Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Dissertação de Mestrado

Análise filogenética molecular e biossistemática do complexo *Habenaria repens* Nutt. (Orchidaceae) no Brasil.

BRUNA LADEIRA LAU

ORIENTADOR: Dr. Eduardo Leite Borba

COORIENTADOR: Dr. João Aguiar Nogueira Batista

Belo Horizonte – Minas Gerais

Maio de 2013

Análise filogenética molecular e biossistemática do complexo *Habenaria repens* Nutt. (Orchidaceae) no Brasil.

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

Belo Horizonte – Minas Gerais

Maio de 2013

“Ando devagar
Porque já tive pressa
E levo esse sorriso
Porque já chorei demais

Hoje me sinto mais forte,
Mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza
De que muito pouco sei,
Ou nada sei”

Almir Sater e Renato Teixeira

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais, Ronaldo e Rosilene, pois se não fosse pelo seu amor e dedicação incondicionais não estaria onde estou. Ao meu irmão, Lucas e à minha cunhada, Thiara, pela companhia e pelos auxílios em vários momentos. A todos meus familiares, avós, tios, primos, que me apoiaram e deram muitos conselhos importantes. Em especial às minhas avós pelos ótimos almoços aos domingos e à família Ladeira Lanna, que teve participação especial nessa minha jornada. À família Massensini que me recebeu de portas e corações abertos. Ao meu namorado, Antônio, por toda a ajuda no laboratório, no campo, nas discussões científicas após seminários, na mesa do bar, nas horas de descanso, e por ser meu psicólogo sempre que precisei.

Aos meus amigos do CEFET-MG pelos muitos momentos de diversão e desabafo. Aos amigos da Biologia-UFMG, muitos dos quais passaram pelas mesmas felicidades e angústias que experimentei e ofereceram conforto e companheirismo.

A todos os amigos que passaram pelo laboratório nos últimos cinco anos, e que ajudaram direta e indiretamente, no desenvolvimento do meu trabalho. Gostaria de agradecer, em especial, à Ana Paula, Karina Proite e Bárbara, que me ajudaram muito no desenvolvimento dos marcadores e nas suas análises; ao Fred, que me introduziu ao mundo do Statistica; à Marcella, que me socorreu nos momentos finais e à Aline Joseph, pelas suas risadas que fazem todos rirem junto.

A todos que se lembraram de mim quando viram uma *Habenaria repens* em campo, em especial à Ana Cláudia, Nara e Aline Vale.

Ao Leonardo P. Félix e ao Mark Whitten, que me enviaram materiais que não teria condições de coletar e que foram essenciais no âmbito da minha amostragem. Ao Marcelo Pedron e ao João Batista, pela disponibilização de sequências que foram de grande valor.

A todos do Departamento de Botânica, em suas mais diversas atribuições, que foram indispensáveis para que o trabalho fosse desenvolvido. Em especial à Denise e ao João Renato, coordenadores do programa durante esse período e que estavam sempre de portas abertas para me ajudar quando precisei.

A todos os professores, de todas as disciplinas cursadas durante o mestrado, principalmente ao Almir, Adalberto e Mário Cozzuol, do Departamento de Zoologia, que me mostraram quão bonita e intrigante é a análise da evolução dos seres vivos através da filogenia.

Ao meu coorientador, João Batista, idealizador desse projeto e conhecedor de *Habenaria*, sem o qual esse trabalho não aconteceria.

Ao meu orientador, Eduardo Borba que, do seu jeito único, me fez crescer profissionalmente. Por todos os ensinamentos que me passou durante os últimos cinco anos e pela confiança, apoio e dedicação que possibilitaram a concretização deste trabalho e a formação de mais um Mestre.

ÍNDICE

RESUMO GERAL **07**

ABSTRACT **09**

INTRODUÇÃO GERAL **11**

CAPÍTULO 1

Análise filogenética molecular do complexo *Habenaria repens* Nutt. (Orchidaceae) no Brasil. **18**

CAPÍTULO 2

Variabilidade morfológica e genética no complexo *Habenaria repens* Nutt. (Orchidaceae) no Brasil. **40**

CONSIDERAÇÕES FINAIS **85**

BIBLIOGRAFIA GERAL **88**

APÊNDICE 1 **99**

APÊNDICE 2 **103**

RESUMO GERAL

Habenaria é um dos maiores gêneros de Orchidaceae, mesmo assim é muito pouco estudado. Poucas revisões e estudos taxonômicos foram feitos para o gênero e nenhuma abordagem morfométrica ou de genética de populações foi realizada até o momento. Um dos vários complexos existentes para o gênero é o formado por *H. repens* e morfotipos relacionados. *Habenaria repens sensu lato* tem distribuição do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina e, no Brasil, diversos variantes morfológicos semelhantes a ela podem ser encontrados. A fim de esclarecer a relação dos morfotipos existentes no Brasil com *H. repens* e entre eles, e de circunscrever essas entidades, foi feito um estudo com três diferentes abordagens: análise filogenética molecular, análise morfométrica multivariada e genética de populações. Ao todo, 31 populações, englobando duas espécies reconhecidas (*H. repens* e *H. aranifera*), seis morfotipos do Brasil, e uma população proveniente da localidade onde o tipo de *H. repens* foi coletado, nos Estados Unidos da América, foram amostrados. Dois marcadores nucleares (ITS e ETS) e dois plastidiais (*matK* e *trnK*), totalizando 3.250 caracteres, foram utilizados em análises filogenéticas. Nestas análises, foi evidenciada a existência de três clados não diretamente relacionados formados exclusivamente por entidades pertencentes ao complexo. Em um deles, mais distantemente relacionado a todos os demais, situa-se apenas o morfotipo *H.* aff. *repens*6, enquanto os outros morfotipos se dividem em dois clados maiores. Dezessete caracteres florais e três vegetativos foram utilizados em análises morfométricas com técnicas de estatística multivariada. Pouca distinção morfológica foi obtida entre os morfotipos, e nem todos os agrupamentos de populações formados coincidem com aqueles obtidos pela análise filogenética e pela genética de populações. Para esta última, cinco *loci* microssatélites foram amplificados para 295 indivíduos de 20 populações. Cinco agrupamentos genéticos foram identificados e estes coincidem, em grande parte, com alguns clados recuperados nas análises filogenéticas. Os padrões mais consistentes encontrados pelo conjunto dos marcadores foram: a união de três populações da forma típica de *H. repens* (Curitiba-PR, Anguera-BA e Areias-PB), o agrupamento dos morfotipos *H.* aff. *repens*3 e *H.* aff. *repens*4, e a discriminação de *H. aranifera* e das populações do morfotipo *H.* aff. *repens*7. Considerando-se todas as evidências e a congruência entre elas, é sugerido que cinco espécies sejam aceitas para o complexo no Brasil. Apesar dos morfotipos *H.* aff. *repens*3 e *H.* aff. *repens*4 serem recuperados como um único grupo pelos três marcadores empregados, estes apresentam grande variação em função de tamanho de todos os órgãos da planta (em grande parte caracteres não empregados nas análises), sendo facilmente distinguíveis, o que torna questionável a manutenção destes como um único táxon. Assim, outras análises serão realizadas para determinar se estes serão descritos

como uma ou duas novas espécies. O morfotipo *H.* aff. *repens*7, que pertence ao mesmo clado dos morfotipos *H.* aff. *repens*3 e *H.* aff. *repens*4 na análise filogenética, foi possível de ser distinto tanto nesta análise quanto pelos marcadores microssatélites e pela morfometria, possuindo características diagnósticas que o sustentam como espécie distinta. O morfotipo *H.* aff. *repens*6 forma um clado muito isolado dos demais nas análises filogenéticas e, apesar de não se diferenciar nas análises morfométricas, nem mesmo foi possível de ser incluído na análise de genética de populações, pois falhou na amplificação com os *primers* desenhados para *H. repens*. Essas evidências indicam tratar-se de uma espécie distantemente relacionada e que se assemelha morfologicamente por convergência de caracteres florais. Logo, essa entidade será reconhecida como uma nova espécie sustentada por características de hábito e porte (não incluídas nas análises morfométricas). Dentro do outro clado obtido pelas análises filogenéticas, *H. aranifera* será mantida com o status de espécie, uma vez que foi recuperada como um grupo consistente por todos os marcadores utilizados. Os demais terminais pertencentes a esse clado, apesar de possuírem ampla variabilidade morfológica e terem sido separados por marcadores moleculares, não possuem características diagnósticas que sustentem a sua separação. Por esse motivo, todos serão aceitos como *H. repens*, uma espécie de ampla distribuição geográfica, com alto grau de polimorfismo e possuindo todas as características de uma ocloespécie, provavelmente constituindo um par progenitor-derivativo com *H. aranifera*.

PALAVRAS-CHAVE: complexo de espécies, filogenia molecular, genética de populações, *Habenaria*, microssatélites, morfometria.

ABSTRACT

Habenaria is one of the largest genera of Orchidaceae, but even though, it is not well studied. Few taxonomic studies and revisions have been done so far, and none of them comprise morphometric or population genetics approaches. One of the many species complexes in the genus is the one formed by *H. repens* and related morphotypes. *Habenaria repens sensu lato* occurs from south United States of America to north Argentina and, in Brazil, many morphological variants can be found. In order to clarify the relationships between Brazilian morphotypes and *H. repens*, as well as the relationships among them, and circumscribe these entities, three different techniques were used: molecular phylogenetic analyses, multivariate morphometric analyses and population genetics. Thirty one populations, encompassing two known species (*H. repens* e *H. aranifera*), six Brazilian morphotypes, and one population from the locality where the species type was collected, in the United States of America, were sampled. Two nuclear markers (ITS and ETS) and two plastidial ones (*matK* and *trnK*) totalizing 3,250 characters were used in the phylogenetic analyses. In these, the existence of three clades, not directly related and formed exclusively by entities that belong to the complex, was detected. Morphotype *H.* aff. *repens*6 belongs to one of these clades, whereas the other morphotypes are separated in two bigger clades. Seventeen floral and three vegetative characters were used in morphometric analyses with multivariate statistic techniques. Little morphological distinction was found between the morphotypes, and not all the groups formed match those obtained with phylogenetic and population genetics approaches. For this last method, five microsatellite *loci* were amplified for 295 individuals belonging to 20 populations. Five genetic groups were identified and these match partially some of the clades recovered in the phylogenetic analyses. The most consistent patterns found by all three markers were: the reunion of three populations previously classified as the typical form of *H. repens* (Curitiba-PR, Anguera-BA and Areias-PB), a group with morphotypes *H.* aff. *repens*3 and *H.* aff. *repens*4, and the discrimination of *H. aranifera* and of the populations that form *H.* aff. *repens*7. Considering all the evidences and the congruence between them, it is suggested that at least five species be recognized in Brazil. Despite the fact that *H.* aff. *repens*3 and *H.* aff. *repens*4 form a group recovered by all markers employed, they present a large variation in the size of all plant organs (characters, in a great part, not included in the analyses), and are easily distinguishable, which makes it questionable whether they represent a single taxon or not. Therefore, other analyses must be carried out in order to determine if they should be described as one or two new species. *Habenaria* aff. *repens*7, which belongs to the same clade as *H.* aff. *repens*3 and *H.* aff. *repens*4, is distinguishable by morphological and molecular markers and

possesses diagnostic features that support it's recognition as a different species. Morphotype *H.* aff. *repens*6 forms a clade isolated from the others and, although it does not differentiate itself in the morphometric analyses, it was not even included in the population genetic analyses, because it failed to amplify with the primers developed for *H. repens*. These evidences suggest it represents a distantly related species that resembles morphologically the species that form the rest of the complex due to convergence of floral traits. Thus, this entity must be recognized as a new species supported by characters of habit and size (not included in the morphometric analyses). In regard to the other clade obtained in the phylogenetic analyses, *H. aranifera* will be maintained as a species, once it was recovered as a consistent group in all the analysis. The remaining terminals, in spite of having a broad morphological variability and some of them have been separated by molecular markers, do not have diagnostic characteristics that sustain more than one species. Hence, they will all be accepted under *H. repens*, a species with broad geographic distribution, high level of polymorphism as well as all the other attributes of an ochlospecies, probably constituting a progenitor-derivative pair with *H. aranifera*.

KEY-WORDS: *Habenaria*, microsatellites, molecular phylogeny, morphometry, population genetics, species complex.

INTRODUÇÃO GERAL

Habenaria Willd. é um gênero de Orchidaceae com aproximadamente 834 espécies (Govaerts *et al*., 2013) distribuído nos trópicos e subtrópicos do Velho e Novo Mundo (Pridgeon *et al*., 2001), com centros de diversidade no Brasil, regiões sul e central da África, e leste Asiático. No Brasil estão presentes 167 espécies, sendo 105 delas endêmicas (Batista *et al*., 2011a, 2011b), e seu principal centro de diversidade é o Cerrado, incluindo os campos rupestres do Brasil central e da região Sudeste. Após a subdivisão genérica de *Pleurothallis* por Pridgeon & Chase (2001), *Habenaria* tornou-se o maior gênero de Orchidaceae no Brasil. Considerando sua representatividade em número de espécies, os estudos sobre o gênero no Brasil são pouco abrangentes e restringem-se a inventários florísticos locais (e.g., Leoni, 1990; Batista *et al*., 2008a), revisão de seções (e.g., Batista *et al*., 2006) e descrições de novas espécies (e.g., Batista *et al*., 2008b, 2008c).

Os resultados de um estudo de filogenia molecular de Orchidinae e algumas Habenariinae utilizando sequências de ITS indicou que o gênero é polifilético (Bateman *et al*., 2003). No entanto, apenas oito espécies (cerca de 1% do total do gênero) foram amostradas neste estudo, sendo apenas uma do Novo Mundo. Uma análise filogenética recente utilizando sequências de ITS e *matK*, que incluiu cerca de 151 das 298 espécies de *Habenaria* Neotropicais e algumas espécies do Velho Mundo (Batista *et al*., 2013), apontou o monofiletismo do grupo de espécies Neotropical. Esse estudo também indicou que o clado Neotropical consiste de, ao menos, 22 subgrupos monofiléticos com alto suporte. Entretanto, a relação entre estes clados não ficou bem resolvida, sendo necessária a inclusão de mais regiões e caracteres para aumentar a resolução e o suporte nos ramos internos.

Os principais tratamentos taxonômicos do gênero para o Brasil foram os de Cogniaux (1893) na *Flora Brasiliensis*, Hoehne (1940) na *Flora Brasilica* e Pabst & Dungs (1975) no *Orchidaceae Brasilienses*. Kränzlin (1892, 1901) realizou as únicas revisões em escala mundial do gênero, incluindo as espécies brasileiras conhecidas até então. Todavia, devido ao grande número de espécies no gênero, à falta de revisões mais recentes e à existência de vários complexos de espécies, a identificação e mesmo a delimitação de diversas espécies é muitas vezes difícil. Dentre esses complexos, encontra-se o formado por *H. repens* Nutt. e espécies relacionadas. *Habenaria repens* é uma espécie de habitat tipicamente aquático a subaquático crescendo dentro d'água nas margens de lagoas e rios, característica incomum no gênero. O holótipo de *H. repens* é proveniente do estado da Geórgia (Estados Unidos da América), mas a

distribuição estende-se do sul deste país (desde a Carolina do Norte) até o sul da América do Sul (norte da Argentina e Uruguai), e no Brasil ocorre em todas as regiões. Caracteristicamente, as suas plantas apresentam sistema radicular bem desenvolvido, com raízes numerosas e longas sem tuberoides, caule reptante folhoso, folhas lanceoladas, bem desenvolvidas, inflorescência multiflora, e flores verdes de tamanho pequeno em comparação a outras espécies do gênero (Ames, 1910). Como toda espécie de *Habenaria*, ela emite orgãos epígeos apenas uma vez ao ano, o que limita o período em que pode ser encontrada (Hohene, 1940). *Habenaria repens* foi uma das primeiras espécies do gênero descritas para o Neotrópico (Nuttal, 1818) e no tratamento seccional de Kränzlin (1892, 1901) foi incluída na seção *Clypeatae* Kraenzl.

Várias espécies de *Habenaria* apresentam uma morfologia floral similar a *H. repens*, sendo a separação entre elas difícil e controversa. Diversos nomes, como *H. radicans* Griseb., *H. palustris* Acuña, *H. tricuspis* A.Rich., *H. pseudorepens* Schltr., e *H. nuttallii* Small, foram e ainda são consensualmente aceitos como sinônimos de *H. repens* (Kraenzlin, 1892, 1901; Cogniaux 1893; Ames 1910; Hoehne 1940; Dunsterville & Garay 1966; Pabst & Dungs 1975; Batista et al. 2011a, b). Além destas, várias outras espécies apresentam morfologia similar a *H. repens*, incluindo: *H. aranifera* Lindl., *H. achnantha* Rchb.f., *H. amambayensis* Schltr., *H. brownelliana* Catling, *H. gracilis* Lindl., *H. modestissima* Rchb.f., *H. polygonoides* Schltr., *H. polyrhiza* Schltr., *H. rupicola* Barb.Rodr., *H. sampaioana* Schltr., *H. subviridis* Hoehne & Schltr., *H. taubertiana* Cogn., e *H. uliginosa* Rchb.f. Ainda não existe um consenso quanto a relação destas espécies entre si e com *H. repens*, e o status taxonômicos de cada uma delas têm variado de acordo com a época e o autor. Algumas, como *H. rupicola*, sempre foram aceitas como distintas, apesar de bastante semelhante a *H. repens*, enquanto diversas outras foram em um momento sinonimizadas sob *H. repens* (Hoehne 1940; Dunsterville & Garay 1966; Pabst & Dungs 1975). Este fato sugere que as sinonimizações propostas provavelmente foram baseadas mais em comparações com base em poucos exemplares e eventualmente superficiais do que em um estudo detalhado. De fato até o momento não foi realizado nenhum tratamento ou trabalho taxonômico específico com este grupo de espécies. Um problema neste sentido é que a maioria destas espécies é conhecida apenas do material tipo ou de poucas coletas antigas e encontram-se mal caracterizadas, o que dificulta uma comparação morfológica detalhada entre elas e *H. repens*.

Na sinopse para as espécies Neotropicais do gênero, Batista *et al*. (2011a, 2011b) apontou a existência deste complexo de espécies, reconhecendo as seguintes espécies como morfologicamente similares e relacionadas a *H. repens*: *H. achnantha* Rchb.f., *H. achnantha*

Rchb.f. var. *gracilior* Cogn., *H. amambayensis* Schltr., *H. aranifera* Lindl., *H. brownelliana* Catling, *H. modestissima* Rchb.f., *H. novaesii* Edwall & Hoehne, *H. polygonoides* Schltr., *H. polyrhiza* Schltr., *H. repens* Nutt. var. *maxillaris* (Lindl.) Garay, *H. rupicola* Barb.Rodr., *H. sampaioana* Schltr., *H. taubertiana* Cogn., *H. uliginosa* Rchb.f. Por outro lado, *H. nuttallii* Small, *H. palustris* Acuña, *H. paucifolia* Lindl. var. *estolonifera* M.N.Correa, *H. pseudorepens* Schltr., *H. radicans* Griseb., *H. repens* Nutt. var. *gracilis* Luederw. & Hoehne, e *H. sceptrodes* Rchb.f. foram tratadas como sinônimos de *H. repens*. Apesar de não indicado, *H. coxipoensis* Hoehne e *H. subviridis* Hoehne & Schltr. apresentam morfologia similar a *H. rupicola*, sendo também similares a *H. repens*. Além dessas espécies, o exame de amostras vivas e cerca de 7.300 amostras herborizadas localizadas em diversos herbários no Brasil e no exterior revelou a existência de diversos morfotipos similares a *H. repens* (J.A.N. Batista, comunicação pessoal) (Figuras 2.1, 2.2 e 2.3, Capítulo 2) que ainda não foram identificados a nível específico e podem representar novas espécies. Afora o complexo identificado para o Brasil, em outras extensões de sua distribuição, como o México, *H. repens* também tem delimitação confusa, necessitando a realização de uma ampla revisão taxonômica (G. A. Salazar, comunicação pessoal).

Dentre os caracteres que variam no complexo, estão características ecológicas e morfológicas (ver Figuras 2.1-2.3, Capítulo 2). O hábito varia de plantas aquáticas, que crescem em áreas permanentemente úmidas, como margens de lagos e rios (*H. repens*, *H.* aff. *repens*2 e *H.* aff. *repens*5) e subaquáticas, plantas que crescem em ambientes estacionalmente úmidos (*H.* aff. *repens*3 e *H.* aff. *repens*4) a terrícolas, que crescem em ambientes secos (*H.* aff. *repens*7). *Habenaria* aff. *repens*6 diferencia-se das demais por ser rupícola em paredões cobertos de musgos próximos a quedas d'água (ver Figura 2.3, capítulo 2). Além disso, alguns morfotipos florescem no período chuvoso, enquanto a maioria deles floresce no período seco, esta última uma característica pouco comum para o gênero. A variação morfológica está principalmente relacionada ao tamanho e disposição das folhas e flores, havendo poucas diferenças na forma e proporção relativa das partes florais. O morfotipo com menor porte é *H.* aff. *repens*6 (cerca de 10 cm da base da planta à primeira bráctea floral), assim como o menor número de flores por inflorescência (máximo de três) e folhas basais. Quando comparadas a essa, *H. aranifera*, *H.* aff. *repens*2, *H.* aff. *repens*4 e *H.* aff. *repens*7, com exceções em algumas populações, possuem maior porte, de cerca de 20 cm, e folhas distribuídas ao longo do caule, exceto *H.* aff. *repens*7, que possui folhas basais. *Habenaria repens* (forma típica), *H.* aff. *repens*3 e *H.* aff. *repens*5, de forma geral, possuem maior porte que as demais, chegando a ter média populacional de 51 cm em *H. repens*. Todos estes morfos possuem folhas distribuídas ao

longo do caule, sendo que *H. repens* possui folhas maiores quando comparada a qualquer dos outros morfotipos acima descritos. *Habenaria* aff. *repens*7 diferencia-se das demais devido a uma diferença no ginostêmio: os braços do rostelo são convergentes em direção ao ápice, enquanto nos outros morfotipos são paralelos. Uma das principais diferenças está no tamanho da flor, que é menor em *H.* aff. *repens*4 e *H. repens*. No entanto, as características descritas acima são variáveis dentro de uma mesma população, onde pode ser encontrada uma variação contínua, que leva a ocorrência de extremos com uma variação de tamanho da ordem de quatro vezes. Estes padrões podem ser causados por hibridação entre espécies simpátricas seguida de introgressão, dificultando a separação entre as espécies parentais, hipótese que poderia ser investigada com a utilização de marcadores moleculares.

Casos de alta convergência morfológica devido a polinizadores compartilhados têm sido reportados para a família, tanto ao nível de espécie (e.g., Sramkó *et al*., 2011) quanto ao nível de gênero (e.g., Borba *et al*., 2002; Chase *et al*., 2009; Salazar, Cabrera & Figueroa 2011). Poucos estudos de biologia reprodutiva foram feitos para *Habenaria* (e.g. Singer, 2001; Singer *et al*., 2007; Pedron *et al*., 2012) e todos apontam para espécies de mariposas como os principais polinizadores. Conforme Pedron *et al*. (2012), compartilhamento de espécies de polinizadores pode ser encontrado em espécies pertencentes a diferentes seções de *Habenaria*. Até o momento nenhum trabalho de biologia reprodutiva foi realizado para espécies do complexo. Devido à forma plana do perianto e da coluna, principalmente do labelo, ao cálcar curto (até 1,37 cm) e à presença de néctar, é possível que várias espécies de Lepdoptera possam polinizá-las, havendo uma ampla guilda de polinizadores nas populações e compartilhamento de polinizadores entre espécies pertencentes ao complexo. *Habenaria parviflora* Lindl., espécie que também possui flor pouco tridimensional no que tange o perianto e o ginostêmio, e oferece recursos, é polinizada por várias espécies de mariposas, além de duas espécies de Diptera (Singer, 2001). A baixa especificidade em relação ao polinizador pode ocasionar polinização interespecífica, possibilitando a formação de híbridos entre espécies simpátricas, a menos que barreiras fenológicas ou genéticas (pré- ou pós-fertlização) existam. A presença de diversas espécies de polinizadores aliada às políneas sécteis, que possibilitam que um mesmo polinário seja utilizado na polinização de diversas flores, característica da tribo Orchideae (Dressler 1981), explicaria a taxa de frutificação de aproximadamente 100% observada em populações naturais desse complexo. Além disso, uma morfologia floral que favorece a polinização por uma ampla guilda de espécies, levando a sistemas promíscuos de polinização, pode ter surgido várias vezes no

gênero por convergência e irradiação adaptativa, resultando nas dificuldades taxonômicas observadas.

Espécies similares morfologicamente a *H. repens*, como *H. rupicola* e *H. subviridis*, foram alocadas em clados distintos de *H. repens* na análise filogenética molecular de Batista *et al.* (2013). Isso mostra que uma análise filogenética molecular pode auxiliar a identificar e delimitar as diferentes linhagens pertencentes ao complexo *H. repens*, uma vez que comparações baseadas apenas em caracteres morfológicos podem ser enganosas, devido a um possível alto grau de homoplasias causadas por convergência. Dessa forma, é possível identificar se as características florais, altamente conservadas dentro do complexo, representam convergência, simplesiomorfias ou se constituem sinapomorfias.

A taxonomia integrativa vem sendo cada dia mais utilizada para tomada de decisões taxonômicas. O uso de múltiplas ferramentas para avaliar a circunscrição de espécies leva em consideração fontes de informação que podem ter sofrido diferentes histórias evolutivas. Várias abordagens podem ser consideradas ao se fazer uso de mais de uma fonte de dados. Uma delas é a evidência total, proposta por Carnap (1950) e trazida para o âmbito da taxonomia por Kluge (1989). Com base nesse princípio, quando em conjunto, as evidências podem revelar relações que são contrapostas pelos dados analisados em separado. Por essa razão, quando as diferentes informações são analisadas isoladamente pode haver discordância quanto aos limites taxonômicos inferidos a partir de cada uma delas. Com resultados assim em mãos, é necessária a tomada de decisões sobre a hipótese a ser escolhida. A taxonomia iterativa, introduzida por Yeates *et al*. (2011), propõe testes para as diferentes delimitações de espécies encontradas e a busca por explicações evolutivas para os padrões divergentes.

Em zoologia é muito comum o uso de taxonomia integrativa, principalmente entre os entomologistas (revisado por Schlick-Steiner *et al*., 2010). No campo da botânica também se tem empregado múltiplas ferramentas para fins taxonômicos (e.g., Conceição *et al*., 2008), especialmente dentro da família Orchidaceae (e.g., Pessoa *et al*., 2012). No entanto, nenhuma abordagem similar, até o momento, foi realizada com espécies do gênero *Habenaria*. Em botânica, as principais fontes de dados são morfológicas e genéticas, frequentemente utilizadas em abordagens populacionais. Bateman, James & Rudall (2012), com o uso de características morfológicas e marcadores moleculares nucleares e plastidiais, encontraram alto nível de variação morfológica, contrastando com baixos níveis de variação genética em *Platanthera*, gênero que pertence à mesma subtribo de *Habenaria*. Eles propõem um possível caso de

especiação recente com isolamento reprodutivo devido a deposição do polinário em diferentes posições do corpo do polinizador. Neste caso, variações observáveis na morfologia não podem ser caracterizadas em nível genético, e ao uso exclusivo de marcadores moleculares o fenômeno de especiação passaria despercebido.

Análises morfométricas multivariadas são frequentemente empregadas para auxiliar na delimitação de espécies ou morfotipos dentro de complexos de espécies, demonstrando a ocorrência de descontinuidades em padrões de variação a princípio aparentemente contínuos (e.g., Oliveira *et al*., 2007; Pereira *et al*., 2007). Em Orchidaceae, vários estudos têm sido realizados com este propósito. (e.g., Borba *et al.*, 2002; Ribeiro *et al*., 2008; Melo & Borba, 2011), inclusive dentro da subtribo Orchidinae (e.g., Ponsie, Johnson & Edwards, 2007; Bateman *et al*., 2012), à qual pertence o gênero *Habenaria*, com os quais vem sendo obtido sucesso em separar morfotipos e espécies de delimitação muito difícil baseada apenas em análises univariadas dos dados morfológicos.

Marcadores microssatélites vêm sendo cada dia mais utilizados em análises de variabilidade genética por, dentre outras vantagens, apresentarem alto nível de polimorfismo, serem codominantes e de caracterização altamente confiável, quando comparados a outros marcadores, especialmente os dominantes ISSR, AFLP e RAPD. Além de fornecerem dados para inúmeras inferências populacionais, como fluxo gamético recente e partição da variabilidade genética entre populações, as análises de estrutura genética podem auxiliar na tomada de decisões de cunho taxonômico (e.g., Jørgensen *et al*., 2008; Harbaugh *et al*., 2009).

O estudo da biologia floral e comportamento dos polinizadores também pode ajudar a elucidar a partição genética encontrada entre grupos de plantas (e.g., Borba *et al*., 2001). Foi demonstrado por diversos autores que mariposas podem permanecer vários minutos em uma mesma inflorescência, favorecendo a autopolinização e a geitonogamia (e.g., Pellmyr, 1997; Singer, 2001). Essa característica levaria a uma estruturação genética intrapopulacional, e a populações altamente diferenciadas entre si. Entretanto, como o polinário na tribo Orchideae é formado por diversos aglomerados de pólen, uma única planta doadora pode ter seu pólen distribuído por várias plantas receptoras. Esse atributo pode compensar a propensão à autopolinização em *Habenaria* polinizada por mariposas e moscas e, com isso, levar a uma maior taxa de reprodução cruzada. Padrões como esse podem ser observados principalmente através da utilização de marcadores moleculares sob uma abordagem populacional.

Marcadores morfológicos e moleculares, estes últimos abordados sob contexto filogenético e de genética de populações, foram utilizados no presente trabalho, a fim de determinar: 1) se o complexo *H. repens* constitui um grupo monofilético; 2) qual a relação dos morfotipos do complexo com outras espécies do gênero *Habenaria*; 3) como esses morfotipos se relacionam filogeneticamente; 4) se algum terminal brasileiro agrupa-se com o terminal da localidade tipo e, se sim, qual; 5) como está particionada a variabilidade genética no complexo 6) se os morfotipos inicialmente delimitados correspondem a agrupamentos morfológicos e genéticos discretos que podem ser reconhecidos como táxons distintos; 7) se as variações morfológicas e genéticas estão correlacionadas; 8) como estão estruturadas geneticamente as populações e como isso pode ser relacionado aos possíveis mecanismos de polinização e especiação; 9) se as similaridades florais se dão por ancestralidade comum ou por convergência; e, por fim, 10) examinar as implicações de todos os resultados obtidos para a taxonomia do grupo.

CAPÍTULO 1

Análise filogenética molecular do complexo *Habenaria repens* Nutt. (Orchidaceae) no Brasil

INTRODUÇÃO

Casos de alta convergência morfológica devido a polinizadores compartilhados têm sido reportados para a família Orchidaceae tanto ao nível de espécie (e.g., Sramkó *et al*., 2011) quanto ao nível de gênero (e.g., Borba *et al.*, 2002; Chase *et al*., 2009; Salazar *et al*., 2011). A presença de convergência, tanto em caracteres vegetativos como em caracteres florais, aliada à plasticidade fenotípica, especialmente nos primeiros, pode gerar elevado polimorfismo dentro de espécies ou mesmo populações, levando à formação de complexos de espécies de difícil delimitação taxonômica. Dentre estes complexos, encontra-se o formado por *H. repens* Nutt. (Orchidaceae) e espécies relacionadas. *Habenaria repens* é uma espécie de hábito tipicamente aquático a subaquático, crescendo dentro d'água nas margens de lagoas e rios, característica incomum nas espécies Neotropicais do gênero. O holótipo de *H. repens* é proveniente do estado da Geórgia (Estados Unidos da América), mas a distribuição estende-se do sul deste país (desde a Carolina do Norte) até o sul da América do Sul (norte da Argentina e Uruguai). A espécie é exclusivamente Neotropical e ocorre em todas as regiões do Brasil. Caracteristicamente, as suas plantas apresentam sistema radicular bem desenvolvido, com raízes numerosas e longas sem tuberoides, caule reptante folhoso, folhas bem desenvolvidas, inflorescência multiflora, e flores verdes de tamanho pequeno, quando comparada a outras espécies do gênero (Ames, 1910). Como toda espécie do gênero, *H. repens* emite orgãos epígeos uma única vez ao ano, o que limita o período em que pode ser encontrada, dificultando a sua representatividade em coleções de herbário. *Habenaria repens* foi uma das primeiras espécies do gênero descritas para o Neotrópico (Nuttal, 1818) e no tratamento seccional de Kränzlin (1892, 1901) foi incluída na seção *Clypeatae* Kraenzl.

Na sinopse para as espécies Neotropicais do gênero, Batista *et al*. (2011a, 2011b) apontaram a existência deste complexo de espécies. O exame de um grande número de amostras vivas e herborizadas revelou a existência de diversos morfotipos similares a *H. repens* (J.A.N. Batista, comunicação pessoal) que ainda não foram identificados a nível específico e podem representar novas espécies (ver Figuras 2.1-2.4, Capítulo 2), além de espécies formais, como *H. aranifera* Lindl., que possuem morfologia muito similar a *H. repens*. Afora o complexo identificado para o Brasil, em outras extensões de sua distribuição, como o México, *H. repens* também tem delimitação confusa que necessita revisão (G. A. Salazar, comunicação pessoal).

Devido à forma plana do perianto e da coluna, principalmente do labelo, ao cálcar curto (até 1,37 cm) e à presença de néctar, é esperado que várias espécies de Lepidoptera possam

polinizá-las, havendo uma ampla guilda de polinizadores nas populações e compartilhamento de polinizadores entre espécies pertencentes ao complexo, como observado em outras espécies do gênero (Singer, 2001). Uma morfologia floral que favorece a polinização por uma ampla guilda de espécies, levando a sistemas promíscuos de polinização, pode ter surgido várias vezes no gênero por convergência e irradiação adaptativa, resultando nas dificuldades taxonômicas observadas.

O estudo filogenético de Batista *et al* (2013) apontou um polifiletismo ou parefiletismo para todas as seções propostas por Kränzlin. A seção *Clypeatae* foi caracterizada pelo labelo tripartido, pétala lateral bipartida, processos breves e sépala posterior grande. Caracteres florais são mais susceptíveis a convergência em função de polinizadores. Como a seção é delimitada apenas com base em caracteres florais, o agrupamento de espécies de linhagens divergentes em uma mesma seção torna-se mais provável, como aparentemente ocorre. Das demais espécies classificadas na seção *Clypeatae*, apenas *H. warmingii* Rchb.f. & Warm agrupa-se a *H. repens* na análise filogenética molecular de Batista *et al*. (2013). As demais possuem semelhanças nas características acima descritas por homoplasia.

Uma análise filogenética molecular pode auxiliar a identificar e delimitar as diferentes linhagens pertencentes ao complexo *H. repens*, uma vez que comparações baseadas apenas em caracteres morfológicos podem ser enganosas, devido a um possível alto grau de homoplasias causadas por convergência. Dessa forma, é possível identificar se as características florais, altamente conservadas dentro do complexo, representam convergência (homoplasias), simplesiomorfias ou se constituem sinapomorfias. Além da circunscrição do clado onde se encontra *H. repens*, outra questão a ser abordada são as relações filogenéticas das espécies que compõem o complexo com outras espécies do gênero. Enquanto a análise filogenética molecular de Batista *et al.*(2013) posicionou *H. repens* em um clado com alto nível de suporte, outras espécies com morfologia floral similar, como *H. rupicola* Barb.Rodr. e *H. subviridis* Hoehne & Schltr., foram posicionadas em clados distintos, indicando convergência na morfologia floral.

Tendo em vista as características do complexo descritas acima, neste trabalho pretende-se determinar: 1) se o complexo *H. repens* constitui um grupo monofilético; 2) como se relacionam os morfotipos e espécies que formam o complexo *Habenaria repens*; 3) qual a relação das espécies e morfotipos pertencentes ao complexo com outras espécies e clados Neotropicais do gênero *Habenaria*; e 4) qual a relação dos terminais brasileiros de *H. repens*

com materiais provenientes da localidade onde o tipo da espécie foi coletado, nos Estados Unidos da América.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Foram coletadas amostras de 31 populações de *H. repens*, *H. aranifera* e seis morfotipos semelhantes a essas duas espécies, abrangendo uma distribuição do norte do estado do Rio Grande do Sul à Paraíba (regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil) (Tabela 1.1). Para comparação com o material típico norte americano, também foram obtidas amostras de uma população de *H. repens* proveniente da Flórida, E.U.A. O grupo interno foi formado por 47 espécies de *Habenaria* Neotropicais, além dos 31 representantes do complexo *Habenaria repens*. Ao todo, dez terminais de outros gêneros foram utilizados como grupo externo, sendo que as árvores foram enraizadas em *Satyrium bicorne* Thunb., representante da tribo Diseae (Tabela 1.2).

Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

As amostras frescas ou secas em sílica foram extraídas de acordo com Doyle & Doyle (1987), com algumas modificações, como menor volume de tecido (aproximadamente 20 mg) e de soluções, em proporção, e lavagem com etanol 70%. A região ITS e parte do gene *matK* foram escolhidas com base no trabalho de Batista *et al*. (2013), a fim de complementar os táxons incluídos naquele trabalho e utilizar as sequências já geradas neste estudo. Ao todo, duas regiões nucleares (ITS e ETS) e duas plastidiais (*matK* e parte do íntron *trnK*) foram amplificadas. As sequências de ITS e parte do *matK* das espécies do Novo Mundo que não pertencem ao complexo foram aproveitadas do trabalho de filogenia do gênero (Batista *et al*., 2013). As sequências para o grupo externo foram obtidas no GenBank. O restante do gene *matK* e o espaçador externo transcrito ETS foram sequenciados para todos os terminais Neotropicais.

A região ITS compreende parte das regiões codificadoras dos RNAs ribossomais 18S e 26S, os espaçadores transcritos internos, ITS 1 e ITS 2, e o gene 5.8S. Os primers 17SE e 26SE (Sun *et al*., 1994) foram utilizados nas amplificações. O espaçador transcrito externo (ETS) foi parcialmente amplificado com os primers Orchid (5’ CATATGAGTTGTTGCGGACCWT 3’)

(van den Berg, dados não publicados) e um primer derivado do iniciador 18S-IGS (5' AGACAAGCATATGACTACTGGCAGG 3') (Baldwin & Markos, 1998). Em função do tamanho (ca. 1700 pb), a região *matK-trnK* foi amplificada em duas reações. Em uma delas foram utilizados os primers *matK*F2 (5' CTAATACCCCATCCCATCCAT 3') e *trnK*2R (5' CCCGGAACTAGTCGGATG 3') (Hu *et al*., 2000) e na outra os primers *matK*-19F (5' CGTTCTGACCATATTGCACTATG 3') (Molvray, Kores & Chase, 2000) e *matK*356R (5' AATCGCAACAAATGCAAA 3'). A junção dos dois fragmentos gerou uma sequência contínua que contém a região codificadora completa do gene *matK* e o íntron *trnK* 3'.

As amostras foram amplificadas em termociclador Biocycler MJ96G ou MJ96+, seguindo o sistema: tampão IB 1x (Phoneutria Biotech, Belo Horizonte, Brasil), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 400 nM de cada primers, 0,2 mg/mL de BSA e 2 unidades de Taq DNA Polimerase (Phoneutria Biotech, Belo Horizonte, Brasil) para um volume final de 20µL. Os ciclos de amplificação foram: 94°C por 3 min.; 35 ciclos compostos de denaturação a 94°C por 45 s., anelamento dos primers a 58°C (*matK*) ou 60°C (ITS e ETS) por 45 s. e extensão a 72°C por 80 s. (exceto a região do *matK* amplificada pelos primers *matK*F2 e *trnK*2R, que teve extensão de 140 s.). Os ciclos foram seguidos por uma extensão final a 72°C por 7 min.

Os produtos de amplificação foram precipitados com PEG 20% (NaCl 2,5 M e polietilenoglicol 8000 a 20%) ou EDTA e enviados a Macrogen Inc. para sequenciamento em sequenciador automático, utilizando o método de Sanger (Sanger & Coulson, 1975) com os mesmos primers utilizados para a amplificação. Todas as amostras foram sequenciadas bidirecionalmente. As sequências obtidas foram tratadas com o pacote Staden (Staden, 1996) a fim de se obter um consenso entre as duas fitas. As matrizes resultantes foram alinhadas utilizando o algoritmo Muscle (Edgar, 2004) seguido de ajustes manuais no programa MEGA 5 (Tamura *et al*., 2011).

Análises filogenéticas

Os gaps foram codificados no programa SeqState (Muller, 2005) de acordo com a codificação simples de indels (SIC) proposta por Simmons & Ochoterena (2000). Foram feitas análises das quatro regiões separadamente a fim de se detectar possíveis incongruências e, em seguida, foram realizadas análises conjuntas. Análises de parcimônia foram realizadas no programa TNT (Goloboff, Farris & Nixon, 2003). As buscas heurísticas foram feitas a partir de 100 replicações, armazenando-se 10 árvores a cada replicação usando a parcimônia de Fitch.

Os rearranjos foram feitos por TBR. Rodadas adicionais de TBR foram feitas com as árvores da memória até não serem encontradas novas árvores. O consenso estrito foi gerado e valores de bootstrap calculados sobre o consenso com 10.000 reamostragens. Valores de bootstrap acima de 90 foram considerados altos, entre 80 e 90 medianos e abaixo de 80 baixos.

Antes da realização das análises bayesianas, a busca pelo melhor modelo para cada região foi feita no programa jModeltest (Darriba *et al*., 2012) sem considerar os gaps codificados. Restringiu-se a busca a três modelos de substituição, pois assim, foram analisados apenas os modelos implementados no programa MrBayes 3.2.1 (Huelsenbeck *et al*., 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Por se tratar de uma região codificante, o *matK* foi separado entre primeira e segunda posição do códon e terceira posição do códon. Já o ITS foi separado em ITS1, 5.8S e ITS2. O critério de informação de Bayes (BIC) (Schwarz, 1978) foi utilizado para escolha do melhor modelo. As análises Bayesianas foram feitas no programa MrBayes 3.2.1, implementando-se o modelo escolhido. Duas corridas, com uma cadeia fria e três quentes cada, rodaram por 10.000.000 de gerações amostrando-se uma árvore a cada 100 gerações. A convergência foi diagnosticada pela divergência nos desvios padrão das duas corridas (menor que 0,01), pelo PRSF (igual a 1,0) e pelo tamanho amostral de cada parâmetro (maior que 200). Os primeiros 25% dos dados foram descartados e o restante foi utilizado para gerar os valores finais dos parâmetros, dentre eles, a árvore de consenso de maioria e as probabilidades posteriores dos clados.

RESULTADOS

Análises Filogenéticas

Os modelos implementados para cada partição estão disponíveis na Tabela 1.3. Para a região ITS, modelos diferentes foram selecionados para as diferentes partições internas. Para o gene *matK*, o mesmo modelo teve o melhor resultado para as diferentes posições do códon. As características relativas às quatro partições estão resumidas na Tabela 1.4. No total, foram alinhados 3.250 caracteres, sendo 132 correspondentes a gaps codificados. A região ETS teve o maior número de caracteres parcimônia informativos (44,8%) e o consenso estrito das árvores de *matK* obteve os maiores índices de consistência e de retenção (0,73 e 0,86 respectivamente).

As análises de parcimônia e bayesiana, assim como as análises separadas das diferentes partições não apresentaram incongruências significativas. Como esperado, por tratar-se de um consenso de maioria, as árvores bayesianas tiveram melhor resolução. Em vista disso, será apresentada e discutida a análise bayesiana de todas as regiões concatenadas, identificando-se os clados que colapsaram na análise de parcimônia (Figura 1.1).

As *Habenaria* Neotropicais foram recuperadas como um grupo monofilético, com *H. tridens*, espécie africana, como grupo irmão. As *Habenaria* do Velho Mundo constituem um grado parafilético, ocupando uma posição basal, e *Bonatea* torna o gênero *Habenaria* parafilético. Os terminais pertencentes ao complexo *H. repens* formaram dois grandes clados (A e B), com alto valor de probabilidade posterior (1,0), mas valores de bootstrap (BS) mediano e baixo (83 e 66, respectivamente), além de um terminal que se encontrou agrupado dentro de outro clado.

No clado B, onde se encontram as amostras de *H. repens* provenientes dos E.U.A, estão também *H. aranifera*, todos os indivíduos do morfotipo 5, um do morfotipo 3, e todos os indivíduos identificados previamente como *H. repens sensu stricto*. Estes tem distribuição desde Curitiba, no Sul do Brasil até a Paraíba, no Nordeste do país. Indivíduos de *H. repens* de Viçosa-MG constituem o grupo irmão dos terminais dos E.U.A. As plantas coletadas nos estados do Paraná, Bahia e Paraíba, muito semelhantes morfologicamente a *H. repens*, ficaram mais próximas dos outros morfotipos (5 e parte do 3) e de *H. aranifera*, do que de *H. repens* dos E.U.A. Todos os seis terminais de *H. aranifera* formaram um clado com probabilidade posterior (PP) de 0,97 na análise bayesiana. *Habenaria warmingii* é irmã do clado B, e este clado, por sua vez, é irmão do clado que inclui *H. pentadactyla*, espécie tipo da seção *Pentadactylae* Kraenzl. Ao clado formado por todas as espécies e morfotipos mencionadas acima, agrupa-se um pequeno clado formado por *H. johannensis*, *H. macronectar*, *H. macilenta* e *H. regnellii*.

No clado A, irmão do grande grupo descrito acima, os indivíduos do morfotipo 7 formaram um clado com 1,0 de PP e 62 de BS. Dois indivíduos do morfotipo 4 formam um clado aninhado dentro de um clado contendo todos os demais indivíduos do morfotipo 3. Estes dois clados (7 e 3+4) constituem uma politomia juntamente com um indivíduo do morfotipo 4, de Conceição do Mato Dentro-MG.

O único indivíduo amostrado do morfotipo 6, também de Conceição do Mato Dentro-MG, ficou separado de todos os outros e foi incluído em um clado formado por espécies pertencentes a grupos de espécies ou seções morfologicamente não relacionadas a *H. repens*, como *H. trifida* Kunth (sect. *Spathaceae*), *H. rupicola*/*H. hexaptera*, *H. imbricata*/*H.armata*, *H. melanopoda*/*H. balansae*, e *H. nuda* (sect.. *Nudae*).

Tabela 1.1. Populações do complexo *H. repens* coletadas para o estudo. Os vouchers estão depositados no Herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB), exceto quando indicado.

Espécie (morfo) Localidade	Coordenadas Geográficas	Voucher
H. aranifera		
Cambará do Sul–RS	28°52'49"S;50°1'37"O	A. C. Fernandes s.n. (BHCB 162187)
São José dos Ausentes–RS	28°33'56"S;49°44'48"O	A. C. Fernandes s.n. (BHCB 162188)
Bom Jardim da Serra–SC	28°31'48"S;49°40'18"O	A. C. Fernandes s.n. (BHCB 162189)
São Francisco de Paula-RS	29°23'24"S;50°23'57"O	A. C. Fernandes s.n. (BHCB 162190)
Urubici-SC	28°6'48"S;49°29'56"O	N. F. O. Mota 2517
H. repens		
Anguera-BA	12°11'44"S;39°9'56"O	B. L. Lau et al. 87
Curitiba-PR	25°31'50"S;49°12'27"O	A. Massensini Júnior 76
Estados Unidos da América	26°31'28"N;80°3'37"O	D. G. Braun 01 (FLAS)
Paraíba	7°10'21"S;35°34'2"O	
Viçosa-MG	20°45'16"S;42°52'57"O	J. A. N. Batista et. al. 3170
Viçosa-MG	20°45'16"S;42°52'57"O	B. L. Lau et al. 88
H. aff. *repens*2		
Morro do Chapéu-BA	11°40'51"S;41°0'50"O	B. L. Lau et al. 86
H. aff. *repens*3		
Buenópolis-MG	17°55'15'S;44°13'2"O	A. A. Vale 172
Ilhéus-BA	14°47'S;39°2'O	A. A. Vale 142
Diamantina-MG	18°16'33,9"S;43°42'46"O	B. L. Lau et al. 58
Grão Mogol-MG	16°32'51"S;42°53'35"O	N. F. O. Mota 2285
H. aff. *repens*4		
Diamantina-MG	18°17'50"S;43°48'13"O	B. L. Lau et al. 23
Milho Verde-MG	18°27'47"S;43°28'54"O	B. L. Lau et al. 24
Conceição do Mato Dentro-MG	19°9'45"S;43°30'50"O	B. L. Lau et al. 39
H. aff. *repens*5		
Delfim Moreira-MG	22°36'36"S;45°20'50"O	B. L. Lau et al. 40
Delfim Moreira-MG	22°35'18"S;45°20'2"O	B. L. Lau et al. 41
H. aff. *repens*6		
Conceição do Mato Dentro-MG	19°5'23"S;43°33'6"O	R. C. Mota 1701
H. aff. *repens*7		
Santa Bárbara-MG	20°8'4"S;43°27'48"O	B. L. Lau et al. 52
Conceição do Mato Dentro-MG	19°9'45"S;43°30'50"O	B. L. Lau et al. 53
Alto Caparaó-MG	20°31'17"S;41°54'26"O	J. A. N. Batista et. al. 2538

Tabela 1.2. Caracterização dos terminais de *Habenaria* Neotropicais utilizados na análise filogenética do complexo *Habenaria repens*, cujas sequências não foram geradas no presente trabalho. Os números nas colunas ITS e *matK* indicam os códigos de acesso no GenBank. Os códigos da região *matK* corresponde à amplificada pelos primers matKF2 e trnK2R. " - " indicam sequências para as quais não se obteve sucesso na amplificação e constaram como dados faltantes nas matrizes finais. As sequências foram obtidas do trabalho de Batista *et al*. (2013) e de Pedron (dados não publicados). Entre parênteses encontram-se os códigos dos herbários onde estão depositados. Acrônimos para os estados brasileiros: BA-Bahia; DF-Distrito Federal; GO-Goiás; MG-Minas Gerais; MT-Mato Grosso; PR-Paraná; RJ-Rio de Janeiro; RS-Rio Grande do Sul. E.U.A.: Estados Unidos da Amèrica.

Táxon	Voucher	Origem	ITS	matK
Habenaria Neotropical				
H. achalensis Kraenzl.	Batista 2506 (BHCB)	Brasil, RS	HM777526	HM777794
H. alpestris Cogn.	Batista 1576 (BHCB)	Brasil, DF	HM777655	HM777952
H. amambayensis Schltr.	Pott 7669 (CEN)	Brasil, MT	–	HM777825
H. aranifera Lindl.	Batista 2472 (BHCB)	Brasil, RS	HM777626	HM777819
H. armata Rchb.f.	Batista 1297 (CEN)	Brasil, DF	HM777677	HM777931
H. ayangannensis Renz	Batista 1919 (BHCB)	Brasil, MG	HM777706	HM777934
H. balansae Cogn.	Batista 2336 (BHCB)	Brasil, MG	HM777683	HM777883
H. caldensis Kraenzl.	Batista 250 (CEN)	Brasil, GO	HM777645	HM777881
H. crucifera Rchb.f. & Warm.	Batista 1826 (BHCB)	Brasil, MG	HM777574	HM778014
H. dutraei Schltr.	Pedron 3 (ICN)	Brasil, RS	-	-
H. edwallii Cogn.	Batista 1717 (BHCB)	Brasil, MG	HM777564	HM777803
H. ekmaniana Kraenzl.	Radins s.n. (BHCB)	Argentina	-	-
H. exaltata Barb.Rodr.	Batista 2771 (BHCB)	Brasil, MG	HM777621	HM777829
H. glaucophylla Barb.Rodr.	Batista 761 (CEN)	Brasil, DF	HM777631	HM777875
H. goyazensis Cogn.	Santos 2422 (CEN)	Brasil, GO	–	HM777895
H. hamata Barb. Rodr.	Batista 1519 (CEN)	Brasil, DF	HM777586	HM777865
H. henscheniana Barb.Rodr.	Batista 2802 (BHCB)	Brasil, MG	HM777623	HM777828
H. hexaptera Lindl.	Batista 2399 (BHCB)	Brasil, MG	HM777538	HM777909
H. humilis Cogn.	Batista 1901 (BHCB)	Brasil, MG	HM777581	HM777879
H. imbricata Lindl.	Batista 1123 (CEN)	Brasil, DF	HM777648	HM777926
H. johannensis Barb.Rodr.	Mota 2777 (BHCB)	Brasil, MG	HM777609	HM777841
H. leptoceras Hook.	Batista 2658 (BHCB)	Brasil, RJ	HM777597	HM777855
H. leucosantha Barb.Rodr.	Batista 1604 (BHCB)	Brasil, DF	HM777568	HM777790
H. leucosantha Barb.Rodr.	Batista 1604 (BHCB)	Brasil, DF	HM777568	HM777790
H. macilenta (Lindl.) Rchb.f.	Batista 2393 (BHCB)	Brasil, MG	HM777606	HM777811
H. macronectar (Vell.) Hoehne	Batista 2519 (BHCB)	Brasil, PR	HM777614	HM777833
H. megapotamensis Hoehne	Pedron 10 (ICN)	Brasil, RS	-	-
H. melanopoda Hoehne & Schltr.	Batista 2539 (BHCB)	Brasil, MG	HM777688	HM777888
H. monorrhiza (Sw.) Rchb.f.	Whitten 2721 (FLAS)	E.U. A.	-	-
H. montevidensis Spreng.	Batista 2479 (BHCB)	Brasil, RS	HM777619	HM777826
H. mystacina Lindl.	Batista 1812 (BHCB)	Brasil, MG	HM777728	HM777970
H. nuda Lindl.	Batista 2869 (BHCB)	Brasil, MG	HM777718	HM777981

H. paranaensis Barb.Rodr.	Batista 2436 (BHCB)	Brasil, MG	HM777528	HM777796
H. parviflora Lindl.	Batista 1813 (BHCB)	Brasil, MG	HM777560	HM777800
H. pentadactyla Lindl.	Pedron 11 (ICN)	Brasil, RS	-	-
H. pratensis (Salzm. ex Lindl.) Rchb.f.	Batista 2686 (BHCB)	Brasil, BA	HM777546	HM777847
H. pungens Cogn.	Batista 2095 (BHCB)	Brasil, GO	HM777570	HM778011
H. regnellii Cogn.	Batista 2801 (BHCB)	Brasil, MG	HM777603	HM777830
H. rodeiensis Barb.Rodr.	Mota 2824 (BHCB)	Brasil, MG	HM777577	HM777995
H. rupicola Barb.Rodr.	van den Berg 1279 (HUEFS)	Brasil, MG	HM777534	HM777910
H. schenckii Cogn.	Batista 2882 (BHCB)	Brasil, BA	HM777580	HM777869
H. secunda Lindl.	Batista 2640 (BHCB)	Brasil, RJ	HM777525	HM777791
H. secundiflora Barb.Rodr.	Batista 2392 (BHCB)	Brasil, MG	HM777637	HM778004
H. setacea Lindl.	Mota 3019 (BHCB)	Brasil, MG	HM777731	HM777980
H. spathulifera Cogn.	Bringel 411 (CEN)	Brasil, GO	-	HM777851
H. trifida Kunth	Batista 1783 (BHCB)	Brasil, DF	HM777672	HM777917
H. warmingii Rchb.f. & Warm.	Batista 2409 (BHCB)	Brasil, MG	HM777616	HM777821
H. quinqueseta (Michx.)Sw.	Whitten 3324 (FLAS)	E.U.A.	-	-
Habenaria África				
H. arenaria Lindl.	-	-	DQ522073	DQ522092
H. clavata (Lindl.) Rchb.f.	-	-	DQ522074	DQ522093
H. dives Rchb.f.	-	-	DQ522075	DQ522095
H. laevigata Lindl.	-	-	DQ522076	DQ522096
H. lithophila Schltr.	-	-	DQ522077	DQ522098
H. praestans Rendle	-	-	DQ522079	DQ522100
H. tridens Lindl.	-	-	DQ522080	DQ522101
Grupo externo Habenariinae				
Bonatea antennifera Rolfe	-	-	DQ522049	DQ522082
B. bracteata G.McDonald & McMurtry	-	-	DQ522057	DQ522084
B. polypodantha (Rchb.f.) L.Bolus	-	-	DQ522062	DQ522087
B. speciosa (L.f.) Willd.	-	-	DQ522069	DQ522091
Cynorkis grandiflora Ridl.	-	-	EF079186	EF065584
Gennaria diphylla (Link) Parl.	-	-	AY351380	AY368383
Stenoglottis longifolia Hook.f.	-	-	AF348065	AY368387
Grupo externo Orchidinae				
Orchis quadripunctata	-	-	Z94105	AY368385
Platanthera chlorantha (Custer) Rchb.	-	-	AY704975	DQ522103
Grupo externo Disae Satyriinae				
Satyrium bicorne	-	-	AY704978	EF612539

Tabela 1.3. – Modelos escolhidos pelo critério de BIC para cada partição utilizada na análise filogenética bayesiana do complexo *Habenaria repens* (Orchidaceae).

Região	Modelo
ITS1	HKY+I+G
5.8S	K80+G
ITS2	HKY+G
trnK	F81+G
Posições 1 e 2 do códon em *matK*	GTR+G
Posição 3 do códon em *matK*	GTR+G
ETS	HKY+G

Tabela 1.4. Caracterização das regiões sequenciadas para a análise filogenética do complexo *Habenaria repens* (Orchidaceae). Total representa os dados para as quatro partições concatenadas. N = tamanho da sequência em pares de base; N.G. = número de caracteres correspondentes a gaps codificados de acordo com Simmons & Ochoterena (2000); V = número de sítios variáveis incluindo os gaps codificados; Pi = número de caracteres parcimoniosamente informativos; C = comprimento total das árvores mais parcimoniosas; IC = índice de consistência; IR = índice de retenção.

Região	N	N.G.	V	Pi	C	IC	IR
ITS	821	64	461	292 (35,6%)	1069	0,63	0,77
ETS	520	35	305	233 (44,8%)	570	0,68	0,79
matK	1554	3	257	121 (7,8%)	379	0,73	0,86
trnK	371	36	122	60 (16,2%)	188	0,72	0,84
Total	3250	132	1042	574 (17,7%)	2043	0,65	0,78

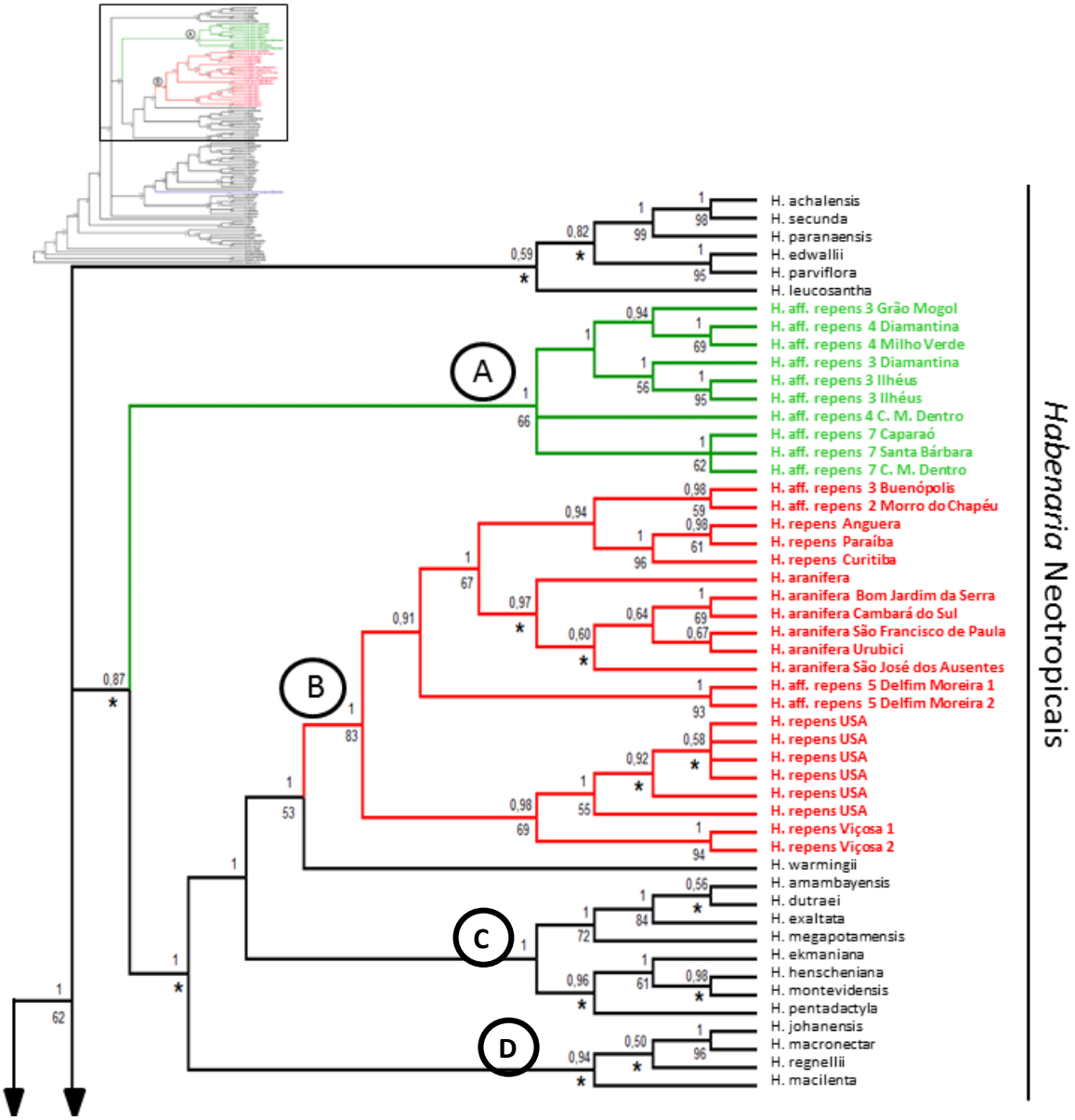


Figura 1.1. Consenso de maioria obtido da análise filogenética bayesiana do complexo *H. repens* mais 61 terminais. Os valores acima dos ramos indicam a probabilidade posterior dos clados. Os valores abaixo dos ramos correspondem ao suporte de bootstrap para o consenso estrito da análise de parcimônia (suportes abaixo de 50 foram omitidos). Os "*" indicam os clados que colapsaram no consenso estrito da análise de parcimônia. C. M. Dentro = Conceição do Mato Dentro.

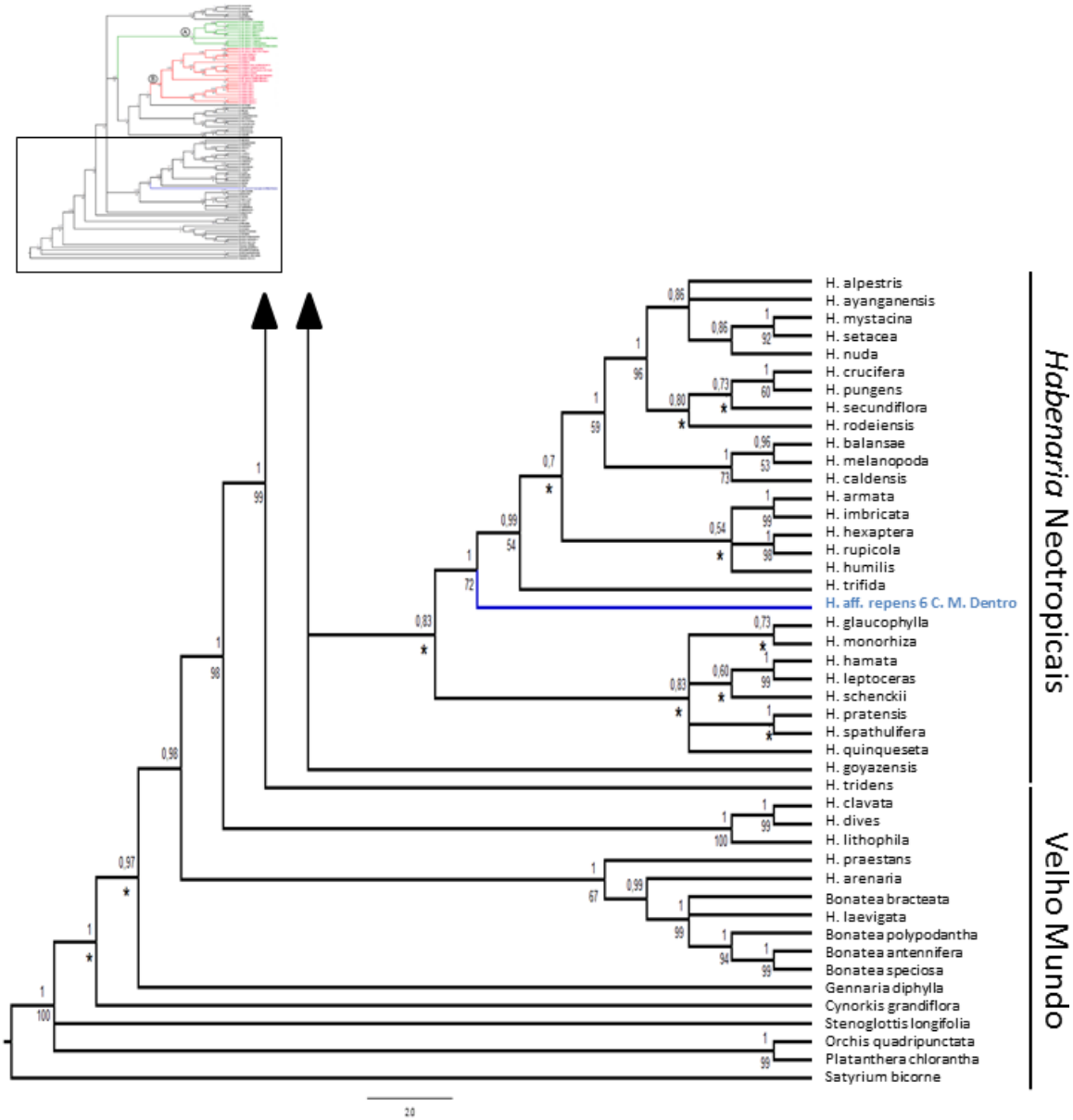


Figura 1.2. Continuação da Figura 1.1. C. M. Dentro = Conceição do Mato Dentro.

DISCUSSÃO

Dentre as regiões utilizadas no presente trabalho, as regiões nucleares (ITS e ETS) apresentaram a maior variabilidade (66,9% dos sítios variáveis), apesar de representarem apenas 40,9% dos caracteres disponíveis. Sequências nucleares mais informativas, quando comparadas às plastidiais, já haviam sido reportadas anteriormente para a família (e.g., Monteiro *et al*., 2010; Batista *et al*., 2013). No entanto, os marcadores plastidiais *matK* e *trnK* obtiveram maiores índices de consistência e de retenção mostrando menor ocorrência de homoplasias nestas regiões. Embora todas as análises tenham sido congruentes entre si, as quatro regiões, quando analisadas em conjunto, geraram uma árvore de consenso estrito melhor resolvida do que qualquer uma delas analisada separadamente. O consenso de cada região suportou os três clados formados pelas espécies do complexo *H. repens*, mas a relação destes entre si e com os terminais mais próximos não pode ser determinada nas análises individuais, devido à formação de grandes politomias. Isso pode ocorrer devido à existência de informação filogenética contida apenas nos dados concatenados, conforme defendido por Kluge (1989) e o princípio da evidência total ou apenas pelo aumento no número de caracteres incluído na análise, argumento que também suporta o proposto por Kluge.

Conforme apontado por Batista *et al*. (2013), *H. tridens*, espécie africana, é irmã das *Habenaria* Neotropicais. Ao contrário da hipótese inicial, os morfotipos do complexo *H. repens* estudados nesse trabalho não constituem um grupo monofilético. Corroborando os resultados de Batista *et al*. (2013), com um maior número de regiões e caracteres, *H. rupicola* pertence a um clado distinto daquele formado pelas espécies do complexo *H. repens*. O mesmo é esperado para *H. subviridis*, já que esta também ficou distante de *H. repens* na análise filogenética molecular de Batista *et al.* (2013). O morfotipo 6 (*H.* aff. *repens*6) não é relacionado a qualquer um dos outros estudados evidenciando que as características morfológicas que o faziam ser considerado relacionado ao grupo tratam-se de homplasias em linhagens distinta dentro do gênero. Apesar da elevada similaridade, morfologicamente é possível discriminar este morfotipo, que deve ser reconhecido como uma espécie distinta, ainda não descrita.

A divisão dos demais indivíduos em dois clados (A e B) não diretamente relacionados também indica a necessidade de reconhecimento de, ao menos, duas espécies no restante do complexo. Apesar de possuírem altos valores de probabilidade posterior (1,0), os clados A e B possuem valores de bootstrap baixo e mediano (66 e 83, respectivamente), assim como o clado que os contem, que colapsa no consenso estrito da análise de parcimônia. No entanto, a

separação entre os dois é observada em todas as árvores de consenso estrito (todas as regiões separadas e concatenadas), estando presente em todas as árvores mais parcimoniosas. Os baixos valores de suporte poderiam ser explicados por uma divergência recente entre as linhagens. Outra possibilidade seria uma baixa taxa de mutação nos marcadores utilizados e, consequentemente, baixo polimorfismo, fazendo-se necessário o uso de um número maior de caracteres. Tendo em vista a frequente ocorrência de convergência na família (e.g., Borba *et al*., 2002; Chase *et al*., 2009; Salazar, Cabrera & Figueroa 2011) e a separação dos morfotipos em dois clados suportada por diversos marcadores moleculares, a semelhança morfológica entre eles pode se dar por dois fatores. O primeiro deles é convergência dos caracteres florais, assim como ocorre entre esses e *H. rupicola* e *H. subviridis*. A outra explicação para o fenômeno seria a presença de simplesiomorfias, com diferenciação dos grupos pertencentes à seção *Pentadactylae* e demais táxons que se agrupam ao complexo, mas possuem poucas similaridades morfológicas em relação a ele.

O clado A possui distribuição restrita ao Sul da Bahia e Minas Gerais. Apesar da sustentação do morfotipo 7, que poderia ser reconhecido como um táxon separado, as relações dentro deste clado não estão bem resolvidas. O morfotipo 7 diferencia-se pela convergência dos canais das anteras e braços do rostelo em direção ao ápice, e será reconhecido como uma nova espécie. Já os morfotipos 3 e 4, apesar de não serem segregados pela análise filogenética, possuem diferenças em relação ao tamanho de todas as partes da planta que permitem sua separação. Dessa forma, outras análises deverão ser realizadas a fim de determinar se estes dois morfos devem ser tratados como uma única espécie com grande variação de tamanho ou duas espécies. Os morfotipos 4 e 7 em Conceição do Mato Dentro correspondem ao único caso encontrado de simpatria. Como a diferença entre as épocas de floração dos dois morfotipos é de cerca de um mês, é possível que haja fluxo gênico entre eles, o que poderia explicar a posição de *H.* aff. *repens*4 de Conceição do Mato Dentro em uma politomia no clado A ao invés de agrupada aos outros terminais do morfotipo 4.

No clado B, *H. aranifera* claramente se sustenta como uma espécie separada dos demais terminais por todos os marcadores e pode ser reconhecida morfologicamente pela presença de tuberoide. Os outros terminais do clado B serão mantidos como *H. repens sensu stricto*. Dessa forma, *H. repens* e *H. aranifera* tratam de um par progenitor-derivativo, o que tornou *H. repens* uma espécie parafilética.

Nas duas revisões que fez do gênero, Kränzlin (1892, 1901) incluiu *H. repens* na seção *Clypeatae*, tipificada por *H. clypeata*. Entretanto, os resultados de Batista *et al*. (2013) posicionaram *H. clypeata* e *H. repens* em clados distintos, indicando que não pertencem a mesma seção. Nos resultados obtidos o clado B, junto com *H. warmingii*, é irmão do clado C, que inclui *H. pentadactyla*, o tipo da seção *Pentadactylae*. Em termos de classificação seccional do complexo *H. repens*, uma alternativa possível é a inclusão do clado B-*H.warmingii* na seção *Pentadactylae*. Embora esta alternativa seja a mais simples, as espécies do clado C apresentam características morfológicas similares entre si e distintas dos morfotipos e espécies do complexo *H. repens*, e são necessários estudos morfológicos comparativos mais detalhados a fim de verificar se existem caracteres morfológicos comuns que sustentem esta alternativa. O clado D, formado por *H. macronectar*, *H. johannensis*, e outras foi atribuído por vários autores a seção *Macroceratitae* (Cogniaux, 1893; Kränzlin, 1901, Batista *et al*., 2006), mas os resultados de Batista *et al*. (2013) mostram que *H. macroceratitis* é distantemente relacionada. No entanto, o clado D, compreende um grupo morfologicamente uniforme e distinto dos demais subgrupos de espécies Neotropicais. *Habenaria macilenta* e *H. regnellii*, embora associados ao clado D, correspondem a espécies morfologicamente distintas e isoladas, de posicionamento seccional indefinido. Quanto ao clado A, é certo que também não pertence à seção *Clypeatae*, mas o seu posicionamento seccional exato é incerto. Para isto será necessário resolver a relação deste clado com os clados B, C e D, que não puderam ser esclarecidas neste trabalho. Os resultados atuais indicam uma posição isolada deste clado, que poderia ser reconhecido como uma seção, mas um problema neste sentido será a circunscrição morfológica do grupo, uma vez que há uma sobreposição grande de caracteres morfológicos deste clado com o clado B.

A convergência em função de polinizadores compartilhados é comum na família Orchidaceae, como demonstrado por diversos autores (e.g., Borba *et al.*, 2001, 2002; Chase *et al*., 2009; Sramkó *et al*., 2011). Pedron *et al*. (2012) mostraram que a mesma espécie de esfingídio poliniza duas espécies de *Habenaria* pertencentes a diferentes seções, enquanto polinizadores distintos são encontrados dentro de uma mesma seção. Possivelmente devido a um elevado grau de convergência, ou a uma caracterização morfológica deficiente dos táxons, todas as seções baseadas em caracteres morfológicos propostas para o gênero até o momento mostraram-se parafiléticas ou polifiléticas na análise filogenética molecular apresentada por Batista *et al.* (2013). Essa informação evidencia o quanto classificações baseadas apenas em morfologia podem ser equivocadas para *Habenaria*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ames O. 1910. *Orchidaceae: Illustrations and studies of the family Orchidaceae*, Vol. 4: The genus *Habenaria* in North America. Stanfordville: Earl M. Coleman (reimpresso em 1979).

Baldwin BG, Markos S. 1998. Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 449–463.

Batista JAN, Bianchetti LB, González-Tamayo R, Figueroa XMC, Cribb PJ. 2011a. A synopsis of New World *Habenaria* (Orchidaceae) I. *Harvard Papers in Botany* 16: 1-47.

Batista JAN, Bianchetti LB, González-Tamayo R, Figueroa XMC, Cribb PJ. 2011b. A synopsis of New World *Habenaria* (Orchidaceae) II. *Harvard Papers in Botany* 16: 233-273.

Batista JAN, Borges KS, de Faria MWF, Proite K, Ramalho AJ, Salazar GA, van den Berg C. 2013. Molecular phylogenetics of the species-rich genus *Habenaria* (Orchidaceae) in the New World based on nuclear and plastid DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67: 95-109.

Borba EL, Felix JM, Solferini VN, Semir J. 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* 88: 419-428.

Borba EL, Shepherd GJ, van den Berg C, Semir J. 2002. Floral and vegetative morphometrics of five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. *Annals of Botany* 90: 219-230.

Chase MW, Williams NH, De Faria AD, Neubig KM, Amaral MDCE, Whitten WM. 2009. Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. *Annals of Botany*104: 387–402.

Cogniaux A. 1893. Habenaria. In: Martius CFP, Eichler AG, Urban I, eds. *Orchidaceae. Fl. Bras*. München: F. Fleischer, *3* 18–102. tabs. 3–18.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModeltest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.

Doyle JF, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.

Dressler RL. 1981. *The Orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.

Dunsterville GCK, Garay LA. 1966. *Venezuelan Orchids Illustrated 4*. London: Andre Deutsche.

Edgar RC. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 113. doi:10.1186/1471-2105-5-113.

Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.

Hoehne FC. 1940. Orchidaceas, *Habenaria*. In: F.C. Hoehne (ed.), *Flora Brasílica* 12: 52-254, tab. 11-122. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo.

Hu J, Lavin M, Wojciechowski MF, Sanderson MJ. 2000. Phylogenetic systematics of the tribe Millettieae (Leguminosae) based on chloroplast *trnK/matK* sequences and its implications for evolutionary patterns in Papilionoideae. *American Journal of Botany* 87: 418-430.

Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310–2314.

Kluge AG. 1989. A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among *Epicrates* (Boidae, Serpentes). *Systematic Zoology* 38: 7–25.

Kränzlin F. 1892. Beiträge zu einer Monographie der Gattung *Habenaria* Willd. *Botanische Jahrbucher für Systematik,Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 16: 52–223.

Kränzlin F. 1901. Orchidacearum genera et species. Vol. I. *Habenaria*. Berlin: Mayer and Müller.

Molvray M, Kores PJ, Chase MW. 2000. Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influences on floral and molecular characters. In: Wilson KL, Morrison DA, editors. *Monocots: Systematics and Evolution.* Collingwood: CSIRO publishing. pp. 441-448.

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

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

Nuttal T. 1818. *The genera of North American plants, and a catalogue of the species, to the year 1817*. Philadelphia: Printed for the author by D. Heartt.

Pabst GFJ, Dungs F. 1975. *Orchidaceae brasilienses* i. Hildesheim: Brücke-Verlag Kurt Schmersow.

Pedron M, Buzatto CR, Singer RB, Batista JAN, Moser A. 2012. Pollination biology of four sympatric species of *Habenaria* (Orchidaceae: Orchidinae) from southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 170: 141–156.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.

Salazar GA, Cabrera LI, Figueroa C. 2011. Molecular phylogenetics, floral convergence and systematics of *Dichromanthus* and *Stenorrhynchos* (Orchidaceae, Spiranthinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 167: 1-18.

Sanger F, Coulson AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94: 441–448.

Schwarz G. 1978. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* 6: 461–464.

Singer RB. 2001. Pollination biology of *Habenaria parviflora* (Orchidaceae: Habenariinae) in southeastern Brazil. *Darwiniana* 39: 201–207.

Simmons MP, Ochoterena H. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* 49: 369–381.

Sramkó G, Gulyás G, V. AM. 2011. Convergent evolution in *Ophrys kotschyi* (Orchidaceae) revisited: a study using nrITS and cpIGS sequences. *Annales Botanici Fennici* 48: 97–106.

Sun Y, Skinner DZ, Liang GH, Hulbert SH. 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 26–32.

Staden R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology* 5: 233–241.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.

CAPÍTULO 2

Variabilidade morfológica e genética no complexo *Habenaria repens* Nutt. (Orchidaceae) no Brasil.

INTRODUÇÃO

A existência de complexos de espécies é algo comum em plantas e muito frequente na família Orchidaceae, muitas vezes ocasionada por eventos de hibridação natural (e.g., Stahlberg 2009; Pinheiro *et al*., 2010). Tais eventos foram relatados várias vezes para a família, mesmo entre espécies de diferentes gêneros. O cruzamento estre espécies distintas, seguido de introgressão pode levar à formação de indivíduos com características morfológicas intermediárias, o que dificulta o trabalho dos taxonomistas, principalmente por frequentemente acarretar em obscurecimento das descontinuidades morfológicas entre os táxons. No entanto, outros fatores também podem levar à formação de complexos de espécies. Dentre eles, destacam-se a plasticidade fenotípica, em resposta a variáveis ambientais (Schlichting & Levin 1986), especialmente de caracteres vegetativos, e a convergência em resposta a pressões seletivas. Em Orchidaceae, este último caso é frequente, principalmente devido à eventual ocorrência de compartilhamento de polinizadores por espécies de linhagens já divergentes, devido à elevada especificidade do ajustamento morfológico entre flor e polinizador na família (Melo & Borba 2011; Salazar *et al*., 2011).

Um dos inúmeros complexos existentes na família Orchidaceae é formado por *Habenaria repens* Nutt. e espécies relacionadas. *Habenaria repens* é uma espécie de hábito tipicamente aquático a subaquático crescendo dentro d'água nas margens de lagoas e rios, característica incomum nas espécies Neotropicais do gênero. O holótipo de *H. repens* é proveniente do estado da Geórgia (Estados Unidos da América), mas a distribuição estende-se do sul deste país (desde a Carolina do Norte) até o sul da América do Sul (norte da Argentina e Uruguai). A espécie é exclusivamente Neotropical e ocorre em todas as regiões do Brasil. Caracteristicamente, as suas plantas apresentam sistema radicular bem desenvolvido, com raízes numerosas e longas sem tuberoides, caule reptante folhoso, folhas bem desenvolvidas, inflorescência multiflora, e flores verdes de tamanho pequeno, quando comparada a outras espécies do gênero (Ames, 1910). Como toda espécie de *Habenaria*, só é visível durante sua época de floração, emitindo orgãos epígeos uma única vez ao ano.

Várias espécies de *Habenaria* apresentam uma morfologia floral similar a *H. repens*, sendo a separação entre elas difícil e controversa. Diversos nomes, como *H. radicans* Griseb., *H. palustris* Acuña, *H. tricuspis* A.Rich., *H. pseudorepens* Schltr., e *H. nuttallii* Small, foram e ainda são consensualmente aceitos como sinônimos de *H. repens* (Kraenzlin, 1892, 1901; Cogniaux, 1893; Ames, 1910; Hoehne, 1940; Dunsterville & Garay, 1966; Pabst & Dungs,

1975; Batista *et al*., 2011a, b). Além destas, várias outras espécies apresentam morfologia muito similar e difilcmente distinguível de *H. repens*. Ainda não existe um consenso quanto a relação destas espécies entre si e com *H. repens*, e o status taxonômico de cada uma têm variado de acordo com o tempo e o autor. Algumas como *H. rupicola* sempre foram aceitas como distintas, apesar de bastante semelhantes a *H. repens*, enquanto diversas outras foram em um momento ou outro sinonimizadas sob *H. repens* (Hoehne, 1940; Dunsterville & Garay, 1966; Pabst & Dungs, 1975). Este fato indica que as sinonimizações propostas podem ter sido feitas mais em comparações superficiais e poucas amostras do que em um estudo detalhado.

De fato até o momento não foi realizado nenhum tratamento ou trabalho taxonômico especifico com este grupo de espécies. Um problema neste sentido é que a maioria destas espécies é conhecida apenas do material tipo ou de poucas coletas e encontram-se mal caracterizadas, o que dificulta uma comparação morfológica detalhada entre elas e *H. repens*. Na sinopse para as espécies Neotropicais do gênero, Batista *et al*. (2011a, 2011b) apontaram a existência deste complexo de espécies, reconhecendo os seguintes táxons como morfologicamente muito similares e relacionados a *H. repens*: *H. achnantha* Rchb.f., *H. achnantha* var. *gracilior* Cogn., *H. amambayensis* Schltr., *H. aranifera* Lindl., *H. brownelliana* Catling, *H. modestissima* Rchb.f., *H. novaesii* Edwall & Hoehne, *H. polygonoides* Schltr., *H. polyrhiza* Schltr., *H. repens* var. *maxillaris* (Lindl.) Garay, *H. rupicola* Barb.Rodr., *H. sampaioana* Schltr., *H. taubertiana* Cogn., *H. uliginosa* Rchb.f., enquanto *H. nuttallii* Small, *H. palustris* Acuña, *H. paucifolia* var. *estolonifera* M.N.Correa, *H. pseudorepens* Schltr., *H. radicans* Griseb., *H. repens* var. *gracilis* Luederw. & Hoehne, e *H. sceptrodes* Rchb.f. foram tratadas como sinônimos. Apesar de não indicado, *H. coxipoensis* Hoehne e *H. subviridis* Hoehne & Schltr. apresentam morfologia similar a *H. rupicola*, sendo também similares a *H. repens*.

Além dessas espécies, o exame de um grande número de amostras vivas e herborizadas revelou a existência de diversos morfotipos similares a *H. repens* (J.A.N. Batista, comunicação pessoal) que ainda não foram identificados a nível específico e podem representar novas espécies (Figuras 2.1-2.4). Fora o complexo identificado para o Brasil, em outras extensões de sua distribuição, como o México, *H. repens* também tem delimitação confusa que necessita revisão (G. A. Salazar, comunicação pessoal).

Dentre os caracteres que variam no complexo estão características ecológicas e morfológicas, tais como hábito (plantas aquáticas, subaquáticas, terrícolas e rupícolas), período

de floração e tamanho e disposição das folhas e flores (Figuras 2.1-2.3). Conforme observado em reconstruções filogenéticas do Capítulo 1, os morfotipos inicialmente classificados no complexo *H. repens* formam três linhagens não diretamente relacionadas. Considerando-se as similaridades na morfologia floral e vegetativa desses morfotipos, as melhores explicações para a sua observação seriam por convergência nesses caracteres ou por simplesiomorfia, sendo que os dois fatores podem estar presentes quando comparadas as diferentes linhagens. Casos de alta convergência morfológica devido a polinizadores comuns já foram reportados para a família tanto ao nível de espécie (Sramkó *et al*., 2011) quanto ao nível de gênero (Chase *et al*., 2009).

Poucos estudos de biologia reprodutiva foram feitos para *Habenaria* (e.g., Singer, 2001; Singer *et al*., 2007; Pedron *et al*., 2012) e todos apontam mariposas como principais polinizadores. Conforme Pedron *et al*., (2012) os mesmos polinizadores podem ser encontrados em espécies pertencentes a diferentes seções de *Habenaria*. Até o momento nenhum trabalho de biologia reprodutiva foi realizado para espécies do complexo. Devido à forma plana do perianto e da coluna, principalmente do labelo, ao cálcar curto e à presença de néctar, é possível que várias espécies de mariposas possam polinizá-las, havendo compartilhamento de espécies de polinizadores entre populações e espécies pertencentes ao complexo. *Habenaria parviflora* Lindl., espécie que também possui flor pouco tridimensional no que tange o perianto e o gimnostênio e oferece recursos, é polinizada por várias espécies de mariposas, além de duas espécies de Diptera (Singer, 2001). A baixa especificidade em relação ao polinizador pode ocasionar polinização interespecífica, possibilitando a formação de híbridos entre espécies simpátricas, a menos que barreiras fenológicas ou genéticas (pré ou pós-fertilização) existam. A presença de diversas espécies de polinizadores também explicaria a taxa de frutificação de aproximadamente 100% observada em populações naturais desse complexo. Além disso, uma morfologia floral que favorece a polinização por uma ampla guilda de espécies, levando a sistemas promíscuos de polinização, pode ter surgido várias vezes no gênero, resultando nas dificuldades taxonômicas observadas.

Neste trabalho, marcadores morfológicos e moleculares foram utilizados em abordagens multivariadas e bayesianas, a fim de investigar, através da determinação de como estão particionadas as variabilidades genética e morfológica no complexo: 1) como estão estruturadas geneticamente e morfologicamente os conjuntos de populações dos morfotipos; 2) se os padrões de variação morfológica e genética estão correlacionadas; 3) se os morfotipos previamente delimitados correspondem a padrões morfológicos e genéticos; e 4) a partir do

conjunto de dados obtidos determinar e caracterizar as entidades taxonômicas que formam o complexo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Foram amostrados indivíduos de 23 populações, totalizando 295 indivíduos (8 a 36 indivíduos por população), compreendendo *H. repens*, *H. aranifera* e os seis morfotipos supramencionados (Tabela 2.1, Figura 2.3). As populações amostradas apresentaram áreas de tamanhos muito diversos, variando entre, aproximadamente, 100 e 400 m^2. Levando-se em conta a distribuição dos indivíduos nas populações, a amostragem foi feita de forma a se amostrar um mínimo de 15 indivíduos (quando disponíveis) com maior distanciamento possível, a fim de se evitar a amostragem de clones vegetativos. *Habenaria achnantha* Rchb.f., *H. gracilis* Lindl., *H. modestissima* Rchb.f., *H. polygonoides* Schltr., *H. polyrhiza* Schltr., *H. sampoiana* Schltr., *H. taubertiana* Cogn. e *H. uliginosa* Rchb.f. são conhecidas apenas do material tipo ou de coletas antigas, e não puderam ser localizadas e coletadas. *Habenaria rupicola, H. coxipoensis* e *H. subviridis* não foram incluídas nas análises, pois uma análise filogenética molecular das espécies Neotropicais mostrou que, apesar da morfologia similar, elas não são diretamente relacionadas a *H. repens* e pertencem a outros grupos do gênero (Batista *et al*., 2013). *Habenaria brownelliana* Catling apresenta distribuição restrita ao México e Guatemala, enquanto *H. amambayensis* Schltr. ocorre principalmente no norte do Brasil e escudo das Guianas, e não foi possível obter material destas espécies. Devido à indisponibilidade de flores em duas populações de *H. repens* de Viçosa-MG e na população de *H.* aff. *repens*3 de Grão Mogol-MG, elas não foram incluídas nas análises morfométricas. Duas populações de *H. aranifera* (A-BJ e A-CS) foram excluídas das análises de variabilidade genética, uma vez que suas distâncias para alguma dentre as outras três populações são muito reduzidas (de 8 a 45 km), e a similaridade morfológica entre elas elevada.

O hábito das populações coletadas varia de plantas aquáticas, que crescem em áreas permanentemente úmidas, como margens de lagos e rios (*H. repens*, *H.* aff. *repens*2e *H.* aff. *repens*5) e subaquáticas, plantas que crescem em ambientes estacionalmente úmidos (*H.* aff. *repens*3 e *H.* aff. *repens*4) a terrícolas, que crescem em ambientes secos (*H.* aff. *repens*7). *Habenaria* aff. *repens*6 diferencia-se das demais por ser rupícola em paredões próximos a

quedas d'água. Além disso, alguns morfotipos florescem no período chuvoso, enquanto a maioria deles floresce no período seco, sendo a última uma característica pouco comum para o gênero. A variação morfológica no complexo está principalmente relacionada ao tamanho e disposição das folhas e flores, havendo poucas diferenças na forma das estruturas florais. O morfotipo com menor porte é *H.* aff. *repens*6 (cerca de 10 cm da base da planta à primeira bráctea floral), assim como o menor número de flores por inflorescência (máximo de três) e folhas basais. Quando comparadas à essa *H. aranifera*, *H.* aff.*repens*2, *H.* aff. *repens*4 e *H.* aff. *repens*7, com exceções em algumas populações, possuem maior porte, de cerca de 20 cm, e folhas distribuídas ao longo do caule, exceto *H.* aff. *repens*7, que possui folhas basais. *Habenaria repens* (forma típica), *H.* aff. *repens*3 e *H.* aff. *repens*5, de maneira geral, possuem maior porte que as demais, chegando a ter média populacional de 51 cm em *H. repens*. Todos estes morfotipos possuem folhas distribuídas ao longo do caule, sendo que *H. repens* possui folhas maiores quando comparada a qualquer dos outros morfotipos acima descritos. Quanto às formas do perianto e dos caracteres de coluna, poucas diferenças podem ser encontradas. *Habenaria* aff. *repens*7 diferencia-se das demais devido a uma confluência de elementos do ginostêmio. A principal diferença está no tamanho da flor, que é menor em *H.* aff. *repens*4 e *H. repens*. No entanto, as características descritas acima possuem uma variação contínua dentro de uma mesma população, onde podem ser encontradas plantas com uma diferença de tamanho da ordem de quatro vezes, o que dificulta uma caracterização mais precisa dos morfotipos.

Análises Morfométricas

Ao todo, 20 caracteres morfológicos foram medidos, dentre eles 17 florais e três vegetativos (Tabela 2.2). Para os caracteres de perianto, as flores foram dissecadas e suas partes digitalizadas. Em seguida, elas foram medidas utilizando-se o programa AxioVision 4.8.2 © (Carl Zeiss Inc.). As demais medidas foram feitas diretamente na planta com um paquímetro ou uma fita métrica. Como muitas coletas foram feitas por colaboração com outros pesquisadores e outras foram feitas antes da definição dos caracteres a serem trabalhados, em alguns casos não foi possível fazer a correspondência entre os caracteres vegetativos e florais nos mesmos indivíduos. A fim de evitar a perda de informações, foram construídas duas matrizes, uma delas possuindo os indivíduos com medidas para todas as variáveis, e a outra matriz apenas com medidas de caracteres florais (Tabelas 2.1 e 2.2). Dados faltantes foram substituídos pela média populacional, quando não em número superior a quatro por indivíduo. Acima desse número, os indivíduos foram excluídos da matriz.

As análises multivariadas foram realizadas utilizando o programa Statistica 6.0 (StatSoft 2001). Uma Análise de Componentes Principais (PCA) exploratória foi feita para a detecção de *outliers* e caracteres altamente correlacionados. Variáveis com índice de correlação acima de 0,85 foram eliminadas mantendo apenas uma delas na matriz. Em seguida, foi feita uma Análise de Variáveis Canônicas (CVA) utilizando-se a classificação *a priori* das populações como variável de grupo. A matriz de Distâncias Quadradas de Mahalanobis entre os centroides das populações foi utilizada para uma análise de agrupamento no programa MEGA 5.0 (Tamura *et al*., 2011) utilizando o algoritmo de *Neighbor-joining.*

Variabilidade genética

Amostras de folhas frescas ou secas em sílica foram extraídas de acordo com o protocolo de Doyle & Doyle (1987) com algumas modificações, como lavagem do *pellet* com etanol 70%. Cinco pares de primers que flanqueiam regiões de microssatélites foram empregados. Três destes pares de primers (HR09/HR10, HR13/HR14 e HR17/HR18) foram desenvolvidos para *H. repens* (Apêndice 1), e duas outras regiões foram amplificadas com iniciadores desenhados para *H. nuda* (SSRNH2 e SSRHN5) e transferidos para o complexo (Vale *et al*., dados não publicados). Os tamanhos e motivos das regiões de microssatélites, assim como as sequências dos primers são apresentados na Tabela 2.4.

As regiões de microssatélites foram amplificadas em termociclador Biocycler MJ96G ou MJ96+, com o seguinte ciclo: denaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de 30 segundos de denaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento em temperatura de acordo com a região (Tabela 2.3) e 45 segundos de extensão a 72°C, seguidos por 13 ciclos de 30 segundos de denaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 50°C, extensão por 45 segundos a 72°C e uma extensão final a 72°C por 60 minutos. Para cada região, o primer *forward* foi construído com uma cauda M13 (Schuelke, 2000), e durante as reações um primer marcado complementar a cauda M13 foi utilizado. Dois fluoróforos, HEX e FAM foram usados para diferentes regiões, a fim de possibilitar a montagem de multiplex para a análise de fragmentos. As reações foram montadas nas seguintes concentrações para um volume total de 30 µL: Tampão IB 1X (PhoneutriaBiotech, Belo Horizonte, Brasil), 0,2 mM de dNTPs, 0,04 µM do primer *forward*, 0,16 µM do primer reverso, 0,16 µM do fluoróforo, 0,1 unidade de Taq DNA Polimerase (PhoneutriaBiotech, Belo Horizonte, Brasil) e 5–15 ng de DNA. Os produtos de amplificação foram verificados em gel de agarose 1% e, aqueles que geraram bandas no gel, foram secos e

enviados a Macrogen Inc. para eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3730XL (AppliedBiosystems), tendo 500LIZ ou 400HD como padrões de tamanho.

Os resultados das análises dos tamanhos dos fragmentos foram visualizados no programa Peak Scanner (AppliedBiosystems) e uma matriz 10x295 foi construída. Indivíduos que falharam na amplificação de mais de dois *loci* foram excluídos. Os alelos foram nomeados utilizando o macro FlexiBinv2 (Amos *et al*., 2006) implementado em Excel. A presença de genótipos multiloci idênticos foi verificada com o macro MsTools (Park, 2001) em Excel. Os dados foram verificados quanto à presença de *stuttering* e dominância do menor alelo utilizando o programa Microchecker 2.2.3 (van Oosterhout *et al*., 2004).

As análises de estrutura genética foram realizadas sob uma abordagem estatística bayesiana implementada no programa Structure 2.3.3 (Pritchard *et al*., 2000). Foram feitas vinte iterações para cada número de agrupamentos presumidos (K), que variou de um a 19. Em cada repetição correram 1.000.000 de gerações de Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com um *burn-in* inicial de 100.000 gerações. O modelo escolhido considerou presença de mistura genética e a frequência dos alelos como correlacionadas entre populações. Em seguida, o número de agrupamentos genéticos foi calculado de acordo com a estatística ΔK de Evanno, Regnaut & Goudet *et al*. (2005), implementado no programa Harvester (Earl & vonHoldt, 2012).

As medidas de variabilidade genética (valores de heterozigosidade, números de alelos, e índice de fixação), de distância genética de Nei e F_{st}, teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg e análise de variância molecular (AMOVA) foram calculadas no programa GenALEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2006, 2012). Para a AMOVA foram considerados como grupos aqueles identificados na análise bayesiana de estruturação genética realizada no programa Structure. Como os indivíduos da população R_EU foram assinalados a muitos grupos genéticos, esta população foi considerada um grupo distinto. A riqueza alélica foi computada pelo software FStat 2.2.9.2 (Goudet, 1995).

A frequência de alelos nulos foi calculada pelo algoritmo de Expectation Maximization de Dempster, Laird & Rubin (1977) no programa FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007). A partir dessas frequências foi construída uma matriz de distância de Cavalli-Sforza& Edwards (D_c) (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) utilizando o método *INA* de Chapuis & Stoup (2007). A mesma serviu de base para uma análise de coordenadas principais (PCO) no GenALEx e uma

análise de agrupamento pelo algoritmo de *Neighbor-joining* utlizando Mega 5.0. O suporte bootstrap para o dendrograma foi obtido pelos programas Consense e Neighbor do pacote Phylip (Felsenstein, 2005). Para tal, 999 matrizes de D_c foram construídas pelo software MSA (Dieringer & Schlotterer, 2003). A existência de correlação entre as matrizes de distância morfológica (distância de Mahalanobis), genética (D_c) e geográfica (dados brutos e ln(1+x)) foi avaliada através do teste de Mantel implementado no programa GenALEx.

RESULTADOS

Análises Morfométricas

Para a matriz com os dados completos, a análise exploratória PCA não acusou a presença de nenhum *outlier* na matriz, mas quatro variáveis foram eliminadas devido à alta correlação (acima de 0,85): largura da sépala dorsal, comprimento da sépala lateral, comprimento do segmento anterior da pétala e comprimento do segmento posterior da pétala. Assim sendo, as análises foram realizadas com uma matriz de 16 caracteres (caracteres reprodutivos e vegetativos). Na análise de discriminantes, as diferenças entre todas as populações foram significativas ($p<0,01$). Apenas dois indivíduos (1,89%) apresentaram distância ao centroide de outra população menor do que à sua própria, sendo um indivíduo da população *H.* aff. *repens*7 de Conceição do Mato Dentro (7_CM) classificado em uma das populações de *H.* aff. *repens*5 de Delfim Moreira (5_DM2) e um indivíduo de uma população de *H.* aff. *repens*5 de Delfim Moreira (5_DM1) classificado na outra população da mesma localidade (5_DM2).

Na CVA com a matriz de caracteres reprodutivos e vegetativos, cinco eixos apresentaram autovalor superior a 1,0, e foram considerados significativos (autovalor menor que 1,0; Guttman, 1954), representando 93,47% da variância, sendo que o primeiro eixo representa 36,08%. No primeiro eixo canônico da CVA, é possível separar as populações de *H. repens, H. aranifera* e *H.* aff. *repens*2 de *H.* aff. *repens*7 e de *H.* aff. *repens*3 (Figura 2.5). Essa separação é devida principalmente aos comprimentos dos segmentos central e lateral do labelo, largura do segmento posterior da pétala e à distância da base da planta à primeira bráctea floral. No segundo eixo, em função das larguras da sépala lateral e do segmento posterior da pétala, dos comprimentos dos segmentos central e lateral do labelo, e do cálcar e da distância entre os

viscídios, separam-se *H. aranifera* e *H.* aff. *repens*2 de *H. repens* e *H.* aff. *repens*3. As duas populações de *H.* aff. *repens*5 possuem posição intermediária nos dois eixos (Figura 2.5A)

No terceiro eixo canônico, é possível separar *H.* aff. *repens*5 e *H.* aff. *repens*7 de *H. aranifera*, *H.* aff. *repens*2, *H.* aff. *repens*3 e das populações de *H. repens* da Paraíba (R_PB) e dos Estados Unidos (R_EU). Os caracteres que mais explicam essa separação são as larguras do segmento posterior da pétala e da folha, os comprimentos do segmento central do labelo e do cálcar e a distância entre os viscídios. No quarto eixo, as populações de *H.* aff. *repens*7 e *H. repens* do estado da Paraíba (R_PB) separam-se de *H. aranifera*, *H.* aff. *repens*5, *H.* aff. *repens*3 e *H. repens* de Curitiba (R_CR). Esse padrão se deve, principalmente, às larguras da sépala lateral e a dois terços do comprimento do cálcar, aos comprimentos dos segmentos central e lateral do labelo, do cálcar e da folha (Figura 2.5B).

Na análise de *Neighbor-joining*, todas as populações de *H. repens* se agruparam, sendo que as populações de Anguera (R_AG) e Curitiba (R_CR) são as mais próximas, seguidas por Paraíba (R_PB) e Estados Unidos (R_EU). *H. aranifera* agrupou-se com *H.* aff. *repens*2 e a esses dois grupos uniu-se *H.* aff. *repens*3. Em outro grupo *H.* aff. *repens*7 agrupou-se com uma população de *H.* aff. *repens*5 de Delfim Moreira (5_DM1). A esse último grupo se uniu a outra população de *H.* aff. *repens*5 (5_DM2) (Figura 2.6A).

Na matriz dos indivíduos com dados apenas florais, a PCA não acusou nenhuma *outlier*, e uma variável foi eliminada devido à alta correlação (acima de 0,85): comprimento do segmento posterior da pétala. Desta forma, as análises seguintes foram realizadas com uma matriz de 16 caracteres. Na análise discriminante, as distâncias entre os centroides das populações de *H.* aff. *repens*4 de Diamantina (4_DI), Milho Verde (4_MV) e Conceição do Mato Dentro (4_CM) não foram significativas ($p>0,01$), sendo que 4_DI também não se separa de uma das populações de *H.* aff. *repens*5 (5_DM2). Da mesma forma, *H. aranifera* de São Francisco de Paula (A_SF) não se diferencia significativamente das populações da mesma espécie de Cambará do Sul (A_CS) e de Bom Jardim da Serra (A_BJ), mas estas se diferenciam entre si. 14,23% dos indivíduos apresentaram distância ao centroide de outra população menor do que à sua própria, sendo que a maior parte destes casos concentrou-se dentro dos morfotipos, mesmo quando os centroides das populações mostraram-se significativamente distantes entre si, como no morfotipo *H.* aff. *repens*7.

Na CVA, quatro eixos apresentaram autovalor superior a 1,0, e foram considerados. Estes quatro eixos representam 75,97% da variância total, sendo que o primeiro eixo representa 33,47%. No primeiro eixo canônico da CVA é possível discriminar as populações de *H. repens* de *H. aranifera*, *H.* aff. *repens*5, *H.* aff. *repens*7 e *H.* aff. *repens*3. *Habenaria* aff. *repens*5 e *H.* aff. *repens*7 também são totalmente discriminadas (Figura 2.7A). Essa separação é devida principalmente ao comprimento do segmento lateral do labelo e do cálcar e à largura a 2/3 do comprimento cálcar. No segundo eixo, em função do comprimento do cálcar e da distância entre os viscídios, *H.* aff. *repens*3 se separa de todas as outras populações.

No terceiro eixo canônico, *H. repens* da Paraíba (R_PB) separa-se das populações de *H. repens* de Curitiba e de Anguera (R_CR e R_AG). Os caracteres que mais explicam essa separação são os comprimentos do segmento lateral do labelo e da sépala lateral. No quarto eixo, *H.* aff. *repens*5, separa-se de *H. repens* da Paraíba. Esse padrão se deve, principalmente, às larguras da sépala lateral e do segmento posterior da pétala (Figura 2.7B).

Na análise de *Neighbor-joining*, todas as populações brasileiras de *H. repens* se agruparam (R_AG, R_PB e R_CR). A estas se agrupou *H.* aff. *repens*2, outro grupo formado por duas populações de *H.* aff. *repens*4 (4_DI e 4_MV), pela população norte-americana e pela outra população de *H.* aff. *repens*4 (4_CM). Outro grande grupo é formado por *H. aranifera* junto a *H.* aff.*repens*7, *H.* aff.*repens*3 e *H.* aff.*repens*6, mais um pequeno agrupamento formado pelas populações de *H.* aff.*repens*5 (Figura 2.6B).

Variabilidade genética

Ao todo foram encontrados 58 alelos para os cinco *loci* genotipados (Tabela 2.4). A única população do morfo 6 incluída falhou na amplificação de todos os loci, não sendo incluída nas análises. Todos os loci apresentaram alelos nulos para ao menos uma população, sendo que o *locus* SSRHN5 foi o que apresentou maior proporção de alelos nulos (0,15) (Tabela 2.4). Oito ocorrências de possível *stuttering* foram encontradas, mas nenhuma de dominância do menor alelo.

Vários indivíduos com genótipos multiloci idênticos foram encontrados, mesmo entre populações distantes mais de 1.000 Km, como Morro do Chapéu, no estado da Bahia, e Viçosa, em Minas Gerais. A riqueza alélica variou entre as populações, em uma proporção de 60,57 a 98,44% em relação à contagem de alelos N (Tabela 2.5). Uma elevada heterogeneidade foi encontrada entre os resultados dos cinco *loci*. A heterozigosidade média observada por

população oscilou em função da esperada (Tabelas 2.4, 2.5), sendo menor em alguns casos, e maior na maioria deles (os dados detalhados podem ser encontrados no Apêndice 2). O *locus* HR09/HR10 foi o único a apresentar heterozigosidade observada média menor que a esperada. As grandes diferenças entre os dois parâmetros de heterozigosidade para os diferentes *loci* de uma mesma população (Apêndice 2) dificulta a análise do índice de fixação. Devido a uma heterogeneidade do comportamento das frequências genotípicas entre marcadores em uma mesma população, fazendo com que o índice de fixação (F_{is}) variasse de -1 a 1 na mesma população, as médias do índice de fixação por população não foram discutidas e os valores por *locus* encontram-se disponíveis no Apêndice 2 (e.g., variou de -1 para o *locus* HR17/HR18 a 1 nos *loci* HR09/HR10 e SSRHN12 na população 3_GM). Apenas as populações de *H.* aff. *repens*5 (5_DM1 e 5_DM2), *H. repens* de Curitiba (R_CR), Viçosa (R_VÇ1) e Paraíba (R_PB), e *H.* aff. *repens*2 (2_MC), apresentaram o mesmo comportamento para todos os *loci*, sendo consistentemente negativo (excesso de heterozigotos), mas nenhuma delas é polimórfica para mais de três *loci*. Das 100 combinações possíveis entre *loci* e populações, 34 são monomórficas. Das demais, 42 (63,6%) tem F_{is} negativo e 24 (36,4%) tem F_{is} positivo (deficiência de heterozigotos). Treze populações apresentaram alelos exclusivos, sendo que *H. repens* de Anguera (R_AG) possui o maior número, seis (Tabela 2.5).

Em 34 das 100 combinações *loci* e populações um alelo está fixado, e em duas foi observado um genótipo heterozigoto fixado. Em 37 ocorrências, as populações se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). As populações *H.* aff. *repens*7 de Conceição do Mato Dentro (7_CM), *H.* aff. *repens*5 de Delfim Moreira (5_DM1), *H. repens* de Curitiba (R_CR), Viçosa (R_VÇ1 e R_VÇ2), Paraíba (R_PB) e Estados Unidos (R_EU) estão em equilíbrio para todos os *loci* (Tabela 2.6). No entanto, a ocorrência de *locus* monomórficos foi frequente e, com isso, algumas populações, como R_CR, apesar de estarem em equilíbrio, tem apenas um *locus* polimórfico (Tabela 2.3).

As populações estão estruturadas geneticamente em cinco grupos (K=5) (Figura 2.8A). O primeiro grupo é formado pelos morfotipos *H.* aff. *repens*4 e *H.* aff. *repens*3, outro pelo morfotipo *H.* aff.*repens*7, o terceiro pelas três populações de *H. aranifera*, o quarto por. *H. repens* dos estados da Paraíba (R_PB), Bahia (R_AG) e Paraná (R_CR), e o último pelos morfotipos *H.* aff. *repens*5, *H.* aff. *repens*2 e *H. repens* de Minas Gerais (R_VÇ1 e R_VÇ2). A população da localidade tipo (R_EU) apresentou uma mistura gênica, com indivíduos assinalados a diversos grupos e não foi possível posicioná-la em nenhum deles (Figura 2.8C).

A análise de agrupamento utilizando a matriz de distância de Cavalli-Sforza separa as populações em dois grandes grupos. O primeiro é formado pelos morfotipos *H.* aff. *repens*7, *H.* aff. *repens*4 e *H.* aff. *repens*3. O outro é formado pelas populações classificadas previamente como similares às plantas da localidade do tipo de *H. repens* (R_EU), mais *H.* aff. *repens*5 e *H.* aff. *repens*2. A população da localidade tipo propriamente dita situa-se similarmente distante dos dois grupos (Figura 2.9). Dentro de cada um desses grupos, as subdivisões coincidem com os cinco agrupamentos obtidos na análise de estruturação genética.

Na análise de coordenadas principais, o primeiro eixo separa quase totalmente os dois grandes grupos descritos acima. No segundo eixo esses grupos são subdivididos de maneira muito similar à que acontece no *Neighbor-joining*. *Habenaria* aff. *repens*7 separa-se de *H.* aff. *repens*3 mais *H.* aff. *repens*4. O grupo formado por três populações de *H. repens* (R_EU, R_VÇ1 e R_VÇ2), *H.* aff. *repens*2 (2_MC) e *H.* aff. *repens*5 (5_DM1 e 5_DM2) distancia-se das outras três populações de *H. repens* (R_AG, R_PB e R_CR) e das populações de *H. aranifera* (A_SF, A_SJ e A_UR). Os únicos grupos formados nos dois primeiros eixos da análise de agrupamento que não podem ser visualizados na PCO são os formados pelas populações denominadas *H. repens* do Brasil (R_AG, R_PB e R_CR) e *H. aranifera*, pois a população *H. repens* de Curitiba (R_CR) agrupa-se a esta última (Figura 2.10).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) indicou uma alta estruturação genética entre o conjunto de populações (F_{st}=0,596). A maior parte da variância se encontra entre os grupos (48%), 11% se encontram entre as populações e 41% dentro das populações.

No teste de Mantel, os índices de correlação foram baixos em todas as combinações de variáveis. Em alguns casos, no entanto, o p-valor foi significativo, o que pode ser atribuído à amplitude da distribuição geográfica e ao grande número de populações utilizadas na análise, uma vez que não foram considerados os morfotipos separadamente (Apêndice 2). Sendo assim, pode-se considerar que não há correlação positiva entre nenhuma das variáveis.

Tabela 2.1. Dados referentes às populações utilizadas no trabalho. Nomes dos morfotipos e espécies pertencentes ao complexo, local da coleta, códigos dados às populações, coordenadas geográficas, vouchers e número de indivíduos amostrados por população para as análises morfométricas e genéticas. Os materiais testemunhos foram depositados no herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB), exceto quando indicado.

Espécie (morfo) Localidade	Código	Coordenadas Geográficas	Voucher	N (morfom)*	N (genética)
H. aranifera					
Bom Jardim da Serra-SC	A_BJ	28°31'48"S;49°40'17"O	A. C. Fernandes s.n. (BHCB162189)	0/15	-
Cambará do Sul-RS	A_CS	28°52'49"S;50°1'37"O	A. C. Fernandes s.n. (BHCB162187)	0/17	-
São Francisco de Paula-RS	A_SF	29°23'23"S;50°23'56"O	A. C. Fernandes s.n. (BHCB162190)	0/12	15
São José dos Ausentes-RS	A_SJ	28°33'56"S;49°44'48"O	A. C. Fernandes s.n. (BHCB162188)	0/15	15
Urubici-SC	A_UR	28°6'48"S;49°29'56"O	N. F. O. Mota 2517	17/17	15
H. repens					
Anguera-MG	R_AG	12°11'44"S;39°9'55"O	B. L. Lau et al. 87	12/12	20
Curitiba-PR	R_CR	25°31'49"S;49°12'27"O	A. Massensini Júnior 76	9/9	10
Estados Unidos da América	R_EU	26°31'28"N;80°3'37"O	D. G. Braun 01 (FLAS)	5/5	6
Paraíba	R_PB	7°10'20"S;35°34'1"O		6/6	16
Viçosa-MG	R_VÇ1	20°45'16"S;42°52'56"O	J. A. N. Batista et. al. 3170	-	12
Viçosa-MG	R_VÇ2	20°45'16"S;42°52'56"O	B. L. Lau et al. 88	-	8
H. aff. *repens*2					
Morro do Chapéu-BA	2_MC	11°40'51"S;41°0'50"O	B. L. Lau et al. 86	12/12	15
H. aff. *repens*3					
Diamantina-MG	3_DI	18°16'33"S;43°42'45"O	B. L. Lau et al. 58	19/19	22
Grão Mogol-MG	3_GM	16°32'50"S;42°53'34"O	N. F. O. Mota 2285	-	10
H. aff. *repens*4					

Conceição do Mato Dentro-MG	4_CM	19°9'45"S;43°30'50"O	B. L. Lau et al. 39	0/11	14
Diamantina-MG	4_DI	18°17'49"S;43°48'13"O	B. L. Lau et al. 23	0/2	17
Milho Verde-MG	4_MV	18°27'46"S;43°28'54"O	B. L. Lau et al. 24	0/4	15
H. aff. *repens*5					
Delfim Moreira-MG	5_DM1	22°36'36"S;45°20'50"O	B. L. Lau et al. 40	8/13	14
Delfim Moreira-MG	5_DM2	22°35'18"S;45°20'2"O	B. L. Lau et al. 41	5/6	17
H. aff. *repens*6					
Conceição do Mato Dentro-MG	6_CM	19°5'22"S;43°33'5"O	R. C. Mota 1701	0/7	-
H. aff. *repens*7					
Caparaó-MG	7_CP	20°31'16"S;41°54'25"O	J. A. N. Batista et. al. 2538	0/6	25
Conceição do Mato Dentro-MG	7_CM	19°9'45"S;43°30'50"O	B. L. Lau et al. 53	13/15	16
Santa Bárbara-MG	7_SB	20°8'3"S;43°27'47"O	B. L. Lau et al. 52	0/15	13

*****Número de indivíduos utilizados para matriz completa (caracteres vegetativos e florais) / matriz com apenas caracteres florais

Tabela 2.2. Estatística descritiva para os 20 caracteres morfológicos medidos para as análises morfométricas de 20 populações pertencentes ao complexo *Habenaria repens*. Os valores apresentados são: média±desvio padrão (mínimo–máximo) por população. Os valores estão apresentados em milímetros, exceto quando especificado.

	Comprimento da sépala dorsal	Largura da sépala dorsal	Comprimento da sépala lateral	Laragura da sépala lateral	Comprimento do segmento anterior da pétala	Comprimento do segmento posterior da pétala	Largura do segmento posterior da pétala	Comprimento do segmento lateral do labelo
A_CS	5,1±0,5 (4,2-6,3)	4,4±0,5 (3,4-5,4)	6,6±0,4 (6,1-7,8)	3,0±0,3 (2,5-3,8)	7,7±0,9 (6,0-9,6)	5,3±0,4 (4,2-6,3)	1,6±0,2 (1,3-1,9)	6,9±0,8 (5,5-8,3)
A_SJ	4,5±0,4 (3,9-5,3)	3,6±0,5 (1,8-4,1)	5,8±0,5 (4,8-6,4)	2,4±0,2 (2,1-2,9)	6,6±0,8 (5,2-8,2)	4,6±0,3 (4,0-5,2)	1,4±0,2 (1,2-1,8)	5,9±0,7 (4,6-7,2)
A_BJ	4,7±0,5 (4,1-5,8)	4,0±0,4 (3,3-4,6)	5,8±0,7 (4,7-7,0)	2,7±0,2 (2,4-3,0)	7,3±1,0 (5,7-9,3)	4,7±0,4 (4,0-5,5)	1,6±0,2 (1,3-1,9)	6,7±1,0 (5,2-8,4)
A_SF	4,7±0,5 (4,2-5,6)	3,8±0,4 (3,1-4,3)	6,0±0,4 (5,3-6,7)	2,8±0,3 (2,3-3,4)	6,8±0,9 (4,9-8,1)	4,7±0,4 (4,1-5,4)	1,5±0,2 (1,0-1,7)	6,6±0,8 (5,5-7,9)
A_UR	5,0±0,4 (4,2-5,4)	3,5±0,4 (2,9-4,2)	6,4±0,4 (5,6-7,1)	2,5±0,3 (2,0-2,9)	7,0±0,5 (6,1-7,8)	5,1±0,3 (4,4-5,6)	1,6±0,2 (1,3-2,0)	6,5±0,4 (5,9-7,4)
R_AG	5,1±0,3 (4,4-5,4)	3,9±0,3 (3,2-4,3)	6,3±0,4 (5,4-6,9)	2,8±0,3 (2,4-3,3)	5,6±0,5 (4,7-6,6)	5,2±0,3 (4,8-5,8)	1,4±0,1 (1,2-1,7)	5,4±0,7 (4,6-6,5)
R_CR	4,7±0,4 (4,4-5,7)	3,5±0,3 (3,2-3,9)	5,6±0,6 (4,9-6,7)	2,6±0,3 (2,2-3,3)	5,0±0,6 (4,0-5,9)	4,5±0,6 (3,9-5,7)	1,2±0,2 (1,0-1,5)	4,3±0,6 (3,8-5,4)
R_PB	4,6±0,3 (4,1-4,8)	3,3±0,2 (3,0-3,6)	5,5±0,4 (4,8-5,9)	2,3±0,3 (1,9-2,7)	4,2±0,3 (4,0-4,7)	4,2±0,3 (3,9-4,6)	1,2±0,1 (1,0-1,3)	5,0±0,6 (4,1-5,9)
R_EU	4,6±0,2 (4,3-4,8)	4,0±0,3 (3,7-4,4)	5,4±0,7 (4,8-6,4)	3,0±0,5 (2,5-3,6)	5,0±0,1 (4,9-5,2)	4,0±0,1 (3,8-4,1)	1,2±0,0 (1,2-1,3)	5,9±0,0 (5,9-5,9)
2_MC	3,8±0,4 (3,3-4,8)	3,3±0,3 (2,7-4,0)	4,4±0,5 (3,6-5,5)	2,0±0,2 (1,4-2,3)	3,5±0,4 (2,9-4,1)	3,8±0,3 (3,3-4,6)	1,2±0,2 (1,0-1,5)	3,8±0,6 (2,6-4,7)
3_DI	5,7±0,5 (4,8-6,7)	4,5±0,4 (3,7-5,1)	6,5±0,7 (5,3-7,9)	3,2±0,2 (2,8-3,7)	8,1±1,3 (6,5-10,4)	5,8±0,5 (4,7-6,9)	1,8±0,2 (1,5-2,2)	8,8±1,3 (6,3-11,1)
4_DI	4,0±0,3 (3,8-4,2)	3,0±0,1 (3,0-3,1)	5,2±0,1 (5,1-5,2)	2,5±0,1 (2,4-2,6)	4,4±1,3 (3,5-5,3)	3,8±0,1 (3,8-3,9)	1,0±0,1 (0,9-1,0)	5,0±0,3 (4,8-5,2)
4_MV	3,6±0,3 (3,4-4,0)	3,0±0,4 (2,7-3,6)	4,4±0,4 (4,0-5,0)	2,1±0,2 (1,9-2,4)	4,5±0,5 (3,8-4,9)	3,6±0,2 (3,4-3,9)	0,9±0,1 (0,8-1,1)	4,7±0,3 (4,5-5,1)
4_CM	4,8±1,4 (4,0-9,1)	3,6±0,8 (1,9-4,9)	5,7±1,3 (4,8-9,5)	2,6±0,6 (2,1-4,3)	5,8±1,5 (4,2-9,8)	4,7±1,3 (3,7-8,4)	1,2±0,3 (1,0-2,2)	5,8±1,8 (4,7-10,4)
5_DM1	5,2±0,5 (4,4-6,0)	3,9±0,3 (3,5-4,3)	6,2±0,4 (5,8-6,9)	3,0±0,5 (2,0-3,5)	7,2±1,3 (5,2-9,1)	5,5±0,6 (4,8-6,2)	1,2±0,2 (0,9-1,5)	7,1±1,3 (5,6-9,2)
5_DM2	4,4±0,4 (3,7-5,2)	3,9±0,2 (3,4-4,4)	5,7±0,8 (4,4-7,0)	2,8±0,2 (2,5-3,2)	6,2±0,8 (4,0-7,5)	4,7±0,5 (3,7-5,6)	1,4±0,2 (1,1-1,6)	6,4±0,6 (5,8-7,4)
6_CM	4,2±0,4 (3,5-4,7)	3,2±0,2 (3,0-3,6)	4,7±0,4 (4,2-5,3)	2,1±0,2 (1,9-2,3)	6,0±0,6 (5,0-6,8)	4,5±3,5 (4,1-5,0)	1,1±0,1 (0,9-1,3)	5,9±1,0 (4,5-7,1)
7_SB	5,0±0,6 (4,2-6,4)	3,8±0,3 (3,3-4,5)	6,0±0,4 (5,1-6,6)	2,7±0,2 (2,4-3,0)	7,4±1,2 (4,0-9,3)	4,8±0,4 (4,2-5,6)	1,5±0,2 (1,3-2,0)	8,3±1,07 (6,5-10,8)
7_CM	4,8±0,7 (3,5-6,0)	3,3±0,5 (2,1-4,0)	5,9±0,8 (4,4-7,6)	2,5±0,3 (1,8-2,9)	7,0±1,2 (5,0-8,9)	4,8±0,6 (3,7-6,0)	1,4±0,2 (1,1-1,6)	8,9±1,3 (6,7-11,1)
7_CP	5,7±0,6 (4,9-6,6)	4,4±0,3 (4,0-4,7)	6,4±0,9 (5,3-7,8)	2,9±0,1 (2,8-3,1)	7,8±0,8 (6,5-9,1)	5,4±0,4 (4,8-5,9)	2,0±0,1 (1,9-2,2)	9,1±1,4 (6,8-10,3)

Tabela 2.2. Continuação

	Comprimento do segmento central do labelo	Largura do segmento central do labelo	Comprimento do cálcar	Largura a 1/3 do comprimento do cálcar	Largura a 2/3 do comprimento do cálcar	Curvatura do segmento posterior da pétala (em graus)	Largura da folha (cm)
A_CS	5,3±0,7 (4,2-6,8)	0,9±0,1 (0,8-1,1)	10,4±0,98 (8,4-12,1)	0,76±0,07 (0,63-0,87)	0,93±0,1 (0,72-1,16)	18,8±3,8 (12,6-24,2)	-
A_SJ	4,4±0,6 (3,2-5,6)	0,8±0,1 (0,6-0,9)	10,1±1,39 (5,4-11,3)	0,61±0,06 (0,51-0,71)	0,79±0,1 (0,64-1,01)	19,6±4,0 (12,3-26,8)	-
A_BJ	4,8±0,8 (3,7 -6,7)	0,8±0,1 (0,7-0,9)	9,8±1,0 (7,5-11,1)	0,7±0,06 (0,58-0,80)	0,95±0,14 (0,74-1,20)	20,1±2,7 (15,4-24,6)	-
A_SF	5,1±0,4 (4,5-5,8)	0,9±0,1 (0,7-1,0)	10,1±1,1 (8,3-11,4)	0,76±0,05 (0,66-0,82)	0,95±0,13 (0,66-1,13)	17,1±3,6 (11,9-22,3)	-
A_UR	5,4±0,3 (4,8-6,0)	0,8±0,2 (0,4-1,0)	9,9±0,5 (9,1-10,8)	0,71±0,12 (0,52-0,94)	0,81±0,14 (0,61-1,08)	19,1±3,2 (13,6-24,0)	0,9± 0,2 (0,4-1,2)
R_AG	5,0±0,5 (4,3-6,0)	0,8±0,8 (0,7-0,9)	7,2±0,7 (6,0-8,5)	0,58±0,1 (0,39-0,71)	0,58±0,07 (0,47-0,67)	16,4±3,4 (9,8-21,2)	2,0±0,4 (1,5-2,6)
R_CR	4,4±0,6 (3,7-5,6)	0,9±0,1 (0,7-1,0)	7,9±0,6 (6,9-8,5)	0,7±0,07 (0,62-0,79)	0,61±0,05 (0,55-0,68)	16,5±2,8 (11,3-20,4)	1,8±0,5 (1,2-2,6)
R_PB	4,0±0,3 (3,5-4,4)	0,6±0,1 (0,4-0,8)	5,5±0,7 (4,4-6,2)	0,48±0,11 (0,32-0,63)	0,48±0,09 (0,38-0,61)	20,2±4,5 (13,3-24,1)	1,4±0,4 (0,8-1,8)
R_EU	4,7±0,0 (4,7-4,7)	0,9±0,0 (0,9-0,9)	7,9±0,8 (6,8-9,0)	0,62±0,08 (0,51-0,72)	0,64±0,08 (0,53-0,76)	17,6±2,2 (14,5-20,6)	0,8±0,2 (0,6-1,0)
2_MC	3,2±0,4 (2,2-3,8)	0,8±0,2 (0,4-0,9)	6,7±0,5 (5,6-7,4)	0,58±0,08 (0,47-0,75)	0,55±0,08 (0,41-0,65)	13,0±3,8 (5,5-19,8)	0,8±0,2 (0,5-1,0)
3_DI	6,4±0,8 (5,1-8,2)	1,0±0,1 (0,7-1,1)	9,0±1,0 (7,7-11,3)	0,8±0,1 (0,63-0,97)	1,05±0,15 (0,73-1,41)	15,9±2,8 (11,4-19,7)	1,1±0,2 (0,7-1,4)
4_DI	3,7±0,3 (3,5-3,9)	0,7±0,1 (0,6-0,8)	7,9±1,3 (7,0-8,8)	0,57±0,01 (0,56-0,58)	0,47±0,03 (0,45-0,49)	12,0±4,7 (8,7-15,4)	-
4_MV	3,4±0,3 (3,1-3,8)	0,7±0,1 (0,7-0,8)	7,1±0,1 (7,0-7,3)	0,56±0,07 (0,49-0,64)	0,43±0,03 (0,40-0,47)	13,4±0,6 (12,6-14,0)	-
4_CM	4,8±1,1 (3,9-8,0)	0,8±0,3 (0,7-1,6)	7,9±0,8 (5,9-8,9)	0,68±0,08 (0,51-0,83)	0,58±0,16 (0,38-0,93)	16,9±4,1 (10,5-24,0)	-
5_DM1	4,5±1,2 (3,1-6,1)	0,7±0,3 (0,5-1,1)	10,2±1,5 (7,7-11,9)	0,8±0,1 (0,64-0,94)	0,75±0,14 (0,63-1,02)	16,6±3,1 (12,7-21,8)	1,6±0,5 (1,2-2,4)
5_DM2	4,6±0,6 (3,9-5,9)	0,9±0,1 (0,8-1,1)	10,1±0,9 (8,3-11,8)	0,66±0,08 (0,47-0,79)	0,69±0,06 (0,59-0,76)	17,6±4,0 (10,0-22,9)	1,4±0,2 (1,0-1,8)
6_CM	4,9±1,1 (3,0-6,1)	0,8±0,1 (0,7-0,9)	9,7±0,6 (8,4-10,2)	0,71±0,09 (0,63-0,87)	0,89±0,11 (0,76-1,01)	26,5±5,8 (18,5-35,9)	-
7_SB	5,7±4,5 (5,1-6,6)	1,0±0,1 (0,7-1,1)	10,9±1,4 (8,4-13,7)	0,7±0,11 (0,57-1,00)	0,93±0,16 (0,71-1,36)	22,9±5,5 (12,3-34,6)	-
7_CM	5,6±1,0 (3,9-7,6)	0,9±0,1 (0,7-1,1)	10,3±1,3 (6,8-12,0)	0,66±0,08 (0,54-0,78)	0,79±0,18 (0,45-1,06)	20,4±4,6 (15,3-30,9)	1,3±0,3 (0,5-1,6)
7_CP	5,7±0,8 (4,5-6,5)	1,2±0,1 (1,2-1,4)	10,3±0,9 (9,2-11,4)	0,84±0,09 (0,74-0,98)	1,12±0,08 (0,98-1,21)	14,1±5,3 (6,5-20,4)	-

Tabela 2.2. Continuação

	Comprimento folha (cm)	Comprimento da base da planta a primeira bráctea floral (cm)	Comprimento da antera	Comprimento da coluna e ovário	Distânica entre os viscídios
A_CS	-	-	1,7±0,2 (1,3-2,0)	14,8±1,53 (11,2-16,4)	0,9±0,2 (0,6-1,2)
A_SJ	-	-	1,6±0,1 (1,4-1,8)	11,5±1,6 (9,2-15,6)	0,8±0,2 (0,4-1,0)
A_BJ	-	-	1,6±0,1 (1,4-1,8)	12,6±1,9 (8,9-16,2)	0,8±0,2 (0,5-1,3)
A_SF	-	-	1,5±0,1 (1,3-1,7)	13,1±1,8 (10,2-16,7)	0,8±0,2 (0,6-1,1)
A_UR	5,1±1,1 (3,5-8,1)	17,6±2,8 (14,5-23,8)	1,6±0,2 (1,2-2,0)	13,2±1,3 (11,7-16,8)	0,5±0,2 (0,5-1,2)
R_AG	16,9±4,2 (12,2-23,8)	51,1±9,0 (36,8-64,6)	2,1±0,3 (1,6-2,5)	15,2±1,6 (13,4-18,1)	1,1±0,2 (0,7-1,5)
R_CR	8,1±2,7 (4,9-14,1)	19,9±4,3 (14,3-29,5)	1,9±0,4 (1,2-2,6)	17,2±3,1 (11,3-20,9)	1,0±0,4 (0,6-1,5)
R_PB	10,4±3,6 (6,2-16,5)	26,3±9,7 (18,0-41,0)	1,8±0,3 (1,4-2,1)	13,2±0,9 (12,4-14,8)	1,2±0,4 (0,5-1,5)
R_EU	6,8±2,7 (5,0-11,5)	20,1±5,3 (12,6-25,5)	1,9±0,4 (1,4-2,5)	10,6±0,59 (9,9-11,4)	1,2±0,4 (0,7-1,5)
2_MC	6,0±1,7 (2,9-8,1)	18,6±3,2 (10,7-23,5)	1,7±0,3 (1,0-2,2)	12,2±1,5 (10,6-16,4)	0,7±0,1 (0,6-1,0)
3_DI	8,7±2,6 (5,0-14,0)	43,8±10,7 (23,6-70,6)	2,1±0,3 (1,6-2,8)	13,8±2,6 (10,0-19,9)	1,6±0,3 (1,1-2,2)
4_DI	-	-	1,2±0,0 (1,2-1,3)	12,1±0,4 (11,8-12,4)	0,7±0,1 (0,6-0,8)
4_MV	-	-	1,4±0,2 (1,2-1,6)	10,4±0,81 (9,7-11,6)	0,6±0,1 (0,5-0,7)
4_CM	-	-	1,5±0,1 (1,4-1,6)	12,0±1,4 (9,5-14,1)	0,6±0,2 (0,1-0,8)
5_DM1	5,9±1,0 (4,7-7,4)	37,9±10,2 (25,5-51,0)	1,9±0,2 (1,7-2,2)	16,3±2,4 (13,6-20,4)	0,8±0,4 (0,3-1,4)
5_DM2	6,6±1,1 (5,3-8,0)	22,1±6,9 (11,5-32,2)	1,7±0,2 (1,4-2,0)	12,9±2,4 (9,0-17,2)	0,6±0,2 (0,2-0,9)
6_CM	-	-	1,6±0,1 (1,5-1,7)	11,2±0,9 (9,5-12,1)	0,6±0,1 (0,4-0,8)
7_SB	-	-	1,6±0,2 (1,3-2,1)	12,5±1,8 (7,5-14,4)	0,6±0,2 (0,3-0,8)
7_CM	9,8±2,1 (6,9-13,9)	35,5±8,2 (23,3-52,2)	1,6±0,2 (1,3-1,9)	13,4±0,74 (11,6-14,5)	0,5±0,2 (0,0-0,9)
7_CP	-	-	1,5±0,2 (1,2-1,7)	11,8±1,6 (9,6-13,6)	0,7±0,1 (0,4-0,8)

Tabela 2.3. Pares de primers utilizados para amplificar cinco regiões microssatélites empregadas na caracterização genética de vinte populações pertencentes ao complexo *Habenaria repens*. F = forward, R = reverse, TA = temperatura de anelamento.

Primers	Motivo	Tamanho alelos	TA
HR17/HR18 F 5'-GGGCCGCAGAAAATCTA-3' R 5'- ATGTCTCCAAGCAGAGAAAAGC-3'	(TCC)4T(TCC)	123-192	54,5°C
HR09/HR10 F 5'-CATATCCATGTCTTCTGCC-3' R 5'-CTCCCGTTTGCTTTATCTTTTG-3'	(CT)5CC(CT)5CC	281-305	60,7°C
SSRHN12 F 5'-ATCTACCATGATCTGCACCACA-3' R 5'-GTTATAGGCGATGTTCTCGACC-3'	(ATG)4 N5 (GGA)4	321-360	54,5°C
HR13/HR14 F 5'-GGCATGGAAAAGGGTGGACTTAT-3' R 5'-TGAGATCAACAAGGATGTCGAA-3'	(TG)6	157-173	62,2°C
SSRHN5 F 5'-TGTGCGAGTGAGAGAGAGAAAG-3' R 5'-ACAATCAACAGAGTGGTTGCAC-3'	(TG)7	331-371	55°C

Tabela 2.4. Caracterização dos cinco *loci* microssatélites utilizados no estudo de variabilidade genética de vinte populações pertencentes ao complexo *H. repens*. N = número de indivíduos genotipados; Na = número de alelos; Ho = heterozigosidade média observada; H_e = heterozigosidade média esperada; A.N. = frequência média de alelos nulos; Ne = número efetivo de alelos; H_s = heterozigosidade média entre as populações; H_t = heterozigosidade esperada se todas as populações fossem unidas; F_{is} = índice de fixação; F_{st} = coeficiente de endogamia nas subpopulações comparando-as com a população total.

Locus	N	Na	H_o	H_e	A.N.	Ne	H_s	H_t	F_{is}	F_{st}
HR17/HR18	289	15	0,329	0,278	0,05	1,547	0,276	0,347	-0,160	0,206
HR9/HR10	286	8	0,093	0,190	0,14	1,338	0,196	0,407	0,560	0,518
SSRHN12	288	11	0,143	0,136	0,08	1,341	0,179	0,816	0,273	0,780
HR13/HR14	295	7	0,175	0,167	0,01	1,267	0,228	0,661	0,259	0,654
SSRHN5	274	17	0,407	0,392	0,15	1,935	0,400	0,816	0,049	0,510
Total		58	0,229	0,233	0,086	1,486	0,256	0,609	0,151	0,580

Tabela 2.5. Diversidade genética das 20 populações estudadas pertencentes ao complexo *H. repens*. Na = número médio de alelos entre os cinco *loci*; N = número total de alelos; RA = riqueza alélica; RA/N = razão, em porcentagem, da riqueza alélica (RA), em função do número observado de alelos (N); H_o = heterozigosidade observada média; H_e = heterozigosidade esperada média; F_{is} = índice de fixação médio; AE = número de alelos exclusivos.

População	**Na**	**N**	**RA**	**RA/N**	H_o	H_e	F_{is}	**AE**
H. aranifera								
A_SF	2,400	12	9,693	80,775	0,187	0,269	0,109	3
A_SJ	1,800	9	7,920	88,000	0,240	0,220	-0,054	2
A_UR	2,600	13	10,562	81,246	0,251	0,317	0,015	2
H. repens								
R_AG	2,800	14	8,480	60,571	0,114	0,166	0,303	6
R_CR	1,200	6	5,898	98,300	0,080	0,064	-0,250	0
R_EU	1,400	7	6,891	98,443	0,100	0,131	0,333	1
R_PB	1,800	9	7,183	79,811	0,163	0,132	-0,146	0
R_VÇ1	1,600	8	6,564	82,050	0,100	0,094	-0,053	0
R_VÇ2	2,000	10	7,997	79,970	0,150	0,177	0,045	0
H. aff. *repens*2								
2_MC	1,400	7	5,763	82,329	0,040	0,038	-0,053	1
H. aff. *repens*3								
3_DI	2,600	13	9,292	71,477	0,200	0,285	0,420	0
3_GM	2,400	12	10,613	88,442	0,413	0,419	0,146	0
H. aff. *repens*4								
4_CM	2,200	11	8,780	79,818	0,341	0,300	0,044	0
4_DI	2,000	10	8,974	89,740	0,265	0,287	0,138	1
4_MV	2,400	12	9,031	75,258	0,257	0,235	0,216	1
H. aff. *repens*5								
5_DM1	2,000	10	6,285	62,850	0,064	0,061	-0,045	3
5_DM2	1,600	8	6,835	85,438	0,218	0,142	-0,406	1
H. aff. *repens*7								
7_CM	4,200	21	14,008	66,705	0,443	0,486	0,063	3
7_CP	3,000	15	10,277	68,513	0,416	0,360	-0,004	1
7_SB	3,000	15	12,090	80,600	0,545	0,470	-0,131	1

Tabela 2.6. Situação quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada uma das vinte populações do complexo *Habenaria repens* em relação a cada um dos cinco *loci* microssatélites utilizados. Valores significativos ($p < 0,05$) indicam ausência de equilíbrio. M = monomórfico; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

	HR17/HR18	HR9/HR10	SSRHN12	HR13/HR14	SSRHN5
H. aranifera					
A_SF	M	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	***
A_SJ	p > 0,05	M	M	M	***
A_UR	p > 0,05	p > 0,05	p > 0,05	M	***
H. repens					
R_AG	***	p > 0,05	p > 0,05	M	***
R_CR	M	M	M	M	p > 0,05
R_EU	M	*	M	p > 0,05	M
R_PB	p > 0,05	M	M	p > 0,05	p > 0,05
R_VÇ1	M	M	M	p > 0,05	p > 0,05
R_VÇ2	p > 0,05	M	M	p > 0,05	p > 0,05
H. aff. *repens*2					
2_MC	p > 0,05	M	M	p > 0,05	M
H. aff. *repens*3					
3_DI	p > 0,05	***	***	p > 0,05	M
3_GM	**	**	**	*	p > 0,05
H. aff. *repens*4					
4_CM	p > 0,05	***	M	***	**
4_DI	***	***	M	M	p > 0,05
4_MV	**	***	M	M	*
H. aff. *repens*5					
5_DM1	p > 0,05	M	p > 0,05	M	p > 0,05
5_DM2	p > 0,05	M	M	M	**
H. aff. *repens*7					
7_CM	p > 0,05	p > 0,05	*	p > 0,05	p > 0,05
7_CP	***	*	*	p > 0,05	***
7_SB	*	*	**	p > 0,05	p > 0,05

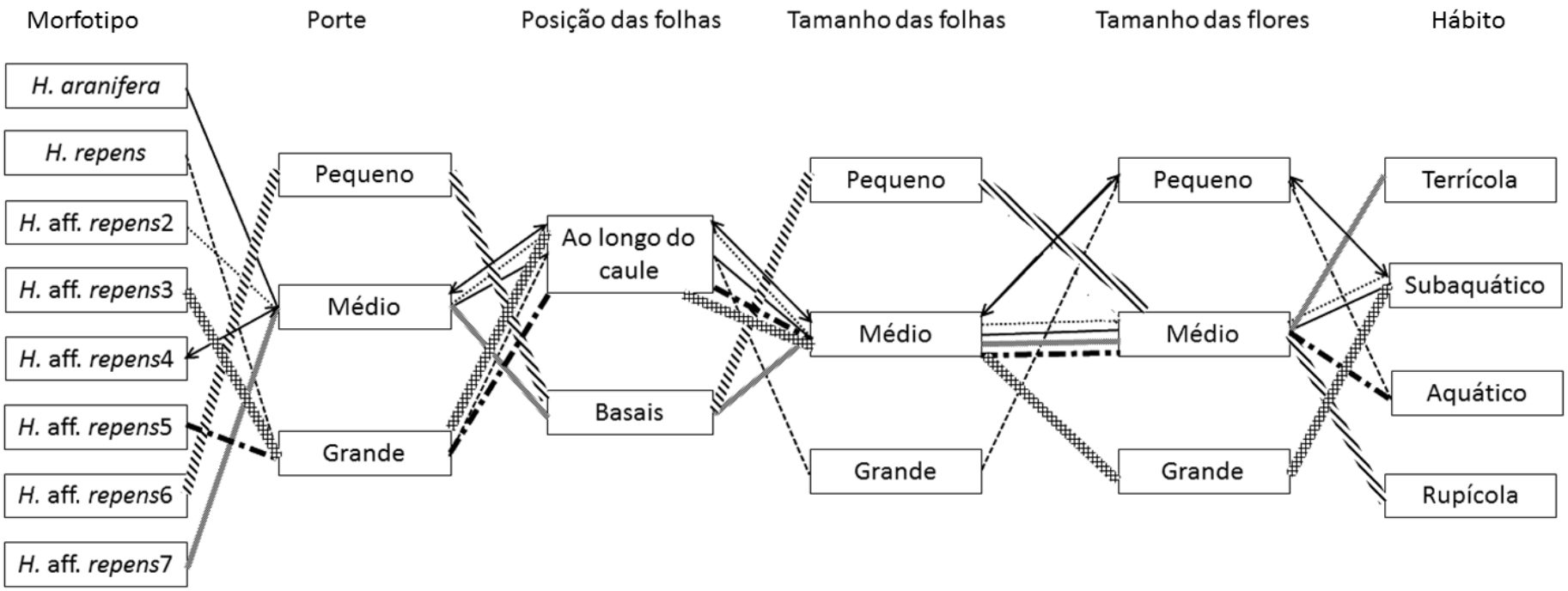


Figura 2.1. Combinação entre as principais características encontradas nas espécies e morfotipos amostrados para o presente trabalho e que compõem o complexo *Habenaria repens* (Orchidaceae) no Brasil.

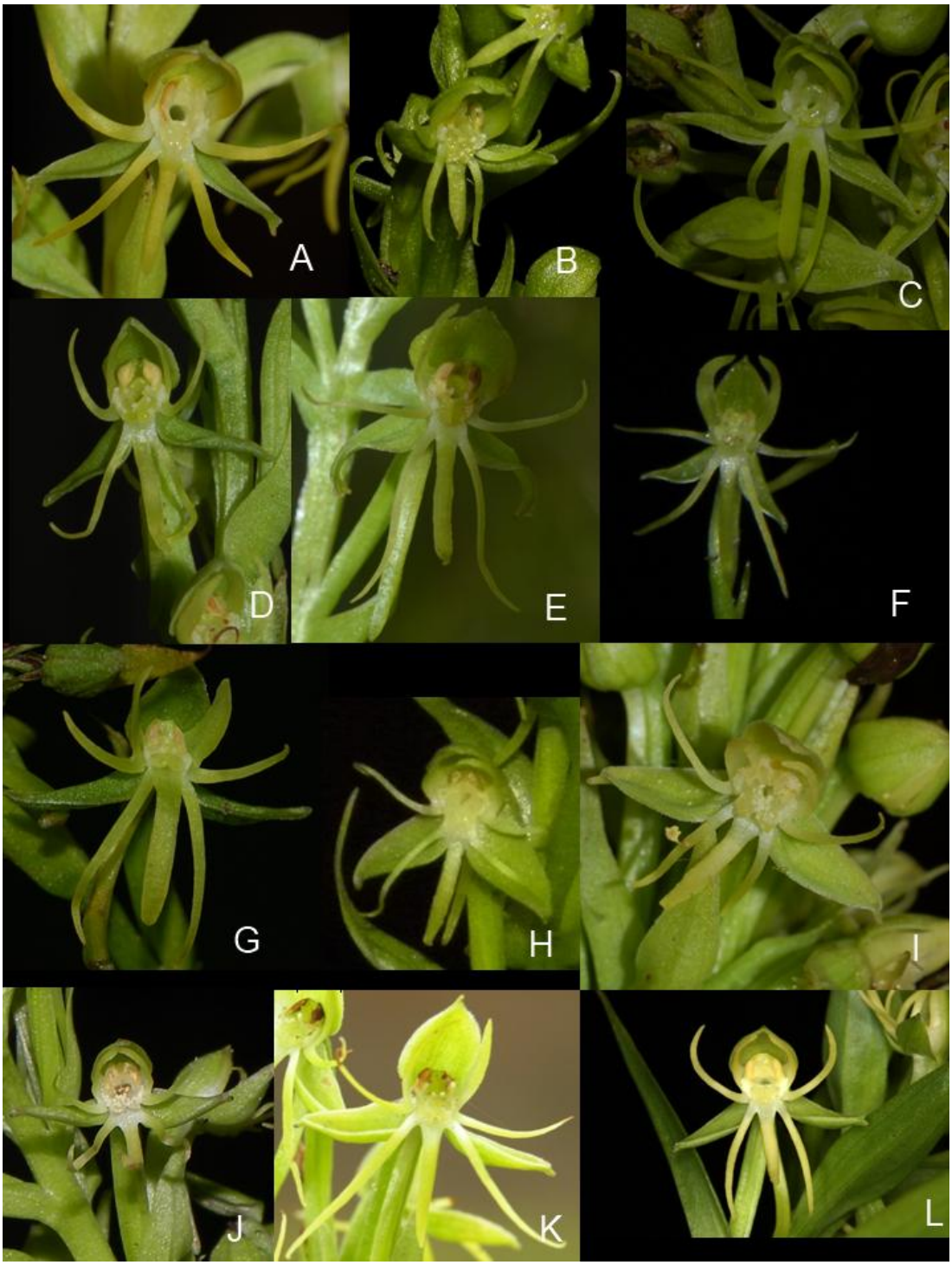


Figura 2.2. Variação morfológica no complexo *Habenaria repens.* **A** – *H. aranifera* (Urubici–SC); **B** – *H.* aff.*repens*2 (Morro do Chapéu–BA); **C** – *H.* aff. *repens*3 (Diamantina–MG); **D** – *H.* aff. *repens*4 (Milho Verde–MG); **E** – *H.* aff.*repens*5 (Delfim Moreira–MG; foto de L. L. Giacomin); **F** – *H.* aff. *repens*6 (Conceição do Mato Dentro–MG); **G** – *H.* aff. *repens*7 (Santa Bárbara–MG); **H -** *H. repens* (Anguera–BA); **I -** *H. repens* (Curitiba–PR); **J** – *H. repens* (Areias–PB; foto de L. P. Félix); **K** – *H. repens* (Viçosa–MG); **L** – *H. repens* (EUA, país onde foi coletado o tipo da espécie; foto de M. Whitten)

Figura 2.3. Variação de hábito e habitat no complexo *Habenaria repens*. **A** – Hábito aquático em *H.* aff. *repens*2 (Morro do Chapéu–BA); **B** – Hábito semiaquático em *H.* aff. *repens*4 (Milho Verde–MG); **C** – Hábito rupícola em *H.* aff. *repens*6 (Conceição do Mato Dentro–MG); **D** – Hábito terrícola em *H.* aff. *repens*7 (Santa Bárbara–MG); **E –** Hábito aquático em *H. repens* (Anguera–BA); **F** – Exemplo de habitat das espécies aquáticas do complexo (Curitiba–PR). As setas indicam a localização das *Habenaria*.

Figura 2.4. Mapa mostrando a distribuição dos morfotipos e espécies amostrados no Brasil para o complexo *Habenaria repens*. *H. aranifera* (A_BJ, A_CS, A_SF, A_SJ, A_UR), *H.* aff. *repens*2 (2_MC), *H.* aff. *repens*3 (3_DI, 3_GM, 3_IL), *H.* aff. *repens*4 (4_BU, 4CM, 4_DI, 4_MV), *H.* aff. *repens*5 (5DM_1, 5DM_2), *H.* aff. *repens*6 (6_CM), *H.* aff. *repens*7 (7_SB, 7_CM, 7_CP), *H. repens* (R_AG, R_CR, R_PB). Veja Tabela 1.1 (Capítulo 1) para nomes das populações.

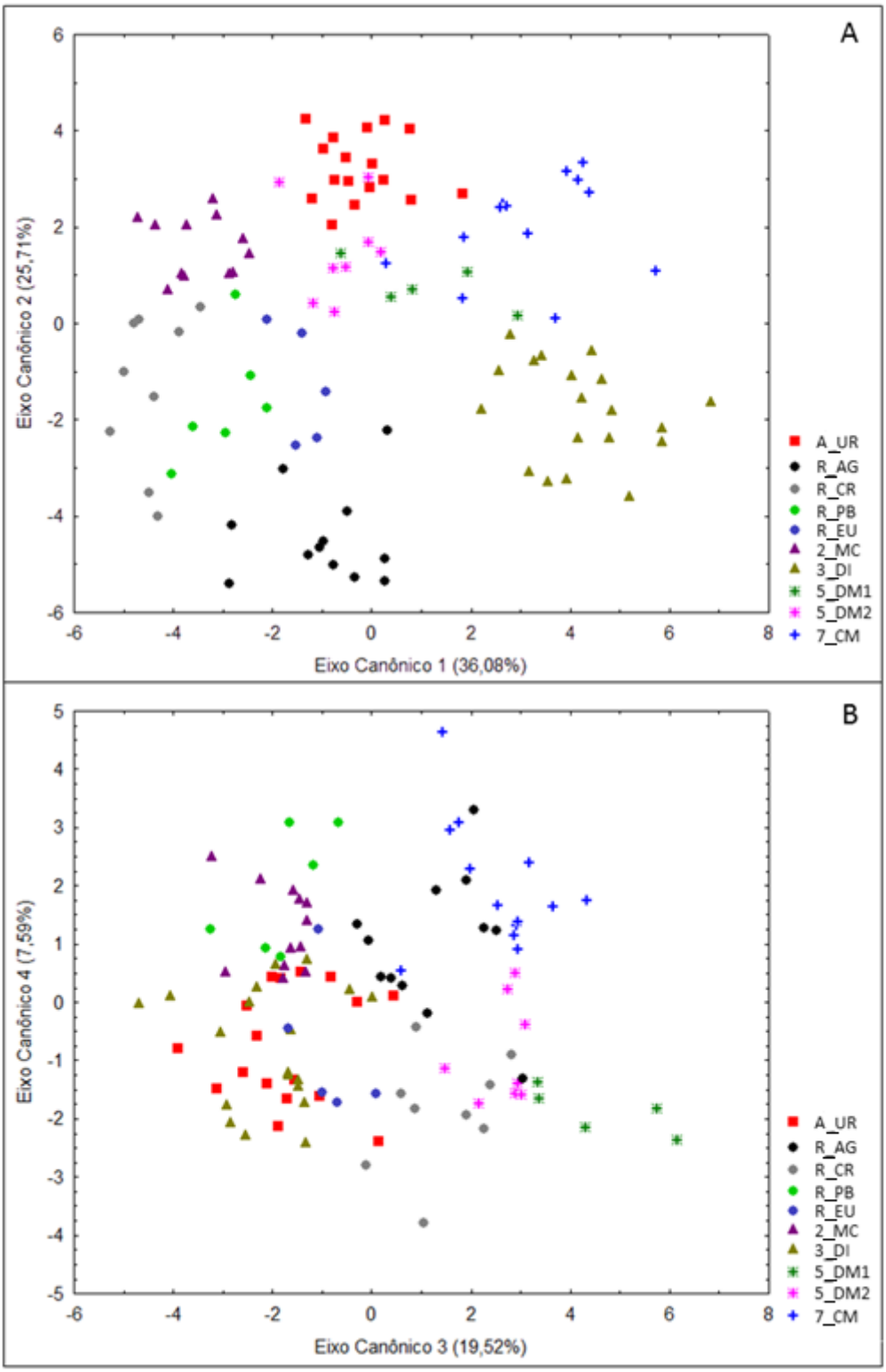


Figura 2.5. Representação gráfica dos quatro primeiros eixos canônicos da CVA para a matriz com 16 caracteres florais e vegetativos de 10 populações pertencentes ao complexo *Habenaria repens*, utilizando as populações como variável de grupo. Os valores entre parênteses indicam a porcentagem da variância explicada pelo eixo correspondente. Para os códigos das populações, consultar Tabela 2.1.

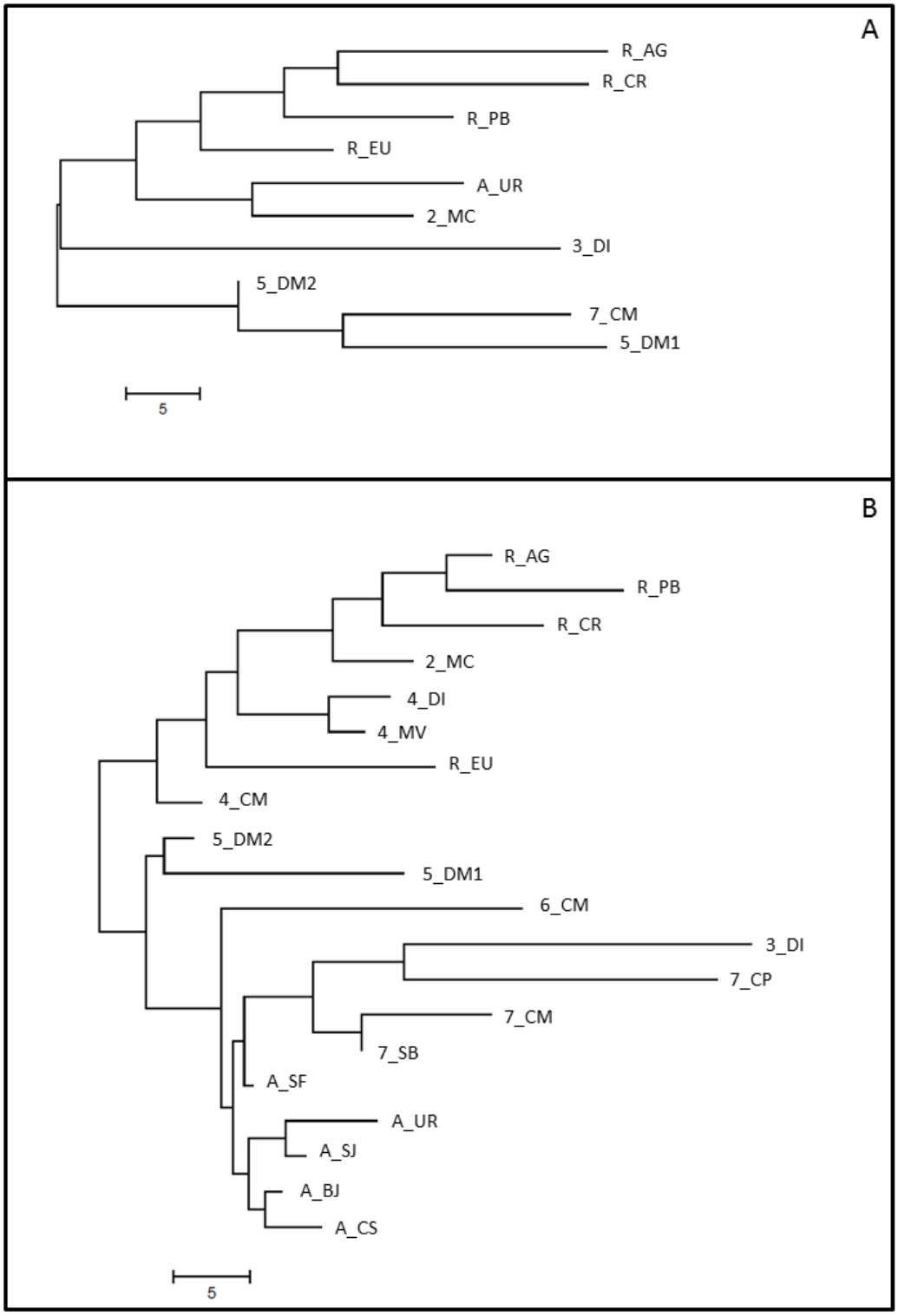


Figura 2.6. Relações fenéticas entre populações pertencentes ao complexo *Habenaria repens*, utilizando a matriz a distância quadrada de Mahalanobis entre os centroides, baseado em 16 caracteres morfológicos florais e vegetativos (A) e 16 caracteres morfológicos florais (B), utilizando *Neighbor-joining* como algoritmo de agrupamento. Para os códigos das populações, consultar Tabela 2.1.

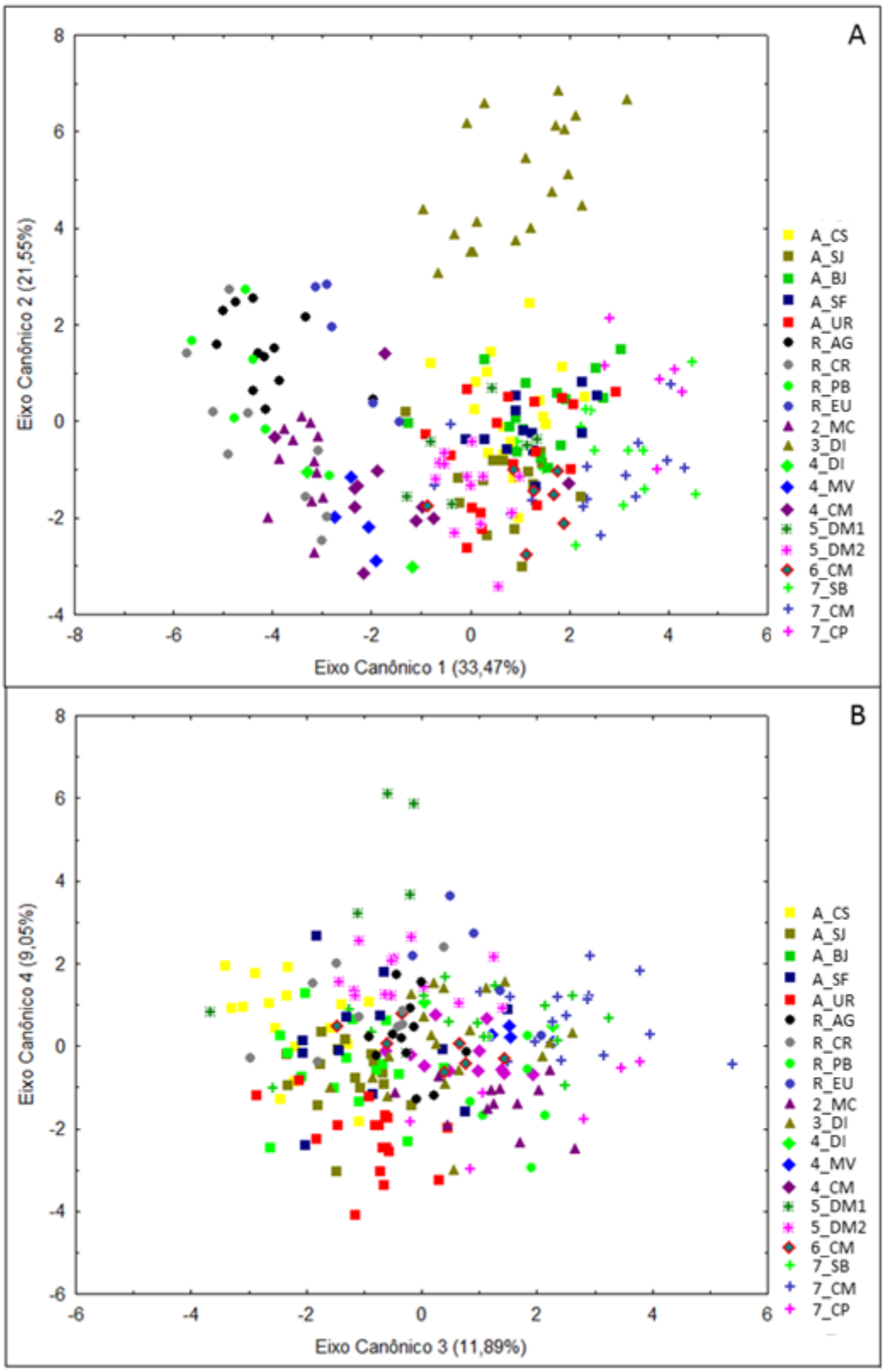


Figura 2.7. Representação dos quatro primeiros eixos canônicos da CVA para a matriz com 16 caracteres florais de 20 populações pertencentes ao complexo *Habenaria repens*, utilizando as populações como variável dependente. Os valores entre parênteses indicam a porcentagem da variância explicada pelo eixo correspondente. Para os códigos das populações, consultar Tabela 2.1.

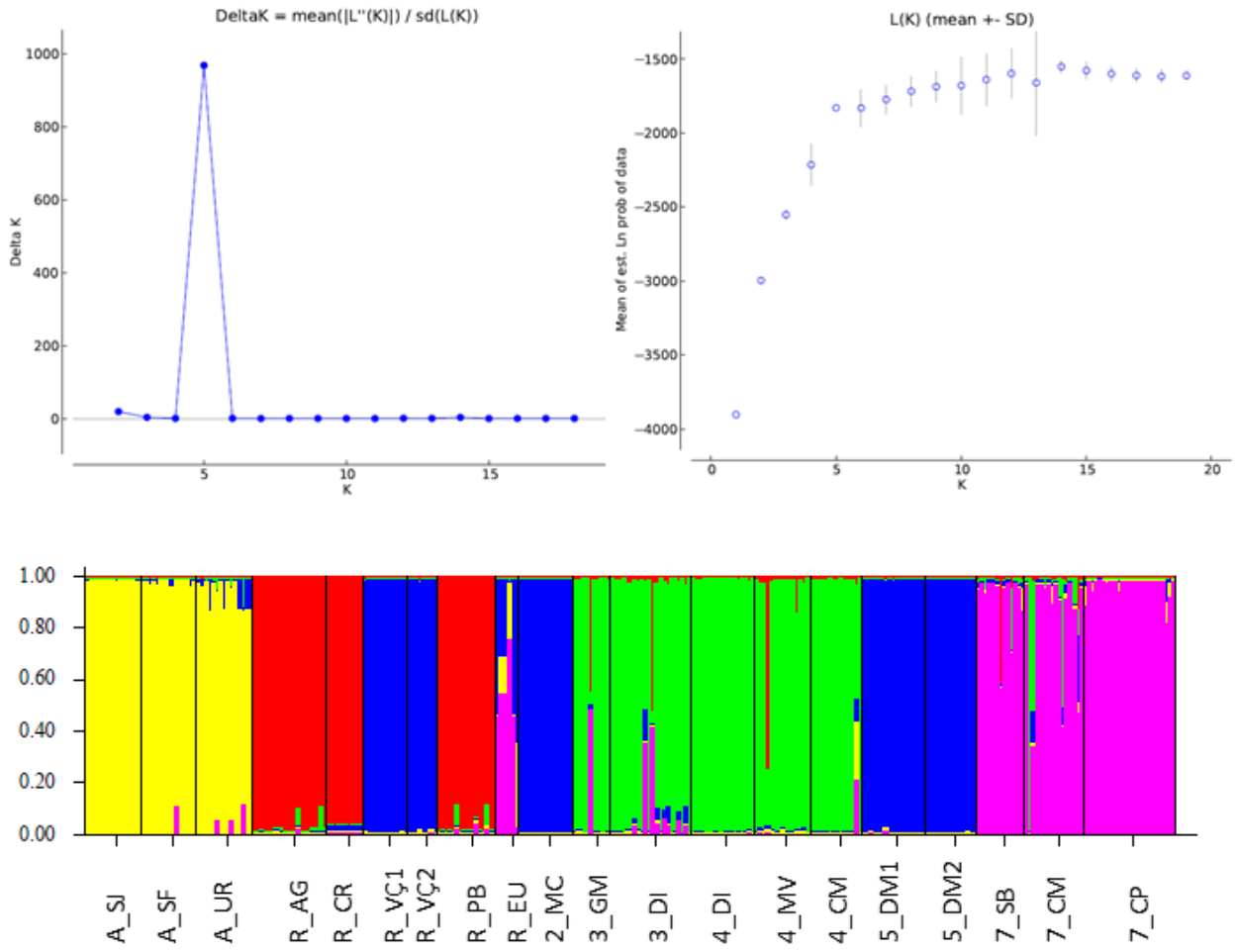


Figura 2.8. Análise Bayesiana de atribuição genética de 295 indivíduos do complexo *Habenaria repens*, distribuídos em 20 populações, a partir de cinco *loci* de marcadores microssatélites. **A.** Gráfico de Δ*K* (Ln''(*K*)/desvio padrão de LnP(*K*); onde *K*=número de grupos genéticos). **B.** Gráfico de Ln(*K*) (média±desvio padrão). **C.** Saída gráfica do programa Structure representando os cinco grupos genéticos. Cada cor indica um grupo e cada barra um indivíduo. A proporção de cores para cada indivíduo indica a sua composição genética provável.

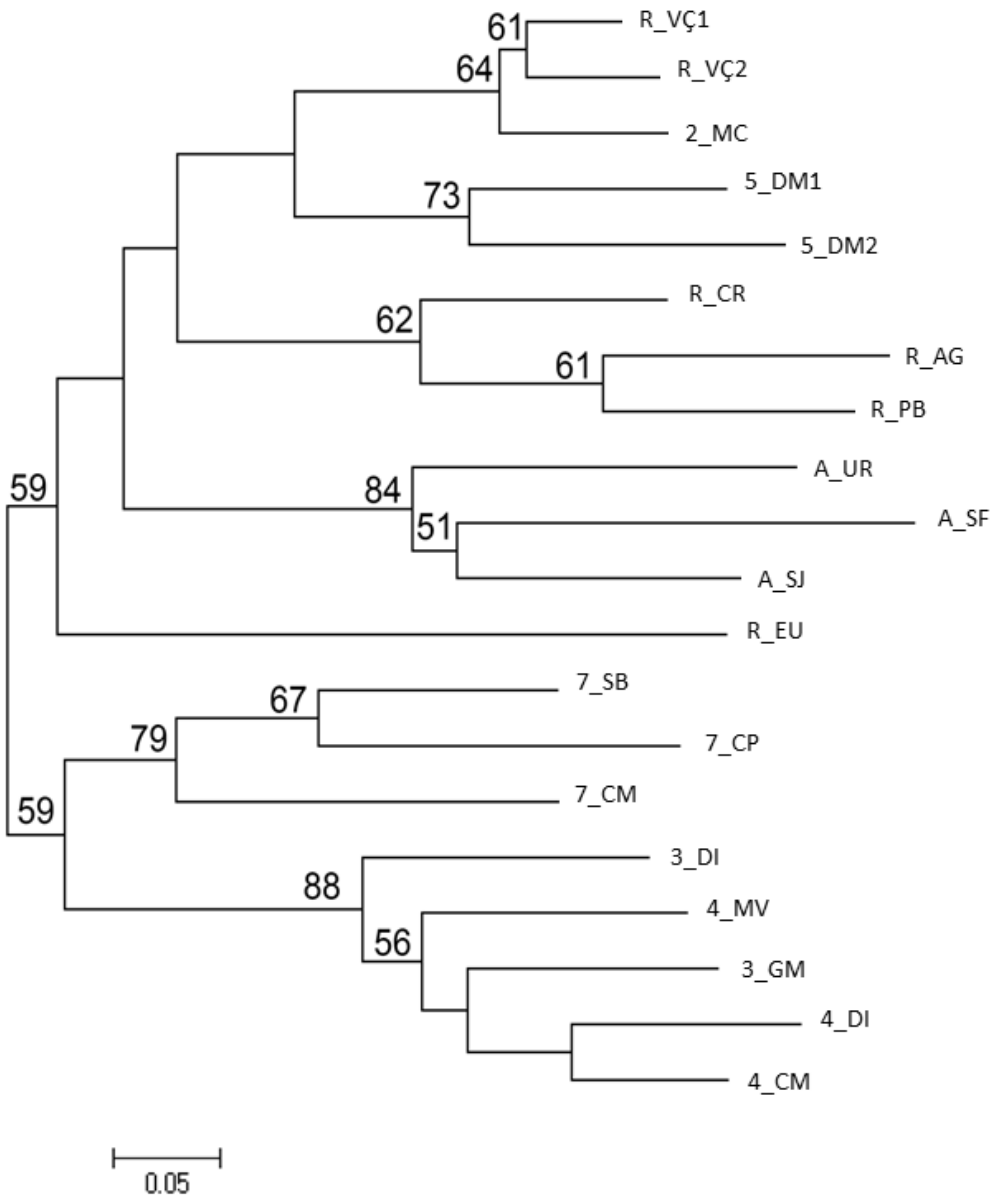


Figura 2.9. Relações fenéticas entre 20 populações do complexo *Habenaria repens*, baseado na matriz de distância de Cavalli-Sforza (D_c) construída a partir da genotipagem de cinco marcadores microssatélites, utilizando *Neighbor-joining* como algoritmo de agrupamento. Os valores nos ramos indicam o suporte *bootstrap*. Valores menores que 50 não foram representados. Para os códigos das populações, consultar a Tabela 2.1.

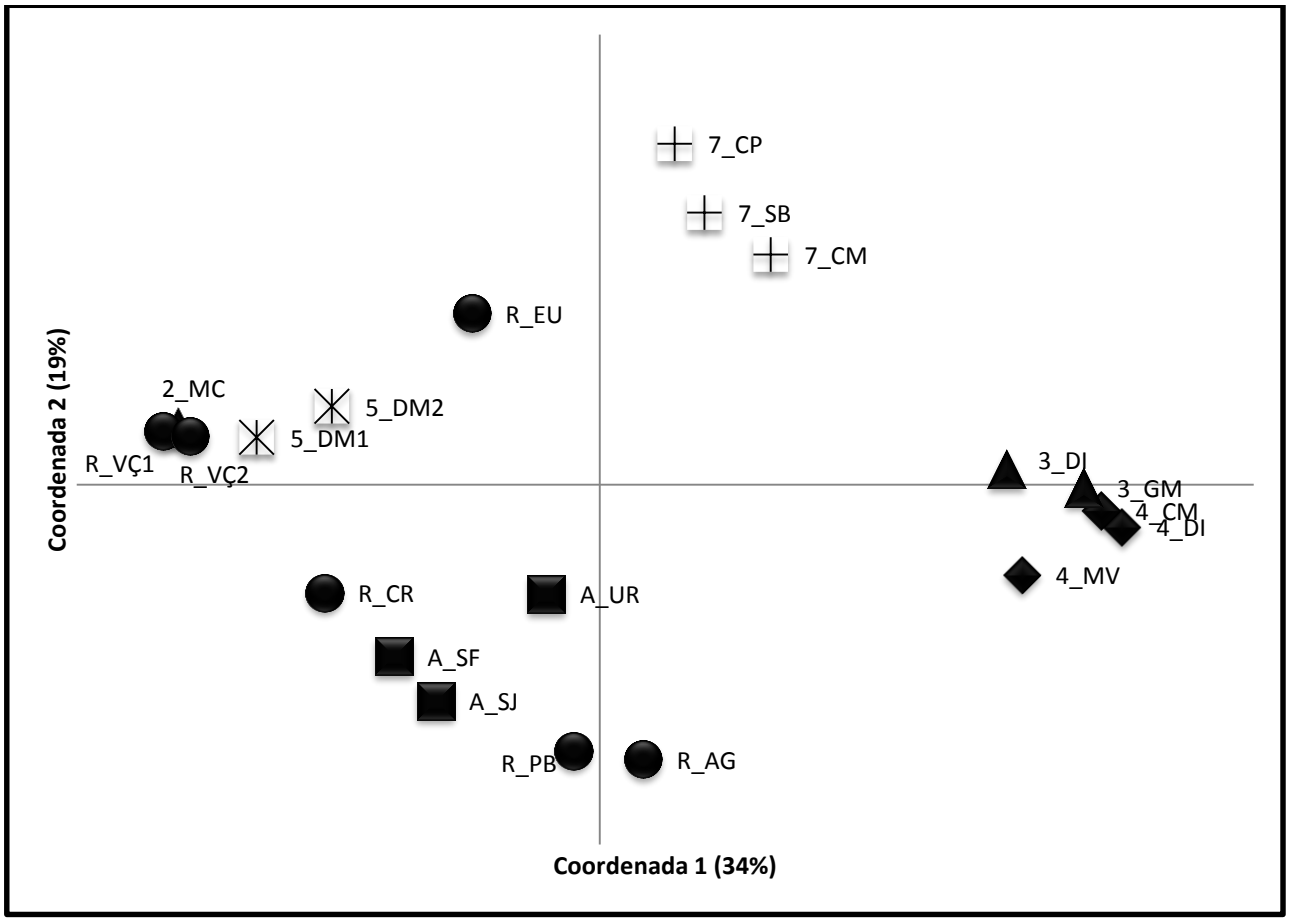


Figura 2.10. Análise de Coordenadas Principais (PCO) das 20 populações do complexo *Habenaria repens*, realizada a partir da matriz de distância de Cavalli-Sforza com correção de INA construída a partir da genotipagem de cinco marcadores microssatélites. Os valores entre parênteses indicam a porcentagem da variância explicada pela coordenada correspondente. Para os códigos das populações, consultar a Tabela 2.1.

DISCUSSÃO

De uma forma geral, os grupos encontrados nas análises genéticas, tanto de agrupamento quanto de estruturação concordam com o indicado na análise filogenética molecular do complexo (Capítulo 1), de que ao menos dois grandes grupos existem dentro do complexo, um sendo constituído pelos morfotipos 3, 4 e 7, e o outro pelos morfotipos 2, 5 e as espécies *H. aranifera* e *H. repens*. Porém, esta conclusão não é inteiramente congruente com as análises multivariadas morfológicas, onde os grupos formados não correspondem aos mesmos recuperados nas análises com marcadores moleculares. Essa é uma forte evidência de que a morfologia floral dos três clados do complexo *H. repens* encontrados pelas análises moleculares possa ser resultado de convergência ou da manutenção de simplesiomorfias tornando complicada a separação tanto dos clados obtidos nas análises filogenéticas do Capítulo 1, como das espécies no complexo. Dentro do primeiro grupo acima (morfotipos 3, 4 e 7), a subdivisão coincide com o indicado nas análises filogenéticas, nas quais o morfotipo 7 separa-se do conjunto dos morfotipos 3 e 4 (que não podem ser discriminados geneticamente entre si), o que também é sustentado pelas análises morfológicas. Já o segundo grupo possui divergências em relação às linhagens observadas nas análises filogenéticas do Capítulo 1.

Valores similarmente altos de estruturação genética, como a apontada pela análise de variância molecular (AMOVA) entre os grupos determinados pelo Structure (48%), têm sido encontrados entre espécies (e.g., Devos *et al*., 2003; Barrett & Freudenstein, 2011), mas não usualmente entre populações ou partições da mesma espécie (e.g., Ståhlberg & Hedrén, 2010; Lousada *et al*., 2011) ou mesmo entre espécies próximas (e.g., Soliva & Widmer, 2003; Pellegrino *et al*., 2005). Esse resultado de uma alta diferenciação genética entre os cinco grupos, indica a existência de múltiplas espécies no complexo.

Apesar de terem sido encontrados cinco agrupamentos genéticos nas análises com microssatélites, a morfologia e as análises filogenéticas do Capítulo 1 não dão suporte à classificação desses como cinco espécies. O grupo formado pelos morfotipos 3 e 4 é consistente nos dois marcadores moleculares e diferencia-se do morfotipo 7, ao qual se agruparam na análise filogenética. Dessa forma, ao menos duas espécies serão reconhecidas a partir desses morfos, sendo a convergência dos canais das anteras e braços do rostelo em direção ao ápice, característica do morfotipo 7. Os morfotipos 3 e 4 diferenciam-se pelo tamanho, mas não pelas formas das partes florais e das folhas. No

entanto, morfologicamente é fácil a distinção entre eles e outras análises deverão ser realizadas para determinar se estas devem ser reconhecidas como uma única espécie, com ampla variação em tamanho, ou como duas espécies.

A separação de *H. repens* e *H. aranifera* nas análises morfológicas com as duas matrizes é corroborada nas análises de estruturação genética. Nas análises filogenéticas (Capítulo 1), além da distinção de *H. aranifera*, o conjunto de populações da forma típica de *H. repens* se divide em dois grupos, um formado pelas populações de Viçosa-MG com as norte-americanas, e outro pelas populações de Anguera-BA (região Nordeste do Brasil), Curitiba-PR (região Sul), Paraíba (região Nordeste), *H.* aff. *repens*5 e a única população do morfotipo *H.* aff. *repens*2. Como não observamos características morfológicas diagnósticas que sustentem a separação desses dois grupos em duas espécies, seria muito pouco prático a segregação de diversos táxons não distinguíveis, e desta forma este conjunto de populações será mantido como uma única espécie altamente polimórfica, *H. repens*. Os únicos terminais a diferenciarem-se são os de *H. aranifera*, que se pode ser reconhecida pela presença de um tuberoide, e será mantida como uma espécie distinta.

A circunscrição de *H. repens*, incluindo os morfotipos 2 e 5, atende a todos os requisitos determinados como fundamentais por Cronk (1998) para que uma espécie seja considerada uma ocloespécie, como observado em outros grupos brasileiros (e.g., Barbosa *et al.*, 2012). As características mais marcantes que assim a define são a alta variabilidade morfológica e a ausência de correlação entre morfologia e geografia, muito acentuada, quando consideradas as populações de Curitiba, Anguera e Paraíba, que formam um grupo coeso nas análises morfológicas e possuem distribuição do Sul ao Nordeste do Brasil.

A segregação das plantas pelo seu período de floração no Brasil, observada no primeiro eixo da CVA da matriz com dados florais, sugere que as diferenças morfológicas entre esses grupos podem ter surgido por deriva e serem mantidas pela presença de diferentes visitantes florais nas diferentes épocas do ano, levando a uma pressão seletiva em direção a morfologias distintas. *Habenaria repens* de Anguera (R_AG), da Paraíba (R_PB) e de Curitiba (R_CR) e *H.* aff. *repens*2 (2_MC) florescem no segundo semestre e as demais no primeiro. Apenas *H.* aff. *repens*3 foge a essa regra e, apesar de florescer no segundo semestre está mais próxima das populaçãoes que florescem no primeiro. No

entanto, a pluviosidade não parece ser um fator determinante na manutenção dessas diferenças, uma vez que, apesar de florescerem no mesmo período, não necessariamente as populações florescem sob as mesmas condições. O segundo semestre é chuvoso na Bahia (onde foi coletada a população de *H. repens* em Anguera) e seco no Paraná (onde foi coletada a população de *H. repens* de Curitiba). Essa hipótese é corroborada pela análise dos dados florais isolados, nas quais populações não relacionadas nas análises filogenéticas apresentadas no Capítulo 1 agrupam-se, o que indica que a convergência morfológica nos caracteres florais é maior que nos caracteres vegetativos, condizente com uma convergência por polinizadores comuns.

O fato da única população do morfotipo 6 ter falhado na amplificação para todos os *loci* amostrados indica o seu distanciamento genético em relação a todas as demais populações do complexo, como evidenciado também por análises filogenéticas (Capítulo 1). Apesar disso, nas análises morfológicas ela não se distingue facilmente das demais, evidenciando um alto nível de convergência morfológica, apesar de se mostrar diferenciada na análise de agrupamento da matriz com 16 caracteres morfológicos florais (ver Figura 2.3B) . Devido à grande divergência genética, que a posiciona em outra seção do gênero distinta da qual está *H. repens* (Capítulo 1), esta população deve ser reconhecida como uma nova espécie, que morfologicamente é quase críptica com *H. repens* e demais táxons do complexo, mas que pode ser diferenciada pelo hábito rupícola, pelo pequeno porte e pelo baixo número de flores por inflorescência (até três).

Quando vários marcadores são utilizados em trabalhos taxonômicos, algumas situações divergentes podem ser encontradas. Na primeira delas, todos os marcadores são congruentes, facilitando o trabalho do taxonomista, que se vê em face de uma única conclusão possível, como aconteceu com Pereira, Borba & Giulietti (2007) ao trabalhar com *Syngonanthus mucugensis*. No entanto, em muitos casos, como no presente trabalho, os diferentes marcadores apontam em diferentes direções. Nesse último caso, é necessário extrair os melhores sinais informativos de cada marcador e juntá-los de uma maneira complementar, de forma que juntos eles levem a suposições e conclusões mais robustas do que qualquer um deles de forma separada. Também no leste do Brasil, esses padrões conflitantes têm sido encontrados para diversos grupos taxonômicos, tais como o complexo *Raddia brasiliensis* (Poaceae) (Oliveira, Borba & Longhi-Wagner, 2008; Oliveira *et al*., 2008) e *Chamaecrista cytisoides* (Fabaceae) (Conceição, Queiroz & Borba, 2008; Conceição *et al.*, 2008), quando contrastados padrões morfológicos e

genéticos. Quando combinados, os dois marcadores permitiram uma solução para a complexidade taxonômica abordada que não seria possível por quaisquer das análises separadamente. Em Orchidaceae, um contraste entre níveis de divergência morfológica e molecular foi observado em duas espécies de *Platanthera* por Bateman *et al*. (2012), que conseguiram, a partir do uso dos dois marcadores, observar uma grande variação morfológica não acompanhada por variações genéticas, o contrário do aqui observado, sugerindo um caso de especiação recente.

A existência de genótipos multiloci idênticos pode se dever a dois fatores. A primeira possibilidade é uma amostragem baixa de *loci*, com baixa variabilidade de alelos amostrados, aumentando a probabilidade de indivíduos relacionados apresentarem mesmo genótipo, e a outra seria a presença de algum tipo de reprodução clonal. Devido à presença de genótipos multiloci idênticos dentro de algumas populações é mais plausível supor a ocorrência de mecanismos de reprodução assexuada. Porém, a similaridade observada entre indivíduos de populações muito disjuntas, como em Viçosa–MG e em Morro do Chapéu–BA, separadas por cerca de 1.300 km, dificilmente pode ser explicada por reprodução assexuada, exceto por uma prevalência de agamospermia, com menor frequência de reprodução sexuada. Nestes casos, parece ser provável que a amostragem não tenha sido grande o suficiente para detectar variabilidade entre elas. A heterozigosidade fixada em alguns loci nas populações de *H.* aff. *repens*3 de Grão Mogol (3_GM) e *H.* aff. *repens*4 de Milho Verde (4_MV) constitui um forte indício de ocorrência de reprodução assexuada.

Assim como uma grande parte das espécies do gênero (e.g., Singer *et al*., 2007), as populações do complexo *H. repens* apresentam uma elevada frutificação, chegando a 100% em vários indivíduos (obs. pess.). Esta característica, incomum em orquídeas (Neiland & Wilcock, 1998), é frequentemente observada em espécies agamospérmicas (Richards, 1997), mas também pode estar associada à preseça de recompensas ao polinizador (Neiland & Wilcock, 1998), como em outras *Habenaria* (e.g., Pedron *et al*., 2012). Nas Orchidaceae, agamospermia tem sido mais frequentemente associada à subfamília Orchidoideae, em especial às Spiranthinae (e.g., Catling, 1987; Schmidt & Antlfinger, 1992), porém inexistem estudos neste aspecto em *Habenaria*. Entre os diversos tipos de reprodução agamospérmica, em orquídeas, aparentemente, os mais comuns envolvem a formação de sementes poliembriônicas (agamospermia esporofítica e aposporia; Richards, 1997), inclusive em todos os casos conhecidos em Orchidoideae

(e.g., Catling, 1982, 1987). No entanto, a observação de milhares de sementes em cerca de quinze frutos, de diferentes indivíduos de sete destas mesmas populações, não indicou a presença de nenhuma semente poliembriônica (dados não apresentados). Mas, ao invés disto, em alguns frutos foi observado um elevado número de sementes sem embrião (chegando a cerca de 40% em alguns casos), característica comum na ocorrência de depressão endogâmica (Borba, Semir & Shepherd, 2001; Wallace, 2003). O tamanho muito reduzido de várias das populações, e a observação de propagação vegetativa durante a coleta de material, principalmente nas populações aquáticas (obs. pess.), sugerem que a reprodução clonal vegetativa deve ser comum no grupo, com presença de poucos genótipos distintos. Mesmo as coletas tendo sido feitas de forma a se evitar clones, isto pode ter sido muito restringido pelo reduzido tamanho populacional, tanto em área quanto em número de indivíduos. Isto explicaria a ocorrência de depressão endogâmica nestas populações, e pode ajudar a compreender o complexo padrão morfológico observado de diferenciação entre populações.

De acordo com Phillips *et al*. (2012), os valores de F_{st} em Orchidaceae oscilam em média em torno de 0,146. No entanto, fatores como endogamia e reprodução vegetativa podem alterá-los em larga escala, uma vez que esses processos reprodutivos levam a alta estruturação das populações. Wallace (2002) encontrou F_{st} igual a 0,75 ao trabalhar com aloenzimas em *Platanthera leucophaea*, chegando a 0,944 para um dos *loci* estudados. Já Les (1991), observou valores de até 0,8446 (G_{st}) para duas espécies de *Ceratophyllum* (Ceratophylaceae). Em casos de endogamia, os valores são mais baixos quando comparados a plantas com reprodução vegetativa, em torno de 0,5 (e.g. Bonnin *et al*., 1996; Hamrick & Godt, 1996) para dados de aloenzimas. Somando essas evidências ao alto número de genótipos multiloci idênticos encontrados e à prevalência de índices de fixação (F_{is}) negativos, novamente a reprodução vegetativa é a melhor hipótese para justificar os resultados observados. Além de altas taxas de endogamia, que podem ser provocadas por polinização por mariposas, e reprodução sexuada, as populações possivelmente se originaram de diferentes fontes. Todos esses fatores, aliados à deriva genética podem ser responsáveis pela criação e manutenção da elevada diferenciação populacional.

A composição genética dividida entre os grupos de *H.* aff. *repens*7, o grupo das populações de Viçosa e o de *H. aranifera* observada na população proveniente da localidade onde o tipo de *H. repens* foi coletado (Estados Unidos da América) , torna

difícil a sua inclusão em um destes três grupos gênicos exclusivamente. Sua alta diferenciação em relação às demais pode ser explicada pela distância geográfica. Como já foi visto, o fluxo gênico entre as populações brasileiras é baixo, o que faz do fluxo entre estas e a população norte-americana pouco provável. A presença de alelos comuns com as populações brasileiras pode se dar tanto por tratar-se da população de origem, a partir da qual surgiram as brasileiras, quanto por homoplasia, fato não raro em marcadores microssatélites (Estoup, Jarne & Cornuet, 2002)

Populações simpátricas podem estar diferenciadas tanto morfológica quanto geneticamente. As populações de Conceição do Mato Dentro dos morfotipos 4 e 7 (4_CM e 7_CM) ocorrem em simpatria com pequena diferença entre os períodos de floração. No entanto, *H.* aff. *repens*7 possui algumas diferenças morfológicas em sua coluna quando comparadas a outros morfotipos. Este fato evidencia uma barreira eficiente ao fluxo gênico entre elas, podendo esses dois morfotipos apresentar diferentes polinizadores.

O uso de diferentes marcadores, característica da taxonomia integrativa, é importante para a visualização de padrões de evolução diferentes (ou similares) no mesmo grupo. Esses dados abrem caminho para o estudo de vários outros aspectos da biologia do grupo estudado e dão maior suporte para a tomada de decisões de cunho taxonômico, principalmente quando se trata de complexos de espécies. Com isso, a taxonomia integrativa deve ser vista como uma importante e valiosa ferramenta para os sistematas. No presente trabalho, o uso dessa abordagem permitiu a elucidação do complexo de espécies *H. repens* dando suporte ao reconhecimento de ao menos três espécies (*H.* aff. r*epens*3 e *H.* aff. r*epens*4 como uma espécie, *H.* aff. r*epens*6 e *H.* aff. r*epens*7) e à caracterização de *H. repens* como uma ocloespécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ames O. 1910. *Orchidaceae: Illustrations and studies of the family Orchidaceae*, Vol. 4: The genus *Habenaria* in North America. Stanfordville: Earl M. Coleman (reimpresso em 1979).

Amos W, Hoffman JI, Frodsham A, Zhang L, Best S, Hill AVS. 2006. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes* 7: 10–14.

Barbosa AR, Fiorini CF, Silva-Pereira V, Mello-Silva R, Borba EL. 2012. Geographical genetic structuring and phenotypic variation in the *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) ochlospecies complex. *American Journal of Botany* 99: 1477-1488.

Barrett CF, Freudenstein JV. 2011. An integrative approach to delimiting species in a rare but widespread mycoheterotrophic orchid. *Molecular Ecology* 20: 2771–2786.

Batista JAN, Bianchetti LB, González-Tamayo R, Figueroa XMC, Cribb PJ. 2011a. A synopsis of New World *Habenaria* (Orchidaceae) I. *Harvard Papers in Botany* 16: 1-47.

Batista JAN, Bianchetti LB, González-Tamayo R, Figueroa XMC, Cribb PJ. 2011b. A synopsis of New World *Habenaria* (Orchidaceae) II. *Harvard Papers in Botany* 16: 233-273.

Bonnin I, Huguet T, Gherardi M, Prosperi J-M, Prosperi I. 1996. High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers. *American Journal of Botany* 83: 843–855.

Borba EL, Felix JM, Solferini VM, Semir J. 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isosyme markers. *American Journal of Botany* 88: 419-428.

Borba EL, Semir J, Shepherd GJ. 2001. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* 88: 89-99.

Borba EL, Shepherd GJ, van den Berg C, Semir J. 2002. Floral and vegetative morphometrics of five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. *Annals of Botany* 90: 219 - 230.

Catling PM. 1982. Breeding systems of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* 60: 3017-3039.

Catling PM. 1987. Notes on the breeding systems of *Sacoila lanceolata* (Aublet) Garay (Orchidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 74: 58-68.

Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19: 233–257.

Chapuis M-P, Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24: 621–631.

Chase MW, Williams NH, De Faria AD, Neubig KM, Amaral MDCE, Whitten WM. 2009. Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. *Annals of Botany*104: 387–402.

Cogniaux A. 1893. Habenaria. In: Martius CFP, Eichler AG, Urban I, eds. *Orchidaceae. Fl. Bras*. München: F. Fleischer, *3* 18–102. tabs. 3–18.

Conceição AS, Queiroz LP, Borba EL. 2008. Natural hybrids in *Chamaecrista* sect. *Absus* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae): genetic and morphological evidence. *Plant Systematics and Evolution* 271: 19-27.

Conceição AS, Queiroz LP, Lambert SM, Pereira ACS, Borba EL. 2008. Biosystematics of *Chamaecrista* sect. *Absus* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae) based on allozyme and morphometric analyses. *Plant Systematics and Evolution* 270: 183-207.

Cronk QCB. 1998. The ochlospecies concept. In: Huxley CR, Lock JM, Cutler DF [eds], *Chorology, Taxonomy and Ecology of the Floras of Africa and Madagascar*. 155-170. Kew: Royal Botanic Gardens.

Dempster AP, Laird NM, Rubin DB. 1977. Maximum Likelihood from incomplete data via the EM Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Methodological)* 39: 1-38.

Devos N, Tyteca D, Raspé O, Wesselingh RA, Jacquemart A-L. 2003. Patterns of chloroplast diversity among western European *Dactylorhiza* species (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 243: 85–97.

Dieringer D, Schlotterer C. 2003. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3: 167–169.

Doyle JF, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*19: 11–15.

Dunsterville GCK, Garay LA. 1966. *Venezuelan Orchids Illustrated 4*. London: Andre Deutsche.

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.

Estoup A, Jarne P, Cornuet J-M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591–1604.

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.

Felsenstein G. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Seattle: Department of Genome Sciences, University of Washington.

Goudet J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics. *The Journal of Heredity* 86: 485–486.

Guttman L. 1954. Some necessary conditions for common-factor analysis. *Psychometrika* 19: 149–161.

Hamrick JL, Godt MJW. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 351: 1291–1298.

Hoehne FC. 1940. Orchidaceas, *Habenaria*. In: F.C. Hoehne (ed.), *Flora Brasílica* 12: 52-254, tab. 11-122. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo.

Kränzlin F. 1892. Beiträge zu einer Monographie der Gattung *Habenaria* Willd. *Botanische Jahrbucher für Systematik,Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 16: 52–223.

Kränzlin F. 1901. Orchidacearum genera et species. Vol. I. *Habenaria*. Berlin: Mayer and Müller.

Les DH. 1991. Genetic diversity in the monoecious hydrophile *Ceratophyllum* (Ceratophyllaceae). *American Journal of Botany* 78: 1070–1082.

Lousada JM, Borba EL, Ribeiro KT, Ribeiro LC, Lovato MB. 2011. Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica* 139: 431–440.

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

Neiland MRM, Wilcock CC. 1998. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 85: 1657-1671.

Nuttal T. 1818. *The genera of North American plants, and a catalogue of the species, to the year 1817*. Philadelphia: Printed for the author by D. Heartt.

Oliveira RP, Borba EL, Longhi-Wagner HM. 2008. Morphometrics of herbaceous bamboos of the *Raddia brasiliensis* complex (Poaceae-Bambusoideae): implications for the taxonomy of the genus and new species from Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 270: 159-182.

Oliveira RP, Borba EL, Longhi-Wagner HM, Pereira ACS, Lambert SM. 2008. Genetic and morphological variability in the *Raddia brasiliensis* complex (Poaceae-Bambusoideae). *Plant Systematics and Evolution* 274: 25-35.

van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538.

Pabst GFJ, Dungs F. 1975. *Orchidaceae Brasilienses*, v.1. Hildesheim: Kurt Schmersow.

Park SDE. 2001. Trypanotolerance in west african cattle and the population genetic effects of selection [Ph.D. thesis] 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, Smouse P. 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539.

Pedron M, Buzatto CR, Singer RB, Batista JAN, Moser A. 2012. Pollination biology of four sympatric species of *Habenaria* (Orchidaceae: Orchidinae) from southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 170: 141–156.

Pellegrino G, Musacchio A, Noce ME, Palermo AM, Widmer A. 2005. Reproductive versus floral isolation among morphologically similar *Serapias* L. species (Orchidaceae). *The Journal of Heredity* 96: 15–23.

Pereira ACS, Borba EL, Giulietti AM. 2007. Genetic amnd morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for the conservation and taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 401-416.

Phillips RD, Dixon KW, Peakall R. 2012. Low population genetic differentiation in the Orchidaceae: implications for the diversification of the family. *Molecular Ecology* 21: 5208–5220.

Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Meyer D, Fay MF, Suzuki RM, Lexer C, Cozzolino S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* 19: 3981-3994.

Ponsie ME, Johnson SD, Edwards TJ. 2007. A morphometric analysis of species boundaries in the *Bonatea cassidea* complex. *Nordic Journal of Botany* 25: 257–267.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.

Richards AJ. 1997. *Plant breeding systems.* London: Chapman & Hall.

Schlichting CD, Levin DA. 1986. Phenotypic plasticity: an evolving plant character. *Biological Journal of the Linnean Society* 29: 37-47.

Schmidt JM, Antlfinger AE. 1992. The level of agamospermy in a Nebraska populations of the *Spiranthes cernua* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 79: 501-507.

Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nature Biotechnology* 18: 233 - 234.

Singer RB. 2001. Pollination biology of *Habenaria parviflora* (Orchidaceae: Habenariinae) in southeastern Brazil. *Darwiniana* 39: 201–207.

Singer RB, Breier TB, Flach A, Farias-Singer R. 2007. The pollination mechanism of *Habenaria pleiophylla* Hoehne & Schlechter (Orchidaceae: Orchidinae). *Functional Ecosystems and Communities* 1: 10-14.

Soliva M, Widmer A. 2003. Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive *Ophrys* (Orchidaceae) species. *Evolution* 57: 2252–2261.

Sramkó G, Gulyás G, V AM. 2011. Convergent evolution in *Ophrys kotschyi* (Orchidaceae) revisited: a study using nrITS and cpIGS sequences. *Annales Botanici Fennici* 48: 97–106.

Ståhlberg D. 2009. Habitat differentiation, hybridization and gene flow patterns en mixed populations of diploid and autotetraploid *Dactylorhiza maculata* s.l. (Orchidaceae). *Evolutionary Ecology* 23: 295-328.

Ståhlberg D, Hedrén M. 2010. Evolutionary history of the *Dactylorhiza maculata* polyploid complex (Orchidaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 503–525.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.

Wallace LE. 2002. Examining the effects of fragmentation on genetic variation in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae): inferences from allozyme and random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Species Biology* 17: 37–49.

Wallace LE. 2003. The cost of inbreeding in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 90: 235-242.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando se observa a morfologia floral e vegetativa do complexo *Habenaria repens*, a primeira impressão que se tem é de que se trata de um grupo com ancestralidade comum recente, constituindo um grupo monofilético. Mas não é isso que mostram os resultados aqui obtidos. De acordo com análises filogenéticas moleculares, os morfotipos incluídos no complexo com base em similaridade morfológica formam três clados não diretamente relacionados. Esse resultado indica uma forte convergência morfológica vegetativa e floral que pode ser observada através de análises morfométricas. Nestas, os morfotipos não se separam de acordo com a análise filogenética e, em análises de agrupamento, morfotipos pertencentes a clados distintos se agrupam, evidenciando como a separação baseada apenas em caracteres morfológicos pode ser complicada. Já uma abordagem de genética populacional corrobora os resultados encontrados pelas análises filogenéticas. A primeira forma agrupamentos que não ferem o proposto pela reconstrução filogenética, mantendo os grupos sempre dentro dos respectivos clados.

Gamarra *et al*. (2010) demonstraram que a morfologia de sementes é de grande valor para a taxonomia da subtribo Orchidinae. Apesar de não terem trabalhado com o gênero *Habenaria*, eles mostraram que análises filogenéticas moleculares são congruentes com caracteres da morfologia de sementes, tanto para a sustentação de gêneros, como *Ophrys*, quanto para grupos dentro deles, como em *Dactylorhiza* e *Orchis*. Uma análise preliminar de microscopia óptica mostrou diferenças de morfologia entre as sementes de representantes de dois dos clados detectados (Figura 4), indicando que caracteres de semente podem ser úteis para a caracterização e discriminação dos grupos. No entanto, nem todos os morfotipos possuíam espécimes com frutos e uma coleta direcionada a esse propósito seria necessária para investigar esta hipótese.

Considerando todas as análises feitas no presente trabalho, os resultados obtidos indicam a existência de ao menos três novas espécies a serem reconhecidas e descritas. Uma avaliação cuidadosa da morfologia deverá ser feita para decidir se os clados deverão sofrer mais subdivisões e, consequentemente, mais espécies serão descritas. *Habenaria* aff. *repens*6, separa-se de todos os outros morfotipos e será reconhecida como uma nova espécie baseado principalmente em seu porte vegetativo, hábito e número de flores por inflorescência, que não passa de três.

O clado A (ver Figura 1.1, capítulo 1) é formado por três morfotipos. O ginostêmio do morfotipo *H.* aff. *repens*7 apresenta uma característica única no complexo. Os canais das anteras e braços do rostelo são convergentes em direção ao ápice, enquanto em todos os demais táxons do complexo os canais das anteras e braços do rostelo são paralelos. Uma análise morfológica e comparação deste morfotipo com outras espécies do complexo e do gênero indicam que se trata de uma espécie nova. Os demais morfotipos pertencentes a esse clado (3 e 4) diferenciam-se em tamanho e em período de floração, não havendo diferenças na forma das suas partes. Dessa forma, novas análises desses morfotipos, incluindo outros marcadores, deve ser feito a fim de determinar se estes devem ser tratados como uma única espécie com elevado polimorfismo de tamanho, ou se é mais adequado considerá-los como espécies distintas. Quanto ao clado B, apesar de possuir diversos subgrupos bem resolvidos e com alto suporte (ver Fig. 1.1, capítulo 1), até o momento não foram encontradas características morfológicas que sustentem a separação de cada subgrupo em nível especifico. Apenas *H. aranifera* é sustentada por todos os marcadores e pode ser diferenciada das demais pela presença de tuberoide. Isto posto, a solução mais adequada é a manutenção de *H. aranifera* e a inclusão dos demais terminais do clado B sob o nome de *H. repens*, devido à dificuldade em obter características morfológicas diagnósticas para separá-las. Provavelmente, estas duas espécies constituem um par progenitor-derivativo, fazendo com que *H. repens* seja uma espécie parafilética, característica comum em plantas.

Em termos de classificação seccional, as espécies do complexo aqui analisadas foram incluídas por Kränzlin (1892, 1901) e Cogniaux (1893) nas seções *Clypeatae* (*H. repens*) e *Pentadactylae* (*H. aranifera*). Nossos resultados mostram que essas duas espécies são morfológica e filogeneticamente relacionadas. A seção *Clypeatae*, tipificada por *H. clypeata*, do México, corresponde a um grupo distinto com distribuição restrita ao México e América Central, enquanto a seção *Pentadactylae*, tipificada por *H. pentadactyla* (Clado C – ver figura 1.1, capítulo 1), embora filogeneticamente próxima do complexo da *H. repens*, apresenta características morfológicas distintas. No entanto, considerando-se que o ramo que separa o clado A colapsa no consenso estrito da parcimônia, é possível que todos os terminais do complexo incluídos na análise, exceto o morfotipo 6, sejam irmãos da seção *Pentadactylae*. Dessa forma, o clado B junto a *H. warmingii* e *H. amambayensis* será incluso provisoriamente na seção *Pentadactylae*, sendo necessária uma análise morfológica detalhada a fim de buscar uma caracterização

morfológica que englobe os táxons adicionados.. Quanto ao clado A, será necessário resolver sua relação com os clados B, C e D, que não puderam ser esclarecidas neste trabalho. Os resultados atuais indicam uma posição isolada deste clado, que poderia ser reconhecido como uma seção, mas um problema neste sentido seria a circunscrição morfológica do grupo, uma vez que há uma sobreposição grande de caracteres morfológicos deste clado com o clado B.

BIBLIOGRAFIA GERAL

Ames O. 1910. *Orchidaceae: Illustrations and studies of the family Orchidaceae*, Vol. 4: The genus *Habenaria* in North America. Stanfordville: Earl M. Coleman (reimpresso em 1979).

Amos W, Hoffman JI, Frodsham A., Zhang L, Best S, Hill AVS. 2006. Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes* 7: 10–14.

Baldwin BG, Markos S. 1998. Phylogenetic utility of the external transcribed spacer (ETS) of 18S-26S rDNA: congruence of ETS and ITS trees of *Calycadenia* (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10: 449–463.

Barbosa AR, Fiorini CF, Silva-Pereira V, Mello-Silva R, Borba EL. 2012. Geographical genetic structuring and phenotypic variation in the *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) ochlospecies complex. *American Journal of Botany* 99: 1477-1488.

Barrett CF, Freudenstein JV. 2011. An integrative approach to delimiting species in a rare but widespread mycoheterotrophic orchid. *Molecular Ecology* 20: 2771–2786.

Bateman RM. Hollingsworth PM. Preston J. Yi-Bo L. Pridgeon A M. Chase MW. 2003. Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 142: 1-40.

Bateman RM, James KE, Rudall PJ. 2012. Contrast in levels of morphological versus molecular divergence between closely related Eurasian species of *Platanthera* (Orchidaceae) suggests recent evolution with a strong allometric component. *New Journal of Botany* 2: 110–148.

Batista JAN, Bianchetti LB, Miranda ZJG. 2006. A revision of *Habenaria* section *Macroceratitae* (Orchidaceae) in Brazil. *Brittonia* 58: 10-41.

Batista JAN, Silva JBF, Bianchetti LB. 2008a. The genus *Habenaria* (Orchidaceae) in the Brazilian Amazon. *Revista Brasileira de Botânica* 31: 105-134.

Batista JAN, Bianchetti LB, Miranda ZJG. 2008b. Two new species of *Habenaria* (Orchidaceae) from the Brazilian cerrado and campo rupestre. *Kew Bulletin* 63: 449-456.

Batista JAN, Mota RC, Abreu NL, Menini Neto L. 2008c. *Habenaria pseudoglaucophylla* (Orchidaceae), a new species from Minas Gerais, Brazil. *Novon* 18: 409-414.

Batista JAN, Bianchetti LB, González-Tamayo R, Figueroa XMC, Cribb PJ. 2011a. A synopsis of New World *Habenaria* (Orchidaceae) I. *Harvard Papers in Botany* 16: 1-47.

Batista JAN, Bianchetti LB, González-Tamayo R, Figueroa XMC, Cribb PJ. 2011b. A synopsis of New World *Habenaria* (Orchidaceae) II. *Harvard Papers in Botany* 16: 233-273.

Batista JAN, Borges KS, De Faria MWF, Proite K, Ramalho AJ, Salazar GA, van den Berg C. 2013. Molecular phylogenetics of the species-rich genus *Habenaria* (Orchidaceae) in the New World based on nuclear and plastid DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67: 95-109.

Bonnin I, Huguet T, Gherardi M, Prosperi J-M, Prosperi I. 1996. High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species , *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers. *American Journal of Botany* 83: 843–855.

Borba EL, Felix JM, Solferini VM, Semir J. 2001. Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isosyme markers. *American Journal of Botany* 88: 419-428.

Borba EL, Semir J, Shepherd GJ. 2001. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* 88: 89-99.

Borba EL, Shepherd GJ, van den Berg C, Semir J. 2002. Floral and vegetative morphometrics of five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. *Annals of Botany* 90: 219-230.

Carnap R. 1950. Logical foundations of probability. Chicago: Univ. Chicago Press.

Catling PM. 1982. Breeding systems of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* 60: 3017-3039.

Catling PM. 1987. Notes on the breeding systems of *Sacoila lanceolata* (Aublet) Garay (Orchidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 74: 58-68.

Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19: 233–257.

Chapuis M-P, Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24: 621–631.

Chase MW, Williams NH, De Faria AD, Neubig KM, Amaral MDCE, Whitten WM. 2009. Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. *Annals of Botany* 104: 387–402.

Cogniaux A. 1893. Habenaria. In: Martius CFP, Eichler AG, Urban I, eds. *Orchidaceae. Fl. Bras*. München: F. Fleischer, *3* 18–102. tabs. 3–18.

Conceição AS, Queiroz LP, Borba EL. 2008. Natural hybrids in *Chamaecrista* sect. *Absus* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae): genetic and morphological evidence. *Plant Systematics and Evolution* 271: 19-27.

Conceição AS, Queiroz LP, Lambert SM, Pereira ACS, Borba EL. 2008. Biosystematics of *Chamaecrista* sect. *Absus* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae) based on allozyme and morphometric analyses. *Plant Systematics and Evolution* 270: 183-207.

Cronk QCB. 1998. The ochlospecies concept. In: Huxley CR, Lock JM, Cutler DF [eds], *Chorology, Taxonomy and Ecology of the Floras of Africa and Madagascar*. 155-170. Kew: Royal Botanic Gardens.

Cruz DT, Selbach-Schnadelbach A, Lambert SM, Ribeiro PL, Borba EL. 2011. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 294: 87–98.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModeltest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.

Dempster AP. Laird NM, Rubin DB. 1977. Maximum Likelihood from incomplete data via the EM Algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 39: 1-38.

Devos N, Tyteca D, Raspé O, Wesselingh RA, Jacquemart A-L. 2003. Patterns of chloroplast diversity among western European *Dactylorhiza* species (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 243: 85–97.

Dieringer D, Schlotterer C. 2003. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3: 167–169.

Doyle JF, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.

Dressler RL. 1981. *The Orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.

Dunsterville GCK, Garay LA. 1966. *Venezuelan Orchids Illustrated 4*. London: Andre Deutsche.

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 : a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5.

Estoup A, Jarne P, Cornuet J-M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591–1604.

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.

Felsenstein G. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Seattle: Department of Genome Sciences, University of Washington.

Goldman DH, van den Berg C, Griffith MP. 2004. Morphometric circumscription of species and infraspecific taxa in *Calopogon* R.Br. (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 247: 37–60.

Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.

Goudet J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics. *The Journal of Heredity* 86: 485–486.

Govaerts R, Pfahl J, Campacci MA, Baptista DH, Tigges H, Shaw J, Cribb P, George A, Kreuz K, Wood J. 2013. World Checklist of Orchidaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew; http://apps.kew.org/wcsp/ (acessado 02 Fevereiro 2013 14:00).

Guttman L. 1954. Some necessary conditions for common-factor analysis. *Psychometrika* 19: 149–161.

Hamrick JL, Godt MJW. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 351: 1291–1298.

Harbaugh DT, Wagner WL, Percy DM, James HF, Fleischer RC. 2009. Genetic structure of the polymorphic *Metrosideros* (Myrtaceae) complex in the Hwaiian islands using nuclear microsatellite data. *PLoS ONE* 4: e4698.

Hoehne FC. 1940. Orchidaceas, *Habenaria*. In: F.C. Hoehne (ed.), *Flora Brasílica* 12: 52-254, tab. 11-122. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo.

Hu J, Lavin M, Wojciechowski MF, Sanderson MJ. 2000. Phylogenetic systematics of the tribe Millettieae (Leguminosae) based on chloroplast *trnK/matK* sequences and its implications for evolutionary patterns in Papilionoideae. *American Journal of Botany* 87: 418-430.

Huelsenbeck JP, Ronquist F, Nielsen R, Bollback JP. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science (New York, N.Y.)* 294: 2310–2314.

Jørgensen MH, Carlsen T, Skrede I, Elven R. 2008. Microsatellites resolve the taxonomy of the polyploid *Cardamine digitata* aggregate (Brassicaceae). *Taxon* 57: 882–892.

Kluge AG. 1989. A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among *Epicrates* (Boidae, Serpentes). *Systematic Zoology* 38: 7–25.

Kränzlin F. 1892. Beiträge zu einer Monographie der Gattung *Habenaria* Willd. *Botanische Jahrbucher für Systematik,Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 16: 52–223.

Kränzlin F. 1901. Orchidacearum genera et species. Vol. I. *Habenaria*. Berlin: Mayer and Müller.

Leoni LS. 1990. *Habenaria* Willd. no municipio de Carangola, MG. *Pabstia* 1: 25-23.

Les DH. 1991. Genetic diversity in the monoecious hydrophile *Ceratophyllum* (Ceratophyllaceae). *American Journal of Botany* 78: 1070–1082.

Lousada JM, Borba EL, Ribeiro KT, Ribeiro LC, Lovato MB. 2011. Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with the landscape in the Espinhaço Range, in southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica* 139: 431–440.

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

Molvray M, Kores PJ, Chase MW. 2000. Polyphyly of mycoheterotrophic orchids and functional influences on floral and molecular characters. In: Wilson KL, Morrison DA, editors. *Monocots: Systematics and Evolution.* Collingwood: CSIRO publishing. pp. 441-448.

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

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

Neiland MRM, Wilcock CC. 1998. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 85: 1657-1671.

Nuttal T. 1818. *The genera of North American plants, and a catalogue of the species, to the year 1817*. Philadelphia: Printed for the author by D. Heartt.

Oliveira RP, Borba EL, Longhi-Wagner HM. 2008. Morphometrics of herbaceous bamboos of the *Raddia brasiliensis* complex (Poaceae-Bambusoideae): implications for the taxonomy of the genus and new species from Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 270: 159-182.

Oliveira RP, Borba EL, Longhi-Wagner HM, Pereira ACS, Lambert SM. 2008. Genetic and morphological variability in the *Raddia brasiliensis* complex (Poaceae-Bambusoideae). *Plant Systematics and Evolution* 274: 25-35.

van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538.

Pabst GFJ, Dungs F. 1975. *Orchidaceae Brasilienses*, v.1. Hildesheim: Kurt Schmersow.

Park SDE. 2001. Trypanotolerance in west african cattle and the population genetic effects of selection [Ph.D. thesis] 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, Smouse P. 2012. GenAlEx 6.5 : Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539.

Pedron M, Buzatto CR, Singer RB, Batista JAN, Moser A. 2012. Pollination biology of four sympatric species of *Habenaria* (Orchidaceae: Orchidinae) from southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 170: 141–156.

Pellegrino G, Musacchio A, Noce ME, Palermo AM, Widmer A. 2005. Reproductive versus floral isolation among morphologically similar *Serapias* L. species (Orchidaceae). *The Journal of Heredity* 96: 15–23.

Pellmyr O, Massey LK, Hamrick JL, Feist MA. 1997. Genetic consequences os specialization: yucca moth behavior and self-pollination in yuccas. *Oecologia* 190: 273-278.

Pereira ACS, Borba EL, Giulietti AM. 2007. Genetic amnd morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for the conservation and taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 401-416.

Pessoa EM, Alves M, Alves-Araújo A, Palma-silva C, Pinheiro F. 2012. Integrating different tools to disentangle species complexes : a case study in Epidendrum (Orchidaceae). *Taxon* 61: 721–734.

Phillips RD, Dixon KW, Peakall R. 2012. Low population genetic differentiation in the Orchidaceae: implications for the diversification of the family. *Molecular Ecology* 21: 5208–5220.

Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Meyer D, Fay MF, Suzuki RM, Lexer C, Cozzolino S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* 19: 3981-3994.

Ponsie ME, Johnson SD, Edwards TJ. 2007. A morphometric analysis of species boundaries in the *Bonatea cassidea* complex. *Nordic Journal of Botany* 25: 257–267.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.

Pridgeon AM, Chase MW. 2001. A phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Lindleyana* 16: 235-271.

Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW. Rasmussen FN. 2001. *Genera Orchidacearum* Vol. 2, Orchidoideae, part 1. New York: Oxford University Press Inc.

Richards AJ. 1997. *Plant breeding systems.* London: Chapman & Hall.

Ribeiro PL, Borba EL, Smidt EC, Lambert SM, Schnadelbach AS, van den Berg C. 2008. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring .in the Brazilian "campos rupestres": implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution* 270: 109-137.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.

Salazar GA, Cabrera LI, Figueroa C. 2011. Molecular phylogenetics, floral convergence and systematics of *Dichromanthus* and *Stenorrhynchos* (Orchidaceae, Spiranthinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 167: 1-18.

Sanger F, Coulson AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94: 441–448.

Schlichting CD, Levin DA. 1986. Phenotypic plasticity: na evolving plant character. *Biological Journal of the Linnean Society* 29: 37-47.

Schlick-Steiner BC, Steiner FM, Seifert B, Stauffer C, Christian E, Crozier RH. 2010. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology* 55: 421–438.

Schmidt JM, Antlfinger AE. 1992. The level of agamospermy in a Nebraska populations of the *Spiranthes cernua* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 79: 501-507.

Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. A poor man’s approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.

Schwarz G. 1978. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* 6: 461–464.

Simmons MP, Ochoterena H. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* 49: 369–381.

Singer RB. 2001. Pollination biology of *Habenaria parviflora* (Orchidaceae : Habenariinae) in southeastern Brazil. D*arwiniana* 39: 201–207.

Singer RB, Breier TB, Flach A, Farias-Singer R. 2007. The pollination mechanism of *Habenaria pleiophylla* Hoehne & Schlechter (Orchidaceae : Orchidinae). *Functional Ecosystems and Communities* 1: 10-14.

Soliva M, Widmer A. 2003. Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive *Ophrys* (Orchidaceae) species. *Evolution* 57: 2252–2261.

Sramkó G, Gulyás G, V AM. 2011. Convergent evolution in *Ophrys kotschyi* (Orchidaceae) revisited : a study using nrITS and cpIGS sequences. *Annales Botanici Fennici* 48: 97–106.

Staden R. 1996. The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology* 5: 233–241.

Ståhlberg D. 2009. Habitat differentiation, hybridization and gene flow patterns en mixed populations of diploid and autotetraploid *Dactylorhiza maculata* s.l. (Orchidaceae). *Evolutionary Ecology* 23: 295-328.

Ståhlberg D, Hedrén M. 2010. Evolutionary history of the *Dactylorhiza maculata* polyploid complex (Orchidaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 503–525.

Sun Y, Skinner DZ, Liang GH, Hulbert SH. 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 26–32.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.

Wallace LE. 2002. Examining the effects of fragmentation on genetic variation in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae): inferences from allozyme and random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Species Biology* 17: 37–49.

Wallace LE. 2003. The cost of inbreeding in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 90: 235-242.

Yeates DK, Seago A, Nelson L, Cameron SL, Joseph L, Trueman JWH. 2011. Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? *Systematic Entomology* 36: 209–217.

APÊNDICE 1

Desenvolvimento de marcadores microsatélites para o complexo *Habenaria repens* (nota científica a ser publicada em conjunto com o desenvolvimento de marcadores microsatélites para o complexo *H. nuda*)

O isolamento dos microssatélites foi feito de acordo com a metodologia proposta por Provan & Wilson (2006). Ao todo, foram obtidos 179 clones positivos, que foram enviados para sequenciamento na companhia Macrogen Inc. Das sequências, apenas 70 eram diferentes. Elas foram examinadas quanto a sua qualidade conforme implementado por Togawa & Brigido (2003) e Togawa *et al.* (2006) em http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/. Em seguida, foi feita uma busca por sequências repetitivas no site http://www.fresnostate.edu/ssrfinder/.(©2009 CaliforniaStateUniversity). Foram encontradas 24 regiões em potencial, das quais foi possível desenhar primers para apenas dez. Os primers foram desenhados com o software online Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000).

Os dez primers desenhados (Tabela A1.1) foram sintetizados acrescidos de uma cauda M13 (Schuelke, 2000) para permitir anelamento com um primer fluorescente durante as amplificações. Inicialmente, seis indivíduos, incluindo aquele utilizado para a construção da biblioteca, foram utilizados em testes de padronização. Foram testadas temperaturas de anelamento de 54 a 66°C, no seguinte sistema, para um volume final de 15 µL: Tampão IB 1X (PhoneutriaBiotech, Belo Horizonte, Brasil), 0,2 mM de dNTPs, 0,04 µM do primer *forward*, 0,16 µM do primer reverso, 0,16 µM do fluoróforo, 0,1 unidade de Taq DNA Polimerase (PhoneutriaBiotech, Belo Horizonte, Brasil) e 5 – 10 ng de DNA. As amplificações foram feitas em termociclador Biocycler MJ96G ou MJ96+, com o ciclo: denaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de 30 segundos de denaturação a 94°C, 45 segundos a temperatura de anelamento (54 a 66°C) e 45 segundos de extensão a 72°C, seguidos por 13 ciclos de 30 segundos de denaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 50°C, extensão por 45 segundos a 72°C e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Dos dez pares de primers, HR03/HR04, HR05/HR06 e HR07/HR08 falharam em amplificar com as condições testadas e HR01/HR02, HR11/HR12 HR15/HR16 e HR19/HR20 amplificaram apenas o indivíduo utilizado para a construção da biblioteca.

Os outros três pares (HR09/HR10, HR13/HR14 e HR17/HR18) foram padronizados conforme a Tabela 2.4, Capítulo 2.

Para teste de polimorfismo, foram selecionados três indivíduos de cada população. As reações foram feitas conforme o sistema (para um volume final de 30 µL): Tampão IB 1X (PhoneutriaBiotech, Belo Horizonte, Brasil), 0,2mM de dNTPs, 0,04µM do primer *forward*, 0,16µM do primer reverso, 0,16µM do fluoróforo, 0,1 unidade de Taq DNA Polimerase (PhoneutriaBiotech, Belo Horizonte, Brasil) e 5–15ng de DNA. As amplificações foram feitas em termociclador Biocycler MJ96G ou MJ96+, com o ciclo: denaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de 30 segundos de denaturação a 94°C, 45 segundos a temperatura de anelamento (Tabela 3) e 45 segundos de extensão a 72°C, seguidos por 13 ciclos de 30 segundos de denaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 50°C, extensão por 45 segundos a 72°C e uma extensão final a 72°C por 60 minutos.

Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 1% e, aqueles que geraram bandas no gel, foram secos e enviados a Macrogen Inc. para eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3730XL (AppliedBiosystems) tendo 500LIZ ou 400HD como padrões de tamanho. Os resultados das análises dos tamanhos dos fragmentos foram visualizados no programa Peak Scanner (AppliedBiosystems) As três regiões apresentaram polimorfismo e foram aplicadas nas populações objeto do estudo.

Tabela A1.1. Caracterização dos dez pares de primers desenhados para regiões microssatélites de *H. repens*. M13 = 5' – TTTTCCCAGTCACGAC – 3'; TF = tamanho aproximado do fragmento.

Região	Motivo	TF	Primer *forward*	Nome	Primer reverso	Nome
HR01/H0R2	(CT)8	173	5' - M13TGATTCCTCATGGTTGTGATTG - 3'	HR1	5' - ACATCCGAGCAGTCCAATTTT - 3'	HR2
HR03/HR04	(GTTG)T(GTTG)4C(GTTG)7	291	5' - M13ACAACTCTTAGGTGGCGTGAGT - 3'	HR3	5' - GCACATACATCATCATCAACCC - 3'	HR4
HR05/HR06	(TGT)6	256	5' - M13AGAAGAATTGCAGAGGTTTTCG - 3'	HR5	5' - GAACTACCAGCACAACAACAGC - 3'	HR6
HR07/HR08	(GA)6 / (TC)4	250	5' - M13CGGGTTGTTGCTTTGATACTTTT - 3'	HR7	5' - TCTGAGGAGAGAGATGGAGAGG - 3'	HR8
HR09/HR10	(CT)5CC(CT)5CC	279	5' - M13CATATCCATGTCTTCTGCC - 3'	HR9	5' - CTCCCGTTTGCTTTATCTTTTG - 3'	HR10
HR11/HR12	(TG)4 / (GC)4C(CA)7	212	5' - M13GGCCATCGCATTGTTGATA - 3'	HR11	5' - GTAGAAGGGGAATGTGGTCAAG - 3'	HR12
HR13/HR14	(TG)6	155	5' - M13GGCATGGAAAAGGGTGGACTTAT - 3'	HR13	5' - TGAGATCAACAAGGATGTCGAA - 3'	HR14
HR15/HR16	(CTGT)6(CT)6	371	5' - M13ACAATGCTTCCCTTCTCATCC - 3'	HR15	5' - TCTTTCGAGACATCCATTCCTT - 3'	HR16
HR17/HR18	(TCC)4T(TCC)	120	5' - M13GGGCCGCAGAAAATCTA - 3'	HR17	5' - ATGTCTCCAAGCAGAGAAAAGC - 3'	HR18
HR19/HR20	(GT)6	274	5' - M13CCAACTACTACGATTTTGTGCG - 3'	HR19	5' - TGTACCCAACGCATGAATACAC - 3'	HR20

REFERÊNCIAS BIOBLIOGRÁFICAS

Provan J, Wilson PJ. 2006. Development of microsatellites for the peat moss *Sphagnum capillifolium* using ISSR cloning. *Molecular Ecology Notes* 7: 254–256.

Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* 132: 365 – 386.

Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nature Biotechnology* 18: 233–234.

Togawa RC, Brigido MM, Santos CMR, Júnior MTS. 2006. The use of the.PHPH tool to assembly the gene sequences that are candidate to the biotic and abiotic stress in *Musa acuminata*. In: 35th annual meeting of the Brazilian Society of Biochemestry and Molecular Biology, Águas de Lindóia, São Paulo, Brazil.

Togawa RC, Brigido MM. 2003. PHPH : Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In: 1st International Conference on Bioinfomatics and Computacional Biology, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

APÊNDICE 2

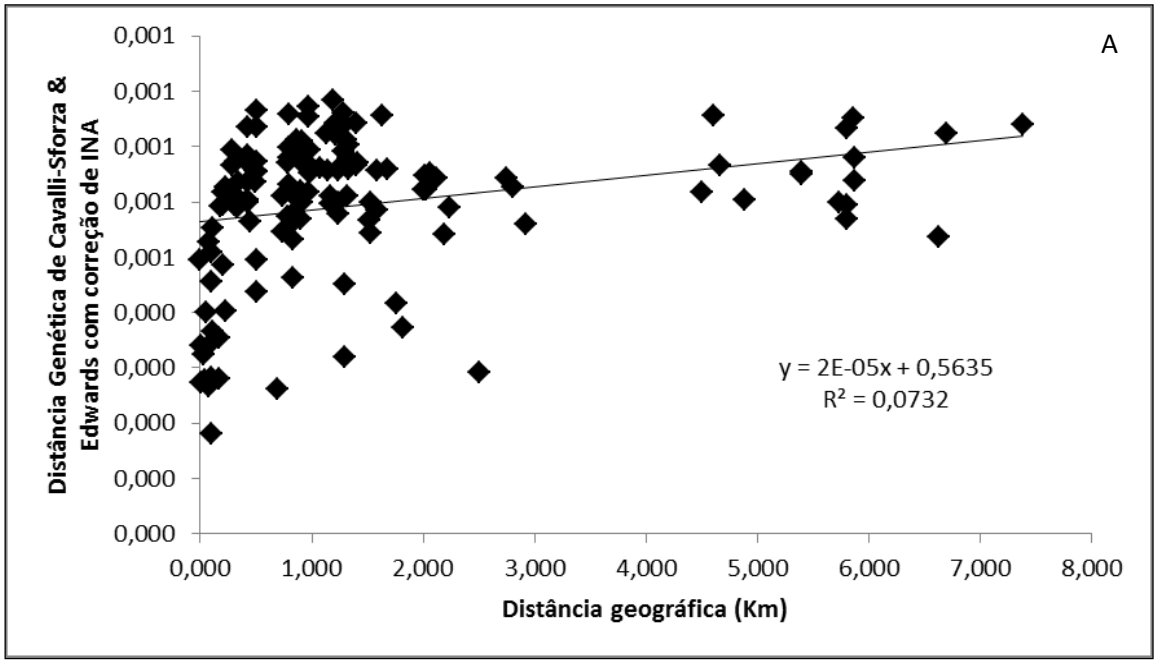
Tabela A2.1. Caracterização das 20 populações do complexo *H. repens* em função dos cinco *loci* microssatélites. Para código das populações e informações sobre os *loci* consultar as tabelas 2.1 e 2.4 respectivamente. N = número de indivíduos que amplificaram; Na = número de alelos; H_o = heterozigosidade observada; H_e = heterozigosidade esperada; F_{is} = índice de fixação; RA = riqueza alélica. N/A = cálculos não realizados (*loci* monomórficos).

Pop	Locus	N	Na	H_o	H_e	F_{is}	RA
H. aranifera							
A_SF	HR17/HR18	15	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR9/HR10	15	2	0,067	0,064	-0,034	1.267
	SSRHN12	15	2	0,067	0,064	-0,034	1.267
	HR13/HR14	15	3	0,600	0,491	-0,222	2.537
	SSRHN5	15	4	0,200	0,727	0,725	3.622
A_SJ	HR17/HR18	15	2	0,333	0,491	0,321	1.996
	HR9/HR10	15	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN12	15	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR13/HR14	15	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN5	15	4	0,867	0,607	-0,429	2.924
A_UR	HR17/HR18	15	2	0,200	0,180	-0,111	1.621
	HR9/HR10	13	2	0,308	0,260	-0,182	1.795
	SSRHN12	15	2	0,533	0,391	-0,364	1.945
	HR13/HR14	15	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN5	14	6	0,214	0,755	0,716	4.201
H. repens							
R_AG	HR17/HR18	20	2	0,000	0,095	1,000	1.364
	HR9/HR10	19	2	0,053	0,051	-0,027	1.211
	SSRHN12	20	2	0,050	0,049	-0,026	1.200
	HR13/HR14	20	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN5	15	7	0,467	0,633	0,263	3.705
R_CR	HR17/HR18	10	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR9/HR10	10	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN12	10	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR13/HR14	10	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN5	10	2	0,400	0,320	-0,250	1.898
R_EU	HR17/HR18	6	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR9/HR10	6	2	0,000	0,278	1,000	1.909
	SSRHN12	5	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR13/HR14	6	2	0,500	0,375	-0,333	1.982
	SSRHN5	4	1	0,000	0,000	N/A	1.000
R_PB	HR17/HR18	16	2	0,063	0,061	-0,032	1.250
	HR9/HR10	16	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN12	16	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR13/HR14	16	2	0,188	0,170	-0,103	1.592

	SSRHN5	16	3	0,563	0,432	-0,303	2.341
R_VÇ1	HR17/HR18	12	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR9/HR10	12	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN12	12	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR13/HR14	12	2	0,083	0,080	-0,043	1.333
	SSRHN5	12	3	0,417	0,392	-0,062	2.231
R_VÇ2	HR17/HR18	8	2	0,125	0,117	-0,067	1.500
	HR9/HR10	8	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN12	8	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR13/HR14	8	3	0,250	0,227	-0,103	2.000
	SSRHN5	8	3	0,375	0,539	0,304	2.497
H. aff. *repens*2							
2_MC	HR17/HR18	15	2	0,067	0,064	-0,034	1.267
	HR9/HR10	15	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN12	15	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR13/HR14	15	2	0,133	0,124	-0,071	1.469
	SSRHN5	15	1	0,000	0,000	N/A	1.000
H. aff. *repens*3							
3_DI	HR17/HR18	22	3	0,545	0,475	-0,148	2.464
	HR9/HR10	22	3	0,091	0,492	0,815	2.301
	SSRHN12	22	2	0,000	0,087	1,000	1.334
	HR13/HR14	22	4	0,364	0,369	0,014	2.193
	SSRHN5	15	1	0,000	0,000	N/A	1.000
3_GM	HR17/HR18	10	2	1,000	0,500	-1,000	1.999
	HR9/HR10	10	2	0,000	0,480	1,000	1.996
	SSRHN12	10	2	0,000	0,180	1,000	1.653
	HR13/HR14	10	3	0,400	0,460	0,130	2.550
	SSRHN5	9	3	0,667	0,475	-0,403	2.415
H. aff. *repens*4							
4_CM	HR17/HR18	14	3	0,786	0,503	-0,563	2.272
	HR9/HR10	12	2	0,000	0,375	1,000	1.941
	SSRHN12	14	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR13/HR14	14	3	0,071	0,135	0,472	1.571
	SSRHN5	13	2	0,846	0,488	-0,733	1.996
4_DI	HR17/HR18	16	3	0,563	0,486	-0,157	2.397
	HR9/HR10	17	2	0,000	0,415	1,000	1.959
	SSRHN12	16	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR13/HR14	17	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN5	17	3	0,765	0,535	-0,430	2.618
4_MV	HR17/HR18	14	5	0,286	0,467	0,388	2.932
	HR9/HR10	14	2	0,000	0,133	1,000	1.497
	SSRHN12	11	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR13/HR14	15	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN5	11	3	1,000	0,574	-0,741	2.602
H. aff. *repens*5							
5_DM1	HR17/HR18	15	4	0,200	0,187	-0,071	1.800

	HR9/HR10	17	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN12	16	2	0,063	0,061	-0,032	1.250
	HR13/HR14	17	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN5	17	2	0,059	0,057	-0,030	1.235
5_DM2	HR17/HR18	13	3	0,231	0,210	-0,099	1.837
	HR9/HR10	13	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN12	14	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	HR13/HR14	14	1	0,000	0,000	N/A	1.000
	SSRHN5	14	2	0,857	0,500	-0,714	1.998
H. aff. *repens*7							
7_CM	HR17/HR18	16	5	0,563	0,537	-0,047	3.184
	HR9/HR10	15	5	0,467	0,589	0,208	3.284
	SSRHN12	16	4	0,625	0,701	0,109	3.347
	HR13/HR14	16	4	0,438	0,482	0,093	2.693
	SSRHN5	16	3	0,125	0,119	-0,049	1.500
7_CP	HR17/HR18	25	5	0,960	0,629	-0,527	2.971
	HR9/HR10	25	3	0,120	0,185	0,351	1.711
	SSRHN12	25	2	0,680	0,471	-0,443	1.985
	HR13/HR14	25	2	0,240	0,211	-0,136	1.670
	SSRHN5	25	3	0,080	0,302	0,735	1.940
7_SB	HR17/HR18	12	4	0,667	0,566	-0,178	2.865
	HR9/HR10	12	2	0,750	0,469	-0,600	1.991
	SSRHN12	13	4	0,846	0,710	-0,192	3.445
	HR13/HR14	13	3	0,231	0,210	-0,099	1.837
	SSRHN5	13	2	0,231	0,393	0,414	1.952

Figura A2.1. Correlação entre as matrizes de Distância geográfica e de Distância genética de Cavalli-Sforza & Edwards com correção de INA para populações do complexo *Habenaria repens* para dados de cinco *loci* microssatélites; **A.** Distância geográfica em kilômetros; **B.** Distância geográfica transformada para Ln(x+1).



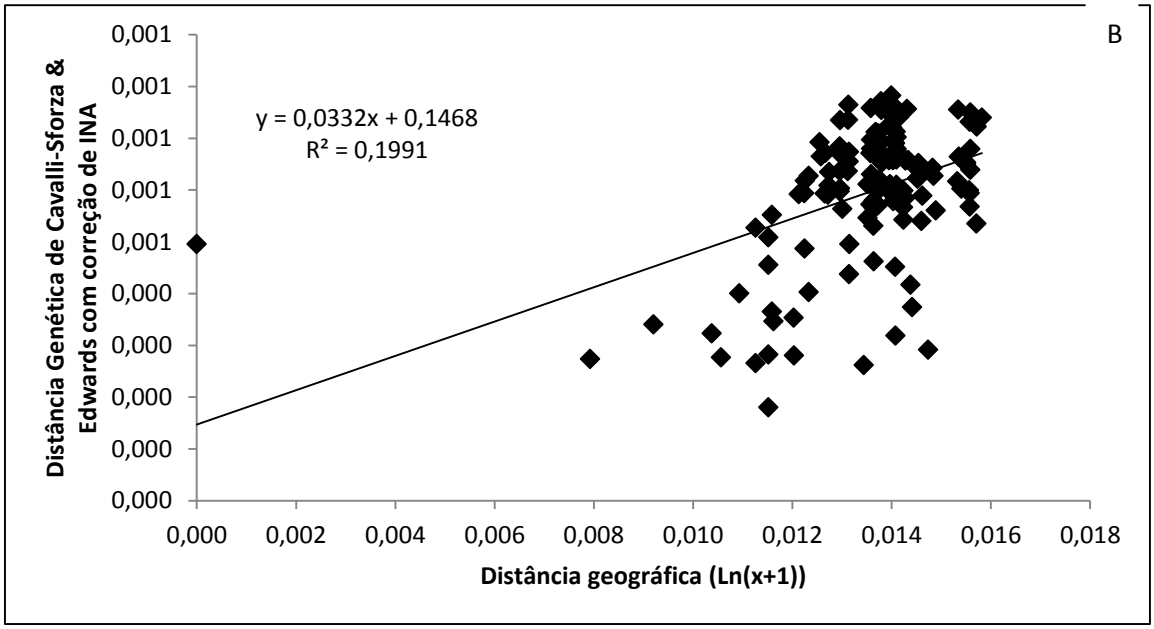
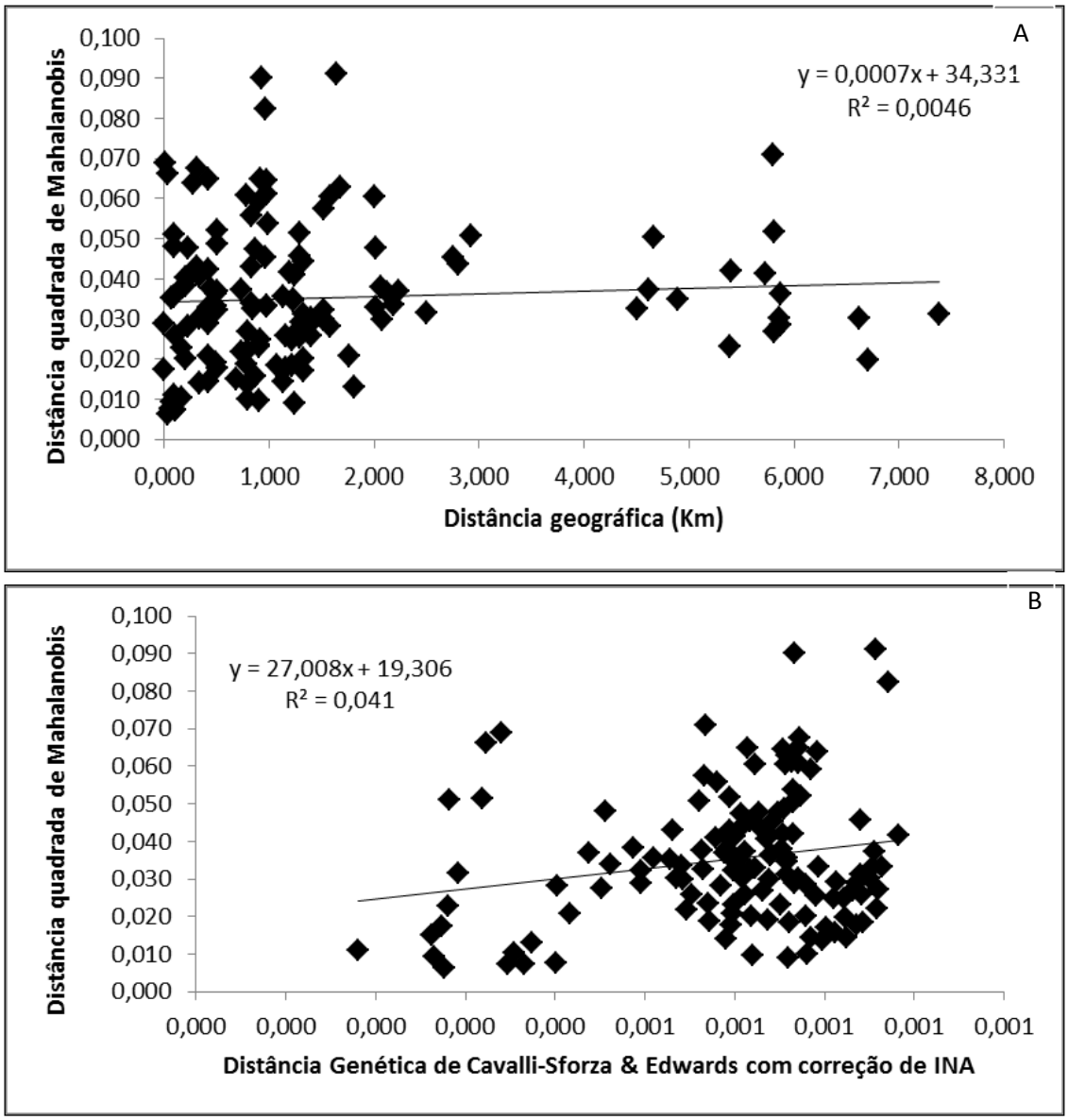



Figura A2.2. **A.** Correlação entre as matrizes de Distância geográfica e de Distância quadrada de Mahalanobis obtida a partir de dados morfológicos de flores para populações do complexo *Habenaria repens*; **B.** Correlação entre as matrizes de Distância genética de Cavalli-Sforza & Edwards com correção de INA para dados de cinco *loci* microssatélites e de Distância quadrada de Mahalanobis obtida a partir de dados morfológicos de flores.