

Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

**FILOGEOGRAFIA DO COMPLEXO *BULBOPHYLLUM EXALTATUM* E
EVOLUÇÃO DOS SISTEMAS DE REPRODUÇÃO NO CLADO
NEOTROPICAL DE *BULBOPHYLLUM* (ORCHIDACEAE)**

Pesquisadora responsável: Cecília Fonseca Fiorini

Orientador : Prof. Dr. Eduardo Leite Borba

Maio de 2016

Introdução

*Filogeografia do complexo **Bulbophyllum exaltatum***

Bulbophyllum Thouars tem distribuição pantropical, ocorrendo predominantemente na Ásia, e cerca de 1500 espécies, o que faz dele um dos maiores gêneros de Orchidaceae (Smidt *et al.* 2011). No Neotrópico ocorrem cerca de 60 espécies de *Bulbophyllum*, as quais formam um grupo monofilético. Baseado em análises filogenéticas utilizando sequências de DNA, este clado neotropical foi recentemente dividido em seis seções: *B. sect. Bulbophyllaria*, *B. sect. Furoescens*, *B. sect. Napelli*, *B. sect. Micranthae*, *B. sect. Xiphizusa* e *B. sect. Didactyle* (Smidt 2007; Smidt *et al.* 2011). No grupo há uma grande diversidade de formas florais, e esta variação está relacionada à ampla gama de mecanismos de polinização observados entre as espécies (Smidt 2007).

Várias espécies de *Bulbophyllum* podem ser encontradas nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, que é uma cordilheira com mais de 1000 km de extensão localizada nos estados de Minas Gerais e Bahia, e em formações rochosas adjacentes. Nestes campos rupestres, populações de espécies vegetais, especialmente as rupícolas, ocorrem de forma disjunta devido à descontinuidade dos afloramentos rochosos, o que pode ser responsável pela grande diferenciação populacional e pelo elevado nível de endemismo e riqueza de espécies encontrado nestas formações (Giulietti & Pirani 1988; Rapini *et al.* 2008). O Espinhaço surgiu de um único evento orogênico ocorrido no Proterozóico, mas diferenças lito-estruturais e morfológicas permitem a distinção dos platôs Meridional e Setentrional. Os Campos Rupestres da Cadeia do Espinhaço foram recentemente reconhecidos como OCBILS, abrindo novas perspectivas para sua conservação (Silveira 2015). Hopper e colaboradores (2015) apontam a necessidade da realização de mais estudos, especialmente genéticos, para aumentar a compreensão da evolução dos organismos e da biodiversidade desse ambiente.

Em um estudo realizado com o complexo *Bulbophyllum exaltatum*, que ocorre predominantemente no Espinhaço, Ribeiro *et al.* (2008) observaram que não há relação entre a delimitação taxonômica das espécies (baseada apenas na complexa morfologia do grupo) e a frequência de alelos de alozimas, sendo que a estruturação apresenta um padrão geográfico coincidente com a disjunção entre os platôs. Neste complexo foi observado compartilhamento de alelos entre as espécies, e populações de diferentes espécies de uma mesma região (norte ou sul do Espinhaço) são geneticamente mais semelhantes entre do que populações da mesma espécie localizadas em regiões distintas. Os autores sugeriram que tal padrão pode ser atribuído à hibridação entre as espécies ou ao compartilhamento de polimorfismos ancestrais (Ribeiro *et al.* 2008). Apesar de Ribeiro *et al.* (2008) fornecerem evidências sobre a ocorrência de um desses processos, as limitações do marcador utilizado nesse trabalho impossibilitaram a utilização de

abordagens filogenéticas e geográficas adequadas para a distinção entre tais hipóteses. Para tanto é necessário a utilização de marcadores mais variáveis e o estudo dos genomas nuclear e plastidial, uma vez que os marcadores utilizados naquele trabalho apresentam baixa variação e representam apenas partes do genoma nuclear.

A abordagem filogeográfica pode fornecer evidências sobre processos como expansões e retrações populacionais, dispersão, vicariância e contato secundário, podendo proporcionar um melhor entendimento sobre a origem dos padrões de diversidade genética no complexo *B. exaltatum* (Diniz-Filho *et al.* 2008; Hickerson *et al.* 2010). Os métodos de coalescência utilizados na filogeografia permitem ainda a inferência de tempos de divergência entre linhagens, possibilitando que evidências climáticas e geomorfológicas sejam associadas aos processos de diferenciação (Bouckaert *et al.* 2014). Turchetto-Zolet *et al.* (2013), ressaltam que a maior parte dos estudos filogeográficos na América do Sul discute padrões de vertebrados, principalmente em florestas úmidas, e que estudos com vegetais e invertebrados distribuídos nos demais ambientes desse continente seriam fundamentais para um melhor entendimento de sua dinâmica evolutiva, auxiliando a compreensão da origem e manutenção de sua biota. Além de serem relevantes para a compreensão de processos evolutivos, estudos filogeográficos podem auxiliar na determinação de áreas prioritárias para conservação, na identificação de linhagens crípticas e também na previsão de possíveis alterações vegetacionais em função de mudanças climáticas, sendo fundamentais para o planejamento de estratégias de conservação da biodiversidade (Frankham *et al.* 2008; D'Amen *et al.* 2013).

Complexos de espécie são conjuntos de populações onde os limites entre as espécies não podem ser claramente definidos devido à existência de um contínuo de diferenças fenotípicas (Böcher 1967). No caso do complexo *B. exaltatum*, que compreende os nomes *B. exaltatum* (mais antigo), *B. geraense*, *B. longispicatum*, *B. roraimense*, *B. warmingianum*, *B. perii*, *B. proencai*, *B. ipanemense*, *B. involutum*, *B. machupicchuense* e *B. gomesii*, a continuidade dos estados de caráter se traduz na existência de populações com fenótipos claramente distintos nos extremos deste estados, porém interligadas por populações com características intermediárias, permitindo, *a priori*, apenas agrupamentos arbitrários ou artificiais (Ribeiro *et al.* 2008). É possível que além de um gradiente morfológico exista também um gradiente de inter-compatibilidade entre as populações, como já foi constatado em *Iris* (Iridaceae) (Sapir & Mazzucco 2012). Além de permitir testes de hipótese para distinguir entre hibridação e compartilhamento de polimorfismos ancestrais, um estudo mais detalhado das espécies do complexo *B. exaltatum* poderá dar suporte taxonômico à delimitação das espécies do grupo.

A formação politópica de híbridos naturais entre *B. weddellii* e *B. involutum*, como sugerido por Borba & Semir (1998a) e Azevedo *et al.* (2006), pode ser um dos fatores responsáveis pela

dificuldade na delimitação taxonômica no complexo *B. exaltatum*. Foi sugerido que apenas *B. weddellii* seja receptor de pólen na formação de híbridos, pois o tamanho do polinário desta espécie não é compatível com a cavidade estigmática de *B. involutum* (Borba & Semir 1998a, 1999). Contudo, aparentemente o retrocruzamento dos híbridos com os parentais ocorre apenas na direção contrária, com *B. involutum* como receptor de pólen, pois não é observado um gradiente de morfologia entre os híbridos e os indivíduos de *B. weddellii*. Já entre os híbridos e os indivíduos de *B. involutum* existe uma gama de formas intermediárias em mais de uma população, indicando a ocorrência de introgressão na espécie (Azevedo *et al.* 2006).

Com o estudo filogeográfico do complexo *B. exaltatum* e espécies relacionadas e polinizações experimentais entre os mesmos táxons, pretendemos responder as seguintes questões: 1) Podem ser distinguidas linhagens que guardam relações com os táxons definidos morfologicamente? 2) Ocorre de fato hibridação ou introgressão natural politópica entre *B. involutum* e *B. weddellii*? Em que intensidade e quais são as consequências desses eventos nos complexos padrões morfológicos observados neste par de espécies? 3) A correlação entre o grau de compatibilidade de populações coespecíficas e interespecíficas está relacionada à distribuição geográfica ou a grupos genéticos?

Hipóteses:

1) É possível identificar linhagens baseadas em ambos os genomas que sejam congruentes com os táxons descritos.

Predição: As espécies *B. exaltatum* e *B. involutum* podem ser recuperadas nas análises.

2) Existe ao menos uma quebra filogeográfica em comum para todos os táxons.

Predição: as populações ao norte da divisa entre os estados de Minas Gerais e Bahia são significativamente diferentes daquelas coespecíficas localizadas ao sul desta divisa.

3) Ocorre hibridação e introgressão no complexo *B. exaltatum*.

Predição: Hibridação entre *B. weddellii* e *B. involutum* ocorre de forma politópica.

4) Eventos de hibridação e introgressão são responsáveis pelo complexo padrão de variação apresentado por algumas espécies.

Predição: *B. involutum* tem parte da sua variação em decorrência de sua hibridação com *B. weddellii*.

Evolução dos sistemas de reprodução no clado neotropical de Bulbophyllum

A grande diversidade morfológica da família Orchidaceae é atribuída à alta adaptação dessas plantas a atrair polinizadores, que variam de insetos a pássaros (Proctor *et al.* 1996). Devido à freqüente especificidade desses sistemas de polinização, vários estudos têm sido

realizados na tentativa de esclarecer os mecanismos de co-evolução entre orquídeas e polinizadores (van der Pijl & Dodson 1966, Dressler, 1993). Por outro lado, relativamente pouca importância tem sido dada à biologia reprodutiva de espécies polinizadas por Diptera, por serem considerados polinizadores promíscuos e ineficientes (Christensen 1994, Proctor et al. 1996). Entretanto, Borba & Semir (2001) e Barbosa et al. (2009) demonstraram que em espécies dos gêneros *Acianthera* e *Octomeria* há uma elevada especificidade entre plantas e polinizadores. Em Orchidaceae, a miofilia ocorre em diversas linhagens não proximamente relacionadas, indicando que polinização por Diptera é uma característica que surgiu várias vezes no grupo, sendo a subtribo neotropical Pleurothallidinae e o gênero pantropical *Bulbophyllum*, os dois maiores grupos miofílicos de orquídeas (van der Pijl & Dodson 1966, Dressler 1993, Christensen 1994).

O sistema de reprodução é um importante fator na determinação da variabilidade genética das populações. A maior parte das espécies de orquídeas são autocompatíveis, sendo a autopolinização evitada por barreiras pré-polinização, aparentemente garantindo a manutenção de níveis de heterozigosidade moderados a elevados nas populações (van der Pijl & Dodson 1966, Dressler 1981, 1993, Borba & Semir 1999, Singer & Cocucci 1999, Borba et al. 2001b). O comportamento do polinizador também interfere na heterozigosidade de populações, com o padrão de forrageamento diferindo entre os grupos. Moscas são polinizadores que apresentam comportamento que favorece autopolinização, realizando visitas longas e a diversas flores de uma mesma inflorescência ou indivíduo (Borba & Semir 1998b, 2001). Como orquídeas são tipicamente autocompatíveis, seria esperado que as populações de espécies miofílicas apresentassem baixa heterozigosidade. Entretanto, Borba et al. (2001b) verificaram que os níveis de heterozigosidade em populações de espécies de *Acianthera* auto-incompatíveis são elevados se comparados aos de outras espécies de Orchidaceae, sugerindo que auto-incompatibilidade seria responsável pela manutenção dos altos níveis de heterozigosidade nestas populações e teria surgido na subtribo em resposta ao comportamento do polinizador.

Poucas espécies de *Bulbophyllum* tiveram o seu sistema de reprodução estudado, mas a auto-incompatibilidade entre e dentro das seções é uma característica variável. Não se sabe se as espécies em *B. sect. Bulbophyllaria* e *B. sect. Furvescens*, que foram as primeiras seções a divergirem no clado neotropical, são auto-incompatíveis (AI) ou autocompatíveis (AC) ou mesmo apresentam outro sistema reprodutivo, pois nenhum estudo de sistemas de reprodução foi realizado com elas até o momento. Nas demais seções AI é o estado mais comum, exceto na seção *Didactyle*, cujas espécies estudadas são autocompatíveis. Porém, apenas 4 de 12 espécies foram estudadas em *Micranthae*, 2 de 23 em *Xiphizusa*, 3 de 7 em *Didactyle* e 2 de 12 em *Napelli*. Na seção *Didactyle*, Borba et al. (1999) observaram que *B. weddellii*, *B. involutum* e *B. ipanemense* (= *B. exaltatum*) são auto-compatíveis, sendo que as duas últimas espécies apresentam barreiras

mecânicas temporais à autopolinização (Borba & Semir 1999). Por outro lado, estudos mostram que espécies de outras seções neotropicais apresentam podem apresentar alguma variação no sistema de auto-incompatibilidade, como ocorre em *B. sect. Napelli*: *B. glutinosum* não chega a formar frutos se auto-polinizado, porém *B. regnellii* forma frutos com sementes inviáveis (Verola 2002). É possível que a resposta de *B. regnellii* às autopolinizações seja variável e que sementes viáveis sejam produzidas em uma pequena parte desses eventos, como observado em espécies de *Acianthera* (Borba *et al.* 2001a). Essa característica pode favorecer a colonização de novas áreas e a manutenção de populações com pequeno tamanho populacional ou impactadas (Borba *et al.* 2001a). Na seção *Napelli* barreiras pré-polinização à auto-polinização não estão presentes em ao menos 3 espécies, mas ocorre de forma semelhante à observada em *B. sect. Didactyle* em ao menos uma espécie (Borba, comunicação pessoal). Porém não é sabido se em *B. sect. Napelli* a existência de barreiras pré-polinização à auto-polinização está associada à AC, como ocorre em *Didactyle*. As informações sobre os sistemas de reprodução do clado neotropical de *Bulbophyllum* encontram-se sumarizadas na figura 1.

A espécie asiática *B. ambrosia*, assim como espécies de *Dendrobium*, gênero proximoamente relacionado a *Bulbophyllum*, são auto-incompatíveis (Johansen 1990; Chen & Gao 2011; Pinheiro *et al.* 2015), fazendo com que seja possível que a AI seja uma característica simplesiomórfica do clado neotropical de *Bulbophyllum* e que, conseqüentemente, tenham ocorrido reversões nos grupos autocompatíveis. É possível ainda que exista variação entre AI e AC dentro de cada uma das seções. Para que as hipótese de AI como simplesiomorfia no clado neotropical de *Bulbophyllum* e de polimorfismo AI/AC dentro das seções sejam testadas é necessário que um número significativo de representantes de todas as seções sejam avaliados, assim como de espécies do grupo irmão desse clado, uma vez que não existem informações sobre as primeiras linhagens a se divergirem entre os *Bulbophyllum* neotropicais, a amostragem atual dentro das seções é baixa e há apenas um trabalho publicado neste tema com espécies de *Bulbophyllum* não neotropicais.

Com o estudo da evolução dos sistemas de reprodução no clado neotropical de *Bulbophyllum*, pretendemos responder as seguintes questões: 1) Quais tipos de barreiras à autopolinização e à autofertilização ocorrem nas seções e qual a correlação entre elas? 2) Tais barreiras tiveram evolução homoplástica e, se sim, existe algum padrão nas direções de mudança?

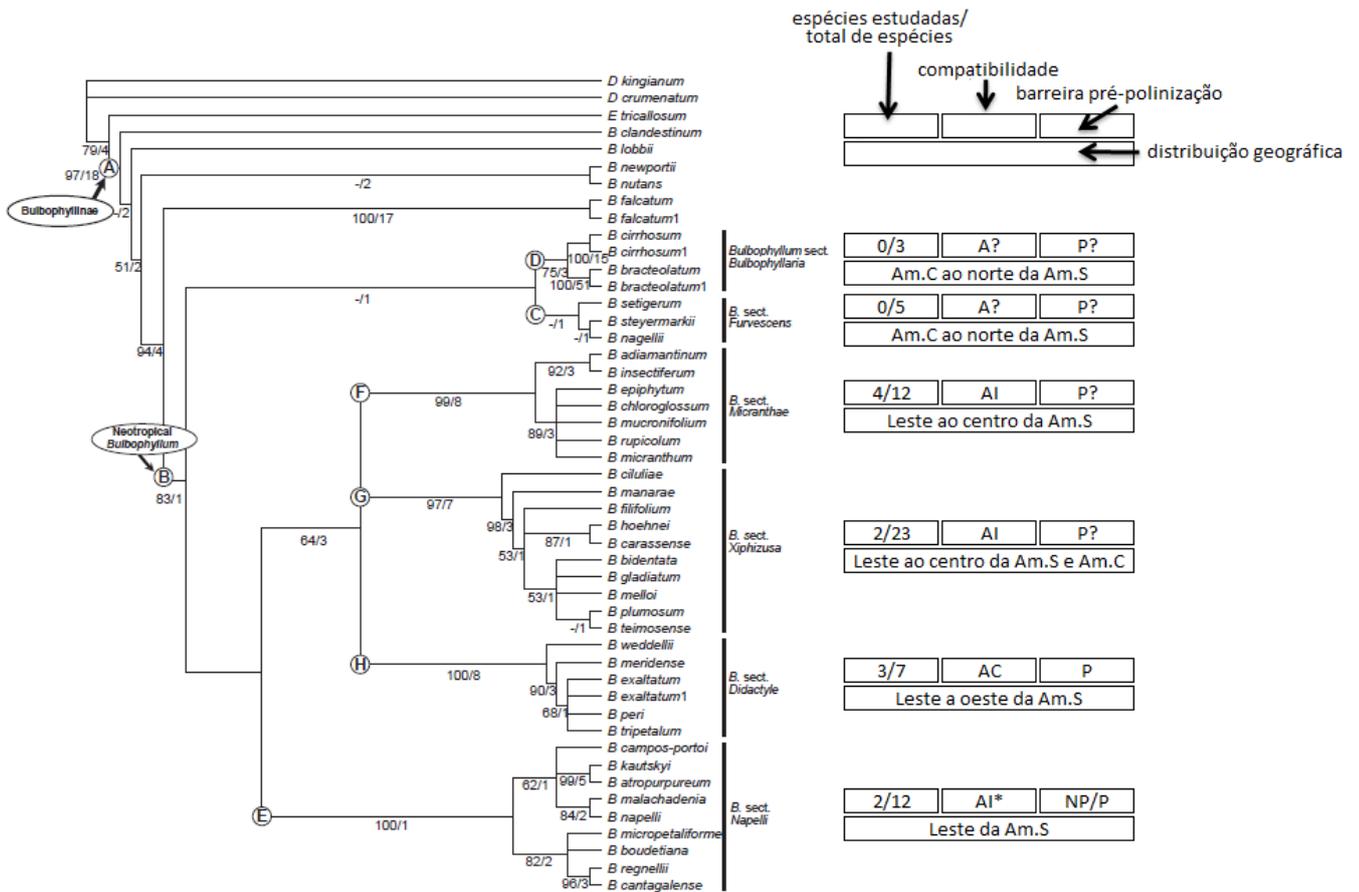


Figura 1 Síntese sobre o conhecimento atual dos sistemas de reprodução do clado neotropical de *Bulbophyllum*. Consenso estrito de 10.000 árvores mais parcimoniosas obtidos pela análise dos dados combinados (plastídeo psbA-trnH + trnS-TRNG e nrITS). Os percentuais de bootstrap acima de 50% e os índices de decaimento são apresentados abaixo dos ramos (Comprimento = 1053, IC = 0,707, RI = 0,767). A, *Bulbophyllinae*; B, Clado Neotropical; C, sect. *Furvescens*; D, sect. *Bulbophyllaria*; E, sect. *Napelli*; F, sect. *Micranthae*; G, sect. *Xiphizusa*; H, sect. *Didactyle*. Modificado a partir do cladograma de Smidt et al. (2011). São apresentados a distribuição geográfica e o número de espécies cujo o sistema de reprodução foi estudado, em relação ao número total de espécies, para cada uma das seções. Compatibilidade: **A?**, não existem informações; **AC**, autocompatível; **AI**, auto-incompatível; **AI***, auto-incompatibilidade com variação dentro da seção. Barreira pré-polinização à autopolinização: **P?**, não existem informações; **P**, presente; **NP**, ausente. Distribuição geográfica: **Am.C**, América Central; **Am.S**, América do Sul.

Hipóteses;

1) Auto-incompatibilidade é uma característica ancestral no clado neotropical de *Bulbophyllum*.

Predição 1: A ocorrência de autocompatibilidade representa uma reversão em relação à auto-incompatibilidade.

Predição 2: A autocompatibilidade é uma característica homoplástica em diferentes seções do gênero no clado neotropical.

2) Existe associação entre ocorrência de auto-incompatibilidade e barreiras pré-polinização à autopolinização nas espécies neotropicais de *Bulbophyllum*

Predição: A correlação é negativa, inexistindo ambos os tipos de barreira à autogamia em uma mesma espécie.

3) O grau de inter-compatibilidade (entre espécies) depende da distância geográfica entre elas.

Predição: Populações interespecíficas situadas em uma mesma região (norte ou sul) apresentam maior inter-compatibilidade do que aquelas situadas em diferentes regiões.

Objetivos

Filogeografia do complexo *Bulbophyllum exaltatum*

O objetivo da filogeografia do complexo *Bulbophyllum exaltatum* é esclarecer as relações de conectividade genética as populações desse grupo, em busca de compartilhamento de polimorfismo ancestral e eventos de hibridização e introgressão, e testando a existência de quebras filogeográficas que resultem na diferenciação observada por Ribeiro *et al.* (2008). Para isso, pretende-se:

- i. Avaliar a magnitude e a distribuição geográfica da diversidade genética;
- ii. Testar se a disjunção observada por Ribeiro *et al.* (2008) é observada também com marcadores de sequências nucleares e plastidiais;
- iii. Descrever linhagens e estimar datas de divergências entre elas;
- iv. Investigar os padrões e de fluxo gênico atual entre as populações e se há compartilhamento de alelos ancestrais, hibridização e introgressão entre as espécies;
- v. Investigar alterações demográficas e de distribuição geográfica ocorridas no passado;
- vi. Correlacionar distâncias genéticas e potencial de intercruzamento entre as populações;

*Evolução dos sistemas de reprodução no clado neotropical de **Bulbophyllum***

O objetivo do estudo da evolução dos sistemas de reprodução no clado neotropical de *Bulbophyllum* é avaliar a diversidade de barreiras morfológicas e de respostas moleculares à autopolinização nas seções desse grupo com uma abordagem evolutiva. Os objetivos específicos desse projeto são:

- i. Determinar as características de sistemas de reprodução de taxa do clado neotropical de *Bulbophyllum*;
- ii. Averiguar a existência de mecanismos genéticos que evitam a autofertilização e morfológicos/etológicos que evitam a autopolinização;
- iii. Averiguar o potencial de cruzamentos interespecíficos e a existência de barreiras à hibridação;
- iv. Correlacionar distâncias genéticas e potencial de cruzamentos interespecíficos;
- v. Avaliar a existência de homoplasias na origem das características de sistemas de reprodução observadas.

Metodologia

Coletas

Para a filogeografia do complexo *Bulbophyllum exaltatum* e para o estudo da evolução dos sistemas de reprodução no clado *Bulbophyllum* neotropical indivíduos inteiros nunca serão coletados. Os indivíduos de *Bulbophyllum* são compostos por vários pseudobulbos, eventualmente por algumas dezenas deles, conectados por rizoma. Apenas cerca de três desses pseudobulbos serão removidos de cada planta amostrada (figura 1). Dependendo da espécie, em particular aquelas com número muito elevado de pseudobulbos mas com poucas flores por inflorescência, um ramo com número pouco superior de pseudobulbos pode vir a ser removido, de modo que a muda produzida em cultivo forneça flores suficientes para a realização dos experimentos. Para que as populações naturais não sofram impacto negativo com as coletas, pseudobulbos serão removidos apenas se a planta possuir um número elevado deles, de forma que o indivíduo seja preservado, não comprometendo a sua sobrevivência (nuca será removido mais do que um terço do indivíduo). A relação das espécies que serão coletados é apresentada na tabela 1 (nesta tabela, conjuntos de três pseudobulbos são denominados “ramos”). Após a coleta, os ramos serão cultivados em casa de vegetação do Departamento de Botânica da UFMG para aclimatação e realização dos experimentos, sendo posteriormente incorporados à Coleção Viva de Orquídeas do Jardim Botânico e Museu de História Natural da UFMG, podendo ser utilizados

em outros estudos futuros e compondo banco ativo de germoplasma *ex situ*, auxiliando na conservação das populações naturais das espécies.

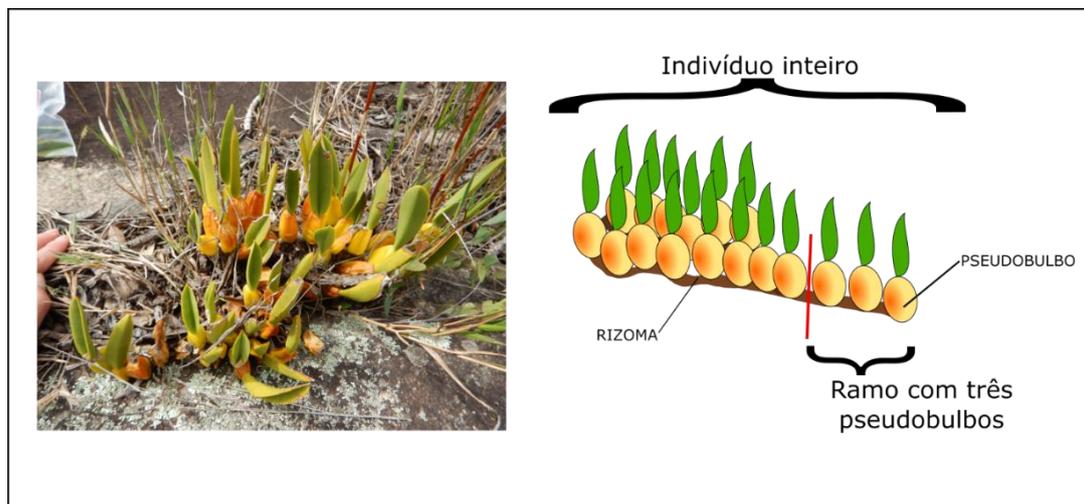


Figura 1. Morfologia vegetativa de *Bulbophyllum* e esquema de coleta de ramos. O ponto de corte para a coleta é representado pela linha vermelha. Indivíduos inteiros nunca serão coletados.

Filogeografia do complexo Bulbophyllum exaltatum

Espécie coletada no Parque Estadual do Guartelá-PR : *B. perri*

Amostragem

Para a realização dos estudos filogeográficos, cerca de 5 a 10 populações de *B. involutum* e 15 a 20 populações de *B. exaltatum* s.l. (incluindo todos os seus potenciais sinônimos, apontados por Smidt 2007) serão coletadas, abrangendo toda a distribuição geográfica (incluindo extremos geográficos e populações disjuntas), biomas, fitofisionomias e formações geológicas de ocorrência do complexo. Sempre que possível serão coletadas e desidratadas individualmente em sílica gel folhas jovens de 15 indivíduos de cada localidade. Para que as populações naturais não sofram impacto negativo com as coletas, a folha será removida apenas se a planta possuir um número razoável de pseudobulbos, de forma que o indivíduo seja preservado. Indivíduos inteiros nunca serão coletados. Tentativamente, toda a variação morfológica e diversidade taxonômica, tal como a de espécies segregadas e taxa intraespecíficos sinônimos, será amostrada. Indivíduos de espécies relacionadas (*B. machupicchuense*, *B. gomesii*, *B. perri* e *B. proencai*), assim como populações de *B. weddellii* serão incluídas nas análises. Tentativamente, serão amostradas as populações onde os holótipos dos táxons foram amostrados. As exsicatas de um indivíduo de cada população serão depositadas no herbário BHCB.

Filogeografia plastidial

O DNA total será extraído de folhas secas em sílica gel, pulverizadas com nitrogênio líquido, utilizando brometo de cetilmetil amônio (CTAB), de acordo com Doyle & Doyle (1987). Serão sequenciadas regiões do DNA de cloroplasto (cpDNA) e DNA nuclear, a partir de pares de primers previamente testados para escolha daqueles que apresentarem maior variabilidade para cada grupo específico, baseado na literatura. Os fragmentos serão amplificados por PCR em um volume total de 20 µL contendo 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, tampão de reação 1x [75 mM Tris HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄], 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,75 µM de cada iniciador, 0,04mg/mL de alumina de soro bovino (BSA) e DNA genômico. As condições serão: um ciclo de 94 °C por 1 min; 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 53 °C por 40 s e 72 °C por 40 s; e um ciclo de 75 °C por 5 min. As condições de amplificação serão padronizadas de acordo com as necessidades do material e de cada primer utilizado. Os produtos de amplificação serão avaliados qualitativamente em eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corados com GelRed™ (Biotium) e purificados com PEG 20%. Os sequenciamentos serão realizados em sentido direto e reverso pela metodologia de Sanger em sequenciador automático ABI PRISM 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) usando o BigDye Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit (Applied Biosystems). Todas as sequências serão depositadas no GenBank. O consenso das sequências direta e reversa das regiões será realizado com o software Staden Package 1.7.0 (Staden 1996) e o alinhamento das sequências será realizado com MEGA 6 (Edgar 2004; Tamura *et al.* 2013). Com o auxílio do programa BioEdit 5.0.6 (Hall 1999), a matriz de alinhamento passará por inspeção visual para detecção de sítios polimórficos espúrios. Possíveis indels serão codificados de acordo com o esquema Simple Indel Coding (SIC, Simmons & Ochoterena 2000), implementado em programa SeqState (Müller 2005).

Filogeografia nuclear

Um parcela de 96 indivíduos utilizados para a filogeografia plastidial será também sequenciada com a metodologia nextRAD pela empresa SNPsaurus (<http://snpsaurus.com/>). Como descrito por Russello *et al.* (2015), no método nextRAD o DNA genômico é fragmentado utilizando o Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina, Inc), o qual também liga adaptadores às extremidades dos fragmentos. Os primers utilizados na amplificação subsequente são constituídos da sequência complementar aos adaptadores, além de uma sequência arbitrária de 9 nucleotídeos. Assim, o genoma é parcialmente amostrado, pois apenas fragmentos que sejam iniciados por tal sequência serão amplificados com sucesso. Serão avaliados cerca de 15.000 loci nextRAD, com uma cobertura de 20X, em leituras de 100 bp.

Microsatélites

Serão desenvolvidos marcadores microsatélites para 96 loci em *B. weddellii* e *B. involutum*, pela empresa Ecogenics. Tentativamente, tais marcadores serão desenhados de forma a permitir transferibilidade para as demais espécies do complexo *B. exaltatum* e a realização de genotipagem multiplex. Os primers desenvolvidos serão testados em 24 indivíduos. Os fragmentos serão amplificados por PCR em um volume total de 20 µL contendo 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, tampão de reação 1x (100 mM Tris HCl; pH 8,3; 500 mM KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,1 µM de cada iniciador e DNA genômico. O programa de amplificação será constituído por um ciclo de 94 °C por 5 min; 20 ciclos de 95 °C por 30 s, temperatura de anelamento do primer por 40 s e 72 °C por 40 s; e um ciclo de 75 °C por 5 min. As condições de amplificação serão padronizadas de acordo com as necessidades do material e de cada primer utilizado. Os produtos de amplificação serão analisados em sequenciador automático ABI3730XL (Applied Biosystems), utilizando 400HD ROXTM (Applied Biosystems) como padrão de tamanho em pares de base (pb). Para visualização dos picos correspondentes aos alelos, será utilizado o software Peak Scanner™ (Applied Biosystems). Para a nomeação e verificação de erros de anotação de tamanhos dos alelos, serão utilizados os macros para Excel Flexibin (<http://www.zoo.cam.ac.uk/zoostaff/meg/amos.htm>) (Amos et al., 2007) e Autobin (<http://www4.bordeaux-aquitaine.inra.fr/biogeco/Ressources/Logiciels/Autobin>) (Ghichoux et al., 2011). Os resultados da nomeação de alelos fornecidos por ambos os macros serão confrontados a fim de resolver problemas específicos de nomeação. O programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004) será utilizado para verificar a existência de erros de análise das amplificações, por locus e população, devido à presença de alelos nulos, *stuttering* ou eliminação do maior alelo e o macro Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001) será utilizado para verificar a existência genótipos idênticos.

Análise dos resultados - filogeografia plastidial

As diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) serão calculadas utilizando DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009) e Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010). A estruturação geográfica será avaliada a partir da inferência do número de agrupamentos genéticos, utilizando o pacote GENELAND versão 4.0.3 implementado em R (Guillot *et al.* 2005, <http://www.cran.r-project.org/>), da análise de variância molecular hierárquica (AMOVA), realizada com o software GenAEx 6.5 (Peakall & Smouse 2012), e da localização de discontinuidades genéticas com o programa Barrier 2.2 (Manni & Gue 2004). A detecção de grupos genéticos será realizada pela inferência bayesiana de agrupamentos populacionais com o software BAPS 6.0 (Corander & Tang

2007; Corander *et al.* 2008). O teste de Mantel (Mantel 1967) será realizado a partir dos números médios de substituições sítio a sítio com o programa GenAIEx 6.5 (Peakall & Smouse 2012).

A rede haplotípica dos dados plastidiais será inferida com o algoritmo *Integer Neighbour-Joining Networks* sem tolerância à reticulação (French *et al.* 2013) implementado no programa PopArt 1.6 beta (<http://popart.otago.ac.nz>) e a inferência filogenética bayesiana de dados provenientes de ambos os genomas será especificada com a ferramenta BEAUti 1.8.1 e realizada com o programa BEAST 1.8.1 (Drummond *et al.* 2012). A seleção de modelos será baseada no Critério de Informação Bayesiana (BIC) implementada pelo programa JModelTest2 (Darriba *et al.* 2012). A frequência das bases será empiricamente calculada e fixada para as proporções observadas no conjunto de dados. As árvores serão inferidas sob os modelos de "constant size" com relógio estrito e datadas de acordo com Ramirez *et al.* (2007). A convergência dos resultados será verificada com o programa Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond 2009) e as árvores serão sumarizadas com a ferramenta TreeAnnotator 1.8.1; a árvore obtida será visualizada utilizando FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Para avaliar evidências de expansões populacionais serão calculados os índices F_s (Fu 1997) e D (Tajima 1989) com o programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010) e R_2 (Ramos-Onsins & Rozas 2002) com o programa DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009). A dinâmica demográfica dos grupos também será explorada com *skyline plots* (Drummond *et al.* 2005), os quais serão especificados com a ferramenta BEAUti 1.8.1 e realizados com o programa BEAST 1.8.1 (Drummond *et al.* 2012), com as mesmas características da inferência filogenética bayesiana, exceto que as árvores serão inferidas sob o modelo coalescente de "*Bayesian Skyline*". A inferência será calibrada a partir da taxa de substituição obtida na inferência filogenética bayesiana. Serão realizadas 5×10^7 iterações, com amostragem de árvores a cada 5×10^3 gerações. A convergência dos resultados será verificada com o programa Tracer v1.5, o qual também será utilizado para a inferência e exibição dos *skyline plots* (Rambaut & Drummond 2009).

Análise dos resultados - filogeografia nuclear

Do total de SNPs obtidos a partir de nextRAD, 6.000 serão escolhidos aleatoriamente e divididos em três conjuntos de 2.000 SNPs para a determinação do número apropriado de agrupamentos com STRUCTURE 2.3.4 (Falush *et al.*, 2003). O número de populações presumíveis (K) variará de 1 a 15, e 10 corridas independentes compostas por 500.000 interações MCMC serão realizadas para cada K , com um burn-in inicial de 100.000, e modelo de mistura correlacionada de alelos entre as populações. O número de agrupamentos ótimo será inferido a partir do método de Evanno, Regnaut & Goudet (2005), que emprega a estatística ΔK baseada na taxa de mudanças de $\Pr(X|K)$ entre sucessivos valores de K , implementado com o programa HARVESTER (Earl &

vonHoldt, 2011). Agrupamentos de indivíduos serão testados com o pacote de R *adegenet* (Jombart et al., 2010), utilizando as funções *glPca*, *find.clusters* e *dapc*.

Um cladograma de todos os indivíduos não-híbridos será gerado utilizando o método de Neighbor-Joining com o software TASSEL 3.0 (Bradbury et al., 2007) e representado graficamente utilizando o pacote de R *ape* (Paradis et al., 2004). O F_{IS} será estimado a partir das heterozigosidades observadas e esperadas e a diversidade (heterozigosidade esperada) será estimada a partir de frequências alélicas, com o pacote de R *adegenet* (Jombart e Ahmed 2011).

A AMOVA será realizada a partir de uma matriz de distância Euclidiana inter-individual, com o pacote *pegas* (Paradis 2010). O programa GenALEx 6.41 (Peakall e Smouse 2006) será utilizado para confirmar os resultados e calcular os valores de *p*.

O programa TreeMix (Pickrell e Pritchard 2012) será usado para modelar a divergência e migração entre os grupos de indivíduos identificados com o pacote *dapc*. Valores de bootstrap serão calculados com o pacote *ape* (Paradis et al., 2004).

Análise dos resultados – microssatélites

Para a caracterização da variabilidade genética, serão utilizados os seguintes estimadores: número de alelos observados (*A*), variação do tamanho do alelo (*var*), heterozigosidade observada (*HO*) e heterozigosidade esperada (*HE*) (Nei, 1987), fornecidos pelo programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995). Este programa será utilizado também para testar o desequilíbrio de ligação entre os pares de loci. A frequência média de alelos nulos (*r*) por locus será estimada pelos métodos de Brookfield 1 (Brookfield, 1996) implementado no MICRO-CHECKER 2.2.3 (Oosterhout et al., 2004). Será realizado um teste exato no programa GENEPOP on the web, versão 4.0.10 (Raymond & Rousset, 1995), para detectar desvios nas proporções genotípicas em relação ao esperado em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em cada locus (Guo & Thompson, 1992) e a combinação das probabilidades de todas as populações em cada locus será realizada pelo método de Fisher. A variabilidade genética das populações será estimada a partir do número médio de indivíduos genotipados (*N*), do número de alelos observados (*A*), do número de alelos exclusivos (*PA*), da riqueza alélica (*RA*), da heterozigosidades média observada (*HO*) e esperada (*HE*) (Nei, 1987) e do índice de fixação (*F*), calculados com os programas GENALEX 6.4 (Peakall & Smouse, 2006) e MSA (Dieringer & Schlötterer, 2003).

O número de agrupamentos genéticos e a mistura nuclear serão estimados a partir do método de atribuição bayesiana implementado no programa Structure 2.3 (Pritchard, Stephens & Donnelly, 2000). O número de populações presumíveis (*K*) variará de 1 a 15, e 10 corridas independentes compostas por 500.000 interações MCMC serão realizadas para cada *K*, com um burn-in inicial de 100.000 e modelo de mistura correlacionada de alelos entre as populações. O

número de agrupamentos ótimo será inferido a partir do método de Evanno, Regnaut & Goudet (2005), que emprega a estatística ΔK baseada na taxa de mudanças de $Pr(X|K)$ entre sucessivos valores de K , implementado com o programa HARVESTER (Earl & vonHoldt, 2011).

A partição da variabilidade genética entre as espécies, entre as populações dentro das espécies e dentro das populações será investigada com a Análise de Variância Molecular (AMOVA), locus por locus, no programa Arlequin (Excoffier, Laval & Schneider, 2005). A significância dos componentes da variância será calculada utilizando 10.000 permutações dos dados. Além disso, um teste de diferenciação populacional, com base nas frequências genotípicas e não assumindo acasalamento aleatório dentro das amostras, foi conduzido no programa FSTAT. Para representar graficamente as relações genéticas entre as populações serão utilizadas as distâncias genéticas de Nei (1978) (DN, unbiased genetic distance) e de Cavalli-Sforza & Edwards (1967) (DC), com e sem correção para alelos nulos (INA), e o algoritmo neighbor-joining (NJ) em análises de agrupamento distintas. A matriz de DN será fornecida pelo programa GENALEX 6.4, enquanto as matrizes de DC com e sem correção INA serão fornecidas pelo FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007). O programa MSA (Dieringer & Schlötterer, 2003) será utilizado para obtenção de 1000 replicatas de bootstrap da matriz de distância DC sem correção para alelos nulos. Essas replicatas serão utilizadas no pacote Phylip (Felsenstein, 1989) para gerar árvores de NJ (programa NEIGHBOR) e, posteriormente, para criar árvores de consenso de maioria (programa CONSENSE). O suporte dos ramos será, então, acrescido às árvores não-enraizadas construídas no programa Mega6 (Tamura et al., 2013).

Evolução dos sistemas de reprodução no clado neotropical de *Bulbophyllum*

Espécies coletadas nos Parques Estaduais de Vila Velha e do Guartelá: *B. peri*, *B. plumosum*, *B. tripetalum*, *B. micranthum*, *B. dusenii*, *B. regnellii*

Amostragem

Para os estudos de sistemas de reprodução, serão amostrados de 20 a 30 espécies do clado neotropical de *Bulbophyllum*. Tentativamente serão amostradas espécies de todas seções. Dentro das seções, a amostragem será realizada visando a avaliação da maior parte da diversidade filogenética, especialmente em *B. sect. Xiphizusa*, *B. sect. Napelli* e *B. sect. Micranthae*, da amplitude de distribuição geográfica, da diversidade de morfologias florais (a qual pode estar associada a diferentes mecanismos de polinização). Tentativamente, serão amostrados também espécies de *Bulbophyllum* não neotropicais. Para cada espécie a ser estudada, serão amostrados três pseudobulbos de cerca de 10 indivíduos. Para que as populações naturais não sofram impacto

negativo com as coletas, os pseudobulbos serão removidos apenas se a planta possuir um número razoável deles, de forma que o indivíduo seja preservado. Indivíduos inteiros nunca serão coletados. Os pseudobulbos coletados serão incorporados à coleção do Museu de História Natural da UFMG.

Polinizações experimentais

Para os experimentos dos sistemas de reprodução serão utilizados indivíduos cultivados na casa de vegetação do Departamento de Botânica e no Museu de História Natural da UFMG. As polinizações experimentais serão realizadas somente após um período de 6 meses da coleta e plantio dos indivíduos. Serão realizados dois tipos de polinizações experimentais: autopolinização e polinização cruzada intraespecífica. Flores não polinizadas serão ensacadas para verificação da ocorrência de autopolinização espontânea (flores não emasculadas) e agamospermia diplospórica (flores emasculadas). Tentativamente, serão utilizadas cerca de 20 a 30 flores para cada um dos quatro tratamentos, dependendo do número de flores disponíveis. Nas espécies com maior disponibilidade de indivíduos e de flores, polinizações adicionais serão realizadas e o desenvolvimento do fruto será interrompido e as flores fixadas a intervalos regulares (24 horas, e 5, 10, 15 e 20 dias) para observação de germinação dos grãos de pólen, crescimentos dos tubos polínicos, desenvolvimento do ovário e fertilização. Os frutos maduros terão suas sementes removidas na época da deiscência e serão fixados em FAA 50%. Uma amostra de 200 sementes por fruto será examinada para cálculo no número de sementes viáveis, sendo consideradas sementes viáveis aquelas que possuírem embrião bem desenvolvido (Borba et al., 2001a). A partir dos cruzamentos efetuados, flores que não desenvolverem frutos, frutos abortados e frutos maduros, e as flores das polinizações adicionais serão fixados e posteriormente tratados com NaOH 10N a 60°C, corados com azul de anilina e examinados em microscópio de epifluorescência para observação de crescimento de tubos polínicos e fertilização dos óvulos (Martin, 1959; Borba et al. 1999, 2001a).

Análise dos resultados - Cruzamentos experimentais

Para cada espécie, os resultados serão comparados entre os diferentes tratamentos através de análise de variância ANOVA one-way e testadas com teste *t*.

Referências

Azevedo CO, Borba EL, Van Den Berg C (2006) Evidence of natural hybridization and introgression in *Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & F. Barros and *B. weddellii* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae)

- in the Chapada Diamantina, Brazil, by using allozyme markers. *Revista Brasileira de Botânica*, 29, 415–421.
- Barbosa AR, Melo MC, Borba EL (2009) Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Systematics and Evolution*, 283, 1–8.
- Böcher TW. (1967) Continuous variation and taxonomy. *Taxon*, 16, 255–258.
- Borba E, Semir J, Shepherd GJ (2001) Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) Species. *Annals of Botany*, 88, 89–99.
- Borba EL, Barbosa AR, Melo MC, Gontijo SL, Oliveira HO (2011) Mating systems in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): evolutionary and systematic implications. *Lankesteriana*, 11, 207–221.
- Borba EL, Semir J (1998a) *Bulbophyllum x cipoense* (Orchidaceae), a new natural hybrid from the Brazilian “campos rupestres”: description and biology. *Lindleyana*, 13, 113–120.
- Borba EL, Semir J (1998b) Wind-assisted fly pollination in three *Bulbophyllum* (Orchidaceae) species occurring in the Brazilian campos rupestres. *Lindleyana*, 13, 203–218.
- Borba EL, Semir J (1999) Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 217, 197–204.
- Borba EL, Shepherd GJ, Semir J (1999) Reproductive systems and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occurring in Brazilian "campo rupestre" vegetation. *Plant Systematics and Evolution*, 217, 205–214.
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D et al. (2014) BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*, 10, 1–6.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES. (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23, 2633–2635.
- Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5, 453–455
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* 21, 550–570.
- Cirino, JF & Lima, JE (2008) Valoração contingente da Área de Proteção Ambiental (APA) São José - MG: um estudo de caso. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 46 647–672.
- Chapuis M-P, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 621–631.
- Chen L-L, Gao J-Y (2011) Reproductive ecology of *Bulbophyllum ambrosia* (Orchidaceae). *Chinese Journal of Plant Ecology*, 35, 1202–1208.
- Corander J, Marttinen P, Sirén J, Tang J (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC bioinformatics*, 9, 539.

- Corander J, Tang J (2007) Bayesian analysis of population structure based on linked molecular information. *Mathematical Biosciences*, 205, 19–31.
- D’Amen M, Zimmermann NE, Pearman PB (2013) Conservation of phylogeographic lineages under climate change. *Global Ecology and Biogeography*, 22, 93–104.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*, 9, 772.
- Dieringer D, Schlotterer C (2003) Microsatellite Analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, 3, 167–169.
- Diniz-Filho JAF, de Campos Telles MP, Bonatto SL et al. (2008) Mapping the evolutionary twilight zone: Molecular markers, populations and geography. *Journal of Biogeography*, 35, 753–763.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 1185–1192.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969–1973.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359–361.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32, 1792–1797.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564–567.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.
- Felsenstein J (1989) PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5, 164–166.
- Fonseca, DSR & Lessa, SN (2010) Um breve diagnóstico ambiental do Parque Estadual de Grão Mogol (MG) e seu contexto espacial. *Caminhos de Geografia*, 11, 260–274.
- French N, Yu S, Biggs Pet al. (2013) Evolution of *Campylobacter* species in New Zealand. Horizon Scientific Press.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915–925.

- Ghichoux E, Lagache L, Wagner S, Chameil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11, 591–611.
- Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485–486.
- Guillot, G, Mortier, F, Estoup, A (2005) GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular ecology notes*, 5, 712-715.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 361–372.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-Bares J et al. (2010) Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 291–301.
- Hopper SD, Silveira FA & Fiedler PL (2015) Biodiversity hotspots and Ocbil theory. *Plant and Soil*, 1-50.
- Johansen BO (1990) Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 103, 165–196.
- Jombart T, Ahmed I (2011) adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27, 3070-3071.
- Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11, 94.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Manni F, Guérard E, Heyer E (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's Algorithm. *Human Biology*, 76, 173–190.
- Mantel N (1967) The detection of disease Clustering and Generalized Regression Approach. *Cancer research*, 27, 209–220.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*, 34, 125-128.
- Müller K (2005) SeqState: Primer Design and Sequence Statistics for Phylogenetic DNA Datasets. *Applied Bioinformatics*, 4, 65–69.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Paradis E (2010) pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26, 419-20.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20, 289-290

- Park SDE (2001) Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Tese, University of Dublin.
- Peakall R, Smouse PE (2006) Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295.
- Peakall, R and Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
- Pickrell JK, Pritchard JK (2012) Inference of population splits and mixtures from genome-wide allele frequency data. *PLoS Genetics* 8, e1002967.
- Pinheiro F, Cafasso D, Cozzolino S, Scopece G (2015) Transitions between self-compatibility and self-incompatibility and the evolution of reproductive isolation in the large and diverse tropical genus *Dendrobium* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, doi: 10.1093/aob/mcv057.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Rambaut A, Drummond AJ (2009) Tracer v1.5. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramirez SR, Gravendeel B, Singer RB, Marshall CR, Pierce NE (2007) Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator. *Nature*, 448, 1042-1045.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular biology and evolution*, 19, 2092–2100.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248–249.
- Ribeiro PL, Borba EL, Smidt EC et al. (2008) Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution*, 270, 109–137.
- Russello MA, Waterhouse MD, Etter PD, Johnson EA (2015) From promise to practice: pairing non-invasive sampling with genomics in conservation. *PeerJ*, 3, e1106.
- Saadi A (1995) A geomorfologia da Serra do Espinhaço em Minas Gerais e de suas margens. *Geonomos*, 3, 41–63.
- Sapir Y, Mazzucco R (2012) Post-zygotic reproductive isolation among populations of *Iris atropurpurea*: The effect of spatial distance among crosses and the role of inbreeding and outbreeding depression in determining niche width. *Evolutionary Ecology Research*, 14, 425–445.
- Silveira FA, Negreiros D, Barbosa NP, Buisson E, Carmo FF, Carstensen DW, ... & Garcia, QS (2015) Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant and Soil*, 1-24.
- Simmons MP, Ochoterena H (2000) Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic biology*, 49, 369–381.

- Smidt EC, Borba EL, Gravendeel B, Fischer G a., van den Berg C (2011) Molecular phylogeny of the neotropical sections of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) using nuclear and plastid spacers. *Taxon*, 60, 1050–1064.
- Staden R (1996) The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, 5, 233–241.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725–2729.
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22, 1193–1213.