ALINE AMÁLIA DO VALE

# ESTUDOS BIOSSISTEMÁTICOS NO GÊNERO *HABENARIA* WILLD. (ORCHIDACEAE)

Belo Horizonte – Minas Gerais
2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**
Departamento de Botânica
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**

PPGBV
U F M G

UFMG

ALINE AMÁLIA DO VALE

# ESTUDOS BIOSSISTEMÁTICOS NO GÊNERO *HABENARIA* WILLD. (ORCHIDACEAE)

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.**

**Área de Concentração: Taxonomia Vegetal**

**BELO HORIZONTE – MG**
**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**
Departamento de Botânica
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**

PPGBV
U F M G

UFMG

ALINE AMÁLIA DO VALE

# ESTUDOS BIOSSISTEMÁTICOS NO GÊNERO *HABENARIA* WILLD. (ORCHIDACEAE)

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.**

**Área de Concentração: Taxonomia Vegetal**

**Orientador: Prof. Dr. João Aguiar Nogueira Batista**
**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba**
**Universidade Federal do ABC**

**BELO HORIZONTE – MG**
**2015**

043 Vale, Aline Amália do.
Estudos biossistemáticos no gênero Habenaria Willd. (Orchidaceae) [manuscrito] / Aline Amália do Vale. – 2015.

185 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: João Aguiar Nogueira Batista. Co-orientador: Eduardo Leite Borba.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Botânica.

1. Habenaria - Teses. 2. Filogenia – Teses. 3. Taxonomia vegetal - Teses. 4. Estudos biossistemáticos. 5. Cromossomos vegetais – Teses. 6. Botânica – Teses. I. Batista, João Aguiar Nogueira. II. Borba, Eduardo Leite. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Botânica. IV. Título.

CDU: 581

UFMG

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**
Universidade Federal de Minas Gerais
ICB - Departamento de Botânica

*Tese defendida e aprovada em 12 de fevereiro de 2015, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:*

*Dr. João Aguiar Nogueira Batista- UFMG*

*Dr. Eric de Camargo Smidt – Universidade Federal do Paraná*

*Dr. Rodrigo Bustos Singer- Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

*Dr. Alexandre Salino- UFMG*

*Dra. Marta Svartman- UFMG*

*A mi querido papá*

*"Não posso fingir que não estou com medo.*
*Mas meu sentimento predominante é de gratidão.*
*Amei e fui amado; recebi muito e dei algo em troca; li, viajei, pensei e escrevi.*
*Acima de tudo, fui um ser sensível,*
*um animal pensante nesse planeta maravilhoso*
*e isso, por si só,*
*tem sido um enorme privilégio e aventura."*

*Oliver Sacks (2015)*

**Agradecimentos**

- À minha amada família: meus pais - Vera e Alaor e Alison, pelo verdadeiro amor, apoio e confiança incondicionais.

- Ao meu orientador Dr. João Aguiar Nogueira Batista, por aceitar me orientar sem me conhecer, por compartilhar comigo seus conhecimentos sobre as habenárias sempre com muita paciência e uma incrível didática, pela disposição em acompanhar o trabalho, pelo apoio à minha ideia do doutorado sanduíche e pelo também apoio às muitas ideias e projetos que surgiram nesses quatro anos. Com certeza sem o João não seria possível realizar este trabalho.

- À Universidade Federal de Minas Gerais.

- Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo no país e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo no exterior e pelo o financiamento que possibilitou o desenvolvimento desse projeto.

- Ao Dr. Eduardo Leite Borba, coorientador na parte de genética de populações, pelos conselhos dados.

- Ao Dr. Gerardo Salazar também pela orientação, por me receber tão bem no México, por me aceitar em seu laboratório e pelos ensinamentos (inclusive na bancada fazendo experimentos).

- Ao Dr. Leonardo P. Felix por me receber em Areia (PB) e compartilhar comigo os seus conhecimentos de citogenética e pelo auxílio com o capítulo 1.

- Ao Dr. Eric Smidt, ao Dr. Rodrigo Singer, à Dra. Marta Svartman e ao Dr. Alexandre Salino por gentilmente terem aceitado fazer parte da banca no dia da defesa.

- À amiga Dra. Karina Proite pela ajuda na bancada, nas análises, pelos conselhos, pelo auxílio com a orientação no cap. 3 e pelas conversas super divertidas no laboratório e fora dele.

- Ao Rolando Jiménez pelo auxílio com a identificação das spp. de *Habenaria* mexicanas, por ter me recebido sempre cordialmente todas as vezes no herbário AMO e também pelo auxílio no campo.

- À querida amiga Bárbara Leal pela imensa e inestimável ajuda com as análises do cap. 3 e da nota de SSR – obrigada pelo auxílio em todos os momentos em que precisei e por sempre estar disposta a ajudar e com um sorriso nos lábios. Muitíssimo obrigada pela amizade nesses durante esses anos.

- Ao Dr. Pedro Mercado pela imensa ajuda com as análises citogenéticas na UNAM e por gentilmente ceder seu laboratório e trabalhar comigo.

- Ao querido Vinícius Dittrich por todo companheirismo, pela imensa ajuda nas coletas, revisando os projetos, o inglês, por apoiar a minha ida para o doutorado sanduíche e por todos os ensinamentos tanto no mundo da botânica quanto na vida.

- À toda equipe formada neste trabalho do laboratório de Biossistemática e Sistemática Molecular: Daniel Venturini, Marcella Baroni, Carolina Marinho, Karina Proite, Bruna Lau, Antônio Massensini, Bárbara Leal, Ana Paula Martins, Frederic Mendes Hughes, obrigada pela imensa ajuda e boa vontade na realização deste. Sem vocês este trabalho também não teria sido feito!

- À grande amiga e professora Dra. Fátima Salimena por me iniciar neste maravilhoso mundo das plantas, por acreditar no meu trabalho e me dar a maior força sempre.

- Ao querido amigo e professor Dr. Luiz Menini Neto, que sempre está presente nos meus agradecimentos desde a minha monografia - obrigada por todos os ensinamentos, por toda ajuda (sempre inegável e infalível) pelo auxílio com o projeto quando entrei no doutorado, pela ajuda com a qualificação, com os mapas dos capítulos 3 e 4 e também pela confecção das pranchas do cap. 4. Enfim, pela valiosa amizade a mim dispensada.

- Ao amigo e Dr. Marco Antônio Manhães pelo auxílio com as análises estatísticas do cap. 3, pelas ótimas conversas e pela amizade durante todos esses anos.

- Às companheiros que me auxiliaram de forma tão gentil nas coletas: - Luciano de Bem Bianchetti (em Brasília), Rodrigo Pacheco (em Uberlândia), Ana Cláudia (em vários lugares...), Samuel Siriani, Marcella Baroni, Eric Hattori, Maria José Reis, Fernando Silveira, Caetano Troncoso, Mariana Augsten, Anete Formiga, Ana Cristina Tala e ao meu querido pai Alaor do Vale.

- À Ana Cláudia, ao Eric Hattori, ao João Batista e à Nara Mota por terem se lembrado de mim durante as suas coletas e fixado botões florais para as análises de citogenética.

- Aos funcionários e aos chefes de Unidades de Conservação que permitiram as minhas coletas e que me receberam tão bem no Parque Nacional da Serra do Cipó, Parque Nacional Sempre-vivas, Parque Nacional Chapada Diamantina, Parque Nacional Chapada dos Veadeiros, Parque Nacional do Itatiaia, Parque Nacional da Serra da Capivara, Parque Estadual Rio Preto, Parque Estadual Itambé, Parque Estadual Serra do Cabral, Parque Estadual do Ibitipoca e Parque Estadual do Itacolomi.

- Aos proprietários da Fazenda Chapada Imperial (DF) em especial à Marta Imperial, quem gentilmente autorizou a coleta no local. Agradeço também ao gentil funcionário Renato pelo grande auxílio.

- Também à direção da RPPN Reserva Natural do Caraça por permitirem as coletas ali realizadas.

- Aos amigos do laboratório de Sistemática Vegetal - por serem uma família e por me receberem tão bem como membro dela - pelos incontáveis dias divertidos que desfrutei com vocês: Ana Cláudia (amor), Talita Mota, Suzana Moreira, Danilo Neves, Bruno Carvalho, Bruno Falcão, Liliane Paixão, Marcelo Bueno, Thaís Almeida, Nara Mota, Érica Borsali, Mariana Augsten, Pedro Miranda, Luiza Fonseca, Luiz Neto, Raquel Viveros, Juliana Francisco, Mariana Bünger e à doce Luciana Kamino.

- Ao amigo “mega-eficiente” André Gasper pelos “socorros” prestados em qualquer hora do dia enviando arquivos, ajudando com dicas sobre as análises e até mesmo escutando as lamúrias.

- *A mis amigos y hermanos mexicanos* - que me receberam tão bem no México e com quem tive o enorme privilégio de conviver – Ana Martinez (Anita), Gabriela Cruz (Gabichu), Miguel Castañeda (Miguelito), Claudia Liz, Alejandro Oceguera Figueroa (*muy querido* Dr. F.), Angélica Guerreiro, Montserrat Vazquez, Paty Rosas, Jesus Ricardo, Hector Huerta: obrigada por não me deixarem sentir só nem um minuto sequer, estando tão longe de casa. *Los quiero muchísimo!*

- Aos amigos brasileiros Cristiano Buzzato e Leonardo Guimarães pela imensa ajuda nos meus primeiros dias no México.

- Aos amigos da botânica: Cleber Chaves (Daí), Anete Formiga, Alberto Teixido, Vinícius Kuster e Renê Carneiro, sempre me encontrando com sorrisos e abraços nos corredores da botânica.

- Aos professores do departamento de botânica que compartilharam comigo os seus conhecimentos na disciplina de MTE (Morfologia e Taxonomia de Espermatófitas): Dr. Clemens Schlindwein, Dr. João Batista, Dr. João Renato Stehmann e Dr. Leandro Assis.

- Aos muito queridos amigos do Colégio Rui Barbosa e agregados: Cláudia Tavares, Alex Manzi, Geiza e Samir Nassif, pelos divertidíssimos momentos compartilhados.

- À minha “amiga-irmã” Luisa Brasil, pela sempre amizade e companhia constante mesmo estando à uma enorme distância, pelo apoio, amor e pelo carinho de sempre.

- À amiga Priciane Ribeiro pela amizade, pelas conversas do dia-a-dia que me ajudaram tanto a vencer tudo isso, e também pelo auxílio com as análises do cap. 3. Obrigada pela agradável companhia durante esses anos convivendo juntas.

- À querida amiga Verônica Belchior por me receber duas vezes para morar temporariamente em sua casa, me recebendo sempre com sorrisos, maravilhosas conversas, deliciosos cafés e uma agradável companhia sempre. E à também querida amiga Talita Mota, por me receber com tanto carinho em casa, pelas conversas sempre divertidas, sempre com tantos sorrisos.

- À saudosa amiga baiana Suzana Meira por me receber várias vezes na sua casa durante as minhas coletas em Brasília. E por toda amizade, carinho e aprendizado que carregarei para sempre.

- Aos meus amigos de infância/adolescência: - Guilherme Oliveira (Coruja) pelos cafés engraçados na UFMG e por ser sempre “ouvidos”, pela amizade de tantos e tantos anos; - à amiga Carolina Crespo pelo auxílio nos meus primeiros meses em Belo Horizonte - obrigada por me receber em sua casa e por toda amizade e ajuda; aos amigos Henrique Magalhães (Chaves) e Michele Hildebrando, por todas as infinitas risadas e momentos divertidos em Varginha; - ao Luiz Gustavo Simões Mendes pelo apoio em todos os momentos durante os seis primeiros anos da minha jornada acadêmica (desde o colégio até o mestrado) e pelos muitos anos compartilhados das nossas vidas – eles também me ajudaram a ser o que sou hoje. Sem vocês eu não teria chegado até aqui.

- Aos amigos do herbário CESJ: Marco Manhães, José Hugo, Luiz Menini, Fatinha - pelas conversas engraçadas e pelo ótimo clima de trabalho.

- Ao querido e saudoso Ariosto Ardila, pelas mensagens durante todos esses quatro anos, pela amizade mesmo estando tão longe, pelo incalculável aprendizado que vou levar para a vida toda.

- Ao meu muito querido tio Luís pelo seu enorme carinho e disposição em sempre estar ao meu lado; aos meus amados primos pelo carinho de sempre: Stanley, Steffanie, Elaine, Odair e Néia – obrigada pelo amor com que sempre me receberam.

- Às amadas amigas que me ajudaram muito com seu apoio e entenderam todos esses dez anos (acadêmicos) da minha ausência: Miriam Moreira, Renata Casimiro, Roberta Casimiro e Amanda Melo.

- E assim como fiz na minha dissertação, novamente agradeço às plantinhas: por serem os seres mais lindos, incríveis, fantásticos e misteriosos do planeta!

O meu muito obrigada!

ÍNDICE

RESUMO GERAL.....I
ABSTRACT.....II

INTRODUÇÃO GERAL .....1

CAPÍTULO 1 - Números cromossômicos no gênero *Habenaria* Willd. (Orchidaceae).....6
Introdução .....7
Material e Métodos ..... 9
Resultados .....13
Discussão .....18
Conclusões .....29
Referências bibliográficas.....30
Apêndice .....37

CAPÍTULO 2 - Filogenia molecular dos clados mexicanos e centro-americanos do gênero *Habenaria* Willd. (Orchidaceae) e suas implicações taxonômicas.....40
Introdução .....41
Material e Métodos .....42
Resultados .....48
Discussão .....51
Considerações finais .....64
Referências bibliográficas.....64

CAPÍTULO 3 - Variabilidade morfológica e genética no complexo *Habenaria nuda* Lindl. (Orchidaceae) .....69
Introdução .....70
Material e Métodos .....73
Resultados .....83
Discussão .....103
Considerações finais .....111
Referências bibliográficas.....111
Apêndice .....117

CAPÍTULO 4 - Estudos taxonômicos no complexo *Habenaria nuda* Lindl. (Orchidaceae) .....
.....127
Introdução .....128
Material e Métodos .....130
Resultados .....131
Considerações finais .....162
Referências bibliográficas.....167

CONSIDERAÇÕES FINAIS .....169

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....170

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 -
Figura 1 – Figuras representativas da variação de números cromossômicos encontrados .....14
Figura 2 – Mapa de distribuição das espécies que possuem contagens cromossômicas disponíveis na literatura .....15
Figura 3 – Modelo sobre as possíveis tendências de supostas linhagens entre os números cromossômicos somáticos encontrados em espécies de *Habenaria* .....17
Figura 4 – Primeira parte da árvore obtida pela análise de máxima verossimilhança utilizando uma região do genoma nuclear (ITS) e parte do gene *matK* ..... 19
Figura 5 – Segunda parte da árvore obtida pela análise de máxima verossimilhança utilizando uma região do genoma nuclear (ITS) e parte do gene *matK*.....20

CAPÍTULO 2 -
Figura 1 – Mapa demonstrando os principais sistemas orográficos do México .....43
Figura 2 – Consenso de maioria obtido da análise filogenética bayesiana das espécies mesoamericanas e sul-americanas de *Habenaria* .....49
Figura 3 – Morfologia floral de algumas espécies de *Habenaria* ocorrentes no México.....54
Figura 4 – Morfologia floral de algumas espécies de *Habenaria* ocorrentes no México ..... 55
Figura 5 – Distribuição de *Habenaria* Seção *Habenaria* ..... 57
Figura 6 – Mapa da distribuição no México das espécies de *Habenaria* Seção *Clypeatae* incluídas nas análises filogenéticas .....61
Figura 7 – Distribuição de *Habenaria* Seção *Novemfidae* ..... 63

CAPÍTULO 3 -
Figura 1 - Distribuição geográfica dos dez morfotipos abordados nas análises de variabilidade genética e morfométrica ..... 81
Figura 2 - Morfologia floral dos morfotipos abordados neste trabalho e listados na tabela 2..82
Figura 3 - Consenso de maioria obtido da análise filogenética bayesiana das espécies de *Habenaria*, com ênfase no clado que compreende o complexo *Habenaria nuda*. .....97
Figura 4 - Representações dos escores nos eixos 1 e 2 da PCA de 19 caracteres florais e vegetativos de 13 populações estudadas .....98
Figura 5 - Representação dos escores nos eixos 1 e 2 da CVA de 19 caracteres florais e vegetativos de populações estudadas .....99
Figura 6 - Relações fenéticas entre 13 populações analisadas utilizando a matriz a distância quadrada de Mahalanobis entre os centroides, baseado em 19 caracteres morfológicos florais e vegetativos .....100
Figura 7 - Análise Bayesiana de atribuição genética de 293 indivíduos analisados neste trabalho, distribuídos em 13 populações, a partir de seis *loci* de marcadores microssatélites..... .....101
Figura 8 - Relações fenéticas entre 13 populações analisadas, baseadas na matriz de distância de Cavalli-Sforza construída a partir da genotipagem de seis marcadores microssatélites, utilizando *Neighbor-joining* como algoritmo de agrupamento.....102

CAPÍTULO 4 –
Figura 1 - *Habenaria adpressifolia* nom. et stat. nov. .....133
Figura 2 - *Habenaria vallislunae* sp. nov. .....136
Figura 3 - *Habenaria brasiliensis* sp. nov.....139

Figura 4. *Habenaria septentrionalis* sp. nov.....142
Figura 5. *Habenaria oreadica* sp. nov. .....145
Figura 6. *Habenaria proiteana* sp. nov.....148
Figura 7. *Habenaria pseudonuda* sp. nov. .....151
Figura 8. *Habenaria nuda* Lindl. .....154
Figura 9. *Habenaria rodriguesii* Cogn. .....157
Figura 10. *Habenaria nasuta* Rchb. f. & Warm. .....160
Figura 11 - Mapa de distribuição dos táxons *Habenaria nasuta*, *H. nuda*, *H. proiteana* sp.nov. inéd., *H. pseudonuda* sp. nov. inéd., *H. rodriguesii*, *H. septentrionalis* sp. nov. inéd., *H. vallislunae* sp. nov. inéd. .....161
Figura 12 – Mapa de distribuição dos táxons *Habenaria adpressifolia* comb. et stat. nov., *H. brasiliensis* sp.nov. inéd., *H.* oreadica sp. nov. inéd. .....161

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 –
Tabela 1 – Dados referentes às sequências retiradas do *GenBank* de ITS e de parte do gene *matk* dos táxons adicionais utilizados na filogenia realizada neste trabalho ..... 11
Tabela 2 – Táxons de *Habenaria* analisados neste trabalho: identificação das espécies, dados de localidade de coleta, número voucher, contagem gametofítica (n); contagem esporofítica (2n) e número de populações analisadas .....12
Tabela 3 – Variação de números cromossômicos no gênero *Habenaria* para o Velho Mundo e o Novo Mundo .....16
Apêndice - Táxons de Habenaria e de gêneros próximos com números cromossômicos disponíveis na literatura. Contagem gametofítica (n); contagem esporofítica (2n), localidade (país) e referências .....37

CAPÍTULO 2 -
Tabela 1 - Informação sobre os espécimes ocorrentes no México incluídos nas análises filogenéticas neste trabalho .....45
Tabela 2 – Caracterização das regiões sequenciadas para a análise filogenética e os modelos escolhidos pelo critério de BIC para cada partição utilizada na análise filogenética bayesiana .....50

CAPÍTULO 3 -
Tabela 1 - Informação sobre os espécimes utilizados nas amplificações realizadas neste trabalho para as análises filogenéticas. Os vouchers estão depositados no Herbário BHCB . 79
Tabela 2 - Listagem dos morfotipos, abreviatura, número e localidade das populações coletadas ..... 80
Tabela 3 - Estatística descritiva para os 19 caracteres morfológicos medidos para as análises morfométricas de 13 populações analisadas .....90
Tabela 4 – Caracterização das regiões sequenciadas para a análise filogenética e os modelos escolhidos pelo critério de BIC para cada partição utilizada na análise filogenética bayesiana .....91
Tabela 5 - Correlação entre variáveis e eixos significativos (autovalor >1) da análise de discriminates (CVA) de 19 caracteres morfológicos florais e vegetativos de 13 populações analisadas .....93
Tabela 6 - Caracterização dos seis *loci* microssatélites utilizados no estudo de variabilidade genética de 13 populações pertencentes ao complexo *H. nuda* .....94
Tabela 7 - Diversidade genética das 13 populações estudadas .....95
Tabela 8 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) média para seis *loci* microssatélites em diferentes níveis hierárquicos, considerando-se os cinco grupos morfológicos (táxons) envolvidos e os quatro grupos genéticos resultantes da análise bayesiana de estruturação genética a partir do programa Structure .....96
Apêndice – Table 1- Characterization of microsatellite *loci* in *Habenaria nuda* and *H. repens* .....121
Apêndice – Table 2 - Results of primer screening for seven microsatellites in two populations of *Habenaria nuda* .....124
Apêndice – Table 3 - Results of primer screening for five microsatellites *loci* in two populations of *Habenaria repens* .....124

CAPÍTULO 4 –

Tabela 1- Comparação de caracteres diagnósticos para algumas espécies do complexo *Habenaria nuda* .....166

## RESUMO GERAL

O gênero *Habenaria* é um dos maiores gêneros de orquídeas no país, com cerca de 170 espécies distribuídas por todo o território. Uma filogenia molecular envolvendo as espécies do Novo Mundo foi realizada e a partir dela foi possível inferir inúmeros cenários evolutivos dentro do gênero. Um deles seria uma correspondência entre os números cromossômicos e os clados apresentados, indicando que esse tipo de análise teria potencial para esclarecer aspectos ligados à taxonomia e filogenia do gênero, e este foi o primeiro objetivo deste trabalho. Dois dos maiores clados encontrados nessa mesma filogenia, o clado relacionado à *Habenaria* seção *Nudae* e o clado com espécies mexicanas, não apresentaram boa resolução. Em relação ao clado de espécies mexicanas e centro-americanas, a filogenia realizada contou com uma pequena amostragem e espécies com diferenças morfológicas se agruparam no mesmo clado, fato que levou os autores desde trabalho a sugerirem que o aumento da amostragem seria crucial para uma melhor resolução do grupo. Já a *Habenaria* seção *Nudae* foi bem amostrada na filogenia realizada, porém, na mesma foram utilizados apenas dois marcadores moleculares o que levou ao terceiro objetivo deste trabalho: a utilização de um maior número de marcadores moleculares na análise filogenética a fim de melhorar a resolução de parentesco entre os táxons e também de outras ferramentas como a análise de variabilidade genética e morfológica dos espécimes envolvidos. No presente trabalho foi possível observar que os números cromossômicos não apresentam uma correspondência direta e uniforme em relação à distribuição dos clados apresentados na filogenia e que as variações cromossômicas observadas nas espécies dentro do gênero possivelmente surgiram de forma independente. As árvores obtidas após o aumento da amostragem das espécies de *Habenaria* que ocorrem no México e na América central revelaram uma forte estruturação geográfica e a divisão das espécies mexicanas em dois subclados não diretamente relacionados. As diferenças morfológicas apresentadas pelas espécies sugerem que adaptações a diferentes polinizadores ou mecanismos de polinização podem ser responsáveis pela subdivisão observada. Neste contexto é proposta a recircunscrição das seções *Habenaria* e *Clypeatae* e a criação da nova seção *Novemfidae*. Foi realizada uma análise filogenética usando três marcadores moleculares com as espécies envolvidas no complexo *Habenaria nuda* a qual mostrou que o aumento do número de marcadores não foi suficiente para resolver as relações de parentesco entre os morfotipos envolvidos. Então, dentro deste cenário, foram realizadas análises de variabilidade genética utilizando marcadores microssatelites e análises morfométricas multivariadas envolvendo 293 indivíduos pertencentes a 10 morfotipos e os resultados obtidos indicam a existência de espécies novas relacionadas ao complexo *H. nuda* e a elevação para nível específico de uma variedade. Após a realização dessas análises e o direcionamento dado por elas, foi realizado um estudo mais detalhado de caracteres não abordados pela morfometria e foi possível avaliar a identidade taxonômica dos táxons envolvidos e delimitar de maneira mais precisa os táxons *H. nasuta, H. nuda* e *H. rodriguesii* e descrever seis novas espécies. Considerando todos os resultados obtidos neste trabalho, é possível concluir que o gênero *Habenaria* está em ativo processo de especiação e que o mesmo possa ser considerado um importante modelo evolutivo a ser estudado em maiores detalhes e com ferramentas diversas.


**Palavras-chave:** *Habenaria*, biossistemática, filogenia, cromossomo, taxonomia.

ABSTRACT

*Habenaria* is one of the richest orchid genera in Brazil, with *ca*. 170 species found in all areas of the country. A molecular phylogeny with neotropical species of the genus was carried out and from this phylogeny it was possible to infer many evolutionary scenarios in the genus. One of these could be a correlation between chromosome numbers and the recovered clades, demonstrating that this type of analysis would be potentially fitted in unraveling some taxonomic and phylogenetic aspects of the genus, and this was the first goal of this work. Two of the largest clades recovered in this same phylogeny (the *Habenaria* sect. *Nudae* clade and the Mexican clade) were not well resolved. Concerning the Mexican clade, the performed phylogeny included a small sample, with species morphologically divergent clustered in the same clade, a fact that led the authors of this paper to suggest that increasing the sample would be crucial for a better clade resolution. In turn, *Habenaria* sect. *Nudae* was well sampled in the performed phylogeny, but in this phylogeny only two molecular markers were used, carrying us to the third goal of this work: the usage of a larger set of molecular markers in the phylogenetic analysis in order to improve the resolution between taxa, and also the implementation of other tools such as the analysis of the genetic and morphological variation of the involved specimens. In this work it was possible to observe that the chromosome numbers did not present a direct and uniform correspondence to the clades recovered in the phylogeny and that chromosome variations observed in the species of the genus possibly arose independently. The trees obtained after increasing the sampling of Mexican *Habenaria* species revealed a strong geographic structuring and the splitting of the Mexican species in two subclades non directly related. Morphological differences suggest that adaptations to distinct pollinators or pollination strategies can be responsible for the observed splitting, and in this context we propose a recircumscription of the sections *Habenaria* and *Clypeatae* and the establishment of the new section *Novemfidae*. We carried out, with the studied species in the *Habenaria nuda* complex, a phylogenetic analysis using three markers. The larger number of markers was insufficient in resolving affinities between the studied morphotypes. With this scenario, we made analyses of genetic variability using microsatellite markers and morphometric multivariate analyses involving 293 specimens pertaining to 10 morphotypes; The results indicate the existence of new species akin to the *H. nuda* complex and the status change of a variety to species. After the analyses were completed and using them as a guidance, we performed a more detailed study of characteres non approached by morphometry and it was possible to better evaluate the identity of many taxa, to circumscribe more acurately the species *H. nasuta, H. nuda*, and *H. rodriguesii* and to describe siw new species. Taking into account all the results obtained in this work, we conclude that the genus *Habenaria* is in an active process of speciation and can be considered as an important evolutionary model to be studied in greater details and with diversified tools.

**Keywords:** *Habenaria*, biosystematics, phylogeny, chromosome, taxonomy.

# INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Habenaria* (Orchidaceae, Orchidoideae, Orchidinae) possui distribuição pantropical e é diverso na África e Ásia, com número estimado de 835 espécies (Govaerts et al., 2014). No Brasil é um dos maiores gêneros de orquídeas, com aproximadamente 165 a 170 táxons (Hoehne, 1940; Pabst e Dungs; 1975, Batista et al., 2011), e as espécies estão distribuídas por todo o território, sendo frequente no cerrado e nos campos rupestres das regiões Centro-oeste e Sudeste (Batista et al., 2004). No Novo Mundo, após o Brasil, o México se destaca com 72 espécies registradas (Batista et al., 2011a, 2011b). De acordo com os mesmos autores, os dois países também constituem os maiores centros de endemismo de espécies, com 105 táxons restritos ao Brasil (63% dos táxons conhecidos para o país, 35% das espécies do Novo Mundo) e 53 ao México (74% dos táxons conhecidos para o país e 18% das espécies do Novo Mundo).

O gênero é composto exclusivamente por espécies terrestres e típicas de vegetação campestre, a maioria possuindo flores inconspícuas, pequenas e de coloração esverdeada sendo, portanto, raramente cultivadas (Batista e Bianchetti, 2003). Os principais tratamentos das *Habenaria* brasileiras foram os de Cogniaux (1893) na Flora Brasiliensis, Hoehne (1940) na Flora Brasílica e Pabst e Dungs (1975) no Orchidaceae Brasilienses. Com exceção deste último trabalho, alguns trabalhos abordaram a sistemática do gênero no país nos últimos 65 anos (*e.g*. Batista e Bianchetti, 2002, 2006; Batista et al., 2006, 2011a, 2011b). Para o México não há nenhum tratamento taxonômico recente para o gênero. González-Tamayo (1993) dividiu as espécies mexicanas em 12 grupos informais, sendo que a relevância filogenética desta proposta até este trabalho nunca havia sido testada.

Felix (1996) realizou um trabalho envolvendo os números cromossômicos de algumas espécies de *Habenaria* ocorrentes na Paraíba, e este um dos poucos trabalhos desenvolvidos até o momento com este tipo de abordagem. Embora a amostragem nesse trabalho (Felix, 1996) tenha sido baixa, os resultados sugerem uma correspondência entre os números cromossômicos e as seções do gênero, indicando que esse caráter tem potencial para ser investigado e correlacionado a taxonomia, filogenia e evolução do gênero.

Em 2013 Batista e colaboradores produziram uma filogenia das espécies americanas do gênero baseada em sequências do espaçador ribossomal ITS e do gene *matK*. Neste trabalho os autores relataram que os clados formados foram congruentes com a morfologia das espécies, mas as relações entre vários clados e a posição de alguns táxons ainda não estão bem resolvidas. Entre os clados não resolvidos, encontra-se o correspondente a seção *Nudae lato*

*sensu* (subgrupo 21). No tratamento seccional de Cogniaux (1893), essa é uma das maiores seções do gênero no Novo Mundo, abrangendo cerca de 25 espécies, sendo que a maior parte das espécies da seção encontra-se no Brasil, concentradas no cerrado e campo rupestre das regiões Sudeste e Centro Oeste. Outro clado que também não apresentou uma boa resolução na filogenia de Batista et al. (2013) foi o grupo formado por espécies mexicanas e da América Central (subgrupo 9). Com base em dados de distribuição e morfologia, tal subclado provavelmente compreende 56 espécies concentradas no México, sendo que algumas espécies também se estendem a países da América Central. A maior parte das espécies mexicanas e centro-americanas de *Habenaria* se reuniu em um único clado, porém a amostragem foi pouco representativa, contendo apenas cerca de 17 espécies. A amostragem pequena e a baixa resolução filogenética desse subclado não permitiu uma comparação com os 12 grupos informais propostos por González-Tamayo (1993).

O grande número de espécies, a delimitação complicada, a pouca informação de muitos taxa e a existência de vários complexos de espécies têm conduzido a identificações equivocadas das mesmas, com diferentes nomes sendo aplicados a uma única espécie e algumas outras sendo negligenciadas (Batista e Bianchetti, 2003). Dentre os complexos de espécies do gênero *Habenaria* destaca-se o complexo *Habenaria nuda* Lindl. dentro do qual são conhecidos cinco táxons descritos e cerca de 18 morfotipos distribuídos nas regiões central, nordeste e sudeste do Brasil. *Habenaria nuda* não foi até o momento identificada inequivocadamente, uma vez que o material tipo depositado no herbário de Munique (M) encontra-se em mau estado de conservação e a descrição original não permite a distinção dos vários morfotipos relacionados a essa espécie. Os táxons descritos e os morfotipos apresentam algumas características em comum, como as folhas pouco desenvolvidas, lineares e geralmente adpressas ao caule, flores verdes e segmentos laterais das pétalas e do labelo desenvolvidos, sempre mais longos do que o segmento posterior das pétalas e o segmento mediano do labelo, características que compõem um complexo de difícil delimitação e que exige uma revisão mais detalhada. Neste contexto, as análises biossistemáticas tornam-se indispensáveis, pois empregam técnicas adicionais que podem contribuir para a sistemática desse grupo, uma vez que as ferramentas clássicas de análises morfológicas utilizadas pela taxonomia se mostram insuficientes para tal fim.

A sistemática molecular tem revolucionado os estudos filogenéticos em plantas através da incorporação de técnicas de biologia molecular, especialmente os dados de seqüências de DNA nas reconstruções filogenéticas (Judd et al., 2002). Nessas análises podem ser utilizadas três diferentes fontes potenciais de caracteres: os genomas de cloroplasto, mitocondrial e

nuclear (Karp et al., 1996). A combinação de diferentes genomas é uma das melhores ferramentas para ser usada em reconstruções filogenéticas (Qiu et al., 1999).

A variabilidade genética, além de ser importante para a evolução, pode ser usada como ferramenta de investigação por ecólogos e sistematas em diversos ramos como, por exemplo, para verificar as afinidades e limites entre as espécies, para detectar modos de reprodução e estrutura familiar, para estimar níveis de dispersão nas populações, entre outros (Avise, 1994). Os marcadores microssatélites, um tipo de marcador codominante, têm sido utilizados em análises de variabilidade genética por apresentarem alto nível de polimorfismo e por serem considerados de caracterização altamente confiável quando comparados a outros marcadores, especialmente os dominantes. Além dos microssatélites fornecerem dados para várias inferências populacionais, as análises de estrutura genética podem auxiliar na tomada de decisões taxonômicas (*e.g.*, Harbaugh et al., 2009).

As análises morfométricas também podem auxiliar na tomada de decisões taxonômicas, especialmente equando os táxons em questão formam complexos de espécies (Henderson, 2006). Tais análises podem ser realizadas por métodos de estatística bivariada ou multivariada (Peres Neto, 1995). A função da morfometria tradicional aplicada em estudos taxonômicos tem sido discutida por vários autores e alguns estudos têm combinado dados moleculares e morfológicos para inferir sobre essas questões (Borba et al., 2002; Kucera et al., 2006).

Muitas vezes a distinção entre espécies morfologicamente similares é contraditória em função da ausência de caracteres que auxiliem nessa tarefa. A análise citogenética tem sido reconhecida como uma ferramenta auxiliar para a taxonomia de plantas, visto que o número cromossômico não é influenciado por fatores ambientais (Sttebins, 1971).

O presente trabalho tem como proposta empregar análises biossistemáticas para auxiliar na delimitação taxonômica dentro do gênero utilizando: (i) a análise citogenética de espécies representantes de diferentes clados para inferir sobre a correlação entre os números cromossômicos e as espécies presentes nos clados apresentados na filogenia de Batista et al. (2013); (ii) a filogenia molecular com uma maior amostragem das espécies mexicanas e centro-americanas de *Habenaria* para o melhor entendimento da sistemática das espécies, (iii) o estudo da diversidade a partir dos marcadores microssatélites e a análise morfológica entre as populações de morfotipos inseridos no complexo *Habenaria nuda* Lindl.

# CAPÍTULO 1

Vale, A. A.; Venturini, D. G. S. S.; Felix, L. P.; Mercado, P.; Salazar, G. A. & Batista, J. A. N. Números crômossomicos no gênero *Habenaria* Willd. (Orchidaceae).

# Números cromossômicos no gênero *Habenaria* Willd. (Orchidaceae)

Aline A. do Vale[1], Daniel G. S. S. Venturini[1], Leonardo P. Felix[2], Pedro Mercado[3], Gerardo A. Salazar[3] e João A. N. Batista[1]

[1]*Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 486, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.*

[2]*Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, CEP 58397-000, Areia, Paraíba, Brasil.*

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

## RESUMO

Embora Orchidaceae seja uma das maiores famílias de angiospermas e possua uma grande diversidade de números cromossômicos, poucos estudos citogenéticos ainda foram realizados para suas espécies. O gênero *Habenaria* é um dos maiores da família, com aprox. 835 espécies. Nos neotrópicos, o Brasil é o país onde *Habenaria* é um dos maiores gêneros, com cerca de 170 táxons, que é seguido pelo México, que possui 72 espécies registradas. Entretanto, estão disponíveis dados de contagens cromossômicas apenas para 16 espécies brasileiras de *Habenaria* na literatura e nenhum dado para espécies mexicanas deste gênero. Recentemente foi publicada uma filogenia das espécies neotropicais do gênero de 151 espécies de *Habenaria* ocorrentes nas Américas. Os autores deste trabalho observaram uma correspondência entre os números cromossômicos disponíveis e alguns clados identificados na filogenia. Baseados nesta observação, os autores sugeriram que processos de evolução cromossômica poderiam estar relacionados à evolução e especiação do gênero no Novo Mundo. O presente trabalho teve como proposta realizar a análise citogenética de espécies representantes de diferentes clados apresentados nessa filogenia e também fazer um levantamento dos dados disponíveis na literatura sobre contagens cromossômicas para o gênero, com o propósito de discutir a correlação entre tais números e as espécies presentes nos clados apresentados na análise filogenética supracitada. Foram analisados os números cromossômicos de 28 táxons pertencentes a *Habenaria* distribuídos no Brasil e no México e encontrados quatro diferentes números somáticos (2n= 21, 22, 42 e 84). Também foi feito um levantamento sobre as contagens cromossômicas disponíveis na literatura e foram observados 16 números crômossomicos diferentes com uma variação de 2n=28 a 2n=cerca de 112, presentes em 56 espécies de *Habenaria* distribuídas na Ásia e América do Sul. O número 2n=42 foi o mais frequente tanto nos 28 táxons analisados neste trabalho quanto entre as 56 espécies com dados prévios. A análise dos números cromossômicos do gênero além de corroborar dados da literatura que registram a predominância do número 2n=42 e que sugerem o $x_1$=7 como possível número básico primário para o gênero, também revelou dois novos números (2n=21 e 22), sendo números restritos ao clado Neotropical de *Habenaria* e 2n=21 o menor número registrado para o gênero até o momento. No presente trabalho foi possível observar que os números cromossômicos não apresentam uma correspondência direta e uniforme em relação à distribuição dos clados apresentados na filogenia e que as variações cromossômicas observadas nas espécies que pertencem a *Habenaria*, juntamente com as variações morfológicas, sugerem que os eventos de poliploidização sejam relevantes na evolução do gênero, o qual demonstra estar em ativo estado de especiação.

**Palavras-chave:** *Habenaria*, citogenética, números cromossômicos.

## 1. Introdução

Orchidaceae é uma das maiores famílias de angiospermas, com número de espécies estimado entre 20 e 30 mil segundo diferentes autores (Garay, 1960; Dahlgren et al., 1985; Atwood, 1986; Cronquist, 1988; Dressler, 1993) distribuídas em cerca de 700 gêneros (Christenson, 2004). As espécies de orquídeas estão distribuídas por quase todas as regiões do planeta, porém concentram-se nos trópicos, especialmente em regiões montanhosas (Dressler, 1993) e apresentam uma grande diversidade de números cromossômicos.

Alguns autores discutem que estudos citogenéticos em Orchidaceae são poucos, dispersos e incompletos e estima-se que apenas de 10% a 13% das espécies tenham sido analisadas citologicamente, percentagem que diminui quando somente as espécies neotropicais são consideradas (Daviña et al., 2009; Felix e Guerra, 2005).

Dressler (1993) comenta as tentativas dos autores Chatterji (1986), Mehra (1983) e Vij (1989) de esboçarem um padrão cromossômico em Orchidaceae ao buscarem os números básicos de seus grupos de estudo. Tais autores postularam que o número básico esteja entre x= 6 e 11.

Dentro da subfamília Orchidoideae está a tribo Orchideae, que compreende 62 gêneros e aproximadamente 1800 espécies distribuídas em todo o mundo (Cribb, 2001). Embora atualmente dados moleculares não sustentem a divisão da tribo em duas subtribos Orchidinae e Habenariinae, neste capítulo optamos em manter essa divisão para melhor entendimento dos dados apresentados e dos dados encontrados na literatura, assim como realizado em *Genera Orchidacearum* (Pridgeon et al*.,* 2001).

De acordo com Dressler (1993) existe a predominância dos números haploides 20, 21 e 22 em Orchidoideae e Yokota (1987) sugere a evolução de Orchideae de um hipotético ancestral com n=7.

Felix e Guerra (2000) revisaram a citotaxonomia das orquídeas "Cymbidioides" (*sensu* Dressler, 1993) e sugeriram que o número básico primário para o grupo, assim como provavelmente o número básico para a família, seria $x_1$=7. Em um trabalho posterior, Felix e Guerra (2005) analisaram várias espécies de orquídeas terrícolas pertencentes a diferentes subfamílias (Cypripedioideae, Orchidoideae, Vanilloideae) e sugeriram o número básico $x_1$=7 para a subfamília Orchidoideae e também que a maioria dos gêneros são compostos por paleopoliploides.

Foi proposta por D'Emerico (2001) a existência de quatro números de cromossomos básicos para Orchideae (*sensu* Cribb, 2001): x = 16, 18, 20 e 21. Em 1990 Yokota analisou 48

táxons desta tribo (*sensu* Dressler, 1993) e considerou 2n=42 como o número cromossômico mais comum em Orchideae.

Kashyap e Mehra (1983) sugerem que alguns gêneros de Orchidinae e Habenariinae (*Habenaria* Willd. e alguns gêneros contendo espécies segregadas de *Habenaria* como *Coeloglossum* Lindl., *Platanthera* Rich. e *Peristylus* Blume) tenham os números crômossomicos diretamente ou indiretamente baseados em $x_1=7$.

*Habenaria* Willd. possui distribuição pantropical, sendo o maior gênero na subtribo Habenariinae, que é particularmente diversa na Região Neotropical, na África e Ásia, com número estimado de 876 espécies (Govaerts et al., 2013). No Brasil é um dos maiores gêneros de orquídeas, com *ca.* 165-170 táxons (Batista et al., 2011a). Nos neotrópicos, após o Brasil, o México se destaca com 72 espécies registradas (Batista et al., 2011a, 2011b). O gênero é composto exclusivamente por espécies terrícolas e típicas de vegetação campestre, a maioria possuindo flores inconspícuas, pequenas e de coloração esverdeada, sendo, portanto, raramente cultivadas (Batista e Bianchetti, 2003).

Uma grande variação de números cromossômicos é observada em *Habenaria*, entre 2n=28 a 2n = ca. 112 (Apêndice). A espécie que apresenta o maior número cromossômico é *Habenaria reniformis* (2n= cerca de 112), da Índia. No mesmo Apêndice pode-se observar que a variação cromossômica das espécies americanas é de 2n= 42 a 2n= 84 cromossomos.

Felix e Guerra (2005) analisaram 11 gêneros de espécies terrícolas de orquídeas distribuídos em quatro subfamílias, incluindo *Habenaria,* do qual foram analisadas 16 espécies. Dentre todos os gêneros analisados, *Habenaria* foi o que apresentou a maior variação quanto aos números cromossômicos: 2n= 42, 44, 48, 50, 75, 80 e 84. O número 2n=42 foi encontrado em 7 das 16 espécies analisadas, o que sugeriu aos autores que considerassem o número n=21 como o mais representativo das Américas e Ásia (Yokota, 1990; Felix e Guerra, 1998), sendo considerado o número básico mais frequente dentro do gênero (Felix e Guerra, 2005). Os trabalhos de Felix e Guerra (1998, 2005) compreendendo as 16 espécies estudadas foram os únicos desenvolvidos até o momento envolvendo números cromossômicos de *Habenaria* no Brasil.

Recentemente Batista et al. (2013) produziram uma filogenia das espécies americanas do gênero baseada em sequências do espaçador ribossomal ITS e do gene *matK* de 151 espécies de *Habenaria* neotropicais (cerca de 50%), através de análises de parcimônia e Bayesiana. Os resultados destes autores mostraram que as espécies do Novo Mundo formam um grupo monofilético com alto suporte e que este consiste de ao menos 22 subgrupos terminais. A topologia das árvores obtidas indicou uma origem africana para o clado

Neotropical e a baixa divergência entre as sequências das espécies neotropicais sugeriu uma radiação recente do gênero no Novo Mundo.

Estes mesmos autores (Batista et al., 2013) observaram que quando os números cromossômicos das espécies neotropicais determinados por Felix e Guerra (1998) são analisados no contexto da filogenia obtida, tais números indicam uma correspondência entre os mesmos e alguns dos subgrupos identificados, com os grupos basais apresentando valores menores (2n=42, 44 ou 50) e os grupos derivados apresentando valores maiores (2n=80 ou 84). Com base nesta observação Batista et al. (2013) sugeriram que poliploidização ou outros processos de evolução genômica poderiam estar relacionados à evolução e especiação do gênero no Novo Mundo, bem como constituir um caráter a mais para a diferenciação dos subgrupos. Todavia, os números cromossômicos estão disponíveis apenas para 16 das 298 espécies neotropicais (cerca de 5% do total) de modo que dados adicionais são necessários para verificar estas hipóteses.

O presente trabalho teve como proposta realizar a análise citogenética de espécies representantes de diferentes clados apresentados na filogenia de Batista et al. (2013) e também fazer um levantamento dos dados disponíveis na literatura sobre contagens cromossômicas para o gênero, com o propósito de discutir a correlação entre tais números e as espécies presentes nos clados apresentados na análise filogenética supracitada.

## 2. Material e métodos

### 2. 1 - *Material biológico para a análise citogenética*

Foram coletadas amostras pertencentes a 28 táxons localizadas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e nas regiões Oeste, Sudeste e Central do México. A listagem das espécies analisadas e os respectivos números cromossômicos estão na Tabela 2.

### 2.2 - *Análise citogenética*

Devido à extrema dificuldade de manter em cultivo as espécies de *Habenaria* e também de obter raízes meristemáticas em campo para a análise mitótica, optou-se por utilizar material oriundo de botões florais: as células reprodutivas e partes do ovário pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína. Como também é difícil a obtenção de um bom número de células

mitóticas de boa qualidade provenientes de ovários, a maior parte da análise citogenética deste trabalho foi realizada utilizando células reprodutivas.

Em função da grande variação morfológica em relação ao tamanho das espécies analisadas, é difícil indicar o melhor tamanho dos botões para a obtenção das células meióticas. Quase todas as amostras foram compostas por botões coletados na porção apical da inflorescência. Quando as espécies possuíam mais de 20-25 cm de altura, geralmente os botões apicais foram obtidos de indivíduos em um estágio de desenvolvimento portando quase todas as flores presentes na inflorescência ainda em estágio de botões, com apenas as flores basais da inflorescência abertas. Quando as espécies possuíam um tamanho menor ao de 20-25 cm, os indivíduos portavam botões, na maioria das vezes, apenas na porção apical da inflorescência. No campo, os polinários foram retirados e colocados em fixador Carnoy e observados quanto à coloração – os ideais ficaram brancos após alguns minutos em agitação – a cor amarelada dá indício de que os grãos de pólen já estão formados. Foram coletados diretamente no campo polinários de tamanhos diferentes e cerca de 4-6 polinários de um mesmo indivíduo foram usados para a confecção de cada suspensão celular, a depender do tamanho das flores.

Para a análise meiótica, a suspensão celular foi preparada de acordo com Viccini et al. (2005) que utiliza técnica de suspensão celular para a obtenção das células-mãe do grão de pólen (PMCs). Para isso foram utilizadas em média seis anteras. O material foi tratado com uma solução enzimática concentrada (Ultrazym Nono NordiskTM) e após as anteras foram fragmentadas mecanicamente para a retirada das PMCs. Após três etapas de centrifugação a suspensão celular foi gotejada em lâminas que foram coradas em solução de Giemsa 5%.

Para a análise mitótica, ovários oriundos dos botões florais foram pré-tratados com 8-hidroxiquinoleína (3 mM) de 8 a 10 horas, dependendo da espécie. Em seguida, os ovários foram fixadas em Carnoy 3:1. Para a confecção das lâminas, o material foi tratado com uma solução enzimática concentrada (Ultrazym Nono NordiskTM) e as lâminas preparadas por meio de técnicas de secagem ao ar com maceração enzimática (Carvalho, 1995) e coradas com Giemsa 5%.

As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz Olympus Bx52 acoplado a um sistema de digitalização e análise de imagens.

Foi realizado um levantamento sobre os números cromossômicos existentes para o gênero na literatura, e estão listados no Apêndice com suas respectivas referências. Foram excluídas as contagens de espécies brasileiras às quais não tivemos acesso aos exemplares ou fotos dos mesmos para confirmar a sua identificação. Os dados de distribuição geográfica das

espécies foram obtidos a partir de Govaerts et al. (2014) e de W3 Tropicos (2014). O mapa mundi utilizado como base foi extraído da página Wordclim e organizado pelos autores utilizando o programa ArcView GIS 3.2.

## *2. 3 - Análise filogenética*

### *2.31 Amostragem dos táxons para a análise filogenética*

A amostragem utilizada para a análise corresponde basicamente à mesma da análise filogenética de Batista et al. (2013), mas incluiu várias espécies adicionais de táxons do Velho Mundo, incluindo os gêneros *Dithrix* Schaltr., *Herminium* L., *Peristylus* e *Pecteilis* Raf., que são derivados de *Habenaria*. As sequências desses táxons do Velho Mundo foram obtidas do *GenBank* (Tabela 1) e para detalhes dos demais terminais usados, consultar Batista et al. (2013). Foram utilizadas as sequências combinadas de ITS e parte do gene *matK*. A amostragem dos táxons americanos incluiu representantes da maioria das seções neotropicais de *Habenaria* e táxons de todos os clados terminais com suporte elevado identificados na análise filogenética de Batista et al. (2013).

Tabela 1 – Dados referentes às sequências retiradas do *GenBank* de ITS e de parte do gene *matk* dos táxons adicionais utilizados na filogenia realizada neste trabalho (Figuras 4 e 5). As informações relativas ao restante dos táxons são as mesmas contidas no trabalho de Batista et al. (2013).

| Táxon | Voucher | Origem | ITS | *matK* |
|---|---|---|---|---|
| *Corycium carnosum* (Lindl.) Rolfe | GenBank | África | EU301524 | EU301524 |
| *Cynorkis galeata* Rchb.f, | GenBank | - | AJ000135 | AJ000143 |
| *Diphylax urceolata* (Clarke) Hook. f. | GenBank | China | JN696447 | FR832753 |
| *Disa glandulosa* Burch. ex Lindl. | GenBank | - | AJ000120 | AF263654 |
| *Disperis capensis* Sw. | GenBank | África | EU301486 | EU301539 |
| *Dithrix griffithii* (Hook.f.) Ormerod & Ganchi | GenBank | China | JN696445 | JN696430 |
| *Habenaria aitchinsonii* Rchb. f. ex Aitch. & Hemsl. | GenBank | - | KF998087 | KF998088 |
| *Habenaria foliosa* A.Rich. | GenBank | Índia | JN114529 | JN004457 |
| *Habenaria grandifloriformis* Blatt. & McCann | GenBank | Índia | JN114542 | JN004463 |
| *Habenaria heyneana* Lindl. | GenBank | Índia | JN114549 | JN004469 |
| *Habenaria intermedia* D. Don. | GenBank | Índia | JN114554 | JN004474 |
| *Habenaria roxburghii* Nicolson | GenBank | Índia | JN114574 | JN004475 |
| *Habenaria stenopetala* Lindl. | GenBank | China | JN696451 | JN696437 |
| *Herminium lanceum* (Thumb. ex Sw.) Vuijk | GenBank | China | JN696452 | JN696440 |
| *Herminium monorchis* (L.) R. Br. | GenBank | China | JN696453 | JN696439 |
| *Ophrys apifera* Huds. | GenBank | - | AM981000 | JN893962 |
| *Pecteilis gigantea* (Sm.) Raf. | GenBank | Índia | JN114652 | JN004549 |
| *Peristylus coeloceras* Finet | GenBank | China | JN696459 | JN696431 |
| *Peristylus densus* (Lindl.) Santapau & Kapadia | GenBank | Índia | JN114654 | JN004559 |
| *Peristylus elisabethae* (Duthie) R.K.Gupta | GenBank | Índia | JN696460 | JN004560 |
| *Peristylus plantagineus* Lindl. | GenBank | Índia | JN114672 | JN004563 |
| *Platanthera stenantha* (Hook. f.) Soó | GenBank | China | JN696463 | JN696442 |
| *Satyrium rhynchantum* | GenBank | - | AJ539528 | AY708039 |

*2.32 Marcadores moleculares*

Sequências nucleotídicas de uma região do genoma nuclear (ITS) e de parte do gene *matK* foram usadas na análise. A região nuclear (*ITS*) consistiu nos genes RNA ribossomais 18S e 26S respectivamente relacionados aos espaçadores transcritos internos *ITS1* e *ITS2* e do gene 5.8S da família de multigenes ribossomais nucleares. Para a região do *matK* foi usada a região amplificada pelos primers *matK*-F2 and *matK*-R2 (Batista et al., 2013).

*2.33 Análise filogenética*

Foram realizadas análises de máxima verossimilhança utilizando-se o programa RAxML-HPC versão 7.4.4 (Stamatakis, 2006) implementado no CIPRES (Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research), Portal 2.0 (Miller et al., 2010; Pfeiffer e Schwartz, 2010).

Tabela 2 – Táxons de *Habenaria* analisados neste trabalho: identificação das espécies, dados de localidade de coleta, número voucher, contagem gametofítica (n); contagem esporofítica (2n) e número de populações analisadas.

| Espécies | Localidade | Material testemunho | N | 2n | Número de populações |
|---|---|---|---|---|---|
| *Habenaria aranifera* Lindl. | Brasil, Rio Grande do Sul | Fernandes 468 | 11 | 22 | 2 |
| *Habenaria caldensis* Kraenzl. | Brasil, Minas Gerais | Vale 97 | 21 | 42 | 3 |
| *Habenaria ciliatisepala* J.A.N.Bat. & Bianch. | Brasil, Goiás | Vale 34 | 21 | 42 | 3 |
| *Habenaria crassicornis* Lindl. | México, Ixtlan de Juárez | Salazar s.n. | 21 | 42 | 2 |
| *Habenaria crucifera* Rchb.f. & Warm. | Brasil, Minas Gerais | Batista s.n. | 21 | 42 | 1 |
| *Habenaria edwallii* Cogn. | Brasil, Minas Gerais | Mota 2330 | 21 | 42 | 2 |
| *Habenaria exaltata* Barb. Rodr. | Brasil, Rio Grande do Sul | Fernandes 705 | 21 | 42 | 1 |
| *Habenaria greenwoodiana* R. González | México, Michoacán, Zacapu | Jimenez s.n. | 21 | 42 | 1 |
| *Habenaria guilleminii* Rchb.f. | Brasil, Minas Gerais | Vale 20 | 42 | 84 | 1 |
| *Habenaria heptadactyla* Rchb.f. | Brasil, Mato Grosso | Mota 2061 | | 21 | 1 |
| *Habenaria jaliscana* S. Watson | México, Jalisco, Guadalajara | Jimenez 2835 | 21 | 42 | 2 |
| *Habenaria cf. jaliscana* S. Watson | México, Oaxaca, Huatulco | Salazar s.n. | 21 | 42 | 3 |
| *Habenaria* cf. *macronectar* (Vell.) Hoehne | Brasil, Rio Grande do Sul | Fernandes 486 | ca. 21 | ca. 42 | 2 |
| *Habenaria macvaughiana* R. González | México, Oaxaca, Ixtlan de Juárez | Salazar s.n. | 42 | 84 | 1 |
| *Habenaria mystacina* Lindl. | Brasil, Minas Gerais | Mota 2181 | 42 | 84 | 1 |
| *Habenaria montevidensis* Spreng. | Brasil, Rio Grande do Sul | Fernandes 519 | 21 | 42 | 2 |
| *Habenaria nasuta* Rchb.f. & Warm. | Brasil, Minas Gerais | Vale 115 | 21 | 42 | 2 |
| *Habenaria nogueirana* R. González | México, México, Michoacán, Zacapu | Jimenez s.n. | 42 | 84 | 2 |
| *Habenaria novemfida* Lindl. | México, DF, Ciudad de México | Salazar 8527 | 21 | 42 | 2 |
| *Habenaria nuda* var. *pygmaea* Hoehne | Brasil, Goiás | Vale 168 | 21 | 42 | 2 |
| *Habenaria pabstii* J.A.N.Bat. & Bianch. | Brasil, Goiás | Batista s.n | 42 | 84 | 2 |
| *Habenaria parviflora* Lindl. | Brasil, Minas Gerais | Hattori 1325 | 21 | 42 | 1 |
| *Habenaria petalodes* Lindl. | Brasil, Minas Gerais | Batista s.n. | 21 | 42 | 3 |
| *Habenaria quinqueseta* (Michx.) Eaton | México, Nayarit, Tepic | Jimenez 2827 | 42 | 84 | 1 |
| *Habenaria regnellii* Cogn. | Brasil, Minas Gerais | Batista s.n. | 21 | 42 | 1 |
| *Habenaria secundiflora* Barb. Rodr. | Brasil, Minas Gerais | Vale 239 | 21 | 42 | 1 |
| *Habenaria strictissima Rchb*.f. | México, DF, Ciudad de México | Salazar s.n. | 42 | 84 | 1 |
| *Habenaria trifida* Kunth. | Brasil, Goiás | Vale 37 | ca. 42 | ca. 84 | 2 |

*ca.=cerca

A análise de 1000 replicações de *bootstrap* (Stamatakis et al., 2008) foi seguida por uma busca pela árvore que maximize a função de verossimilhança, com o valor padrão de 25 categorias e a estimativa de todos os parâmetros de modelo livre para as partições. O modelo GTRGAMMA foi utilizado tanto para a análise de *bootstrap* como para a análise de máxima verossimilhança.

## 3. Resultados

### *3.1 – Novos registros para Habenaria*

Foram analisados 28 táxons distribuídos no Brasil e México e os números observados estão indicados na tabela 2. As contagens realizadas para espécies mexicanas foram as primeiras contagens feitas para a América do Norte.

Os números cromossômicos variaram de 2n=21 a 2n=84 (Tabela 2 e Figura 1), sendo que a maioria das espécies apresentou o número cromossômico 2n=42. Dos 28 táxons analisados, 26 são novos registros de contagem para espécies para o gênero.

No presente trabalho as espécies que apresentaram os maiores números cromossômicos foram: *Habenaria guilleminii*, *H. ixtlanensis*, *H. nogeirana*, *H. novemfida, H. pabstii*, e *H. quinqueseta*. De nove espécies mexicanas analisadas, quase a metade (quatro spp.) apresentaram um alto nível de ploidia - 2n=84. As espécies que apresentaram os menores números foram *H. heptadactyla* (2n=21) e foi *H. aranifera* (2n=22) sendo os primeiros registros destes números para o gênero (Tabela 2).

### *3.2 – Registros disponíveis na literatura para o gênero*

No levantamento realizado sobre as contagens cromossômicas disponíveis na literatura para *Habenaria* é possível observar que o gênero possui uma grande variação de números cromossômicos, com 17 diferentes números somáticos distribuídos em 56 espécies com dados disponíveis na literatura (2n= 28, 32, 40, 42, 44, 46, 50, 63, 64, 66, 75, 80, 84, 88 , 108 e 112 – Tabela 3 e Apêndice).

Tais espécies estão distribuídas na Argentina (Daviña et al*.,* 2009), Brasil (Felix e Guerra, 1998, 2005), China (Luo, 2004), Índia (Kulkarni e Jorapur, 1979; Mehra e Kashyap, 1979; Jorapur e Kulkarni, 1980; Mehra e Sehgal, 1980; Jorapur e Phatak, 1981; Kashyap e Mehra, 1983; Mehra, 1983; Mehra e Kashyap, 1989), Japão (Yokota, 1987, 1990) e Macaronésia (Dalgaard, 1991) (Figura 2).

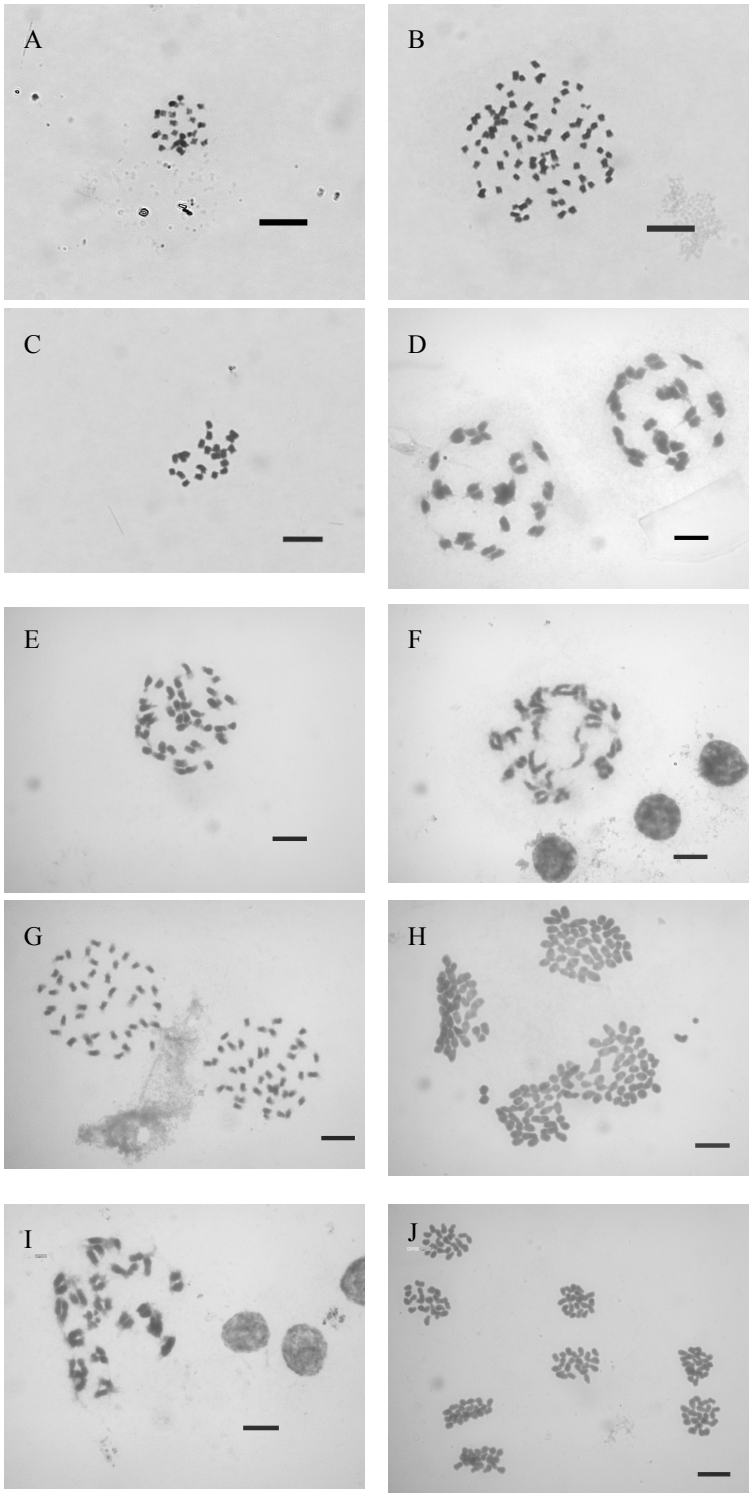



Figura 1 – Figuras representativas da variação de números cromossômicos encontrados: (A) *H. aranifera* (célula mitótica - metáfase 2n=22); (B) *H. guilleminii* (célula mitótica - metáfase 2n=84); (C) *H. heptadactyla* (célula miótica - metáfase 2n=21); (D) *H. jaliscana* (célula meiótica - diacinese n=21); (E) *H. novemfida* (célula mitótica - metáfase 2n=42); (F) *H. crassicornis* (célula meiótica - diacinese inicial n=21); (G) *H. ixtlanensis* (célula meiótica - diacinese n=42); (H) *H. strictissima* (célula meiótica - metáfase de micrósporo n=42); (I) *H. greenwoodiana* (célula meiótica – diacinese n=21); (J) *H.* cf. *jaliscana* (célula meiótica – metáfase de micrósporo n=21). Barra= 10 µm.

A maioria dos números cromossômicos encontrados entre as 56 espécies é 2n=42 (71,5%) e é seguida por 2n=44 (17,8%) (Tabela 3). O número 2n=42 também foi o mais frequente nos 28 táxons analisados neste trabalho e representa 68% de todos os números encontrados, já o número 2n=84 (29%) e 2n=22 (3,5 %).

O número (2n=42) é considerado por Kashyap e Mehra (1983) como número hexaploide e vários autores (Mehra e Bawa, 1970; Roy e Sharma, 1971; Kashyap e Mehra, 1983; Yokota, 1990; Felix e Guerra, 1998, 2005; Luo, 2004) supõe que o número $x_1=7$ seja o número básico primário para o gênero. A discussão sobre os níveis de ploidia deste trabalho está baseada nessas considerações e também no observado na Tabela 3 e na Figura 3.

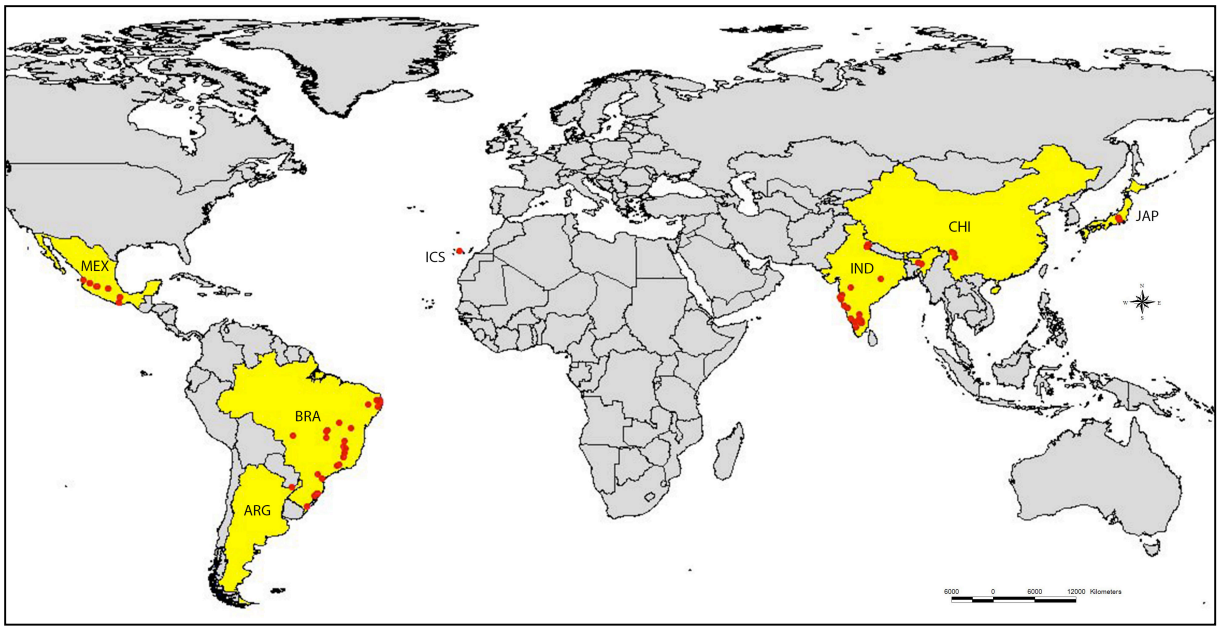



Figura 2 – Mapa de distribuição das espécies que possuem contagens cromossômicas disponíveis na literatura (Apêndice). ARG: Argentina; BRA: Brasil; CHI: China; ICS: Ilhas Canárias; IND: Índia; JAP: Japão e MEX: México.

Tabela 3 – Variação de números cromossômicos no gênero *Habenaria* para o Velho Mundo e o Novo Mundo – Quantidade de espécies que apresentam determinado número cromossômico e percentagem relativa ao número total de espécies com dados citogenéticos disponíveis na literatura; distribuição geográfica continental dessas espécies; número cromossômico da fase gametofítica (n); número cromossômico da fase esporofítica (2n); número básico primário ($x_1$) e números básicos secundários ($x_2$); possíveis níveis de ploidia.

| Quantidade de táxons e percentagem | Continentes | n | 2n | $x_1$ e $x_2$ | Nível de ploidia |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 (1,7%) | América | | 21* | $x_1=7$ | $3x_1$ |
| 1 (1,7%) | América | 11 | 22* | $x_1=7$ | $3x_{1+1}$ |
| 3 (5,3%) | Ásia | | 28 | $x_1=7$ | $4x_1$ |
| 1 (1,7%) | Ásia | | 32 | $x_2=8$ | $4x_2$ |
| 3 (5,3%) | Ásia | 20 | 40 | $x_2=7$ | $6x_1$-2 |
| 39 (69,6%) | Ásia e América | 21 | 42* | $x_1=7$ | $6x_1$ |
| 10 (17,8%) | Ásia e América | | 44 | $x_1=7$ | $6x_1$+2 |
| 2 (3,5%) | Ásia | | 46 | $x_1=7$ | $6x_1$+4 |
| 2 (3,5%) | Ásia e América | | 48 | $x_1=7$ | $7x_1$-1 |
| 3 (5,3%) | América | | 50 | $x_1=7$ | $7x_1$+1 |
| 1 (1,7%) | Ásia | | 63 | $x_1=7$ | $9x_1$ |
| 2 (3,5%) | Ásia | | 64 | $x_2=8$ | $8x_2$ |
| 1 (1,7%) | Ásia | | 66 | $X_1=7$ | $10x_1$-4 |
| 1 (1,7%) | América | | 75 | $x_1=7$ | $11x_1$-2 |
| 1 (1,7%) | América | | 80 | $x_1=7$ | $12x_1$-4 |
| 7 (12,5%) | Ásia e América | 42 | 84* | $x_1=7$ | $12x_1$ |
| 1 (1,7%) | Ásia | | 88 | $x_1=7$ | $12x_1$+4 |
| 1 (1,7%) | Ásia | | 108 | $x_1=7$ | $16x_1$-4 |
| 1 (1,7%) | Ásia | | 112 | $x_1=7$ | $16x_1$ |

* Números encontrados neste trabalho.

### *3.3 – Relação entre a filogenia e números cromossômicos*

A fim de testar a hipótese de que possa haver uma correspondência entre os números cromossômicos e os clados obtidos na análise filogenética de Batista et al. (2013) foi realizada a análise filogenética e após a obtenção da árvore foram incorporados os números cromossômicos correspondentes a cada espécie na mesma árvore. Os dados inseridos foram tanto os disponíveis na literatura quanto aqueles obtidos no presente trabalho.

Na filogenia apresentada (Figuras 4 e 5) pode-se observar o clado *Habenaria sensu lato* formado por *Habenaria* e representantes de alguns gêneros relacionados (*Bonatea, Dithrix*, *Gennaria*, *Herminium*, *Pecteilis* e *Peristylus*). Os gêneros exceto *Habenaria* apresentaram uma variação de 2n=36 a 46.

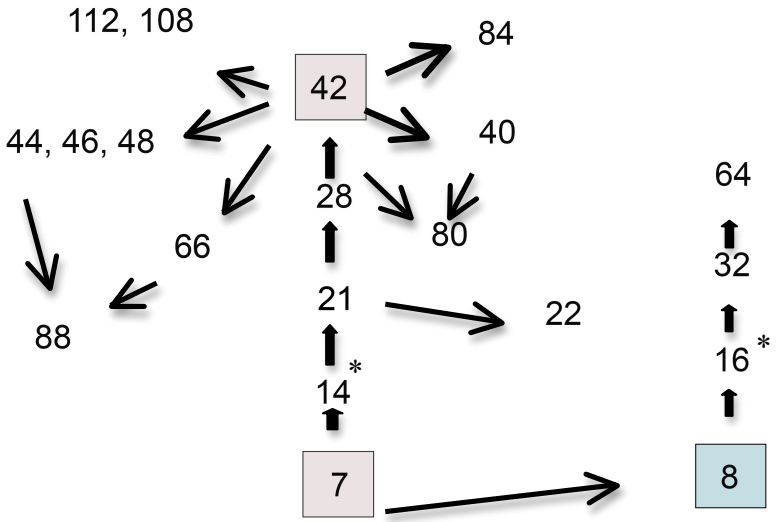



Figura 3 – Modelo sobre as possíveis tendências de supostas linhagens entre os números cromossômicos somáticos encontrados em espécies de *Habenaria*; a ideia da figura é baseada no trabalho de Yokota (1987) realizado para alguns gêneros dentro de Orchideae; 7=número cromossômico básico primário; 8 e 11: números cromossômicos básicos secundários; * indicam hipotéticos números cromossômicos ancestrais (tais números não foram observados e tampouco descritos na literatura).

Em *Habenaria* o clado C "*Habenaria-Bonatea clade*" (Batista et al., 2013) apresenta apenas uma espécie com contagem cromossômica disponível na literatura (*Habenaria intermedia*), com 2n=42. Esta espécie é asiática, com distribuição do Paquistão ao leste da Índia e sul do Tibete.

O clado B "*core Habenaria clade*" (Batista et al., 2013) compreende um clado composto por espécies asiáticas (clado B asiático) apresentando ampla variação de números cromossômicos: 2n=42, 44, 46, 66 e 88 (Figuras 4).

O clado A "*Habenaria Neotropical*" (Batista et al., 2013) é representado pelas espécies de *Habenaria* do Novo Mundo e possui como grupo irmão uma espécie africana (*H. tridens* Lindl.). Infelizmente não existe nenhuma contagem cromossômica para este táxon e também para nenhuma espécie africana, como pode ser observado na figura 2.

O clado 1 (Batista et al., 2013) possui uma espécie com contagem cromossômica: *Habenaria pratensis* (Lindl.) Rchb.f. (2n=42) e o clado 3 apresenta o número 2n=42, nas duas espécies que compõe o mesmo: *H. parviflora* e *H. edwalii*.

O clado formado pelos menores clados 4, 5 e 6 (Batista et al., 2013) contém 13 espécies, das quais oito possuem contagem cromossômica na literatura. Pode-se observar que o número 2n=42 aparece em cinco espécies (*Habenaria exaltata*, *H. macronectar*, *H.*

*montevidensis, H. regnelii*, e *H. repens* Nutt). As outras três espécies apresentam: 2n=44 (*H. bractescens* Lindl. e *H. johannensis* Barb.Rodr.) e 2n=22 (*H. aranifera*).

O clado formado pelos menores clados 8 e 9 (Batista et al., 2013) é marcado pela presença de espécies com 2n=42 e 84 (*Habenaria crassicornis* e *H. quinqueseta)* e o clado 10 por espécies com 2n= 42, 48, 50 e 75. O número 2n=42 aparece em duas espécies – *H. petalodes* e *H. strictissima* e é neste clado que ocorre o registro dos números 2n=48 (*H. pseudohamata* Toscano), 2n=50 (*H. hamata* Barb. Rodr. e *H. josephensis* Barb. Rodr.) e 2n=50 e ca. 75 (*H. obtusa* Lindl.).

Os clados 12 e 13 (Batista et al., 2013) mais *Habenaria pabstii* possuem juntos 14 espécies, sendo que três espécies (*H. guilleminii*, *H. hexaptera* Lindl. e *H. pabstii*) apresentam 2n=84 e uma espécie (*H. trifida* Kunth) 2n=80 e ca. 84.

Os clado D, correspondente à seção *Nudae* Cogn. (Batista et al., 2013) possui alguns clados com baixa amostragem de espécies com contagem cromossômica realizada, como os clados com apenas quatro espécies com registros de seus números cromossômicos (*Habenaria caldensis*, *H. crucifera*, *H. secundiflora* e *H. ciliatisepala*) o número encontrado foi 2n=42.

Os clados 19, 20 e 21 possui uma espécie *H. heptadactyla* com 2n=21 (o menor número registrado para o gênero) e também possuem espécies com 2n=42 (*Habenaria fluminensis* Hoehne, *H. nasuta* e *H. nuda* var. *pygmaea*) e o registro de 2n=84 (*H. mystacina*), observando que as espécies que possuem 2n=84 cromossomos aparecem com uma frequência bem menor do que aquelas com 2n=42.

## 4.Discussão

### 4.1 - Variação cromossômica em *Habenaria*

*Habenaria* possui 17 diferentes números cromossômicos somáticos distribuídos em 56 espécies (Tabela 3 e Apêndice), sendo 2n=42 o número mais frequente entre os táxons com dados disponíveis na literatura e também entre os táxons analisados neste trabalho.

O número n=21 é considerado o número mais comum e o mais representativo na Ásia e Américas (Yokota, 1990; Felix e Guerra, 1998) e parece ser o número básico mais importante dentro do gênero (Felix e Guerra, 2005). E segundo Roy e Sharma (1971) os demais números cromossômicos existentes no gênero devem ser derivados do n=21.

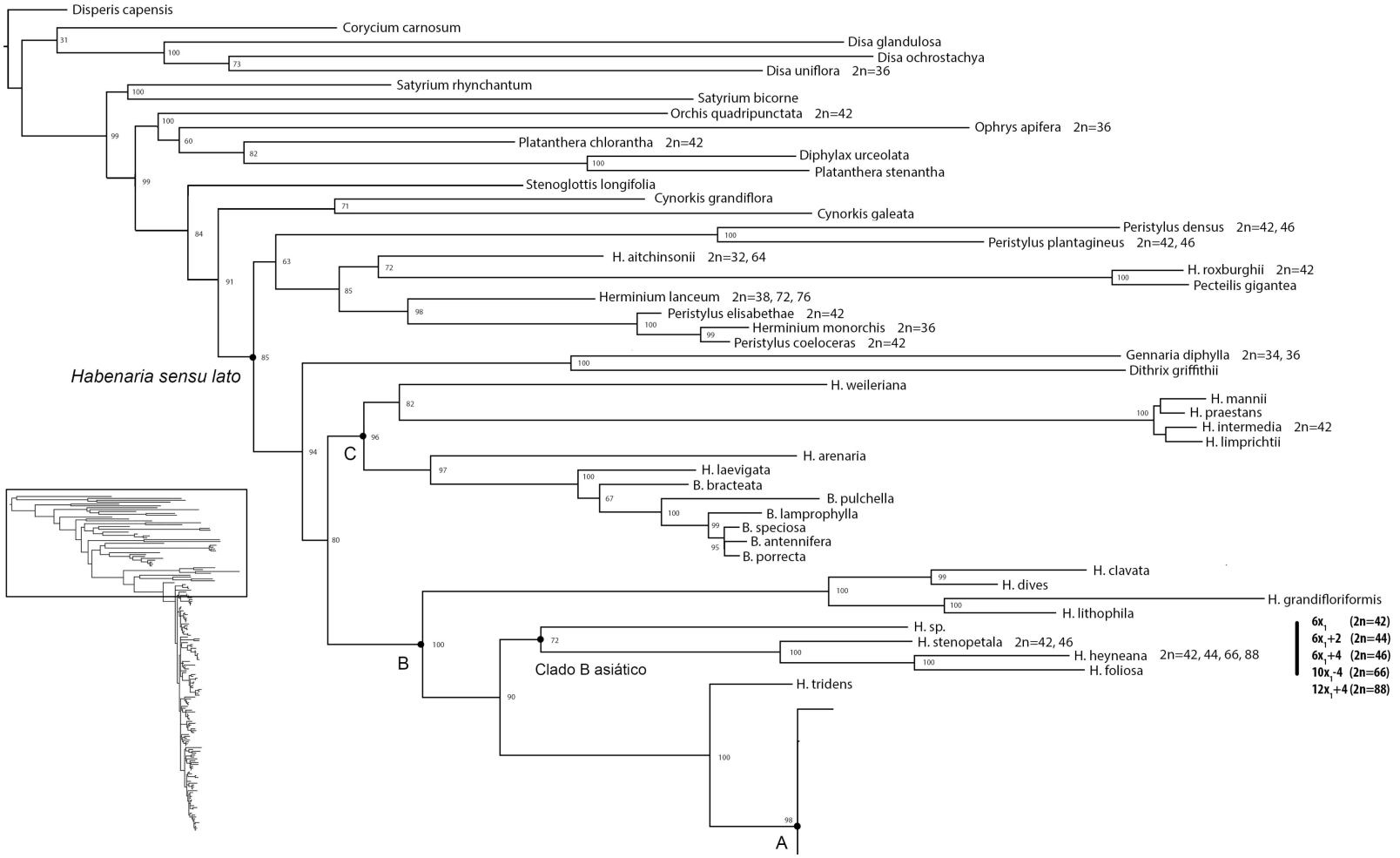
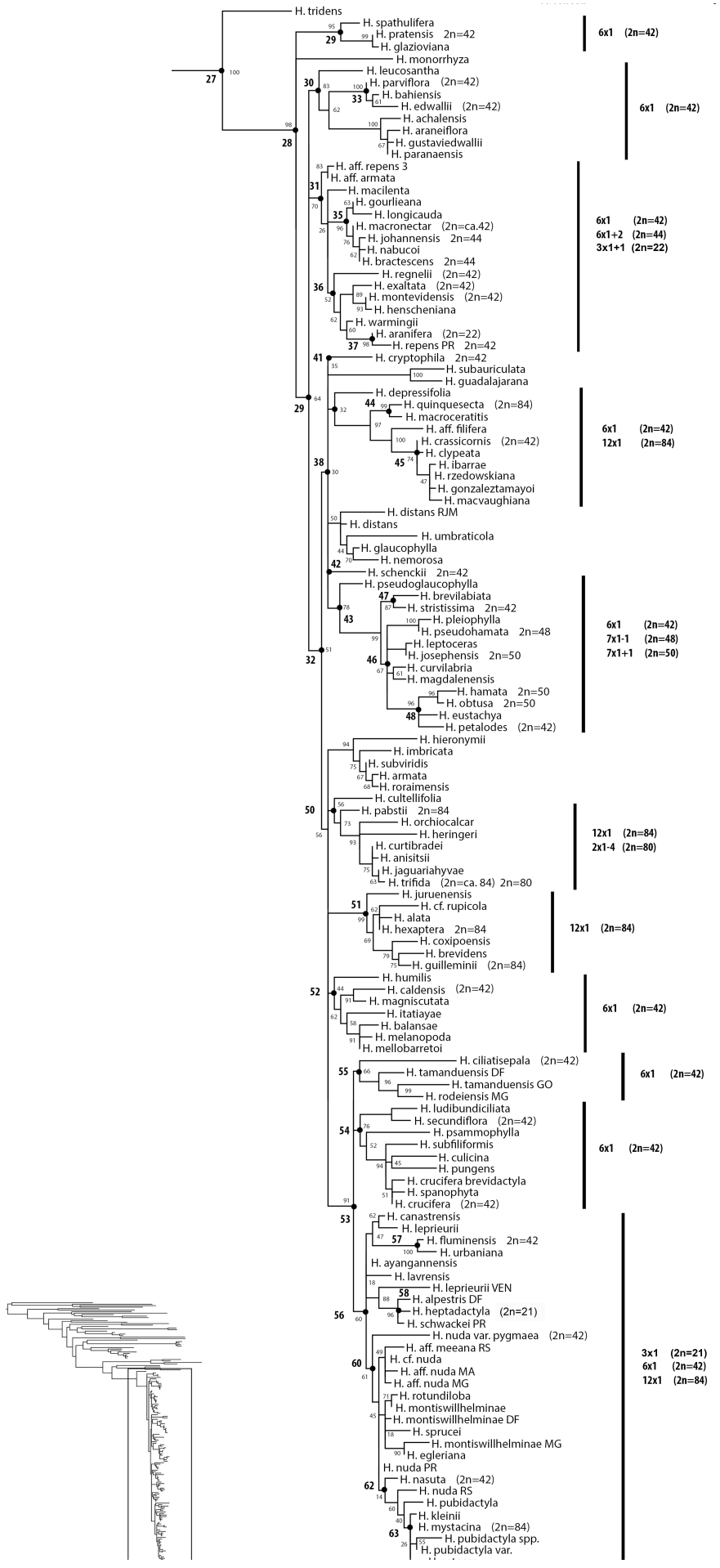



Figura 4 – Primeira parte da árvore obtida pela análise de máxima verossimilhança utilizando uma região do genoma nuclear (ITS) e parte do gene *matK*. Os menores números próximos aos nós correspondem aos valores de *bootstrap*. Os grupos A-D e de 1-21 estão nomeados de acordo com Batista et al. (2013) e o nome genérico para todas as espécies de *Habenaria* estão abreviados. Números cromossômicos estão apresentados em frente às suas respectivas espécies, os números que estão entre parênteses são os resultados apresentados neste trabalho. Possíveis níveis de ploidia estão apresentados em alguns clados.


H. tridens
H. spathulifera
H. pratensis 2n=42
H. glazioviana
H. monorrhyza
H. leucosantha
H. parviflora (2n=42)
H. bahiensis
H. edwallii (2n=42)
H. achalensis
H. araneiflora
H. gustaviedwallii
H. paranaensis
H. aff. repens 3
H. aff. armata
H. macilenta
H. gourlieana
H. longicauda
H. macronectar (2n=ca.42)
H. johannensis 2n=44
H. nabucoi
H. bractescens 2n=44
H. regnelii (2n=42)
H. exaltata (2n=42)
H. montevidensis (2n=42)
H. henscheniana
H. warmingii
H. aranifera (2n=22)
H. repens PR 2n=42
H. cryptophila 2n=42
H. subauriculata
H. guadalajarana
H. depressifolia
H. quinquesecta (2n=84)
H. macroceratitis
H. aff. filifera
H. crassicornis (2n=42)
H. clypeata
H. ibarrae
H. rzedowskiana
H. gonzaleztamayoi
H. macvaughiana
H. distans RJM
H. distans
H. umbraticola
H. glaucophylla
H. nemorosa
H. schenckii 2n=42
H. pseudoglaucophylla
H. brevilabiata
H. stristissima 2n=42
H. pleiophylla
H. pseudohamata 2n=48
H. leptoceras
H. josephensis 2n=50
H. curvilabria
H. magdalenensis
H. hamata 2n=50
H. obtusa 2n=50
H. eustachya
H. petalodes (2n=42)
H. hieronymii
H. imbricata
H. subviridis
H. armata
H. roraimensis
H. cultellifolia
H. pabstii 2n=84
H. orchiocalcar
H. heringeri
H. curtibradei
H. anisitsii
H. jaguariahyvae
H. trifida (2n=ca. 84) 2n=80
H. juruenensis
H. cf. rupicola
H. alata
H. hexaptera 2n=84
H. coxipoensis
H. brevidens
H. guilleminii (2n=84)
H. humilis
H. caldensis (2n=42)
H. magniscutata
H. itatiayae
H. balansae
H. melanopoda
H. mellobarretoi
H. ciliatisepala (2n=42)
H. tamanduensis DF
H. tamanduensis GO
H. rodeiensis MG
H. ludibundiciliata
H. secundiflora (2n=42)
H. psammophylla
H. subfiliformis
H. culicina
H. pungens
H. crucifera brevidactyla
H. spanophyta
H. crucifera (2n=42)
H. canastrensis
H. leprieurii
H. fluminensis 2n=42
H. urbaniana
H. ayangannensis
H. lavrensis
H. leprieurii VEN
H. alpestris DF
H. heptadactyla (2n=21)
H. schwackei PR
H. nuda var. pygmaea (2n=42)
H. aff. meeana RS
H. cf. nuda
H. aff. nuda MA
H. aff. nuda MG
H. rotundiloba
H. montiswillhelminae
H. montiswillhelminae DF
H. sprucei
H. montiswillhelminae MG
H. egleriana
H. nuda PR
H. nasuta (2n=42)
H. nuda RS
H. pubidactyla
H. kleinii
H. mystacina (2n=84)
H. pubidactyla spp.
H. pubidactyla var.
6x1 (2n=42)
6x1 (2n=42)
6x1 (2n=42)
6x1+2 (2n=44)
3x1+1 (2n=22)
6x1 (2n=42)
12x1 (2n=84)
6x1 (2n=42)
7x1-1 (2n=48)
7x1+1 (2n=50)
12x1 (2n=84)
2x1-4 (2n=80)
12x1 (2n=84)
6x1 (2n=42)
6x1 (2n=42)
6x1 (2n=42)
3x1 (2n=21)
6x1 (2n=42)
12x1 (2n=84)

-> Figura 5 – Segunda parte da árvore obtida pela análise de máxima verossimilhança utilizando uma região do genoma nuclear (ITS) e parte do gene *matK*. Os menores números próximos aos nós correspondem aos valores de bootstrap. Os grupos A-D e de 1-21 estão nomeados de acordo com Batista et al. (2013) e o nome genérico para todas as espécies de *Habenaria* estão abreviados. Números cromossômicos estão apresentados em frente às suas respectivas espécies, os números que estão entre parênteses são os resultados apresentados neste trabalho. Possíveis níveis de ploidia estão apresentados em alguns clados.

O conceito de número básico (x) é um dos mais importantes na citotaxonomia, e é interessante identificar as diferenças entre o número básico (x) e os conceitos das variantes: $x_1$ (número cromossômico primário ou original), $x_2$ (número cromossômico secundário) e o número monoploide.

Partindo do pressuposto que grupos naturais sejam monofiléticos, e que uma única população começa com um único cariótipo (com exceção de algumas espécies poliploides), pode-se concluir que cada espécie natural, gênero ou família possui um único número básico primário - $x_1$ (Guerra, 2000). O mesmo autor define que o número básico (x) é um dos números haploides observados em um táxon que mais parcimoniosamente explica a variabilidade cromossômica de um grupo e é um número que apresenta claramente uma relação com os números de outros grupos de táxons que sejam relacionados com o grupo em questão.

Quando alguns táxons apresentam uma ampla diversidade cromossômica portando registros de dois ou mais números básicos, neste caso o número mais significativo pode ser considerado como o número básico primário ou original ($x_1$) e os demais podem ser considerados números básicos secundários ($x_2$) (Guerra, 2000).

Em seu trabalho, Guerra (2000) relata que ocorre muita confusão entre esses conceitos acima mencionados, o número monoploide e o nível de ploidia - porque o (x) é usado tanto para representar o número básico quanto o nível de ploidia (2x, 4, 6x, etc). O número monoploide é o menor número haploide de uma série e poliploides registrado para uma espécie.

Ao longo dos anos vários autores discutem e consideram o número $x_1=7$ como o número cromossômico básico primário para *Habenaria* (Mehra e Bawa, 1970; Roy e Sharma, 1971; Kashyap e Mehra, 1983; Yokota, 1990; Felix e Guerra, 1998; Luo, 2004; Felix e Guerra, 2005). O número $x_1=7$ também parece ser o número cromossômico básico primário para alguns gêneros segregados de *Habenaria sensu lato* (*Platanthera e Peristylus*) e também é registrado para muitos gêneros dentro de Orchidinae, a subtribo mais próxima de Habenariinae (Kashyap e Mehra, 1983).

Kashyap e Mehra (1983), ao analisarem cinco espécies de *Habenaria* com n=21, realizaram uma divisão dos cromossomos em três categorias baseadas em classes de tamanho (pequenos, médios e grandes) e observaram a formação de 3 distintos grupos, portando 7 cromossomos cada, o que reforça a hipótese de que o número básico original para o gênero possa ser o $x_1$=7. De acordo com os mesmos autores, como a maioria das espécies apresenta 2n=42, ao considerar o número $x_1$=7 como o número básico, claramente pode-se observar que a estabilização do nível de ploidia no gênero ocorre ao nível hexaploide, representado pelo 2n=6x=42.

Kashyap e Mehra (1983) consideraram o número $x_2$=8 como um número cromossômico básico secundário e derivado, encontrado em algumas espécies que pertenceram ao gênero *Habenaria.* Na época tais autores consideraram essa uma importante fonte de variação dos números cromossômicos dentro do gênero, entretanto, tais espécies vieram a ser transferidas para outros gêneros.

Luo (2004), ao analisar citologicamente 14 espécies distribuídas em nove gêneros dentro da tribo Orchideae na China, encontrou 2n=32 e 2n=64 em *Habenaria aitchsonii*, e Yokota (1987), ao analisar algumas espécies no Japão, encontrou 2n=64 para *Habenaria dentata* (Sw.) Schltr. Esses números são múltiplos de $x_2$=8 (2n=4x=32) e (2n=8x=64) e são raros para o gênero. Essa mudança entre os números cromossômicos de $x_1$=7 para $x_2$=8 já foi relatada para a tribo Orchideae em outros grupos e parece desempenhar um importante papel na evolução desta tribo.

Foi proposto por D'Emerico (2001) a existência de quatro números básicos cromossômicos distribuídos nas subtribos dentro de Orchideae (*sensu* Cribb, 2001), x=16, 18, 20 e 21. De acordo com Luo (2004), até a publicação do seu trabalho não haviam registros de x=16 ou 18 em espécies asiáticas da subtribo Orchidinae, porém, esses números são comuns para mesma subtribo na Europa, e, já na Ásia os gêneros endêmicos dessa subtribo possuem geralmente x=21. Os números x=20 e 21 aparecem frequentemente distribuídos tanto na Ásia quanto na Europa, e, portanto o autor sugere que os números x=16 e 18 podem estar ser derivados de números secundários, enquanto x=21 é derivado do número básico primitivo na subtribo Orchidinae na Ásia.

Essa mudança de $x_1$=7 para $x_2$=8 tem ocorrido principalmente na subtribo Orchidinae na Europa (Luo, 2004). Mas sabendo que o número 2n=42 é o mais comum dentro da subtribo Habenariinae e após os registros dos números 2n=32 e 64 para *H. aitchisonii* e 2n=64 para *H. dentata* e também para outras espécies de outros gêneros contidos dentro da subtribo, de acordo com Luo (2004) é possível concluir que essa mudança também possa estar ocorrendo

para Habenariinae na Ásia, único local onde, até o momento, foram encontrados esses números múltiplos de $x_2$=8 para Habenariinae. Ao contrário do número $x_2$=8, o número $x_1$=7, que possui uma ampla distribuição no Velho e no Novo Mundo e pode ser considerado o número básico primitivo essa subtribo (Figura 2 e Figura 3). Kashyap e Mehra (1983) sugeriram dois números cromossômicos básicos secundários para *Habenaria* $x_2$= 8 e 15, e Luo (2004) corroborou o número $x_2$= 8 em seu trabalho.

No presente trabalho foi encontrado o interessante registro de dois números novos para o gênero, 2n=21 e 22 para *H. heptadactyla* e *H. aranifera* respectivamente. Até os trabalhos de Yokota (1987, 1990) o menor número diploide encontrado para as espécies de *Habenaria* era 2n=28 ($x_1$=7; 2n=4$x_1$=28) (Apêndice) e o número 2n=21 pode ser considerado como uma variação triploide do número básico original ($x_1$=7; 2n=3$x_1$=21).

Neste estudo é apresentada uma série mais completa de números crômossomicos secundários para o gênero: $x_1$=7 e $x_2$= 8, sendo o x=21 o número crômossomico básico mais frequente e importante dentro de *Habenaria* (Tabela 3) utilizando dados levantados na literatura e os obtidos neste trabalho.

A Tabela 3 e a Figura 3 mostram os diferentes números crômossomicos encontrados para o gênero no Velho e Novo Mundo e os possíveis níveis de ploidia em cada grupo. As indicações dos possíveis níveis de ploidia foram baseadas nos números básicos. O gênero apresenta uma ampla variação entre os níveis de ploidia, de indivíduos possivelmente triploides (3x) até possivelmente indivíduos hexadecaploides (16x), com presença de eventos de disploidia. O gênero *Habenaria* provavelmente é um dos que possuem as maiores variações de níveis ploidia dentro da tribo Orchideae e isso pode estar relacionado com o tamanho do mesmo, já que ele é o maior gênero da tribo. Na Figura 3 estão ilustradas linhagens hipotéticas entre os números cromossômicos somáticos encontrados nas espécies de *Habenaria* para o Novo e Velho Mundo. De acordo com Kashyap e Mehra (1983) o número básico $x_1$=7 pode ter originado os números secundários e os demais números cromossômicos encontrados para a família. Em seu trabalho, Yokota (1987) ilustra algumas linhagens para determinados gêneros dentro de Orchideae, e de acordo com o autor, o número 2n=14 pode ter originado todos os outros números dentro da tribo.

Dados sobre análises citogenéticas de espécies de *Habenaria* africanas não existem na literatura (Figura 2). No trabalho de *Batista* et al. (2013) os autores comentam que a topologia das árvores obtidas indicou uma origem Africana para o clado Neotropical e a que baixa divergência entre as sequências das espécies Neotropicais sugeriu uma radiação recente do gênero no Novo Mundo. Portanto, seria muito interessante a obtenção de dados relacionados

às contagens cromossômicas para as espécies da África, a fim de inseri-las e compará-las na discussão sobre a evolução cromossômica do gênero.

Eventos de disploidia são comuns dentro de *Habenaria* e ocorrem em diferentes níveis de ploida (Felix e Guerra, 2005). Disploidia é a mudança no número cromossômico devido a rearranjos estruturais entre os cromossomos, como fusão e fissão cêntricas e vários tipos de fusão em *tandem* (Schubert e Rieger, 1985), ou seja, nos eventos de disploidia ocorre a redução ou aumento do número cromossômico sem haver alteração quantitativa ou até mesmo qualitativa no material hereditário (Guerra, 1988).

Guerra (2000) comenta que a fusão (disploidia descendente) é considerada mais comum que e fissão (disploidia ascendente), porém, ambos os tipos de mudanças podem ser encontrados tanto em gêneros isolados quanto em gêneros em processos de especiação avançados. O mesmo autor comenta que tais rearranjos podem modificar as relações de atração entre os cromossomos, a extensão da recombinação na meiose e a possibilidade de expressão gênica.

Na Tabela 3 observa-se dez possíveis registros de números disploides: 2n= 40, 44, 46, 48, 50, 66, 75, 88, 80 e 108 e também que os eventos de disploidia descendente (fusão) são possivelmente mais comuns que os eventos de disploidia ascendente (fissão) no gênero, corroborando a observação de Guerra (2000).

O número 2n=44 é um dos números disploides mais frequentes no gênero. O número é registrado para as espécies dez espécies (Figura 4 e 5). Tais táxons podem ser considerados hexaploides (derivados de $x_1$=7) e na maioria das vezes em que este número é registrado para um determinado táxon, o número 2n=42 também é observado (Apêndice), o que auxilia a interpretação que possa ter ocorrido este evento de disploidia.

Assim como o número 2n=44, o registro do número 2n=88 (*H. heyneana*) também pode estar ligado ao $x_1$=7, e a ocorrência deste número, juntamente com os números 2n=42, 44 e 88 reforça a ideia de que os números foram derivados do $x_1$=7 e, portanto, do número n=21 - que é considerado por vários autores, como já mencionado anteriormente, o número básico mais frequente para o gênero.

Apenas duas espécies apresentam 2n=46 ($6x_1$+4). Nas duas espécies em que este número é registrado o número 2n=42 também pode ser observado (Apêndice), sendo uma situação parecida com a descrita acima para o 2n=44.

O número 2n=48 também é pouco frequente no gênero (*H. arietina e H. pseudohamata*) e o seu cariótipo pode ser considerado $7x_1$-1, ou seja, provavelmente houve um evento de fusão em algum momento na história cromossômica evolutiva do táxon.

Um registro parecido com o 2n=48, porém, marcado por um provável evento de fissão é o 2n=50 (*H. hamata, H. josephensis* e *H. obtusa*). Portanto, número 2n=50 pode ser considerado $7x_1+1$, que possui n=25. O registro do número 2n=ca. 75 para *H. obtusa* (Apêndice) e este número pode estar relacionado com o 2n=50 ($11x_1$-2).

*H. trifida* com 2n=80 e 84 sugere que o táxon seja considerado um dodecaploide 2n=84 ($12x_1$), que também apresenta uma variação $12x_1$-4. Essa variação numérica apresentada pela espécie pode ser devido a sua ampla distribuição, do norte da Argentina até o México (Batista et al., 2013).

A espécie *H. diphylla* possui um número alto de cromossomos 2n=108 e $x_2$=54 (como menor número haploide). A espécie ser considerada hexadecaploide com disploidia ($16x_1$-4).

Kashyap e Mehra (1983) relatam que eventos de aneuploidia são frequentes na especiação de *Habenaria*, ou seja, que eventos de alterações numéricas como a adição e a deleção de um ou mais cromossomos favorecem a especiação e não afetam o balanço fisiológico final da sobrevivência dos táxons.

Roy e Sharma (1971), ao analisarem as espécies *Habenaria arietina* (2n=42, 46) e *H. longicornu* (2n=42, 84), também relatam que alterações numéricas têm sido de grande importância para o gênero. Além das alterações numéricas os autores observaram que os cariótipos das espécies possuíam diferentes combinações de tipos de cromossomos que portavam alterações estruturais, e que essas alterações também poderiam ter desempenhado um papel importante na origem dessas espécies.

Kashyap e Mehra (1983) observaram variações no comprimento dos cromossomos e também na fórmula cariotípica de alguns representantes de *Habenaria* e comentam que esses resultados indicam alterações estruturais cromossômicas na forma de deleções ou adições o que pode atuar ativamente na dinâmica do gênero o qual demonstra estar em um ativo estado de especiação.

Tão bem quanto eventos de aneuploidia, os eventos de poliploidia intra e interespecífica são considerados comuns em *Habenaria* (Duncan, 1959; Mehra e Vij, 1972; Tanaka e Kamemoto, 1972, 1974). Felix e Guerra (2005) também relataram uma alta frequência de eventos de poliploidia ao analisarem 13 spp. pertencentes ao gênero.

De acordo com o levantamento da contagem cromossômica existente para o gênero (Apêndice), oito espécies apresentam cariótipos poliploides *Habenaria aitchisonii* (2n=32, 64), *H. brachyphylla* (Lindl.) Aitch. (2n=42, 84), *H. dentata* (2n= 64, 84), *H. diphylla* (2n=40, 42, 44, 108), *H. grandifloriformis* (2n=42, 84), *H. longicornu* (2n= 42, 63, 84), *H. obtusa* (2n=50, c.75), *H. viridiflora* (2n=44, 84).

*Platanthera edgeworthii* (Hook.f. ex Collett) R.K.Gupta ocorre desde o Paquistão até ao Himalaia e foi segregada de *Habenaria*. No passado, quando estava incluído em *Habenaria*, esse táxon foi um dos primeiros a ter registrada a variação de níveis diferentes de ploidia dentro de uma mesma espécie, 2n=42 e 84 (Vij et al., 1981; Vij et al., 1982; Kashyap e Mehra, 1983). Diferentes citótipos foram comparados por Kashyap e Mehra (1983) e embora quase nenhuma diferença morfológica considerável tenha sido encontrada entre os indivíduos, foi observada uma diferença notável de tamanho entre eles. Embora a espécie seja considerada atualmente integrante de outro gênero, é importante observar que este trabalho foi o único que comparou a morfologia entre os diferentes citótipos.

Stebbins (1971) observou que uma das características evolutivas mais importante dos poliploides é sua herança polissômica, e enquanto espécies diploides possuem somente dois alelos para cada *locus*, as tetraploides possuem quatro e as dodecaploides têm doze. Porém a expressão de novos alelos recessivos em uma espécie poliploide deve ser menos provável que em uma diploide (Guerra, 2000). O mesmo autor comenta que as espécies popliploides expressam mudanças genéticas em taxas mais lentas que as espécies diploides e ao longo do tempo os representantes diploides devem se diferenciar mais rápido em relação aos representantes poliploides.

Eventos de poliploidia são conhecidos como comuns nas angiospermas, nas quais provavelmente pelo menos um evento de poliploidização ocorreu em sua história evolutiva (Blanc e Wolfe, 2004). Por formar uma barreira reprodutiva, a poliploidia constitui o fator principal para que ocorra especiação abrupta em plantas, sendo um processo evolutivo de extrema importância que normalmente está associada a eventos de hibridação natural (Freitas e Bered, 2003).

Segundo Otto e Whitton (2000) a especiação via poliploidia é provavelmente uma das formas mais comuns de especiação simpátrica em plantas. Como consequência os efeitos potenciais em larga escala na regulação gênica e em processos no desenvolvimento podem provocar mudanças imediatas na morfologia, sistemas de reprodução e capacidade de tolerar alterações ecológicas. As variações genéticas observadas nessas espécies, juntamente com as variações morfológicas, sugerem que os eventos de poliploidização sejam relevantes na evolução do gênero.

### 4.2 - Filogenia x Poliploidia

Ao correlacionar os números cromossômicos registrados anteriormente para espécies na literatura (56 spp. com contagens cromossômicas – Apêndice) e os novos registros e números para espécies apresentados neste trabalho (28) com a filogenia obtida pela análise de verossimilhança, é possível observar que os números cromossômicos não apresentam uma relação direta e uniforme em relação à distribuição dos clados na árvore filogenética (Figuras 4 e 5).

O número 2n=42 (hexaploide para $x_1$=7) é o que aparece com maior frequência na maioria dos grupos. Esse resultado corrobora os dados da literatura nos quais 2n=42 é considerado o número básico e também o mais frequente no gênero (Yokota, 1990; Felix e Guerra, 1998, 2005) e o número no qual supostamente ocorre a estabilização do nível de ploidia da maioria das espécies de *Habenaria* (Kashyap e Mehra, 1983). Tanto 2n=42 quanto 2n=84 (dodecaploide para $x_1$=7) se repetem em quase todos os clados de forma independente, ou seja, não há correlação entre os referidos números e os clados contidos na análise.

Em relação ao clado A (*Habenaria* Neotropical) interessantes eventos poliploidia podem ser observados em todos os clados. O nível de ploidia hexaploide ($6x_1$) está presente em quase todos os clados, porém, os clados 8, 12, 13 e 21 são os que possuem o mais alto nível de ploidia registrado para o gênero nas Américas ($12x_1$). Os eventos de disploidia podem ser observados nos clados 4, 10 e 12 (Figuras 4 e 5). Os clados 1, 4, 5, 6, 10, 12 e 13 serão comentados com mais detalhes abaixo.

Os clados 4, 5 e 6 são caracterizados por apresentar diferentes níveis de ploidia, com espécies portando 2n=22, 42, 44 ($3x_1+1, 6x_1, 6x_1+2$, com $x_1$=7 e $x_2$=11) cromossomos. É neste clado que ocorre o primeiro registro do número 2n=22, que é o segundo menor número diploide encontrado para o gênero. O número 2n=22 é, como mencionado anteriormente, uma importante descoberta feita neste trabalho e parece, até o momento, estar restrito ao clado A (*Habenaria* Neotropical).

O clado 6 apresenta duas espécies morfologicamente muito similares segundo Lau (2013), e que neste clado parecem estar muito relacionadas: *Habenaria aranifera* e *Habenaria repens*. Embora *H. aranifera* e *H. repens* sejam morfologicamente muito semelhantes e filogeneticamente próximas, em uma análise genética de populações das duas espécies utilizando microssatélites, Lau (2013) indicou que elas formam dois grupos genéticos distintos. A diferença nos números cromossômicos entre as duas espécies, envolvendo também diferentes níveis de ploidia, pode ser considerada mais uma evidência a favor da manutenção dos dois táxons como espécies distintas. É interessante a realização de mais

estudos relacionados a essas espécies, incluindo um idiograma, a fim de comparar seus cariótipos, levando em consideração, como por exemplo, a morfologia dos cromossomos.

Dentre as 57 espécies de *Habenaria* (e também nas 82 espécies considerando os dados deste trabalho) que possuem contagem, 10 espécies apresentam 2n=44 e este é o número disploide ($6x_1$+2) mais comum dentro do gênero (Apêndice). Duas espécies Neotropicais *H. johannensis* e *H. bractescens* apresentam 2n=44 e se encontram no mesmo subgrupo clado 4, que constitui a seção *Macroceratitae* (Batista et al., 2006). Porém não parece haver nenhuma relação direta entre o número cromossômico, as relações filogenéticas e a morfologia das espécies, pois *H. johannensis* é morfologicamente bastante diferente de *H. bractescens*. Como sugerido acima, também é interessante um estudo que compare a morfologia dos cariótipos dos táxons em questão.

O clado 10 é um dos clados com grandes diferenças em relação aos níveis de ploidia para o gênero ($6x_1$, $7x_1$-1, $7x_1$+1, $11x_1$-2), com uma espécie hexaploide, quatro espécies heptaploides e uma espécie hendecaploide. Além dos eventos de poliploidia, é interessante notar a alta frequência de eventos de disploidia presentes neste clado, e todos ligados ao número básico $x_1$=7. Entretanto, aqui também não há uma relação direta entre os números cromossômicos e a morfologia e relações filogenéticas entre as espécies. As espécies *H. hamata* e *H. obtusa* aparecem no mesmo clado e apresentam 2n=50, um número que não é frequente no gênero. Batista et al. (2013) comentam que essas espécies se encontram em um clado de espécies florestais na filogenia apresentada por eles, porém, *H. hamata* e *H. obtusa* ocorrem preferencialmente em campos secos, indicando uma provável reversão no comportamento de distribuição das mesmas.

No mesmo subgrupo onde se encontram *H. hamata* e *H. obtusa*, dentro do clado 10, está *H. petalodes* que apresenta 2n=42 enquanto *H. josephensis* que encontra-se em outro subgrupo próximo apresenta 2n=50, sugerindo que o número 2n=50 surgiu independentemente nos dois subgrupos, dentro do mesmo clado. Outra variação também é encontrada em *H. pseudohamata*, com 2n=48 e que pode representar um heptaploide com disploidia descendente para um cromossomo $7x_1$-1.

Os clados 12 (mais *Habenaria pabstii*) e 13 são marcados pelos registros de quatro espécies dodecaploides ($12x_1$, com $x_1$=7), com 3 espécies (*H. pabstii, H. guilleminii*, *H. hexaptera*) apresentando 2n=84 e uma espécie (*H. trifida*) com 2n=80, ca. 84, sendo que esta última é caracterizada além de ter um nível de ploidia $12x_1$, também por possuir o registro de um evento de disploidia (2n=80, $12x_1$-4). É interessante observar que as quatro espécies amostradas até agora nestes subclados sejam dodecaploides e que nenhuma tenha 2n=42, o

número mais frequente no gênero. Estes dados sugerem que eventos de poliploidização ligados ao número dodecaploide ($12x_1$) podem ter sido relacionados aos ancestral de cada um ou uma relação direta entre os dois subclados, uma vez que a relação entre eles ainda não está resolvida. Batista et al. (2013) comentam que *H. trifida* apresenta uma grande amplitude geográfica, ocorrendo desde o norte da Argentina até o sul do México, e grande variabilidade morfológica. Esses fatos podem estar relacionados à variação observada no número cromossômico desta espécie.

O clado D (clados 17 ao 21) está na posição mais derivada dentro da análise filogenética e nele pode ser observada uma ampla variação, de 2n=21 a 2n=84. Os clados como os 17, 18, 19 que apresentam somente o número 2n=42 ($6x_1$), o clado 20 que apresenta o primeiro registro 2n=21 ($3x_1$) que é o menor número registrado para o gênero e também é uma importante descoberta feita neste trabalho e parece também estar restrito ao clado A (*Habenaria* Neotropical). O clado 21 que apresenta o 2n=42 ($6x_1$) e apenas uma espécie com 2n=84 ($12x_1$). É possível observar, portanto, que nesses clados mais derivados existe uma incidência maior de espécies com 2n=42 em comparação ao número 2n=84.

Nossos dados não concordam com a hipótese de Batista et al. (2013) a qual sugeriu um processo de poliploidização crescente nos clados derivados a partir do número básico 2n=42, que estaria restrito aos clados basais. Nossos resultados para as espécies neotropicais, bem como os dados da literatura para o gênero como um todo, mostram que o número 2n=42 é o mais frequente e ocorre em espécies distribuídas ao longo de toda a árvore. A maior parte dos clados identificados nas análises filogenéticas apresentavam espécies com diferentes números cromossômicos. Deste modo a possibilidade de que os números cromossómicos fossem constantes dentro dos clados e pudessem ser usados como um caráter a mais, também não foi confirmada. Todavia, a densidade amostral dentro dos clados ainda é baixa, de modo que é possível que exista uma correspondência entre alguns clados bem como entre espécies proximamente relacionadas.

## 5. Conclusões

No presente trabalho foi é possível observar que os números cromossômicos não apresentam uma relação direta e uniforme em relação à distribuição dos clados apresentados na filogenia de Batista et al. (2013), já que eles aparecem de forma independente dentro do grupo estudado.

Os dados referentes aos números cromossômicos encontrados neste trabalho reforçam a teoria de que o número x=21 seja o mais frequente e importante dentro de *Habenaria* e também que $x_1$=7 seja o número básico primário do gênero.

Com o registro de dois novos números 2n=21 e 22, restritos ao clado neotropical, é possível sugerir o que o número 2n=21 possa ser uma variação triploide do número básico $x_1$=7.

As variações cromossômicas observadas nas espécies que constituem o gênero *Habenaria*, juntamente com as variações morfológicas, sugerem que os eventos de poliploidização sejam relevantes na evolução do gênero, o qual demonstra estar em um ativo estado de especiação.

## 6. Referências bibliográficas


Atwood JT. 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of the epiphytic orchids. **Selbyana** 9: 171–186.

Batista JAN, Bianchetti LB. 2002. A review of *Habenaria* in Pabst & Dungs Orchidaceae Brasilienses. **Lindleyana** 17: 75–84.

Batista JAN, Bianchetti LB. 2003. Lista atualizada das Orchidaceae do Distrito Federal. **Acta Botanica Brasilica** 17: 183–201.

Batista JAN, Bianchetti LB, Miranda ZJG. 2006a. The *Habenaria* section *Macroceratitae* (Orchidaceae) in Brazil. **Brittonia** 58: 10–41.

Batista JAN, Bianchetti LB. 2006b. The Brazilian *Habenaria* (Orchidaceae) with hairy segments. **Sitientibus, Série Ciências Biológicas** 6: 9–23.

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, Faria MW, 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.

Batista JAN, Proite K, Carvalho BM, Vale AA, Felix LP. 2014. From Cuba to most of the neotropic: *Habenaria bicornis* (Orchidaceae) is widespread from Mexico to southeastern Brazil. **Lankesteriana** 13: 165–184.

Blanc G, Wolfe KH. 2004. Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. **Plant Cell** 16:1667–1678

Bonfield JK, Smith KF, Staden R. 1995. A new DNA sequence assembly program. **Nucleic Acids Research** 24: 4992–4999.

Carvalho CR. 1995. *Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (Zea mays L.).* Tese de Doutorado não publicada. Universidade Federal de Viçosa.

Chatterji AK. 1986. Chromosomes in orchid phylogeny and classification. In: Vij SP, ed. *Biology, conservation, and culture of orchids*. New Delhi: Affiliated East-West Press Private Limited, 181-187.

Christenson E. 2004. Orchidaceae. In: Smith N, Mori S, Henderson A, Stevenson D.W, Heald SV, eds. *Flowering plants of the Neotropics.* Princeton: Princeton University Press, 465–468.

Cribb PJ. 2001. Distribution of Orchideae, *Ponerorchis*. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase, MW, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum, Vol. 2, part 1: Orchidoideae*. New York: Oxford University Press, 215–354.

Cronquist A. 1988. *The evolution and classification of flowering plants*. New York: The New York Botanical Garden.

Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF. 1985. *The Families of the Monocotyledons*. Berlin: Springer-Verlag.

Dalgaard V. 1991. Chromosome studies in flowering plants from Macaronesia II. **Willdenowia** 20: 139–152.

Daviña JR, Gabriele M, Cerutti JC, Hojsgaard D, Almada RD, Insaurralde IS, Honfi AI. 2009. Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina. **Genetics and Molecular Biology** 32: 811-821.

D'Emerico S. 2001. Cytogenetics. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase, MW, Rasmussen FN, eds. *Genera Orchidacearum, Vol. 2, part 1: Orchidoideae*. New York: Oxford University Press, 216–224.

Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. **Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of American** 19: 11–15.

Dressler RL. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Portland: Dioscorides Press.

Duncan RE. 1959. List of chromosome numbers in orchids. In: Withner CL, ed. *The Orchids. A scientific survey*. The Ronald Press, New York, 529–587.

Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research 32**: 1792–1797.

Felix LP, Guerra M. 1998. Cytogenetic studies on species of *Habenaria* (Orchidoideae: Orchidaceae) occurring in the northeast of Brazil. **Lindleyana** 13: 224–230.

Felix LP, Guerra M. 2000. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of Cymbidioid orchids. **Genetics and Molecular Biology** 23: 957–978.

Felix LP, Guerra M. 2005. Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. **Plant Systematics and Evolution** 254:131–148.

Freitas LB, Bered F. 2003. *Genética e evolução vegetal*. Porto Alegre: Ed. UFRGS.

Garaj V, Papes D, Pevalek B. 1981. In: IOPB Chromosome number reports LXX. **Taxon** 30: 1 69–70.

Garay LA. 1960. On the origin of the Orchidaceae. **Botanical Museum Leaflets, Harvard University** 19: 57–96.

Garg V, Jorapur SM. 1990. Accessory chromosomes in *Habenaria* (Orchidaceae). **Journal of the Indian Botanical Society** 68: 399–400.

Govaerts R, Pfahl J, Campacci MA, Holland Baptista D, 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/. Acesso em 11.07.2013.

Govaerts R, Pfahl J, Campacci MA, Holland Baptista D, Tigges H, Shaw J, Cribb P, George A, Kreuz K, Wood J. 2011. World Checklist of Orchidaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. http://apps.kew.org/wcsp/. Acesso em 15.04.2014.

Greilhuber J, Ehrendorfer, F. 1975. Chromosome numbers and evolution in *Ophrys* (Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution** 124: 125–138.

Guerra M. 2000. Chromosome variation and evolution in monocots. In: Wilson KL, Morrison DA, eds. *Monocots: systematic and evolution*. Collingwood: CSIRO, 127–136.

Hoehne FC. 1940. Orchidaceas, *Habenaria*. In: Hoehne FC, ed. *Flora Brasílica*, Vol. 12. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo, 52–254.

Jorapur SM. 1980. In: Löve A, ed. Chromosome number reports LXVIII. **Taxon** 29:546.

Jorapur SM, Garg V. 1980. In: Löve A, ed. Chromosome number reports LXVIII. **Taxon** 29: 547.

Jorapur SM, Kulkarni PA. 1979. Cytotaxonomy of *Habenaria*. **Journal of Cytology and Genetics** 14: 71–74.

Jorapur SM, Kulkarni PA. 1980. In: Löve A, ed. Chromosome number reports LXVIII. **Taxon** 29: 546–547.

Jorapur SM, Phatak S. 1981. In: Löve A, ed. Chromosome number reports LXXIII. **Taxon** 30: 854–855.

Jorapur SM, Phatak S. 1984. In: Löve A, ed. Chromosome number reports LXXXII. **Taxon** 33: 126–134.

Karp A, Seberg O, Buiatti M. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. **Annals of Botany** 78: 143–149.

Kashyap SK, Mehra PN. 1983. Cytological investigations on West Himalayan orchids. Tribe: Orchideae. I. The genus *Habenaria* Willd. **Cytologia** 48: 633–646.

Krogulevich RE. 1978. Kariologicheskij analiz vidov flory Vostochnogo Sajana. V Flora Pribajkal'ja. 19–48. Novosibirsk: Nauka.

Kulkarni H, Jorapur SM. 1979. In: Löve A, ed. IOPB chromosome number reports LXIV. **Taxon** 28: 392.

Lau BL. 2013. **Análise filogenética molecular e biossistemática do complexo *Habenaria repens* Nutt. (Orchidaceae) no Brasil.** Dissertação de Mestrado não publicada. Universidade Federal de Minas Gerais.

Luo YB. 2004. Cytological studies on some representative species of the tribe Orchideae (Orchidaceae) from China. **Botanical Journal of the Linnean Society** 145: 231–238.

Mehra PN. 1983. *Cytology of orchids of Khasi and Jaintia Hills*. New Delhi: Kapur/Rajbandhu.

Mehra PN, Bawa KS 1970. Cytological observations on some Northwest Himalayan orchids. **Caryologia** 23: 273–282.

Mehra PN, Sehgal RN. 1980. In: Löve A, ed. IOPB chromosome number reports LXVII. **Taxon** 29: 348–350.

Mehra PN, Kashyap SK. 1979. In: Löve A, ed. IOPB chromosome number reports LXIV. **Taxon** 28: 406–408.

Mehra PN, Kashyap SK. 1989. *Cytology of orchids of north-west Himalayas*. New Delhi: Pramodh P. Kapur, Raj Bandhu Industrial Co.

Mehra PN, Kashyap SK. 1981. In: Löve A, ed. IOPB chromosome number reports LXXI. **Taxon** 30: 506–507.

Mehra PN, Vij SP. 1970. In: IOPB chromosome number reports. **Taxon** 19: 102–113.

Mehra PN, Vij SP. 1972. Cytological studies in the East Himalayan Orchidaceae II. Orchideee. **Caryologia** 25: 335–351.

Mikcieta K. 1982. Zytotaxonomischer Beitrag zur Flora des Javornaiky-Gebirges II. **Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Comenianae, Botanica 29**: 55–61.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**. New Orleans, 1–8.

Otto SP, Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution**. Annual Review of Genetics** 34: 401–37.

Phatak S, Jorapur, SM. 1983. Three chromosomal biotypes of *Habenaria marginata* Coleb. (Orchidaceae). **Proceedings of Indian Science Congress Association 70**(3–6): 87.

Pienaar RV, Littlejohn GM, Hill MS, Plessis C, Cywes S. 1989. Chromosome numbers of various *Disa* species and their interspecific and complex hybrids. **South African Journal of Botany** 55: 394–399.

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

Radhamoni G, Vatsala P, Ninan CA. 1985. Chromosome numbers in some South Indian orchids. **New Botanist** 12: 77–82.

Roy SC, Sharma AK. 1971. Cytological studies of Indian orchids. **Proceedings of the Indian National Sciences Academy** 38B: 72–86.

Schubert I, Rieger R. 1985. A new mechanism for altering chromosome number during karyotype evolution. **Theoretical and Applied Genetics** 70: 213-221.

Scrugli A. 1978. Numeri cromosomici per la Flora Italiana: 526–533. **Informatore Botanico Italiano** 10: 414–421.

Singh F. 1981. In: Löve A, ed. Chromosome number reports LXXII. **Taxon** 30: 704–705.

Singh F. 1983. In: Löve A, ed. IOPB chromosome number reports LXXVIII. **Taxon 32:** 140–141.

Stamatakis A, Ludwig T, Meier H. 2005. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. **Bioinformatics** 21:456–463.

Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. **Systematic Biology** 57: 758–771.

Stebbins GL. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants.* California: Addison-Wesley Publishing Company.

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, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution 24**: 1596–1599.

Tanaka R, Kamemoto HH. 1972. *A complete tabulation of chromosome numbers in Orchidaceae. Reprinted from the Orchids, Culture and Breeding.* Tokyo: Seibundo Shinkosha Co. Ltd., 667–773.

Tanaka R, Kamemoto HH. 1974. List of chromosome numbers in species of the Orchidaceae. In: Withner CL, ed. *The orchids: Scientific studies*. New York: John Wiley & Sons, 411–484.

Viccini LF, Pierre PMO, Praça MM, Costa DCS, Romanel EC, Sousa SM, Peixoto PHP & Salimena, FRG. 2005. Chromosome numbers in *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution 256**: 171–178.

Vij SP. 1989. Chromosomes and speciation in Indian orchids. **The journal of the orchid society of India** 3: 11–24.

Vij SP, Shekhar N, Kuthiala R. 1981. In: Löve A, ed. IOPB chromosome number reports LXXI. **Taxon** 30: 512.

Vij SP, Shekhar N, Kuthiala R. 1982. In: Löve A, ed. IOPB chromosome number reports LXXVII. **Taxon** 31: 769.

Vij SP, Shekhar N, Kuthiala R, Sood A. 1983. In: Löve A, ed. IOPB chromosome number reports LXXVIII. **Taxon** 32: 138.

Vij SP, Sood R. 1986. Cytology in relation to morphology in *Spiranthes lancea* (Sw.) Backer. In: Vij SP, ed. *Biology, conservation, and culture of orchids*. New Delhi: Orchid Society of India, Affiliated East–West Press, 147–161.

Vijayakumar N., Subramanian D. 1994. Karyomorphological studies of Orchidaceae from Tamilnadu. **Cell Chromosome Research** 17: 40–47.

Wolfe AD. 2005. ISSR techniques for evolutionary biology. In: Zimmer EA, Roalson EH, eds. *Methods in enzimology, Vol. 395 – Molecular evolution: producing the biochemical data, part B*. San Diego: Elsevier, 134–144.

W3 Tropicos. 2014. Misouri Botanical Garden. Disponível em: http://www.tropicos.org.

Yokota M. 1987. Karyotypes and phylogeny in Orchidinae and allied subtribes. In: *Proceedings of the 12th World Orchid Conference*. Tokyo: 12th World Orchid Conference Organizing Committee, 70–79.

Yokota M. 1990. Karyomorphological studies on *Habenaria*, Orchidaceae, and allied genera from Japan. **Journal of Science of the Hiroshima University, Series B, Division 2, Botany** 23: 53–161.

# Apêndice

Tabela 1 - Táxons de *Habenaria* e de gêneros próximos com números cromossômicos disponíveis na literatura. Contagem gametofítica (n); contagem esporofítica (2n), localidade (país) e referências.

| | Seção | n | 2n | Localidade (País) | Fonte |
|---|---|---|---|---|---|
| *Habenaria acuifera* Wall. ex Lindl. | | | 42, 44 | Índia | MS80, M83 |
| *Habenaria aitchisonii* Rchb. f. ex Aitch. & Hemsl. | *Diphyllae* | | 32, 64 | China | L04 |
| *Habenaria arietina* Hook. f. | *Multipartitae* | 21 | 42, 46, 48 | Índia | MK81, KM83, VS86, MK89 |
| *Habenaria barnesii* Summerh. | | 21 | 42 | Índia | R85 |
| *Habenaria bicornis* Lindl. | | 21 | 42 | Brasil | BT01 |
| *Habenaria bractescens* Lindl. | | | 44 | Argentina | |
| *Habenaria brachyphylla* (Lindl.) Aitch. | *Diphyllae* | | 42, 84 | Índia | JK80, S83, |
| *Habenaria commelinifolia* (Roxb.) Wall. ex Lindl. | | 21 | 42 | Índia | KJ79, S81, KM83, VS86, MK89, |
| *Habenaria crinífera* Lindl. | | | 42 | Índia | KJ79, JK80 |
| *Habenaria cryptophila* Barb. Rodr. | | | 42, c.42 | Brasil | FG98, FG05 |
| *Habenaria delavayi* Finet | *Diphyllae* | | 42 | China | L04 |
| *Habenaria dentata* (Sw.) Schltr. | | | 64, 84 | Índia | M83, Y87, Y90 |
| *Habenaria digitata* Lindl. | | | 42 | Índia | JK79, JP81, S83 |
| *Habenaria diphylla* Dalzell | *Diphyllae* | 20 | 40, 42, 44, 108 | Índia | J80, S83, JP84, KM83, MK89 |
| *Habenaria fluminensis* Hoehne | | | 42 | Brasil | FG05 |
| *Habenaria furcifera* Lindl. | | 21 | 42, 44 | Índia | JK79, J80, S83, V83 |
| *Habenaria gibsonii* Hook. f. | | | 42 | Índia | JP81, S83 |
| *Habenaria grandifloriformis* Blatt. & McCann | *Diphyllae* | | 42, 44, 84 | Índia | J80, JK80, S83 |
| *Habenaria hamata* Barb. Rodr. | | | 50 | Brasil | FG98 |
| *Habenaria hexaptera* Lindl. | | c.42 | c.84 | Brasil | FG98 |
| *Habenaria heyneana* Lindl. | | | 42, 44, 66, 88 | Índia | JK79, JG80, JG80, S83, GJ90 |
| *Habenaria intermedia* D. Don | *Multipartitae* | 21 | 42 | Índia | MK79, V81, V82, KM83, MK89 |
| *Habenaria iyoensis* Ohwi | | | 42 | Japão | Y90 |
| *Habenaria* cf. *johannensis* Barb.Rodr. (como *H. fastor*) | | | 44 | Brasil | FG05 |
| *Habenaria josephensis* Barb. Rodr. | | | 50 | Brasil | FG98 |
| *Habenaria khasiana* Hook. f. | | 21 | 42 | Índia | M83 |
| *Habenaria linearifolia* Maxim. | | | 28 | Japão | Y87, Y90 |
| *Habenaria longicorniculata* J. Graham | | | 40, 42, 44 | Índia | JG80, KJ79, GJ90 |
| *Habenaria longicornu* Lindl. | | | 42, 63, 84 | Índia | J80, JP81, R85 |
| *Habenaria mairei* Schltr. | *Multipartitae* | | 40 | China | L04 |
| *Habenaria marginata* Colebr. | | 21 | 42 | Índia | JK79, J80, S81, JP81, PJ83, KM83, VS86, MK89 |
| *Habenaria multicaudata* Sedgw. | | | 42 | Índia | JP81, S83 |
| *Habenaria obtusa* Lindl. | | 25 | 50, c.75 | Brasil | FG98, FG05 |
| *Habenaria panchaganiensis* Santapau & Kapadia | | | 42 | Índia | JK80 |
| *Habenaria pantlingiana* Kraenzl. | | | 42 | Japão | Y87, Y90 |
| *Habenaria parviflora* Lindl. | | 21 | 42 | Brasil | FG05 |
| Habenaria aff. *parviflora* Lindl. (como *H. montevidensis*) | | 42 | 84 | Brasil | FG05 |
| *Habenaria pectinata* D. Don | | 21 | 42 | Índia | MK79, V81, V82, KM83, VS86, MK89 |
| *Habenaria petalodes* Lindl. | | 21 | 42 | Brasil | FG98, FG05 |
| *Habenaria plantaginea* (Lindl.) Lindl. | | 21 | 42, 44 | Índia | JP81, KM83, R85, MK89, VS94, |
| *Habenaria pratensis* (Lindl.) Rchb. f. | | 21 | 42 | Brasil | FG98, FG05 |
| *Habenaria pseudohamata* Toscano | | | c.48 | Brasil | FG05 |
| *Habenaria rariflora* A. Rich. | | | 42 | Índia | J80, JP81, S83 |
| *Habenaria reniformis* (D. Don) Hook. f. | *Diphyllae* | ca.49 | ca.112 | Índia | M83 |
| *Habenaria repens* Nutt. | | 21 | 42 | Brasil | FG98 |
| *Habenaria rhodocheila* Hance | | | 42 | Japão | Y87, Y90 |
| *Habenaria roxburghii* Nicolson | *Diphyllae* | | 42 | Índia | S83, VS94 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Habenaria sagittifera* Rchb. f. | | 28 | Japão | Y87, Y90 |
| *Habenaria schenckii* Cogn. | | 42 | Brasil | FG98 |
| *Habenaria spencei* Blatt. & McCann | | 42 | Índia | JP81 |
| *Habenaria stenopetala* Lindl. | | 42, 46 | Japão | S81, JP81, Y87, Y90 |
| *Habenaria suaveolens* Dalzell | | 42 | Índia | S83 |
| *Habenaria tridactylites* Lindl. | | 42 | Espanha (Ilhas Canárias) | D91 |
| *Habenaria trifida* Kunth | | 80 | Brasil | FG98 |
| *Habenaria viridiflora* (Rottler ex Sw.) R. | | 44, 84 | Índia | JG80, S83 |
| *Habenaria yezoensis* Hara | | 28 | Japão | Y87 |
| *Disa uniflora* P.J.Bergius | | 36 | África do Sul | P89 |
| *Orchis quadripunctata* Cirillo ex Ten. | | 42 | Itália até Turquia | G81 |
| *Ophrys apifera* Huds. | 18 | 36 | Mediterrâneo ao Cáucaso | GE75 |
| *Platanthera chlorantha* (Custer) Rchb. | 21 | 42 | Marrocos e Eurásia | M82 |
| *Peristylus densus* (Lindl.) Santapau & Kapadia | | 42, 46 | Índia, China e Japão | S83 |
| *Peristylus plantagineus* (Lindl.) Lindl. | | 42, 46 | Índia e Sri Lanca | JG80 |
| *Herminium lanceum* (Thunb. ex Sw.) Vuijk | 19 | 38, 72, 76 | Mongólia até Ásia tropical | MS80 |
| *Peristylus elisabethae* (Duthie) R.K.Gupta | | 42 | Himalaya ao Tibet | KM83 |
| *Herminium monorchis* (L.) R.Br. | 20 | 36 | Eurásia até Himalaya | K78 |
| *Peristylus coeloceras* Finet | | 42 | Tibet até China | L04 |
| *Gennaria diphylla* (Link) Parl. | | 34, 36 | Macaronésia até oeste da Itália | S78 |

BP82 = Baker e Parfitt, 1982; BT01 = Batista et al., 2014; CC87 = Chinnappa e Chmielewski, 1987; D91 = Dalgaard, 1991; FG98 = Felix e Guerra, 1998; FG05 = Felix e Guerra, 2005; G81= Garaj et al., 1981; GE75 = Greilhuber e Ehrendofer, 1975; GJ90 = Garg e Jorapur, 1990; G99 = Gervais et al*.,* 1999; J80 = Jorapur, 1980; JK79 = Jorapur e Kulkarni, 1979; JK80 = Jorapur e Kulkarni, 1980; JG80 = Jorapur e Garg, 1980; JP81 = Jorapur e Phatak, 1981; JP84 = Jorapur e Phatak, 1984; K78 = Krogulevich, 1978; K87 = Kapoor et al*.,* 1987; KM83 = Kashyap e Mehra, 1983; KJ79 = Kulkarni e Jorapur, 1979; L04 = Luo, 2004; M82 = Mikcieta, 1982; M83 = Mehra, 1983; MS80 = Mehra e Sehgal, 1980; M89 = Mehra et al*.,* 1989; MK89 = Mehra e Kashyap, 1989; MK79 = Mehra e Kashyap, 1979; MK81 = Mehra e Kashyap, 1981; P89 = Pienaar et al., 1989; PJ83 = Phatak e Jorapur, 1983; R85 = Radhamoni et al*.,* 1985; SR68 = Sharma e Roy, 1968; S78 = Scrugli, 1978; S81 = Singh, 1981; S83 = Singh, 1983; T79 = Tahara, 1979; TH98 = Takahashi e Hakoda, 1998; VS86 = Vij e Sood, 1986; VS83 = Vij e Shekhar, 1983; VS85 = Vij e Shekhar, 1985; V83 = Vij et al*.,* 1983, V82 = Vij et al*.,* 1982; V81 = Vij et al*.,* 1981; VS94 = Vijayakumar e Subramanian, 1994; Y90 = Yokota, 1990; Y87 = Yokota, 1987.

# CAPÍTULO 2

Vale, A. A.; Jiménez, R; Salazar, G. A. e Batista, J. A. N. Filogenia molecular dos clados mexicanos e centro-americanos do gênero *Habenaria* Willd. (Orchidaceae) e suas implicações taxonômicas.

# Filogenia molecular dos clados mexicanos e centro-americanos do gênero *Habenaria* Willd. (Orchidaceae) e suas implicações taxonômicas

Aline A. do Vale[1], Rolando Jiménez[2], Gerardo Salazar[3] e João A. N. Batista[1]

[1] *Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 486, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.*

[2] *Herbario AMO, Apdo. postal 53-123, 11520, México, D.F., México.*

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

## Resumo

*Habenaria* é um dos grandes gêneros de Orchidaceae, compreendendo aproximadamente 835 espécies. O México com 72 espécies, sendo 53 endêmicas, é o segundo país com maior diversidade do gênero no neotrópico. Uma análise filogenética recente do gênero mostrou que a maioria das espécies mexicanas e centro-americanas forma um subclado, entretanto, as relações internas não foram resolvidas. Neste trabalho, aumentamos a amostragem de táxons e caracteres com o objetivo de avaliar as relações e classificação seccional dessas espécies em um contexto filogenético. As árvores obtidas revelaram uma forte estruturação geográfica e a divisão das espécies mexicanas em dois subclados não diretamente relacionados. Diferenças morfológicas na disposição espacial dos segmentos laterais do labelo sugerem que adaptações a diferentes polinizadores ou mecanismos de polinização podem ser responsáveis pela subdivisão observada. É proposta a recircunscrição da *Habenaria* seção *Habenaria*, que inclui a espécie tipo do gênero e da *Habenaria* seção *Clypeatae*, e a criação de uma nova seção *Habenaria* seção *Novemfidae* para abrigar as espécies de *Habenaria* mexicanas e centro-americanas com segmentos laterais do labelo eretos.

**Palavras-chave:** Filogenia, *Habenaria*, México, classificação seccional infragenérica

## 1. Introdução

O gênero *Habenaria* Willd. (Orchidaceae, Orchidoideae, Habenariinae), com aproximadamente 835 espécies (Govaerts et al., 2014), é um dos maiores gêneros de orquídeas terrestres e está bem representado nos trópicos e subtrópicos do Novo e do Velho Mundo (Pridgeon et al., 2001). Os principais centros de diversidade do gênero estão no Brasil, África central e meridional e leste da Ásia (Kurzweil e Weber, 1992), sendo que nenhum dos táxons de *Habenaria* do Novo mundo ocorre em outros continentes (Batista et al., 2011a, 2011b). O gênero é composto quase exclusivamente por espécies terrestres e típicas de vegetação campestre, a maioria possuindo flores inconspícuas, pequenas e de coloração esverdeada sendo, portanto, raramente cultivadas (Batista e Bianchetti, 2003).

No Novo Mundo, o Brasil é um dos maiores centros de diversidade do gênero, com aproximadamente 167 espécies, seguido pelo México, com 72 espécies registradas (Batista et al., 2011a, 2011b). De acordo com os mesmos autores, os dois países também constituem os maiores centros de endemismo de espécies, com 105 táxons restritos ao Brasil (63% dos táxons conhecidos para o país, 35% das espécies do Novo Mundo) e 53 ao México (74% dos táxons conhecidos para o país e 18% das espécies do Novo Mundo). Os principais tratamentos das espécies de *Habenaria* brasileiras foram os de Cogniaux (1893) na Flora Brasiliensis, Hoehne (1940) na Flora Brasílica e Pabst e Dungs (1975) no Orchidaceae Brasilienses. Para o México não há nenhum tratamento taxonômico recente para o gênero. González-Tamayo (1993) dividiu as espécies mexicanas em 12 grupos informais, porém a relevância taxonômica e filogenética desta proposta nunca foi testada.

Recentemente, Batista et al. (2013) realizaram uma análise filogenética molecular do gênero *Habenaria* baseada nas sequências do espaçador ribossomal ITS e do gene *matK*, com foco nas espécies neotropicais. Os resultados mostraram que as espécies neotropicais constituem um grupo monofilético, que por sua vez é constituído por aproximadamente 21 subgrupos com alto suporte. Dentre estes, dois grupos foram formados por espécies principalmente mexicanas. Com base em dados de distribuição e morfologia, estes subclados provavelmente compreendem 56 espécies concentradas no México, com algumas espécies se estendendo a países centro-americanos. Dez das espécies ocorrentes no México amostradas concentraram-se em um único clado (subgrupo 9). A baixa amostragem, aliada à baixa resolução filogenética do clado mexicano maior, não permitiu uma comparação com os 12

grupos informais propostos por González-Tamayo (1993). Em termos de classificação seccional este grupo corresponde à seção *Clypeatae* Kraenzl., por conter *Habenaria clypeata* Lindl., a espécie-tipo desta seção. Todavia, as espécies neste grupo apresentam grande variação na morfologia e tamanho das flores, variando de pequenas (com alguns milímetros de diâmetro) a grandes, com perianto branco ou verde. Os resultados da análise filogenética molecular, em conjunto com a grande variação morfológica do grupo, indicam que as relações filogenéticas ainda não estão esclarecidas para este clado.

Este trabalho teve como objetivo aumentar a amostragem do clado e realizar novas análises filogenéticas moleculares a fim de avaliar as relações entre as espécies e revisar a classificação seccional desse grupo de espécies ocorrentes no México.

## 2. Material e métodos

### *2.1 Amostragem de táxons*

Foram usados 90 terminais de 81 espécies nas análises., dos quais 36 são da América Central e do México incluindo 20 estritamente mexicanos. Foram geradas sequências para a maioria dos 36 terminais da América Central e do México, com exceção das sequências já disponíveis para espécies abordadas na filogenia de Batista et al. (2013). No total a amostragem dos clados mexicanos foi aumentada para 21 espécies. Amostras de outras sete espécies provenientes do México e não utilizadas anteriormente também foram incluídas nas análises. Com base no trabalho de Batista et al. (2013) foram selecionados como grupo externo seis espécies do Velho Mundo, sendo *Dactylorhiza maculata* (L.) Soó utilizada para enraizar as árvores. A amostragem também incluiu representantes da maioria das seções neotropicais de *Habenaria* amostrados na análise filogenética de Pedron et al. (2014). Amostras novas incluídas neste trabalho foram coletadas em campo e conservadas em sílica-gel, e em poucos casos foram usadas exsicatas. A maioria das amostras utilizadas já estavam disponíveis no banco de DNA sob cuidados do Dr. Gerardo Salazar. Os táxons foram identificados por R. Jiménez e G. Salazar. Algumas espécies com ampla distribuição geográfica ou com significante variação morfológica foram amostradas mais de uma vez.

### *2.2 Breve caracterização da área de estudo*

O México se localiza na América do Norte e está limitado ao norte pelos Estados Unidos e ao sul pela Guatemala e Belize, ao leste pelo Golfo do México e ao oeste pelo oceano Pacífico. O país possui um território de quase 2 milhões de quilômetros quadrados e tem como ponto culminante o Pico Orizaba com 5700 m de altitude.

Por sua localização, aparência e estrutura física o México é uma terra de transição, que se do continente norte-americano à América Central, a qual leva finalmente, à América do Sul. O relevo é considerado complexo, composto de terras altas e baixas e subdividido, grosso modo, em um planalto central (*Meseta Central* ou *Altiplanicie Mexicana*) delimitado por serras paralelas: ao leste pela *Sierra Madre Oriental* e ao oeste pela *Sierra Madre Occidental*, ao sul pelo Eixo Vulcânico (*Eje Volcánico Transversal*) e pela *Sierra Madre del Sur* (Encyclopaedia Britannica, 1963) (Figura 1).

A descoberta do Novo Mundo no final do século XV revelou a existência de civilizações com surpreendentes formas artísticas e expressões intelectuais que formavam um mosaico de diferentes culturas distribuídas em uma vasta área geográfica chamada de Mesoamérica, que hoje é composta por parte do México, Belize, Guatemala e parte de Honduras e El Salvador (Longhena, 2011). Portanto, o termo Mesoamérica é usado preferencialmente em um contexto histórico e arqueológico e tem sido confundido por muitos autores com a América Central, que é baseada em conceitos geopolíticos.

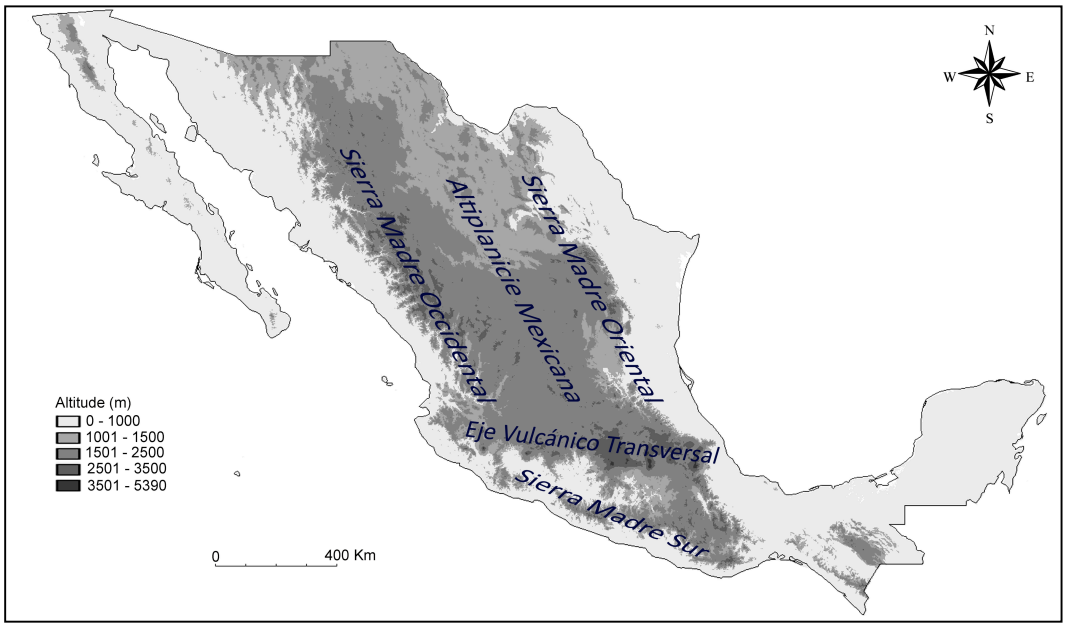



Figura 1 – Mapa demonstrando os principais sistemas orográficos do México.

*2.3 Marcadores Moleculares*

Para as análises foram utilizadas sequências de DNA nuclear (ITS e ETS) e plastidial (*matk*, parte do íntron *trnK* e o espaçador intergênico *rps16-trnK*). Informações sobre os vouchers e números de acesso no *GenBank* das sequências dos táxons do Velho Mundo e representantes de outros subgrupos neotropicais podem ser encontradas em Batista et al. (2013) e Pedron et al. (2014). Dados de *Dactylorhiza maculata* e das sequências geradas neste trabalho são apresentados na tabela 1.

A região ITS consistiu de parte das regiões codificadoras dos RNAs ribossomais 18S e 26S, os espaçadores transcritos internos ITS 1 e ITS 2, e o gene 5.8S. Para as amplificações foram utilizados os primers 17SE e 26SE (Sun et al., 1994). O espaçador transcrito externo ETS foi parcialmente amplificado com os primers Orchid (5' CATATGAGTTGTTGCGGACCWT 3') (van den Berg et al., dados não publicados) e um primer derivado do iniciador 18S-IGS (5' AGACAAGCATATGACTACTGGCAGG 3') (Baldwin e Markos, 1998).

Para a amplificação do gene *matK* e da sequencia contigua do intron 3' *trnK* (região *matK-trnK*), em virtude de sua extensão (*ca.* 1800 pb), foram realizadas cinco reações utilizando os primers *matK*-19F (5'-CGTTCTGACCATATTGCACTATG-3') (Molvray et al., 2000), *trnK* 2R (5'-AACTAGTCGGATGGAGTAG-3') (Steele & Vilgalys, 1994), *matK* 556R (5'-GAAGRAACATCTTTKATCCA-3') (Molvray et al., 2000), *matK* 458F (5'-CTACTAATACCCYATCCCATC-3') (Molvray et al., 2000) e *matK* 731F (5'-TCTGGAGTCTTTCTTGAGCGA-3') (Molvray et al., 2000). A junção dos cinco fragmentos gerou uma sequência contínua que possui a região codificadora completa do gene *matK* e do íntron *3' trnK*. Sequências do espaçador intergênico *rps16-trnK*, amplificadas com os primers primers rpS16x2F2 e trnK (UUU)x1 (Shaw et al., 2007), foram aproveitadas do trabalho de Pedron et al., (2014), mas o sequenciamento não funcionou para os terminais mexicanos e centro-americanos.

*2.4 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA*

O DNA total foi extraído usando a versão modificada do protocolo 2 x CTAB de Doyle e Doyle (1987). As amplificações de PCR foram desenvolvidas no MJ96G Biocycler. O

sistema geral da PCR consistiu em 20–50 ng de DNA genômico, 1X Tampão para PCR, 0,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM dNTPs, 0,25 µM de cada *primer*, 2 U de Taq DNA Polimerase (Qiagen)

Tabela 1 - Informação sobre os espécimes ocorrentes no México incluídos nas análises filogenéticas neste trabalho. Os vouchers estão depositados no Herbário da Universidad Nacional Autónoma de México e no Herbário AMO, localizados na Cidade do México, México. "-"indica que as sequências ainda não foram depositadas no *GenBank*. "*"- indica dados que ainda serão inseridos.

| Táxon | Voucher | Origem[a] | ITS | *matK-trnK* | *rps16-trnK* | ETS |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Habenaria alata* Hook. | Salazar 8511 | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria brevilabiata* A. Rich. & Galeotti | Salazar s.n. | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria calicis* R. González | Salazar s.n. | México, Michoacán | - | - | - | - |
| *Habenaria clypeata* Lindl. | Jacob 461 | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria crassicornis* Lindl. | Salazar 8557 | México, Oaxaca | - | - | - | - |
| *Habenaria cuevesiana* R. González & Cuevas-Figueroa | Nava s.n. | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria distans* Griseb. | Salazar 8576 | México, Oaxaca | - | - | - | - |
| *Habenaria entomantha* (La Llave & Lex.) Lindl. | Jiménez 2863 | México, Michoacán | - | - | - | - |
| *Habenaria eustachya* Rchb. f. | Salazar 6239 | Panamá, * | - | - | - | - |
| *Habenaria filifera* S. Watson | Salazar 8526 | México, DF | - | - | - | - |
| *Habenaria greenwoodiana* R. González | Jimenéz 2717 | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria guadalajarana* S. Watson | Jimenéz, 2691 | México, Jalisco | - | - | - | - |
| *Habenaria gonzaleztamayoi* García-Cruz, R. Jiménez & L. Sánchez | Salazar 6461 | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria hexaptera* Lindl. | Salazar 8417 | * | - | - | - | - |
| *Habenaria ibarrae* R. González | Nava s.n. | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria* aff. *inexspectata* R. González & Cuevas-Figueroa | Jiménez 2713 | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria ixtlanensis* E.W. Greenw. | Salazar 8562 | México, Oaxaca | - | - | - | - |
| *Habenaria jaliscana* S. Watson | Jiménez s.n. | México, Jalisco | - | - | - | - |
| *Habenaria ligulata* C. Schweinf. | Trujillo 343 | Peru, * | - | - | - | - |
| *Habenaria lucaecapensis* Fernald | Jiménez s.n. | México, Nayarit | - | - | - | - |
| *Habenaria macroceratitis* Willd. | Salazar 8583 | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria macvaughiana* R. González | Salazar 8559 | México, Oaxaca | - | - | - | - |
| *Habenaria matudae* Salazar | AM36744 | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria monohrriza* (Sw.) Rchb. f. | Salazar 8503 | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria nogeirana* R. González & Cuevas-Figueroa | Jiménez 2865 | México, Michoacán | - | - | - | - |
| *Habenaria novemfida* | Salazar, s.n. | México, Yucatán | - | - | - | - |
| *Habenaria* cf. *novemfida* Lindl. | Salazar 8584b | México, Oaxaca | - | - | - | - |
| *Habenaria* cf. *novemfida* Lindl.*?* | Salazar s.n. | México, Oaxaca | - | - | - | - |
| *Habenaria odontopetala* Rchb. f. | Salazar s.n. | México,Oaxaca | - | - | - | - |
| *Habenaria ortiziana* R. González | Jiménez 2711 | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria pringlei* B.L. Rob. | Salazar s.n. | México, Vera Cruz | - | - | - | - |
| *Habenaria quinqueseta* (Michx.) Eaton | Sanchez s.n. | México, Vera Cruz | - | - | - | - |
| *Habenaria repens* Nutt. | Salazar s.n. | México, Yucatán | - | - | - | - |
| *Habenaria rzedowskiana* R. González | Jacob 234 | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria schaffnerii* S. Watson | Rodriguez s.n. | México, * | - | - | - | - |
| *Habenaria subauriculata* Rob. & Greenm. | Garcia 7988 | México, DF | - | - | - | - |
| *Habenaria strictissima* Rchb. f. | Salazar 8525 | México, DF | - | - | - | - |
| *Habenaria tuerckheimii* Schltr. | Cruz Lustre 112 | México, Oaxaca | - | - | - | - |
| *Habenaria virens* A. Rich. & Galeotti | AMartinez 1164 | México, * | - | - | - | - |
| *Dactylorhiza maculata* | * | * | AY699446 | EF612529 | Não disponível | AY699533 |

e água para completar o volume total de 25 µl. Os ciclos de amplificação começaram com uma desnaturação inicial de 94°C por dois minutos (ITS e *matK-trnK*) ou cinco minutos (ETS), 28 (ITS e *matK-trnK*) ou 30 (ETS) ciclos compostos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos (ETS) ou um minuto (ITS e *matK-trnK*), anelamento dos primers a 52°C (ITS e *matK-trnK*) por um minuto ou 65°C (ETS) por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 min e 30 s (ITS e *matK-trnK*) ou 1 min e 20 s (ETS), e uma extensão final de 72 °C por sete minutos (ITS e *matK-trnK*) ou cinco minutos (ETS). Os produtos amplificados foram sequenciados pela HTSeq (Seattle, Estados Unidos) em sequenciador automático, utilizando o método de Sanger (Sanger e Coulson 1975) com os mesmos *primers* utilizados para a amplificação. Todas as amostras foram sequenciadas de forma bidirecional.

*2.5 Edição e alinhamento das sequências*

Os eletroferogramas das sequências de DNA foram editados com o *software* Sequencher versão 4.8 (GeneCodes Corp., Ann Arbor, Michigan, EUA). As sequências editadas foram alinhadas usando Muscle (Edgar, 2004) e os resultados dos alinhamentos foram ajustados manualmente usando o *software* MEGA5 (Tamura et al., 2011).

*2.6 Análise filogenética*

As posições de *gap* foram tratadas como dados faltantes. Foram realizadas as análises das quatro regiões separadamente com o objetivo de detectar possíveis incongruências e posteriormente foram realizadas as análises conjuntas. Os dados foram analisados usando as inferências da parcimônia e bayesiana. As análises filogenéticas usando a parcimônia foram desenvolvidas no PAUP versão 4 (Swofford, 1998) com a parcimônia de Fitch (pesos iguais, caracteres desordenados; Fitch, 1971) como o critério de otimização. Cada análise consistiu de 1000 réplicas de adição aleatória de táxons com troca de ramos usando algoritmo TBR retendo somente as 10 primeiras árvores por réplica para permitir uma troca extensa nas ilhas *subótimas*. O suporte interno foi avaliado pelo caráter de *boostrapping* (Felsenstein, 1985) usando 1000 réplicas, adição e troca de ramos TBR, retendo as 10 primeiras árvores por réplica. Para o suporte dos níveis de *boostrap*, porcentagens (BPs) de 50 -70% foram consideradas como fracas, de 71-85% como moderadas e >85% como fortes (Kress et al.,

2002).

As análises filogenéticas por inferência Bayesiana foram desenvolvidas usando MrBayes v3.1.2, utilizando as Cadeias de Markov de Monte Carlo (Ronquist et al., 2005) e tratando cada região de DNA (ITS, ETS, *matK-trnK* e *rps16-trnK*) como uma partição separada. Um modelo evolutivo para cada região de DNA foi selecionado com o programa MrModeltest 2 (Nylander, 2004) (Tabela 3). Cada análise consistiu de duas corridas independentes com quatro cadeias para 10.000.000 de gerações, amostrando uma árvore a cada 1000 gerações. Na análise combinada, para melhorar a troca de cadeias, a temperatura do parâmetro para aquecimento das cadeias foi reduzida para 0.1. A convergência foi diagnosticada pela divergência nos desvios padrão das duas corridas (menor que 0,01), e ocorreu após 710000 gerações. Depois de descartar as primeiras 50% das árvores no período *burn-in*, as árvores remanescentes foram usadas para avaliar a topologia e a probabilidade posterior (PP) no consenso de maioria. Neste trabalho foi usado o critério similar ao teste estatístico padrão, considerando grupos com PP>95% como fortemente suportados, PP 90-95% como moderadamente suportados e PP<90% como fracamente suportados.

*2.7 Análise morfológica*

Baseado no alto número de espécies e na grande variabilidade morfológica encontrada no grupo, foram analisados caracteres morfológicos, ecológicos (habitat) e dados de distribuição. Foi confeccionada uma matriz morfológica com 147 caracteres para os táxons ocorrentes no México que foram abordados na análise filogenética. A confecção desta matriz possibilitou identificar algumas sinapomorfias morfológicas que auxiliaram na discussão da análise filogenética e na revisão seccional, que consistiu de caracterização morfológica e descrição da mesma.

As análises incluíram a parte vegetativa, o perianto e a estrutura do ginostêmio (coluna). Para a análise da parte vegetativa e do perianto foi utilizado principalmente material das coleções dos herbários MEXU (Universidad Nacional Autónoma de México) e AMO, localizados na Cidade do México. Adicionalmente foi consultado um banco de dados com 4287 imagens de *Habenaria*, incluindo 1203 imagens de tipos dos herbários AAU, ALCB, AMES, B, BM, BR, C, CORD, F, G, HUEFS, IAN, ICN, K, LB, MBM, MICH, MO, MPU, NA, NY, P, PAMG, PH, R, RB, RENZ, S, SP, TEX, U e W (acrônimos segundo Thiers, 2014).

Para a análise do ginostêmio foram usadas flores fixadas em etanol 70%, tanto de material coletado da coleção de Orchidaceae mexicanas do Dr. Gerardo Salazar. Dados ausentes no material examinado ou informações de táxons não amostrados foram obtidos da literatura. A identificação das espécies foi feita pelo co-autor Rolando Jiménez Machorro e também por comparação com as descrições originais e com os tipos.

Os dados de distribuição geográfica das espécies foram obtidos a partir das fichas das exsicatas, do banco de dados digitalizado do herbário MEXU, da literatura e de sítios da internet como *World Checklist of Orchidaceae* (Govaerts et al., 2014) e *W3 Tropicos* (2014). Para a confecção dos mapas (Figuras 1, 5, 6 e 7) o mapa-múndi utilizado como base foi extraído da página Worldclim e os mapas foram organizados pelos autores utilizando o programa ArcView GIS 3.2. As figuras 6 e 7, referentes aos mapas das seções estudadas, somente representam os países de ocorrência das espécies devido à indisponibilidade de dados de outros países além do México.

## 3. Resultados

A matriz com as regiões ITS, ETS, *matK-trnK* e *rps16-trnK* consistiu de 4114 caracteres, dos quais 484 (12%) foram potencialmente informativos. A tabela 2 mostra os valores das análises referentes aos grupos individuais e combinados, com os valores estatísticos referentes aos parâmetros da análise de parcimônia. A árvore do consenso de maioria da análise bayesiana foi altamente congruente com a árvore de consenso estrito da análise combinada da parcimônia, porém a primeira apresentou uma maior resolução e um suporte total mais forte e, portanto, esta árvore foi escolhida para a apresentação (Figura 2).

Foram abordadas 34 espécies da América Central e do México na análise, das quais 20 são endêmicas deste país. Assim como no trabalho de Batista et al. (2013), no presente estudo as espécies de *Habenaria* do Novo Mundo formam um clado (clado A) bem suportado (1.00 PP, 100% BS, Figura 2) que é irmão de *Habenaria tridens* da África.

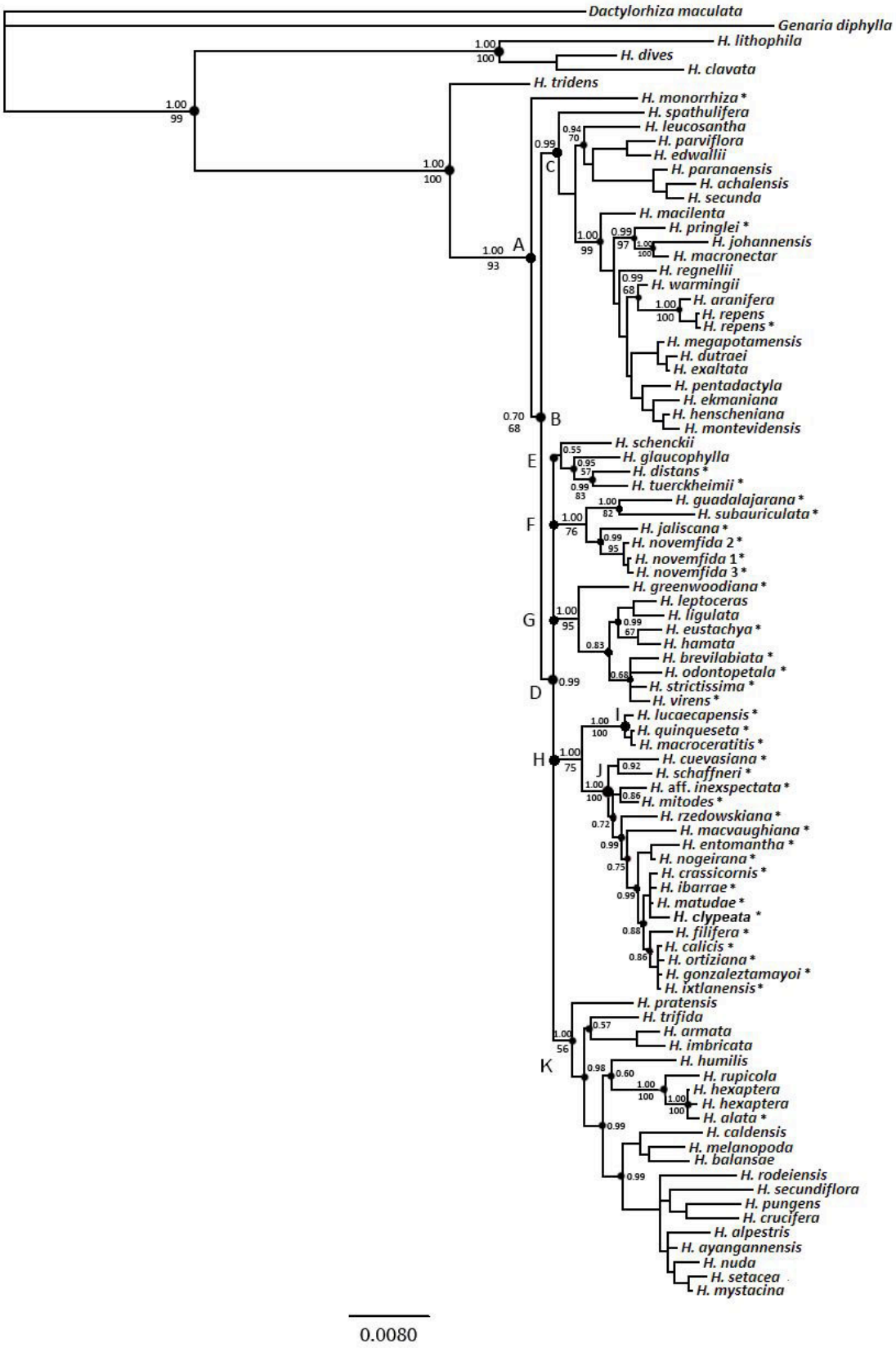



Figura 2 – Consenso de maioria obtido da análise filogenética bayesiana das espécies mexicanas, centro-americanas e sul-americanas de *Habenaria*. Os valores acima dos ramos indicam a probabilidade posterior dos clados. Os valores acima dos ramos indicam os valores de probabilidade posterior da analise bayesiana e os abaixo os valores de bootstrap. Os asteriscos indicam espécies que ocorrem no México.

Dentro do clado das espécies do Novo Mundo, a espécie *Habenaria monorrhiza* se apresenta como irmã do restante das espécies neotropicais, mas com baixo suporte (0.70 PP, 68% BS) (Figura 2). O restante das espécies neotropicais se apresenta subdividido em dois grandes clados bem suportados (clados C e D). No clado C (0.99 PP), a topologia obtida foi basicamente a mesma do trabalho de Batista et al. (2013), com exceção de *H. spathulifera*, que nas analises destes autores aparece em uma politomia na base do clado neotropical. *Habenaria pringlei* e *H. repens*, táxons que também ocorrem no México, pertencem a este clado. O grande clado D (0.99 PP) é subdividido em cinco subclados, dos quais alguns correspondem a subclados identificados nas análises prévias de Batista et al. (2013) e Pedron et al. (2014).

O clado F é bem suportado (1.00 PP, 76% BS) e composto pelas espécies *Habenaria jaliscana*, *H. guadalajarana, H. novemfida* e *H. subauriculata*. O clado G também possui alto suporte (1.00 PP, 95% BS,) e inclui as amostras das espécies *H. brevilabiata*, *H. eustachya*, *H. greenwoodiana*, *H. odontopetala*, *H. strictissima* e *H. virens* se agruparam com as espécies sul-americanas *H. ligulata*, *H. hamata* e *H. leptoceras.*

O clado H (1.00 PP, 100% BS) se apresenta subdividido em dois subclados, o subclado I (1.00 PP, 100% BS), que inclui *Habenaria quinqueseta*, *H. lucaecapensis* e *H. macroceratitis* e o subclado J (1.00 PP, 70% BS), que compreende *Habenaria schaffneri, H. cuevasiana, H. mitodes, H.* aff. *inexspectata, H. rzedowskiana, H. macvaughiana, H. nogeirana, H. entomantha, H. clypeata, H. matudae, H. ibarrae, H. crassicornis, H. filifera, H. calicis, H. ixtlanensis, H. gonzaleztamayoi e H. ortiziana.*

Tabela 2 – Caracterização das regiões sequenciadas para a análise filogenética e os modelos escolhidos pelo critério de BIC para cada partição utilizada na análise filogenética bayesiana. O total representa os dados para as quatro partições concatenadas. N = tamanho da sequência em pares de base; Pi = número de caracteres parcimoniosamente informativos; C=comprimento total das árvores mais parcimoniosas; IC= índice de consistência; IR= índice de retenção. Os *gaps* foram tratados como dados faltantes.

| Região | N | Pi | C | IC | IR | Modelo |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ITS | 757 | 193 (25%) | 557 | 0,71 | 0,80 | GTR+G |
| *matK-trnK* | 1887 | 144 (8%) | 455 | 0,74 | 0,84 | GTR+G |
| *rps16-trnK* | 947 | 65 (7%) | 185 | 0,74 | 0,85 | GTR + I + G |
| ETS | 523 | 82 (16%) | 349 | 0,80 | 0,83 | HKY+G |
| Total | 4114 | 484 (12%) | 1628 | 0,71 | 0,79 | - |

## 4. Discussão

### *4.1 Análise filogenética*

A filogenia apresentada no trabalho de Batista et al. (2013) mostrou que o gênero *Habenaria* está dividido em pelo menos 21 clados ou subgrupos, numerados de 1 a 21, nos neotrópicos. Dentre os clados obtidos nas análises de Batista et al. (2013), dois (subgrupo 9 e o clado não numerado na filogenia citada formado por *H. subauriculata* e *H. guadalajarana*) foram formados por espécies quase exclusivamente mexicanas, indicando uma forte estruturação geográfica destes clados. Entretanto, a amostragem e resolução destes clados foram baixos, o que não permitiu conclusões quanto a classificação seccional ou uma comparação com os grupos informais propostos por González-Tamayo (1993) e González-Tamayo e Hernández (2010) para as espécies mexicanas.

Neste trabalho a amostragem dos dois subclados com espécies exclusivamente mexicanas e centro americanas foi aumentada de 12 para 21 táxons. Das 12 espécies adicionais sete agruparam-se no subclado J e duas no subclado F (Figura 2). Considerando que o México contém 53 espécies de *Habenaria* endêmicas do país a amostragem ainda não é alta, entretanto, a amostragem atual no contexto filogenético das espécies neotropicais associado a uma análise e caracterização morfológica das espécies mexicanas já permite algumas conclusões e proposições.

O clado formado por *H. guadalajarana* e *H. subauriculata* passa a incluir *Habenaria jaliscana*, e *H. novemfida* (F). Este clado apresenta alto valor de suporte nas análises moleculares e labelo em formato perpendicular com os lobos laterais eretos (Figura 4), um caráter distintivo em relação a todos os outros táxons ocorrentes no México do gênero. Os resultados das análises filogenéticas indicam que estas espécies constituem uma linhagem evolutiva distinta, sugerem que este caráter morfológico é significativo e provavelmente está relacionado a polinizadores e mecanismos de polinização diferentes da maioria das espécies mexicanas presentes no subclado J.

Por sua vez, o subclado J, que agora inclui 17 espécies nas análises filogenéticas, também apresenta valores altos de suporte e todas as espécies analisadas com labelo pendente, ou seja, com os segmentos laterais formando um ângulo de 45 graus com o segmento mediano. Analisando a distribuição deste caractere morfológico entre as espécies mexicanas, este grupo provavelmente inclui 59 espécies, restritas ao México com alguns poucos táxons

extendendo-se a alguns países centro americanos. Este grupo inclui *Habenaria clypeata* a espécie-tipo da *Habenaria* seção *Clypeatae*.

O subclado I, irmão com alto suporte do subclado J (Figura 2), também apresenta flores com os segmentos laterais do labelo pendentes. Entretanto as espécies presentes neste clado apresentam uma série de caracteres morfológicos distintivos destacando-se o tamanho maior das flores e principalmente do cálcar, que é sempre mais longo do que o ovário-pedicelado e atinge até 20 cm de comprimento, enquanto no subclado J o cálcar e ovário tem aproximadamente o mesmo comprimento e o cálcar não ultrapassa 4,0 cm. Com base nas características morfológicas das três espécies incluídas neste clado nas análises filogenéticas, este grupo inclui cinco espécies com distribuição concentrada no México, mas extendo-se também ao sul dos Estados Unidos, América Central, Antilhas e Norte da América do Sul. Este clado inclui *H. macroceratitis* a espécie tipo do gênero *Habenaria* (Kränzlin, 1892).

Outras espécies endêmicas mexicanas ou que também ocorrem em outros países, apresentam caracteres morfológicos distintivos e agrupam-se com outros grupos de espécies neotropicais. *Habenaria brevilabiata*, *H. eustachya*, *H. greenwoodiana*, *H. odontopetala*, *H. strictissima* e *H. virens*, que possuem labelo simples ou com projeções laterais mais curtas do que o segmento mediano, se agruparam com outras espécies sul-americanas com as mesmas características (subclado G, figura 2). Este clado corresponde as seções: *Habenaria* seção *Odontopetalae* Kraenzl., *Habenaria* seção *Quadratae* Kraenzl. e *Habenaria* seção *Seticaudae* Kraenzl. Estes resultados corroboram análises anteriores (Batista et al., 2013; Pedron et al., 2014) e confirmam que a morfologia do labelo é um importante caráter morfológico no gênero.

*Habenaria pringlei*, que apresenta os lobos do estigma muito longos, forma um clado com *H. johanennsis* e *H. macronectar* (*Habenaria* seção *Sartores* Kraenzl.), enquanto *H. alata* forma um clado com *H. hexaptera* e *H. rupicola* (*Habenaria* seção *Microstylinae* Kraenzl.). Outras espécies agrupam-se em clados com identificação seccional indefinida, mas em todos os casos formando clados distintos e não diretamente relacionados aos clados exclusivamente mexicanos e centro-americanos. *Habenaria distans* e *H. tuerckheimii* agrupam-se com a espécie brasileira *H. glaucophylla*, formando um grupo caracterizado pelas folhas basais bem desenvolvidas e ocorrência restrita a ambientes florestais, enquanto *H. repens* agrupa-se com as espécies brasileiras *H. aranifera* e *H. warmingii*, caracterizadas pelo hábito aquático ou de ambientes alagados.

Com base nestes resultados no presente trabalho é proposta a recircunscrição das seções *Habenaria* (*Habenaria* seção *Macroceratitae*) e *Habenaria* seção *Clypeatae*, e a

criação de uma nova seção correspondente ao clado F. Embora as relações entre os clados correspondentes não foram completamente resolvidas, a posição do clado I como irmão do clado J implica no reconhecimento do clado F como uma unidade taxonômica distinta, uma vez que a separação morfológica e taxonômica entre as espécies dos clados I e J está muito bem definida e é plenamente justificável.

As espécies no subclado J (*Habenaria* seção *Clypeatae*) apresentam uma grande variação na morfologia e tamanho das flores, variando de pequenas a grandes, com perianto branco ou verde (Batista et al., 2013). As relações internas do clado não corroboram a classificação proposta por González-Tamayo (1993) e González-Tamayo e Hernández Hernández (2010), que separam as espécies de flores brancas das com flores verdes, mas a amostragem, resolução e suporte não foram suficientes para comparações mais conclusivas. Entre os grupos informais propostos por González-Tamayo (1993) e González-Tamayo e Hernández Hernández (2010) os nossos resultados corroboram apenas o subgrupo correspondente ao clado I (*Habenaria* seção *Habenaria*) que constitui um grupo de espécies com características morfológicas muito distintivas.

Todas as espécies presentes no subclado J são restritas ao México e alguns países da América Central, sendo que a grande maioria ocorre na *Sierra Madre Occidental* e/ou na *Altiplanicie mexicana* e/ou na *Sierra Madre del Sur* e/ou no *Eje Vulcánico Transversal* (Figura 6). A presença do alto grau de endemismo e a falta de conhecimento sobre os polinizadores dessas espécies em conjunto com a grande variação morfológica deste grupo dificultam a caracterização, identificação e separação desses táxons. Na família Orchidaceae a convergência morfológica em função de polinizadores é considerada muito comum (Borba et al., 2001, Chase *et al.*, 2009). No trabalho de Pedron *et al.* (2012) foi demonstrado 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. Estes resultados podem explicar a grande diversidade morfológica encontrada neste grupo.

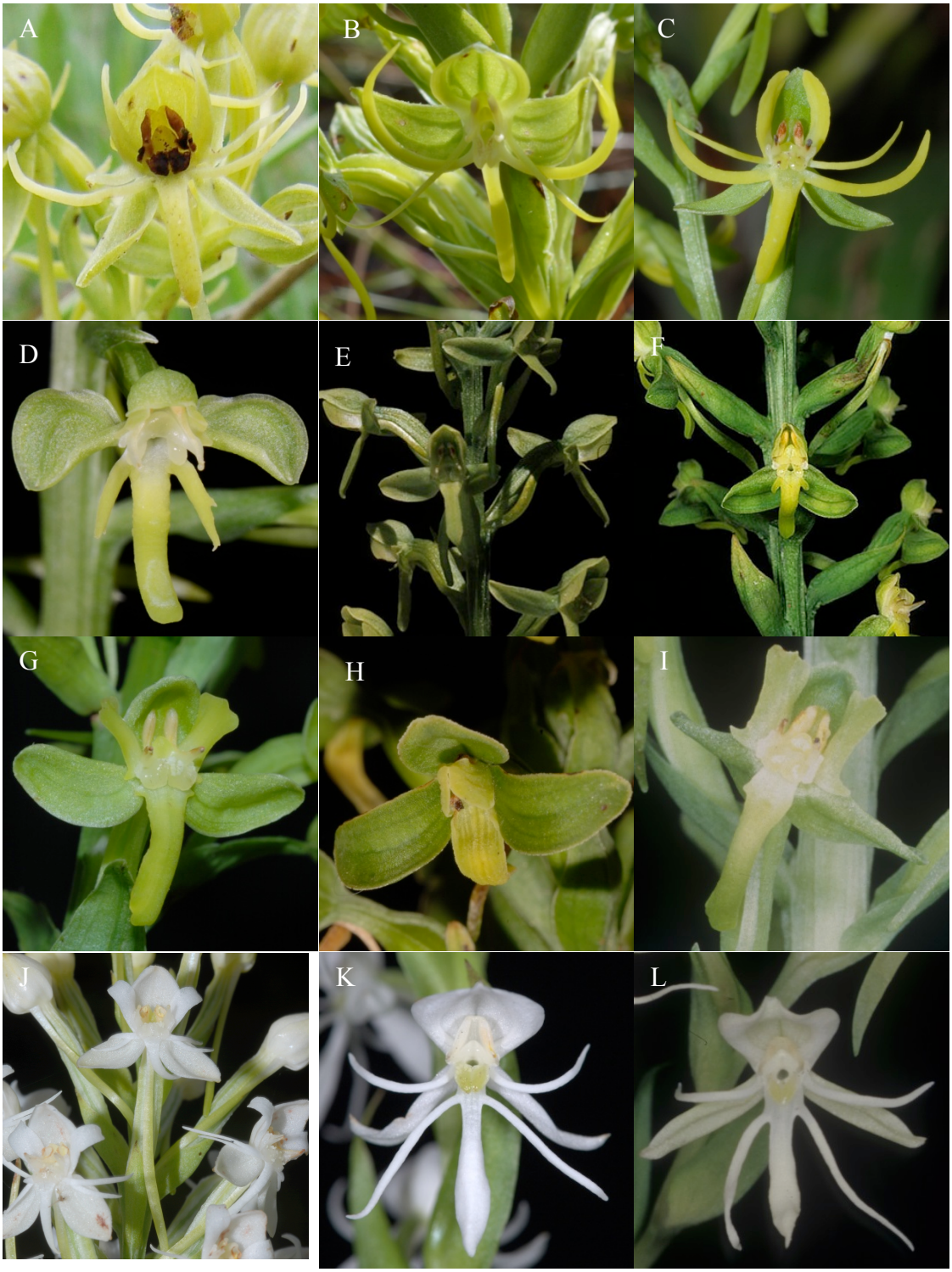



Figura 3 - Morfologia floral de algumas espécies de *Habenaria* ocorrentes no México (A-C *Habenaria* seção *Novemfidae sect. nov.,* K-L *Habenaria* seção *Clypeatae)*. A, *Habenaria guadalajarana*. B, *Habenaria jaliscana*. C, *Habenaria novemfida*. D, *Habenaria greenwoodiana*. E, *Habenaria brevilabiata*. F, *Habenaria virens*. G, *Habenaria odontopetala*. H, *Habenaria strictissima*. I, *Habenaria eustachya*. J, *Habenaria monohrriza.* K, *Habenaria cuevasiana*. L, *Habenaria schaffneri*. Fotos (A, D, E, F, K, L) de R. Jiménez; (B, C) de A. A. Vale; (G, H, I, J) de G. Salazar.

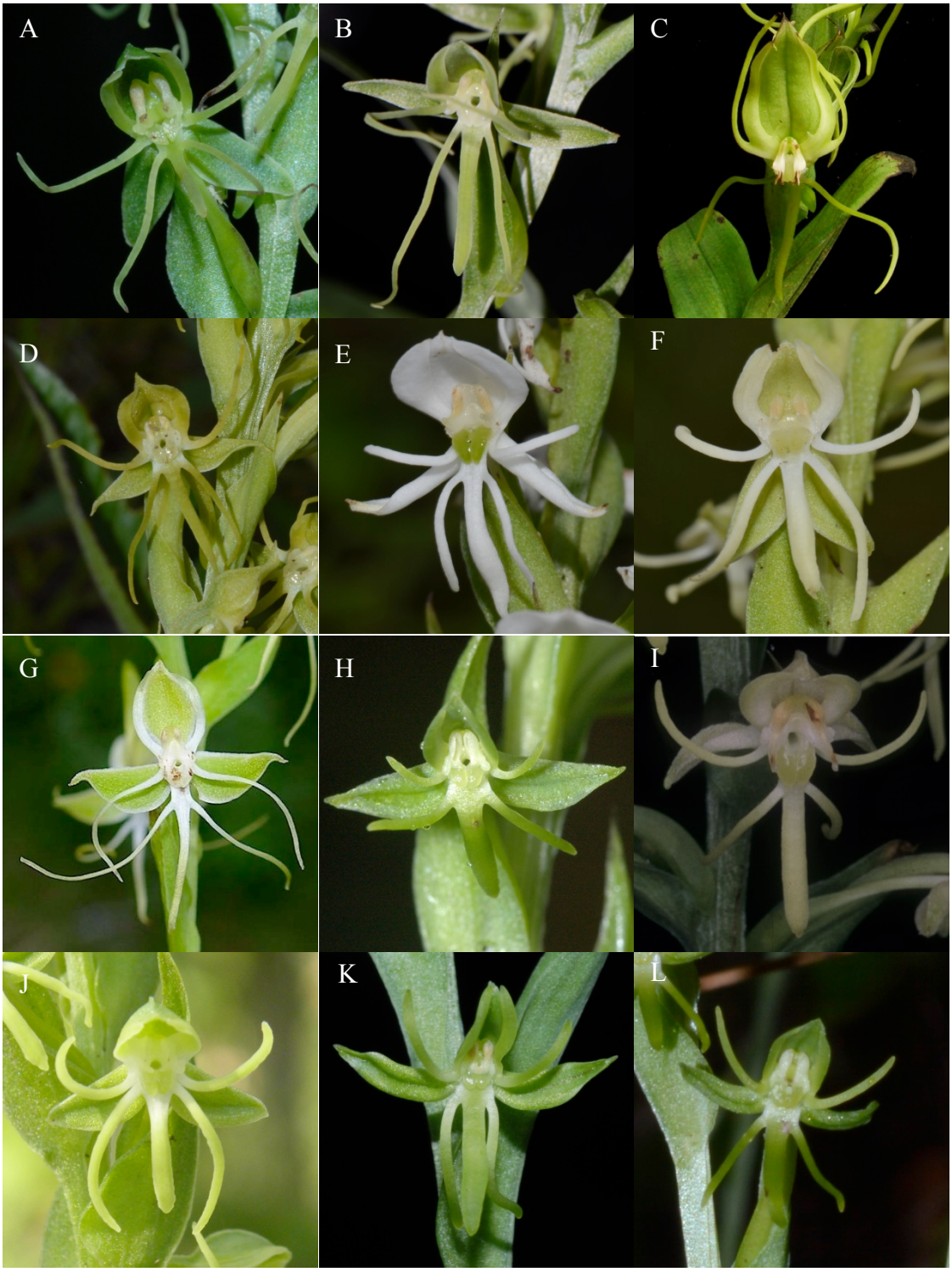



Figura 4 - Morfologia floral de algumas espécies de *Habenaria* ocorrentes no México (A-L *Habenaria* seção *Clypeatae)*. A, *Habenaria* aff. *inexspectata*. B, *H. mitodes*. C, *Habenaria rzedowskiana*. D, *Habenaria macvaughiana*. E, *Habenaria entomantha*. F, *Habenaria nogeirana*. G, *Habenaria crassicornis*. H, *Habenaria ibarrae*. I, *Habenaria gonzaleztamayoi*. J, *Habenaria filifera*. K, *Habenaria calicis*. L, *Habenaria ixtlanensis*. Fotos (A, B, C) de R. Jiménez; (D, G, J, L) de A. A. Vale; (E, F, I, K) de G. Salazar; (H) D.Szesko.

*4.2 Sinopse taxonômica*

***Habenaria*** Seção ***Habenaria***
= *Habenaria* Seção *Macroceratitae* Kraenzl., Bot. Jahrb. Syst. 16: 58. 1892. Tipo: *Habenaria macroceratitis* Willd., Sp. Pl. 4(1): 44. 1805.

Ervas terrestres. Plantas 50-110 cm compr. Folhas ovadas, elípticas ou amplamente elípticas, maiores no centro ou acima da metade do caule. Inflorescência poucas a muitas flores, laxa. Flores 5-21, medianas a grandes, brancas ou verde claras. Sépalas laterais obliquamente ovadas ou elípticas, deflexas ou levemente reflexas; pétalas distintamente bipartidas, lobo anterior patente ou deflexo, linear-filiforme, maior que o lobo posterior; lobo posterior lanceolado-falcado ou oblongo-lanceolado. Labelo distintamente tripartido, parte indivisa curta, lobos laterais lineares ou linear-filiformes, pendentes - formando um ângulo de 45$^{o}$ com o lobo mediano, ápices eretos, maiores que o lobo mediano; lobo mediano ensiforme deflexo ou levemente encurvado para frente, cálcar linear, deflexo, livre das brácteas, muito maior que o ovário, 4,0-20,0 × 0,1-3,0 cm. Ginostêmio ereto. Hemipolinários dois, separados. Estigma bilobado, lobos estreitamente paralelos. Rostelo com lobo mediano triangular, completamente localizado entre os loci da antera; lobos laterais paralelos, voltados para cima.

*Habenaria arachnea* Conz.
*Habenaria lucaecapensis* Fernald*
*Habenaria macroceratitis* Willd.*
*Habenaria oreophila* Greenm.
*Habenaria quinqueseta* (Michx.) A. Eaton*

Espécies incluídas nas análises filogenéticas estão indicadas por um asterisco.

*Distribuição*: Este grupo ocorre no sul dos Estados Unidos, México, América Central, Antilhas e norte da América do Sul. *Habenaria macroceratitis* e *H. quinqueseta* apresentam ampla distribuição, ocorrendo no México, E.U.A., Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicarágua, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana, Bahamas, Cuba, Jamaica, Haiti e República Dominicana (Figura 6) (Batista et al., 2011a, 2011b). As outras espécies da seção estão basicamente restritas ao México. No México estão presentes na *Sierra*

*Madre Occidental*, se extendendo para a *Sierra Madre del Sur* e para outros países. *H. lucaecapensis* também ocorre em El Salvador.

*Habitat e ecologia*: Terrestres, em solo argiloso, úmido, rochoso, ou solo calcário. Em florestas de *Quercus* e/ou florestas de *Pinus*, em encostas, em vegetação secundária ou em pastos à sombra de arbustos ou a pleno sol em vegetação secundária derivada de *Quercus*, entre ervas em Floresta Tropical Subcaducifólia e Caducifólia ou em Floresta mesófila montana (González-Tamayo e Hernández Hernández, 2010). As espécies geralmente ocorrem em altitudes de 15 a 2000 m, com exceção de *H. lucaecapensis* que é conhecida somente de elevadas altitudes (1480 m). Geralmente essas espécies florescem entre agosto e setembro (González-Tamayo e Hernández Hernández, 2010).

*Notas*: De acordo com o artigo 22.1 do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (McNeill *et al.*, 2012), 'O nome de qualquer subdivisão de um gênero que inclua o tipo do nome legítimo adotado do gênero ao qual está atribuído deve repetir, com seu epíteto, o nome genérico inalterado, não seguido do nome do autor'. Como este clado inclui a espécie tipo de *Habenaria* que é *H. macroceratitis* (Kränzlin, 1892) o nome do gênero deve ser aplicado a seção e *Habenaria* Seção *Macroceratitae* passa a ser um sinônimo.

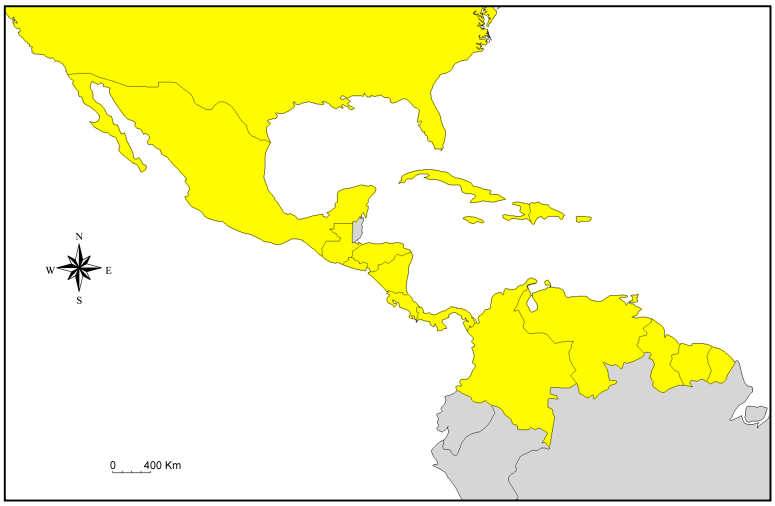



Figura 5 - Distribuição de *Habenaria* Seção *Habenaria.* Indicam-se apenas os países nos quais a seção está presente.

Este grupo inclui cinco espécies aceitas na recente sinopse das espécies neotropicais (Batista et al., 2011a, 2011b). *Habenaria macroceratitis* e *H. quinqueseta* são as mais comuns, enquanto as outras espécies da seção são morfologicamente muito semelhantes as anteriores e

não há um consenso quanto a sua caracterização e distinção. *Habenaria macroceratitis* é muito similar a *H. quinqueseta*, mas possui o cálcar mais longo (até 20 cm). Os espécimes mexicanos possuem cálcar de 6-19 cm – é possível observar uma grande variação no tamanho do cálcar em diferentes espécimes. No México a maioria dos exemplares que apresentam o cálcar maior são de localidades da *Sierra Madre del Sur* (Oaxaca). *Habenaria quinqueseta* possui exemplares com o cálcar entre 4-8 cm de comprimento e as flores geralmente são menores. *Habenaria lucaecapensis* também é uma espécie de difícil delimitação, sendo facilmente confundida com *H. macroceratitis* e *H. quinqueseta.* Estes táxons formam complexos de espécies interessantes para estudos futuros.

***Habenaria*** Seção ***Clypeatae*** Kraenzl., Bot. Jahrb. Syst. 16: 130. 1892. Tipo: *Habenaria clypeata* Lindl. Gen. Sp. Orchid. Pl. 311. 1835.

Ervas terrestres. Plantas 12-45 cm compr. Folhas 3-12, elípticas, ovado-lanceolada, oblongas ou suborbiculares, as maiores no centro do caule. Inflorescência poucas flores, laxa. Flores 2-13, pequenas ou medianas, verdes ou brancas; sépalas verdes ou brancas ou verdes claras; sépalas laterais obliquamente lanceoladas, ovado-lanceoladas, ou oblongas, patentes, deflexas, levemente reflexas ou perpendiculares; pétalas distintamente bipartidas, verdes ou brancas; lobo anterior ereto, patente, deflexo ou perpendicular, linear-filiforme, maior, mesmo tamanho ou menor que o lobo posterior; lobo posterior lanceolado, lanceolado-falcado ou espatulado. Labelo distintamente tripartido, parte indivisa curta ou longa; lobos laterais linear-filiformes, pendentes - formando um ângulo de 45$^{o}$ com o lobo mediano, ápices deflexos, reflexos ou encurvados para frente, maiores, do mesmo tamanho ou menores que o lobo mediano; lobo mediano ensiforme, deflexo, levemente encurvado para frente ou raramente reflexo; cálcar linear-fusiforme, deflexo ou raramente reflexo, parcialmente ou totalmente encoberto pelas brácteas ou raramente livre, aproximadamente do mesmo tamanho que o ovário, tamanho 8,0-40,0 x 0,6-2,0 mm. Ginostêmio ereto. Hemipolinários dois, separados. Estigma bilobado, lobos estreitamente paralelos. Rostelo lobo mediano triangular, completamente localizado entre os loci da antera; lobos laterais paralelos, geralmente retos ou encurvados para cima.

*Habenaria acutiflora* A.Rich. & Galeotti
*Habenaria adenantha* A.Rich. & Galeotti
*Habenaria agapitae* R.González & Reynoso
*Habenaria aguirrei* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria atrata* McVaugh ex R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria atrocalcarata* R.González & Cuevas-Figueroa

*Habenaria calicis* R.González*
*Habenaria carvajaliana* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria castroi* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria clypeata* Lindl.*
*Habenaria contrerasii* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria cortesii* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria crassicornis* Lindl.*
*Habenaria cuevasiana* R.González & Cuevas-Figueroa*
*Habenaria diffusa* A.Rich. & Galeotti
*Habenaria eatoniana* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria entomantha* (Lex.) Lindl.*
*Habenaria felipensis* Ames
*Habenaria filifera* S.Watson*
*Habenaria flexuosa* Lindl.
*Habenaria gonzaleztamayoi* García-Cruz*
*Habenaria greenwoodiana* R.González
*Habenaria horaliae* R.González
*Habenaria ibarrae* R.González*
*Habenaria inexpectata* R.González & Cuevas-Figueroa*
*Habenaria ixtlanensis* E.W.Greenw.*
*Habenaria jardeliana* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria kariniae* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria laatiana* Schltr.
*Habenaria lactiflora* A.Rich. & Galeotti
*Habenaria lactiflora* A.Rich. & Galeotti var. *buccalis* Rchb.f.
*Habenaria leon-ibarrae* R. Jiménez & G. Carnevali
*Habenaria lizbethae* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria luzmariana* R.González
*Habenaria macvaughiana* R.González*
*Habenaria magnibracteata* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria mariae* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria matudae* Salazar*
*Habenaria micheliana* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria mitodes* Garay & Kittredge ex McVaugh*
*Habenaria nogeirana* R.González & Cuevas-Figueroa*
*Habenaria ortiziana* R.González*
*Habenaria pinzonii* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria pseudofilifera* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria rosilloana* R.González
*Habenaria rosulifolia* Espejo & López-Ferrari
*Habenaria ruizii* R.González
*Habenaria rzedowkiana* R.González*
*Habenaria rzedowskii* R.González
*Habenaria schaffneri* S.Watson*
*Habenaria socorroae* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria szlachetkoana* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria talaensis* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria tequilana* R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria tetranema* Schltr.
*Habenaria uncata* R. Jiménez, L. Sánchez & García-Cruz

*Habenaria zamudioana* R.González
*Habenaria zapopana* Rosillo & Espinoza ex R.González & Cuevas-Figueroa
*Habenaria xochitliae* R.González

*Distribuição*: A maioria das espécies dessa seção é endêmica do México, presentes na *Sierra Madre Occidental*, na *Altiplanicie mexicana* e na *Sierra Madre del Sur*, se extendendo para algumas serras um pouco ao sul e alguns países da America Central. *Habenaria flexuosa* é a espécies de distribuição mais ampla, extendendo-se do México até a Costa Rica. Algumas outras poucas espécies também ocorrem na Guatemala, Honduras, El Salvador e Nicarágua.

*Habitat e ecologia*: Terrestres, em florestas de *Pinus* e/ou *Quercus* ou florestas tropicais, com exceção de *H. nogeirana*, *H. filifera*, *H. calicis* e *H. clypeata* que também podem ocorrer em beira de matas ou em pastos. Altitude 1000-3000 m, com exceção de *H. entomantha, H. matudae e H. ortiziana* que podem crescer e menores altitudes. Geralmente florescem de julho a setembro.

*Notas*: Kränzlin (1892, 1901) incluiu 11 espécies nesta seção, distribuídas do México ao sul da América do Sul, e caracterizou o grupo pelo labelo tripartido, pétala bipartida, processos estigmáticos curtos, plantas foliosas ao longo de todo caule, folhas com base não maculada, plantas pequenas e sépala dorsal grande, frequentemente achatada. Como circunscrito por Kränzlin a seção é claramente polifilética. *Habenaria repens* e *H. maxillaria* pertencem a um subclado basal, irmão de *Habenaria* sect. *Pentadactylae* (Pedron et al., 2014), *Habenaria achalensis* pertence a um subclado basal sustentado por altos valores de suporte e diversas características morfológicas (Batista et al., 2013) enquanto *H. michauxii* é um sinônimo de *H. quinqueseta*, que pertence a *Habenaria* sect. *Habenaria*.

O tipo de *Habenaria* Seção *Clypeatae* não foi indicado por Kranzlin (1892, 1901). Todavia, de acordo com o artigo 22.6 do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (McNeill *et al.*, 2012), ‘Quando o epíteto de uma subdivisão de um gênero é idêntico ao, ou derivado do, epíteto de uma de suas espécies constituintes, o tipo do nome da subdivisão do genero é o mesmo que aquele do nome da espécie, a menos que o autor original do nome subdivisional tenha designado outro tipo’. Deste modo *H. clypeata* fixa a aplicação do nome seccional *Clypeatae* a este clado.

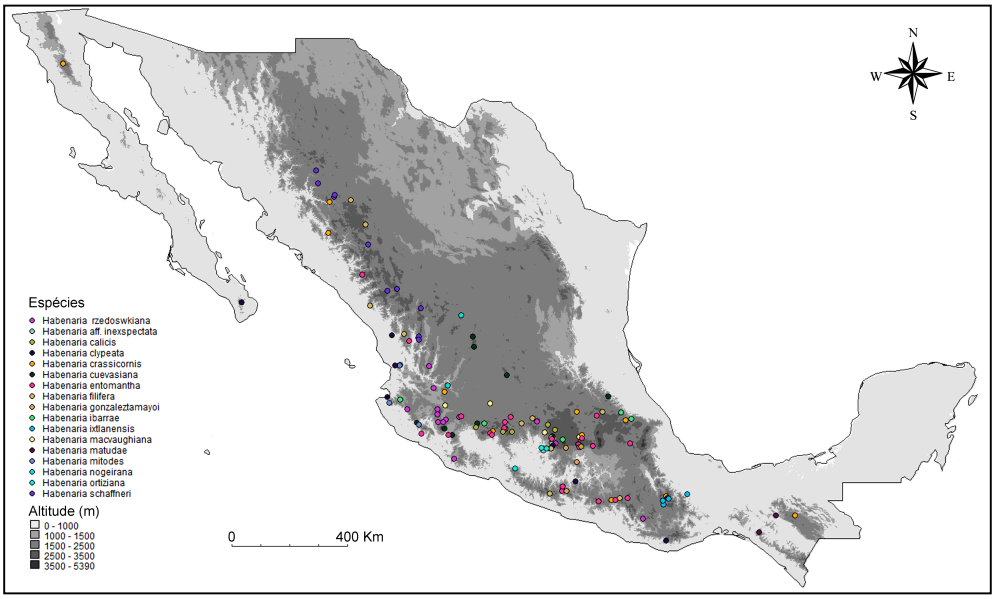



Figura 6 - Mapa da distribuição no México das espécies de *Habenaria* Seção *Clypeatae* incluídas nas análises filogenéticas.

Os nossos resultados indicam que o clado que inclui *H. clypeata* forma uma linhagem evolutiva distinta (subclado J) formado principalmente por espécies endêmicas mexicanas. As espécies incluídas nesta clado apresentam grande diversidade morfológica, com flores variando de grande a pequenas e de brancas e verdes. Neste trabalho incluimos 59 táxons neste grupo com base na distribuição geográfica restrita ao México e América Central, excluindo espécies pertencentes a outros clados, como *H. alata* que forma um clado com *H. hexaptera* e *H. rupicola* (*Habenaria* seção *Microstylinae* Kraenzl.), *H. virens*, *H. strictissima*, *H. brevilabiata* e *H. greenwoodiana*, que apresentam labelo limples ou com projeções laterais curtas e formam um clado com *H. hamata*, *H. odontopetala* e *H. eustachya*, entre outras espécies similares (*Habenaria* seção *Odontopetalae* Kraenzl., *Habenaria* seção *Quadratae* Kraenzl. e *Habenaria* seção *Seticaudae* Kraenzl.), *H. pringlei*, que apresenta os lobos do estigma muito longos, e forma um clado com *H. johanennsis* e *H. macronectar* (*Habenaria* seção *Sartores* Kraenzl.), e as espécies da nova seção proposta abaixo (*Habenaria* seção *Novemfidae*) que constituem uma linhagem evolutiva distinta. A amostragem de táxons e resolução filogenética de *Habenaria* seção *Clypeatae* ainda são baixas. Considerando a grande diversidade morfológica do grupo é possível que a adição de mais espécies e caracteres informativos adicionais nas análises revelem subdivisões neste grande grupo.

Das 59 espécies incluídas na seção, 43 (73%) foram descritas nas últimas quatro décadas. Este resultado é função do intenso estudo taxonômico das espécies mexicanas e indica a alta diversidade do grupo no México. Por outro lado a caracterização e diferenciação

morfológica de muitos destes táxons é baseada em caracteres sutis e contínuos e mais estudos são necessários a fim de avaliar a significância e identidade taxonômica de muitas destas espécies.

***Habenaria*** Seção ***Novemfidae*** **A.A.Vale & J.A.N.Bat.** ***sect. nov.*** Tipo: *Habenaria novemfida* Lindl., Pl. Hartw. 94. 1842.

Ervas terrestres. Plantas 12-80 cm compr. Folhas 3-12, elípticas, ovadas, ovado-lanceoladas ou lanceoladas, as maiores no centro do caule. Inflorescência poucas ou muitas flores, laxa ou congesta. Flores 4-36, pequenas ou medianas, verdes ou verde-amareladas; Sépalas verdes; sépalas laterais obliquamente ovadas, ovado-lanceoladas, lanceoladas ou elípticas, patentes, deflexas ou levemente reflexas; pétalas simples ou distintamente bipartidas, verdes ou verde-amareladas; lobo anterior ereto, patente, deflexo ou perpendicular, linear-filiforme ou reduzido a uma pequena projeção dentiforme, maior ou menor que o lobo posterior; lobo posterior lanceolado, lanceolado-ovado ou oblongo. Labelo distintamente tripartido, parte indivisa curta; lobos laterais linear-filiformes, perpendiculares - formando um ângulo de 90º com o lobo mediano, ápices eretos, maiores ou do mesmo tamanho que o lobo mediano; lobo mediano linear ou ensiforme, deflexo ou levemente encurvado para frente; cálcar linear, levemente clavado ou clavado, deflexo, levemente projetado para a frente ou levemente reflexo, livre, parcialmente ou totalmente encoberto pelas brácteas, pouco menor, pouco maior ou do mesmo tamanho que o ovário, 8,5-30,0 x 0,8-2,0 cm. Ginostêmio ereto. Hemipolinários dois, separados. Estigma bilobado, lobos estreitamente paralelos. Rostelo lobo mediano triangular, completamente localizado entre os loci ou parcialmente projetado para frente dos loci da antera; lobos laterais paralelos, geralmente encurvados para cima.

*Habenaria guadalajarana* S.Watson*
*Habenaria jaliscana* S.Watson*
*Habenaria novemfida* Lindl.*
*Habenaria subauriculata* Robinson & Greenm.*

*Distribuição*: Este clado é restrito ao México e América Central (Figura 7). *Habenaria novemfida* é a espécie de distribuição mais ampla, ocorrendo no México, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua e Costa Rica (Batista et al., 2011b). No México as espécies

ocorrem na *Sierra Madre Occidental*, na *Altiplanicie mexicana* e na *Sierra Madre del Sur*, sendo que *H. guadalajarana* e *H. subauriculata* são endêmicas.

*Habitat e ecologia*: Terrestres, em florestas de *Pinus* e/ou *Quercus* ou florestas tropicais, em clareiras ou em beira de matas, em pastos, em escarpas, entre rochas, depressões úmidas ou em vegetação xerófila. Altitude 1000-3000 m, com exceção de *H. novemfida* que cresce a partir dos 140 m de altitude. Geralmente florescem de julho a setembro.

*Notas*: No momento este grupo é composto por quatro espécies, com centro de distribuição concentrado no México. Estas espécies são morfologicamente similares as espécies na *Habenaria* seção *Clypeatae*, mas caracterizam-se pelos segmentos laterais do labelo eretos, enquanto na *Habenaria* seção *Clypeatae* os segmentos laterais são voltados para baixo. Esta característica morfológica nunca foi considerada em nenhum dos sistemas de classificação anteriores que incluíram táxons mexicanos (Kränzlin, 1892, 1901; González-Tamayo, 1993). Os resultados das análises filogenéticas indicam que as espécies neste grupo constituem uma linhagem evolutiva distinta, sugerindo que este caráter morfológico é significativo e provavelmente está relacionado a polinizadores e mecanismos de polinização diferente das espécies na *Habenaria* seção *Clypeatae*. Até o momento não há nenhum estudo sobre polinização das espécies de *Habenaria* mexicanas e estudos futuros neste sentido devem trazer luz a esta questão.

*Habenaria novemfida* e *H. jaliscana* são espécies amplamente distribuídas e caracterizam-se por apresentar indivíduos com grande variação morfológica, formando complexos de espécies muitas vezes difíceis de delimitar.

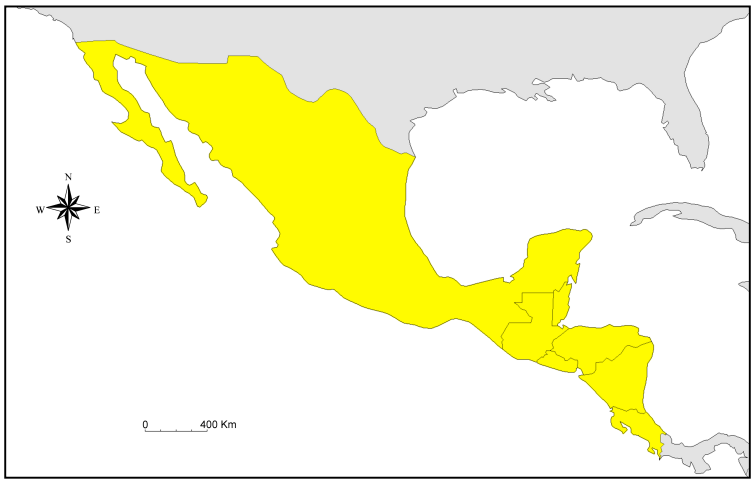



Figura 7. Distribuição de *Habenaria* Seção *Novemfidae.* Indica-se apenas os países nos quais a seção está presente.

## 5. Considerações finais

As árvores obtidas revelaram uma forte estruturação geográfica e a divisão das espécies mexicanas em dois subclados não diretamente relacionados. Diferenças morfológicas na disposição espacial dos segmentos laterais do labelo sugerem que adaptações a diferentes polinizadores ou mecanismos de polinização podem ser responsáveis pela subdivisão observada. É proposta a recircunscrição das seções *Habenaria*, que inclui a espécie tipo do gênero, e *Habenaria* seção *Clypeatae*, e a criação de uma nova seção (*Habenaria* seção *Novemfidae*) para abrigar as espécies de *Habenaria* mexicanas e centro-americanas com segmentos laterais do labelo eretos.

## 6. Referências bibliográficas

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. 2003. Lista atualizada das Orchidaceae do Distrito Federal. **Acta Botanica Brasilica** 17: 183–201.

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

Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, van den Berg C, Madriñán S, Petersen G, Seberg O, Jørgsensen T, Cameron KM, Carine M, Pedersen N, Hedderson TAJ, Conrad F, Salazar GA, Richardson JE, Hollingsworth ML, Barraclough TG, Kelly

L, Wilkinson M. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. **Taxon** 56: 295–299.

Chase MW, Williams NH, Faria AD, Neubig KM, Amaral MCE, 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. Orchidaceae. *Habenaria*. In: Martius CFP, Eichler AG, Urban I, eds. *Flora Brasiliensis*, Vol. 3. München: F. Fleischer, 18–102.

Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. **Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of American** 19: 11–15.

Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research 32**: 1792–1797.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. **Evolution 39**: 783–791.

Fitch WM. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. **Systematic Zoology** 20: 406–416.

Gonzáles-Tamayo R. 1993. Algunas consideraciones sobre el género *Habenaria* (Orchidaceae) en México. **Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara** 1: 485–511.

Gonzáles-Tamayo R, Hernández Hernández L. 2010. Las Orquídeas del occidente de México 1: 1-303. Guadalajara: Coecytjal.

Govaerts R, Pfahl J, Campacci MA, Holland Baptista D, Tigges H, Shaw J, Cribb P, George A, Kreuz K, Wood J. 2011. World Checklist of Orchidaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. http://apps.kew.org/wcsp/. Acesso em 06 de dezembro de 2014.

Hoehne FC. 1940. Orchidaceas, *Habenaria*. In: Hoehne FC, ed. *Flora Brasílica*, Vol. 12. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo, 52–254

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.

Kränzlin F. 1892. Beitrage zu einer Monographie der Gattung *Habenaria* Willd. **Engler's Botanische Jahrbücher** 16: 52–223.

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

Kress WJ, Prince LM, Williams KJ. 2002. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. **American Journal of Botany** 89: 1682–1696.

Kurzweil H, Weber A. 1992. Floral morphology of Southern African Orchideae II. Habenariinae. **Nordic Journal of Botany** 12: 39–61.

McNeill J, Barrie FR, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, Prud'Homme van Reine WF, Smith GF, Wiersema WJ, Turland NJ. 2012. *International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011*. Regnum Vegetabile 154. Koenigstein: Koeltz Scientific Books.

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

Nylander JAA. 2004. MrModeltest v2. Programa distribuído pelo autor. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Pabst GFJ, Dungs F. 1975. *Orchidaceae Brasilienses*, Vol. I. Hildesheim: Kurt Schmersow.

Pedron M, Buzatto CR, Ramalho AJ, Carvalho BM, Radins JA, Singer RB, Batista JAN. 2014. Molecular phylogenetics and taxonomic revision of *Habenaria* section *Pentadactylae* (Orchidaceae, Orchidinae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 175: 47–73.

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.

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

Ronquist F, Huelsenbeck JP, van den Mark P. 2005. MrBayes 3.1 Manual. <http://mrbayes.net>.

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.

Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany** 94: 275–288.

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.

Swofford DL. 1998. *PAUP 4.0. Phylogenetic analysis using parsimony*. Sunderland: Sinauer Publications.

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.

Thiers B. 2014. [Atualizado constantemente]. *Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff*. Disponível em http://sweetgum.nybg.org/ih/. Acessado em 25.02.2014.

# CAPÍTULO 3

Vale, A. A.; Leal, B. S. S.; Proite, K.; Batista, J. A. N. & Borba, E. L. Variabilidade morfológica e genética no complexo *Habenaria nuda* Lindl. (Orchidaceae).

## Variabilidade morfológica e genética no complexo *Habenaria nuda* Lindl. (Orchidaceae)

Aline A. do Vale[1], Bárbara S. Santos Leal[2], Karina Proite[1], João A. N. Batista[1] e Eduardo L. Borba[3]

[1] *Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 486, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.*

[2] *Departamento de Botânica, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Campus de Rio Claro, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brasil.*

[3] *Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Campus de São Bernardo do Campo, CEP 09606-070, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil.*

**RESUMO**

Uma filogenia molecular envolvendo as espécies de *Habenaria* do Novo Mundo foi realizada e um dos maiores clados encontrados na mesma filogenia foi o clado relacionado à *Habenaria* seção *Nudae*. Embora tal clado tenha sido foi bem amostrado as relações de parentesco entre os táxons envolvidos no complexo *Habenaria nuda* não se apresentaram bem resolvidas. Na filogenia realizada foram utilizados apenas dois marcadores moleculares o que levou ao principal objetivo deste trabalho: utilizar um maior número de marcadores moleculares na análise filogenética e também outras ferramentas como a análise de variabilidade genética e morfológica a fim de melhorar a resolução entre os táxons envolvidos no complexo. Foi realizada uma análise filogenética usando três marcadores moleculares com as espécies envolvidas no complexo *H. nuda* a qual mostrou que o aumento do número de marcadores não foi suficiente para resolver as relações de parentesco entre a maioria dos morfotipos envolvidos. Então, dentro deste cenário, foram realizadas análises de variabilidade genética utilizando os marcadores microssatélites e análises morfométricas multivariadas envolvendo 293 indivíduos pertencentes a dez morfotipos e os resultados obtidos indicam a existência de espécies novas relacionadas ao complexo *H. nuda* e a elevação para nível específico de uma variedade. Após a realização das análises supracitadas e o direcionamento dado por elas, foi realizado um estudo mais detalhado de caracteres não abordados pela morfometria e foi possível delimitar de maneira mais precisa o táxon *H. rodriguesii* Cogn.

**Palavras-chave:** Complexos de espécies, análise morfométrica, microssatélites, *Habenaria* seção *Nudae.*

## 1. Introdução

O gênero *Habenaria* Willd. (Orchidaceae, Orchidoideae, Orchidinae) é bem representado nos trópicos e subtrópicos do Novo e Velho Mundo (Pridgeon et al., 2001), sendo que nos neotrópicos o Brasil é o país mais rico, contendo aproximadamente 165-170 táxons (Batista et al., 2011a). No novo mundo o gênero é composto exclusivamente de espécies terrícolas, predominantemente campestres, sendo que a maioria possui flores pequenas, verdes e inconspícuas, sendo portanto, de pouco interesse para cultivo (Batista e Bianchetii, 2003). Estes autores comentam que o grande número de espécies aliado à pobre caracterização ou pouca informação sobre alguns táxons e a existência de vários complexos de espécies no gênero têm originado alguns problemas em relação à identificação das mesmas, ocorrendo a aplicação de diferentes nomes para táxons iguais e o uso de nomes iguais para espécies distintas.

Uma filogenia molecular abrangendo as espécies neotropicais de *Habenaria* foi realizada por Batista et al. (2013), na qual demonstrou-se que o gênero é constituído por aproximadamente 21 subgrupos com alto suporte. Dentre estes, um clado bem suportado correspondente a *Habenaria* seção *Nudae sensu lato* (clado D), composto por espécies de folhas lineares e comumente adpressas ao caule, que estão mais concentradas no cerrado e campos rupestres do Brasil. Este clado é dividido em 6 subgrupos (16 ao 21) e, apesar dos subgrupos 19 ao 21 pertencerem a um subclado bem suportado, as relações de parentesco dentro dos mesmos não estão bem resolvidas. A filogenia apresentada pelos autores utilizou dois marcadores moleculares (ITS e mat*K*) e talvez um aumento de número de marcadores a serem utilizados possa vir a aumentar a resolução do correspondente à seção *Nudae*.

Na sinopse de *Habenaria* para o Novo Mundo os autores Batista et al. (2011b) comentam sobre a identidade de *H. nuda* e a dificuldade da delimitação desta em relação aos táxons similares *H. nuda* var. *pygmaea* Hoehne, *H. rolfeana* Schltr., *H. fluminensis* Hoehne e *H. rodriguesii* Cogn. Os mesmos sugerem que são necessários mais estudos a fim de esclarecer tais relações.

Neste contexto vem à tona, mais uma vez, dois dos problemas fundamentais da taxonomia: como identificar uma espécie e como delimitá-la. Esses problemas foram discutidos por Dayrat (2005), que comenta que a questão fundamental da taxonomia não é como identificar as espécies mas sim como delimitá-las, pois a delimitação de espécies é

fundamental para a determinação da biodiversidade, quando pode-se reconhecer se os espécimes são ou não membros de uma mesma mesma linhagem coesa. Parte do problema de delimitação entre espécies de deve ao fato de que a morfologia, quando utilizada para tal delimitação, apresenta alguns limites e algumas vezes tal abordagem apenas discrimina tipos de "morfos" (Cain, 1954), ou seja, espécimes que se separam baseados exclusivamente em características morfógicas. Dayrat (2005) relata que vários novos métodos que auxiliam na delimitação de espécies foram desenvolvidos nos últimos 15 anos e que tais métodos fornecem importantes contribuições para os estudos em casos de variação morfológica intra e interespecífica. O autor sugere que tal abordagem integrativa é necessária quando existe dificuldade em encontrar o limite entre táxons e isso pode requerer o uso de metodologias múltiplas e complementares.

A taxonomia integrativa vem sendo cada vez mais usada pelos taxonomistas para se tomarem decisões taxonômicas. A utilização de metodologias múltiplas com o objetivo de avaliar a circunscrição de espécies leva em consideração fontes de informação que podem ter passado por diferentes histórias evolutivas, e isso depende da natureza do material utilizado, ou seja, da fonte de dados.

Um dos problemas relatados na literatura se refere à utilização de diferentes fontes de dados que podem ser analisadas em conjunto e revelarem relações contrárias àquelas obtidas quando os dados são analisados em separado. Neste caso, quando existe discordância entre diferentes informações quanto aos limites taxonômicos a serem inferidos, é necessária a tomada de decisões sobre a hipótese a ser escolhida. Tal abordagem foi chamada de evidência total e foi proposta por Carnap (1950) e aplicada na taxonomia por Kluge (1989).

Yeates et al. (2011) dissertam sobres o termo taxonomia integrativa e introduzem o termo "taxonomia iterativa". Os autores propõem que sejam realizados testes para as diferentes delimitações entre um grupo de táxons e que seja realizada uma busca por explicações evolutivas para os padrões divergentes observados nos táxons em questão.

A utilização de várias ferramentas para fins taxonômicos tem sido realizada na família Orchidaceae (Pessoa et al., 2012) mas até o momento apenas uma análise com esse tipo de abordagem foi realizada em *Habenaria* e envolveu o complexo de espécies relacionado a *H. repens* Nutt. (Lau, 2013).

A morfometria pode ser definida como o estudo da forma e sua relação com o tamanho. Disciplinas diversas, como a taxonomia, a ecologia e a genética, têm dado atenção ao estudo morfométrico, uma vez que uma ampla variação morfológica é encontrada entre indivíduos de uma mesma espécie. Essas análises podem ser realizadas por métodos de

estatística bivariada ou multivariada, de acordo com a intenção do estudo (Peres Neto, 1995). Estudos morfométricos multivariados têm sido utilizados para auxiliar no esclarecimento de problemas taxonômicos em vários grupos de plantas, especialmente quando estes formam complexos de espécies (Henderson, 2006). Tais estudos utilizam variáveis contínuas e comparam populações em níveis intra e interespecíficos (van den Berg, 1996).

A função da morfometria tradicional aplicada em estudos taxonômicos tem sido discutida por vários autores e alguns estudos têm combinado dados moleculares e morfológicos para inferir sobre essas questões (Borba et al., 2002; Kucera et al., 2006; Santiago et al., 2009) e desse modo também investigar variações em nível populacional em um contexto evolutivo (Stuessy, 2009). Por meio dessas análises é possível interpretar um grande conjunto de informações que podem ser importantes para investigar padrões morfológicos intraespecíficos, como tem sido realizado em Orchidaceae por alguns autores (*e.g.,* Pinheiro e Barros, 2007; Warghat et al., 2012), e também para delimitar espécies pertencentes a um complexo (*e.g.,* Pinheiro e Barros, 2009; Kaplan e Marhold, 2012).

Os marcadores nucleares podem ser divididos geralmente em dois grupos, os codominantes e os dominantes (Ferreira e Grattapaglia, 1996). Os marcadores codominantes, como os microssatélites e aloenzimas, permitem a distinção de genótipos homozigotos e heterozigotos, o que possibilita a realização de cálculos sobre as frequências genotípicas e alélicas, do fluxo gênico e de inferências sobre o desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desvio do Equilíbrio de ligação envolvendo *loci* de determinadas populações.

Os marcadores de microssatélites têm sido bastante utilizados em análises de variabilidade genética por apresentarem alto nível de polimorfismo, que pode ser mais do que três vezes superior ao encontrado em outros marcadores codominantes em plantas (Butcher et al., 2000). Além do alto polimorfismo, tais marcadores são considerados de caracterização altamente confiável quando comparados a outros marcadores, especialmente os dominantes. Além dos microssatélites fornecerem dados para várias inferências populacionais, as análises de estrutura genética podem auxiliar na tomada de decisões taxonômicas (*e.g.,* Harbaugh et al., 2009).

Como mencionado anteriormente, na filogenia de Batista et al. (2013) o clado 21 é bem suportado, mas as relações entre os táxons dentro do mesmo não estão claramente resolvidas, já que esses táxons se encontram distribuídos em politomias. No presente trabalho dez morfotipos associados a cinco espécies (*H. nuda, H. fluminensis, H. rodriguesii*, *H. rolfeana* e *H. setacea*) são analisados e considerados como pertencentes ao que chamamos de

complexo *Habenaria nuda*, pois como supracitado, de acordo com Batista et al. (2011b) existe uma clara dificuldade em delimitar tais táxons proximamente relacionados a *H. nuda*.

Neste trabalho, foram utilizados marcadores moleculares e morfológicos para tentar esclarecer as relações de parentesco entre os morfotipos pertencentes ao complexo *H. nuda* e investigar como estão particionadas as variabilidades genética e morfológica dentro do complexo: i) se o aumento de número de marcadores a serem utilizados na análise filogenética pode melhorar resolução entre as relações de parentesco dos morfotipos; ii) como estão estruturadas genética e morfologicamente os conjuntos de populações dos morfotipos; iii) se os padrões de variação morfológica e genética estão correlacionados; iv) se os morfotipos previamente delimitados correspondem a padrões morfológicos e genéticos; e v) se a partir do conjunto de dados obtidos seja possível determinar e caracterizar as entidades taxonômicas que formam o complexo.

## 2. Material e métodos

### *2.11 Amostragem de táxons para a análise filogenética*

No total, 91 espécies foram abordadas na análise. Foram usados 120 terminais, dos quais 115 são táxons neotropicais 23 correspondem a táxons cujas sequências foram geradas neste trabalho (Tabela 1). Dos 120 terminais utilizados, cinco são espécies extraneotropicais e possuem sequências no disponíveis no *GenBank*: *Habenaria lithophila* Schltr., *H. dives* Rchb. f., *H. clavata* Rchb. f., *H. tridens* Lindl., *Gennaria diphylla* Parl., sendo este último usado como grupo externo (os números de acesso ao *GenBank* estão citados no Capítulo 2). Além dos táxons extraneotropicais utilizados, a amostragem dos táxons americanos incluiu representantes de outras seções neotropicais de *Habenaria* amostrados na análise filogenética de Batista et al. (2013) e Pedron et al. (2014), também estão disponíveis no *GenBank* com os números de acesso citados nesses trabalhos.

O complexo *Habenaria nuda* envolve atualmente cerca de dez espécies e mais de dezoito morfotipos. Das 91 espécies abordadas na análise deste trabalho, 33 terminais correspondem a dez espécies (*H. australis*, *H. egleriana*, *H. nuda*, *H. fluminensis*, *H. nasuta*, *H. rodriguesii, H. setacea, H. sobraliana*, *H. sprucei*, e *H. rolfeana*) contindas no complexo. Os 23 terminais cujas sequências foram geradas neste trabalho correspondem às cinco espécies: *H. nuda*, *H. fluminensis*, *H. rodriguesii, H. setacea* e *H. rolfeana*.

O material analisado neste trabalho foi coletado em campo e conservado em sílica-gel.

*2.12 Amostragem populacional para as análises de variabilidade genética e morfométrica*

Um total de 293 indivíduos pertencentes a 13 populações foram utilizados nas análises morfométricas e moleculares envolvendo marcadores microssatélites (Tabela 2). As 13 populações representam 10 morfotipos que também estão relacionados às espécies *H. nuda*, *H. fluminensis*, *H. rodriguesii, H. setacea* e *H. rolfeana*, tais populações apresentam distribuição nas seguintes unidades de federação brasileiras: Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Figura 1).

Os morfotipos foram encontrados em diferentes *habitats*, alguns crescendo em campo úmido ou pouco úmido (*H.* aff. *nuda* 1, *H.* aff. *nuda* 2, *H. nuda* var. *pygmaea, H.* cf. *rodriguesii* 1, *H. setacea, H. rolfeana* 1 e *H. rolfeana* 2) e em campo seco (*H.* cf. *rodriguesii* 2).

A quase totalidade dos morfotipos floresce durante o período chuvoso (no final/início do ano em Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Distrito Federal) com exceção de *H. nuda* var. *pygmaea* que ocorre estritamente em campos inundáveis do Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraná e São Paulo, e floresce no inverno, sendo essa última uma característica pouco comum para o gênero. A maioria das espécies apresentam o período de floração relacionado ao período chuvoso, e portanto esse período restrito de floração dificultou a coleta de material de populações relacionadas a todos aos 18 morfotipos abordados na análise filogenética.

A variação morfológica dos morfotipos está principalmente relacionada ao formato das folhas (lineares ou lanceoladas) e à disposição das mesmas (adpressas ou não), ao tamanho da inflorescência e distância entre as flores, ao tamanho das flores, ao tamanho e disposição espacial dos segmentos linear-filiformes das pétalas e do labelo e à estrutura da coluna (Figuras 2 e 3). Algumas características supracitadas às vezes podem apresentar uma variação contínua entre alguns morfotipos, o que dificulta uma caracterização precisa dos mesmos.

*2.2 Análises filogenéticas*

Foram utilizadas sequências de DNA nuclear (ITS) e plastidial (*matk*, parte do íntron *trnK* e o espaçador intergênico *rps16-trnK*). Informações sobre os vouchers e números de acesso no *GenBank* das sequências dos táxons do Velho Mundo e representantes de outros

subgrupos neotropicais podem ser encontradas em Batista et al. (2013) e Pedron et al. (2014). Regiões amplificadas, *primers* e condições de amplificação utilizadas para cada marcador foram exatamente as descritas por Pedron et al. (2014). Os eletroferogramas das sequências de DNA foram editados com o *software* Sequencher versão 4.8 (GeneCodes Corp., Ann Arbor, Michigan, EUA). As sequências editadas foram alinhadas usando Muscle (Edgar, 2004) e os resultados dos alinhamentos foram ajustados manualmente usando o *software* MEGA 6.0 (Tamura et al., 2011).

As posições de *gap* foram tratadas como dados faltantes. Foram realizadas as análises das três regiões (ITS, *matK-trnK*, *rps16-trnK*) separadamente com o objetivo de detectar possíveis incongruências e posteriormente foram realizadas análises conjuntas. Os dados foram analisados usando as inferências da parcimônia e bayesiana. As análises filogenéticas usando a parcimônia foram desenvolvidas no PAUP versão 4 (Swofford, 1998) com a parcimônia de Fitch (pesos iguais, caracteres desordenados; Fitch, 1971) como o critério de otimização. Cada análise consistiu de 1000 réplicas de adição aleatória de táxons com troca de ramos usando algoritmo TBR retendo somente as 10 primeiras árvores por réplica para permitir uma troca extensa nas ilhas *subótimas*. O suporte interno foi avaliado por *boostrapping* (Felsenstein, 1985) usando 1000 réplicas, adição e troca de ramos TBR, retendo as 10 primeiras árvores por réplica. Para o suporte dos níveis de *boostrap*, porcentagens (BPs) de 50 -70% foram consideradas como fracas, de 71-85% como moderadas e >85% como fortes (Kress et al., 2002).

As análises filogenéticas por inferência Bayesiana foram desenvolvidas usando MrBayes v3.1.2, utilizando as Cadeias de Markov de Monte Carlo (Ronquist et al., 2005) e tratando cada região de DNA (ITS, *matK-trnK* e *rps16-trnK*) como uma partição separada. Um modelo evolutivo para cada região de DNA foi selecionado com o programa MrModeltest 2 (Nylander, 2004) (Tabela 3). Cada análise consistiu de duas corridas independentes com quatro cadeias para 10.000.000 de gerações, amostrando uma árvore a cada 1000 gerações. Na análise combinada, para melhorar a troca de cadeias, a temperatura do parâmetro para aquecimento das cadeias foi reduzida para 0.1. A convergência foi diagnosticada pela divergência nos desvios padrão das duas corridas (menor que 0,01), e ocorreu após $8 \times 10^6$ gerações. Depois de descartar as primeiras 50% das árvores no período *burn-in*, as árvores remanescentes foram usadas para avaliar a topologia e a probabilidade posterior (PP) no consenso de maioria. Neste trabalho foi usado o critério similar ao teste estatístico padrão, considerando grupos com PP>95% como fortemente suportados, PP 90-95% como moderadamente suportados e PP<90% como fracamente suportados.

*2.3 Análises morfométricas*

Para a análise morfométrica foram medidos 19 caracteres (2 vegetativos e 17 reprodutivos) para cada população. Os materiais foram montados em fichas florais e a medição dos caracteres foi feita diretamente das estruturas utilizando paquímetro digital ou fita métrica. A partir destes dados foi construída uma matriz de caracteres (Tabela 4).

Análises multivariadas foram realizadas utilizando o programa Statistica 6.0 (StatSoft, 2003). A Análise de Componentes Principais (PCA) empregando a matriz de correlação foi realizada para a detecção de *outliers* e verificação da estrutura geral dos dados. Foi também realizada a Análise de Variáveis Canônicas (CVA), partindo do pressuposto da classificação das populações como variável de grupo. O número de eixos interpretados em ambas análises foi determinado pelo critério de Kaiser (autovalor > 1).

Além disso, foi realizada uma análise de agrupamento empregando a matriz de distância de Mahalanobis obtida na CVA como coeficiente de distância e o algoritmo de *Neighbor-joining* no programa MEGA 6.0 (Tamura et al., 2011).

*2.4 Análises de variabilidade e estrutura genética*

Para a extração de DNA foram utilizadas amostras de folhas frescas ou secas em sílica em gel e a extração foi realizada seguindo protocolo de Doyle e Doyle (1987), com modificações. Seis pares de *primers* que flanqueiam regiões de microssatélites foram empregados. Cinco destes pares de *primers* (SSRHN1B, SSRHN5, SSRHN8, SSRHN12, SSRHN13) foram desenvolvidos para *H. nuda* e um par de *primer* foi desenvolvido para *H. repens* e transferido para *H. nuda* (SSRHR17). Os tamanhos e motivos das regiões utilizadas, assim como as sequências dos *primers,* são apresentados na Tabela 1 do Apêndice, o qual é referente à nota do isolamento desses *primers*, um trabalho em preparação a ser submetido (Vale *et al*., in prep.).

As amplificações dos microssatélites foram realizadas em termociclador Biocycler MJ96G ou MJ96+, com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento em temperatura de acordo com a região (Apêndice 2, Tabela 1) e 45 segundos de extensão a 72°C, seguidos por 13 ciclos de 30 segundos de desnaturação 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). Dois fluoróforos (HEX e FAM) foram usados para as diferentes regiões analisadas para possibilitar a montagem de multiplex para a análise de fragmentos. As reações foram montadas em um volume total de 30 μL, nas seguintes concentrações: 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. Cinco μL dos produtos de amplificação foram verificados em gel de agarose 1% para os que geraram bandas no gel, e os 25 μL de produtos restantes foram secos e enviados à Macrogen Inc. para eletroforese capilar em sequenciador automático ABI 3730XL (AppliedBiosystems), tendo como padrões de tamanho 500LIZ ou 400HD.

Os resultados das análises dos tamanhos dos fragmentos foram visualizados no programa Peak Scanner (AppliedBiosystems). Foram excluídos os indivíduos que falharam na amplificação de mais de dois *loci*. Para nomear os alelos foi utilizado o macro FlexiBinv2 (Amos et al., 2006) implementado em Excel®. Para verificar a presença de genótipos multiloci idênticos foi utilizado o macro MsTools (Park, 2001) em Excel®. Os dados também foram verificados quanto à presença de erros causados por alelos nulos, *stuttering* e dominância do menor alelo utilizando o programa Microchecker 2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004).

O programa GenAlEx 6.5 (Peakall e Smouse, 2006, 2012) foi utilizado para calcular as seguintes medidas de variabilidade genética por locus e por população: números de alelos, número de alelos exclusivos, número de alelos efetivos, heterozigosidade observada e esperada e índices de fixação. A riqueza alélica foi computada pelo software Fstat 2.2.9.2 (Goudet, 1995) e a frequência de alelos nulos por locus foi calculada no MICROCHECKER (van Oosterhout et al., 2004). O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado pelo teste exato (Guo e Thompson, 1992) no programa GENEPOP on the web, versão 4.0.10 (Raymond e Rousset, 1995). O desiquilíbrio de ligação entre todos pares de loci foi testado no programa Fstat.

Uma análise de estrutura genética foi realizadas sob uma abordagem estatística bayesiana implementada no programa Structure 2.3.3 (Pritchard et al., 2000). Foram feitas 10 interações para cada número de agrupamentos presumidos (*K*), que variou de um a 14. Em cada repetição correram 500.000 gerações de Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC), com um *burn-in* de 100.000 gerações. O modelo escolhido considerou a 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 $\Delta K$ de Evanno, Evanno et al. (2005), que foi implementada no programa Harvester (Earl e von Holdt, 2012). A análise de variância molecular (AMOVA) *locus* por *locus* foi realizada no programa Arlequin (Excoffier et al., 2005). Para tal teste duas AMOVAs foram feitas separadamente utilizando o modelo IAM (*infinite alleles model*): para a primeira AMOVA foram considerados 5 grupos morfológicos (equivalentes aos representantes dos cinco táxons envolvidos nas análises genéticas) e para a segunda AMOVA foram considerados os quatro grupos genéticos identificados na análise bayesiana de estruturação genética realizada no programa Structure. Foram construídas 1000 replicatas de matrizes de distância de Cavalli-Sforza & Edwards (Cavalli-Sforza e Edwards, 1967) no software MSA (Dieringer e Schlotterer, 2003). Essas replicatas foram utilizadas no pacote Phylip (Felsenstein, 1989) para gerar árvores de NJ (programa NEIGHBOR) e, posteriormente, para criar árvores de consenso de maioria com suporte bootstrap (programa CONSENSE), que foram visualizadas no Treeview. A existência de correlação entre as matrizes de distância genética e geográfica foi avaliada através do teste de Mantel implementado no programa GenAlEx.

Tabela 1 - Informação sobre os espécimes utilizados nas amplificações realizadas neste trabalho (exceto quando indicado "*") para as análises filogenéticas. Os vouchers estão depositados no Herbário BHCB. *Quando indicado, ao invés do voucher está o número de extração (em itálico), porém, os mesmos serão substituídos pelo voucher posteriormente. "*"- indica sequências utilizadas do trabalho de Batista et al. (2013). "-" indica que ainda serão submetidas ao *GenBank.*

| Táxon | Voucher | Origem | ITS | *matK* | *trnK* | *rps16-trnK* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *H*. aff. *nuda* 1 | Batista 1490 | Goiás, Alto Paraíso de Goiás | - | - | - | - |
| *H*. aff. *nuda* 1 | Batista 1490 | Goiás, Alto Paraíso de Goiás | * | * | - | - |
| *H*. aff. *nuda* 2 | Batista 2091 | Minas Gerais, Catas Altas | - | - | - | - |
| *H*. aff. *nuda* 3 | Batista 2376 | Goiás, Alto Paraíso de Goiás | - | - | - | - |
| *H*. aff. *nuda* 3 | Batista 2377 | Goiás, Alto Paraíso de Goiás | - | - | - | - |
| *H*. aff. *nuda* 3 | Vale 180 | Goiás, Alto Paraíso de Goiás | - | - | - | - |
| *H*. aff. *nuda* 4 | Batista 2869 | Minas Gerais, Diamantina | - | - | - | - |
| *H*. aff. *nuda* 5 | Batista 2527 | Paraná, Ponta Grossa | * | * | - | - |
| *H*. aff. *nuda* 6 | Batista 1368 | Maranhão, Carolina | * | * | - | - |
| *H*. aff. *nuda* 6 | Vale 225 | Distrito Federal, Brasília | - | - | - | - |
| *H*. aff. *nuda* 7 | Batista 3098 | Goiás, Alto Paraíso de Goiás | - | - | - | - |
| *H*. *nuda* var. *pygmaea* | Batista 939 | Distrito Federal, Brasília | * | * | - | - |
| *H*. *nuda* var. *pygmaea* | Vale 173 | Minas Gerais, Buenópolis | - | - | - | - |
| *H*. *rolfeana* | Vale 266 | Rio de Janeiro, Resende | - | - | - | - |
| *H*. cf. *rolfeana* 3 | Batista 2467 | Minas Gerais, Aiuruoca | * | * | - | - |
| *H*. *setacea* | Batista 1417 | Minas Gerais, Santo Antônio do Itambé | * | * | - | - |
| *H*. *setacea* | Vale 228 | Minas Gerais, Santo Antônio do Itambé | - | - | - | - |
| *H*. cf. *setacea 2* | Mota 3019 | Minas Gerais, Catas Altas | * | * | - | - |
| *H*. cf. *rodriguesii* 1 | Vale 116 | Minas Gerais, Moeda | - | - | - | - |
| *H*. cf. *rodriguesii* 1 | Vale 122 | Minas Gerais, Ouro Branco | - | - | - | - |
| *H*. cf. *rodriguesii* 2 | Batista 3080 | Distrito Federal, Brasília | - | - | - | - |
| *H*. cf. *rodriguesii* 3 | Batista 1186 | Distrito Federal, Brasília | * | * | - | - |
| *H*. cf. *rodriguesii* 4 | Batista 1572 | Goiás, Pirenópolis | - | - | - | - |

Tabela 2 - Listagem dos morfotipos, abreviatura, número e localidade das populações coletadas.

| Morfotipos | Nº de populações | Abreviatura das populações | Nº de populações/localidade | Nº de ind. amostrados nas análises morfológicas | Nº de ind. amostrados nas análises genéticas | Voucher | Coordenadas geográficas | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *H.* cf. *nuda* 1 | 1 | HNUI | (1) Alto Paraíso de Goiás (GO) | 10 | 10 | Vale 193 | 14º 11’ 6,4’’S | 47º 47’ 22,2’’O |
| *H.* cf. *nuda* 2 | 1 | HNUII | (1) Catas Altas (MG) | 17 | 21 | Vale 131 | 20º 7’ 29,3’’S | 43º 28’ 20,8’’O |
| *H.* cf. *nuda* 3 | 1 | HNUIII | (1) Alto Paraíso de Goiás (GO) | 12 | 5 | Vale 180; Batista 2376 | 14° 10' 7.33" S | 47° 50' 52.07" O |
| *H. nuda* var. *pygmaea* | 2 | HNUPBSB | (1) Brasília (DF) | 22 | 40 | Vale 170 | 15º 48’ 23,4’’S | 47º 58’ 39,4’’O |
| | | HNUPSC | (1) Buenópolis (MG) | 19 | 20 | Vale 173 | 17º 55’ 45,1’’S | 44º 21’ 24,3’’O |
| *H.* cf. *rodriguesii* 1 | 2 | HRODSM | (1) Moeda (MG) | 10 | 31 | Vale 116 | 20º 16’ 24,2’’S | 43º 57’ 29,6’’O |
| | | HRODOB | (1) Ouro Branco (MG) | 16 | 18 | Vale 122 | 20º 28’ 36’’S | 43º 33’ 29,7’’O |
| *H.* cf. *rodriguesii* 2 | 1 | HRODII | (1) Brasília (DF) | 5 | 4 | Batista 3080 | 15°53'59,6"S | 48° 0'40,2"O |
| *H. fluminensis* | 1 | HFBC | (1) Barão Cocais (MG) | 10 | 16 | Vale 132 | 19º 56’ 14’’S | 43º 34’ 21,9’’O |
| *H. setacea* | 2 | HSEITA | (1) Santo Antônio do Itambé (MG) | 11 | 28 | Vale 228 | 18º 23’ 56,3’’S | 43º 20’ 45,1’’O |
| | | HSERP | (1) Couto de Magalhães de Minas (MG) | 17 | 42 | Vale 242 | 18º 23’ 53,1’’S | 43º 20’ 41,1’’O |
| *H. rolfeana* 1 | 1 | HROI | (1) Resende (RJ) | 23 | 35 | Vale 266 | 22°23'3,7"S | 44°40'45,7"O |
| *H.* cf. *rolfeana* 2 | 1 | HROII | (1) Lima Duarte (MG) | 18 | 23 | Vale 263 | 21°41'35,1"S | 43°53'40,2"O |

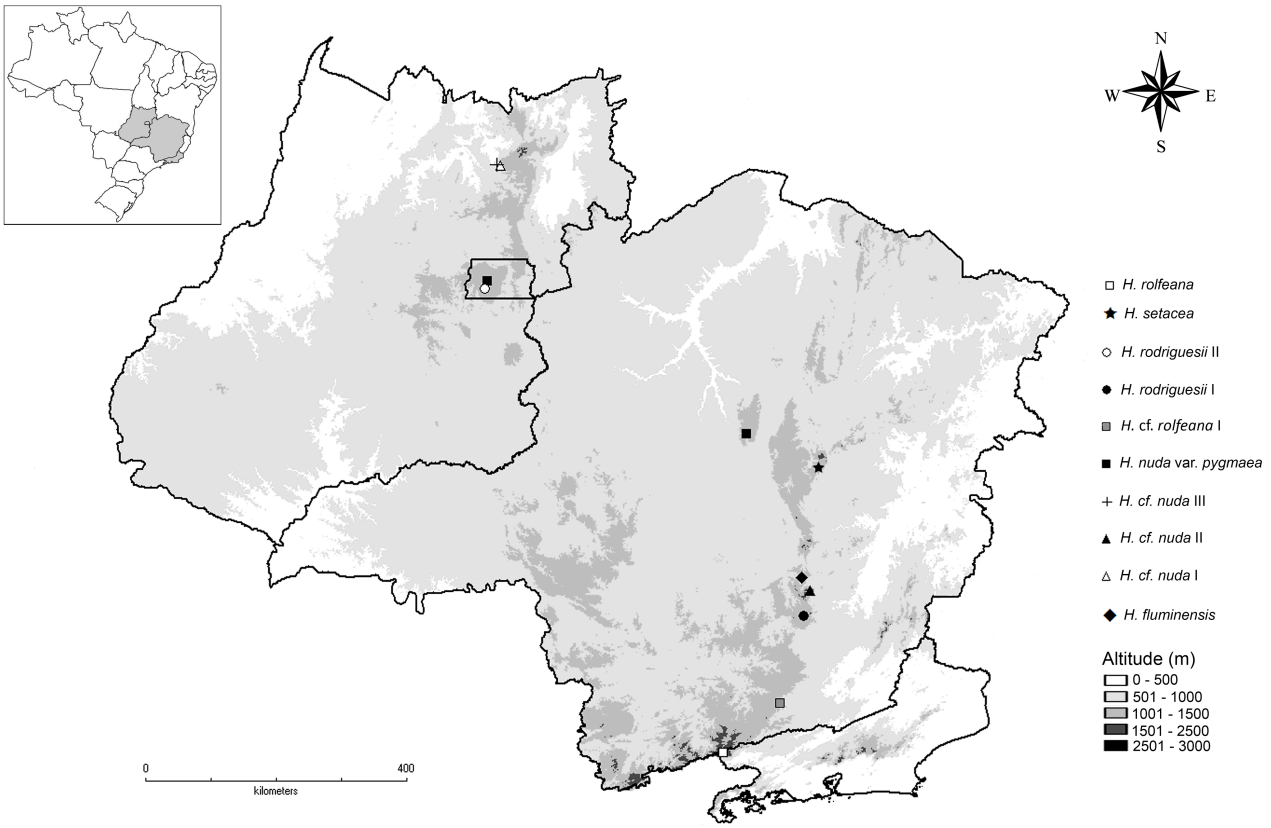



Figura 1 - Distribuição geográfica dos dez morfotipos abordados nas análises de variabilidade genética e morfométrica.

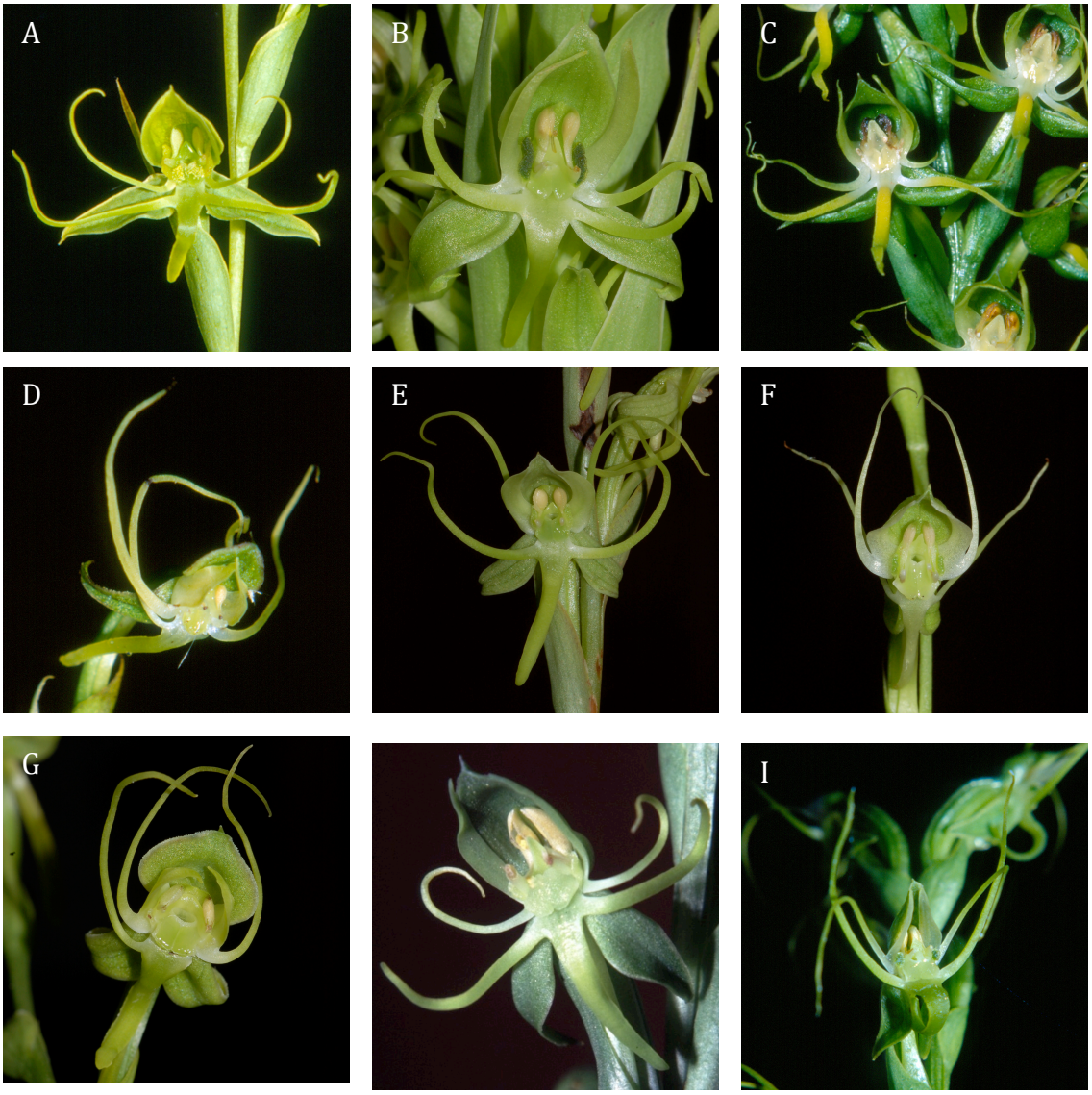



Figura 2 - Morfologia floral dos morfotipos abordados neste trabalho e listados na tabela 2. A, *H. nuda* var. *pygmaea* (HNP). B, *H.* aff. *nuda* 2 (HNUII). C, *H.* aff. *nuda* 1 (HNUI). D, *H. setacea* (HSE). E, *H.* cf. *rodriguesii* 1 (HRODSM). F, *H.* aff. *nuda* 3 (HNUIII). G, *H. rolfeana* (HRO). H, *H. fluminensis* (HF). I, H. *H.* aff. *rodriguesii* 2 (HRODII). Fotos de J. A. N. Batista.

## 3. Resultados

### *3.1 Análise filogenética*

A matriz com as regiões ITS, *matK-trnK* e *rps16-trnK* consistiu de 3801 caracteres, dos quais 485 (12,8%) foram potencialmente informativos. A tabela 4 mostra os valores das análises referentes aos grupos individuais e combinados, com os valores estatísticos referentes aos parâmetros da análise de parcimônia e os modelos utilizados para a análise bayesiana. A árvore do consenso de maioria da análise bayesiana foi altamente congruente com a árvore de consenso estrito da análise combinada da parcimônia, porém a primeira apresentou uma maior resolução e um suporte total mais forte e, portanto, esta árvore foi escolhida para a apresentação (Figura 3).

Assim como no trabalho de Batista et al. (2013), no presente estudo as espécies de *Habenaria* do Novo Mundo formam um clado (clado *A*) bem suportado (1.00 PP, 89% BS, Figura 3) que tem como irmã *H. tridens*, da África .

O morfotipo *H.* aff. *nuda* 1 é considerado relacionado à *H. nuda,* entretanto, na árvore filogenética (Figura 3, clado *B*) o morfotipo *H.* aff. *nuda* 1 é o mais distantemente relacionado dos outros morfotipos e espécies do complexo amostrados neste trabalho.

Com exceção do morfotipo *H.* aff. *nuda* 1, todas as outras espécies e morfotipos do complexo estão posicionados no mesmo clado, mas dispersas em diversos subclados que incluem outras espécies não relacionadas. As duas amostras de *H. nuda* incluídas nas análises aparecem em uma politomia na base desse clado, que é irmão de *H. ayanganennsis* e, junto com esta espécie, formam o clado C, que corresponde ao clado D da análise de Batista et al. (2013).

As amostras do morfotipo *H.* aff. *nuda* 3 formam um clado (subclado *E*) com alto suporte (0.99 PP) que é irmão de *H. psammophila*. *Habenaria fluminensis* forma um clado com *H. pubidactyla* e categorias infraespecificas deste táxon, mas com comprimento dos ramos longos e suporte baixo. *Habenaria setacea* e *H. rolfeana* formam um clado (E) com *H. itacolumia*, mas o suporte foi baixo (0.90 PP, 59% BS) e as relações internas não foram resolvidas. Os demais morfotipos e espécies do complexo aparecem todos em um mesmo clado (subclado F), mas que apresenta suporte baixo (0.62 PP) e relações internas não resolvidas, excetuando os subclados formados por *H. nuda* var. *pygmaea* (1.00 PP, 100% BS), *H. australis*, *H.* cf. *rodriguesii* 1 e *H.* aff. *rodriguesii* 2 (1.00 PP, 95% BS), e *H. egleriana* e *H. montiswilhelminae* (1.00 PP).

### *3.2 Análises morfométricas*

#### *3.21 - Todos os morfotipos*

A Análise de Componentes Principais (PCA) não acusou a presença de nenhum *outlier*. Os quatro primeiros eixos da matriz foram significativos (apresentando autovalor >1), mas os eixos 1 e 2 da PCA foram escolhidos por serem mais informativos quanto aos padrões morfológicos relacionados aos táxons analisados (Figura 4). Em geral pode-se observar na Figura 4 um gradiente ao longo do eixo 1 (59,45% da variância) separando a população HNUI pertencente ao moroftipo (*H*. aff. *nuda* 1) das demais populações do mesmo morfotipo. No eixo 2 (8,70% da variância) apresenta os morfotipos analisados com certa sobreposição entre eles.

Os quatro primeiros eixos da análise de discriminantes (CVA) apresentaram autovalor superior a 1, mas os dois primeiros eixos foram escolhidos por serem mais informativos quanto aos padrões morfológicos. Na Figura 5 o eixo 1 explica 45,62% da variância e está mais associado à largura da folha (♯ 2 – Tabela 4), comprimento da sépala dorsal (♯ 4), largura da sépala dorsal (♯ 5), largura da sépala lateral (♯ 7), comprimento do segmento anterior da pétala (♯ 10) e largura do ápice do cálcar (♯ 15) (Tabela 4). O eixo 2 explica 21,86% da variância e está mais associado ao comprimento da sépala dorsal (♯ 4), à largura da folha (♯ 2), ao comprimento do segmento lateral do labelo (♯ 11) e ao comprimento do cálcar (♯ 16) (Tabela 4). Tanto nas análises de PCA quanto nas de CVA os dois eixos se mostraram influenciados pelos caracteres "largura da folha" (♯ 2) e "comprimento da sépala dorsal" (♯ 4).

A análise de agrupamento de *Neighbor-joining* utilizando a matriz de distância de Mahalanobis separou as populações em dois grandes grupos (Figura 6). O primeiro é formado pelas populações do morfotipo *H. cf. rodriguesii* 1 (HRODSM e HRODOB) e do morfotipo *H. fluminensis* (HFBC), e o segundo é formado pelas demais populações que envolvem os táxons relacionados a *H. nuda*, *H. setacea* e *H. rolfeana*.

#### *3.22 - Morfotipos: H. cf. rodriguesii* 1 e *H. cf. rodriguesii* 2

Por meio da PCA, da CVA e das análises de agrupamento utilizando o algoritmo de *Neighbor-joining* (Figuras 5, 6 e 7) foi possível observar o agrupamento das populações HRODSM (Serra da Moeda) e HRODOB (Serra de Ouro Branco) pertencentes ao morfotipo

*H*. cf. *rodriguesii* 1 e a separação da população HRODII (Distrito Federal) pertencente ao morfotipo *H*. cf. *rodriguesii* 2.

Nas mesmas análises (Figuras 4, 5 e 6) o morfotipo *H. cf. rodriguesii* 2 (HRODII) se encontra no centro do gráfico. Na análise de CVA, tal morfotipo apresenta a largura da sépala lateral e do ápice do cálcar e o comprimento do cálcar similares (♯ 7, ♯ 15, ♯ 16 – Tabela 4) aos morfotipos *H*. aff. *nuda* 1, *H*. aff. *nuda* 2 e *H. rolfeana* 1, sendo possível observar uma sobreposição em relação a esses morfotipos nos respectivos gráficos (Figuras 4 e 5).

*3.23 - Morfotipo: H. fluminensis*

Nas análises de PCA e CVA também foi possível observar que o morfotipo *H. fluminensis* (HFBC) se apresentou claramente isolado. Na Figura 6 observa-se o agrupamento deste morfotipo com *H*. cf. *rodriguesii* 1. Esses dois morfotipos são caracterizados por possuírem folhas lanceoladas e mais largas do que os demais morfotipos e na análise de CVA os dois eixos são influenciados pela largura da folha (♯ 2) e pelo comprimento da sépala dorsal (♯ 4). O morfotipo *H*. cf. *rodriguesii* 1 está mais associado ao eixo 2 da CVA, sob influência do comprimento do segmento lateral do labelo (♯ 11) e do comprimento do cálcar (♯16).

*3.24 - Morfotipos: H*. cf. *rolfeana* e *H. setacea*

Por meio das análises de CVA (Figura 5) foi possível observar que os morfotipos de *H. setacea* (HSEITA e HSERP) e o morfotipo *H. rolfeana* 2 (HROII) se apresentaram parcialmente agrupados e o morfotipo *H. rolfeana* 1 (HROI) se apresentou separado dessas populações, localizando-se no centro dos dois gráficos. Na análise de agrupamento utilizando o algoritmo de *Neighbor-joining* os morfotipos *H. setacea, H. rolfeana* 1 e *H. rolfeana* 2 se agruparam, ainda que com a presença do morfotipo *H. aff. nuda* 3 (HNUIII) entre os mesmos. Isso se deve provavelmente às variáveis largura da folha (♯ 2), comprimento da sépala dorsal (♯ 4) e largura da sépala lateral (♯ 7). Nas análises morfométricas uma das variáveis mais influentes na aproximação dos morfotipos *H. setacea* e *H. rolfeana* 2 dentro do agrupamento é a largura do ápice do cálcar (♯ 5).

*3.25 - Morfotipos associados a H. nuda: H*. aff. *nuda* 1, 2, 3 e *H. nuda* var. *pygmaea*

A maioria das populações associadas aos morfotipos de *H. nuda* (*H.* aff. *nuda* 2, *H. nuda* var. *pygmaea* e parte de *H.* aff. *nuda* 3) se agruparam no centro dos gráficos da PCA e da CVA (Figuras 4 e 5). Sendo assim, as variáveis utilizadas nas análises morfométricas não foram suficientemente discriminativas e possivelmente esses morfotipos foram influenciados igualmente pelos caracteres ♯ 2, ♯ 4, ♯ 5, ♯ 7, ♯ 10, ♯ 11, ♯ 15 e ♯ 16 (Tabela 4), que são a maioria dos caracteres que influenciam os dois eixos na análise.

Embora *H.* aff. *nuda* 3 (HNUIII) tenha se posicionado no centro dos gráficos da PCA e CVA, tal morfotipo se apresentou um pouco distanciado do centro do gráfico da CVA com apenas uma pequena sobreposição em relação ao morfotipo *H. nuda* var. *pygmaea* (HNUPBSB e HNUPSC) e a *H. rolfeana* 1 (HROI). Isso pode ser explicado pela largura da folha (♯ 2), pela largura da sépala lateral (♯ 7), pelo comprimento do segmento anterior da pétala (♯ 10), pela largura do ápice do cálcar (♯ 15) e pelo comprimento do cálcar (♯ 16) (Tabela 4).

O morfotipo *H. aff. nuda* 1 (HNUI) se apresentou isolado na análise de CVA e possivelmente está sob influência dos caracteres associados ao eixo 1, como largura da folha (♯ 2), largura da sépala lateral (♯ 7), comprimento do segmento anterior da pétala (♯ 10) e largura do ápice do cálcar (♯ 15) (Tabela 4).

A análise de agrupamento utilizando o algoritmo de *Neighbor-joining* mostrou que os os morfotipos *H.* aff. *nuda* 1, 2 e 3 e *H. nuda* var. *pygmaea* formam um grande grupo com os morfotipos *H.* cf. *rodriguesii* 2, *H. setacea, H. rolfeana* 1 e 2 (Figura 6), provavelmente devido à variável ♯ 10 (Tabela 3). Dentro desse grande grupo, os morfotipos *H. setacea, H. rolfeana* 1 e 2 e *H.* aff. *nuda* 3 formam um subgrupo provavelmente devido às variáveis mencionadas no tópico 3.24 e os morfotipos *H.* cf. *rodriguesii* 2, *H.* aff. *nuda* 1 e 2 formam outro subgrupo provavelmente devido às variáveis comprimento da sépala dorsal (♯ 4), largura da sépala lateral (♯ 7), largura do ápice do cálcar (♯ 15) e comprimento do cálcar (♯ 16) (Tabela 4).

### *3.3 Análises de variabilidade e estrutura genética*

#### *3.31 - Todos os morfotipos*

Os seis *loci* microssatélites se mostraram polimórficos. O número médio de alelos observados (Na) por *locus* variou de 3,231 a 8,231, a heterozigosidade observada (Ho) em

cada *locus* variou de 0,580 a 0,740 e o índice de fixação (F) variou, por sua vez, de -0,261 a 0,162 nos *loci* analisados (Tabela 6). A riqueza alélica (RA) variou de 2,855 a 4,330 entre as populações e a heterozigosidade média observada tanto por *locus* quanto por população oscilou em função da esperada (Tabelas 6 e 7). O índice de fixação médio (Fis) entre as populações se apresentou entre -0,239 e 0,188 e as populações HNUPBSB e HNUPSC (morfotipo *H. nuda* var. *pygmaea*), HRODII (morfotipo *H.* cf. *rodriguesii* 2) e HROII (morfotipo *H.* cf. *rolfeana* 2) apresentaram valores negativos, o que pode indicar excesso de heterozigotos. Oito das 13 populações apresentaram alelos exclusivos (Tabela 7).

O teste de EHW evidenciou desvios significativos (Tabela 7) em sete populações, o que provavelmente está relacionado à presença de alelos nulos em alguns loci nessas populações , conforme mostrado pela análise realizada pelo Microchecker. A frequência média de alelos nulos (AN) por *locus* apresentou uma variação de -0,092 a 0,071 (Tabela 6).

Foi realizada uma análise bayesiana para inferir sobre a estrutura populacional dos táxons estudados e tal estrutura populacional se mostrou variável dependendo do número de iterações da Cadeia de Markov Monte Carlo e de *burn-in*. Foi selecionado o resultado no qual foi utilizado o maior número de iterações e *burn-in*, cujos valores de L($K$) e $\Delta K$ obtidos para o modelo implementado indicam $K$=4 como o número ótimo de agrupamentos genéticos (Figura 7).

O primeiro agrupamento apresentado pela análise bayesiana inclui as populações HRODSM e HRODOB (morfotipo *H.* cf. *rodriguesii* 1), HNUII (morfotipo *H.* aff. *nuda* 2) e HFBC (morfotipo *H. fluminensis*). O segundo agrupamento inferido mostra as populações HNUPBSB e HNUPSC (morfotipo *H. nuda* var. *pygmaea*). Já o terceiro agrupamento apresentou as populações HSEITA e HSERP (morfotipo *H. setacea*) e HROII (morfotipo *H.* cf. *rolfeana* 2). Finalmente, o quarto agrupamento mostrou HROI (morfotipo *H. rolfeana* 1) e HRODII (morfotipo *H.* cf. *rodriguesii* 2). As populações HNUI (morfotipo *H.* aff. *nuda* 1) e HNUIII (morfotipo *H.* aff. *nuda* 3) apresentaram uma mistura gênica, com indivíduos assinalados a diversos grupos, não sendo possível posicioná-las em nenhum deles.

As AMOVAs indicaram uma estruturação genética entre o conjunto de populações ($F$st= 0.148 e 0.153) e demonstraram que a maior parte da variância (85,20 e 84,64%) está dentro das populações e que a variação entre grupos é levemente maior do que entre populações dentro dos grupos (Tabela 8).

A análise de agrupamento utilizando a matriz de distância de Cavalli-Sforza (Figura 8) não separou as populações em dois grandes grupos como ocorreu na análise de agrupamento

utilizando a matriz de distância de Mahalanobis, mas apresentou um grande grupo interno subdividido em dois grupos, o primeiro formado pelas populações HNUIII (morfotipo *H*. aff. *nuda* 3), HRODII (morfotipo *H*. cf. *rodriguesii* 2) e HROI (morfotipo *H*. *rolfeana* 1) e o segundo dividido em dois subgrupos, o primeiro agrupando HSEITA, HSERP (morfotipo *H*. *setacea*) e HROII (morfotipo *H*. cf. *rolfeana* 2) e o outro HNUPBSB, HNUPSC (morfotipo *H*. *nuda* var. *pygmaea*) e HNUI (morfotipo *H*. aff. *nuda* 1). Fora desse grande grupo ficaram as populações HNUII (morfotipo *H*. aff. *nuda* 2), HFBC (morfotipo *H*. *fluminensis*), HRODSM e HRODOB (morfotipo *H*. cf. *rodriguesii* 1).

No teste de Mantel, o índice de correlação foi baixo (0,177) na combinação das variáveis e o p-valor foi 0,097. Sendo assim, pode-se considerar que não existe correlação positiva entre a distância geográfica e a distância genética das populações analisadas.

### *3.32 - Morfotipos: H*. cf. *rodriguesii* 1 e *H*. cf. *rodriguesii* 2

De acordo com a análise bayesiana da estrutura populacional, o morfotipo *H*. cf. *rodriguesii* 1 (HRODSM e HRODOB) e o morfotipo *H*. cf. *rodriguesii* 2 (HRODII) pertencem a agrupamentos genéticos diferentes (Figura 7). Na análise de agrupamento utilizando a matriz de distância de Cavalli-Sforza as duas populações do morfotipo *H*. cf. *rodriguesii* 1 ficaram na base, não fazendo parte do grande agrupamento formado pelos morfotipos associados aos táxons *H*. *nuda*, *H*. *setacea* e *H*. *rolfeana* (Figura 8). Segundo a mesma análise, o morfotipo *H*. cf. *rodriguesii* 2 localizou-se dentro do grande grupo formado pelos morfotipos associados aos táxons *H*. *nuda*, *H*. *setacea* e *H*. *rolfeana,* se agrupando com os morfotipos *H*. aff. *nuda* 3 (HNUIII) e *H*. *rolfeana* 1 (HROI), o que também pode ser observado na Figura 7.

### *3.33 - Morfotipo: H. fluminensis*

Segundo a análise bayesiana sobre a estrutura populacional o morfotipo *H. fluminensis* (HFBC) pertence ao mesmo agrupamento dos morfotipos *H*. cf. *rodriguesii* 1 e *H*. aff. *nuda* 2 (Figura 7).

Na análise de agrupamento utilizando a matriz de distância de Cavalli-Sforza o morfotipo *H. fluminensis* (HFBC) também se apresenta na base do agrupamento, juntamente

com *H*. cf. *rodriguesii* 1, também não fazendo parte do grande agrupamento formado pelos morfotipos associados aos táxons *H*. *nuda*, *H*. *setacea* e *H*. *rolfeana* (Figura 8).

*3.34 - Morfotipos: H*. cf. *rolfeana* e *H*. *setacea*

De acordo com a análise bayesiana sobre a estrutura populacional e a análise de agrupamento baseado na matriz de distância de Cavalli-Sforza os morfotipos de *H*. *setacea* (HSEITA e HSERP) e o morfotipo *H*. *rolfeana* 2 (HROII) pertencem ao mesmo grupo (Figura 7 e 8), o que corrobora os resultados da morfometria. As mesmas análises mostram que o morfotipo *H*. *rolfeana* 1 (HROI) pertence a outro grupo genético.

Segundo a análise de agrupamento que usa a matriz de distância de Cavalli-Sforza os morfotipos *H*. *setacea* (HSEITA e HSERP) e *H*. *rolfeana* 2 se apresentam em um grupo enquanto *H*. *rolfeana* 1 (HROI) se apresenta agrupado com os morfotipos *H*. aff. *nuda* 3 (HNUIII) e *H*. cf. *rodriguesii* 2 (HRODII).

*3.35 - Morfotipos associados a H*. *nuda: H*. aff. *nuda* 1, 2, 3 e *H*. *nuda* var. *pygmaea*

De acordo com a análise bayesiana o morfotipo *H*. *nuda* var. *pygmaea* (HNUPSC e HNUPBSB) se apresentou como um grupo genético distinto (Figura 7) e na análise de agrupamento com a matriz de Cavalli-Sforza as populações deste morfotipo se agruparam com *H*. aff. *nuda* 1.

Os morfotipos *H*. aff. *nuda* 1 (HNUI) e 3 (HNUIII) apresentaram uma mistura gênica na análise bayesiana e não foi possível posicioná-los em nenhum agrupamento genético, provavelmente em decorrência da pequena amostragem utilizada para ambos nesta análise. Na análise de agrupamento (Figura 8) *H*. aff. *nuda* 3 se apresenta no mesmo grupo de *H*. *rolfeana* 1 (HROI) e *H*. cf. *rodriguesii* 2 (HRODII), enquanto *H*. aff. *nuda* 1. (HNUI) se agrupa com *H*. *nuda* var. *pygmaea* (HNUPSC e HNUPBSB).

Segundo a análise bayesiana *H*. aff. *nuda* 2 (HNUII) pertence ao agrupamento genético compartilhado com os morfotipos *H*. cf. *rodriguesii* 1 e *H*. *fluminensis*. Na análise de agrupamento agrupamento (Figura 8) este morfotipo se localiza entre o maior agrupamento interno e os morfotipos *H*. cf. *rodriguesii* 1 e *H*. *fluminensis*.

Tabela 3 – Caracterização das regiões sequenciadas para a análise filogenética e os modelos escolhidos pelo critério de BIC para cada partição utilizada na análise filogenética bayesiana. O total representa os dados para as quatro partições concatenadas. N = tamanho da sequência em pares de base; Pi = número de caracteres parcimoniosamente informativos; C=comprimento total das árvores mais parcimoniosas; IC= índice de consistência; IR= índice de retenção; Modelo= modelos usados na análise bayesiana. Os *gaps* foram tratados como dados faltantes.

| Região | N | Pi | C | IC | IR | Modelo |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ITS | 745 | 195 | 560 | 0,70 | 0,82 | GTR+G |
| *matK-trnK* | 2031 | 158 | 551 | 0,76 | 0,88 | GTR+G |
| *rps16-trnK* | 1023 | 132 | 451 | 0,70 | 0,84 | GTR + I + G |
| Total | 3801 | 485 | 1653 | 0,68 | 0,82 | - |

Tabela 4 - Estatística descritiva para os 19 caracteres morfológicos medidos para as análises morfométricas de 13 populações analisadas. Os valores apresentados são: média±desvio padrão (mínimo–máximo) por população. Os valores estão apresentados em milímetros.

| Populações | 1.Comprimento folha | 2.Largura folha | 3.Comprimento bráctea basal | 4.Comprimento sépala dorsal | 5.Largura sépala dorsal | 6.Comprimento sépala lateral |
|---|---|---|---|---|---|---|
| HRODSM | 108,1±22,7 (72,8-151,5) | 6,3±1,6 (4,7-9,1) | 31,6±10,7 (22,9-57) | 12,4±1,2 (9,8-13,9) | 7,9±0,5 (7,1-8,7) | 12,5±1,4 (9,5-14,2) |
| HRODOB | 124,4±32,6 (70,4-187,6) | 7,5±1,6 (5,4-9,7) | 30,2±7,9 (16,9-43) | 12,9±1 (11,7-14,9) | 8,8±1,1 (7,2-11,2) | 14±1,3 (12-16) |
| HNUII | 107,5±27,8 (70,7-176,7) | 6,9±1 (5,5-8,7) | 20±8,4 (9,9-43,7) | 9±0,8 (7,6-9,9) | 6,6±0,6 (5,7-7,8) | 10,3±1,3 (8,1-12,6) |
| HNUI | 80,7±20,6 (53,7-112,9) | 15,6±3,8 (10,5-21,8) | 22,8±6,7 (13,1-33,4) | 10,1±1,4 (8,4-12,4) | 6,2±1,6 (4,5-9,5) | 11,1±1,7 (9-13,4) |
| HFBC | 121,5±28 (88,9-178,6) | 8,2±2,4 (4,7-12,1) | 35,9±4,6 (30,5-45,6) | 11,8±0,9 (10,6-13,7) | 8,1±0,6 (7,1-9,3) | 12,1±1 (10,7-14,3) |
| HNUPSC | 122,5±21,9 (86,1-177,8) | 5,2±0,9 (2,8-6,9) | 26,4±6,8 (19,3-47) | 8,5±0,6 (7-9,6) | 6,5±0,6 (5,1-7,8) | 9,1±0,9 (7,2-11,6) |
| HNUPBSB | 104,4±21,3 (66,9-135,5) | 6,2±1,6 (3,7-8,3) | 28,8±8,5 (11,7-40,6) | 8,4±0,6 (7,4-9,6) | 7±0,6 (6,1-8) | 9,2±0,5 (8,3-9,9) |
| HSEITA | 92,3±30,5 (63,5-170,9) | 4,2±1,1 (2,8-6,7) | 25±5,5 (16,1-34,5) | 5,8±0,6 (4,9-6,9) | 5,2±0,6 (4,6-6,5) | 7,2±1,1 (5,8-9,3) |
| HSERP | 78,8±24,2 (43,4-126,9) | 3,9±0,7 (2-5,2) | 25,8±7 (13,6-38,1) | 4,8±0,6 (4,1-6,1) | 4,6±0,4 (4-5,6) | 6,2±0,5 (5,2-7,5) |
| HROII | 100,7±18,4 (73,6-141,5) | 3,5±0,8 (2,4-4,9) | 24,5±6,5 (14,1-35,7) | 5,9±0,6 (4,9-7) | 6,1±0,6 (4,5-7,1) | 7,8±0,7 (6,1-9,2) |
| HROI | 87,1±24 (41,3-130,2) | 7,2±1,7 (3,4-10,2) | 54,6±18 (25,3-87,4) | 8±0,9 (6,6-9,9) | 6,5±0,6 (5,8-7,6) | 9,4±1 (7,8-11,5) |
| HNUIII | 88,8±14 (70,2-118,6) | 4±1,1 (2,1-5,8) | 45±9,6 (30,9-61,8) | 6,7±0,6 (5,6-7,5) | 5,2±0,5 (4,6-6) | 8,3±0,9 (6,9-10) |
| HRODII | 100±14,3 (80-119,2) | 7,1±1,7 (5,2-9,3) | 38±12,9 (22,7-53,9) | 9,3±0,9 (8,4-10,5) | 4,8±0,6 (4-5,4) | 9,5±1 (8,3-10,5) |

| Populações | 7.Largura sépala lateral | 8.Comprimento segmento posterior pétala | 9.Largura segmento posterior pétala | 10.Comprimento segmento anterior pétala | 11.Comprimento segmento lateral labelo | 12.Comprimento segmento central labelo |
|---|---|---|---|---|---|---|
| HRODSM | 5,5±0,7 (4,7-7,2) | 11,4±1,1 (9,0-12,7) | 3,0±0,4 (2,3-3,9) | 22,92± 3,4 (15,1-26,3) | 21,6± 3,3 (14,8-26,0) | 13,81± 1,3 (11,5-15,4) |
| HRODOB | 6,2±0,8 (5,3-7,8) | 12,0±1,0 (10,6-14,5) | 3,2±0,4 (2,4-4,2) | 27,9±4,0 (20,1-32,8) | 28,2±4,1 (20,3-36,7) | 15,4±1,3 (19,1-13,7) |
| HNUII | 4,0±0,4 (3,2-4,5) | 8,4±0,7 (7,3-9,6) | 1,9±0,4 (1,3-2,3) | 10,9±1,6 (7,8-13,0) | 10,5±1,5 (7,6-13,1) | 9,2±0,9 (8,2-11,13) |
| HNUI | 3,7±1,2 (2,4-6,5) | 8,6±1,0 (6,5-10,6) | 1,9±0,3 (1,4-2,3) | 10,4±3,4 (7,0-10,4) | 10,9±4,6 (7,4-20,0) | 8,6±2,1 (5,4-12,5) |
| HFBC | 4,3±0,3 (3,8-4,9) | 10,6±0,5 (8,9-10,9) | 2,2±0,1 (1,9-2,9) | 14,0±1,0 (12,1-15,7) | 13,8±1,5 (10,7-17,7) | 11,13±1,0 (8,5-13,7) |
| HNUPSC | 3,7±0,4 (2,9-4,7) | 8,1±0,6 (6,8-9,4) | 2,1±0,2 (1,7-2,7) | 12,1±1,4 (9,3-14,3) | 13,1±1,4 (9,7-15,7) | 8,8±1,1 (6,5-10,7) |
| HNUPBSB | 3,8±0,3 (3,3-4,6) | 8,2±0,6 (6,7-9,2) | 2,4±0,3 (2,0-3,2) | 12,7±0,9 (11,0-13,7) | 15,1±1,4 (12,5-17,4) | 8,2±0,6 (7,4-9,5) |
| HSEITA | 2,8±0,4 (2,2-3,4) | 5,3±0,8 (3,9-6,7) | 2,3±0,4 (1,6-3,3) | 14,2±2,0 (11,9-19,18) | 15,0±2,0 (11,9-19,4) | 8,4±0,9 (7,3-10,6) |
| HSERP | 2,5±0,3 (1,9-3,3) | 4,5±0,4 (3,7-5,4) | 2,2±0,2 (1,9-2,6) | 12,6±1,0 (10,1-14,37) | 13,15±1,4 (10,5-15,6) | 6,6±0,6 (5,6-7,7) |
| HROII | 3,7±0,3 (3,0-4,3) | 5,3±0,5 (3,7-6,4) | 2,3±0,2 (1,8-2,8) | 10,6±1,2 (7,9-13,2) | 11,9±1,6 (8,1-14,9) | 8,1±1,0 (6,6-10,2) |
| HROI | 3,6±0,3 (3,0-4,3) | 6,6±1,2 (3,0-8,8) | 2,9±0,3 (2,3-3,4) | 11,1±1,6 (8,3-16,1) | 11,9±1,9 (8,4-17,5) | 9,4±1,3 (7,5-12,0) |
| HNUIII | 3,2±0,6 (1,5-3,9) | 6,4±0,7 (5,5-8,2) | 1,8±0,2 (1,3-2,2) | 12,2±1,8 (9,9-15,5) | 14,7±1,3 (12,4-16,3) | 9,7±1,3 (6,3-11,0) |
| HRODII | 3,9±0,3 (3,5-4,4) | 7,9±0,8 (6,6-8,9) | 2,2±0,3 (2-2,6) | 14,9±2,9 (10,2-17,8) | 17,2±1,8 (15,3-19,5) | 9,9±1,4 (8,2-11,6) |

| Populações | 13.Largura segmento central labelo | 14.Largura porção mediana cálcar | 15.Largura ápice cálcar | 16.Comprimento cálcar | 17.Comprimento coluna | 18.Comprimento antera | 19.Distância viscídios |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HRODSM | 1,73±0,1 (1,4-2) | 1,8±0,2 (1,53-2,28) | 3,1±1,8 (2,4-3,9) | 18,4±2,1 (15,1-20,9) | 6,1±2,1 (15,1-20,9) | 2,9±0,3 (2,2-3,3) | 2,8±0,3 (2,4-3,5) |
| HRODOB | 2,49±0,3 (2-2,9) | 2,2±0,3 (1,6-2,6) | 3,5±0,3 (3,0-4,0) | 19,9±1,3 (17,8-22,1) | 6,6±0,5 (5,8-7,6) | 3,1±0,3 (2,5-3,8) | 2,3±0,3 (1,9-3,06) |
| HNUII | 1,6±0,2 (1,2-2,1) | 1,5±0,2 (1,3-2,1) | 2,0±0,3 (1,5-2,5) | 9,4±0,9 (8,0-11,5) | 4,7±0,4 (4,0-5,3) | 1,7±0,2 (1,3-1,9) | 1,9±0,4 (1,3-2,2) |
| HNUI | 1,4±0,3 (1,1-1,8) | 1,6±0,4 (0,9-2,1) | 1,6±0,4 (0,9-2,4) | 9,2±3,7 (4,9-14,9) | 4,2±0,8 (3,2-5,3) | 2,1±0,1 (1,8-2,3) | 1,7±0,2 (1,4-2,2) |
| HFBC | 2,3±0,3 (1,9-2,9) | 2,0±0,2 (1,5-2,6) | 2,0±0,2 (1,5-2,5) | 19,4±2,6 (14,4-23,2) | 5,9±0,4 (4,7-6,8) | 3,6±0,5 (2,2-4,3) | 2,6±0,2 (2,1-3,1) |
| HNUPSC | 1,8±0,2 (1,5-2,3) | 1,4±0,1 (1,2-2,0) | 2,0±0,4 (1,5-3,0) | 11,0±0,8 (9,3-13,1) | 4,0±0,3 (3,4-4,5) | 1,9±0,2 (1,4-2,3) | 2,2±0,2 (1,8-2,7) |
| HNUPBSB | 2±0,2 (1,6-2,3) | 1,7±0,3 (1,2-2,3) | 2,2±0,3 (1,4-2,6) | 10,3±0,5 (9,6-11,3) | 4,4±0,3 (3,9-5,0) | 2,0±0,2 (1,6-2,4) | 2,3±0,2 (2,0-2,6) |
| HSEITA | 1,6±0,2 (1,1-1,9) | 0,78±0,1 (0,6-0,9) | 0,8±0,1 (0,6-0,9) | 10,9±1,3 (7,8-12,5) | 3,1±0,2 (2,7-3,7) | 1,2±0,1 (1,0-1,4) | 1,4±0,2 (1,2-1,9) |
| HSERP | 1,7±0,2 (1,3-2,1) | 0,72±0,1 (0,5-0,9) | 0,6±0,1 (0,4-0,9) | 9,6±1,0 (7,1-10,9) | 2,8±0,1 (2,5-3,1) | 1,1±0,1 (0,8-1,5) | 1,1±0,2 (0,7-1,4) |
| HROII | 1,9±0,2 (1,4-2,6) | 0,9±0,1 (0,7-1,1) | 0,9±0,1 (0,7-1,2) | 12,0±0,9 (10,1-13,7) | 4,0±0,3 (3,3-4,4) | 1,6±0,2 (1,2-2,2) | 2,2±0,2 (2,0-2,6) |
| HROI | 1,8±0,3 (1,4-2,3) | 1,3±0,3 (0,8-2,0) | 1,7±0,4 (0,9-2,9) | 10,6±1,2 (7,9-12,4) | 4,0±0,4 (3,0-4,8) | 1,7±0,2 (1,3-2,0) | 1,7±0,2 (1,3-2,2) |
| HNUIII | 1,6±0,2 (1,2-1,9) | 1,1±0,25 (0,6-1,4) | 1,7±0,3 (1,1-2,4) | 12,5±0,9 (10,7-13,9) | 5,0±0,6 (4,0-6,0) | 2,2±0,2 (1,8-2,6) | 1,6±0,2 (1,2-1,8) |
| HRODII | 1,9±0,1 (1,7-2,1) | 2,0±0,7 (1-2,8) | 1,8±0,2 (1,5-2,2) | 11,8±1,2 (10-13,3) | 4±0,5 (3,2-4,6) | 1,9±0,2 (1,6-2,2) | 1,3±0,2 (1,1-1,5) |

Tabela 5 - Correlação entre variáveis e eixos significativos (autovalor >1) da análise de discriminates (CVA) de 19 caracteres morfológicos florais e vegetativos de 13 populações analisadas. Para nome das variáveis, verificar tabela 2.

| | Eixo 1 | Eixo 2 | Eixo 3 | Eixo 4 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | -0,04368 | -0,014351 | 0,168429 | 0,351808 |
| 2 | 0,50273 | -0,582300 | -0,146708 | -0,186271 |
| 3 | -0,02110 | -0,009831 | -0,008193 | -0,599869 |
| 4 | -0,39189 | -0,748017 | -0,128507 | 0,060689 |
| 5 | 0,38356 | 0,041801 | 0,531714 | 0,239980 |
| 6 | 0,22529 | -0,063926 | -0,255998 | -0,108629 |
| 7 | -0,45590 | 0,313852 | -0,389531 | 0,307218 |
| 8 | -0,32294 | 0,021280 | -0,058334 | 0,109193 |
| 9 | -0,03203 | 0,141378 | -0,176124 | -0,212323 |
| 10 | -0,36581 | 0,344222 | -0,313771 | 0,291197 |
| 11 | -0,11580 | 0,423326 | -0,318851 | -0,116533 |
| 12 | 0,14068 | -0,026270 | 0,131611 | -0,364532 |
| 13 | 0,01042 | 0,058828 | 0,117110 | 0,226466 |
| 14 | 0,34247 | -0,344914 | 0,009509 | 0,116582 |
| 15 | -0,44947 | 0,089520 | -0,483246 | -0,079610 |
| 16 | -0,31039 | 0,408965 | 0,581069 | -0,448420 |
| 17 | -0,08932 | -0,106943 | 0,194905 | 0,228280 |
| 18 | -0,28068 | -0,260657 | 0,322383 | -0,469291 |
| 19 | -0,12767 | -0,099779 | 0,341223 | 0,459376 |

Tabela 6 - Caracterização dos seis *loci* microssatélites utilizados no estudo de variabilidade genética de 13 populações pertencentes ao complexo *H, nuda*, N = número de indivíduos genotipados; Na = número médio de alelos; *H*o = heterozigosidade média observada; *H*e = heterozigosidade média esperada; AN = frequência média de alelos nulos; Ne = número efetivo de alelos; *F* = índice de fixação; *F*st = coeficiente de endogamia nas subpopulações comparando-as com a população total.

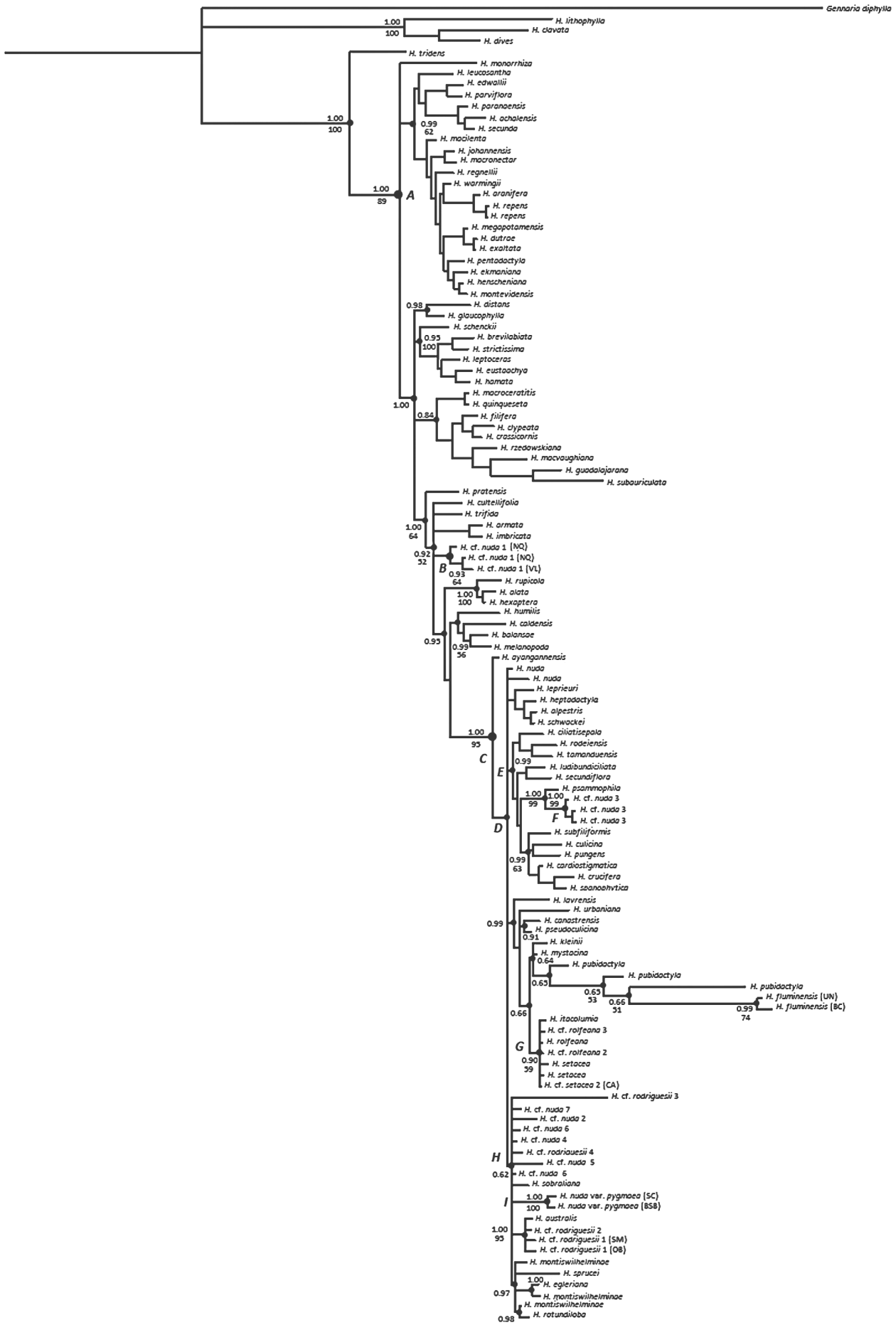
| ***Locus*** | **N** | **Na** | ***Ho*** | ***He*** | **AN** | **Ne** | ***F*** | ***Fst*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SSRHN1B | 290 | 7,077 | 0,679 | 0,720 | 0,021 | 3,979 | 0,045 | 0,190 |
| SSRHN5 | 293 | 8,231 | 0,606 | 0,732 | 0,071 | 4,725 | 0,162 | 0,194 |
| SSRHN8 | 290 | 9,846 | 0,707 | 0,763 | 0,030 | 5,778 | 0,065 | 0,130 |
| SSRHN12 | 290 | 4,538 | 0,740 | 0,619 | -0,075 | 2,725 | -0,202 | 0,144 |
| SSRHN13 | 290 | 6,692 | 0,580 | 0,680 | 0,005 | 3,610 | 0,129 | 0,252 |
| SSRHR17 | 290 | 3,231 | 0,651 | 0,509 | -0,092 | 2,069 | -0,261 | 0,033 |
| Total | - | 6,603 | 0,660 | 0,670 | 0,012 | 3,814 | 0,003 | 0,157 |

Tabela 7 - Diversidade genética das 13 populações estudadas, Na = número médio de alelos para cada população; RA = riqueza alélica; *H*o = heterozigosidade observada média; *H*e = heterozigosidade esperada média; *F*is = índice de fixação médio; AE = número de alelos exclusivos. Valores significativos (p < 0,05) indicam ausência de equilíbrio (* = p < 0,05).

| **População** | **Na** | **RA** | ***Ho*** | ***He*** | **F*is*** | **AE** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *H. aff. nuda* 1 | | | | | | |
| HNUI | 5,500 | 4,043 | 0,633* | 0,707 | 0,156 | 0 |
| *H. aff. nuda* 2 | | | | | | |
| HNUII | 6,667 | 3,883 | 0,611* | 0,687 | 0,134 | 0 |
| *H. aff. nuda* 3 | | | | | | |
| HNUIII | 4,167 | 3,785 | 0,600 | 0,647 | 0,182 | 4 |
| *H. nuda* var. *pygmaea* | | | | | | |
| HNUPBSB | 6,000 | 3,166 | 0,617* | 0,598 | -0,018 | 2 |
| HNUPSC | 4,833 | 3,145 | 0,633* | 0,616 | -0,002 | 0 |
| *H.* cf. *rodriguesii* 1 | | | | | | |
| HRODSM | 7,167 | 3,790 | 0,683 | 0,685 | 0,020 | 5 |
| HRODOB | 6,333 | 3,750 | 0,602* | 0,659 | 0,115 | 0 |
| *H.* cf. *rodriguesii* 2 | | | | | | |
| HRODII | 3,500 | 3,500 | 0,792 | 0,578 | -0,239 | 0 |
| *H.* cf. *fluminesis* | | | | | | |
| HFBC | 6,833 | 3,865 | 0,646* | 0,679 | 0,081 | 1 |
| *H. setacea* | | | | | | |
| HSEITA | 11,500 | 4,327 | 0,739 | 0,734 | 0,011 | 33 |
| HSERP | 6,500 | 3,677 | 0,698 | 0,698 | 0,011 | 2 |
| *H. rolfeana* 1 | | | | | | |
| HROI | 10,167 | 4,330 | 0,614 | 0,744 | 0,188 | 11 |
| *H.* cf. *rolfeana* 2 | | | | | | |
| HROII | 6,667 | 3,788 | 0,717* | 0,685 | -0,025 | 2 |

Tabela 8 - Análise da Variância Molecular (AMOVA) média para seis *loci* microssatélites em diferentes níveis hierárquicos, considerando-se os cinco grupos morfológicos (táxons) envolvidos e os quatro grupos genéticos resultantes da análise bayesiana de estruturação genética a partir do programa Structure. FCT = diferenciação genética entre grupos em relação ao total; FSC = diferenciação genética entre populações dentro dos grupos; FST = diferenciação genética entre populações em relação ao total.

| Fonte de variação | Variação (%) | Estatística F | P |
|---|---|---|---|
| *Grupos morfológicos* | | | |
| Entre 5 (grupos) táxons | 5,50 | FCT=0,05502 | <0,001 |
| Entre populações do mesmo grupo | 9,30 | FSC= 0,09841 | <0,001 |
| Dentro das populações | 85,20 | FST =0,14802 | <0,001 |
| *Grupos genéticos* | | | |
| Entre 4 grupos genéticos | 8,28 | FCT= 0,08276 | <0,001 |
| Entre populações do mesmo grupo | 7,08 | FSC= 0,07723 | <0,001 |
| Dentro das populações | 84,64 | FST =0,15360 | <0,001 |


Gennaria diphylla
H. lithophylla
H. clavata
H. dives
H. tridens
H. monorrhiza
H. leucosantha
H. edwallii
H. parviflora
H. paranaensis
H. ochalensis
H. secunda
H. macilenta
H. johannensis
H. macronectar
H. regnellii
H. warmingii
H. aranifera
H. repens
H. repens
H. megapotamensis
H. autroe
H. exaltata
H. pentadactyla
H. ekmaniana
H. henscheniana
H. montevidensis
H. distans
H. glaucophylla
H. schenckii
H. brevilabiata
H. strictissima
H. leptoceras
H. eustachya
H. hamata
H. macroceratitis
H. quinqueseta
H. filifera
H. clypeata
H. crassicornis
H. rzedowskiana
H. macvaughiana
H. guadalajarana
H. subauriculata
H. pratensis
H. cultellifolia
H. trifida
H. armata
H. imbricata
H. cf. nuda 1 (NQ)
H. cf. nuda 1 (NQ)
H. cf. nuda 1 (VL)
H. rupicola
H. alata
H. hexaptera
H. humilis
H. caldensis
H. balansae
H. melanopoda
H. ayangannensis
H. nuda
H. nuda
H. leprieuri
H. heptadactyla
H. alpestris
H. schwackei
H. ciliatisepala
H. rodeiensis
H. tamandauensis
H. ludibundaciliata
H. secundiflora
H. psammophila
H. cf. nuda 3
H. cf. nuda 3
H. cf. nuda 3
H. subfiliformis
H. culicina
H. pungens
H. cardiostigmatica
H. crucifera
H. spanosthyca
H. lavrensis
H. urbaniana
H. canastrensis
H. pseudoculicina
H. kleinii
H. mystacina
H. pubidactyla
H. pubidactyla
H. pubidactyla
H. fluminensis (UN)
H. fluminensis (BC)
H. itacolumia
H. cf. rolfeana 3
H. rolfeana
H. cf. rolfeana 2
H. setacea
H. setacea
H. cf. setacea 2 (CA)
H. cf. rodriguesii 3
H. cf. nuda 7
H. cf. nuda 2
H. cf. nuda 6
H. cf. nuda 4
H. cf. rodriguesii 4
H. cf. nuda 5
H. cf. nuda 6
H. sobraliana
H. nuda var. pygmaea (SC)
H. nuda var. pygmaea (BSB)
H. australis
H. cf. rodriguesii 2
H. cf. rodriguesii 1 (SM)
H. cf. rodriguesii 1 (OB)
H. montiswilhelminae
H. sprucei
H. egleriana
H. montiswilhelminae
H. montiswilhelminae
H. rotundiloba
A
B
C
D
E
F
G
H
I
0.01

-> Figura 3 - Consenso de maioria obtido da análise filogenética bayesiana das espécies de *Habenaria*, com ênfase no clado que compreende o complexo *Habenaria nuda.* Os valores acima dos ramos indicam a probabilidade posterior dos clados. Os valores abaixo dos ramos correspondem ao suporte de *bootstrap* e os abaixo dos ramos correspondem ao consenso estrito da análise de parcimônia.

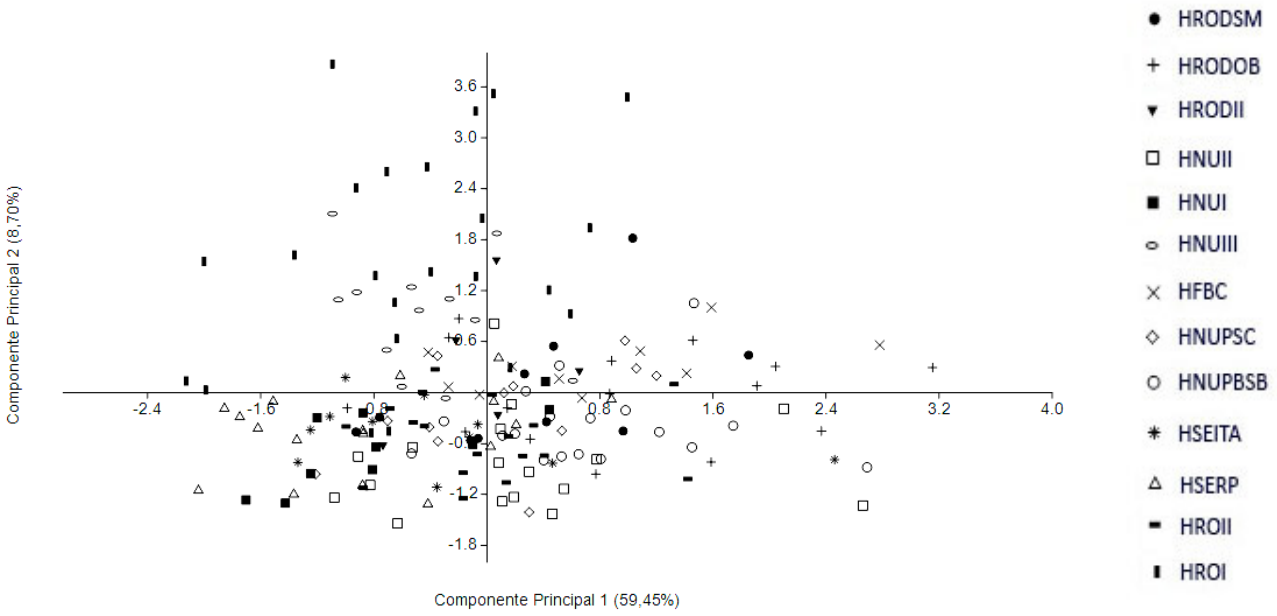



Figura 4 - Representações dos escores nos eixos 1 e 2 da PCA de 19 caracteres florais e vegetativos de 13 populações estudadas. Para nome das populações, ver tabela 1.

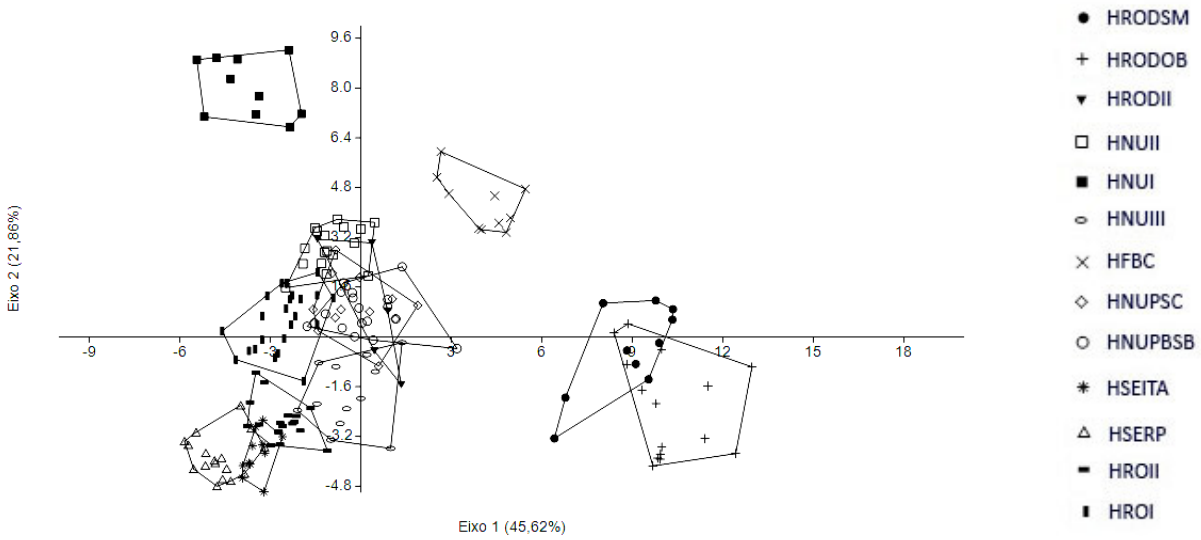



Figura 5 - Representação dos escores nos eixos 1 e 2 da CVA de 19 caracteres florais e vegetativos de populações estudadas. Para nome das populações, ver tabela 1

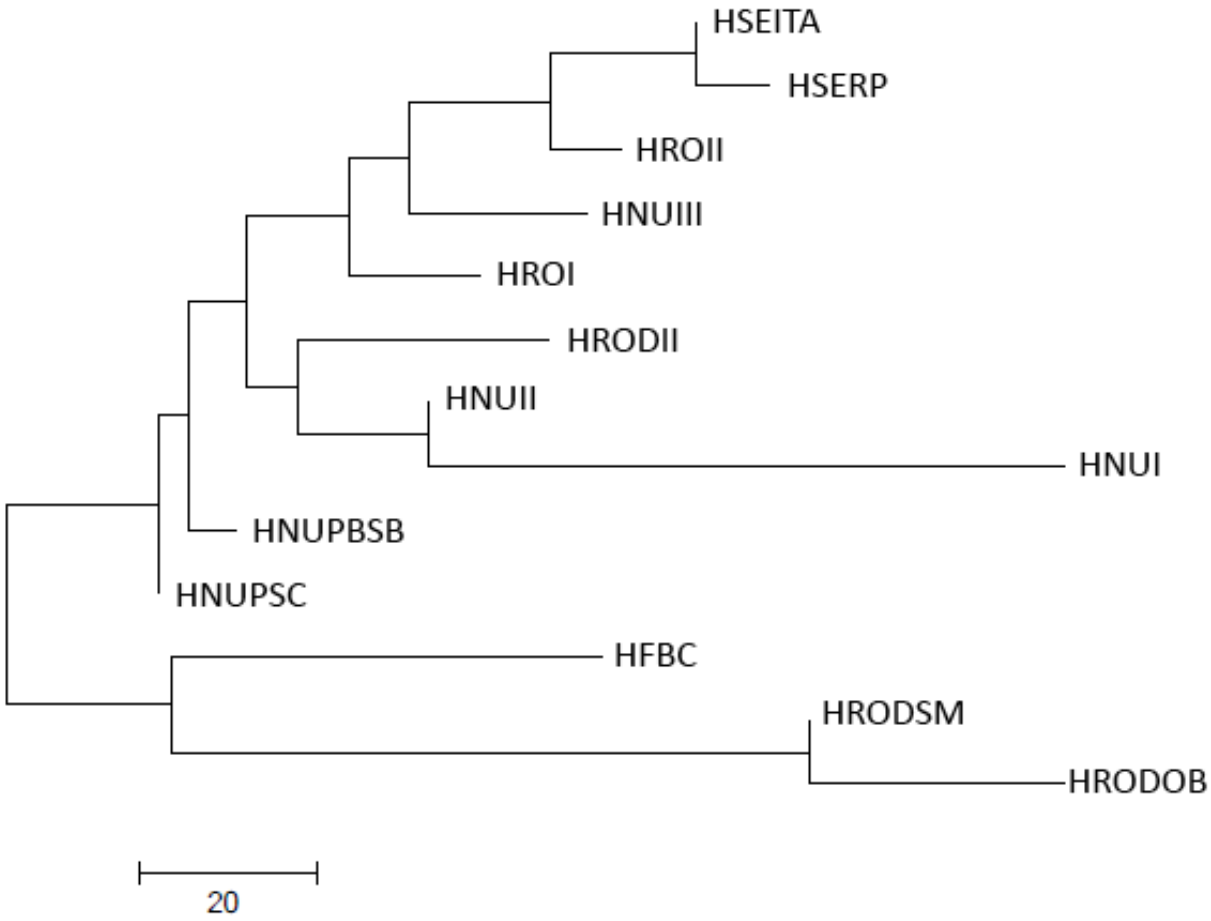



Figura 6 - Relações fenéticas entre 13 populações analisadas utilizando a matriz a distância quadrada de Mahalanobis entre os centroides, baseado em 19 caracteres morfológicos florais e vegetativos. Para nome das populações, ver tabela 1.

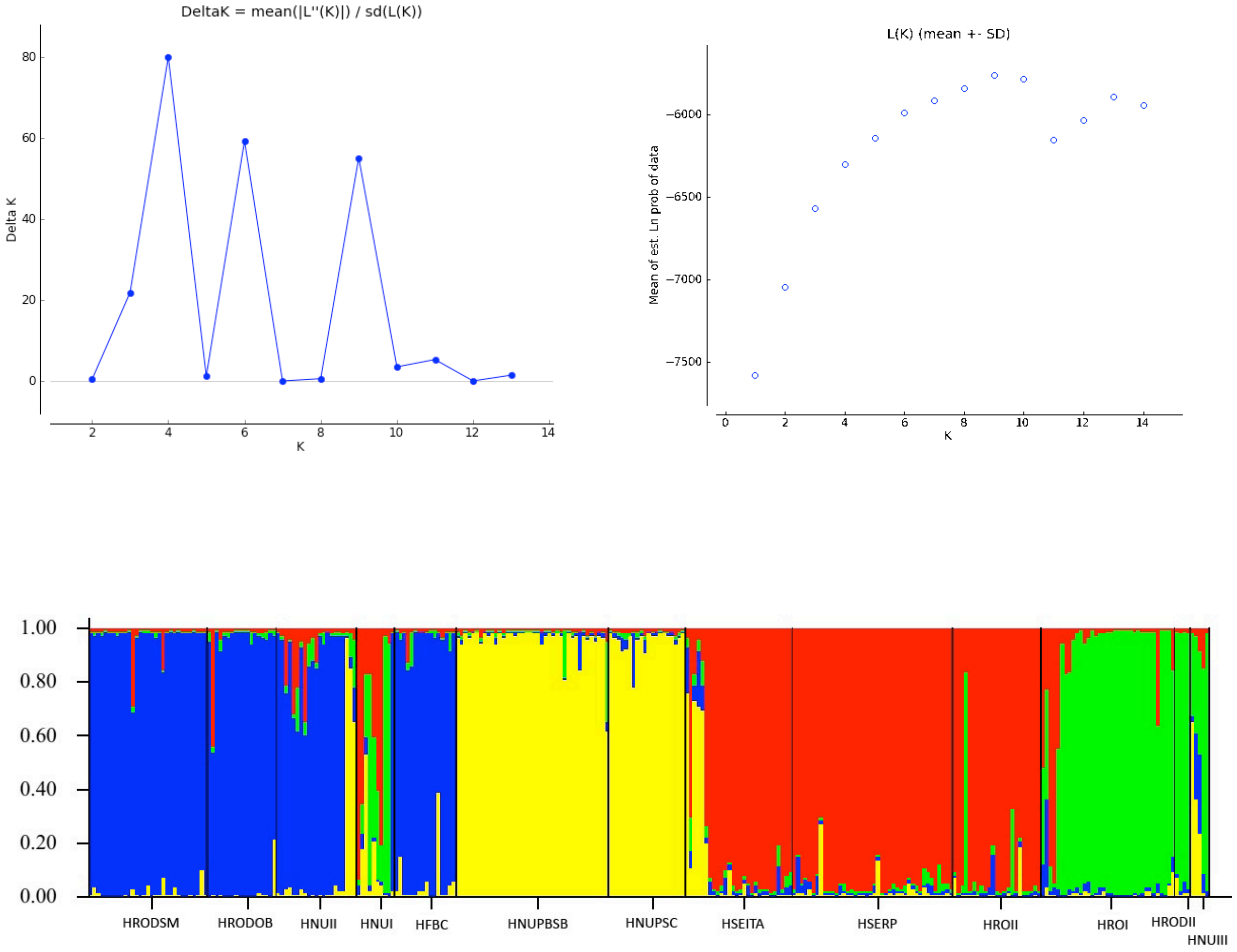



Figura 7 - Análise Bayesiana de atribuição genética de 293 indivíduos analisados neste trabalho, distribuídos em 13 populações, a partir de seis *loci* de marcadores microssatélites. A. Gráfico de $\Delta K$ (Ln"(*K*)/desvio padrão de LnP(*K*); onde *K*=número de grupos genéticos). B. Gráfico de Ln(*K*) (média±desvio padrão). C. Saída gráfica do programa Structure representando os quatro 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.

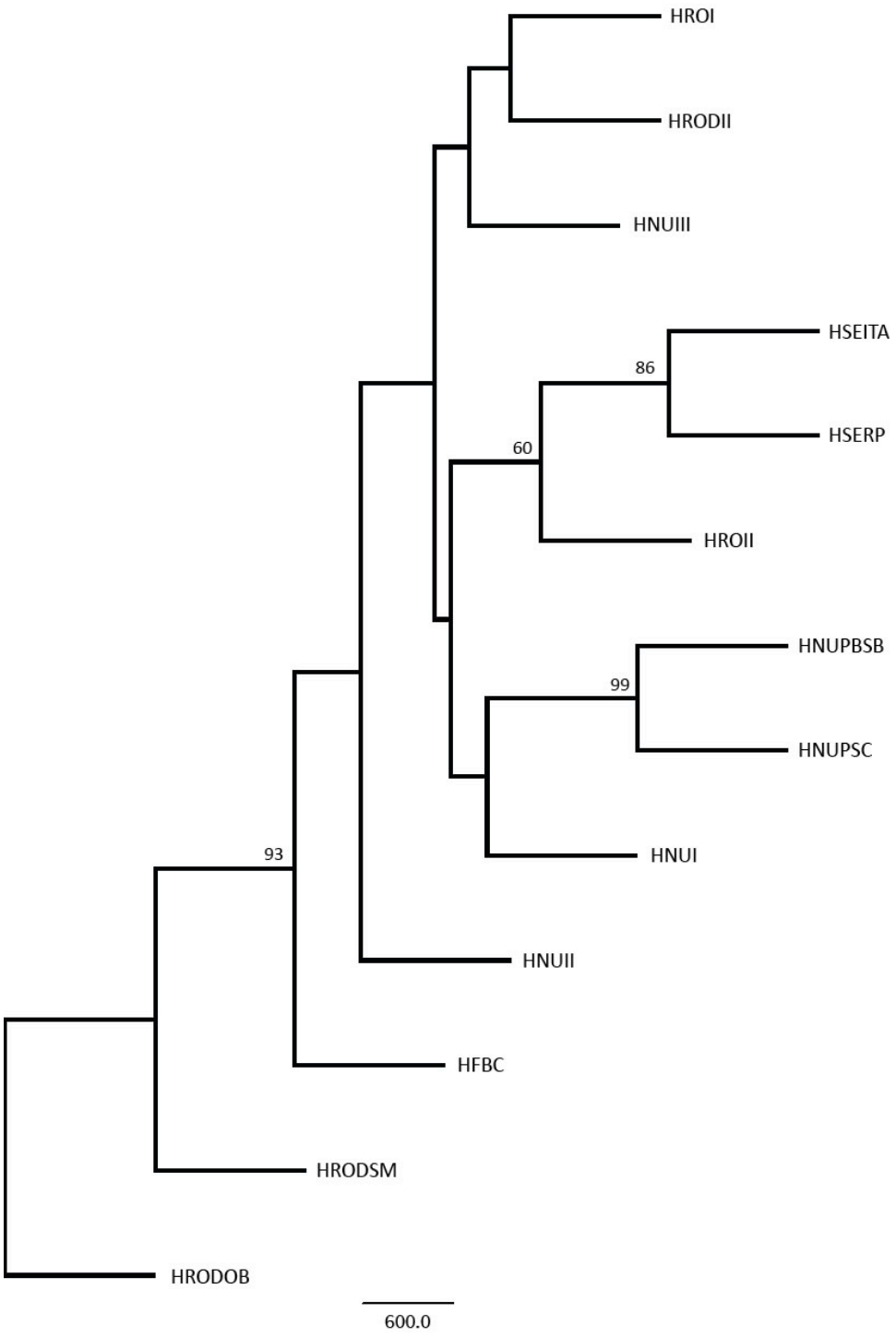



Figura 8. Relações fenéticas entre 13 populações analisadas, baseadas na matriz de distância de Cavalli-Sforza construída a partir da genotipagem de seis marcadores microssatélites, utilizando *Neighbor-joining* como algoritmo de agrupamento. Os valores nos ramos indicam o suporte *bootstrap*. Valores menores que 50 não foram representados. Para nome das populações, ver tabela 1.

## 4. Discussão

### *4.1 Análise filogenética*

Embora a análise filogenética realizada no presente trabalho tenha contado com um número maior de marcadores em relação à filogenia de Batista et al. (2013) em relação ao clado abordado neste trabalho, as relações entre muitos táxons relacionados ao complexo *Habenaria nuda* ainda se apresentaram mal resolvidas.

Um resultado que pode ser considerado relevante é o morfotipo *H*. aff. *nuda* 1 se apresentar na árvore filogenética (Figura 4) em um clado (*B*) que está fora do clado correspondente à seção *Nudae* (*C*). Tal morfotipo apresenta características interessantes do ponto de vista morfológico em relação aos táxons contidos no complexo *H. nuda*. O morfotipo *H*. aff. *nuda* 1 é considerado relacionado à *H. nuda* por apresentar flores com a morfologia semelhante às espécies do complexo, como flores verdes, medianas a grandes, segmentos laterais das pétalas e do labelo eretos, linear-filiformes e longos. Entretanto, este morfotipo apresenta características vegetativas discrepantes em relação às outras espécies do complexo, apresentando folhas mais largas, em maior número e patentes em relação ao caule. Tais características vegetativas observadas podem estar relacionadas à convergência. O táxon *H*. aff. *nuda* 1 foi abordado nas análises de variabilidade genética e morfométrica e será discutido abaixo.

Outro morfotipo que também se apresentou em um agrupamento interessante foi o *H*. aff. *nuda* 3, que apresenta características morfológicas distintas dos demais morfotipos, como os segmentos laterais do labelo totalmente eretos, o segmento mediano reflexo e os braços do rostelo encurvados para cima. O morfotipo *H*. aff. *nuda* 3 também foi abordado nas outras análises e será discutido a seguir.

Por meio da análise filogenética não foi possível inferir as relações entre os morfotipos relacionados aos táxons *H. setacea* e *H. rolfeana*, assim como na filogenia de Batista et al. (2013). Alguns representantes desses morfotipos também foram analisados nas outras análises realizadas neste trabalho e serão discutidos abaixo.

Os representantes dos morfotipos relacionados ao táxon *H. rodriguesii* também apresentaram diferentes cenários entre si dentro da filogenia. Os morfotipos *H*. cf. *rodriguesii* 1 e *H*. aff. *rodriguesii* 2 se agruparam com alto suporte, juntamente com *H. australis*. Os três táxons em questão têm em comum a pétala anterior inserida acima da base da posterior. Os outros dois morfotipos relacionados à *H. rodriguesii*: *H*. aff. *rodriguesii* 3 e *H*. aff. *rodriguesii*

4 se apresentaram em uma politomia, fora deste subclado. O morfotipo *H*. aff. *rodriguesii* 4, diferentemente dos outros morfotipos supracitados, não apresenta a característica da pétala anterior estar inserida acima da base da posterior. Alguns representantes desses morfotipos também foram analisados e serão discutidos a seguir.

### *4.2 Análises variabilidade genética e morfométrica*

#### *4.21 – Todos os morfotipos*

Na análise bayesiana realizada para inferir sobre a estrutura populacional das 13 populações analisadas (cinco espécies, 10 morfotipos), estas se encontram divididas em quatro agrupamentos genéticos (Figura 8). As AMOVAs realizadas tanto entre os quatro grupos genéticos ($F_{st}$= 0,14) quanto entre as populações pertencentes aos cinco táxons ($F_{st}$= 0,15) em questão indicaram que a estruturação genética entre as populações se encontra na média (Tabela 8) para a família Orchidaceae segundo Phillips et al. (2012). Os valores estão um pouco acima dos valores encontrados para orquídeas do gênero *Ophrys* ($F_{st}$= 0,06) de acordo com Soliva e Widmer (2003) e também no gênero *Caladenia* ($F_{st}$= 0,03) segundo Peakall e Beattie (1996). Os valores estão um pouco abaixo dos encontrados para outras espécies dentro da família, como *e.g*., em alguns táxons do gênero *Serapias* ($F_{st}$= 0,26) de acordo com Pellegrino et al. (2006).

As análises AMOVAs realizadas neste trabalho também revelam que a maior parte da variância é intrapopulacional, resultado também encontrado para *Ophrys* por Soliva e Widmer (2003). De acordo com o teste de Mantel praticamente inexiste correlação entre a distância geográfica e a distância genética, já que o índice de correlação foi muito baixo. Phillips et al. (2012) comentam sobre evidências de que orquídeas, comparadas a táxons pertencentes a outras famílias, em geral, possuem os valores de $F_{st}$ oscilando em torno de 0,146, sendo portanto caracterizadas por apresentarem baixos níveis de diferenciação genética entre as populações. De acordo com Soliva e Widmer (2003) a fraca diferenciação genética entre populações de espécies do gênero *Ophrys* que estão próximas entre si pode ser atribuída ao comportamento do polinizador. Segundo Widmer et al. (2000) as abelhas que carregam os polinários recolhidos de populações *Ophrys* podem carregar os polinários entre populações distantes umas das outras, portanto, esses polinizadores promovem o fluxo gênico a grandes distâncias geográficas. *Ophrys* é um gênero rico em espécies e algumas apresentam um

sistema altamente elaborado de polinização, conhecido como "pseudocópula" (Kullenberg, 1961), pois são espécies conhecidas por não recompensarem os polinizadores, e Westrich (1990) comenta que tais polinizadores são importantes na realização do fluxo gênico a longa distâncias. As espécies do gênero *Habenaria,* entretanto, podem ser classificadas como "recompensadoras" pois a maioria das espécies dentro do gênero produzem néctar e o acumulam na parte mais dilatada do cálcar (Galleto et al., 1997).

Estudos sobre polinização realizados no gênero *Habenaria* relatam o evento de polinização sendo realizado por mariposas esfingídeas em *H. gourlieana*, por mariposas Noctuid e Arctiidae em *H. paleiophylla* e pelas Noctuid em *H. hexaptera*, e nesses casos os polinizadores carregaram os polinários nos olhos (Singer e Cocucci, 1997; Singer et al., 2007). Os autores Singer et al. (2007) relataram a observação de que algumas mariposas tentaram remover os polinários dos olhos, o que deve indicar que os polinários podem de alguma forma perturbar o comportamento normal dos insetos, e este fato aliado a outros discutidos pelos autores levaram os mesmos a sugerirem que o fluxo de pólen a longas distâncias possa ser comprometido.

Como já comentado o fluxo gênico pode ser realizado pelo fluxo de pólen por meio dos polinizadores. Soliva e Widmer (2003) comentam que além do fluxo de pólen, o fluxo gênico por meio de sementes pode ser altamente eficaz nas orquídeas, pois, milhares de pequenas sementes podem ser dispersadas pelo vento e tal evento pode influenciar na redução na diferenciação genética entre populações. Os mesmos autores sugerem que o fluxo gênico em escala local possa ser atribuído ao fluxo de pólen mediado pelos polinizadores e ao fluxo de sementes mediado pelo vento, enquanto o fluxo gênico em escala regional ocorra, provavelmente por meio de sementes.

Soliva e Widmer (2003) relatam que todas as populações simpátricas de *Ophrys* analisadas apresentaram períodos de floração sobrepostos os quais foram oportunos para cruzamentos interespecíficos e formação de híbridos. A ocorrência de hibridação é considerada comum na família Orchidaceae (Dressler, 1993) e deve ser futuramente investigada no gênero *Habenaria*, como por exemplo, entre esses morfotipos *H. fluminensis* (Barão de Cocais – MG), *H.* cf. *rodriguesii* 1 (Moeda – MG) e *H.* aff. *nuda* 2 (Catas Altas – MG), que ocorrem na mesma área geográfica e possuem o mesmo período de floração, fato que talvez possa ser explicado pelo fluxo gênico entre tais táxons.

Outra hipótese para tal agrupamento entre os táxons supracitados seria que as populações dos mesmos possam estar em uma fase inicial de especiação, na qual as

populações apresentam alelos em comuns entre elas, e portanto, pouca variação entre as mesmas, as quais apresentam um valor de $F_{st}$ baixo. A hipótese de uma recente divergência entre espécies pode ser inferida por meio da similaridade entre as sequências de DNA das mesmas (Soliva et al., 2001). As sequências dos táxons em questão foram utilizadas na análise filogenética de Batista et al. (2013) e também na filogenia apresentada neste trabalho, as quais apresentaram os táxons agrupados com relações de parentesco mal resolvidas, como já comentado anteriormente.

*4.22 – Morfotipos: H.* cf. *rodriguesii* 1 e *H.* cf. *rodriguesii* 2

Os resultados obtidos por meio da análise morfométrica foram corroborados pelos resultados da análise de variabilidade genética, que indicam que os morfotipos *H.* cf. *rodriguesii* 1 e 2 sejam táxons diferentes entre si. Tais morfotipos eram frequentemente confundidos e determinados como *H. nasuta* por possuírem folhas lineares, segmentos anteriores da pétala lineares e longos e terem um porte bem parecido entre si. Porém, além das evidências mostradas pelas análises de variabilidade genética e morfométrica, características morfológicas como porte pequeno e flores pequenas, segmento posterior da pétala aderente à sépala dorsal, conectivo estreito, aurículos pouco desenvolvidos e estigma sem apêndices presentes em *H.* cf. *rodriguesii* 2 (HRODII) diferenciam a mesma do morfotipo *H.* cf. *rodriguesii* 1 (HRODSM e HRODOB) (v. Cap.4).

Nas análises morfométricas apenas caracteres quantitativos foram mensurados, e caracteres importantes para a determinação de espécies em *Habenaria* como, *e.g.*, a disposição espacial das peças florais, a divisão acima ou na base entre os segmentos das pétalas e a projeção do rostelo não foram considerados. Após a realização das análises supracitadas e o direcionamento dado por elas, foi realizado um estudo mais detalhado de caracteres não abordados pela morfometria aliados a outros caracteres também relevantes, e juntamente com uma pesquisa bibliográfica relacionada ao histórico dos táxons em questão foi possível concluir que *H.* cf. *rodriguesii* 1 (HRODSM e HRODOB), até então tratado como *H. nasuta* por alguns taxonomistas, é na verdade *H. rodriguesii* Cogn. (v. Cap.4). e que *H.* cf. *rodriguesii* 2 (HRODII) é outra espécie.

Nas análises de variabilidade morfométrica o morfotipo *H.* cf. *rodriguesii* 2 (HRODII - Faz. Sucupira - DF) se apresentou mais relacionado aos morfotipos *H.* aff. *nuda* 1 (Alto Paraíso de Goiás - GO) e *H.* aff. *nuda* 2 (Catas Altas - MG), e de acordo com as análises de

variabilidade genética o mesmo está mais relacionado a *H. rolfeana* 1 na análise bayesiana, enquanto na análise de agrupamento utilizando a matriz a distância quadrada de Mahalanobis o morfotipo *H.* cf. *rodriguesii* 2 está mais relacionado a *H. rolfeana* 1 e *H.* aff. *nuda* 3. Ao comparar as análises supracitadas, o morfotipo *H.* cf. *rodriguesii* 2 não apresentou relações consistentes nas diferentes análises, e embora alguns caracteres morfológicos se apresentem relativamente distintos entre esse morfotipos e os demais em questão, neste trabalho sugerimos que mais análises devem ser realizadas a fim de melhorar as relações entre esse táxon e outros próximos.

*4.23 – Morfotipo: H. fluminensis*

Nas análises de variabilidade morfométrica foi possível observar que o morfotipo *H. fluminensis* (Barão de Cocais - MG) se apresentou claramente isolado dos demais. Já segundo as análises de variabilidade genética o morfotipo pertence ao mesmo agrupamento dos morfotipos *H.* cf. *rodriguesii* 1 (Moeda - MG) e *H.* aff. *nuda* 2 (Catas Altas - MG), com os quais compartilha a mesma área geográfica e o mesmo período de floração. Como mencionado no tópico 4.21 existem no mínimo duas hipóteses para tal agrupamento genético i) a ocorrência de cruzamentos interespecíficos entre tais populações ou ii) as populações estarem em uma fase inicial de especiação. Outra evidência que pode facilitar a ocorrência de cruzamentos interespecíficos entre *H. fluminensis* (Barão de Cocais – MG), *H.* cf. *rodriguesii* 1 (Moeda - MG) e *H.* aff. *nuda* 2 (Catas Altas - MG) é a presença do mesmo número cromossômico 2n=42 encontrado em *H.* cf. *rodriguesii* 1 e *H. fluminensis* (v. Cap. 1).

Os caracteres que influenciaram os eixos na análise de CVA, como os que envolvem a largura da folha, o comprimento da sépala dorsal e o comprimento do segmento lateral do labelo, foram importantes para separar *H. fluminensis* dos morfotipos *H. cf. rodriguesii* 1 e *H.* aff. *nuda* 2. Além de tais caracteres, características morfológicas importantes que não foram consideradas nas análises morfométricas podem ser utilizadas para separar *H. fluminensis* dos morfotipos supracitados.

*4.24 – Morfotipos: H.* cf. *rolfeana* e *H. setacea*

Os táxons *H. rolfeana* e *H. setacea* estão representados nas análises de variabilidade genética e morfológica por quatro populações, incluindo as populações-tipo das espécies em

questão. As populações apresentaram características morfológicas intermediárias e contínuas, desde plantas de maior porte e folhas mais largas e não adpressas (*H. rolfeana* 1, HROI – população-tipo de *H. rolfeana*) a plantas de menor porte com folhas estritamente lineares e adpressas (*H. setacea*, HSERP e HSEITA – população-tipo de *H. setacea*). Tais espécimes formam um complexo difícil de ser delimitado, justamente pela variação contínua entre os caracteres apresentados pelas mesmas.

Por meio das análises de CVA e da análise bayesiana foi possível observar um agrupamento entre os morfotipos de *H. setacea* (Santo Antônio do Itambé e Couto de Magalhães de Minas - MG) e o morfotipo *H.* cf. *rolfeana* 2 (Lima Duarte- MG) e a separação do morfotipo *H. rolfeana* (Resende - RJ).

Tanto as análises de morfometria quanto as análises de agrupamento genético separam a população *H. rolfeana* (Resende - RJ) das demais populações *H. setacea* (Santo Antônio do Itambé e Couto de Magalhães de Minas - MG) e *H.* cf. *rolfeana* 2 (Lima Duarte- MG), portanto, as populações foram separadas em dois grupos, um grupo (*H. rolfeana* 1, HROI) e outro (*H. setacea*, HSERP e HSEITA - *H.* cf. *rolfeana* 2, HROII). Neste trabalho levantamos duas hipóteses para tal separação: i) tal evento possa ser explicado pelo baixo fluxo gênico mediado por polinizador e pelo vento (envolvendo as sementes) ou ii) tais populações possam estar em uma fase mais tardia do processo de especiação, no qual as populações apresentam alelos diferentes e já fixados, e consequentemente uma estruturação genética distinta entre as mesmas.

Das populações reunidas em um dos agrupamentos, duas se localizam na Cadeia do Espinhaço, nos Parques Estaduais do Itambé e do Rio Preto (*H. setacea* - HSERP e HSEITA) e uma no Parque Estadual do Ibitipoca. A Cadeia do Espinhaço é conhecida por suas formações quartzíticas e alto endemismo (Benites et al., 2003; Giulietti e Pirani, 1988) e a Serra do Ibitipoca é considerada como um ambiente peculiar na Mantiqueira por apresentar formações quartzíticas, não sendo predominantemente cristalinas (Vasconcelos, 2011), mostrando similaridades florísticas entre essa região e áreas da Serra do Espinhaço (Giulietti e Pirani, 1988).

A população que se mostra praticamente isolada no outro agrupamento genético que se localiza no Planalto do Itatiaia (*H. rolfeana*), que é um ambiente conhecido por possuir características peculiares e um alto endemismo (Brade, 1956). O mesmo autor, em 1956, reconhece a espécie *H. rolfeana* como endêmica do Planalto do Itatiaia. As diversas variáveis que compõem o ambiente particular no Planalto do Itatiaia podem criar um ambiente distinto e

favorecer os mecanismos de especiação, como pode ser discutido em relação ao alto endemismo encontrado na área. Esse ambiente distinto pode apresentar polinizadores endêmicos, entretanto, não foi possível encontrar na literatura nenhum trabalho sobre grupos endêmicos de insetos que possam estar relacionados à polinização de *Habenaria*. Outro fato importante que pode ser levado em consideração é o favorecimento ou desfavorecimento da germinação de sementes que possivelmente chegam ali. Estudos sobre sementes mostram que muitas delas necessitam de um conjunto de variáveis que favoreçam a sua germinação (Marques et al., 2014). Como o Planalto do Itatiaia apresenta características peculiares, como *e.g*., as formações rochosas distintas encontradas no local (Martinelli, 1989), tais condições podem estar atuando como barreiras, influenciando no baixo fluxo gênico entre os morfotipos.

Após a realização dessas análises neste trabalho sugere-se que o morfotipo (população) *H. rolfeana* 1 (Resende - RJ) seja representante do táxon *H. rolfeana*, já que população tipo desta espécie está neste lugar, estando restrito ao Planalto do Itatiaia e os demais morfotipos analisados neste trabalho (*H. setacea* –HSEITA, HSERP- dos Parques Estaduais do Itambé e do Rio Preto e *H. rolfeana* 2 – HROII – Parque Estadual do Ibitipoca) sejam considerados pertencentes à *H. setacea*, até que análises posteriores sejam realizadas a fim de ajudar a elucidar melhor estas relações.

*4.25 – Morfotipos associados a H. nuda: H.* aff. *nuda* 1, 2, 3 e *H. nuda* var. *pygmaea*

Por meio da análise de CVA não foi possível separar os morfotipos *H.* aff. *nuda* 2 (Catas Altas - MG), *H. nuda* var. *pygmaea* (Brasília - DF e Buenópolis - MG) e *H.* aff. *nuda* 3 (Alto Paraíso de Goiás - GO), embora este último tenha se apresentado um pouco mais distante dos demais no gráfico (Figura 5). Na análise de agrupamentos utilizando o algoritmo de *Neighbor-joining* e a matriz de Mahalabonis os morfotipos *H.* aff. *nuda* 2 e 3 se mostraram agrupados (Figura 6).

Ainda que o morfotipo *H. nuda* var. *pygmaea* (HNUPSC e HNUPBSB) não se apresente como um grupo totalmente isolado nas análises morfométricas, de acordo com a análise bayesiana o mesmo se apresenta como um grupo genético distinto (Figura 7) e na análise de agrupamento baseada na matriz de distância de Cavalli-Sforza tais populações se apresentaram agrupadas entre si com alto suporte. Como já mencionado, caracteres qualitativos não foram levados em consideração nas análises morfométricas, e tais caracteres são importantes para a diferenciação entre táxons no gênero. Características morfológicas e

fenológicas corroboram o resultado mostrado pela análise bayesiana, tais como plantas de grande porte com folhas totalmente adpressas e uma característica muito relavante é que este morfotipo é o único do complexo que apresenta o período de floração durante o período seco, no inverno. Portanto, o período de floração isola tal morfotipo, sendo uma barreira fenológica e temporal em relação aos outros, dificultando possíveis eventos de fluxo gênico e/ou cruzamentos interespecíficos, fato também comentado no tópico 4.21. Outro importante dado a ser considerado é a posição do morfotipo *H. nuda* var. *pygmaea* na filogenia (Figura 4), em um subclado dentro do clado *F*. Após tais inferências, neste trabalho sugere-se que o morfotipo *H. nuda* var. *pygmaea* deva ser elevado ao nível específico, sendo portanto considerado uma espécie (v. Cap. 4).

Embora na análise bayesiana o morfotipo *H.* aff. *nuda* 1 (HNUI - Alto Paraíso de Goiás - GO) tenha apresentado uma mistura gênica que não possibilitou a classificação do mesmo em nenhum agrupamento genético, nas análises de PCA e CVA o mesmo se apresentou claramente isolado dos demais morfotipos. Tais características, aliadas às diferenças morfológicas como a presença de sépalas perpendiculares, ápice da sépala dorsal mucronado, segmento anterior da pétala bem maior que o segmento posterior, segmentos laterais do labelo perpendiculares separam o morfotipo *H.* aff. *nuda* 1 dos demais morfotipos. Outro importante resultado a ser considerado também é a posição do mesmo na filogenia, no clado *B*, um clado que está fora do clado *C*, como mencionado no tópico 4.1. Baseados nestes resultados, nós sugerimos que este morfotipo seja tratado como uma nova espécie (v. Cap. 4).

Em relação ao morfotipo *H.* aff. *nuda* 3 (HNUIII - Alto Paraíso de Goiás - GO) também apresentou uma mistura gênica que não possibilitou a classificação do mesmo e outro fato importante também a ser considerado é a pequena amostragem utilizada para este morfotipo. Por meio das análises de variabilidade genética e morfológica não é possível inferir nenhuma conclusão, entretanto, a posição do mesmo na análise filogenética (clado *D*) aliada às características morfológicas deste morfotipo (tópico 4.1) nos permite sugerir que este táxon seja tratado como uma espécie nova (v. Cap. 4).

De acordo com a análise bayesiana, *H.* aff. *nuda* 2 (Catas Altas - MG) pertence ao agrupamento genético no qual estão *H.* cf. *rodriguesii* 1 (Moeda - MG) e *H. fluminensis* (Barão de Cocais - MG), e como já mencionado anteriormente, esses três morfotipos em questão compartilham a mesma área geográfica e possivelmente possa haver fluxo gênico entre tais populações ou uma irradiação recente entre eles (tópico 4.1). Por meio da análise de agrupamento utilizando a matriz a distância quadrada de Mahalanobis o morfotipo *H.* aff.

*nuda* 2 está agrupado com *H*. aff. *nuda* 1, e isso se deve possivelmente à largura da folha pois tais morfotipos são plantas de porte médio e bastante folhosas, com folhas lanceoladas e mais largas do que as dos outros morfotipos associados a *H. nuda*, que comumente possuem folhas lineares e mais adpressas. Como nas análises de variabilidade genética o morfotipo *H*. aff. *nuda* 2 está associado a morfotipos com consideráveis diferenças morfológicas e as análises morfométricas não foram úteis para inferências sobre a classificação do mesmo, sugere-se que mais análises sejam realizadas envolvendo este morfotipo, a fim de esclarecer as relações entre ele e os demais táxons.

## 5. Considerações finais

Os resultados obtidos indicam a existência de pelo menos duas espécies novas relacionadas à *H. nuda* e a elevação do táxon *H. nuda* var. *pygmaea* para nível específico. Após a realização das análises supracitadas e o direcionamento dado por elas, foi realizado um estudo mais detalhado de caracteres não abordados pela morfometria e foi possível descobrir qual é o morfotipo representante da espécie *H. rodriguesii*. Neste trabalho sugerimos que mais análises sejam realizadas com os morfotipos *H*. aff. *nuda* 2 e *H*. cf. *rodriguesii* 2 a fim de melhorar a delimitação dos mesmos em relação aos táxons *H. nuda* e *H. rodriguesi*, respectivamente.

## 6. Referências Bibliográficas

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.

Batista JAN, Bianchetti LB. 2003. An overlooked new species of *Habenaria* (Orchidaceae) from Central Brazil. **Novon** 13: 397–402.

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

Batista JAN, Borges KS, Faria MW, 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.

Benites VM, Caiafa AN, Mendonça ES, Schaefer CE, Ker JC. 2003. Solos e vegetação nos complexos rupestres de altitude da Mantiqueira e do Espinhaço. **Floresta e ambiente** 10: 76–85.

Borba EL, Shepherd GJ, van den Berg C, Semir J. 2002. Floral and vegetative morphometry in five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability, and pollination systems. **Annals of Botany** 10: 219–230.

Brade AC. 1956. A flora do Parque Nacional do Itatiaia. **Boletim do Parque Nacional do Itatiaia** 5: 7–85.

Butcher PA, Decroocq S, Gray Y, Moran GF. 2000. Development, inheritance and cross-species amplification of microsatellite markeres from *Acacia mangium*. **Theoretical and Applied Genetics** 101: 1282–1290.

Cain AJ. 1954. *Animal species and their evolution*. New York: Harper & Row.

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

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

Dayrat B. 2005. Towards integrative taxonomy Biological. **Biological Journal of the Linnean Society** 85: 407–415.

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.

Earl DA, von Holdt BM. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources** 4: 359–361.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology** 14: 2611–2620.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics** 1: 47–50.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. **Evolution** 39: 783–791.

Ferreira ME, Grattapaglia D. 1995. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: Embrapa-Cenargen.

Galetto L, Bernardello G, Rivera G. 1997. Nectar, nectaries, flower visitors and breeding systems in five terrestrial Orchidaceae from Central Argentina. **Journal of Plant Research** 110: 393–403.

Giulietti AM, Pirani JR. 1988. Patterns of geographical distribution of some plant species from Espinhaço range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: Vanzolini PE, Heyer WR, eds. *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 39–69.

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

Guo SW, Thompson EA. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics** 48: 361–372.

Hamrick JL, Godt MJW, Murawski DA, Loveless MD. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Falk DA, Holsinger KE, eds. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press, 75–86.

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

Henderson A. 2006. Traditional morphometrics in plant systematics and its role in palm systematics. **Botanical Journal of the Linnean Society 151**: 103–111

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

Kaplan Z, Marhold K. 2012. Multivariate morphometric analysis of the *Potamogeton compressus* group (Potamogetonaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 170: 112–130.

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

Kucera J, Lihová J, Marhold K. 2006. Taxonomy and phylogeography of *Cardamine impatiens* and *C. pectinata* (Brassicaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 152: 169–195.

Kullenberg B. 1961. Studies in *Ophrys* pollination. **Zoologiska bidrag från Uppsala** 34:1–

340.

Lau BL. 2013. **Análise filogenética molecular e biossistemática do complexo *Habenaria repens* Nutt. (Orchidaceae) no Brasil.** Dissertação de Mestrado não publicada. Universidade Federal de Minas Gerais.

Marques AR, Atman APF, Silveira FAO, Lemos-Filho JP. 2014. Are seed germination and ecological breadth associated? Testing the regeneration niche hypothesis with bromeliads in a heterogeneous neotropical montane vegetation. **Plant Ecology** 215: 517-529.

Park SDE. 2001. Trypanotolerance in west african cattle and the population genetic effects of selection. Tese de Doutorado não publicada. Trinity College 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 PE. 2012. GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics** 28: 2537–2539.

Peakall R, Beattie AJ. 1996. Ecological and genetic consequences of pollination by sexual deception in the orchid *Caladenia tentaculata*. **Evolution** 50: 2207–2220.

Pedron M, Buzatto CR, Ramalho AJ, Carvalho BM, Radins JA, Singer RB, Batista JAN. 2014. Molecular phylogenetics and taxonomic revision of *Habenaria* section *Pentadactylae* (Orchidaceae, Orchidinae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 175: 47–73.

Pellegrino G, Noce ME, Bellusci F, Musacchio A. 2006. Reproductive biology and conservation genetics of *Serapias vomerace* (Orchidaceae). **Folia Geobotanica** 41 21–32.

Peres Neto PR. 1995. Introdução a análises morfométricas. In: Peres Neto PR, Valentin JL, Fernandez FAZ, eds. *Oecologia brasiliensis*. *Vol. 2: Tópicos em tratamento de dados biológicos*. Rio de Janeiro: UFRJ, 57-89.

Pessoa EM, Alves M, Alves-Araujo 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. 2007. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. **Nordic Journal of Botany** 25: 129–136.

Pinheiro F, Barros F. 2009. Morphometric analysis of the *Brasiliorchis picta* complex (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Botânica 32:** 11–21.

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

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

Romero MI, Real C. 2005. A morphometric study of three closely related taxa in the European *Isoetes velata* complex. **Botanical Journal of the Linnean Society** 148: 459–464.

Santiago A., Rico E., Herrero A., Santos-Vicente M., Martínez-Ortega M. 2009. Combining traditional morphometrics and molecular markers in cryptic taxa: towards an updated integrative taxonomic treatment for *Veronica* subgenus *Pentasepalae* (Plantaginaceae *sensu* APG II) in the western Mediterranean. **Botanical Journal of the Linnean Society** 159: 68–87.

Schuelke M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology** 18: 233–234.

Singer RB, Cocucci AA. 1997. Eye attached hemipollinaria in the hawkmoth and settling moth pollination of *Habenaria* (Orchidaceae): a study on functional morphology in 5 species from subtropical South America. **Botanica Acta** 110: 328-337.

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., Kocyan A., Widmer A. 2001. Molecular phylogenetics of the sexually deceptive orchid genus *Ophrys* (Orchidaceae) based on nuclear and chloroplast DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 20:78–88.

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

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.

Vasconcelos MF. 2011. O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil? **Revista Brasileira de Botânica** 34: 241–246.

van den Berg C. 1996. Estudo da variabilidade intra e interespecífica em populações de espécies brasileiras de *Cattleya* (Orchidaceae-Laeliinae). Dissertação de Mestrado não publicada. Universidade Estadual de Campinas.

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.

Warghat AR, Bajpai PK, Sood H, Chaurasia OP, Ravi B. 2012. Morphometric analysis of *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don), a critically endangered orchid in cold desert Ladakh region of India. **African Journal of Biotechnology** 11: 11943–11951.

Westrich P. 1990. *Die Wildbienen Baden-Württembergs* (Vol. 2). Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.

Widmer A, Cozzolino S, Pellegrino G, Soliva M, Dafni A. 2000. Molecular analysis of orchid pollinaria and pollinaria remains found on insects. **Molecular Ecology** 9: 1911–1914.

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

## Apêndice

# Development of microsatellite markers in *Habenaria nuda* Lindl. and *H. repens* Nutt. (Orchidaceae) and transferability between these congeneric species

Aline A. do Vale[1], Bruna L. Lau[1], Bárbara S. Santos Leal[2], Karina Proite[1], João A. N. Batista[1] e Eduardo L. Borba[3]

[1] *Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 486, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.*

[2] *Departamento de Botânica, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho, Campus Rio Claro, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil.*

[3] *Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Campus São Bernardo do Campo, CEP 09606-070, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brazil.*

**Abstract**

This study aimed to isolate and characterize a set of microsatellite markers for *Habenaria nuda* and *H. repens* and to test the cross-amplification between these congeneric species. These species constitute two of the many existing complex on the genus *Habenaria*, which is one of the largest terrestrial genera in orchids and the largest of the subtribe Habenariinae, showing a pantropical distribution. A total of nine markers were isolated in both species and characterized in two populations (20 individuals per population) of each one. Some of the markers isolated in one species were successfully cross-amplified in the other. In *H. nuda*, the number of alleles per locus ranged from four to 12 and the mean number of alleles per locus was 6.14 and 6 in each population analyzed. The observed (Ho) and expected (He) heterozygosities within populations varied from 0.294 to 0.850 and from 0.517 to 0.851, respectively. In. *H. repens,* the variation on the number of alleles per locus was four to seven and mean number of alleles per locus was 2.8 and 4 in each population analyzed. The Ho ranged from 0.000 to 0.563 and the He ranged from 0.000 to 0.666. These markers can be highly informative and the polymorphism level found enable them as powerful tools for future population genetics analysis in these and akin species, helping to answer ecological and evolutionary questions.

**Keywords:** Genetic diversity, microsatellite markers, *Habenaria*, SSR, transferability

## 1. Introduction

*Habenaria* Willd. (Orchidaceae, Orchidoideae, Habenariinae) has a pantropical distribution and is one of the largest terrestrial genera in orchids and the biggest of the subtribe Habenariinae. The genus is well distributed in the tropics and subtropics of both the New and Old World, with only a few species extending into temperate zones (Pridgeon et al. 2001), and is especially rich in the Neotropics, Africa and Asia, with 876 estimated species in total (Govaerts et al. 2014). In the Neotropics, Brazil stands out as the richest country, with *ca*. 165-170 taxa (Batista et al. 2011).

The existence of species complexes is a commonplace in plants, very frequent in orchids, and it is many times caused by natural hybridization events (e.g., Stahlberg 2009, Pinheiro et al. 2010). Such events were reported many times in the family, even between species in distinct genera. The crossing between different species followed by introgression can lead to the development of individuals with intermediate morphology, making the taxonomists' work difficult, mainly by blurring the morphological discontinuities between taxa. Notwithstanding, other factors can also lead to species complex formation. Among these, the phenotypic plasticity in response to environment variables is one of the more important factors (Schlichting & Levin 1986), especially of the vegetative features, and the convergence as a response to selective pressure. In orchids, the convergence is frequent, mainly due to casual occurrence of pollinator sharing by divergent lineages of species, due to the high specificity of the morphology adjustment among flowers and their pollinators in the family (Melo & Borba 2011, Salazar et al. 2011).

Two out of many existing complexes in *Habenaria* are constituted by *Habenaria nuda* Lindl., *Habenaria repens* Nutt. and related species. In this work we report the isolation and characterization of new microsatellite markers in *H. nuda* and *H. repens* and also the cross-transferability between them. These markers can be very helpful for evolutionary studies, such as those aiming to delimit complex species, as well as for conservation genetics studies of these and other related orchids.

## 2. Materials and methods

*DNA extraction and development of microsallite markers*

Total DNA was extracted from two individuals separately: *Habenaria nuda* Lindl. and

*H. repens* Nutt. using a modified version of the 2 × CTAB protocol of Doyle & Doyle (1987).

Following the protocol of Provan & Wilson (2007), 5′-anchored microsatellite primers (CCGG(AG)8, GCGC(AG)8, GGCC (AC)8, CCGG(AC)8 and GCGC(AC)8) were used in individuals ISSR-polymerase chain reaction (PCR) that gave clear multiband products in an initial screen in *H. nuda* and *H. repens*. PCR amplifications were performed in a MJ96 Thermocycler. The general PCR system consisted of a total volume of 20 μL containing: 5-15 ng genomic DNA, 0.4 mM of each primer, 5X PCR Buffer (Green Buffer Promega), 200 μm each dNTP (Promega, USA) 2.5 mm $MgCl_2$ and 1.0 U Taq polymerase (GoTaq, Promega, USA) and water to reach a total volume of 20 μL. Cycling conditions were an initial denaturation at 94 ºC for 3 min, 35 cycles of denaturation at 94 ºC for 1 min, annealing at 60 ºC for 1 min, extension at 72 ºC for 1 min and final extension at 72 ºC for 5 min.

The 20 μL PCR products from each amplification were resolved on a 1.5% agarose gel in TAE buffer. Fragments between 400 – 1200 bp were extracted and purified using the MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany). 5 ng of the eluted DNA were ligated into the plasmid vector pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA) according to manufacturer's instructions. Following transformation into competent cells (*Escherichia coli* XL1-Blue), 160 positive (white) clones to *H. nuda* and 200 positive clones to *H. repens* were sequenced to confirm the presence of microsatellite sequences. The identification and primer design were done using the program WebSat, web-based interface (http://wsmartins.net/ websat/) (Martins et al. 2009), and then tested for reproducible amplification.

The primers isolated from *H. nuda* were named SSRHN the primers isolated from *H. repens* were called SSRHR.

*PCR amplification, genotyping and data analysis*

PCR amplifications of each microsatellite region were performed in a MJ96 Thermocycler, with the following cycling conditions: initial denaturation at 94 ºC for 5 min, 25 cycles of denaturation at 94 ºC for 30 sec, annealing for 45 sec at temperature according each region (Table 1), and extension at 72 ºC for 45 sec, 13 cycles of denaturation at 94ºC for 30 sec, annealing for 45 sec at 50 ºC, extension at 72 ºC for 45 sec and final extension at 72 ºC for 60 min.

For each marker, a M13 tail is added to the 5¢ end of the forward specific primer (Schuelke 2000). PCR fragments labeled with fluorescent dye are generated in one reaction,

which is performed with three primers: a sequence-specific forward primer with M13 tail at its 5¢ end, a sequence-specific reverse primer, and the universal fluorescent-labeled M13 primer. Two fluorophores (HEX and FAM) were used to different regions to make possible the mounting of the multiplex to the fragments analysis. The general PCR system consisted of a total volume of 30 µL containing: 5-15 ng genomic DNA, 1X IB Buffer (Phoneutria Biotech, Belo Horizonte, Brazil), 0.04 µM of forward-M13 tail primer, 0.16 µM of reverse primer, 0,16 µM fluorescent-labeled M13 primer , 0.2 mM dNTP mix, 0.1 U Taq DNA Polymerase (Phoneutria Biotech, Belo Horizonte, Brazil) and water to reach a total volume of 30 µL. The PCR products were checked on a 1 % agarose gel and those that showed bands were dried down and sent to the Macrogen Inc. to the capillary electrophoresis in automatic sequencer ABI 3730XL (AppliedBiosystems), and sized in accordance to standards 500LIZ or 400HD.

The ability of the developed microsatellite markers to cross-amplify between the congeneric species *H. nuda and H. repens* was tested. PCR and cycling conditions were as previously described and the temperature of annelling to each region can be consulted in Table 1.

Results of the fragments analysis were checked using Peak Scanner (AppliedBiosystems) and two matrices including all successfully amplified *loci* by species were built. Individuals that showed amplification fails for two or more *loci* were excluded. The alleles were named using the macro FlexiBinv2 (Amos et al. 2006) for Excel (Microsoft Office). The presence of the multiloci genotypes was checked with the macro MsTools (Park 2001) in Excel. Presence of errors due to null alleles, stuttering and dominance of the minor allele were verified using the software Microchecker 2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004). For each population and locus we estimated the number of alleles per locus (Na), observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (HE) according to the Hardy e Weinberg equilibrium using GenAlEx 6.4 (Peakall & Smouse 2006), and within-population inbreeding coefficient (Fis) using FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2002).Linkage disequilibrium among *loci* in each species were also checked using FSTAT. Deviations from Hardy e Weinberg equilibrium (HWE) were evaluated using exact tests, as implemented in GENEPOP on the Web (Raymond & Rousset 1995).

Table 1 - Characterization of microsatellite *loci* in *Habenaria nuda* and *H. repens*. "-"= data that will be made available in Genbank.

| Locus | Primer sequences (5-'3) | Repeat motif | Allele size | *H. nuda* (N= 40) | | *H. repens* (N = 35) | | GenBank |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Range (bp) | Ta (ºC) | Na | Ta (ºC) | Na | Accession no. |
| *H. nuda* | | | | | | | | |
| SSRHN1B | F: [a] CCTCTTCCCGATCGACTTCA<br>R: AATGCAATGAAGCCGAGCAG | (TCT)8 | 173 – 209 | 60 | 10 | - | - | - |
| SSRHN5 | F: [a] TGTGCGAGTGAGAGAGAGAAAG<br>R: ACAATCAACAGAGTGGTTGCAC | (TG)7 | 326 – 371 | 60 | 12 | 55 | 7 | - |
| SSRHN8 | F: [a] CAATTTCTTGCTCCGCACTC<br>R: ACACATACGCAGATACATACGTATACACAC | (TG)8 | 247 – 295 | 60 | 12 | - | - | - |
| SSRHN12 | F: [a] ATCTACCATGATCTGCACCACA<br>R: GTTATAGGCGATGTTCTCGACC | (ATG)4 N5 (GGA)4 | 321 – 366 | 60 | 7 | 54.5 | 3 | - |
| SSRHN13 | F: [a] TGTCCGTGAATGATTCCTCA<br>R: CATCCGAGCAGTCCAATTTT | (CT)7 | 178 – 214 | 60 | 12 | - | - | - |
| SSRHN15 | F: [a] ACAGAAAATGTGAAGGAAGGGA<br>R: GGGAGGGAGATAGAGAGGAGAG | (TCT)4 | 330 – 348 | 53 | 5 | - | - | - |
| *H. repens* | | | | | | | | |
| SSRHR9 | F: [a] CATATCCATGTCTTCTGCC<br>R: CTCCCGTTTGCTTTATCTTTTG | (CT)5CC(CT)5CC | 281 – 305 | - | - | 60.7 | 4 | - |
| SSRHR14 | F: [a] GGCATGGAAAAGGGTGGACTTAT<br>R: TGAGATCAACAAGGATGTCGAA | (TG)6 | 157 – 173 | - | - | 62.2 | 4 | - |
| SSRHR17 | F: [a] GGGCCGCAGAAAATCTA<br>R: ATGTCTCCAAGCAGAGAAAAGC | (TCC)4T(TCC) | 125 – 192 | 54 | 4 | 54.5 | 4 | - |

Note: Ta=annealing temperature, N=sample size, Na=number of allele per locus.
[a] M13 tag (TTTTCCCAGTCACGAC) added to 5' end of forward primer for amplification with fluorescently labeled M13.

**3. Results and discussion**

The protocol utilized resulted in a low frequency of microsatellite-containing sequences. Out of 360 sequenced clones only 28 contained 14 microsatellites with a motif equal to or greater than eight dinucleotide repeats, five trinucleotide repeats, or one tetranucleotide repeat. Nine of these *loci* (Table 1), six *loci* isolated from *H. nuda* and three *loci* from *H. repens*, were polymorphic (with an average of six and four alleles per locus, respectively – table 2) and showed consistent amplification following optimization. The total number of alleles per locus ranged from four to 12 (Table 1).

Table 2 summarizes the genetic diversity of two populations (HNASM and HNUII) of *H. nuda* based on the analysis of seven polymorphic microsatellite markers (six primers isolated from *H. nuda* and one primer transferred from *H. repens*). The observed heterozygosity in HNASM population ranged from 0.500 to 0.850 (mean 0.686) and the expected heterozygosity ranged from 0.573 to 0.813 (mean 0.683). In HNUII the Ho in the population ranged from 0.294 to 0.750 (mean 0.571) and the expected heterozygosity ranged from 0.517 to 0.851 (mean 0.661) (Table 2). Among the seven analyzed *loci*, three (SSRHN5, SSRHN13 and SSRHR17) showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.005$) in HNASM population, and two (SSRHN8, SSRHN15) in HNUII population (Table 2).

Table 3 represents the genetic diversity of two populations (HREVI and HPOP22) of *H. repens* based on the analysis of five polymorphic microsatellite markers (three primers isolated from *H. repens* and two primers transferred from *H. nuda*). The observed heterozygosity in HREVI population ranged from 0.000 to 0.467 (mean 0.144) and the expected heterozygosity ranged from 0.000 to 0.633 (mean 0.166). In HPOP22 the Ho in the population ranged from 0.067 to 0.563 (mean 0.394) and the expected heterozygosity ranged from 0.064 to 0.666 (mean 0.486) (Table 2). Among the five analyzed *loci*, three (SSRHR17 and SSRHN5) showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.005$) in HREVI population, and one (SSRHN12) in HREVI population (Table 2).

The heterozygous deficiency in some populations of *H. nuda* and *H. repens* can be explained by the occurrence of null alleles at these *loci* as indicated by Microchecker. In both species, no linkage disequilibrium was observed between any two *loci*.

Three out of the nine isolated markers showed successfully cross-amplification: one (SSRHR17) in *H. nuda* and two (SSRHN5 and SSRHN12) in *H. repens*. These species are

placed distantly from each other in the phylogenetic analysis, in unrelated clades (Batista et al. 2013). The transferability suggests its potential application in other species of *Habenaria*.

In this study, we isolated and evaluated nine microsatellite *loci* for *Habenaria nuda* and *Habenaria repens* and so far this is the first set of markers for the genus *Habenaria*. These markers can be highly informative and the polymorphism level found enable them as powerful tools for future population genetics analysis in these and akin species, helping to answer ecological and evolutionary questions.

Table 2 - Results of primer screening for seven microsatellites in two populations of *Habenaria nuda*.

| *Locus* | HNASM [a] population | | | | | HNUII [b] population | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N | Na | Ho | He | FIS | N | Na | Ho | He | FIS |
| SSRHN1B | 20 | 7 | 0.800 | 0.756 | -0.032 | 20 | 6 | 0.750 | 0.751 | 0.027 |
| SSRHN5 | 20 | 7 | 0.500 | 0.672* | 0.280 | 20 | 9 | 0.700 | 0.851 | 0.202 |
| SSRHN8 | 20 | 9 | 0.850 | 0.813 | -0.021 | 20 | 8 | 0.500 | 0.792* | 0.391 |
| SSRHN12 | 20 | 5 | 0.600 | 0.573 | -0.022 | 20 | 7 | 0.600 | 0.586 | 0.002 |
| SSRHN13 | 20 | 9 | 0.750 | 0.728* | -0.004 | 20 | 7 | 0.450 | 0.546 | 0.201 |
| SSRHN15 | 20 | 3 | 0.500 | 0.646 | 0.226 | 17 | 3 | 0.294 | 0.517* | 0.456 |
| SSRHR17 | 20 | 3 | 0.800 | 0.591* | -0.330 | 20 | 4 | 0.700 | 0.584 | -0.174 |
| Mean (SE) | 20 (0) | 6.143 (0962) | 0.686 (0.056) | 0.683* (0.033) | 0.021 | 19.571 (0.429) | 6 (0.816) | 0.571 (0.062) | 0.661* (0.050) | 0.163 |

Note: N=sample size; Na=number of allele per locus; Ho=observed heterozygosity; He=expected heterozygosity; FIS=within inbreeding coefficient.
a Serra da Moeda, Moeda: 20º 16’ 24,2’’ S / 43 º 57’ 29,6’’W.
b RPPN Santuário do Caraça: 20º 7’ 29,3’’ S / 43 º 28’ 20,8’’W.
*Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (P < 0,05)

Table 3 - Results of primer screening for three microsatellites *loci* in four populations of *Habenaria repens*.

| *Locus* | HREVI [a] population | | | | | HPOP22 [b] population | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N | Na | Ho | He | FIS | N | Na | Ho | He | FIS |
| SSRHR9 | 19 | 2 | 0.053 | 0.051[NA] | 0.000 | 15 | 5 | 0.467 | 0.642 | 0.240 |
| SSRHR14 | 20 | 1 | 0.000 [NA] | 0.000 [NA] | - | 16 | 4 | 0.375 | 0.520 | 0.125 |
| SSRHR17 | 20 | 2 | 0.000 [NA] | 0.095* | 1.000 | 16 | 5 | 0.563 | 0.537 | - 0.015 |
| SSRHN5 | 15 | 7 | 0.467 | 0.633* | 0.295 | 15 | 2 | 0.067 | 0.064 | -0.017 |
| SSRHN12 | 20 | 2 | 0.050 | 0.049[NA] | 0.000 | 16 | 4 | 0.500 | 0.666* | 0.140 |
| Mean (SE) | 18.800 (0.970) | 2.800 (1.068) | 0.114 (0.089) | 0.166* (0.118) | 0.341 | 15.600 (0.245) | 4 (0.548) | 0.394 (0.087) | 0.486 (0.109) | 0.120 |

Note: N =sample size; Na=number of allele per locus; Ho=observed heterozygosity; He=expected heterozygosity; FIS=within inbreeding coefficient.

a Conceição do Mato Dentro: 19º 5’ 22’’ S / 43 º 33’ 5’’W.
b Delfim Moreira: 22°35' 18" S / 45°20' 2" W

*Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (P < 0,05) NA=Not available information

**Acknowledgment**

The authors would like to thank ICMBio (Sistema SISBIO) and Instituto Estadual de Florestas (IEF) for collection permits. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

**References**

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.

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.

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

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

Govaerts R, Pfahl J, Campacci MA, Holland Baptista D, Tigges H, Shaw J, Cribb P, George A, Kreuz K, Wood J. 2011. World Checklist of Orchidaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. http://apps.kew.org/wcsp/ (accessed 2014 Dec 06).

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

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.

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.

Park SDE. 2001. Trypanotolerance in west african cattle and the population genetic effects of selection. Ph.D. thesis, Trinity College Dublin, 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.

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.

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

Provan J, Wilson P. 2007. Development of microsatellites for the peat moss *Sphagnum capillifolium* using ISSR cloning. Molecular Ecology Notes 7: 254-256

Raymond M, Rousset F. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity 86: 248-249.

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.

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

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.

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

# CAPÍTULO 4

Vale, A. A. & Batista, J. A.
N. Estudos taxonômicos
no complexo *Habenaria*
*nuda* Lindl.(Orchidaceae).

**Estudos taxonômicos no complexo *Habenaria nuda* Lindl. (Orchidaceae)**

Aline A. do Vale e João A. N. Batista

*Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 486, CEP 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.*

**RESUMO**

*Habenaria nuda* forma um complexo de espécies composto por dez espécies descritas e cerca de 18 morfotipos morfologicamente similares e de identificação difícil. Um problema é a identificação da própria espécie *H. nuda* e de algumas espécies do complexo, que até hoje não está bem definida. Neste trabalho abordamos a taxonomia de algumas espécies e morfotipos do complexo tendo como base para alguns táxons o estudo morfológico, genético e morfométrico realizado no capítulo 3. Como resultado são resolvidas as identidades de *H. nuda*, *H. nasuta* e *H. rodriguesii,* e propostas seis espécies novas: *H. brasiliensis, H. oreadica H. proiteana, H. pseudonuda, H. septentrionalis* e *H. vallislunae*. *Habenaria nuda* var. *pygmaea* é elevada a nível específico como *H. adpressifolia*. São apresentadas descrições, ilustrações e comentários para cada espécie. Para as espécies filogeneticamente relacionadas, diversificações locais e especiação associada a habitats específicos parecem ter sido os principais responsáveis pela diversificação no grupo.

**Palavras-chave:** Espécies novas, *Habenaria,* taxonomia, neotrópicos, cerrado, Brasil.

## 1. Introdução

*Habenaria* Willd. (Orchidaceae, Orchidoideae, Orchidinae) é um grande gênero de Orchidaceae, com cerca de 835 espécies (Govaerts et al., 2014), das quais *ca*. 170 táxons ocorrem no Brasil (Batista et al., 2011a). Os principais tratamentos do gênero para o Brasil foram os de Cogniaux (1893) na Flora Brasiliensis, Hoehne (1940) na Flora Brasílica, e Pabst & Dungs (1975) no Orchidaceae Brasilienses. Cogniaux (1893) descreveu a seção *Nudae*, a qual compreende espécies que possuem folhas lineares e comumente adpressas ao caule, folhas pouco desenvolvidas, lineares e geralmente adpressas ao caule, flores verdes, de tamanho mediano, segmentos laterais das pétalas e do labelo desenvolvidos, sempre mais longos do que o segmento posterior das pétalas e o segmento mediano do labelo.

Mais recentemente Batista e colaboradores publicaram uma série de trabalhos com foco no gênero, incluindo uma revisão e atualização das identificações das espécies no Orchidaceae Brasilienses (Batista e Bianchetti, 2002a), revisão taxonômica das seções *Macroceratitae* (Batista et al., 2006b) e *Pentadactylae* (Pedron et al., 2014), uma sinopse do gênero para o Novo Mundo (Batista et al., 2011a, 2011b), descrições de espécies novas (Batista e Bianchetti, 2003, 2006, 2010; Batista et al., 2008a, 2008b, 2010, 2012); trabalhos abordando a sistemática das espécies *H. orchiocalcar* (Batista e Bianchetti, 2002b) e *H. bicornis* (Batista et al., 2014); estudos florísticos do gênero para o Parque Estadual do Itacolomi (Batista et al., 2004), Amazônia brasileira (Batista et al., 2008c), Rio Grande do Sul (Batista et al., 2012) e Serra da Canastra (Carvalho et al., 2013), e uma filogenia de *Habenaria* com foco nas espécies neotrópicais (Batista et al., 2013).

Na sinopse das espécies do Novo Mundo (Batista et al., 2011b) e na descrição de *H. australis* J.A.N.Bat., A.A. Vale & Menini (Batista et al., 2012), Batista e colaboradores comentam sobre a existência de um complexo de espécies em torno de *H. nuda* Lindl. que inclui *H. fluminensis* Hoehne, *H. nasuta* Rchb.f. & Warm., *H. rodriguesii* Cogn., *H. rolfeana* Schltr., *H. setacea* Lindl., *H. trichoceras* Barb.Rodr. e *H. nuda* var. *pygmaea* Hoehne, ressaltando a dificuldade de identificação e diferenciação destes táxons e apontando a necessidade de estudos adicionais para resolver a identidade de *H. nuda* e sua relação com estes táxons.

Na filogenia apresentada do gênero focada nas espécies neotropicais (Batista et al., 2013) as espécies pertencentes ao complexo *H. nuda* que foram amostradas não formaram um grupo monofilético, sugerindo que o complexo é polifilético. Todavia, a amostragem

incompleta e a baixa resolução dos clados correspondentes não permitiram conclusões mais precisas.

No presente trabalho, tendo como base os resultados obtidos em uma análise filogenética do complexo *H. nuda* com maior número de táxons e caracteres, uma análise morfométrica e uma análise populacional de táxons e morfotipos do complexo utilizando marcadores microssatélites, foi possível avaliar a identidade taxonômica de vários táxons e morfotipos do complexo. Como resultado foi resolvida a identidade de *H. nuda* e outras duas espécies (*H. nasuta* e *H. rodriguesii*), descritas seis espécies novas, e proposto a a elevação de *H. nuda* var. *pygmaea* para nível específico.

## 2. Material e métodos

As descrições foram baseadas em material de herbário e em material armazenado em álcool 70%. O hábito e o perianto foram examinados em material seco ou em material armazendo em álcool 70% e o ginostêmio foi examinado em material armazenado em álcool, usando microscópio estereoscópico. As medições foram feitas com um paquímetro digital. Os dados sobre tempo de floração, habitat e distribuição baseiam-se em etiquetas de herbário e em observações em campo. A terminologia descritiva aplicada foi baseada em Stearn (1992) e Simpson (2006). Os materiais e imagens examinados foram dos seguintes herbários: BHCB, CEN, G, HB, HEPH, HUEFS, HUFU, IBGE, K, M, MBM, MG, P, RENZ, SPF, U, UB, UEC. A identificação dos materiais foi feita por meio de comparação com os materiais-tipo e as descrições e ilustrações originais.

## 3. Resultados

***Habenaria adpressifolia*** A.A.Vale & J.A.N.Bat., *nom. et stat. nov*. Tipo: Brasil. Mato Mato Grosso, Ponte de Pedra, Chapada dos Parecis, Junho 1909, *F.C. Hoehne 2146* (Holótipo: R [2726]; Isótipo: SP [fragmento]). (Fig. 1)

Basiônimo: *Habenaria nuda* Lindl. var. *pygmaea* Hoehne, Relat. Commiss. Linhas Telegr. Estratég. Matto Grosso Amazonas 5(1): 25, t. 1. 1910.

Ervas terrestres. Raízes não vistas. Túbera não vista. Plantas 54-117 cm compr., incluindo a inflorescência. Raízes numerosas, longas, 0,6-1,5 mm larg., pilosas. Túbera ovada, 15,0 x 8,0 mm larg. Caule ereto, 1,8-4,2 mm larg. Folhas 6-12, totalmente adpressas ao caule, lineares, ápice agudo ou acuminado, 6,1-16,8 x 0,24-0,95 mm., totalmente adpressas; Inflorescência 7,9-27,5 cm compr., poucas a muitas flores, congesta, espiralada; brácteas elípticas, oblongas ou amplamente elípticas, ápice acuminado ou longo-acuminado, 13,7-26,3 x 6,1-8,4 mm, lisas, com margem branca, com tamanho aproximado ao do ovário pedicelado. Flores 5-25, medianas, verdes; ovário pedicelado reto, paralelo ao caule ou levemente arqueado, 11-14 mm, pedicelo 2,0-4,0 mm compr. Sépalas verdes, agudas, lisas; sépala dorsal côncava, elíptica quando achatada, ápice agudo, 7,5-8,4 x 6,1-7,8 mm; margem verde, sépalas laterais obliquamente lanceoladas, deflexas com ápice reflexo, levemente convexas, ápice agudo, 7,4-9,6 x 3,3-4,2 mm. Pétalas bipartidas, verdes, segmento anterior perpendicular em relação à base do segmento posterior, linear-filiforme, glabro, inserido na base do segmento posterior, 11,5-14,9 mm; segmento posterior lanceolado, glabro, agudo, aderente à sépala dorsal, 7,3-8,9 x 0,6-0,8 mm; segmento anterior mais longo que o posterior, com o dobro do comprimento do segmento posterior. Labelo tripartido, parte basal indivisa curta, 1,8-2,9 x 2,4-3,1 mm; segmentos laterais perpendiculares ao segmento mediano, linear-filiformes, glabros, ápice ereto e/ou incurvado, 12,3-17,1 x 0,5-0,9 mm larg., um terço mais longos que o segmento mediano; segmento mediano ensiforme, curvado para trás ou com o ápice reflexo ou deflexo, 7,1-8,5 x 1,8-2,2 mm, glabro, ápice agudo; calcar levemente curvado, parcial ou totalmente coberto pelas brácteas, espatulado, mais curto que o ovário pedicelado, 10,1-11,7 x 1,3-2,7 mm, base 1,1-1,7 mm larg., ápice 1,6-2,5 mm larg. Coluna ereta, 3,5-4,7 mm alt.; conectivo retuso, estreito; aurículos amarelos, carnosos, verrucosos, 1,1-1,9 x 1,8-3 mm, ápice truncado; lóculos da antera 1,8-2,5 mm alt., canais curtos, 1,7-2,4 mm compr.; hemipolinários 2, separados, 2,9-4 mm; viscídios arredondados, 0,4-0,5 x 0,5-0,6 mm, espaçados 1,9-2,6 mm; caudículos 2-2,3 mm compr.; políneas 1,7-2,5 x 1,3-1,7 mm. Lobos estigmáticos 2, estreitamente paralelos, formando uma superfície receptiva, oblanceolados, 1,6-2,1 mm compr., superfície receptiva levemente convexa, voltada para cima, 1,2-1,6 mm compr., ápice 1,8-2,2 mm larg., truncados, margens internas espessadas, glabros, espaço entre os lobos elíptico. Rostelo 3,1-4,6 mm compr.; lobo mediano 1,1-2 mm alt., 1-1,3 mm compr., triangular, carnoso, agudo, ereto, totalmente inserido entre os lóculos da antera; lobos laterais paralelos em toda a extensão, 1,6-2,1 mm compr., base 0,6-1,1 mm larg., ápice 0,4-0,9 mm larg. Fruto não visto.

**Etimologia:** O epíteto refere-se às folhas fortemente adpressas ao caule nesta espécie.

**Distribuição:** Restrita ao Brasil no Distrito Federal e nos estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, São Paulo e Paraná (Figura 12).

**Habitat e fenologia:** Ocorre em campo limpo inundável, de acordo com a terminologia proposta por Ribeiro e Walter (2008), frequentemente associada a veredas, em solo humoso,

escuro. Estas áreas são permanentemente úmidas, geralmente com água sobre a superfície, não secando mesmo durante a estação seca. A floração ocorre no auge do período seco, principalmente entre junho-agosto.

**Notas taxonômicas:** Hoehne (1910) descreveu este táxon como uma variedade de *H. nuda*. No tratamento do gênero na Flora Brasílica, Hoehne (1940) incluiu *H. nasuta*, que tem flores maiores, como sinônimo de *H. nuda*, o que provavelmente explica o seu conceito da espécie e o epíteto escolhido para a variedade. No mesmo trabalho Hoehne considera *H. nuda* var. *pygmaea* como um sinônimo de *H. secundiflora* Barb.Rodr.. Entretanto, *H. nuda* var. *pygmaea* é um táxon distinto de todos citados acima e de outros morfotipos no complexo *H. nuda*. Uma característica distintiva é a floração durante o período seco quando todas as outras espécies do complexo estão em repouso vegetativo. Esta é uma característica incomum no gênero, ao menos entre as espécies neotropicais, sendo encontrada adicionalmente apenas em *H. pungens* Cogn. e *H. repens* Nutt. e alguns morfotipos relacionados a esta ultima. Tanto *H. nuda*. var. *pygmaea*, *H. pungens* como *H. repens* ocorrem em áreas permanentemente úmidas ou alagadas, o que explica a disponibilidade de água e o crescimento vegetativo e a floração durante a seca. Outra característica distintiva em relação aos morfotipos do complexo *H. nuda* são as folhas completamente adpressas ao caule, enquanto nas outras espécies elas são mais ou menos destacadas em vários graus. A sinonimização como *H. secundiflora* é injustificável. Esta espécie apresenta flores menores (sépala dorsal 4-6 mm compr.), o segmento anterior da pétala inserido alguns milímetros acima da base do segmento posterior, os segmentos laterais do labelo voltados para baixo, os hemipolinários unidos pelo viscidio, ocorre em campo limpo úmido, seco ou cerrado, e floresce durante o período chuvoso, entre dezembro e março.

**Espécimes adicionais examinados:** BRASIL. **Distrito Federal:** Brasília, Córrego Vicente Pires, na estrada para Taguatinga, 10 Agosto 1983, *Todzia & Kirkbride 2365* (SPF); Brasília, MSPW, 15º46’34’’S, 47º56’29,8’’W, 08 Agosto 2012, *Vale & Bianchetti 168* (BHCB); Brasília, Reserva Ecológica do IBGE, 17 Agosto 1978, *Heringer* et al. *600* (IBGE); Brasília, Setor de Abastecimento, 08 Agosto 1964, *Heringer 9728* (HB); Brasília, Setor de Mansões Lago Norte, 14 Julho 1991, *Bianchetti & Batista 1163* (CEN); Brasília, Torto, 15º 42’10,5’’S, 47º 53’50,3’’W, 08 Agosto 2012, *Vale & Bianchetti 169* (BHCB); Guará: Reserva Ecológica do Guará, 22 Julho 1990, *Batista 87* (CEN); Guará, 15º 48’23,4’’S, 47º 58’39,4 W, 08 Agosto 2012, *Vale & Bianchetti 170* (BHCB); Núcleo Bandeirante, Santuário Ecológico do Riacho Fundo, 17 Agosto 1996, *Batista 612* (CEN); Sobradinho, Ribeirão do Torto, 19 Julho 1992, *Batista 313* (CEN); Sobradinho, Chapada da Contagem, 16 Agosto 1964, *Irwin & Soderstrom 5184* (UB); Taguatinga, Taguatinga Sul, 1 Agosto 1992, *Batista 314* (CEN). **Goiás:** Teresina de Goiás, estrada Alto Paraíso de Goiás-Teresina de Goiás, 15 Junho 1994, *Walter 2142* (CEN). **Mato Grosso:** Ponte de Pedra, Chapada dos Parecis, Junho 1909, *Hoehne 2146* (R); **Minas Gerais:** Buenópolis, Serra do Cabral, 17º 55’15,5’’S, 44º 21’24,3’’W, 1 Setembro 2012, *Vale* et al. *173* (BHCB); Datas, Estribo da Bandeirinha, 10 Agosto 1972, *Hatschbach 30158* (MBM); Jaboticatubas, Serra do Cipó, 6 Agosto 1972, *Hatschbach* et al. *29977* (MBM); Moeda, Serra da Moeda, 11 Agosto 1987, *Reis* et al. *10* (BHCB); Uberlândia, Estação Ecológica do Panga, Vereda 4, 19º 10’41’’S, 48º 24’24,4’’W, 2 Agosto 2012, *Vale & Pacheco 165* (BHCB); Uberlândia, estrada para Campo Florido, 9 Julho 1999, *Barbosa & Faria 2207* (HUFU); Unaí, 16º 27’14,7’’S, 47º 4’16,7’’W, 26 Julho 2008, *Batista* et al. *2694* (BHCB). **Paraná:** Arapoti, Rio das Perdizes, 6 Abril 1970, *Hatschbach* et al. *24127* (MBM); **São Paulo:** Mogi Guaçu, Reserva Florestal Fazenda Campininha, 21 Junho 1956, *Kuhlmann 3801* (SP).

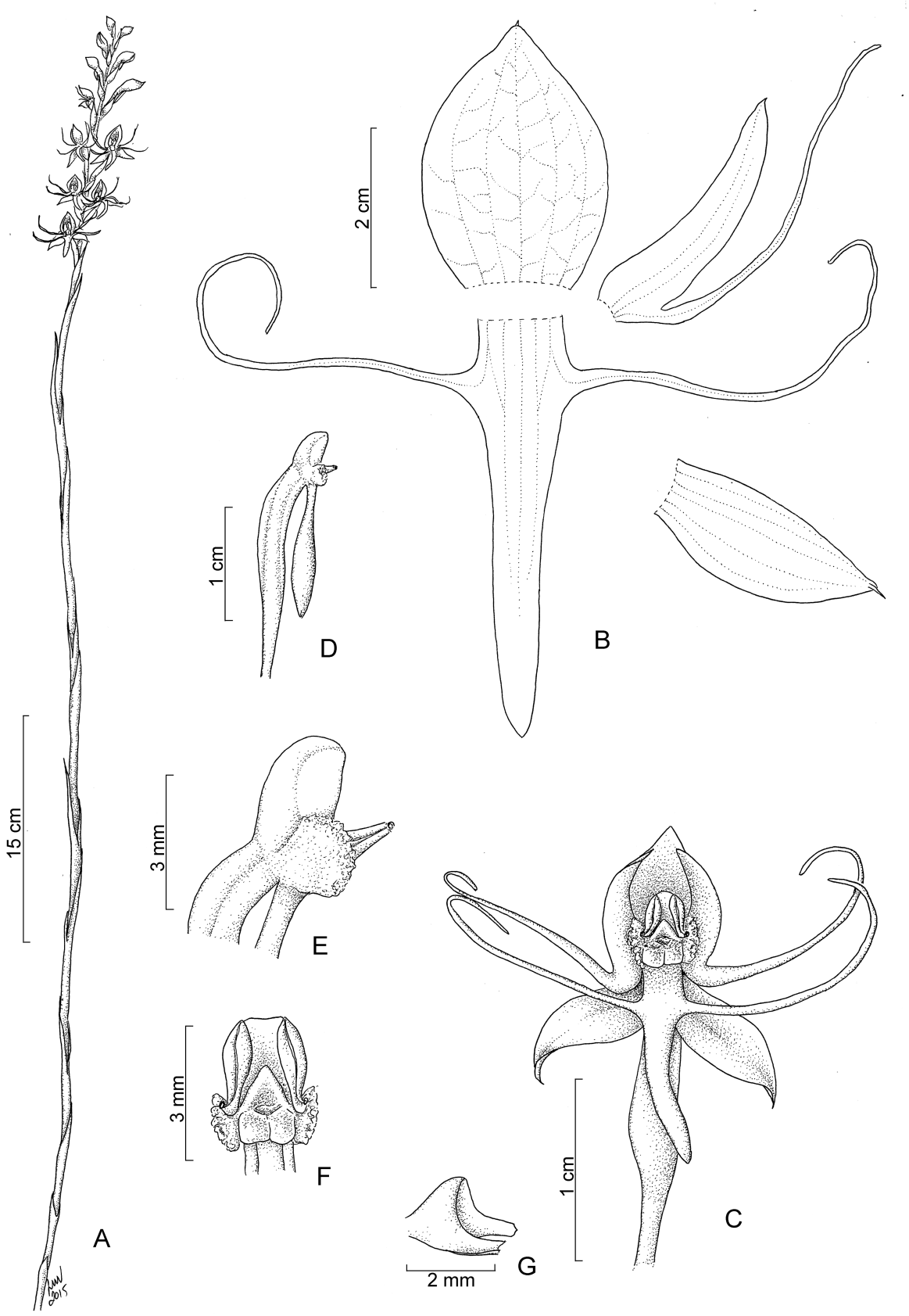



Figura 1. *Habenaria adpressifolia* A.A. Vale & J.A.N. Bat. *nom. et stat. nov.ined.* A. Hábito. B. Perianto. C. Flor, vista frontal. D. Ovário, cálcar e ginostêmio, vista lateral. E. Ginostêmio, vista lateral. F. Ginostêmio, vista frontal. G. Rostelo, vista lateral. Ilustração de L. Menini Neto a partir de *A.A. Vale 168*.

***Habenaria vallislunae*** A.A.Vale & J.A.N.Bat., *sp. nov*. . Tipo: Brasil. Goiás. Alto Paraíso de Goiás, Vale da Lua, 9 Fevereiro 2004, *J.A.N. Batista, K. Proite, E.L. Borba, C. van den Berg & E.C. Smidt 1490* (Holótipo: CEN; isótipos BHCB, RB, SP) (Fig. 2).

Ervas terrestres. Raízes numerosas, longas, 0,7-1,9 mm larg., pilosas. Túbera ovada, 30 x 9,7 mm larg. Caule ereto, 28,1-52,2 cm compr. incluída a inflorescência, 2,2-4,3 mm larg. Folhas 7-9, espalhadas, as maiores na região mediana do caule, lanceoladas a estreitamente elípticas, largas, ápice acuminado, 6,2-23 x 1,1-2,1 cm. Inflorescência 7,1-9 cm compr., poucas a muitas flores, laxa, espiralada; brácteas ovadas, ápice agudo ou longo-acuminado, 19,7-26,9 x 6,6-9,2 mm, lisas, alvacentas, iguais ou mais longas que o ovário pedicelado. Flores 6-13, medianas, verde-amareladas; ovário pedicelado ascendente, 12,9-15,5 mm compr; ovário reto ou levemente arqueado, pedicelo 2,2-2,8 mm compr. Sépalas verdes, lisas, ápice agudo, margens verdes; sépala dorsal côncava, ovada quando achatada, ápice agudo, 8,1-12,1 x 4,7-7 mm; sépalas laterais obliquamente lanceoladas, perpendiculares, levemente côncavas, ápice agudo, 8,6-12,9 x 2,3-4,3 mm. Pétalas bipartidas, verde-amareladas; segmento posterior lanceolado, glabro, 7,7-10,8 x 1,4-2,5 mm, aderente à sépala dorsal, ápice agudo; segmento anterior perpendicular em relação à base do segmento posterior com ápice ereto, linear ou linear-filiforme na base, inserido na base do segmento posterior, glabro, 7,3-11,9 x 0,3-0,9 mm larg., aproximadamente com o mesmo tamanho do segmento posterior ou pouco um pouco maior. Labelo tripartido, porção basal não dividida curta, 1,3-2,5 x 1,9-2,3 mm; segmentos laterais perpendiculares ao segmento mediano na base e voltados para baixo em diração ao ápice, lineares, glabros, 8,1-11,9 x 0,7-1 mm, aproximadamente com o mesmo tamanho do segmento mediano; segmento mediano ensiforme, deflexo e pouco projetado para frente, 7,1-9,5 x 1,4-2,3 mm, glabro, ápice agudo; calcar deflexo, total ou parcialmente coberto pelas brácteas, linear-fusiforme, com aproximadamente o mesmo tamanho do ovário pedicelado, 5,8-11,8 x 1,6-2,1 mm, base 1,1-1,5 mm larg., ápice 1,4-1,8 mm larg. Coluna reclinada, 2,9-4,7 mm alt.; conectivo retuso, estreito; aurículos brancos, carnosos, verrucosos, 0,7 x 0,6-0,9 mm, ápice obtuso. Lóculos da antera 1,8-2,2 mm alt., canais curtos, 1,6-2,1 mm compr.; hemipolinários 2, separados, 3,1-4,2 mm compr.; viscídios arredondados, 0,4-0,6 x 0,7-0,9 mm, com distância 1,4-1,9 mm entre eles; caudículos 2,3-2,6 mm compr.; políneas 1,8-2,1 x 1,1-1,5 mm. Lobos estigmáticos 2, estreitamente paralelos, formando uma superfície receptiva plana voltada para frente, oblongos, 1,6-2,3 x 1,0–1,6 mm; ápice 1,4-2,1 mm larg., truncados, margem interna espessada, glabros; espaço entre os lobos elíptico. Rostelo 2,9-5,1 mm compr, lobo mediano 2,7-3,3 mm alt., 1,1-1,6 mm compr., triangular, carnoso, subagudo, voltado para frente, ápice geralmente projetado além dos lóculos da antera; lobos laterais paralelos em toda a extensão, 1,8-2,6 mm compr., base 1-1,4 mm larg., ápice 0,7-0,9 mm larg. Fruto não visto.

**Etimologia:** O epíteto refe-se à localidade do material-tipo, o Vale da Lua, no município de Alto Paraíso de Goiás, ao sul do Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros.

**Distribuição:** Restrita ao Brasil nos estados de Goiás e Tocantins (Figura 11).

**Habitat e fenologia:** Em cerrado ou campo sujo, geralmente associado a alforamentos rochosos, em ambiente seco. Na localidade tipo a espécie ocorre associada a grandes blocos de rocha granítica. A floração ocorre durante o auge do período chuvoso, entre janeiro e

fevereiro.

**Notas taxonômicas:** Na análise filogenética do complexo *H. nuda* esta espécie é a mais distante do restante, formando uma politomia com o clado *H. armata* Rchb.f./*H.imbricata* Barb.Rodr., *H. cultellifolia* Barb.Rodr. e *H. trifida* Kunth, espécies com as quais não tem nenhuma similaridade morfológica aparente. A morfologia floral geral desta espécie é similar a de outras do complexo *H. nuda*, o que fez com que a incluíssemos no grupo, entretanto *H. vallislunae* apresenta uma série de características morfológicas distintivas. A mais aparente são as folhas muito desenvolvidos e patentes. Em exemplares mais desenvolvidos as folhas atingem 23 cm de comprimento e 2 cm de largura. As flores de *H. vallislunae* são em média maiores do que as de outras espécies do complexo, assemelhando-se neste sentido a *H. nasuta* e *H. rodriguesii*. Todavia, estas espécies apresentam o segmento anterior das pétalas e os segmentos laterais do labelo, tanto em valores absolutos como proporcionais, maiores do que o segmento posterior e o segmento mediano, respectivamente. Outro caractere distintivo é a disposição espacial dos segmentos laterais do labelo geralmente voltada para baixo, enquanto nas outras espécies do complexo os segmentos são sempre eretos. Por fim, o lobo mediano do rostelo é bem desenvolvido e o ápice é projetado além dos lóculos da antera, enquanto em todos os outros táxons do complexo o lobo mediano esta completamente compreendido entre os lóculos da antera. Fruto não visto.

**Espécimes adicionais examinados: Goiás:** 25 km S. of Niquelândia, 750 m, 24 Janeiro 1972, *Irwin et al 34935* (UB); Fazenda Pedra Preta, *Rodrigues Jr. 1769* (HEPH); Alto Paraíso, Vale da Lua, 30 janeiro 2013, *Vale* et al. *193* (HUEFS). **Tocantins:** Paranã, estrada canteiro de obras – Rio Custódio, km 13, 12º48'59''S, 48º11'24''W, 31 março 2009, *Pereira-Silva* et al. *14195* (CEN).

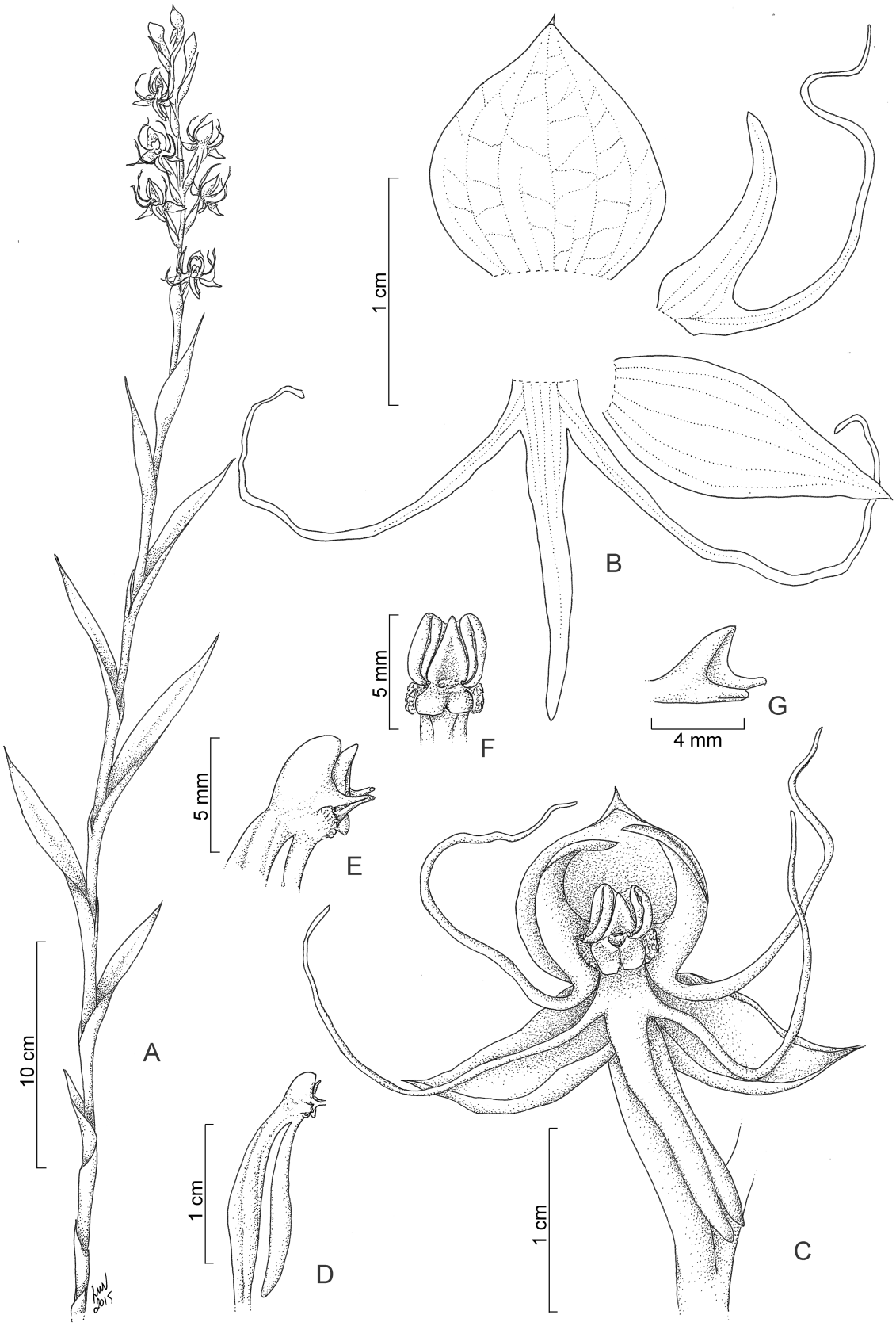



Figura 2. *Habenaria vallislunae* sp. nov. A. Hábito. B. Perianto. C. Flor, vista frontal. D. Ovário, cálcar e ginostêmio, vista lateral. E. Ginostêmio, vista lateral. F. Ginostêmio, vista frontal. G. Rostelo, vista lateral. Ilustração de L. Menini Neto a partir de *J.A.N. Batista 1490*.

***Habenaria brasiliensis*** A.A.Vale & J.A.N.Bat., *sp. nov*. Tipo: Brasil. Distrito Federal, Ceilândia, atrás da QNP-36, encostas do vale do córrego Taguatinga, 28 Dezembro 1999, *J.A.N. Batista 970* (Holótipo: CEN; isótipos: AMES, BHCB, K, RB, SP) (Fig. 3)

Ervas terrestres. Raízes poucas, longas, 1,2-2 mm larg., pilosas. Túbera não vista. Caule ereto, 19-34,1 cm compr. incluída a inflorescência, 1,4-2,4 mm larg. Folhas 3-6, parcialmente adpressas ao caule, as maiores na região mediana do caule, lineares, estreitas, ápice acuminado, 3,4-10,2 cm x 0,4-0,5 cm. Inflorescência 5,2-13,2 cm compr., poucas flores, laxa, espiralada; brácteas elípticas ou oblongas, ápice longo acuminado, 16,8-29,1 x 4,6-7,1 mm, lisas, verdes, mais curtas que o ovário pedicelado. Flores 3-7, medianas, verdes; ovário pedicelado ascendente ou inclinado, 14,4-18,6 mm compr.; ovário reto, pedicelo 1,1-2,5 mm compr. Sépalas verdes, finamente denticuladas, ápice agudo, apiculado ou acuminado; sépala dorsal côncava, ovada ou elíptica quando achatada, ápice agudo, 5,9-7,2 x 4,7-7,7 mm; sépalas laterais obliquamente lanceolado-ovadas ou lanceoladas ou amplamente elípticas, levemente deflexas ou perpendiculares ou com o ápice curvado, levemente convexas ou côncavas, ápice agudo-acuminado, 8-10,3 x 3-4,1 mm. Pétalas bipartidas; segmento posterior lanceolado ou lanceolado-falcado, glabro, 6,5-7,9 x 1,9-2,5 mm, aderente à sépala dorsal, ápice agudo-acuminado; segmento anterior perpendicular em relação à base do segmento posterior com ápice ereto, linear-filiforme, inserido na base do segmento posterior, glabro, 7,6-15,3 x 0,4-0,7 mm, um terço maior que o segmento posterior. Labelo tripartido, parte basal indivisa curta, 1,5-2,4 x 1,7-2,9 mm; segmentos laterais eretos, linear-filiformes, glabros, ápice reflexo, 8-11,9 x 0,5-0,7 mm, com aproximadamente o mesmo tamanho do segmento mediano ou 1,4 vezes mais longos que estes; segmento mediano linear, reflexo, 6,4-10,5 x 0,9-1,5 mm, glabro, ápice agudo; cálcar deflexo ou levemente projetado para frente, livre das brácteas, clavado, mais curto que o ovário pedicelado, 9,7-13,7 x 0,7-1,1 mm; base 0,9-1,2 mm larg., ápice 1,2-2 mm larg. Coluna ereta, 3,9-4,7 mm alt.; conectivo retuso, largo, 1,6-2,2 mm larg.; aurículos amarelos, carnosos, verrucosos, 0,8-1,6 x 0,8-1,8 mm, ápice truncado. Lóculos da antera 1,5-1,8 mm alt.; canais curtos, 1,3-2,2 mm compr.; hemipolinários 2, separados, 3,4 mm compr.; viscídios arredondados, 0,3 x 0,2 mm; caudículos 2-2,4 mm compr.; políneas 1,4-1,8 x 0,8-1,2 mm. Lobos estigmáticos 2, estreitamente paralelos, oblongos, 2,2-3,5 mm compr., superfície receptiva convexa ou plana, voltada para frente, 1,6-2,3 mm compr., ápice truncado, 2,5-3,7 mm larg., margens internas espessadas, glabros, sem protuberâncias, espaço entre os lobos elíptico. Rostelo 5-6,1 mm compr., lobo mediano 1-1,5 mm alt., 0,8-1,6 mm compr., triangular, carnoso, ápice agudo ou subagudo, voltado para frente, geralmente projetado além dos lóculos das anteras; lobos laterais paralelos em toda a extensão, 2,7-3,1 mm compr., base 0,6-1 mm larg., ápice 0,3-0,4 mm larg. Fruto não visto.

**Etimologia:** O epíteto refere-se a Brasília, capital do Brasil, único local de onde a espécie é conhecida até o momento.

**Distribuição:** Restrita ao Brasil e conhecida até o momento de uma única localidade no Distrito Federal (Figura 12).

**Habitat e fenologia:** Ocorre em campo limpo de encosta, em áreas com declive acentuado, preferencialmente em áreas mais úmidas e protegidas, menos expostas ao vento, próximas a grotões entre as encostas, em solo raso, com blocos de rocha e muito cascalho sobre a superfície. Floresce no período chuvoso, durante dezembro e janeiro.

**Notas taxonômicas:** Na morfologia vegetativa e do perianto esta espécie assemelha-se a outras do complexo, todavia distingue-se claramente na morfologia do ginostêmio. O ginostêmio é bastante largo e o conectivo, que separa os lóculos da antera, é muito desenvolvido, apresentando 1,6-2,2 mm de largura. Nas outras espécies com flores de mesmo tamanho essa medida varia de 0,2 a 0,8 mm. Mesmo nas espécies com flores muito maiores, como *H. nasuta* e *H. rodriguesii*, a largura é menor mesmo em valores absolutos, variando de 0,6 a 1,4 mm. Outros caracteres menos discriminativos, mas que em conjunto contribuem para diferenciar a espécies são: as sépalas com margem denticulada e ápice com uma arista bem desenvolvida, os auriculos bem desenvolvidos, muito largos, que atingem a mesma altura dos lóculos da antera, a ocorrência em encostas pedregosas, secas, ingrimes e a distribuição geográfica restrita ao Distrito Federal.

**Espécime adicional examinado:** BRASIL. **Distrito Federal:** Ceilândia, atrás da QNP-36, Vale do Córrego Taguatinga, 5 Janeiro 1995, *Batista & Miranda 467* (CEN).

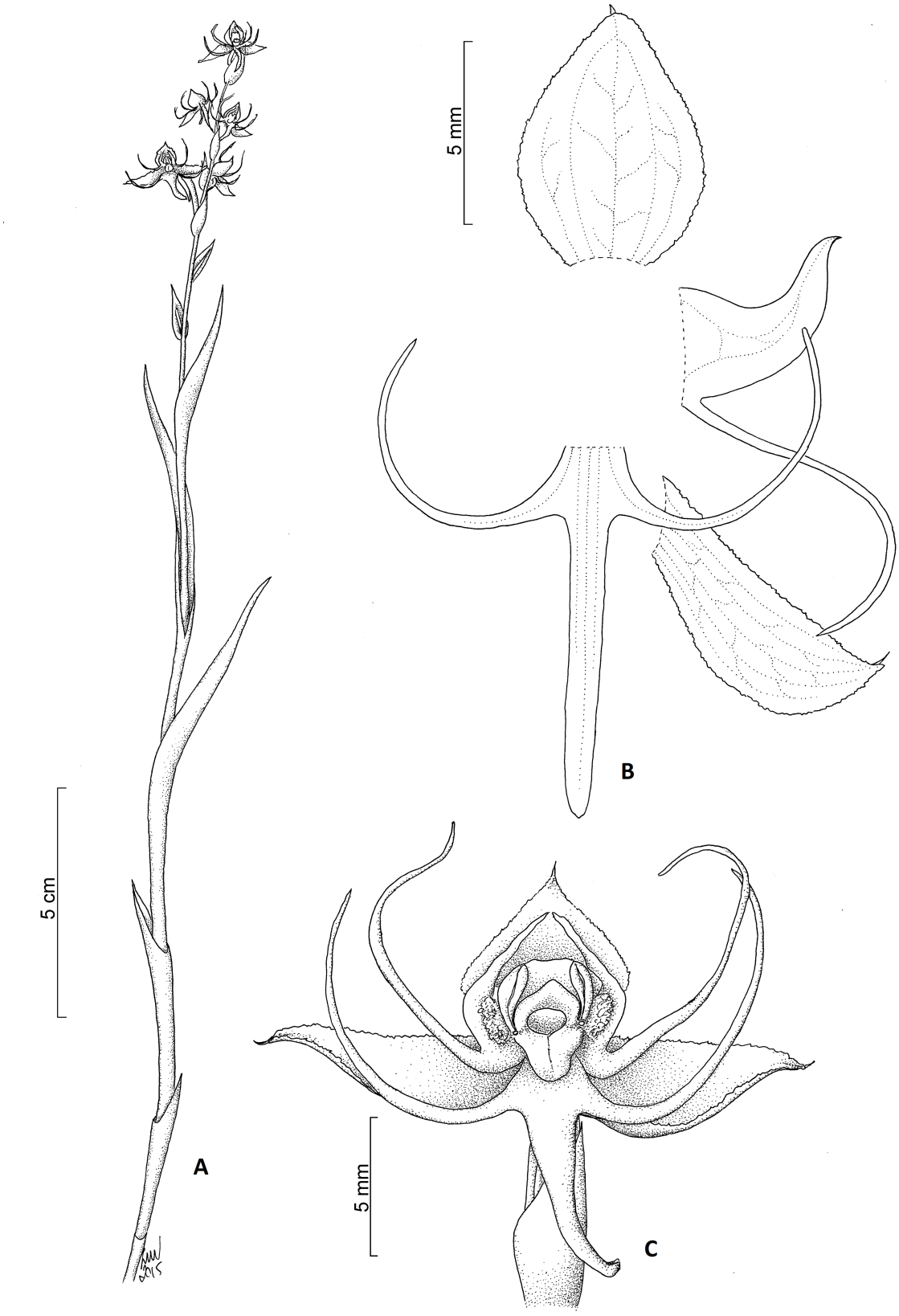



Figura 3. *Habenaria brasiliensis* sp. nov. A. Hábito. B. Perianto. C. Flor, vista frontal. Ilustração de L. Menini Neto a partir de *J.A.N. Batista 1186*.

***Habenaria septentrionalis*** A.A.Vale & J.A.N.Bat., *sp. nov*. Tipo: Brasil. Distrito Federal, Chapada da Contagem, fazenda Dois Irmãos (Chapada Imperial), entrada na DF-220, ca. de 6 km do entroncamento com a DF-001, na trilha de descida ao longo do Córrego Dois Irmãos, a partir do poço do Quati, 3 Fevereiro 2001, *J.A.N. Batista 1186* (Holótipo: CEN: isótipos: BHCB, RB, SP) (Fig. 4)

Ervas terrestres. Raízes poucas, longas, 1–1,3 mm larg., esparsamente pilosas. Túbera não vista. Caule ereto, 27,7-120 cm compr., incluída a inflorescência, 3,0 mm larg. Folhas 7-12, espalhadas ou parcialmente adpressas ao caule, as maiores na região mediana do caule, lanceoladas, estreitas ou pouco mais largas, ápice acuminado, margens verdes, 3,5–14,2 x 0,6–1,3 cm. Inflorescência 15,5 cm compr., poucas a muitas flores, laxa, espiralada. Brácteas ovadas, ápice acuminado, 17-28 x 3,0-8,0 mm, lisas, verdes, mais curtas ou iguais ao ovário pedicelado. Flores 10 - 18, medianas; ovário pedicelado ascendente ao caule, reto, 12-25 mm compr. Sépalas verdes, lisas ou finamente denticuladas, ápice agudo, margem verde; sépala dorsal côncava, elíptica quando achatada, ápice agudo a obtuso, 8,6 x 6,3 mm; sépalas laterais obliquamente lanceoladas, deflexas, ápice agudo, levemente convexas, 8,2–9,0 x 3,7–3,9 mm. Pétalas bipartidas, segmento posterior lanceolado, glabro, 7,3–7,8 x 2,8–2,9 mm, aderente à sépala dorsal, ápice agudo; segmento anterior perpendicular em relação à base do segmento posterior, linear, inserido na base do segmento posterior, glabro, 8,3–10,0 x 0,6–0,7 mm, aproximadamente do mesmo tamanho ou 1,5 vezes mais longo que o segmento posterior. Labelo tripatido, parte basal indivisa curta, 1,5 mm x 2,2 mm; segmentos laterais perpendiculares ao segmento mediano, lineares, glabros, ápice agudo, 10–19,5 x 0,4–1,6 mm, com aproximadamente o mesmo tamanho que o segmento mediano; segmento mediano ensiforme, deflexo, 9,3 x 1,7 mm, glabro, ápice agudo; cálcar deflexo, totalmente ou parcialmente coberto pelas brácteas, fusiforme, mais curto que o ovário pedicelado, 11,3 x 2,6 mm, base 1,2 mm larg., ápice 2,4 mm larg. Coluna ereta, 4,4 mm alt.; conectivo retuso, estreito, 0,7 mm larg.; aurículos brancos, carnosos, verrucosos, 0,5–0,7 x 0,8–0,9 mm, ápice truncado. Lóculos da antera 1,6–1,9 mm alt., canais proeminentes, 2,2–2,5 mm compr.; hemipolinários 2, separados, 3,5–3,9 mm compr.; viscídios arredondados, 0,4–0,5 x 0,4–0,5 mm, com distância 2,0 mm entre eles; caudículos 2,5–2,7 mm compr.; políneas 1,6–1,8 x 1,4–1,5. Lobos estigmáticos 2, estreitamente paralelos, oblongos, 1,7–1,8 mm compr., superfície receptiva plana, voltada para frente, 1,2–1,3 mm compr., ápice truncado, 2,0 mm larg., margens internas espessadas, glabros, sem protuberâncias, espaço entre os lobos cordiforme. Rostelo 4,0–4,5 mm compr., lobo mediano 1,1 mm alt., 1,6 mm compr., triangular, carnoso, ápice agudo ou estreitamente agudo, voltado para frente, entre os lóculos da antera; lobos laterais paralelos em toda a extensão, 1,8–2,0 mm compr., base 0,5–0,6 mm larg., ápice 0,3 mm larg. Fruto não visto.

**Etimologia:** O epíteto específico refere-se a distribuição da espécie, que compreende a região Centro Oeste e Norte do Brasil e as Guianas, sendo a única espécie do complexo *H. nuda* com distribuição ao norte (setentrional) da América do Sul.

**Distribuição:** Brasil no Distrito Federal e os estados de Goiás, Maranhão e Pará, e Guiana Francesa (Figura 11).

**Habitat e fenologia:** Em cerrado ralo ou savana seca, geralmente associados a afloramentos rochosos, crescendo a sombra de arvores baixas ou em pleno sol, em solo geralmente raso, seco, com blocos de rocha e calcalho sobre a superfície. No Distrito Federal, Goiás e Maranhão floresce em janeiro-fevereiro, enquanto no Pará floresce entre março-maio.

**Notas taxonômicas:** *Habenaria septentrionalis* diferencia-se das demais espécies do complexo *H. nuda* principalmente pela morfologia dos aurículos, que são pequenos, alongados e dispostos abaixo dos canais das anteras. Nas outras espécies do complexo com perianto similar a *H. septentrionalis*, os auriculos são bem desenvolvidos, largos e encombrem lateralmente a base das anteras, canais e lobos do estigma. Apenas outras duas espécies no complexo *H. nuda* também apresentam os auriculos relativamente pouco desenvolvidos, mas diferenciam-se pelas seguintes caracteristicas. *Habenaria vallislunae* tem folhas mais desenvolvidas, flores maiores, segmentos laterais das pétalas e do labelo mais longos, e ápice do lobo mediano do rostelo projetado além dos lóculos da antera. *Habenaria australis* apresenta o segmento lateral da pétala inserido alguns milímetros acima da base do segmento mediano, e aurículo curto, disposto acima dos canais da antera.

**Espécimes adicionais examinados:** BRASIL. **Goiás:** Mossâmedes, Serra Dourada, Goiás Velho, 26 Janeiro 1991, *Salles 1782* (HEPH). **Maranhão:** Barão de Grajaú, Ponta da Serra, próximo ao Rio Parnaíba, divisa com Piauí, 15 janeiro 2007, *Silva 1506* (BHCB); Carolina, cerca de 36 km ao Norte de Carolina na estrada para Estreito, cerca de 1 km após a entrada para a cachoeira da Pedra Caída, 21 Janeiro 2003, *Batista & Oliveira-Neto 1368* (CEN). **Pará:** Canaã dos Carajás, S11-D, 6º23'26''S, 50º22'18''W, 20 Março 2012, *Arruda* et al. *722* (BHCB); Castanhal, 7 Maio 1994, *J.B.F. Silva 315* (MG); Marabá, Serra dos Carajás, N4, 14 março, 1984, *A.S.L. Silva* et al. *1768* (MG); Parauapebas, N2, 6º03'27''S, 50º14'41''W, 19 Abr 2012, *Arruda* et al. *946* (BHCB); Marabá, Serra dos Carajás, Serra do Norte, clareira N-1, 18 abril 1970, *Cavalcante & Silva 2630* (HB, M, MG); Marabá, Serra Norte, vegetação de canga, próximo da pista de pouso do helicóptero, 17 Abril 1986, *Secco* et al. *721* (MG); Marabá, Serra dos Carajás, campo, arredores do aeroporto, 3 Abril 1977, *M.G. Silva & Bahia 3009* (MG); Marabá, Serra dos Carajás, 23 km W of AMZA, camp N-5, 16 Maio 1982, *Sperling* et al. *5719* (K, MG). GUIANA FRANCESA: Montagnes de la Trinité, sommet nordest, savane roche sur face ouest, 400 m, 22 janeiro 1984, *Granville* et al. *6194* (RENZ, U); Montagne des Nouragues, bassin de l'Aratayc, sommet, savane roche, 1 junho 1989, *Sarthou 537* (RENZ); Monts Bakra, 1,5 km à Ouest du Pic Coudreau, 52º57'N, 3º18'W, 560 m, 18 junho 2002, *Granville* et al. *14850* (G, P); Massif des Emerillons, zone centrale, savane roche exposée au Sud sur le flanc d'une colline granitique, 300 m, 10 setembro 1980, *Granville 3801* (P); Inselberg Trinité, 4º35'N, 53º21'W, savane-roche, 6 maio 1998, *Villiers & Sarthou 6238* (P); Montagne des Nomagues, 411 m, 14 junho 1988, *Sarthou 324* (P).

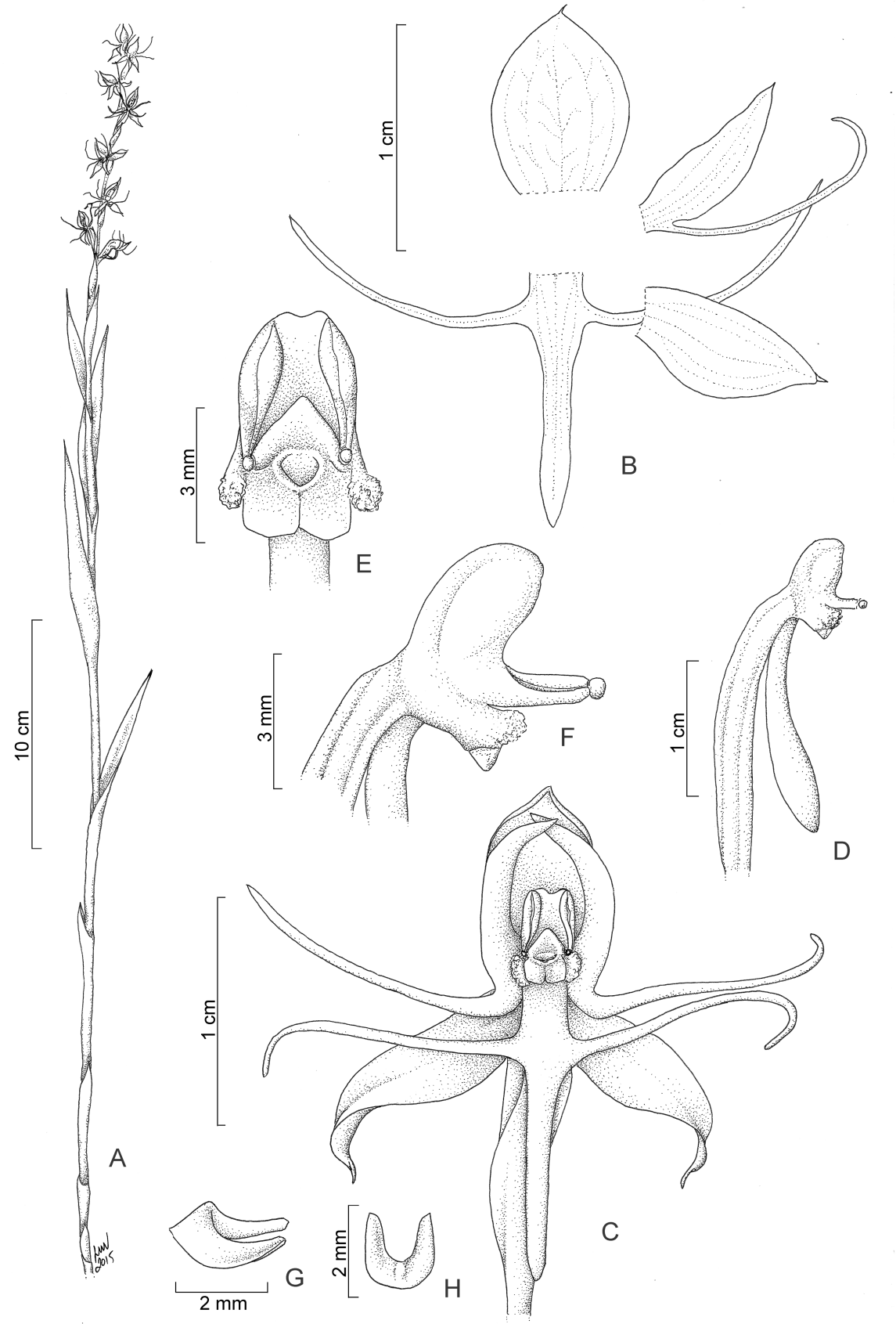



Figura 4. *Habenaria septentrionalis* sp. nov. A. Hábito. B. Perianto. C. Flor, vista frontal. D. Ovário, cálcar e ginostêmio, vista lateral. E. Ginostêmio, vista frontal. F. Ginostêmio, vista lateral. G. Rostelo, vista lateral. H. Rostelo, vista frontal. Ilustração de L. Menini Neto a partir de *J.A.N. Batista 1186***.**

***Habenaria oreadica*** A.A.Vale & J.A.N.Bat., *sp. nov*. Tipo: Brasil. Distrito Federal: Fazenda Sucupira (Embrapa-Cenargen), no entorno dos Bairros Riacho Fundo II e Riacho Fundo, entre o o Recanto das Emas e o Núcleo Bandeirante, área do SPSB, a direita da mata do córrego do Riacho Fundo, no entorno entre este e a mata do Açudinho, , 19 Abril 1999, *J.A.N. Batista 927* (Holótipo: CEN) (Fig. 5)

Ervas terrestres. Raízes poucas, longas, 1,0–1,3 mm larg., pilosas. Túbera não vista. Caule ereto, 93–155 cm compr., incluída a inflorescência, 2,8–4,4 mm larg. Folhas 9–14, parcialmente adpressas ao caule, as maiores na região mediana do caule, linear-lanceoladas ou lanceoladas, estreitas, ápice estreitamente agudo, margens verdes ou esbranquiçadas. 6,0–27,3 x 0,6–1,2 cm. Inflorescência 17,2–43 cm compr., poucas a muitas flores, laxa, espiralada; brácteas lanceoladas, amplamente elípticas ou orbiculares, ápice longo acuminado, 13,8–45,5 x 8,5–10,0 mm, lisas, verdes, do mesmo tamanho ou maiores que o ovário pedicelado. Flores 19–35, medianas; ovário pedicelado paralelo ao caule, reto, levemente arqueado no ápice, 12,0–15,2 mm compr., pedicelo 1,3–2,0 mm compr. Sépalas verdes, glabras, ápice agudo, apiculado, margem verde; sépala dorsal concava, elíptica quando achatada, amplamente elíptica ou quase arredondada, ápice agudo, 6,7–9,0 x 6,5–7,3 mm; sépalas laterais obliquamente lance-ovadas ou estreitamente elípticas, reflexas ou com ápice reflexo, ápice agudo, apiculado, levemente convexas, 7,3–9,2 x 2,7–4,0 mm. Pétalas bipartidas, segmento posterior lanceolado, glabro, 6,5–8,1 x 1,5–2,2 mm, aderente à sépala dorsal, ápice agudo; segmento anterior perpendicular em relação à base do segmento posterior com ápice ereto, linear-filiforme, inserido na base do segmento posterior, glabro, 7,0–8,5 mm x 0,6–0,8 mm, aproximadamente do mesmo comprimento do segmento posterior. Labelo tripatido, parte basal indivisa curta, 0,6–1 x 2,3–3,0 mm; segmentos laterais perpendiculares ao segmento mediano, linear-filiformes, glabros, ápice ereto, 7,9–10,2 x 0,5–0,9 mm, com aproximadamente do mesmo comprimento que o segmento mediano; segmento mediano ensiforme, deflexo, geniculado, 7,0–8,3 mm x 1,0–1,5 mm, glabro, ápice agudo; cálcar deflexo, totalmente ou parcialmente coberto pelas brácteas, oblongo com ápice agudo, mais curto ou do mesmo tamanho que o ovário pedicelado, 8,1–11,5 x 2,1–2,8 mm; base 0,9–1,3 mm larg., ápice 1,3–1,9 mm larg. Coluna ereta, 3,4–4,4 mm alt.; conectivo retuso, estreito, 0,5–0,8 larg.; aurículos verdes, carnosos, verrucosos, 1,1–1,5 x 2,1–2,7 mm larg., ápice truncado. Lóculos da antera 1,7–2,3 mm alt., canais curtos, 1,0–1,9 mm compr.; hemipolinários 2, separados, 2,4–3,1 mm compr.; viscídios arredondados, 0,3–0,4 x 0,5–0,7 mm, com distância 1,2–2,0 mm entre eles; caudículos 1,5–2,2 mm compr., políneas 1,6–2,2 x 1,49–1,77 mm. Lobos estigmáticos 2, estreitamente paralelos, oblongos, 2,0–2,8 mm compr.; superfície receptiva plana ou levemente convexa, voltada para frente, 1,2–1,5 mm compr., ápice truncado, 2,2–2,6 mm larg., margens internas espessadas, glabros, sem protuberâncias, espaço entre os lobos circular. Rostelo 2,0–3,3 mm compr., lobo mediano 1,3–2,3 mm alt., 1,0–1,3 mm compr., triangular, carnoso, ápice agudo, ereto, parcialmente projetado além dos lóculos da antera; lobos laterais paralelos em toda a extensão, 1,4–1,8 mm compr., base 0,6–0,9 mm larg.; ápice 0,3–0,5 mm larg. Fruto não visto.

**Etimologia:** Na mitologia grega, as oréades são ninfas das montanhas, além de ser o nome dado aos cerrados por C.F.P. Martius (Rizzini, 1979). O epíteto específico se refere ao fato da espécie ser encontrada somente neste domínio fitogeográfico brasileiro, em áreas de cerrado *s.s.* no Distrito Federal.

**Distribuição:** Restrita ao Brasil sendo conhecida até o momento apenas do Distrito Federal, na região central do páis. Considerando a distribuição conhecida e o tipo de habitat é bastante provável que a espécie também ocorra em Goiás e Minas Gerais (Figura 12).

**Habitat e fenologia:** A espécie ocorre em cerrado ralo, campo sujo ou campo limpo, ou em áreas de transição de cerrado com mata de galeria, em latossolo argiloso, avermelhado, profundo, seco. Floresce no final da estação seca em abril.

**Notas taxonômicas:** Esta espécie apresenta morfologia floral bastante similar a outras do complexo, como *H. nuda*, *H. pseudonuda* e *H. adpressifolia*, incluindo os aurículos bem desenvolvidos, largos, que lateralmente encobrem a base dos lóculos da antera, os canais das anteras e os lobos estigmáticos. Diferencia-se pelo porte alto, com as plantas variando de 93–155 cm de altura, incluindo a inflorescência, a inflorescência longa e pelo ambiente de ocorrência, sendo a única espécie do complexo *H. nuda* que ocorre em cerrado sensu estrito, em latossolo avermelhado.

**Espécimes adicionais examinados:** BRASIL. **Distrito Federal:** Brasília, Estação Ecológica do Jardim Botânico, 21 Abril 2006, *Salles* et al. *4192* (HEPH); Brasília, Fazenda Água Limpa próximo à Vargem Bonita, 29 Abril 1976, *Ratter & Fonseca 2967* (UB); Brasília, Fazenda Sucupira (Embrapa-Cenargen) entre Riacho Fundo e o Recanto das Emas, 15 Abril 1998, *Batista & Bianchetii 791* (CEN); Brasília, Parque Nacional de Brasília, 19 Abril 2007, *Dias* et al. *596* (CEN); Brasília, Reserva Ecológica do IBGE, mata do Taquara, 15º57’18’’S, 47º53’25 W, 1127 m, 03 Abril 2003, *Rezende* et al. *865* (CEN); Brazlândia, 28 Abril 1992, *Filgueiras 2296* (IBGE); Sobradinho, Embrapa, 15º39’35’’S, 47º43’25’’, 1110 m, 20 Abril 2009, *Meneguzzo* et al. *129* (BHCB).

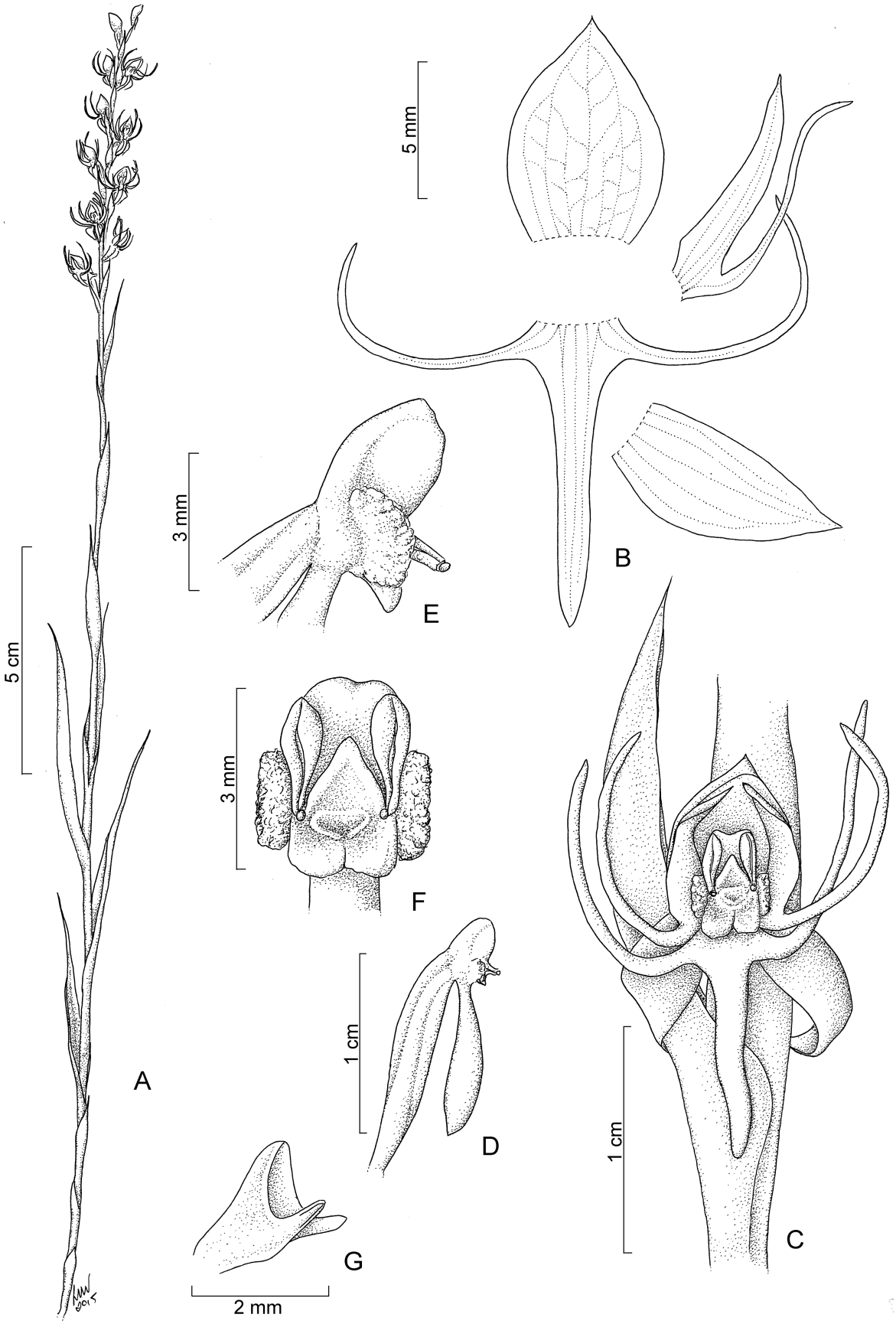



Figura 5. *Habenaria oreadica* sp. nov. A. Hábito. B. Perianto. C. Flor, vista frontal. D. Ovário, cálcar e ginostêmio, vista lateral. E. Ginostêmio, vista lateral. F. Ginostêmio, vista frontal. G. Rostelo, vista lateral. Ilustração de L. Menini Neto a partir de *J.A.N. Batista 927*.

***Habenaria proiteana*** A.A.Vale & J.A.N.Bat., sp. nov. Tipo: Brasil. Goiás: Alto Paraíso de Goiás, Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, margem da trilha em direção e próximo as corredeiras do Rio Preto, 3 de Janeiro 2008, *J.A.N. Batista, K. Proite & P. Proite 2376* (Holótipo: BHCB; isótipos: CEN, RB, SP) (Fig. 6)

Ervas terrestres. Raízes poucas, longas, 0,9–1,6 mm larg., esparsamente pilosas. Túbera não vista. Caule ereto, 31–64 cm compr. incluíndo a inflorescência, 1,7–2,5 mm larg. Folhas 4–7, parcialmente adpressas ao caule, as maiores na região mediana do caule, lineares, estreitas, ápice agudo ou acuminado, verdes, 2,6–12 x 0,2–0,7 cm. Inflorescência 9–23 cm compr., poucas flores, laxa, espiralada. Brácteas ovadas ou ovado-lanceoladas, amplamente elípticas ou orbiculares, ápice acuminado, 15,3–32,2 x 3,7–8,1 mm, lisas, verdes, mais curtas que o ovário pedicelado. Flores 3–8, medianas; ovário pedicelado ascendente, arqueado, 15,0–22,4 mm, pedicelo 2,5–2,8 mm compr. Sépalas verdes, glabras, ápice agudo ou agudo-acuminado, margens verdes, finamente denticuladas; sépala dorsal côncava, ovada ou elíptica quando achatada, ápice agudo, 5,6–7,5 x 4,2–5,4 mm; sépalas laterais obliquamente falcadas, deflexas ou com ápice reflexo, ápice agudo-acuminado, levemente convexas, 6,8–9,6 x 2,6–3,8 mm. Pétalas bipartidas, segmento posterior falcado ou lanceolado-falcado, glabro, 5,3–7,7 x 1,5–2,1 mm, aderente à sépala dorsal, ápice agudo-acuminado; segmento anterior ereto, linear-filiforme, inserido pouco acima da base do segmento posterior, glabro, 10,9–15,7 mm x 0,3–1 mm, 2 x mais longo que o segmento posterior. Labelo tripatido, parte basal indivisa curta, 0,9–1,6 x 1,7–2,6 mm; segmentos laterais eretos, lineares, glabros, ápice ereto, 12,1–16,8 x 0,4–1,2 mm, 1,3 x mais longos que o segmento mediano; segmento mediano linear, reflexo, base voltada para frente, 8,1–10,4 mm x 0,9–1,4 mm, glabro, ápice agudo; cálcar deflexo ou com o ápice projetado para a frente, livre das brácteas, clavado, mais curto que o ovário pedicelado, 11,7–13,9 x 0,9–1,4 mm; base 1–1,3 mm larg., ápice 1,6–1,9 mm larg. Coluna ereta, 4,2–5,8 mm alt.; conectivo retuso, estreito, 0,5 larg.; aurículos verdes, carnosos, verrucosos, 0,5–0,9 x 0,8–1,6 mm larg., ápice truncado. Lóculos da antera 1,5–2,1 mm alt., canais curtos, 1,8–2,3 mm compr.; hemipolinários 2, separados, 2,2–3,8 mm compr.; viscídios arredondados, 0,2 x 0,3 mm, com distância 1,2 mm entre eles; caudículos 3,1–4 mm compr., políneas 1,4–2,1 x 0.9–1.5mm larg. Lobos estigmáticos 2, estreitamente paralelos, oblongos, 2,2–3,1 mm compr.; superfície receptiva levemente convexa, voltada para frente, 1,3–1,7 mm compr., ápice truncado ou arredondado, 1,6–2,3 mm larg., margens internas espessadas, glabros, sem protuberâncias, espaço entre os lobos elíptico. Rostelo 4,2–5,9 mm compr., lobo mediano 1,8–2,3 mm alt., 1,1–1,4 mm compr., triangular, carnoso, ápice estreitamente agudo, ereto, parcialmente projetado além das anteras; lobos laterais paralelos e voltados para cima, 2,5–3,7 mm compr., base 0,9–1 mm larg.; ápice 0,4–0,6 mm larg. Fruto não visto.

**Etimologia:** O epíteto específico homenageia Karina Proite e Paulo Proite, pelo companheirismo, ajuda em campo, pela contribuição em ínumeras coletas e por terem encontrado a população utilizada para caracterizar e descrever a espécie.

**Distribuição:** Restrita ao Brasil e conhecida apenas da Chapada dos Veadeiros, no estado de Goiás (Figura 11).

**Habitat e fenologia:** Ocorre em campo rupestre, em solo arenoso, seco ou em campo limpo estacionalmente úmido, em solo humoso, escuro, temporariamente úmido. Floresce durante a estação chuvosa, em dezembro e janeiro.

**Notas taxonômicas:** *Habenaria proiteana*, *H. australis* e *H. rodriguesii* apresentam o segmento anterior da pétala inserido alguns milímetros acima da base do segmento posterior, e não na base como ocorre nas outras espécies do complexo *H. nuda* e na grande maioria das espécies de *Habenaria* neotropicais. No entando *H. proiteana* diferencia-se destas espécies nos seguintes caracteres: segmento lateral da pétala proporcionalmente mais longo (2,2-2,8 vezes mais longo do que o segmento posterior versus 1,2-1,8 vezes mais longo do que o segmento posterior em *H. australis*), calcar fortemente genuflexo (versus calcar reto ou apenas ligeiramente arqueado em *H. australis* e *H. rodriguesii*). Além destas três espécies do complexo *H. nuda*, apenas outras duas espécies neotropicais também apresentam este mesmo caractere: *H. secundilfora* e *H. meeana* Toscano. Entretanto *H. secundiflora* tem flores menores (4-6 x 3-4,5 mm), os segmentos laterais do labelo pendentes e os hemipolinários unidos pelo viscidio, enquanto *H. meeana* também tem flores menores (sépala dorsal 5-6 x 3-4 mm), o segmento anterior da pétala inserido apenas cerca de 2 mm acima da base do segmento posterior, e sépalas laterais e e segmentos do labelo fortemente reflexos, abraçando o ovário.

**Espécimes adicionais examinados:** BRASIL. **Goiás:** Alto Paraíso de Goiás, rodovia para Colinas, Rio das Cobras, 2 Dezembro 1992, *Hatschbach* et al. *58383* (MBM); Alto Paraíso de Goiás, Chapada dos Veadeiros, GO-239, entre Alto Paraíso e São Jorge, cerca de 3,1 km após a entrada para a fazenda São Bento, 30 dezembro 2010, *Batista & Bianchetii 3101* (BHCB).

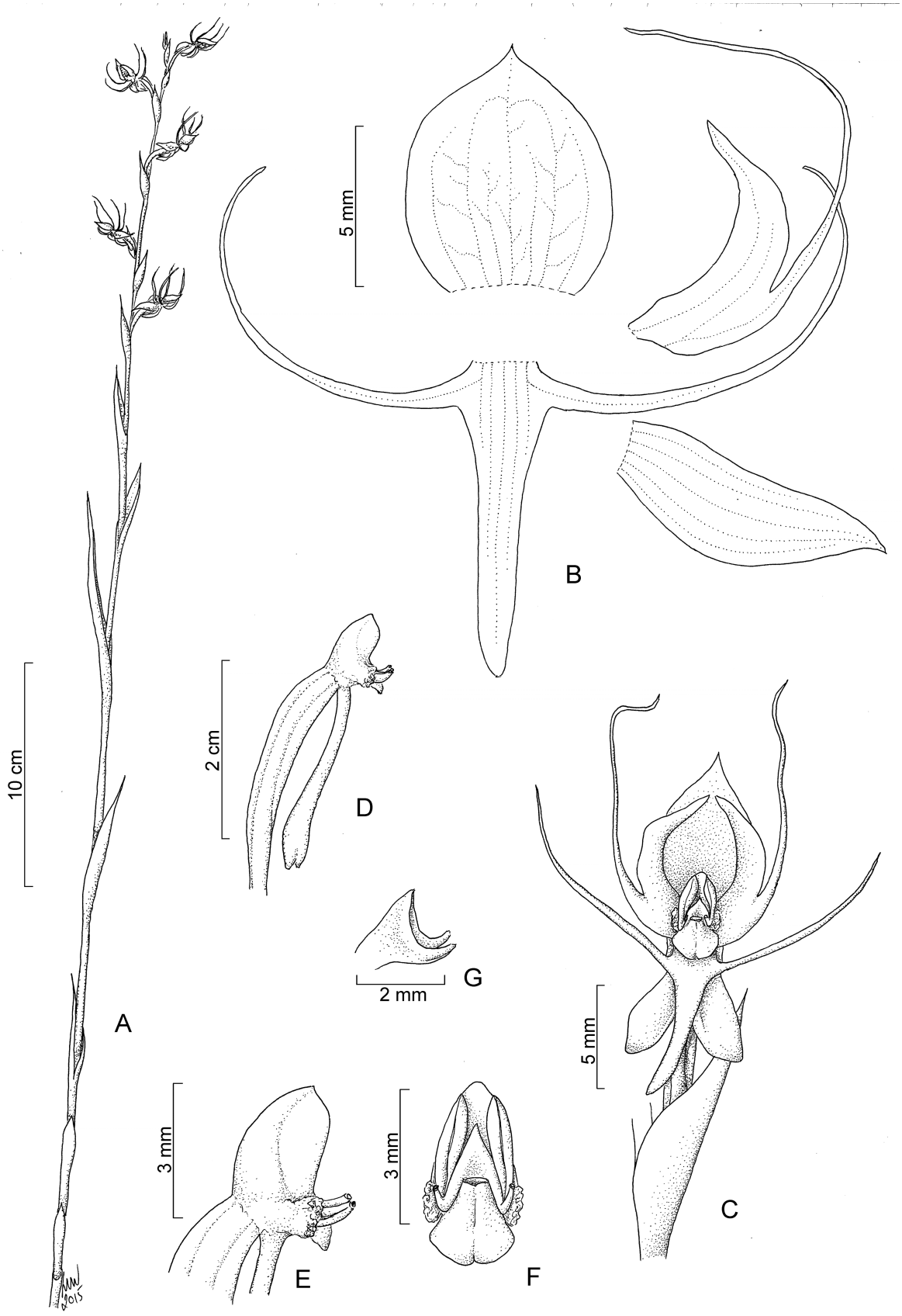



Figura 6. *Habenaria proiteana* sp. nov. A. Hábito. B. Perianto. C. Flor, vista frontal. D. Ovário, cálcar e ginostêmio, vista lateral. E. Ginostêmio, vista lateral. F. Ginostêmio, vista frontal. G. Rostelo, vista lateral. Ilustração de L. Menini Neto a partir de *J.A.N. Batista 2376*.

***Habenaria pseudonuda*** A.A.Vale & J.A.N.Bat., *sp. nov*. Tipo: Diamantina, entre Macacos e São João da Chapada, 8 Março 2009, *J.A.N. Batista 2869* (Holótipo: BHCB; isótipo: CEN) (Fig. 7)

Ervas terrestres. Raízes não vistas. Túbera não vista. Caule ereto, 37,3–95 cm compr., incluída a inflorescência, 2,1–2,5 mm larg. Folhas 5–7, parcialmente adpressas ao caule, as maiores na região mediana do caule, linear-lanceoladas ou lanceoladas, estreitas, ápice agudo ou acuminado, margem esbranquiçada, 25,8–134,6 x 3,9–8,4 mm larg. Inflorescência 14–19 cm compr., poucas flores, laxa, espiralada; brácteas ovadas ou elípticas, ápice acuminado ou longo acuminado, 22,5–28,6 x 6,1–7,9 mm, lisas, verdes, iguais ou pouco maiores do que o ovário pedicelado. Flores 5–10, medianas; ovário pedicelado ascendente, levemente arqueado, 18,9–19,1 mm long., pedicelo 3,4–4,2 mm compr. Sépalas verdes, lisas, ápice agudo, margens verdes; sépala dorsal concava, ovada ou elíptica quando achatada, ápice agudo, 7,6–8,6 x 4,9–5,9 mm; sépalas laterais obliquamente lanceoladas, deflexas com ápice reflexo, ápice agudo, levemente convexas, 8,3–9,9 x 3,0–3,5 mm. Pétalas bipartidas, segmento posterior lanceolado, glabro, 7,7–8,5 x 1,9–2,3 mm, aderente ou livre da sépala dorsal, ápice agudo; segmento anterior ereto, linear-filiforme, inserido na base do segmento posterior, glabro, 9,7–13,5 x 0,5–0,9 mm, 1,4 vezes maior que o segmento posterior. Labelo tripatido, parte basal indivisa curta, 1,3–1,9 x 2,2–3,0 mm; segmentos laterais perpendiculares ao segmento mediano, ápice ereto, linear-filiformes, glabros, ápice agudo, 9,9–12,2 x 0,7–1,0 mm, 1,4 vezes maiores que o segmento mediano; segmento mediano ensiforme, deflexo, 9,3–10,3 mm x 1,1–1,6 mm, glabro, ápice agudo; cálcar deflexo, totalmente ou parcialmente coberto pelas brácteas, clavado, mais curto que o ovário pedicelado, 8,7–12,9 x 1,1–1,7 mm, base 0,5–0,9 mm larg., ápice 1,1–1,5 mm larg. Coluna ereta, 2,8–4,1 mm alt.; conectivo retuso, estreito, 0,5–0,7 mm larg.; aurículos verdes, carnosos, verrucosos, 0,5–0,9 x 0,7–1,4 mm, ápice truncado. Lóculos da antera 1,2–1,5 mm alt., canais curtos, 1,3–1,5 mm compr.; hemipolinários 2, separados, 2,7–3,0 mm compr.; viscídios arredondados, com distância 1,0-1,3 mm entre eles; políneas 1,1–1,4 x 0,9–1,1 mm. Lobos estigmáticos 2, estreitamente paralelos, oblongos, 1,9–2,6 mm compr.; superfície receptiva convexa ou plana, voltada para frente, 1,4–1,6 mm compr.; ápice truncado, 1,3–2,0 mm larg., margens internas espessadas, glabros, sem protuberâncias, espaço entre os lobos cordiforme. Rostelo 1,9–3,1 mm compr., lobo mediano 1,4–1,6 mm alt., 0,8–1,0 mm compr., triangular, carnoso, ápice agudo ou estreitamente agudo, voltado para frente, entre os lóculos da antera; lobos laterais paralelos em toda extensão, 1,2–2,1 mm compr.; base 0,5–0,8 mm larg., ápice 0,2–0,54 mm larg. Fruto não visto.

**Etimologia:** O nome da espécie refere-se ao fato da mesma ter sido confundida com *H. nuda* por ser muito similar à mesma.

**Distribuição** Restrita ao Brasil ocorrendo nas regiões central e na Cadeia do Espinhaço no estado de Minas Gerais (Figura 11).

**Habitat e fenologia:** Ocorre em campo rupestre, em solo raso, arenoso, seco, geralmente com cascalho sobre a superfície e associado a afloramentos rochosos quartziticos. Floresce no final da estação chuvosa, entre março e maio.

**Notas taxonômicas:** Esta espécie assemelha-se bastante a *H. nuda* e durante algum tempo achamos que se tratava desta espécie. Todavia, *H. pseudonuda* ocorre em campo rupestre seco (versus campo inundável para *H. nuda*), apresenta em média plantas com porte maior (37-75 cm de altura versus 26–45 cm em *H. nuda*), auriculos menores (0,5–0,9 x 0,7–1,4 mm versus 0,9–1,4 x 1,6–2,2 mm) e verdes (versus amarelos), lobo mediano do rostelo com ápice agudo (versus obtuso), conectivo apiculado (versus emarginado), margem interna dos lobos estigmáticos circundando a abertura para o calcar lisa, não involuta (versus espessada e involuta).

**Espécimes adicionais examinados:** BRASIL. **Minas Gerais:** Barão de Cocais, Mina do Gongo Soco, Barragem de Rejeito, 19º58’29’’S, 43º36’11’’, 868 m, 7 Maio 2008, *Rezende* et al. *2664* (BHCB); Rio Pardo de Minas, Distrito de Serra Nova, Parque Estadual da Serra Nova, 15º39’37,5’’S, 42º45’53,7’’W, 1000-1230 m, 13 Março 2007, *Salino* et al. *11743* (BHCB); Rio Pardo de Minas, Distrito de Serra Nova, Parque Estadual da Serra Nova, 15º39’13’’S, 42º45’10’’W, 1119 m, 22 Março 2012, *Goes-Neto* et al. *684* (BHCB).

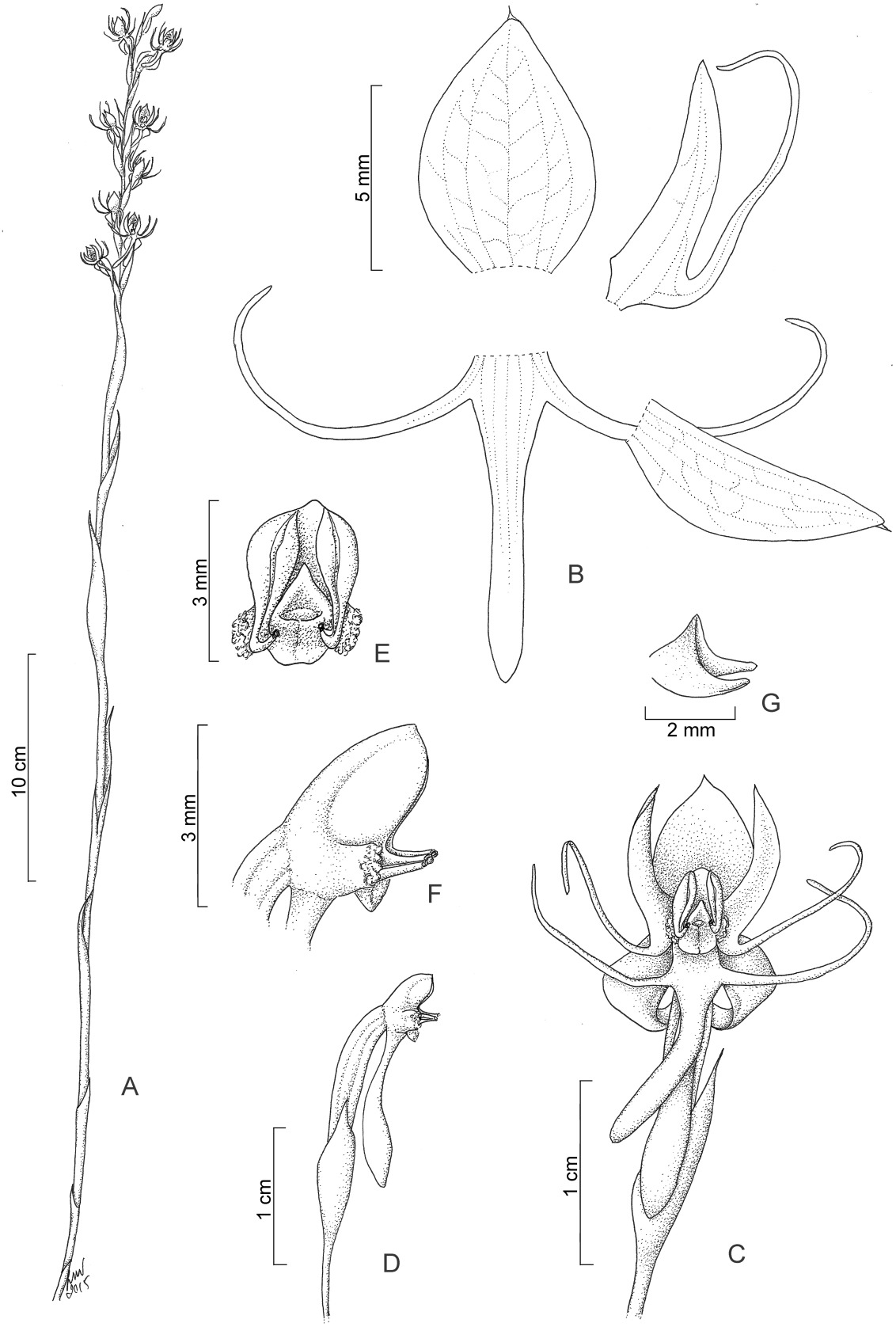



Figura 7. *Habenaria pseudonuda* sp. nov. A. Hábito. B. Perianto. C. Flor, vista frontal. D. Ovário, cálcar e ginostêmio, vista lateral. E. Ginostêmio, vista frontal. F. Ginostêmio, vista lateral. G. Rostelo, vista lateral. Ilustração de L. Menini Neto, a partir de *J.A.N. Batista 2869*.

***Habenaria nuda*** Lindl., Gen. Sp. Orchid Pl. 312. 1835. Tipo: Brasil. Minas Gerais: *s.d.*, *s.l.*, *C.F.P. Martius s.n.* (Holótipo: M; isótipos: W [fragmento do holótipo e reprodução da ilustração do holótipo feito por Lindley], K-L [ilustração do holótipo feita por Lindley]). (Fig. 8)

Ervas terrestres. Raízes não vistas. Túbera não vista. Caule ereto, 26–45 cm compr., incluíndo a inflorescência, 1,5–3,3 mm larg. Folhas 4–7, parcialmente adpressas ao caule, as maiores na região mediana do caule, estreitas, linear-lanceoladas, ápice estreitamente agudo, margens verdes, 4,7–14,4 x 0,28–0,87 mm. Inflorescência 8,6–19,6 cm compr., poucas a muitas flores, laxa, espiralada; brácteas obovadas ou orbiculares, ápice acuminado, 11,5–17,6 x 5,3–6,9 mm, lisas, verdes, mais curtas que o ovário pedicelado. Flores 6–17, medianas, ovário pedicelado patentes em relação ao caule, reto e levemente arqueado no ápice, 9,9–20,9 mm compr., pedicelo 1,2–4,1 mm compr. Sépalas verdes, finamente denticuladas, ápice agudo e mucronado, margens verdes; sépala dorsal côncava, elíptica ou amplamente elíptica quando achatada, ápice agudo, 6,3–8,6 x 5–5,5 mm; sépalas laterais obliquamente lance-ovadas ou obliquamente lanceoladas, reflexas ou com ápice reflexo, ápice agudo, levemente convexas, 6,9–10,9 x 2,5–3,2 mm. Pétalas bipartidas, segmento posterior lanceolado ou falcado, glabro, 5,4–7,2 x 1,5–2,1 mm, aderente à sépala dorsal, ápice agudo; segmento anterior ereto, linear-filiforme, inserido na base do segmento posterior, glabro, 7,6–15,5 mm x 0,5–0,8 mm, ¼ até 2 vezes maior que o segmento posterior. Labelo tripatido, parte basal indivisa curta, 0,9–2,0 x 2,0–2,4 mm; segmentos laterais perpendiculares ao segmento mediano, ápices eretos, linear-filiformes, glabros, ápice agudo, 7,9–15,2 x 0,6–0,8 mm larg., aproximadamente o mesmo comprimento ou 1,3 vezes mais longos que o segmento mediano; segmento mediano ensiforme, deflexo, 6,0–11,5 x 0,9–1,4 mm, glabro, ápice agudo; cálcar deflexo, ápice levemente projetado para frente, total ou parcialmente coberto pelas brácteas, linear com ápice fusiforme, mais curto que o ovário pedicelado, 7,1–11,3 x 1,0–1,5 mm larg., base 0,7–1,0 mm larg., ápice 0,9–1,5 mm larg. Coluna ereta, 3,5 mm alt.; conectivo emarginado, estreito, 0,2–0,5 mm; aurículos amarelos, carnosos, verrucosos, 0,9–1,4 x 1,6–2,2 mm, ápice truncado. Lóculos da antera 1,0–1,9 mm alt., canais curtos, 1,2–1,7 mm compr.; hemipolinários 2, separados, 2,0–3,0 mm compr.; viscídios arredondados, 0,2-0,4 x 0,3-0,4 mm, com distância 1,1–1,5 mm entre eles; caudículos 1,2–1,7 mm compr.; políneas 1,0–1,8 x 0,9–1,4 mm. Lobos estigmáticos 2, estreitamente paralelos, oblongos, 2,1–3,1 mm compr., superfície receptiva plana, voltada para frente, 1,1–2,2 mm compr., ápice truncado, 1,8–2,7 mm larg., margens internas involutas, glabros, com espessamento na entrada do calcar, espaço entre os lobos elíptico. Rostelo 1,3–1,8 mm compr., lobo mediano 1,2–1,4 mm alt., 0,8–1,1 mm compr., triangular, carnoso, ápice obtuso ou agudo, ereto, completamente disposto entre os lóculos da antera; lobos laterais paralelos em toda a extensão, 1,3–2,0 mm compr. base 0,5–0,7 mm larg., ápice 0,3–0,5 mm larg. Fruto não visto.

**Distribuição:** Restrita ao Brasil nos estados de Goiás e Minas Gerais (Figura 11).

**Habitat e fenologia:** Ocorre em campo limpo estacionalmente úmido, em solo humoso, escuro, geralmente com água sobre a superfície durante o período chuvoso, mas que secam em maior ou menor grau durante a estação seca. Floresce do meio para o final da estação chuvosa, durante fevereiro e março.

**Notas taxonômicas:** Este foi o primeiro táxon descrito do complexo, em 1835 por Lindley. O estado avançado de maturação das flores no holótipo e a descrição original suscinta impossibilitaram uma caracterização detalhada da espécie. A associação deste fato com a diversidade de táxons no complexo e a grande semelhança morfológica entre eles, resultou em uma situação confusa, onde nenhum dos autores posteriores que identificaram material do complexo souberam reconhecer a identidade de *H. nuda* e aplicaram o nome a táxons distintos. Para elucidar a identidade desta espécie foi necessário coletar, caracterizar e descrever todos os morfotipos do complexo e compara-los detalhadamente com os dados originais disponíveis, incluindo o material tipo, a descrição original e a ilustração do tipo feita por Lindley. Com base nesta análise *H. nuda* apresenta plantas de tamanho mediano, que ocorrem em campo limpo úmido e florescem do meio para o final da estação chuvosa. No tamanho das flores e morfologia do perianto *H. nuda* é muito semelhante a outras espécies do complexo como *H. pseudonuda*, *H.oreadica*, *H. septentrionalis* e *H. adpressifolia*. Caracteres distintivos são as sépalas distintamente apiculadas e com margem denticulada (margem lisa na *H. pseudonuda*, *H. oreadica* e *H. adpressifolia*), os aurículos bem desenvolvidos e amarelos (versus pequenso e brancos na *H. septentrionalis*, verdes em *H. pseudonuda* e *H. oreadica*), e margem interna dos lobos estigmáticos espessadas, formando uma quilha bem pronunciada (versus liso ou pouco espessado, sem uma quilha aparente nestas outras espécies).

**Espécimes adicionais examinados:** BRASIL. **Goiás:** Teresina de Goiás, Chapada dos Veadeiros, GO-118, km 204, 37 km após Alto Paraíso de Goiás, 25 março 2001, *Batista* et al. *1217* (CEN). **Minas Gerais:** Diamantina, Parque Nacional das Sempre Vivas, Campos de São Domingos, 17º54'48,1''S, 43º47'20,7''W, 1260 m, 6 Março 2009, *Batista* et al. *2839* (BHCB); Diamantina, Parque Nacional das Sempre Vivas, Campos de São Domingos, 17º54'07,2''S, 43º46'51,9''W, 1258 m, 7 Março 2009, *Batista* et al. *2860* (BHCB); Diamantina, Rodovia sentido Montes Claros-Diamantina, cerca de 15 km da cidade, 11 Fevereiro 2001, *Pansarin & Simões 787* (CEN, UEC); Serra do Cipó, entroncamento para Morro do Pilar km 128 em direção a Coinceição do Mato Dentro, 13 Março 1999, *Batista & Bianchetti 916* (CEN); Serra do Cipó, 9 km após a ponte sobre o córrego Vitalino, km 118, na direção de Conceição do Mato Dentro, próxima da estátua, 12 Março 1999, *Batista & Bianchetti 897* (CEN).

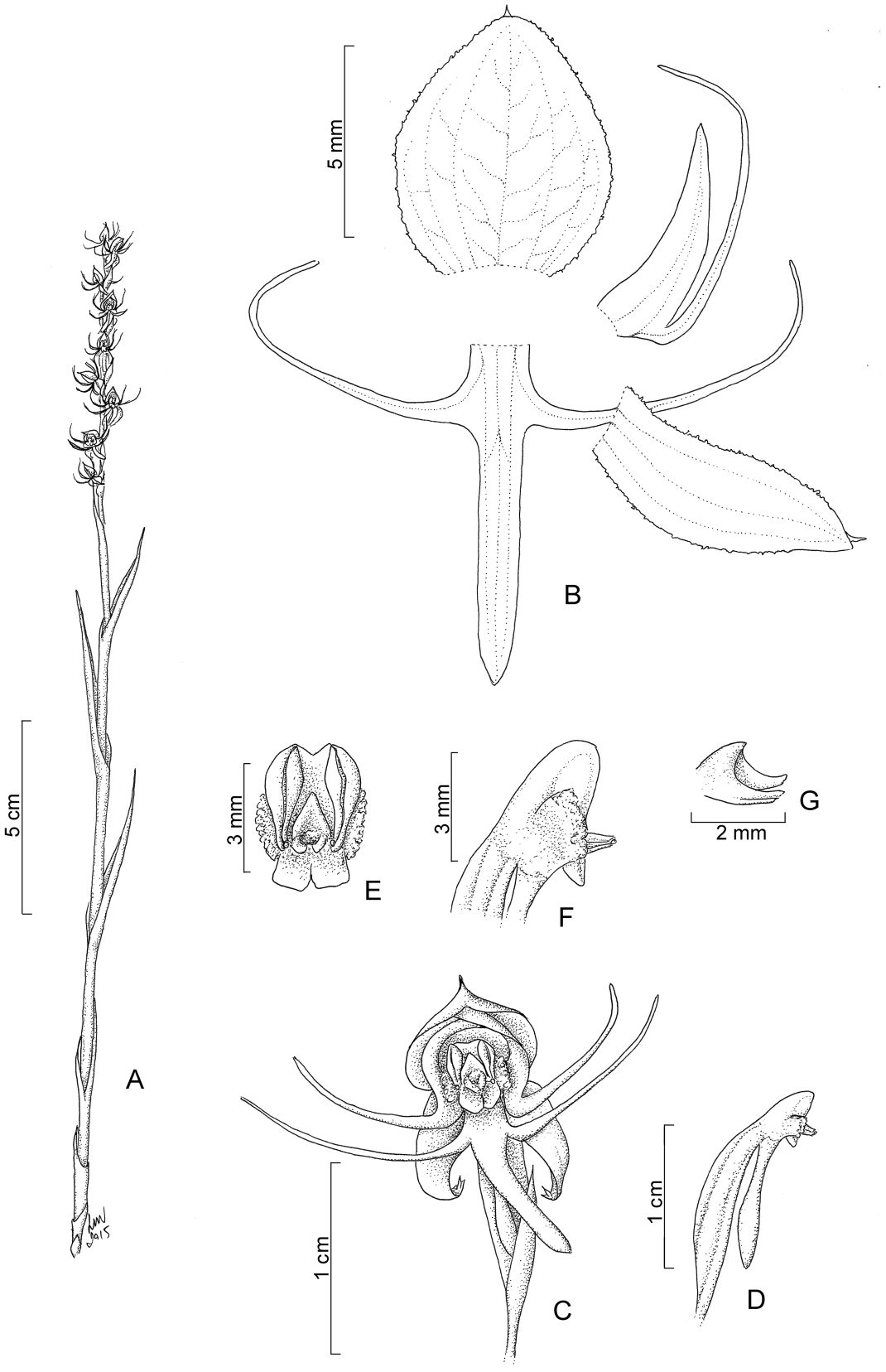



Figura 8. *Habenaria nuda* Lindl. A. Hábito. B. Perianto. C. Flor, vista frontal. D. Ovário, cálcar e ginostêmio, vista lateral. E. Ginostêmio, vista frontal. F. Ginostêmio, vista lateral. G. Rostelo, vista lateral. Ilustração de L. Menini Neto a partir de *J.A.N. Batista 897*.

***Habenaria rodriguesii*** Cogn., Fl. Bras. 3(4): 43, t. 7, f. 3. 1893. *Habenaria muricata* Barb.Rodr., Gen. Sp. Orchid. 2: 255. 1882, *nom. illeg.*, *non* (Schauer) Rchb.f., 1857. Tipo: Brasil. Minas Gerais, Capão redondo, próximo de São João del Rei, s.d., *Barbosa Rodrigues s.n.* (Holótipo: desconhecido, perdido; lectótipo (designado por Batista et al. 2011b): Barbosa Rodrigues Iconographie des Orchidées du Brésil , v. 1, t. 10b, RB, cópia K; reproduzido por Sprunger, 1996: 1: 63B). (Fig. 9)

Ervas terrestres. Raízes não vistas. Túbera não vista. Caule ereto, 36–60 cm compr., incluíndo a inflorescência, 2,0–3,5 mm larg. Folhas 5–9, parcialmente adpressas ao caule, as maiores na região mediana do caule, linear-lanceoladas ou lanceoladas, estreitas, ápice agudo, acuminado ou longo acuminado, margem branca, 37,8–192,5 x 4,0–10,1 mm. Inflorescência 10,8–17,3 cm compr., poucas a muitas flores, laxa, espiralada; brácteas ovadas, elípticas, ápice longo acuminado, 22,7–31,2 x 8,8–13,2 mm, lisas, margens brancas, aproximadamente do mesmo tamanho do ovário pedicelado. Flores 3–13, grandes; ovário pedicelado ascendente ao caule, reto, 18,7–28,3 mm compr., pedicelo 2,4–4,3 mm compr. Sépalas verdes, finamente denticuladas, ápice agudo e apiculado, margens verdes; sépala dorsal côncava, ovada ou elíptica quando achatada, ápice agudo, 9,9–13,2 x 7,3–8,4 mm; sépalas laterais obliquamente lance-ovadas, lanceoladas ou elípticas, reflexas com ápice curvado, ápice agudo, apiculado, fortemente convexas, 9,9–14,6 x 3,9–5,6 mm. Pétalas bipartidas, segmento posterior lanceolado-falcado, glabro, 8,9–12,6 x 2,6–2,9 mm, aderente à sépala dorsal, ápice agudo; segmento anterior ereto com ápice curvado para o centro, linear-filiforme, inserido a poucos mm da base do lobo posterior, glabro, 17,6–27,2 x 0,8–1,2 mm, 3 vezes maior que o segmento posterior. Labelo tripatido, parte basal indivisa curta, 1,3–1,9 x 2,8–4,0 mm; segmentos laterais eretos com ápice curvado para o centro, linear-filiformes, glabros, ápice agudo, 19,4–24,8 x 1,0–1,6 mm larg., 1,5 vezes mais longo que o segmento mediano; segmento mediano ensiforme, deflexo ou levemente curvado para trás, 11,3–15,8 x 1,5–2,0 mm larg., glabro, ápice agudo; cálcar levemente projetado para frente, parcialmente coberto pelas brácteas, clavado, mais curto ou do mesmo tamanho que o ovário pedicelado, 15,7–20,9, base 1,0–1,8 mm larg., ápice 3–4,1 mm larg. Coluna ereta, 5,2–6,8 mm alt.; conectivo retuso, estreito, 0,6–1,0 mm larg.; aurículos verdes, carnosos, verrucosos, 1,0–1,5 x 1,8–2,1 mm, ápice truncado. Lóculos da antera 2.6–3,9 mm alt., canais curtos, 1,7–1,9 mm compr.; hemipolinários 2, separados, 3,8–4,6 mm compr.; viscídios arredondados, 0,4–0,7 x 0,6–0,8 mm, com distância 1,8–2,5 mm entre eles; caudículos 2,5–3,2 mm compr.; políneas 2,5–3,7 x 1,8–2,6 mm. Lobos estigmáticos 2, estreitamente paralelos, oblongos, 3,1–4,2 mm compr.; superfície receptiva plana ou levemente côncava, voltada para frente, 1,8–2,2 mm compr., ápice truncado, 2,7–3,3 mm larg., margens internas espessadas, glabros, sem protuberâncias na entrada do calcar, espaço entre os lobos obovado ou circular. Rostelo 4,2–6,3 mm compr., lobo mediano 1,3–2,7 mm alt., 0,8–1,8 mm compr., triangular, carnoso, ápice agudo, ereto, completamente entre os lóculos da antera; lobos laterais paralelos em toda a extensão, 2,4–3,3 mm compr., base 1,1–1,4 mm larg., ápice 0,6–0,9 mm larg. Fruto não visto.

**Distribuição:** Restrita ao Brasil, ocorrendo no Distrito Federal e nos estados de Goiás e Minas Gerais (Figura 11).

**Habitat e fenologia:** Campo limpo seco e campo rupestre, geralmente associados a afloramentos rochosos quartziticos, em solo raso, areno-argiloso, seco. Floresce no final da

estação chuvosa, durante março e abril.

**Notas taxonômicas:** Após a sua descrição por Barbosa Rodrigues a identidade desta espécie sempre foi obscura e nenhum dos principais taxonomistas que examinaram e identificaram material do gênero brasileiro usaram este nome. Cogniaux (1893) não viu nenhum material da espécie e basicamente reproduziu a descrição e ilustração original de Barbosa Rodrigues. Hoehne (1940), que também não viu nenhum material da espécie, reproduziu a descrição da Flora Brasiliensis (Cogniaux 1893) e sugeriu que pudesse ser igual a *H. nuda*. No Orchidaceae Brasiliensis (Pabst & Dungs 1975) reproduziram a ilustração original da espécie. Mais recentemente, Renz (1992) ressuscitou o nome identificando material da Guiana Francesa como esta espécie, entretanto este material corresponde a *H. septentrionalis*. Um caractere diferencial na ilustração original de Barbosa Rodrigues é o segmento anterior da pétala inserido alguns milímetros acima da base do segmento posterior. Apenas outras duas espécies do complexo *H. nuda* apresentam esta característica, *Habenaria proiteana* e *H. australis*, mas que diferem em outros caracteres de *H. rodriguesii*. De modo similar a *H. nuda* a resolução da identidade desta espécie sõ foi possível após a comparação de todos os morfotipos com a descrição e ilustração original da espécie. *Habenaria rodriguesii* é bastante semelhante a *Habenaria nasuta*, ambas diferenciando-se das demais espécies do complexo pelo maior tamanho das flores e no tamanho absoluto dos segmentos laterais das pétalas e o labelo. Entretanto, *H. rodriguesii* diferencia-se facilmente pelo caractere citado acima, sendo que na *H. nasuta* o segmento anterior das pétalas está inserido na base do segmento posterior. As duas espécies apresentam distribuição, morfologia e ecologia similares, todavia na filogenia do complexo *H. nuda*, *H. rodriguesii* agrupa-se com alto suporte com *H. australis*, sendo que a principal similaridade entre ambas é a característica do segmento da pétala anterior inserido acima da base do segmento posterior. Este resultado sugere uma origem comum e a conservação deste caractere nestas espécies, provavelmente relacionado a polinização.

**Espécimes adicionais examinados:** BRASIL. **Distrito Federal:** Brasília, Fazenda Água Limpa, divisa com o Cristo Redentor (Jardim Botânico de Brasília) e o IBGE, 15º55’47,8”S, 47º54’22,5”W, 28 Março 2000, *Munhoz* et al. *989* (UB); Brasília, Estação Ecológica do Jardim Botânico de Brasília, 15º 52’00’’S, 47º 51’00’’W, 17 Março 2006, *Salles 4045* (HEPH); Brasília, Bacia do Rio São Bartolomeu, Quadrícula número 141, *Heringer* et al. *3951* (IBGE). **Goiás:** Luziânia, margem Rio Alagado, 16º16’20’’S, 48º11’40”W, 827 m, *Pereira-Silva* et al. *9917* (CEN). **Minas Gerais:** Belo Horizonte, Serra do Taquaril, 3 Março 1934, *Sampaio 7358* (BHCB); Moeda, Serra da Moeda, 20º16’24,2’’S, 43º57’29,6’’W, 21 Março 2012, *Vale & Batista 116* (BHCB); Ouro Branco, Serra de Ouro Branco, próximo às antenas, 28 Abril, 2012, *Vale* et al. *122* (BHCB); Santa Bárbara, Santuário do Caraça, Campo de Fora, 11 Abril 2012, *Vale & Formiga 121* (BHCB).

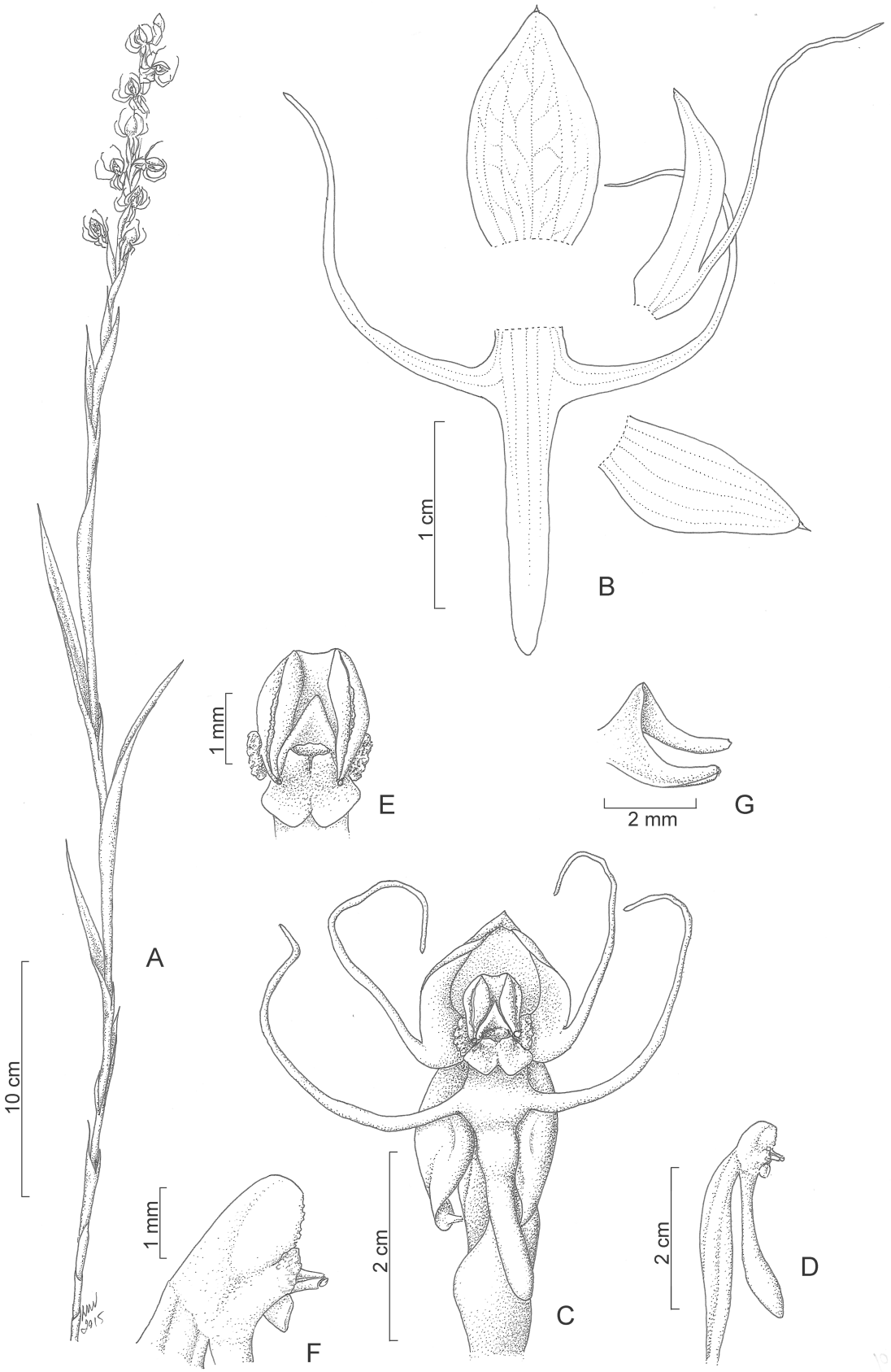



Figura 9. *Habenaria rodriguesii* Cogn. A. Hábito. B. Perianto. C. Flor, vista frontal. D. Ovário, cálcar e ginostêmio, vista lateral. E. Ginostêmio, vista frontal. F. Ginostêmio, vista lateral. G. Rostelo, vista lateral. Ilustração de L. Menini Neto a partir de *J.A.N. Batista 1970*.

***Habenaria nasuta*** Rchb. f. & Warm., Otia Bot. Hamburg 80. 1881. *Bertauxia nasuta* (Rchb.f. & Warm.) Szlach., Richardiana 4: 58. 2004. Tipo: Minas Gerais, Lagoa Santa, *s.d.*, *J.E.B. Warming s.n. (140)* (Holótipo: W-R [30471]; Isótipos: BR [642564], RENZ [foto e fragmento do holótipo]). (Fig. 10)

Ervas terrestres. Raízes não vistas. Túbera não vista. Caule ereto, 86-122cm compr., incluíndo a inflorescência, 4,1 mm larg. Folhas 11, parcialmente adpressas ao caule, as maiores na região mediana do caule, lanceoladas, estreitas, ápice agudo ou acuminado, margens brancas, 4,8–22,3 x 1,0–2,0 cm. Inflorescência 12-24,2 cm compr., poucas a muitas flores, laxa, espiralada; brácteas lanceoladas ou elípticas, ápice acuminado ou longo acuminado, 31,0–67,4 x 10,7–11,8 mm, lisas, margens brancas, mais curtas, iguais ou maiores que o ovário pedicelado. Flores (6)12-25, grandes; ovário pedicelado ascendente e inclinado, reto e fortemente arqueado no ápice, 31,9–40,0 mm compr., pedicelo 6,9–9,0 mm compr. Sépalas verdes, finamente denticulado no ápice, ápice agudo e apiculado; sépala dorsal côncava, ovada ou elíptica quando achatada, ápice agudo, 15,9–17,5 x 10,9–11,2 mm; sépalas laterais obliquamente lance-ovadas ou lanceoladas, reflexas com ápice curvado, ápice agudo, apiculado, fortemente convexas, 16,3–18,6 x 4,6–5,8 mm. Pétalas bipartidas, segmento posterior lanceolado, glabro, 18,3–20,3 x 2,1–2,4 mm, livre da sépala dorsal, ápice estreitamente agudo; segmento anterior ereto com ápice curvado para o centro, linear-filiforme, inserido na base do segmento posterior, glabro, 31,9–34,3 x 0,6–1,0 mm, 1,5 vezes maior que o segmento posterior. Labelo tripatido, parte basal indivisa curta, 1,2–1,5 x 3,3–3,9 mm; segmentos laterais eretos, ápice ereto ou curvado para o centro, linear-filiformes, glabros, ápice agudo, 50,1–51,2 x 0,7–1,2 mm, 3 vezes maiores que o segmento mediano; segmento mediano lanceolado, curvado para trás, 19,2–21,9 x 1,6–1,9 mm, glabro, ápice agudo; cálcar levemente projetado para frente, parcialmente coberto pelas brácteas, ápice clavado ou fusiforme, mais curto que o ovário pedicelado, 20,3–25,0 mm, base 1,2–1,6 mm larg., ápice 2,3–4,0 mm larg. Coluna ereta, 6,7–7,0 mm alt.; conectivo retuso, largo, 1,2–1,4 mm larg.; aurículos verdes, carnosos, verrucosos, 1,2–1.6 x 2,0–2,8 mm, ápice truncado. Lóculos da antera 2,9–3,4 mm alt., canais curtos, 2,7–3,1 mm compr; hemipolinários 2, separados, 4,5–4,9 mm compr.; viscídios arredondados, 0,7–0,9 x 0,9–1,0 mm, com distância 2,0–2,5 mm entre eles; caudículos 3,1–3,5 mm compr.; políneas 2,7–3,3 x 2,1–2,4 mm. Lobos estigmáticos 2, estreitamente paralelos, oblanceolados; 3,7–4,2 mm compr., voltados para frente, 2,6–2,8 mm compr., ápice truncado ou uncinado, 3,1–3,8 mm larg., margens internas espessadas, glabros, com protuberâncias, entre os lobos cordiforme. Rostelo 6,1 mm compr., lobo mediano 7,0 mm alt., 2,5–3,0 mm compr., triangular, carnoso, ápice agudo, ereto, completamente entre os lóculos; lobos laterais paralelos em toda a extensão, 2,9–3,8 mm compr., base 1,5–2,1 mm larg., ápice 0,9–1,0 mm larg. Fruto não visto.

**Distribuição:** Restrita ao Brasil nos estados de Goiás e Minas Gerais (Figura 11).

**Habitat e fenologia:** Ocorre em cerrado sensu estrito, cerrado ralo e campo sujo, algumas vezes associados com afloramentos rochosos quartziticos, em solo arenoso, raso ou latossolo argiloso, geralmente secos. Ocasionalmente pode ocorrer próximo a margem de pequenos córregos ou grotões de escoamento de água, em locais estacionalmente úmidos. Floresce durante o período chuvoso, de janeiro a março.

**Notas taxonômicas:** A identidade desta espécie nunca foi muito clara. Kränzlin (1892), que examinou o material tipo, comentou que esta era uma das maiores espécies do gênero. Cogniaux (1893) considerou a espécie um sinônimo de *H. nuda* e foi seguido por Hoehne (1940). Pabst & Dungs (1975) aceitaram a espécie, mas a confundiram com outras espécies e apresentaram uma ilustração para a espécie que corresponde a outro morfotipo do complexo *H. nuda*. Mais recentemente Batista et al. (2003) confundiram a espécie com *H. urbaniana* Cogn. *Habenaria nasuta* é bastante similar a *H. rodriguesii*, na morfologia vegetativa e floral, distribuição geográfica e ecologia. Todavia, estas espécies separam-se facilmente pela posição de inserção do segmento anterior das pétalas no segmento posterior. Na *H. nasuta* o segmento anterior está inserido na base do posterior, enquanto na *H. rodriguesii* o segmento anterior está inserido alguns milímetros acima da base do posterior. Outras diferenças são a presença de uma projeção dentiforme, ereta no ápice da margem interna dos lobos estigmáticos na *H. nasuta* (versus ausente na *H. rodriguesii*) e o espaço entre os lobos estigmáticos cordiforme na *H. nasuta* (versus obovado ou circular na *H. rodriguesii*).

**Espécimes adicionais examinados:** BRASIL. **Goiás:** Pirenópolis, Serra dos Pirineus, 16 janeiro 1972, *Irwin* et al. *34366* (UB). **Minas Gerais:** São Gonçalo do Rio Preto, Parque Estadual do Rio Preto, trilha para a Chapada, 18º08’12,0”S, 43º19’59,3”W, 786 m, 20 Março 2007, *Batista* et al. *2023* (BHCB).

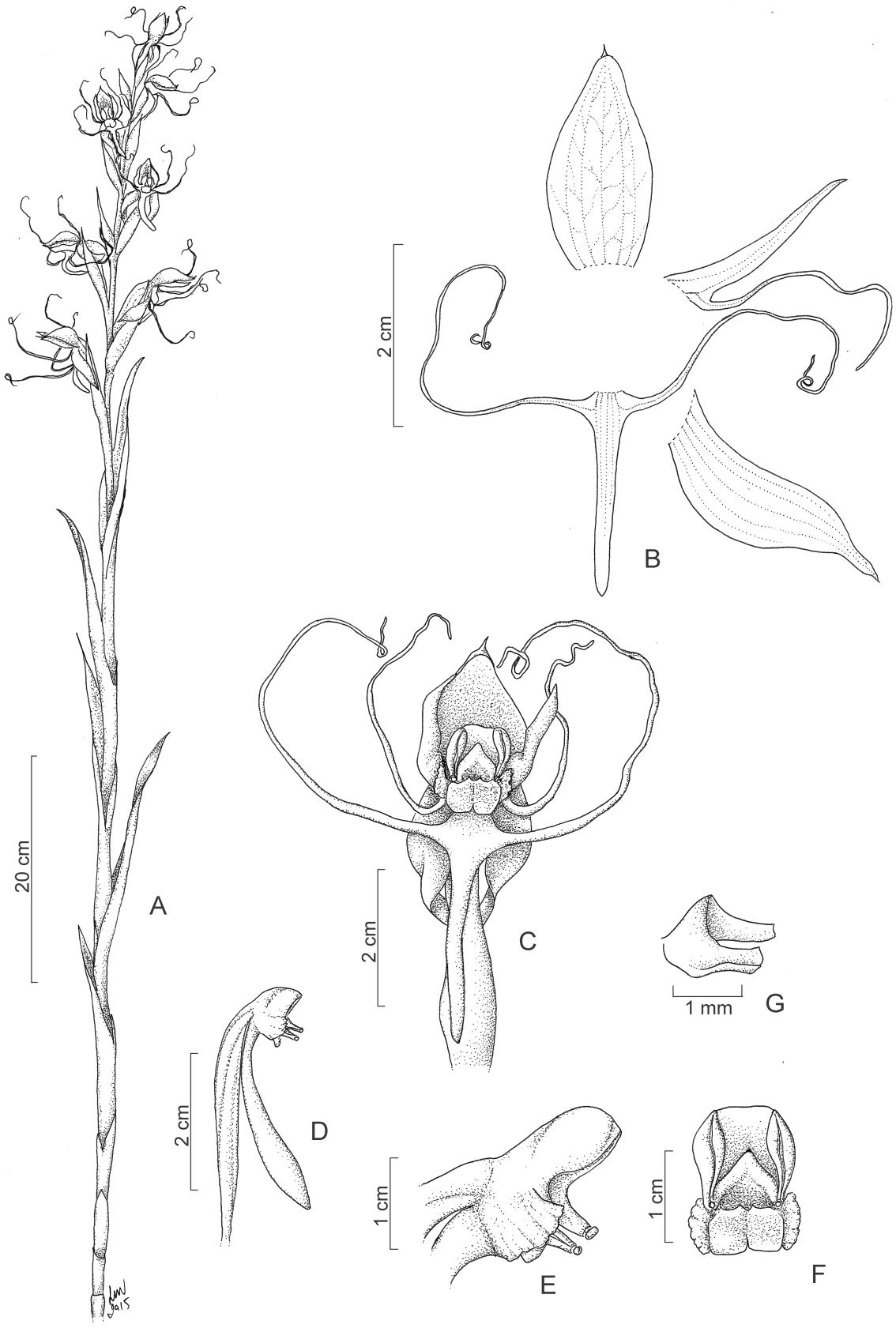



Figura 10. *Habenaria nasuta* Rchb. f. & Warm. A. Hábito. B. Perianto. C. Flor, vista frontal. D. Ovário, cálcar e ginostêmio, vista lateral. E. Ginostêmio, vista lateral. F. Ginostêmio, vista frontal. G. Rostelo, vista lateral. Ilustração de L. Menini Neto a partir de *J.A.N. Batista 1572*.

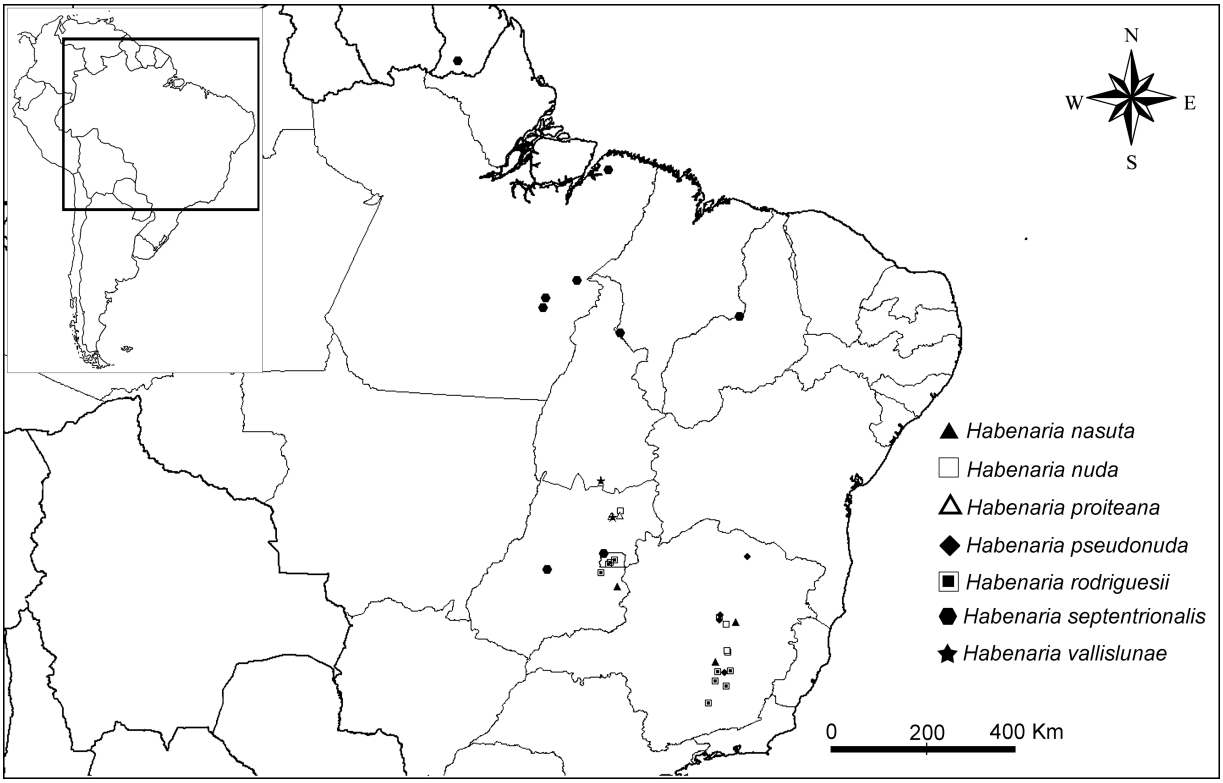



Figura 11 – Mapa de distribuição dos táxons *Habenaria nasuta*, *H. nuda*, *H. proiteana* sp.nov. inéd., *H. pseudonuda* sp. nov. inéd., *H. rodriguesii*, *H. septentrionalis* sp. nov. inéd., *H. vallislunae* sp. nov. inéd.

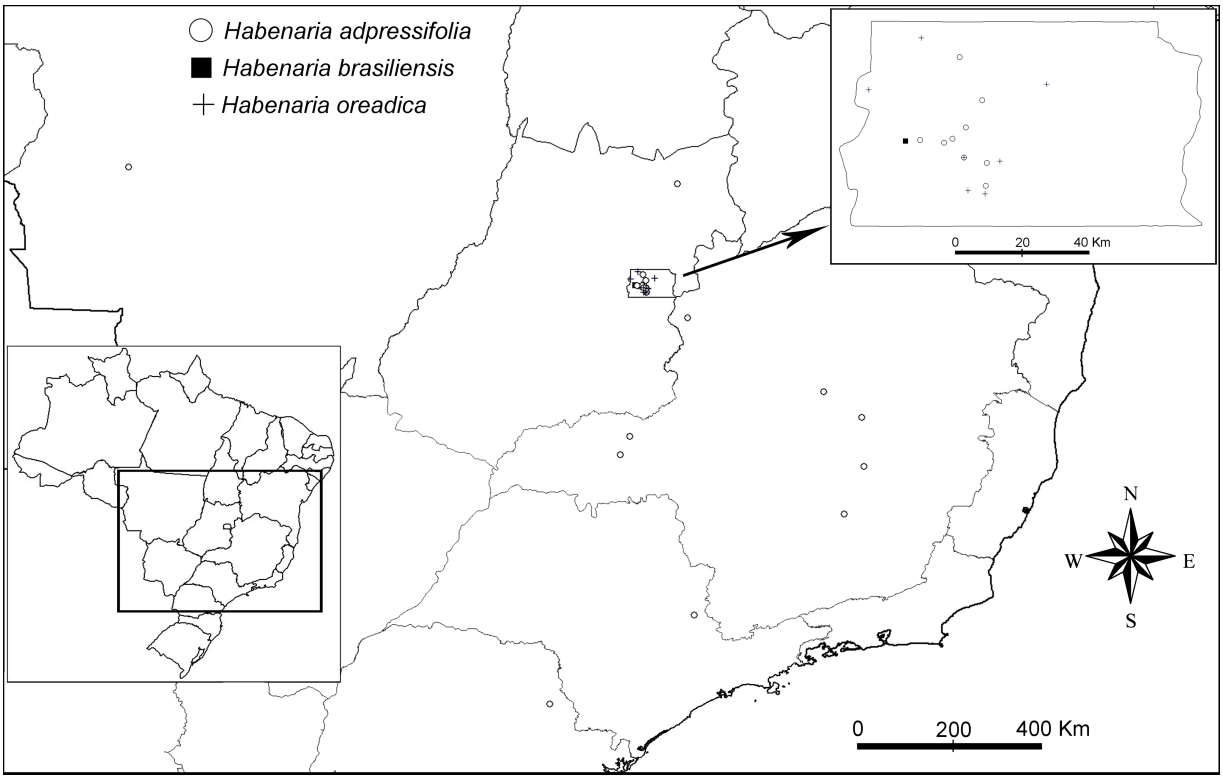



Figura 12 – Mapa de distribuição dos táxons *Habenaria adpressifolia nom. et stat. nov.*, *H. brasiliensis* sp.nov. inéd., *H.* oreadica sp. nov. inéd.

## 4. Considerações finais

No último capítulo deste trabalho são apresentadas descrições, ilustrações, comentários e distribuição geográfica dos táxons abordados no capítulo 3 e também de táxons relacionados ao complexo *H. nuda* que não tiveram suas populações coletadas. No total foram descritas seis espécies novas, um táxon foi elevado a nível específico e foram redescritas três espécies que até então eram difíceis de serem delimitadas.

Tabela 1- Comparação de caracteres diagnósticos para algumas espécies do complexo *Habenaria* nuda.

| | Morfotipos | *H.adpressifolia* | *H.vallislunae* | *H. pseudonuda* | *H. septentrionalis* | *H. oreadica* | *H.brasiliensis* | *H. nuda* | *H. rodriguesii* | *H. nasuta* | *H. proitean* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Caracteres | **sp. nov** | **sp. nov** | **sp. nov** | **sp. nov** | **sp. nov** | **sp. nov** | | | | **sp. nov** |
| **Hábito** | **Altura (cm)** | 54 a 117 | 28 a 52 | 37 a 90 | 28 a 70 | 93 a 155 | 19 a 35 | 26 a 45 | 36 a 60 | 102 | 31-65 |
| | **Disposição** | adpressas | parc. adpressas | parc. adpressas | parc. adpressas | parc. adpressas | parc. adpressas | parc. adpressas | parc. adpressas | parc. adpressas | parc. adpre |
| **Flor** | **Número** | 5 a 25 | 6 a 13 | 5 a 20 | 5 a11 | 19 a 35 | 3 a 7 | 6 a 17 | 3 a 13 | 10 | 3-8 |
| **Ovário** | **Curvatura** | reto<br>lig. arqueado | reto<br>lig. arqueado | lig. arqueado | reto | lig. arqueado<br>(no ápice) | reto | lig. arqueado<br>(no ápice) | reto | arqueado<br>(no ápice) | lig. arqueac |
| **Sépala** | **Disposição (laterais)** | deflexas com<br>ápice reflexo | perpendiculares | deflexas | deflexas<br>perpendiculares | reflexas | lig. deflexas<br>perpendiculares | reflexas | reflexas | reflexas | deflexas ou<br>reflexas |
| | **Divisão basal** | base | base | base | base | base | base | base | acima da base | base | acima da ba |
| | **Tamanho relativo seg. anterior** | 2x maior | ca. mesmo<br>tamanho | 1/4 maior | ca. mesmo<br>tamanho | ca. mesmo<br>tamanho | 1/4 maior | 1/4 a 2x maior | 3x maior | 1,5 x maior | 2x maior |
| | **Tamanho relativo seg. laterais** | 1/3 maior | ca. mesmo<br>tamanho | 1/4 maior | ca. mesmo<br>tamanho | ca. mesmo<br>tamanho | 1/4 maior | 1/4 a 1/3 maior | 1,5 x maior | 3x maior | 2x maior |
| **Calcar** | **Forma** | espatulado | linear-fusiforme | clavado<br>fusiforme | clavado | oblongo | clavado | linear-fusiforme | clavado | clavado<br>fusiforme | clavado |
| **Coluna** | **Apêndices lobos estigma** | não possui | não possui | não possui | não possui | não possui | não possui | protuberância | não possui | protuberância | não possui |
| | **Aurículos** | grandes | pequenos | grandes | pequenos | grandes | grandes | grandes | grandes | grandes | grandes |
| | **Conectivo** | estreito | estreito | estreito | estreito | largo | largo | largo | estreito | largo | estreito |
| | **Projeção rostelo em relação aos *Loci* antera** | frente | frente | parc. frente | frente | parc. frente | parc. frente | entre | entre | entre | entre |

**4. Referências Bibliográficas**

Batista, J.A.N. & Bianchetti, L.B. 2002a. A review of *Habenaria* in Pabst & Dungs Orchidaceae Brasilienses. **Lindleyana 17**: 75-84.

Batista, J. A. N. ; Bianchetti, L. B. 2002b. Notes on Habenaria orchiocalcar (Orchidaceae), an overlooked species from central Brazil. **Lindleyana**, v. 17, n.3, p. 115-121.

Batista, J.A.N. & Bianchetti, L.B. 2010. Taxonomy, distribution and new taxa from the Habenaria crucifera (section Nudae, Orchidaceae) aggregate from Brazil and the Guianas. **Brittonia** (Bronx, N.Y.), v. 62, p. 57-79.

Batista, J. A. N. ; Bianchetti, L. B. 2003. An overlooked new species of Habenaria (Orchidaceae) from Central Brazil. **Novon,** v. 13, n.4, p. 397-402.

Batista, J.A.N. & Bianchetti, L.B. L. B. ; Nogueira, R. E. ; Pellizzaro, K F ; Ferreira, F. E. 2004. The genus Habenaria (Orchidaceae) in the Itacolomi state park, Minas Gerais, Brazil. Sitientibus série Ciências Biológicas, v. 4, n.1/2, p. 25-36.

Batista, J.A.N. & Bianchetti, L.B. 2006. The Brazilian *Habenaria* (Orchidaceae) with hairy segments. **Sitientibus, Série Ciências Biológicas 6**: 9-23.

Batista, J.A.N., Bianchetti, L.B. & Miranda, Z.J.G. 2006. The *Habenaria* section *Macroceratitae* (Orchidaceae) in Brazil. **Brittonia 58**: 10-41.

Batista, J.A.N. & Bianchetti, L.B. L. B. ; Miranda, Z. J. G. 2008a. Two new species of Habenaria (Orchidaceae) from the Brazilian cerrado and campo rupestre. **Kew Bulletin**, v. 63, p. 449-456.

Batista, J.A.N., Bianchetti, L.B., Tamayo, R.G., Figueroa, X.M.C., Cribb, P.J. 2011a. A synopsis of new world *Habenaria* (Orchidaceae) I. **Harvard Papers in Botany 16**: 1-47.

Batista, J.A.N., Bianchetti, L.B., Tamayo, R.G., Figueroa, X.M.C., Cribb, P.J. 2011b. . A synopsis of new world *Habenaria* (Orchidaceae) II. **Harvard Papers in Botany 16**: 233-273.

Batista, J.A.N., Borges, K.S., Faria, M.W., Proite, K., Ramalho, A.J., Salazar, G.A. & 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.

Batista, J. A. N. ; Carvalho, B. M. ; Ramalho, A. J. ; Bianchetti, L. B. 2010. Three new species of Habenaria (Orchidaceae) from Serra da Canastra, Minas Gerais,. Phytotaxa, v. 13, p. 27-39.

Batista, J. A. N. ; Menini Neto, L. ; Vale, A. A. 2012.Three new species, four new records and an updated checklist of Habenaria (Orchidaceae) from Rio Grande do Sul, Brazil. **Nordic Journal of Botany**, v. 30, p. 277-290.

Batista, J. A. N. ; Mota, R. C. ; Abreu, N. L. ; Menini Neto, L. 2008b. Habenaria pseudoglaucophylla (Orchidaceae), a new species from Minas Gerais, Brazil. **Novon** (Saint Louis), v. 18, p.409-414.

Batista, J. A. N.; Proite, K. ; Carvalho, B. M. ; Vale, A. A. ; Felix, L. P. 2014. From Cuba to most of the Neotropics: Habenaria Bicornis (Orchidaceae) is widespread from Mexico to southeastern Brazil. **Lankesteriana**, v. 13, p. 165-184.

Batista, J. A. N.; Silva, J. B. F. ; Bianchetti, L. B. 2008c.The genus *Habenaria* (Orchidaceae) in the Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, p. 105-134.

Carvalho, B. M. ; Ramalho, A. J. ; Batista, J. A. N. 2013. O gênero *Habenaria* (Orchidaceae) na Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia** (Online), v. 64, p. 223-245.

Cogniaux, A. 1893. Orchidaceae. *Habenaria*. *In*: C.F.P. Martius; A.G. Eichler; I. Urban (eds.), **Flora Brasiliensis 3**(4): 18-102, tab. 3-18. Munich: F. Fleischer.

Govaerts, R., Bernet, P., Kratochvil, K., Gerlach, G., Carr, G., Alrich, P., Pridgeon, A.M., Pfahl, J., Campacci, M.A., Baptista, D.H., Tigges, H., Shaw, J., Cribb, P., George, A., Kreuz, K. & Wood, J. 2014. World Checklist of Orchidaceae. Royal Botanic Gardens, Kew. http://apps.kew.org/wcsp/. Acesso em 15.12.2014.

Hoehne, F.C. 1940. Orchidaceas, *Habenaria*. *In*: F.C. Hoehne (ed.), **Flora Brasílica 12**(1): 52-254, tab. 11-122. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo.

Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1975. **Orchidaceae Brasilienses.** Band I. Hildesheim: Kurt Schmersow.

Pedron, M. ; Buzatto, C. R.; Ramalho, A. J. ; Carvalho, B. M. ; Radins, J. A. ; Sinerg, R. B. ; Batista, J. A. N. . Molecular phylogenetics and taxonomic revision of Habenaria sect. Pentadactylae (Orchidaceae, Orchidinae). **Botanical Journal of the Linnean Society** (Print), v. 175, p. 47-73, 2014.

Renz, J. 1992. The genus *Habenaria* (Orchidaceae) in the Guianas. Candollea 47: 483–512.

Ribeiro, J.F. & Walter, B.M.T. (2008) As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: Sano, S.M., Almeida, S.P. & Ribeiro, J.F. (eds.) Cerrado: ecologia e flora. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília-DF, pp. 151–212.

Rizzini CT. 1979. Tratado de fitogeografia do Brasil. v.2. Aspectos ecológicos. Hucitec Edusp, São Paulo.

Simpson, M. G. 2006. Plant systematics. – Elsevier Academic Press.
Stearn, W. T. 1992. Botanical Latin. – Timber Press.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o gênero pertença à família Orchidaceae, *Habenaria* é composto por espécies de flores verdes, muitas vezes pequenas, inconspícuas e por isso muitas vezes negligenciadas por botânicos em geral. É um gênero difícil de ser estudado e coletado e suas espécies são de difícil determinação.

Considerando todos os resultados obtidos neste trabalho, desde o reconhecimento da ocorrência de vários eventos de poliploidização no gênero, da descrição e recircunscrição de seções por meio de uma filogenia molecular após o aumento da amostragem de espécies, da descoberta de seis espécies novas e da recircunscrição de quatro espécies duvidosas após análises mais detalhadas, conclui-se que o gênero *Habenaria* está em ativo processo de especiação e pode ser considerado um importante modelo evolutivo a ser estudado em maiores detalhes e com ferramentas diversas.

Outra observação importante é em relação aos habitats em que encontramos as espécies analisadas neste trabalho. Na maioria das vezes as espécies foram coletadas em áreas de conservação, pois fora das mesmas é muito difícil encontrá-las. Por ocorrerem geralmente em campos, muitas vezes estão sujeitas principalmente ao pastejo pelo gado bovino e ao cultivo intenso de espécies exóticas (*e.g. Eucalyptus* spp. e *Pinus* spp.). *Habenaria* é um dos muitos exemplos de espécies ocorrentes nesse bioma que também sofre com a destruição do mesmo.

É interessante notar que com apenas algumas análises foi possível chegar a muitas conclusões relevantes. Se forem realizadas mais análises, com uma amostragem maior, o gênero poderá apresentar ainda um número consideravelmente maior de espécies e muitos outros complexos poderão ser solucionados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Avise JC. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. London: Chapman & Hall.

Batista JAN, Bianchetti LB. 2003. An overlooked new species of *Habenaria* (Orchidaceae) from Central Brazil. **Novon** 13: 397-402.

Batista JAN, Bianchetti LB. 2002. A review of *Habenaria* in Pabst & Dungs Orchidaceae Brasilienses. **Lindleyana** 17: 75–84.

Batista JAN, Bianchetti LB. 2006. The Brazilian *Habenaria* (Orchidaceae) with hairy segments. **Sitientibus, Série Ciências Biológicas** 6: 9–23.

Batista JAN, Bianchetti LB, Nogueira RE, Pellizzaro KF, Ferreira FE. 2004. The genus *Habenaria* (Orchidaceae) in the Itacolomi state park, Minas Gerais, Brazil. **Sitientibus série Ciências Biológicas** 4: 25–36.

Batista JAN, Bianchetti LB, Miranda ZJG. 2006a. The *Habenaria* section *Macroceratitae* (Orchidaceae) in Brazil. **Brittonia** 58: 10–41.

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, Faria MW, 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, Shepherd GJ, van den Berg C, Semir J. 2002. Floral and vegetative morphometry in five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability, and pollination systems. **Annals of Botany** 10: 219–230.

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

Felix LP. 1996. *Estudos taxonômicos em representantes do gênero Habenaria Willd. (Orchidaceae-Orchidoideae) ocorrentes no Estado da Paraíba, Brasil*. Dissertação de Mestrado não publicada. Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Govaerts R, Bernet P, Kratochvil K, Gerlach G, Carr G, Alrich P, Pridgeon AM, Pfahl J, Campacci MA, Holland Baptista D, Tigges H, Shaw J, Cribb P, George A, Kreuz K, Wood

J. 2014. World Checklist of Orchidaceae. Royal Botanic Gardens, Kew. http://apps.kew.org/wcsp/. Acesso em 15.12.2014.

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

Henderson A. 2006. Traditional morphometrics in plant systematics and its role in palm systematics. **Botanical Journal of the Linnean Society** 151: 103–111.

Hoehne FC. 1940. Orchidaceas, *Habenaria*. In: Hoehne FC, ed. *Flora Brasílica*, Vol. 12. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo, 52–254.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2002. **Plant systematics: a phylogenetic approach.** 2 ed. Sunderland: Sinauer Associates.

Karp A, Seberg O, Buiatti M. 1996. Molecular techniques in the Assessment of Botanical Diversity. **Annals of Botany** 78: 143–149.

Kucera J, Lihová J, Marhold K. 2006. Taxonomy and phylogeography of *Cardamine impatiens* and *C. pectinata* (Brassicaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society** 152: 169–195.

Pabst GFJ, Dungs F. 1975. *Orchidaceae Brasilienses*. Band I. Hildesheim: Kurt Schmersow.

Peres Neto PR. 1995. Introdução a análises morfométricas. In: Peres Neto PR, Valentin JL, Fernandez FAZ, eds. *Oecologia brasiliensis. Vol. 2: Tópicos em tratamento de dados biológicos.* Rio de Janeiro: UFRJ, 57-89.

Qiu YL, Lee J, Bernasconi-Quadroni F, Soltis DE, Soltis OS, Zanis M, Zimmer EA, Chen Z, Savolainen V, Chase MW. 1999. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid and nuclear genomes. **Nature 402**: 404-407.

Stebbins GL. 1971. *Chromosomal evolution in higher plants*. California: Addison-Wesley Publishing Company.