previous cytological and molecular studies.

Keywords Brazil, cytotaxonomy, ideogram, karyotype, Mexico.

Introduction

The family Orchidaceae comprises approximately 25,000 species (Dressler 2005) distributed in 850 genera (Atwood 1986; Pridgeon et al. 1999; Chase et al. 2003). It has a cosmopolitan distribution, with the exception of the regions always covered with snow and extreme deserts, but is most abundant and diverse in humid tropical and subtropical forests. As for the classification, the most recent systems for Orchidaceae are those proposed by Dressler (1993) and Pridgeon et al. (1999, 2001, 2003, 2005, 2009, 2014), the latter based also on molecular data, proposing the division of the family into five subfamilies: Apostasioideae, Vanilloideae, Cypripedioideae, Orchidoideae and Epidendroideae. In the subfamily Orchidoideae, there are six tribes; one of them is the Cranichideae, with six subtribes: Cranichidinae, Galeottiellinae, Goodyerinae, Manniellinae, Pterostylidinae and Spiranthinae (Pridgeon et al. 2001, 2003).

Subtribe Cranichidinae has 16 genera and about 210 species, all of them endemic to the Neotropics (Cribb and Pridgeon 2003; Salazar et al. 2003), and is characterized by the non-resupinate flowers, comparatively short column and brittle pollinia (Dressler 1993). In turn, subtribe Spiranthinae comprises about 40 genera and 470 species almost exclusively restricted to the Neotropics, except for the cosmopolitan genus *Spiranthes* Rich. (Salazar 2003). Its members can be recognized by the tubular flowers, margins of the lip adhered to the sides of the column, forming a deep nectary, and the soft, granulose pollinia (Dressler 1993).

There are few cytotaxonomic studies on Spiranthinae, and these are concentrated especially on the genus *Spiranthes* (Vij and Vohra 1974; Sheviak 1982; Tanaka and Kamemoto 1984; Martínez 1985). For the Neotropical species, Martínez (1981, 1985), Felix and Guerra (2005), Daviña et al. (2009) and Grabiele et al. (2010, 2013) have made the most significant contributions. On Cranichidinae, chromosome counts are reported only for *Ponthieva mandonii* Rchb.f. (Martínez 1985) and six species of *Prescottia* R.Br. (Felix and Guerra 2005).

The aim of this study was to determine the chromosome numbers and other chromosomal features of eighteen species of Spiranthinae and two of Cranichidinae, as part of our ongoing systematic and evolutionary studies of these orchid groups (Guimarães 2014; Guimarães et al., unpublished data).

Material and methods

Eighteen species of Spiranthinae from Brazil and Mexico, and two species of Cranichidinae from Ecuador were studied (Table 1). Samples were cultivated in the greenhouses of the “Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado/ Instituto de Botânica” (NP-OE/IBt in São Paulo, Brazil) and of “Herbario AMO” (Mexico City, Mexico). Vouchers were deposited at the herbarium of the Institute of Botany (SP), Mexico’s National Herbarium (MEXU) and the herbarium of the Faculty of Superior Studies of the National Autonomous University of Mexico, campus Zaragoza (FEZA).

Mitotic studies were performed in root tips pretreated with 8-hydroxyquinoline 0.2 mM (8-Hq) for 24 h at 4 °C (SP samples) and for 5 h at 18 °C (MEXU and FEZA samples), fixed in absolute ethanol:glacial acetic acid (3:1) for 3-24 h at room temperature (25 °C), and stored in a freezer at -20 °C. To prepare the slides, root tips were hydrolysed in 5N HCl for 12-30 min at room temperature, frozen in liquid nitrogen to remove the coverslip, stained with 2% Giemsa for the Brazilian specimens (Guerra 1983); hydrolysed in 1N HCl for 12 minutes at 60 °C and stained according to the Feulgen technique for the remaining specimens (Mercado-Ruaro and Delgado-Salinas 1998). The meristems were soaked in a drop of 2% aceto-orcein and then squashed.

Chromosomes were counted in at least five cells, observed in a Carl Zeiss Jenaval (SP samples) and an Axioscop (MEXU, FEZA samples) optical microscopes, and photographed using the Canon PowerShot S3 1S (SP samples) and AxioCam ERc5S (MEXU, FEZA samples) digital cameras.

We selected the best mitotic metaphase spreads from the SP samples for karyotyping and preparing ideograms. Chromosomes were measured using Adobe Photoshop CS 5.1 software, determining the karyotype formula (KF), total chromosome length (TCL, calculated as the sum of all individual sizes of chromosomes), the average of total chromosome length (ATL), and the centromeric index (CI) for each chromosome pair (calculated as the ratio of the short arm and chromosome length). The chromosome types were classified according to the nomenclature of Levan et al. (1964).

Results

Within the subtribe Spiranthinae, *Aulosepalum riodelayense* (Burns-Bal.) Salazar presented $2n = 64$; *A. tenuiflorum* (Greenm.) Garay, $2n = 60$; *Cyclopogon luteoalbus* (A.Rich. & Galeotti) Schltr., $2n = 36$; *Dichromanthus aurantiacus* (Lex.) Salazar & Soto Arenas, $2n = 40$; *Eltroplectris calcarata* (Sw.) Garay & H.R.Sweet, $2n = 42$; *E. triloba* (Lindl.) Pabst, $2n = 46$;

Pelexia funckiana (A.Rich. & Galeotti) Schltr., $2n = 46$; *Mesadenella cuspidata* (Lindl.) Garay, $2n = 38$ and 42 (variation possibility due to uncertainty or aneusomy; see Discussion below); *Sarcoglottis assurgens* (Rchb.f.) Schltr., $2n = 46$; *Sarcoglottis* cf. *grandiflora* (Lindl.) Klotzsch, $2n = 46$; *Sarcoglottis richardiana* (Schltr.) Salazar & Soto Arenas, $2n = 50$; *Sarcoglottis rosulata* (Lindl.) P.N.Don, $2n = 33$; *Sarcoglottis sceptrodes* (Rchb.f.) Schltr., $2n = 46$; *Sarcoglottis schaffneri* (Rchb.f.) Ames, $2n = 46$; *Sarcoglottis scintillans* (E.W.Greenw.) Salazar & Soto Arenas, $2n = 46$; *Sauroglossum elatum* Lindl., $2n = 46$; *Stenorrhynchos albidomaculatum* Christenson, $2n = 46$; and *Stenorrhynchos* cf. *speciosum* (Jacq.) Rich., $2n = 46$ (Figs. 1, 3, 4 and 5). All species studied, except *A. riodelayense*, *A. tenuiflorum*, *C. luteoalbus*, *S. richardiana*, *S. scintillans*, *S. albidomaculatum* and *S.* cf. *speciosum* present a pair of acrocentric or submetacentric chromosomes, which are about twice the size of the remaining chromosomes, which are metacentric. *Mesadenella cuspidata* with $2n = 42$ presents a pair of acrocentric chromosome about four times as large as the remainder chromosomes (Table 2, Figs. 1d and 2d). The species *A. riodelayense* (Fig. 4a) and *A. tenuiflorum* (Fig. 4b) show a bimodal karyotype with six larger chromosomes and the others small.

The chromosome numbers for *E. calcarata* (Table 3, Figs. 1a and 2a), *D. aurantiacus* (Fig. 3a), *S. richardiana* (Fig. 3b), *S. rosulata* (Fig. 3c), *S. schaffneri* (Fig. 3d), *A. riodelayense* (Fig. 4a), *A. tenuiflorum* (Fig. 4b), *C. luteoalbus* (Fig. 4c), *P. funckiana* (Fig. 4d), *S. assurgens* (Fig. 4e), *S. sceptrodes* (Fig. 5a), *S. scintillans* (Fig. 5b), *S. albidomaculatum* (Fig. 5c), and *S.* cf. *speciosum* (Fig. 5d) represent the first mitotic records for those species.

A secondary constriction (satellite) was observed on the largest chromosome pair of *M. cuspidata* (Table 2, Figs. 1c, 1d, 2c and 2d), *S. rosulata* (Fig. 3c) and *S. assurgens* (Fig. 4e).

The chromosome number (CN), total chromosome length (TCL) and karyotype formula (KF) of *E. calcarata*, *E. triloba*, *M. cuspidata* and *S. elatum* is given in Table 4.

Regarding the studied representatives of the subtribe Cranichidinae, *Ponthieva andicola* Rchb.f. has $2n = 26$ (Fig. 3e) and *Ponthieva pilosissima* (Senghas) Dodson, $2n = \pm 42$ (Fig. 3f). Both are first chromosome counts for these species. *Ponthieva pilosissima* presents 10 large chromosomes, 20 median chromosomes and ca. 12 small chromosomes in a trimodal karyotype. This difficulty of counting is due to the distinct degree of contraction of the different types of chromosomes, so that the small chromosomes are out-of-phase in the contraction, and some of them have a secondary constriction. Thus, we were unable to determinate the precise chromosome number of this species.

Discussion

Some of the counts obtained here differ from those found in literature. Martínez (1985) reported a $2n = 46$ cytotype for a specimen of *Mesadenella cuspidata* collected in Argentina, while in this study we found $2n = 38/42$ cytotypes for a single specimen collected in Brazil. This variation could be due to the difficulty of counting, to the possibility that these specimens could actually represent different species of *Mesadenella*, or merely to intra-polymorphism in this feature (cf. Figs. 1c, 1d, 2c and 2d). Another possible explanation is that Martínez (1985) interpreted the secondary constrictions (satellites) of some chromosomes as distinct chromosomes, as was the case with legume *Oxyrhynchus* (Palomino and Mercado 1983). Analysis of additional specimens of this species, preferably from different geographic origins, would help to clarify the issue.

Davide et al. (2007) defined polysomy and aneusomy as the intraindividual variations in chromosome number, related to the occurrence of polyploidy and aneuploidy, respectively. The variation of the chromosome number in *M. cuspidata* may be due to difficulty of counting or to the occurrence of aneusomy. In the latter case, it would represent the first observation of this condition in Spiranthinae, although it has been documented in orchids of the rupicolous epidendroid genus *Hoffmannseggella* of Laeliinae (Yamagishi-Costa and Forni-Martins 2009, 2013). Few cases of aneusomy in plants are described in literature, but this phenomenon is common in families such as Orobanchaceae (Greilhuber and Weber 1975), Boraginaceae (Bigazzi and Selvi 2003) and Fabaceae (Rodrigues et al. 2009).

Martínez (1985) also noted that species of Spiranthinae with $2n = 46$ often show a bimodal karyotype, with one pair of large chromosomes and the remainder ones much smaller. The present study confirms this bimodal karyotype (with some exceptions), as has been found in other species of the subtribe by Felix and Guerra (2005). Moreover, this karyotype bimodality supports the inclusion of the genera *Eltroplectris* and *Mesadenella* in the *Stenorrhynchos* clade sensu Salazar et al. (2003). On the other hand, *Sarcoglottis assurgens*, *S. cf. grandiflora*, *S. sceptrodes*, *S. schaffneri* and *S. scintillans* share the same chromosome number ($2n = 46$) of other species of *Sarcoglottis* and *Pelexia* previously analysed (Martínez 1985; Dematteis and Daviña 1999; Felix and Guerra 2005; Daviña et al. 2009), which reinforces the proposal that all those genera belong in the *Pelexia* clade sensu Salazar et al. (2003). The meaning of the discordant chromosome numbers of *S. richardiana* ($2n = 50$) and *S. rosulata* ($2n = 33$) remains unclear and must be carefully studied by analysis of additional specimens of both species.

According to Martínez (1985), the basic number $x = 23$ for the Spiranthinae, as well as the bimodal chromosome condition, seem to be distinguishing characteristics of the subtribe,

which Felix and Guerra (2005) suggest as a significant feature to separate it from subtribe Goodyerinae, which belongs to a different lineage within the tribe Cranichideae (Salazar et al. 2003). The origin for this high basic number, compared to Goodyerinae (with $x = 10, 14?$, Brandham 1999; Felix and Guerra 2005), is not clear but it could be due to polyploidy, although the single pair of large chromosomes does not support this hypothesis, unless the polyploids have chromosomes derived from different species, *i.e.*, the origin would be fully allopolyploid as supposed by Martínez (1985).

The evolutionary significance of a single pair of larger chromosomes in a bimodal karyotype also remains obscure, especially when this condition is present in species with different chromosome numbers, e.g. *Eltroplectris* sp. with $2n = 26$ (Martínez 1985; Daviña et al. 2009) and *Sacoila* sp. with $2n = 46$ (Cocucci 1956; Martínez 1985; Felix and Guerra 2005; Daviña et al. 2009; Grabiele et al. 2010). Furthermore, this kind of karyotype appears to be quite rare in other groups of Orchidaceae. Felix and Guerra (2000) analysed 44 species of cymbidioid orchids and found bimodality in only two of them. Apparently, a bimodal karyotype is a specialized genomic architecture that could be selected for its functionality (Stebbins 1971; Kenton et al. 1990).

Ponthieva pilosissima, with $2n = \pm 42$, is a typical case of trimodal karyotype. This condition was observed in Hyacinthaceae (Forrest and Jong 2004), Ruscaceae (Yamashita and Tamura 2004; Meng et al. 2005) and Orchidaceae (this study). All these families belong to the order Asparagales and this type of karyotype could be a homoplasy (parallel/convergent character) among those groups.

This study confirms some previous observations (Martínez 1985) on chromosome numbers in Spiranthinae, but also contributes new chromosome counts, expanding the cytogenetic knowledge of the subtribe, and also of the family Orchidaceae. Further analyses are needed to clarify the different chromosome numbers found for *M. cuspidata* and to understand the trimodal karyotype reported for *P. pilosissima*.

Acknowledgements

The authors are grateful to Fernanda Lo Schiavo and Leandro C.S. Ventura (NP-OE/IBt) for assistance in the laboratory, and Eric Hågsater (AMO Herbarium) and Gabriela Cruz-Lustre (UNAM) for providing plant material for this study. This study was supported by a scholarship of the São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant numbers 2010/16353-1, 2012/19778-

9] to LRSG and by a productivity grant of the Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant number 306889/2010-2] to FB.

References

- Atwood JT (1986) The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9: 171-186
- Bigazzi M, Selvi F (2003) Chromosome variation in Anatolian species of *Nonea* Medik. (Boraginaceae), with special reference to endemics and *N. persica*. *Caryologia* 56: 509-519. doi:10.1080/00087114.2003.10589364
- Brandham P (1999) Cytogenetics. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) *Genera Orchidacearum*, vol 1: General Introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. Oxford University Press, Oxford, pp 67-80
- Chase MW, Cameron KM, Barrett RS, Freudenstein JV (2003) DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ (eds) *Orchid Conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, pp 69-89
- Cocucci AE (1956) Cromosomas gaméticos de *Stenorrhynchos australis* Lindl. y *Tradescantia radiata* Clarke. *Trab Mus Bot (Cordoba)* 2: 781-783
- Cribb PJ, Pridgeon AM (2003) Subtribe Cranichidinae. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) *Genera Orchidacearum*, vol 3: Orchidoideae (part 2), Vanilloideae. Oxford University Press, Oxford, pp 23-24
- Davide LC, Techio VH, Nunes JD, Pereira AV (2007) Variação cromossômica numérica em *Pennisetum*. *Ci Agrotecnol* 31: 398-405
- Daviña JR, Grabiele M, Cerutti JC, Hojsgaard DH, Almada RD, Insaurralde IS, Honfi AI (2009) Chromosomes studies in Orchidaceae from Argentina. *Genet Mol Biol* 32: 811-821. doi: 10.1590/S1415-47572009005000089
- Dematteis M, Daviña JR (1999) Chromosome studies on some orchids from South America. *Selbyana* 20: 235-238
- Dressler RL (1993) *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland
- Dressler RL (2005) How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158

- Felix LP, Guerra M (2000) Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. *Genet Mol Biol* 23: 957-978. doi: 10.1590/S1415-47572000000400041
- Felix LP, Guerra M (2005) Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. *Plant Syst Evol* 254: 131-148. doi: 10.1007/s00606-004-0200-9
- Forrest LL, Jong K (2004) Karyotype asymmetry in *Galtonia* and *Pseudogaltonia* (Hyacinthaceae). *Edinburgh J Bot* 60: 569-579. doi: 10.1017/S0960428603000416
- Grabiele M, Honfi AI, Cerutti JC, Fernandez V, Franco D, Daviña JR (2010) Cytogenetic analysis in the terrestrial orchid *Sacoila argentina* (Griseb.) Garay from Paraguay. *Bot Stud* 51: 337-342
- Grabiele M, Cerutti JC, Hojsgaard DH, Almada RD, Daviña JR, Honfi AI (2013) Comparative cytogenetics in *Cyclopogon* (Orchidaceae). *Biologia (Bratislava)* 68: 48-54. doi: 10.2478/s11756-012-0127-5
- Greilhuber J, Weber A (1975) Aneusomaty in *Orobanche gracilis*. *Plant Syst Evol* 124: 67-77. doi: 10.1007/BF00986157
- Guerra M (1983) O uso de Giemsa na citogenética vegetal: comparação entre a coloração simples e o bandeamento. *Cienc Cult* 35: 190-193
- Guimarães LRS (2014) Filogenia e citotaxonomia do clado *Stenorrhynchos* (Spiranthinae, Cranichideae, Orchidoideae, Orchidaceae). PhD Thesis, Instituto de Botânica
- Kenton A, Dickie JB, Langton DH, Bennett MD (1990) Nuclear DNA amount and karyotype symmetry in *Cypella* and *Hesperoxiphion* (Tigridieae; Iridaceae). *Evol Trends Pl* 4: 59-69
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position of chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220. doi: 10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x
- Martínez AJ (1981) Notas citotaxonomicas sobre el género *Cyclopogon* Presl. *Parodiana* 1: 139-148
- Martínez AJ (1985) The chromosomes of orchids VIII. Spiranthinae and Cranichidinae. *Kew Bull* 40: 139-147
- Meng Y, Nie ZL, Yang YP, Gu ZJ (2005) Karyomorphology of *Maianthemum* sensu lato (Polygonatae, Ruscaceae). *J Plant Res* 118: 155-162. doi: 10.1007/s10265-005-0205-7
- Mercado-Ruaro P, Delgado-Salinas A (1998) Karyotypic studies on species of *Phaseolus* (Fabaceae: Phaseolinae). *Amer J Bot* 85: 1-9
- Palomino G, Mercado P (1983) Cytological studies in the genus *Oxyrhynchus* (Leguminosae). In: Brandham PE, Bennett MD (eds) *Kew Chromosome Conference II*. Ed George Allen and Unwin, London

- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) (1999) *Genera Orchidacearum*, vol 1: General Introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. Oxford University Press, Oxford
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) (2001) *Genera Orchidacearum*, vol 2: Orchidoideae (part 1). Oxford University Press, Oxford
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) (2003) *Genera Orchidacearum*, vol 3: Orchidoideae (part 2), Vanilloideae. Oxford University Press, Oxford
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) (2005) *Genera Orchidacearum*, vol 4: Epidendroideae (part one). Oxford University Press, Oxford
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) (2009) *Genera Orchidacearum*, vol 5: Epidendroideae (part two). Oxford University Press, Oxford
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) (2014) *Genera Orchidacearum*, vol 6: Epidendroideae (part three). Oxford University Press, Oxford
- Rodrigues RS, Corrêa AM, Forni-Martins E, Tozzi AMGA (2009) Números cromossômicos em espécies de *Acosmium* Schott e *Leptolobium* Vogel (Leguminosae, Papilionoideae). *Acta Bot Bras* 23: 902-906. doi: 10.1590/S0102-33062009000300031
- Salazar GA (2003) Subtribe Spiranthinae. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (eds) *Genera Orchidacearum*, vol 3: Orchidoideae (part 2), Vanilloideae. Oxford University Press, Oxford, pp 164-278
- Salazar GA, Chase MW, Soto Arenas MA, Ingrouille M (2003) Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *Amer J Bot* 90: 777-795. doi: 10.3732/ajb.90.5.777
- Sheviak CJ (1982) Biosystematic study of the *Spiranthes cernua* complex. *Bull New York State Mus* 48: 1-73
- Stebbins GL (1971) *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold, London
- Tanaka R, Kamemoto H (1984) Chromosomes in orchids: counting and numbers. In: Arditti J (ed) *Orchid biology: reviews and perspectives III*. Cornell University Press, Ithaca, pp 323-410
- Vij SP, Vohra N (1974) Cytomorphological studies in the genus *Spiranthes* Rich. *Cytologia* 39: 139-143
- Yamagishi-Costa J, Forni-Martins ER (2009) Hybridization and polyploidy: cytogenetic indications for *Hoffmannseggella* (Orchidaceae) species evolution. *Int J Bot* 5: 93-99 doi: 10.3923/ijb.2009.93.99

- Yamagishi-Costa J, Forni-Martins ER (2013) Chromosomal diversity in two synchronopatric species of *Hoffmannseggella* (Orchidaceae). *Nordic J Bot* 31: 505-509. doi: 10.1111/j.1756-1051.2013.001638.x
- Yamashita J, Tamura MN (2004) Phylogenetic analyses and chromosome evolution in Convallarieae (Ruscaceae sensu lato), with some taxonomic treatments. *J Plant Res* 117: 363-370. doi: 10.1007/s10265-004-0169-z

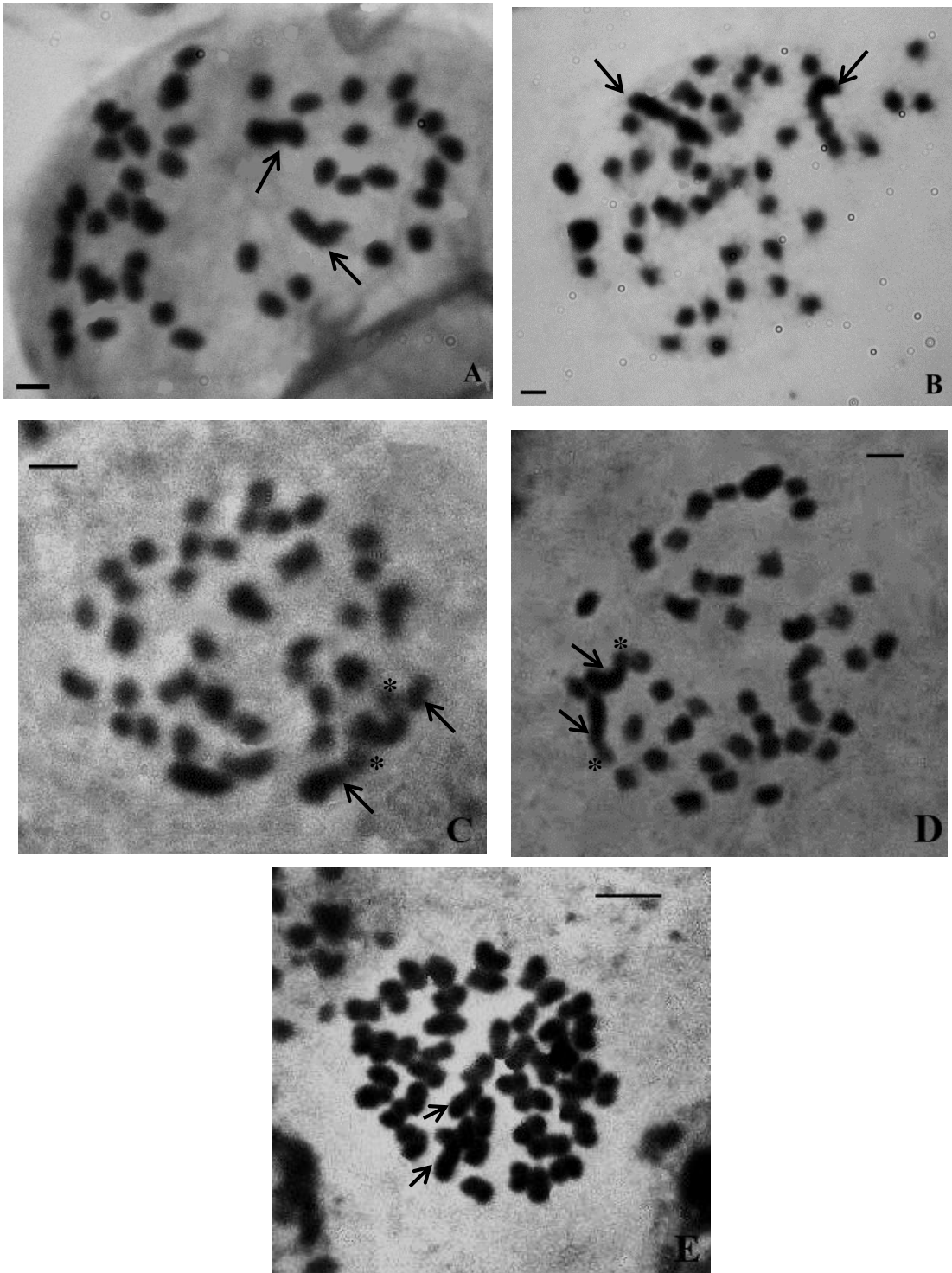


Fig. 1 Chromosomes of species of Spiranthinae studied. **a** *Eltroleptis calcarata* ($2n = 42$), **b** *Eltroleptis triloba* ($2n = 46$), **c-d** *Mesadenella cuspidata* ($2n = 38$ and $2n = 42$, respectively) and **e** *Sauroglossum nitidum* ($2n = 46$). Arrows indicate largest chromosomes in bimodal karyotypes; asterisks in **c** and **d** indicate the satellites. *Bar* = 1 μm

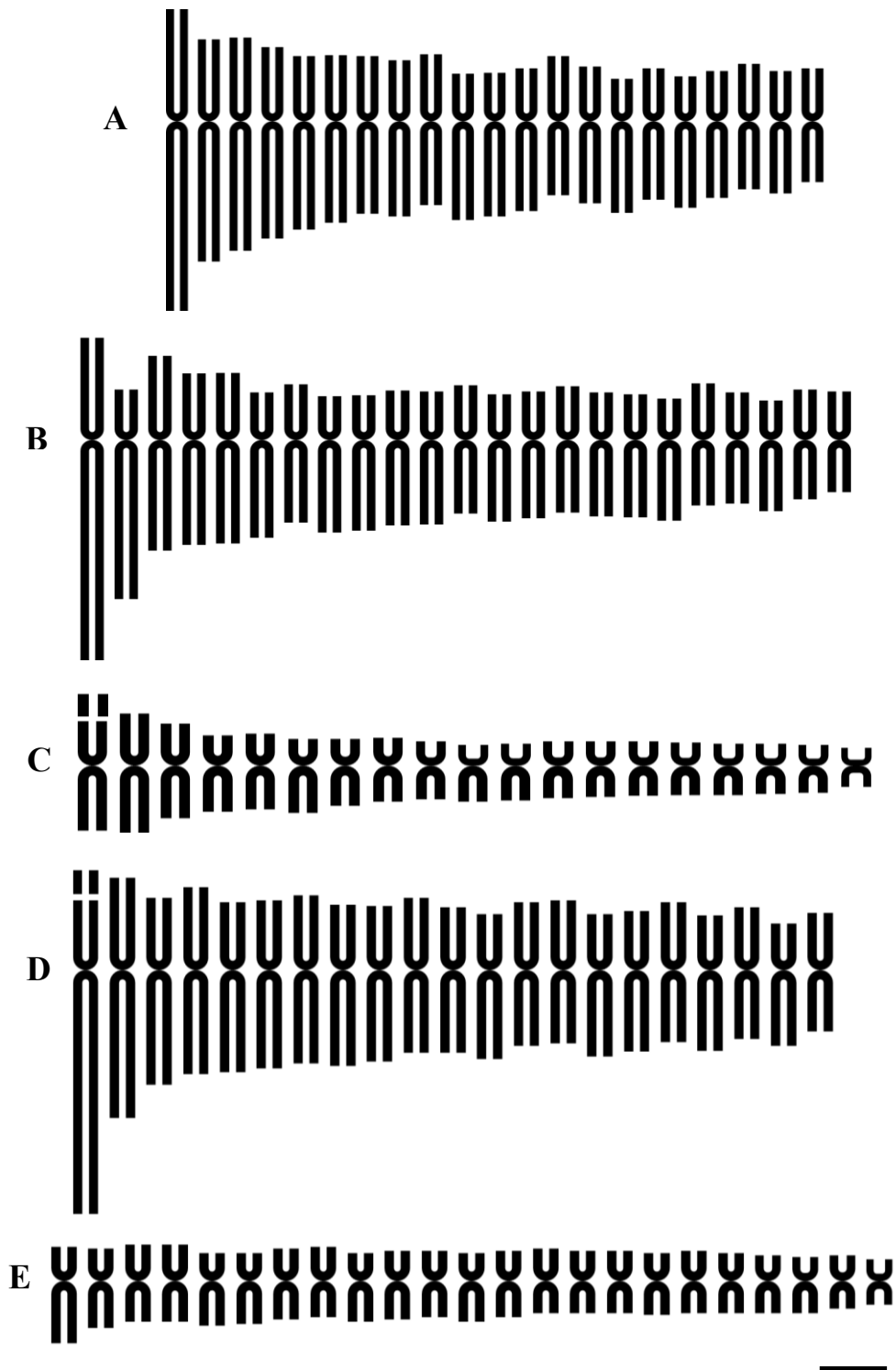


Fig. 2 Ideograms of some species of Spiranthinae studied. **a** *Eltroplectris calcarata* ($2n = 42$), **b** *Eltroplectris triloba* ($2n = 46$), **c-d** *Mesadenella cuspidata* ($2n = 38$ and $2n = 42$, respectively, with one pair with satellites) and **e** *Sauroglossum nitidum* ($2n = 46$). Bar = 1 μm

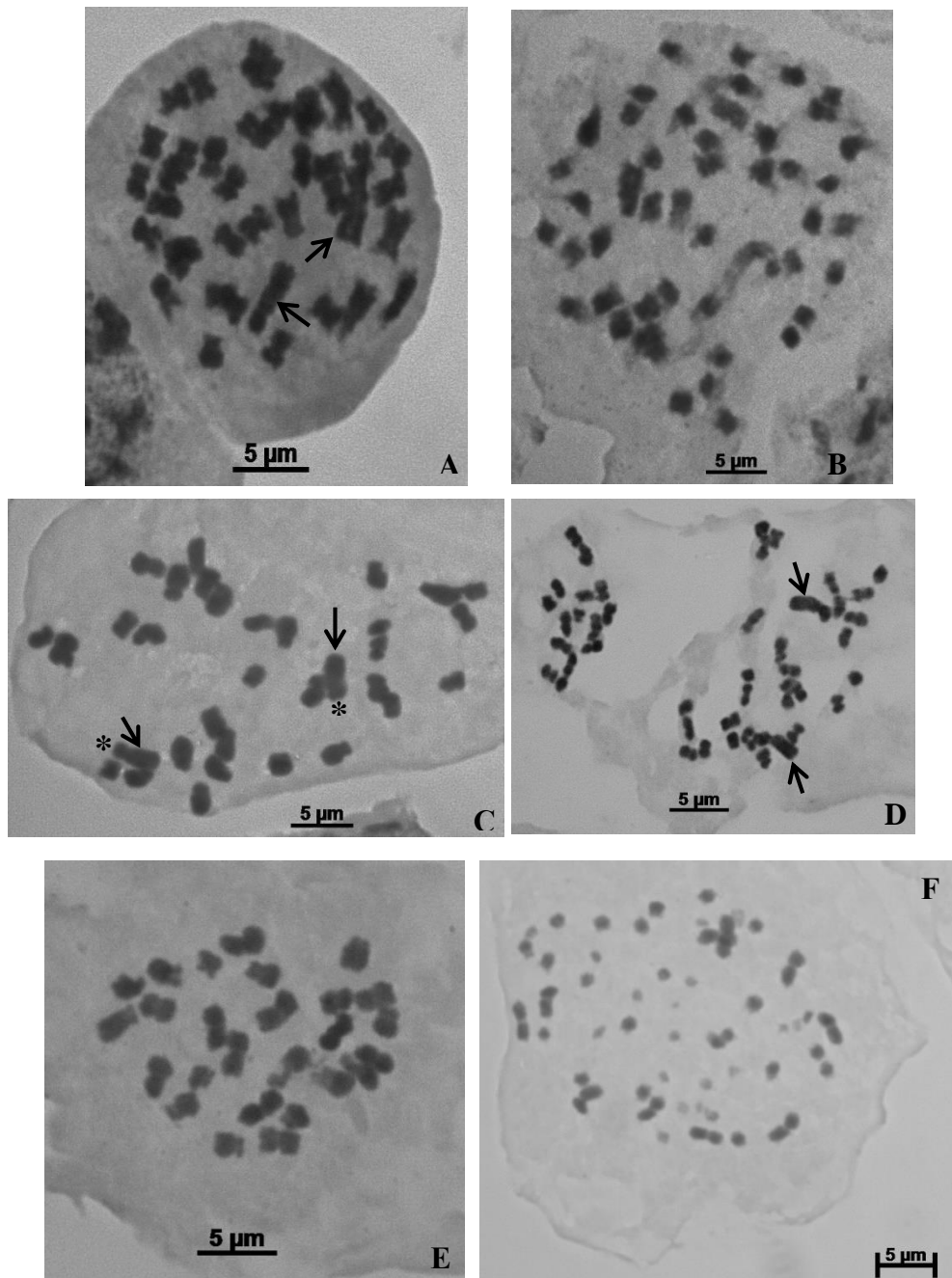


Fig. 3 Chromosomes of species of Spiranthinae and Cranichidinae studied. **a** *Dichromanthus aurantiacus* ($2n = 40$), **b** *Sarcoglottis richardiana* ($2n = 50$), **c** *Sarcoglottis rosulata* ($2n = 33$), **d** *Sarcoglottis schaffneri* ($2n = 46$), **e** *Ponthieva andicola* ($2n = 26$) and **f** *Ponthieva pilosissima* ($2n = \pm 42$). Arrows in **a**, **c** and **d** indicate largest chromosomes in bimodal karyotypes; asterisks in **c** indicate the satellites

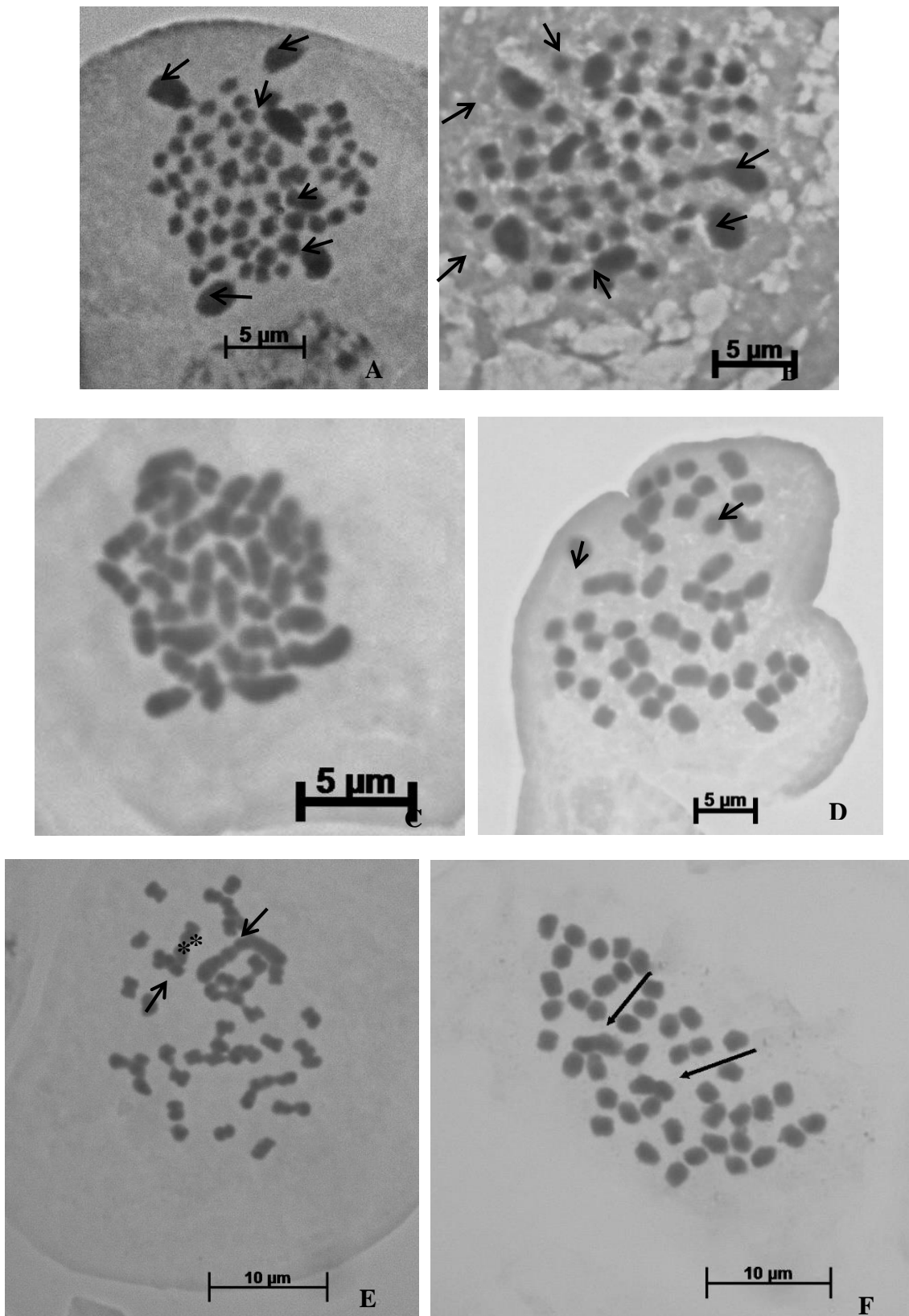


Fig. 4 Chromosomes of species of Spiranthinae studied. **a** *Aulosepalum riodelayense* ($2n = 64$), **b** *Aulosepalum tenuiflorum* ($2n = 60$), **c** *Cyclopogon luteoalbus* ($2n = 36$), **d** *Pelexia funckiana* ($2n = 46$), **e** *Sarcoglottis assurgens* ($2n = 46$) and **f** *Sarcoglottis* cf. *grandiflora* ($2n = 46$). Arrows in **a** and **b** indicate the six largest chromosomes; arrows in **d-f** indicate largest chromosomes in bimodal karyotypes; asterisks in **e** indicate the satellites

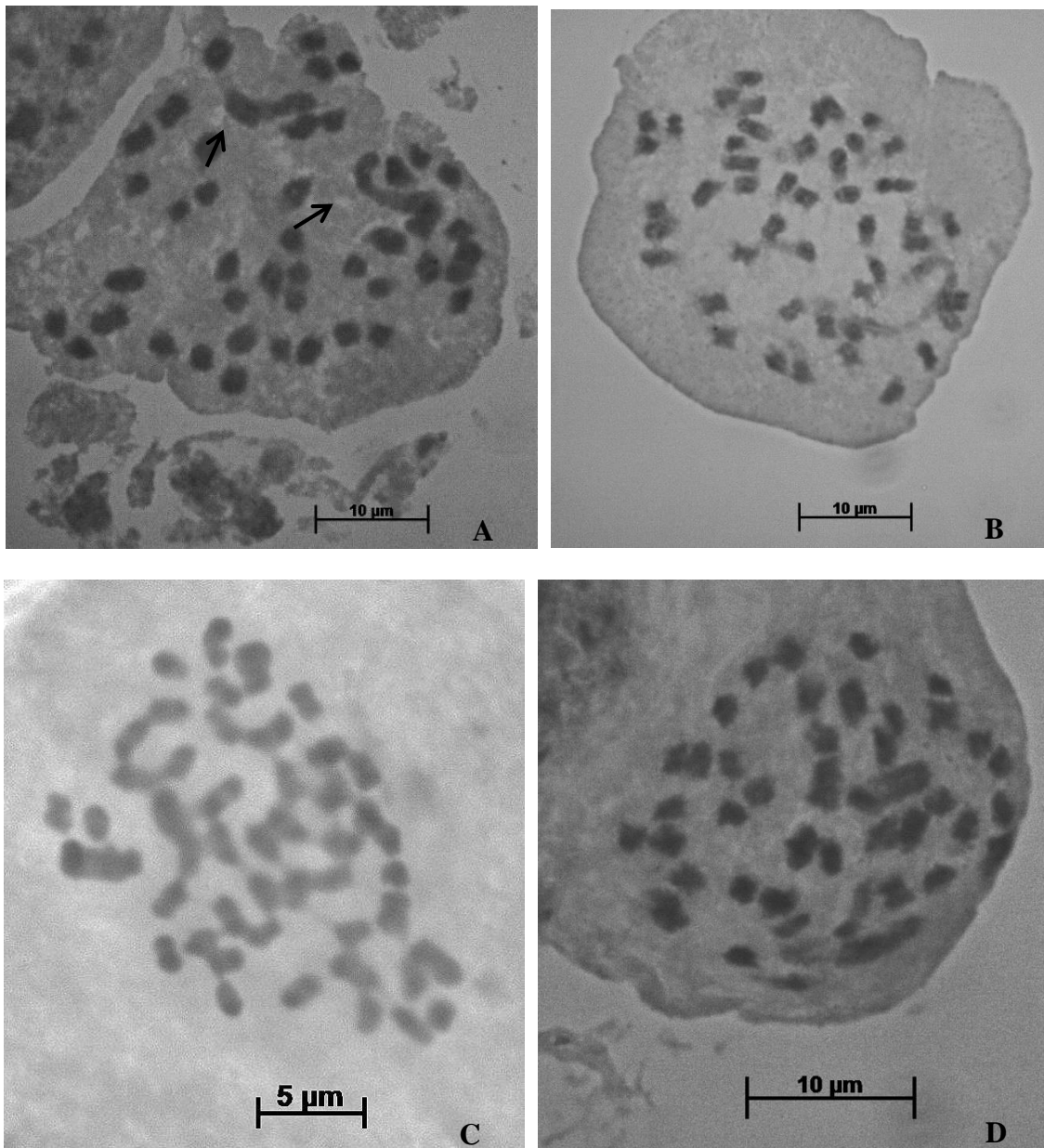


Fig. 5 Chromosomes of species of Spiranthinae studied. **a** *Sarcoglottis sceptrodes* ($2n = 46$), **b** *Sarcoglottis scintillans* ($2n = 46$), **c** *Stenorrhynchos albidomaculatum* ($2n = 46$) and **d** *Stenorrhynchos* cf. *speciosum* ($2n = 46$). Arrows in **a** indicate largest chromosomes in bimodal karyotypes

Table 1 List of species analysed of Spiranthinae and Cranichidinae with respective locality, vouchers and chromosome numbers ($2n$), previous counts and references

Taxon	Locality and voucher	$2n$	$2n$ – Previous counts
Spiranthinae			
<i>Aulosepalum riodelayense</i> (Burns-Bal.) Salazar	Mexico, Oaxaca, El Vado, Rio del Vado, <i>Salazar 7553</i> (MEXU)	64	-
<i>Aulosepalum tenuiflorum</i> (Greenm.) Garay	Mexico, Oaxaca, Ayoquezco de Aldama, <i>Cruz-Lustre 158</i> (MEXU)	60	-
<i>Cyclopogon luteoalbus</i> (A.Rich & Galeotti) Schltr.	Mexico, Querétaro, Landa de Matamoros, <i>Cruz-Lustre 970</i> (MEXU)	36	-
<i>Dichromanthus aurantiacus</i> (Lex.) Salazar & Soto Arenas	Mexico, Distrito Federal, Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, <i>Cruz-Lustre 155</i> (MEXU)	40	-
<i>Eltroplectris calcarata</i> (Sw.) Garay & H.R.Sweet	Brazil, Espírito Santo, Santa Teresa, Reserva Biológica Augusto Ruschi, <i>Guimarães et al. 198</i> (SP)	42	-
<i>Eltroplectris triloba</i> (Lindl.) Pabst	Brazil, Espírito Santo, Linhares, Reserva Biológica Sooretama, <i>Guimarães et al. 204</i> (SP)	46	46 – Martínez (1985)
<i>Mesadenella cuspidata</i> (Lindl.) Garay	Brazil, São Paulo, Itararé, <i>Barros s.n.</i> (SP)	38/42	46 – Martínez (1985), Daviña et al. (2009)
<i>Pelexia funckiana</i> (A.Rich. & Galeotti) Schltr.	Mexico, Veracruz, San Andrés Tuxtla, <i>Salazar 8390</i> (MEXU)	46	-
<i>Sarcoglottis assurgens</i> (Rchb.f.) Schltr.	Mexico, Guerrero, Chilpancingo, Pueblo de Acahuizotla, <i>Figueroa 302</i> (MEXU)	46	-
<i>Sarcoglottis</i> cf. <i>grandiflora</i> (Lindl.) Klotzsch	Ecuador, <i>Salazar 8500</i> (cultivated specimen)	46	46 – Martínez (1985), Felix & Guerra (2005), Daviña et al. (2009)
<i>Sarcoglottis richardiana</i> (Schltr.) Salazar & Soto Arenas	Mexico, Chiapas, Ocotulito, Area de Protección de Flora y Fauna Nahá, <i>Salazar 8227</i> (MEXU)	50	-
<i>Sarcoglottis rosulata</i> (Lindl.) P.N.Don	Mexico, Oaxaca, Ayoquezco de Aldama, <i>Cruz-Lustre 142</i> (MEXU)	33	-
<i>Sarcoglottis szeptrodes</i> (Rchb.f.) Schltr.	Mexico, Quintana Roo, Felipe Carrillo Puerto, <i>Hágsater 12236</i> (MEXU)	46	-
<i>Sarcoglottis schaffneri</i> (Rchb.f.) Ames	Mexico, Distrito Federal, Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, <i>Cruz-Lustre 156</i> (MEXU)	46	-
<i>Sarcoglottis scintillans</i> (E.W.Greenw.) Salazar & Soto Arenas	Mexico, Oaxaca, <i>Ramírez 15</i> (FEZA)	46	-

<i>Sauroglossum elatum</i> Lindl.	Brazil, Minas Gerais, Serra do Cipó, <i>Guimarães et al. 159</i> (SP)	46	46 – Martínez (1985)
<i>Stenorrhynchos albidomaculatum</i> Christenson	South America, without location, <i>Guimarães 294</i> (cultivated specimen)	46	-
<i>Stenorrhynchos</i> cf. <i>speciosum</i> (Jacq.) Rich.	Mexico, without location, <i>Guimarães 293</i> (cultivated specimen)	46	-
Cranichidinae			
<i>Ponthieva andicola</i> Rchb.f.	Ecuador, <i>Salazar 8428</i> (cultivated specimen)	26	-
<i>Ponthieva pilosissima</i> (Senghas) Dodson	Ecuador, <i>Salazar 8427</i> (cultivated specimen)	±42	-

Table 2 Chromosome measures of *Mesadenella cuspidata*

Pair	<i>Mesadenella cuspidata</i> (2n = 38)				<i>Mesadenella cuspidata</i> (2n = 42)			
	ATL (μm)	CI	Type	SC	ATL (μm)	CI	Type	SC
1	0.49	40.82	m	+	1.33	22.26	a	+
2	0.60	39.50	sm	-	1.02	38.42	sm	-
3	0.43	44.71	m	-	0.79	38.61	sm	-
4	0.33	36.36	sm	-	0.79	44.30	m	-
5	0.34	39.71	sm	-	0.72	39.86	sm	-
6	0.34	42.65	m	-	0.71	41.55	m	-
7	0.30	40.00	sm	-	0.68	40.44	m	-
8	0.29	43.86	m	-	0.71	44.37	m	-
9	0.26	37.25	sm	-	0.66	41.22	m	-
10	0.26	39.22	sm	-	0.61	38.52	sm	-
11	0.26	42.31	m	-	0.60	39.17	sm	-
12	0.26	43.14	m	-	0.66	46.56	m	-
13	0.25	44.00	m	-	0.62	43.09	m	-
14	0.25	44.90	m	-	0.60	42.02	m	-
15	0.24	44.68	m	-	0.57	40.35	m	-
16	0.23	43.48	m	-	0.61	47.11	m	-
17	0.23	44.44	m	-	0.52	37.86	sm	-
18	0.22	44.19	m	-	0.61	48.76	m	-
19	0.18	45.71	m	-	0.59	48.31	m	-
20	-	-	-	-	0.56	47.75	m	-
21	-	-	-	-	0.50	48.00	m	-

Average of total chromosome length (ATL), centromeric index (CI), Type of chromosome: metacentric (m), submetacentric (sm), acrocentric (a), and secondary constriction (SC): presence (+) and absence (-)

Table 3 Chromosome measures of *Eltroplectris calcarata*, *E. triloba* and *Sauroglossum elatum*

Pair	<i>Eltroplectris calcarata</i>			<i>Eltroplectris triloba</i>			<i>Sauroglossum elatum</i>		
	ATL (μm)	CI	Type	ATL (μm)	CI	Type	ATL (μm)	CI	Type
1	1.71	37.13	sm	1.81	31.5 8	sm	0.45	34.83	sm
2	1.26	36.90	sm	1.17	24.0 3	a	0.37	39.73	sm
3	1.21	39.26	sm	1.09	43.3 2	m	0.33	37.88	sm
4	1.09	38.71	sm	0.96	38.7 4	sm	0.33	38.46	sm
5	0.99	37.56	sm	0.95	39.4 7	sm	0.36	47.22	m
6	0.95	39.47	sm	0.81	32.7 2	sm	0.36	47.22	m
7	0.83	32.53	sm	0.76	32.2 4	sm	0.32	40.63	m
8	0.89	38.98	sm	0.76	33.1 1	sm	0.31	40.32	m
9	0.82	33.74	sm	0.75	36.6 7	sm	0.33	44.62	m
10	0.90	41.34	m	0.74	36.4 9	sm	0.32	44.44	m
11	0.76	31.58	sm	0.77	40.2 6	m	0.33	47.69	m
12	0.81	37.04	sm	0.71	35.9 2	sm	0.31	45.16	m
13	0.75	34.23	sm	0.68	33.8 2	sm	0.31	45.90	m
14	0.86	44.44	m	0.71	38.3 0	sm	0.29	43.86	m
15	0.78	40.00	sm	0.69	37.2 3	sm	0.30	50.00	m
16	0.75	40.27	m	0.69	38.4 1	sm	0.29	48.28	m
17	0.72	39.58	sm	0.72	42.6 6	m	0.29	48.28	m
18	0.79	46.84	m	0.71	42.5 5	m	0.29	47.37	m
19	0.70	41.01	m	0.62	35.7 7	sm	0.28	45.45	m
20	0.71	45.77	m	0.68	46.3 2	m	0.27	44.44	m
21	0.65	46.51	m	0.62	42.7 4	m	0.25	42.00	m
22	-	-	-	0.61	45.9 0	m	0.25	48.00	m
23	-	-	-	0.56	48.2 1	m	0.21	47.62	m

Average of total chromosome length (ATL), centromeric index (CI), Type of chromosome: metacentric (m), submetacentric (sm), and acrocentric (a)

Table 4 Karyological features of the species analysed

Taxon	CN	TCL	KF
<i>Eltroplectris calcarata</i> (Sw.) Garay & H.R.Sweet	42	18.88	7m + 14sm
<i>Eltroplectris triloba</i> (Lindl.) Pabst	46	18.52	8m + 14sm + 1a
<i>Mesadenella cuspidata</i> (Lindl.) Garay	38	5.71	13m + 6sm
	42	14.41	14m + 6m + 1a
<i>Sauroglossum elatum</i> Lindl.	46	7.10	19m + 4sm

Chromosome number (CN), total chromosome length (TCL), karyotypic formula (KF), metacentric (m), submetacentric (sm), and acrocentric (a)