



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



UFMG

GABRIELA MICAELA CRUZ LUSTRE

**ESTUDOS BIOSISTEMÁTICOS PARA A DELIMITAÇÃO DE LINHAGENS E
ESPÉCIES NO COMPLEXO *Habenaria parviflora* LINDL. (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
Doutora em Biologia Vegetal.**

**Área de Concentração: Morfologia, sistemática e
diversidade vegetal**

BELO HORIZONTE – MG

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



UFMG

GABRIELA MICAELA CRUZ LUSTRE

ESTUDOS BIOSISTEMÁTICOS PARA A DELIMITAÇÃO DE LINHAGENS E ESPÉCIES NO COMPLEXO *Habenaria parviflora* LINDL. (ORCHIDACEAE)

Versão final

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 Doutora em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Morfologia, sistemática e diversidade vegetal

Orientador: Prof. Dr. João Aguiar Nogueira Batista

Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientadores: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba

Profa. Dra. Luciana Cunha Resende Moreira

Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE – MG

2021

043 Lustre, Gabriela Micaela Cruz.
Estudos biosistemáticos para a delimitação de linhagens e espécies no complexo *Habenaria parviflora* Lindl. (Orchidaceae) [manuscrito] / Gabriela Micaela Cruz Lustre. – 2021.
127 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. João Aguiar Nogueira Batista. Coorientadores: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba; Profa. Dra. Luciana Cunha Resende Moreira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

1. Filogenia. 2. Orchidaceae. 3. Classificação. 4. Variação Genética. I. Batista, João Aguiar Nogueira. II. Moreira, Luciana Cunha Resende. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581



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



Tese defendida por Gabriela Micaela Cruz Lustre em 08 de dezembro de 2020 e aprovada pela Banca Examinadora constituída pelos professores:

Dr. João Aguiar Nogueira Batista (orientador)

Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chávez

Dr. Cássio van den Berg

Dr. Alessandro Rapini

Dr. João Renato Stehmann

A mama Mica[†].

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Silvano e Margarita, à minha avó Micaela, aos meus tios Baldomero e Pilar, às minhas irmãs Carmen, Yola, Faby e Heidi, e aos meus sobrinhos, pelo carinho, por acreditar em mim, pelo apoio incondicional ao longo da minha formação e por me inculcar o amor pela natureza.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais-FAPEMIG (5308/15) pela bolsa de doutorado e à FAPEMIG pelo apoio econômico “CRA - APQ-03350-16” que custeou o meu projeto.

Ao meu orientador, Dr. João Batista, que compartilhou comigo sua fascinação pelas habênárias e me ajudou nas coletas, no laboratório e em cada parte do projeto, sempre com muita dedicação. Obrigada, João, pelo inestimável e contínuo suporte (inclusive em meus momentos pessoais mais difíceis)! Agradeço da mesma forma aos meus coorientadores, Dr. Eduardo Borba pela confiança e apoio no trabalho, e à Dra. Luciana Resende pela enorme ajuda nas análises genômicas e nas discussões.

À Aline Vale pela grande ajuda antes de ingressar no programa e durante as primeiras semanas no Brasil. À Ceci Fiorini, por todo o apoio, inclusive desde antes de me conhecer, e por compartilhar seu vasto conhecimento de laboratório e sobre as análises genômicas. Ao Leo Guimarães pela ajuda incondicional sempre que precisei, e pelo inestimável carinho e motivação. Ao Vinni Moreira, Josefran Lacerda, Jenny Paucar e Sérgio Adachi pela amizade e companheirismo. Obrigada pela incrível convivência, queridos amigos!

Ao Dr. José Miguel Ortega pela ajuda no uso do servidor Sagarana HPC Cluster (CEPAD-ICB-UFMG) e ao Dr. Francisco Lobo pelos ensinamentos.

Ao Instituto Estadual de Florestas (IEF Minas Gerais), Instituto Florestal e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pelas autorizações de coleta e suporte logístico. Agradeço também aos curadores e pessoal técnico dos herbários pelo apoio no acesso às coleções, especialmente ao Gustavo Santos.

Aos colegas estrangeiros José Radins, Cristian Castro e Andrés González, que possibilitaram a obtenção de amostras nos seus países. Ao Alexandre Medeiros, Carla Royer, Ceci Fiorini, Daniela Simão, Eduardo Borba, Emerson Pansarin, Fernando Moro, George Fagundez, Geraldo Barfknecht, Ingo Bauer, Jacques Klein, Jader Caetano, Jomar Jardim, Klaus Dietrich Guth, Leo Guimarães, Liliana Essi, Mônica Bolson, Silvia Estevez, Tadeu Motta e Thiago Meneguzzo pelo apoio no campo na obtenção de amostras. Aos funcionários das unidades de conservação amostradas, especialmente à Aline Abreu (RPPN do Caraça), D.

Francisco e Fabrício Marcolino (Parque Estadual da Serra do Brigadeiro), família Koprowski (Benedito Novo, SC), e Marcelo Gonçalves e Ellen Rodrigues (PESM-Curucutu). A participação de vocês foi fundamental para atingir a amostragem do projeto.

Aos professores Dr. Cássio van den Berg, Dr. Luiz Eduardo Vieira del Bem, Dr. Rafael Felipe de Almeida e Dr. Alexandre Salino pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

Aos professores Dr. Cássio van den Berg, Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chávez, Dr. João Renato Stehmann e Dr. Alessandro Rapini pelas importantes observações na defesa.

Ao corpo docente, técnico e administrativo do Departamento de Botânica (ICB-UFMG), especialmente às secretarias Denise Monteiro e Isabella Silva. Agradeço também ao pessoal da biblioteca pela gentileza no atendimento.

À Mari Augsten, Stela Oliveira, Caro Leroy, Renato Fernandes, Isabelle Costa, Caro Assunção, Gustavo Santos, Joaquim Lacerda, Gustavo Pimenta, Ludmila Souza, David Sanín, Gabriel Peñaloza, Laísa Marques, Fábio Gomes, Mari Duarte e Raquel Stauffer pela agradável companhia no lab (Biossistemática e Sistemática Molecular) e na Sistemática. Agradeço especialmente à Thaynara Salgado pela ajuda no processamento das amostras.

Às famílias Vale (D. Alaor e D. Vera), Fiorini (D. Bernadete, D. Gianfranco, Laura e Kevin), Guimarães (D. Vê e D. Eduardo), Salazar (Gerardo e Lidia), Lara (Claudia, Rafa e Alexandre), Oliveira (D. Keila e D. Gustavo) pela hospitalidade. À Maria Aparecida Andrade Santos pela empatia e amizade.

Aos professores Leandro Diniz, Yara Miranda, Isis Pordeus, Marcela Cândido e Desiree Oliveira (FALE-UFMG) pelos ensinamentos. Às queridas Ana Olalla, Ilya Espino e Ayda Blanco pela amizade sincera e os momentos maravilhosos que abateram a saudade dos nossos países.

À Dra. Alejandra Vasco pela ajuda no início deste processo.

Finalmente, agradeço infinitamente a todas as pessoas que de uma ou outra forma gentilmente me ajudaram durante esta etapa.

RESUMO GERAL

Neste trabalho estudamos o complexo *Habenaria parviflora* (Orchidaceae), um grupo restrito a vegetações campestres da América do Sul, visando elucidar sua sistemática tanto em nível seccional como entre os táxons morfológicamente similares do complexo. Em nível seccional, analisamos as relações filogenéticas das espécies classificadas em *H.* sect. *Micranthae*, à qual pertence *H. parviflora*, bem como outras morfológicamente relacionadas a esta espécie usando os marcadores ETS, ITS, *matK-trnK* e *rps16-trnK*, através de parcimônia e análise Bayesiana. Recircunscrevemos a seção de modo a estabelecer um grupo monofilético que passa a ser formado por oito espécies (*H. abscondita* sp. nov., *H. brachyphyton*, *H. edwallii*, *H. gollmeri*, *H. parviflora*, *H. paulensis*, *H. ulei* e *H. uruguayensis*) morfológicamente relacionadas e caracterizadas pelo viscido sulcado. Para analisar os padrões de diferenciação morfológica e genética dentro do complexo amostramos 65 populações abrangendo a variação morfológica, taxonômica, ecológica e geográfica do grupo. Realizamos análises morfométricas usando 18 caracteres morfológicos em 685 indivíduos classificados em 12 morfotipos. As análises mostraram um padrão de sobreposição, mas permitiram diferenciar dois táxons mediante uma associação de caracteres, *H. paulensis* e *H. ulei*. O tamanho da flor, a largura da folha e o ângulo de abertura das sépalas foram os caracteres mais discriminativos dos grupos. Analisamos os dados gerados com genotipagem por sequenciamento para 196 indivíduos do complexo mediante análises de ordenação, de estruturação genética e filogenéticas. De maneira geral, os dados genéticos apresentaram congruência com os padrões morfológicos, permitindo o reconhecimento de seis táxons: *H. brachyphyton*, *H. caaguazensis*, *H. parviflora*, *H. paulensis*, *H. tucumanensis* comb. & stat. nov. e *H. ulei*. Os padrões de mistura genética observados sugerem a possibilidade de hibridação e introgressão no complexo, eventos até o momento não registrados para o gênero. No Cerrado identificamos três disjunções que separam áreas de campo rupestre: Serra da Canastra e Espinhaço sul para *H. paulensis*, e Centro-Oeste para *H. parviflora*. Para a Mata Atlântica identificamos duas disjunções, uma próxima à zona de falhas de Além Paraíba e a outra cerca do alinhamento Guapiara para *H. parviflora* e *H. paulensis*, respectivamente. Nossos resultados sugerem que diversos fatores podem estar envolvidos na evolução do complexo e estudos adicionais no grupo possibilitarão hipóteses mais sólidas em relação à diversificação das vegetações campestres sul-americanas.

Palavras-chave: complexo de espécies, filogenômica, morfometria, vegetações campestres, Orchidoideae, taxonomia, variação genética.

OVERALL ABSTRACT

In this work, we studied the *Habenaria parviflora* (Orchidaceae) complex, a group restricted to grassland vegetation in South America, in order to elucidate its systematics both at the sectional level and among the morphologically similar taxa of the complex. At the sectional level, we analysed the phylogenetic relationships of species classified in *H.* sect. *Micranthae*, to which *H. parviflora* belongs, as well as other taxa morphologically associated with this species, using the markers ETS, ITS, *matK-trnK* and *rps16-trnK*, through parsimony and Bayesian analysis. We recircumscribed the section in order to establish a monophyletic group that is now formed by eight morphologically related species (*H. abscondita* sp. nov., *H. brachyphyton*, *H. edwallii*, *H. gollmeri*, *H. parviflora*, *H. paulensis*, *H. ulei* and *H. uruguayensis*) characterized by their sulcate viscidium. To analyze the patterns of morphological and genetic differentiation within the complex, we sampled 65 populations covering the morphological, taxonomic, ecological and geographical variation of the group. We performed morphometric analyzes using 18 morphological characters on 685 individuals classified into 12 morphotypes. The analyses showed a pattern of overlap, but allowed to differentiate two taxa through an association of characters, *H. paulensis* and *H. ulei*. The size of the flower, the width of the leaf and the opening angle of the sepals were the most discriminating characters of the groups. We analyzed the data generated with genotyping by sequencing (GBS) for 196 individuals in the complex through ordering analysis, genetic structuring and phylogenetics. In general, the genetic data showed congruence with the morphological patterns, allowing the recognition of six taxa: *H. brachyphyton*, *H. caaguazensis*, *H. parviflora*, *H. paulensis*, *H. tucumanensis* comb. & stat. nov. and *H. ulei*. The observed patterns of genetic mixture suggest the possibility of hybridization and introgression in the complex, events that have not yet been reported for the genus. In the Cerrado we identified three disjunctions that separate areas of rocky fields: Serra da Canastra and Southern Espinhaço for *H. paulensis*, and Central-West for *H. parviflora*. For the Atlantic Forest, we identified two disjunctions, one near the fault zone of Além Paraíba and the other near the Guapiara alignment for *H. parviflora* and *H. paulensis*, respectively. Our results indicate that several factors may be involved in the evolution of the complex and additional studies in the group will enable more solid hypotheses regarding the diversification of South American grassland vegetations.

Keywords: genetic variation, grassland vegetation, morphometry, phylogenomics, species complex, taxonomy, Orchidoideae.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	11
Referências.....	13
CAPÍTULO 1. PHYLOGENETICS AND TAXONOMY OF <i>Habenaria</i> SECT. <i>Micranthae</i> (ORCHIDACEAE), WITH THE DESCRIPTION OF AN OVERLOOKED NEW SPECIES FROM THE ESPINHAÇO MOUNTAIN RANGE, EASTERN BRAZIL	15
Abstract.....	17
Introduction.....	18
Materials and methods	20
Taxon sampling for phylogenetic analyses	20
Molecular markers.....	21
Phylogenetic analyses	21
Morphological, taxonomic, and conservation status analyses	22
Results.....	23
Data matrices and Phylogenetic analyses.....	23
Morphological analyses.....	24
Discussion.....	25
Phylogeny and taxonomy of <i>Habenaria</i> sect. <i>Micranthae</i>	25
Taxonomy of <i>Habenaria bahiensis</i> and the EMR specimens.....	26
Phylogeny and taxonomy of <i>H. gollmeri</i>	28
Taxonomic treatment.....	30
Identification key to the species or subgroups of <i>Habenaria</i> sect. <i>Micranthae</i>	31
References.....	37
Supplementary material	53
CAPÍTULO 2. MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE <i>Habenaria parviflora</i> COMPLEX (ORCHIDACEAE).....	63
Abstract.....	64
Introduction.....	64
Materials and methods	66
Sampled populations	66

Character selection	68
Multivariate analyses.....	69
Results.....	70
Analyses of the 46 expanded populations	70
Analyses of the 12 morphotypes	72
Descriptive statistical analysis of the morphological characters.....	73
Discussion.....	73
References.....	77
Supplementary material	79

CAPÍTULO 3. ANÁLISE FILOGENÔMICA E GENÉTICA POPULACIONAL UTILIZANDO GENOTIPAGEM POR SEQUENCIAMENTO DO COMPLEXO *Habenaria parviflora* (ORCHIDACEAE), UM GRUPO CAMPESTRE DE DIVERGÊNCIA RECENTE NA AMÉRICA DO SUL.....89

Resumo	90
Introdução	91
Material e métodos.....	94
Amostragem	94
Métodos moleculares.....	94
Processamento dos dados genômicos.....	95
Estruturação genética do complexo <i>H. parviflora</i>	96
Relações filogenéticas	97
Resultados	97
Variação genômica ao longo do complexo <i>H. parviflora</i>	97
Relações filogenéticas em <i>H. sect. Micranthae</i>	98
Estruturação genética no complexo <i>H. parviflora</i>	100
Discussão	101
Evidência genômica vs morfológica e implicações taxonômicas	101
Padrões biogeográficos	104
Conclusão.....	107
Referências.....	107
Material suplementar	124

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....127

INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae é uma das famílias de plantas mais diversa a nível mundial, compreendendo aproximadamente uma décima parte do total de angiospermas (~28.000 espécies; Christenhusz, & Byng, 2016). Nesta família, *Habenaria* Willd. constitui o gênero mais diverso de orquídeas terrícolas com cerca 900 espécies (Govaerts, Dransfield, Zona, Hodel, & Henderson, 2020). As espécies Neotropicais formam uma linhagem que divergiu de um ancestral africano (Batista et al., 2013) durante o final do Mioceno (Claessens et al., 2019) e atualmente concentra aproximadamente um terço do total de espécies do gênero (Govaerts et al., 2020). Nos Neotrópicos o gênero apresenta seu maior centro de diversidade no Brasil, principalmente em vegetações campestres (Batista, Bianchetti, González-Tamayo, Figueroa, & Cribb, 2011a) das regiões Centro Oeste e Sudeste (Batista, & Bianchetti, 2010).

As únicas revisões para *Habenaria* em nível mundial foram realizadas por Kränzlin (1892, 1901), que dividiu o gênero em 34 seções, sendo 12 Neotropicais. No tratamento das espécies brasileiras para a *Flora Brasiliensis*, Cogniaux (1893-1896) seguiu em linhas gerais a proposta de Kränzlin. Contudo, na filogenia das espécies do Novo Mundo de Batista et al. (2013), baseada em hipóteses filogenéticas explícitas a partir de sequências de DNA nuclear e plastidial, foi mostrado que as seções nos tratamentos de Kränzlin e Cogniaux são altamente artificiais e precisam ser revisadas.

Devido ao grande número de espécies no gênero, à morfologia similar entre várias delas e à escassa informação, existem alguns complexos de espécies não resolvidos que têm tornado desafiadora a taxonomia de *Habenaria*. Dentre esses complexos, encontra-se o formado por *H. parviflora* Lindl. e espécies morfologicamente relacionadas. Este grupo envolve cerca de 20 nomes e agrupa espécies classificadas nas seções *Micranthae* e *Microstylinae* (Kränzlin, 1901; Cogniaux, 1893-1896). O complexo *H. parviflora* foi revisado unicamente por Garay (1976), que aceitou quatro espécies, *H. brachyphyton* Schltr., *H. parviflora*, *H. paulensis* Porsch e *H. uruguayensis* Garay, baseado principalmente em caracteres florais. Renz (1992) considerou *H. gollmeri* proximamente relacionada com *H. parviflora*, porém, esta espécie distribuída no norte da América do Sul e centro dos Andes ainda não teve seu posicionamento filogenético resolvido. Na sinopse das espécies americanas do gênero, Batista et al. (2011a, b) seguiram a proposta de Garay (1976) e ressaltaram a similaridade morfológica de outras três espécies, *H. bahiensis* Schltr., *H. edwalli* Cogn. e *H. ulei* Cogn., com *H. parviflora*. Na análise filogenética das espécies neotropicais (Batista et al., 2013), as espécies amostradas do complexo (*H. parviflora*, *H. brachyphyton* e *H. paulensis*) foram recuperadas em um mesmo clado (subclado

3) junto com *H. bahiensis* e *H. edwallii* com alto suporte, confirmando a proximidade entre elas, porém com baixa resolução interna.

O complexo *H. parviflora* compreende ervas terrícolas, sazonais, amplamente distribuídas através do centro-sul da América do Sul nos biomas Mata Atlântica, Pampa e Cerrado. As plantas crescem em diversos tipos de formações campestres, principalmente em campos úmidos, em solos hidromórficos em diferentes altitudes (desde o nível do mar até 2.800 m). As plantas são perenes, apresentam crescimento dos órgãos epígeos durante a estação chuvosa e um período de repouso na estação seca mediante uma túbera, que origina um novo broto na estação chuvosa seguinte (Batista et al., 2013). As flores são geralmente pequenas e verdes, apresentam fragrância noturna, oferecem néctar e são polinizadas por mariposas e dípteros (Singer, 2001). Todas as espécies do complexo florescem no período chuvoso. As sementes são pequenas e dispersas pelo vento.

A taxonomia deste complexo é particularmente difícil devido à grande sobreposição morfológica observada entre suas espécies, à sua grande amplitude geográfica e ecológica (Batista et al., 2011a, b) e a sua origem recente (~0,86 Ma; Claessens et al., 2019). Até o momento a taxonomia e relações filogenéticas do complexo foram estudados apenas com poucos caracteres morfológicos (Garay, 1976) e um número reduzido de indivíduos e marcadores moleculares (ITS e *matK*; Batista et al., 2013). Porém, estes estudos não foram suficientes para resolver a taxonomia e elucidar as relações entre os taxa pertencentes ao complexo (*H. brachyphyton*, *H. parviflora*, *H. paulensis* e *H. ulei*), bem como das espécies associadas (*H. bahiensis*, *H. edwalli* e *H. gollmeri*), evidenciando a necessidade de esclarecer a circunscrição taxonômica tanto dentro do complexo, como ao nível de seção. Posto isto, ressalta-se a necessidade de estudos que envolvam uma amostragem maior de indivíduos e caracteres, bem como o uso de ferramentas adicionais que produzam um conjunto de dados robusto que possibilite inferências mais embasadas quanto à evolução e taxonomia do complexo. A tese aborda a mencionada complexidade e sistemática do grupo nos dois níveis (seccional e do complexo propriamente dito) e segue um formato de capítulos a serem publicados como artigos separados. Especificamente, o presente trabalho visou: 1) resolver as relações filogenéticas e circunscrição taxonômica de *Habenaria* sect. *Micranthae*, que compreende o complexo *H. parviflora* e táxons associados (CAPÍTULO 1); 2) amostrar a caracterizar a diversidade morfológica do complexo *H. parviflora* e estabelecer sua relação com os táxons aceitos para o complexo (CAPÍTULO 2); 3) comparar as relações filogenéticas e padrões genéticos com os padrões morfológicos com o objetivo de subsidiar uma revisão taxonômica do complexo através da delimitação de táxons sustentados por dados morfológicos

e genéticos (CAPÍTULO 3); e 4) identificar padrões biogeográficos gerais dentro do complexo com base nas relações filogenéticas e variação genética do complexo que possam subsidiar o entendimento da diversificação das vegetações campestres da América do Sul, considerando que o grupo é amplamente distribuído nessa região e ocorre exclusivamente em vegetações campestres (CAPÍTULO 3).

No final da presente tese são apresentadas as considerações finais, onde se estabelece uma conexão dos três capítulos e considerações sobre o logro dos objetivos, nossas descobertas e algumas perspectivas de estudos futuros sobre o grupo.

Referências

- 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*, 62, 57–79.
- Batista, J. A. N., Bianchetti, L. B., González-Tamayo, R., Figueroa, X. M. C., & Cribb, P. J. (2011a). A synopsis of new world *Habenaria* (Orchidaceae) I. *Harvard Papers in Botany*, 16, 1–47. doi:10.3100/025.016.0101
- Batista, J. A. N., Bianchetti, L. B., González-Tamayo, R., Figueroa, X. M. C., & Cribb, P. J. (2011b). A synopsis of new world *Habenaria* (Orchidaceae) II. *Harvard Papers in Botany*, 16, 233–273. doi:10.3100/0.25.016.0202
- Batista, J. A. N., Borges, K. S., Faria, M. W., Proite, K., Ramalho, A. J., Salazar, G. A., & Berg, C. van den. (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. doi:10.1016/j.ympev.2013.01.008
- Christenhusz, M. J. M., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261, 201–217. doi:10.11646/phytotaxa.261.3.1
- Claessens, J., Bacallado, J. J., Bogarin, D., Dedroog, L., Heijungs, R., Langelaan, R., ... Gravendeel, B. (2019). Pollination of *Habenaria tridactylites* on the Canary Islands. *Nordic Journal of Botany*, e02401. doi:10.1111/njb.02401
- Cogniaux, A. (1893). Orchidaceae. *Habenaria*. In Martius, C. F. P., Eichler, A. G., Urban, I. (Eds.), *Flora Brasiliensis* 3(4), F. Fleischer, Munich, pp. 18–102.
- Garay, L. A. (1976). Sprengel's *Habenaria montevidensis*. *Bradea*, 19, 115–120.

- Govaerts, R., Dransfield, J., Zona, S., Hodel, D.R., & Henderson, A. (2020). World Checklist of *Habenaria*. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Publicado na internet: <http://wmsp.science.kew.org/> (acesso: 10 oct 2020).
- Kränzlin, F. (1892). Beitrage zu einer monographie der gattung *Habenaria* Willd. *Engler Botanische Jahrbücher fur Systematik*, 16, 52–223.
- Kränzlin, F. (1901). Orchidacearum genera et species. vol. I. *Habenaria*. Mayer and Müller, Berlin.
- Renz, J. (1992). The genus *Habenaria* (Orchidaceae) in the Guianas. *Candollea*, 47, 483–512.
- Singer, R. (2001). Pollination biology of *Habenaria parviflora* (Orchidaceae: Habenariinae) in southeastern Brazil. *Darwiniana*, 39, 201–207.

CAPÍTULO 1. PHYLOGENETICS AND TAXONOMY OF *Habenaria* SECT. *Micranthae* (ORCHIDACEAE), WITH THE DESCRIPTION OF AN OVERLOOKED NEW SPECIES FROM THE ESPINHAÇO MOUNTAIN RANGE, EASTERN BRAZIL
(Formatado para submissão na *Systematics and Biodiversity*)

Running title: Phylogenetics and taxonomy of *Habenaria* sect. *Micranthae*

PHYLOGENETICS AND TAXONOMY OF *Habenaria* SECT. *Micranthae* (ORCHIDACEAE), WITH THE DESCRIPTION OF AN OVERLOOKED NEW SPECIES FROM THE ESPINHAÇO MOUNTAIN RANGE, EASTERN BRAZIL

GABRIELA CRUZ-LUSTRE¹, CRISTIAN CASTRO², EDUARDO LEITE BORBA¹ & JOÃO AGUIAR NOGUEIRA BATISTA¹

¹Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, Pampulha, Caixa Postal 486, 31270-910, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

Correspondence to: João A. N. Batista. E-mail: janb@icb.ufmg.br

Abstract

Habenaria sect. *Micranthae* is one of the 14 Neotropical sections of the genus and in its current delimitation, comprises ca. 14 morphologically heterogeneous species. Previous phylogenetic analyses have shown that the section is polyphyletic, so that both the species composition and the morphological characterization of the section are undefined. Among the species associated with the section, *H. bahiensis* and *H. gollmeri* have obscure taxonomic identities and undefined phylogenetic relationships. To revise the taxonomic and morphological circumscription of *H.* sect. *Micranthae* and clarify the identities and phylogenetic relationships of these species, we collected fresh samples to generate new sequences of DNA markers (ETS, ITS, *matK-trnK*, and *rps16-trnK*), performed Bayesian and parsimony analyses, and reassessed morphological features. Based on our analyses, *H.* sect. *Micranthae* is re-circumscribed to include eight phylogenetically and morphologically related species, characterized by their sulcate viscidia. Our results also indicate that *H. gollmeri* belongs to the *H. parviflora* clade, but a sample from the type locality of *H. bahiensis* is morphologically, ecologically, and phylogenetically related to *H. repens*. Nonetheless, due to differences between the original description of *H. bahiensis* and the additional analyzed specimens, its identity has remained unclarified. Specimens from the Espinhaço Mountain Range, previously identified as *H. bahiensis*, represent a new species described here as *H. abscondita*. In addition, we lectotypified *H. maderoi* and *H. moritzii* and proposed the synonymization of this last species with *H. armata*.

Keywords: Neotropics, nomenclature, Orchidinae, Orchidoideae, sectional classification, South America, systematics

Introduction

Habenaria Willd. (Orchidoideae, Orchidinae) is one of the largest genera of Orchidaceae, with ca. 910 species and worldwide distribution (Govaerts et al., 2020). Approximately one-third of this total, ca. 300 spp., are exclusive to the Neotropics, where Brazil and Mexico constitute the two main centers of diversity of Neotropical *Habenaria* (Batista, Bianchetti, González-Tamayo, Figueroa, & Cribb, 2011a; Govaerts et al., 2020). Out of these, at least 22 species are obscure or poorly understood taxa, mostly known only from the type material, which in many cases have been lost (Batista et al., 2011a; Batista, Bianchetti, González-Tamayo, Figueroa, & Cribb, 2011b). Clarifying these names' identity and characterizing the corresponding species has been a long and laborious process (Batista, personal observation).

The only worldwide revisions of *Habenaria* were those of Kränzlin (1892, 1901) in which he recognized 34 sections based mainly on floral characters. One of these sections is *H.* sect. *Micranthae*, which originally comprised five species (Table 1). Cogniaux (1893–1896), in his treatment of *Habenaria* for *Flora Brasiliensis*, added 12 species to the section, mostly Brazilian taxa described by Barbosa Rodrigues and which were not included in Kränzlin's work. Later, Kränzlin (1901) incorporated some species proposed by Cogniaux into the section, accepting ten species for the section. In total, Kränzlin and Cogniaux assigned 14 species to *H.* sect. *Micranthae*, excluding synonyms. However, the phylogenetic analyses by Batista et al. (2013) showed that both Kränzlin and Cogniaux's classifications are highly artificial and in need of a thorough revision.

One of the species originally included in *H.* sect. *Micranthae* was *H. parviflora* Lindl. (Kränzlin 1892), one of the most common species of the genus in Brazil. *Habenaria parviflora* and morphologically similar species form a complex that comprises about five species (*H. brachyphyton* Schltr., *H. parviflora*, *H. paulensis* Porsch, *H. ulei* Cogn., and *H. uruguayensis* Garay), 20 names, and several morphological variants, which have defied identification so far (Cruz-Lustre, Batista, Radins, González, & Borba, 2020). Among Neotropical *Habenaria*, this complex stands out due to its high frequency, wide geographic distribution, and taxonomic difficulty (Cruz-Lustre et al., 2020).

Another species associated with *H. parviflora* and *H.* sect. *Micranthae* is *H. bahiensis* Schltr. This species was described by Rudolf Schlechter (1914) based on a single collection from Serra dos Maracás, State of Bahia, Brazil (i.e., *E.H.G. Ule 44 Ba*). This specimen was deposited at the Berlin herbarium, until its destruction in the bombing of the abovementioned herbarium during World War II (Merrill, 1943; Butzin, 1978, 1981; Hiepko, 1987), with no

duplicates found so far in any herbaria (Batista et al., 2011a). Since then, this species' identity has remained uncertain, with Schlechter (1914) placing it close to *H. parviflora* in *H. sect. Micranthae*. Hoehne (1940) omitted *H. bahiensis* in his treatment of *Habenaria* for *Flora Brasílica* but placed it among the species with insufficient data, which probably implies that he did not see or examine any material of the species. Pabst & Dungs (1975), in their seminal study of Brazilian orchids, *Orchidaceae Brasiliensis*, recorded *H. bahiensis* only for the State of Bahia and placed it in the *H. leptoceras* Hook. alliance, which also included *H. parviflora* and other related taxa. Pabst & Dungs (1975) also did not illustrate this species, which usually indicates it to represent a poorly known species that they did not examine.

More recently, from 2009 onwards, one of us (JANB) applied the name *H. bahiensis* to specimens from the Espinhaço Mountain Range (EMR) based on Schlechter's original description. The EMR is a mountain range in Brazil that runs roughly north and south through the States of Minas Gerais and Bahia, extending for approximately 1,100 km, and being remarkable for its biodiversity and high level of endemism (Giulietti & Pirani, 1988; Rapini, Mello-Silva, & Kawasaki, 2002; Rapini, Ribeiro, Lambert, & Pirani, 2008; Echternacht, Trovó, Oliveira, & Pirani, 2011). Molecular phylogenetic analyses of New World *Habenaria* revealed that the specimens from the EMR, named *H. bahiensis* (voucher: *Batista 2867*, BHCB), belong to the *H. parviflora* clade (clade 3, Fig. 1 in Batista et al., 2013). However, the habitat mentioned in the protologue of *H. bahiensis* did not match with the habitat from the EMR specimens. The type specimen of *H. bahiensis* was collected in marsh vegetation ('*sümpfen bei Maracas, c. 1,000 m*'). Although the type locality of *H. bahiensis* is located just 100 km east of the Bahian EMR, at a similar altitude of ca. 1,000 m, the mountain range of Maracás comprises an ecotone region between deciduous forest (liana forest) and Caatinga with rocky outcrops (Giulietti et al., 2003). On the other hand, the specimens from the EMR grew from 1,200 to 1,600 m altitude in grasslands associated with quartzitic outcrops and rocky fields (*campos rupestres*), that characterize the EMR, raising doubts on the application of *H. bahiensis* for them.

A further species of particular interest related to the *H. parviflora* group is *H. gollmeri* Schltr. Initially described from the municipality of Caracas, Venezuela, the species was subsequently recorded for several other localities in that country, as well in Ecuador, Colombia, Bolivia, Guyana, and Peru (Foldats, 1969; Garay, 1978; Dodson & Dodson, 1980; Renz, 1992; Jørgensen, Nee, & Beck, 2014; Szlachetko, Nowak, Baranow, & Kolanowska, 2016; Szlachetko, Kolanowska, Nowak, & Vieira-Urbe, 2017). *Habenaria gollmeri* is common throughout its distribution range and known from numerous herbarium collections (Renz, 1992; Szlachetko et al., 2017). However, the few comments in the literature about the species are

conflicting, raising doubts about its morphological and phylogenetic relationships. In the protologue, Schlechter (1919) compared it with *H. macilenta* (Lindl.) Rchb.f. and *H. hexaptera* Lindl. Garay (1978) considered it conspecific to *H. maderoi* Schltr. from Colombia, but did not comment on the species. Renz (1992) considered *H. gollmeri* as closely related to *H. parviflora*, presenting an intermediate morphology with *H. gollmeri* in Venezuela and the Guianas, raising doubts on their separation. In contrast, Szlachetko et al. (2016, 2017) compared *H. gollmeri* to *H. armata* Rchb.f. and *H. monorrhiza* (Sw.) Rchb.f., stating that in both cases, they were probably conspecific. The species with which *H. gollmeri* was compared to by different authors are morphologically very distinct from each other and, according to the phylogeny published by Batista et al. (2013), belong to unrelated lineages in the Neotropical clade.

In the context of a broader project focusing on the *H. parviflora* complex and related species' taxonomy, this study aimed to revise the taxonomic and morphological circumscription of *H. sect. Micranthae*, elucidate the identity of *H. bahiensis*, the phylogenetic placement of *H. gollmeri*, and their relation to *H. parviflora*. Thus, we collected fresh samples that allowed a more detailed morphological and phylogenetic characterization of these species and performed phylogenetic analyses with a wider sampling of the section. Additionally, this study revealed an overlooked new species, described herein.

Materials and methods

Taxon sampling for phylogenetic analyses

We used same datasets used by Batista et al. (2013), Pedron et al. (2014), Batista, Proite, & Bianchetti (2017) and Lau, Batista, Massensini Junior, Whitten & Borba (in press), with a selected sampling of species encompassing most of the subclades of Neotropical *Habenaria*. We included samples of all currently accepted species of the *H. parviflora* complex (Cruz-Lustre et al., 2020), most of the species attributed to *H. sect. Micranthae* (Kränzlin, 1892, 1901; Cogniaux, 1893–1896), *H. gollmeri* from Colombia, a sample from the type locality of *H. bahiensis* (Batista & Cruz-Lustre 3418), and two samples from the ERM determined previously as *H. bahiensis*. In total, our dataset included 71 terminals of 62 Neotropical *Habenaria* taxa, and four African *Habenaria* species that were used as outgroup. We used *Stenoglottis longifolia* Hook.f. to root the trees, based on the results of Batista et al. (2013) and Jin et al. (2017), which recovered this species as sister of *Habenaria* plus related genera. Voucher information, geographic origins, and GenBank accession numbers are provided in Appendix 1 (see online supplemental material).

Molecular markers

Nucleotide sequences from two nuclear genome (ITS and ETS) and three plastid (*matK*, *trnK* intron and *rps16-trnK*) genome regions were used in the analyses. The ITS region consisted of internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the intervening 5.8S gene of the nuclear ribosomal multigene family. The ETS comprised a \approx 460 bp fragment at the 3' end of the ETS region. The plastid DNA regions included the complete sequences of the *matK* gene, part of the upstream and the complete downstream contiguous *trnK* intron, and the *rps16-trnK* intergenic spacer. We carried out DNA extraction, amplification, and sequencing as described by Pedron et al. (2014). For amplification of the ETS we used the primers and conditions described by Monteiro, Selbach-Schnadelbach, Oliveira, & Berg (2010). We obtained Bidirectional sequence reads for all of the DNA regions, and edited and assembled the sequences using Staden Package software (Bonfield, Smith, & Staden, 1995). The edited sequences were aligned with MUSCLE (Edgar, 2004), and the resulting alignments were manually adjusted using MEGA 7.0 software (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016).

Phylogenetic analyses

The data were analysed by means of maximum parsimony (MP) and Bayesian inference (BI) to compare phylogenetic patterns and support values generated by a method (BI) that assumes evolutionary models of nucleotide substitution and another that does not (MP). Because we did not detect no cases of strongly supported incongruence in our previous analyses with similar datasets (Pedron et al., 2014), we presented and discussed only analyses performed with the combined matrix. Phylogenetic analyses using MP were performed using PAUP* version 4 software (Swofford, 2002) with Fitch parsimony (equal weights, unordered characters; Fitch, 1971) as the optimality criterion. This analysis consisted of heuristic searches with 2,000 replicates of random addition of taxa, with branch-swapping using the tree-bisection and reconnection (TBR) algorithm, saving \leq 10 trees per replicate to avoid extensive swapping on suboptimal islands. Internal support was evaluated by 2,000 bootstrap replicates (Felsenstein, 1985) using the same parameters as the MP. For bootstrap support levels, we considered bootstrap percentages (BS) of 50–70% as weak, 71–85% as moderate, and >85% as strong (Kress, Prince, & Williams, 2002). We conducted Bayesian analysis using MrBayes v. 3.2.7 (Ronquist et al., 2012) as implemented in the Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research (CIPRES) Portal 2.0 (Miller, Pfeiffer, & Schwartz, 2010), treating each DNA region (ITS region, ETS, *matK*, *trnK* intron, and *rps16-trnK*) as a separate partition. We selected an

evolutionary model for each DNA region using the Akaike Information Criterion in MrModeltest 2 (Nylander, 2004). The selected models were the same as described in Pedron et al. (2014). For the ETS, the selected model was GTR+G. The unlink command was used to unlink parameters among each partition. Each analysis consisted of two independent runs, each with four chains, for 10,000,000 generations, sampling one tree every 1,000 generations. Convergence between the runs was evaluated using the average standard deviation of split frequencies (<0.01) and was achieved after 270,000 generations. After discarding the first 5% trees sampled as the burn-in, we used the remaining trees to assess topology and posterior probabilities (PPs) in a 50% majority-rule consensus. We considered groups with PPs <0.90 as weakly supported, groups with PPs ranging from 0.90–0.95 as moderately supported, and groups with PPs >0.95 as strongly supported.

Morphological, taxonomic, and conservation status analyses

For morphological analyses, we examined fresh, liquid-preserved and herbarium specimens. Examined herbaria included AAU, ALCB, AMES, BHCB, BM, CEN, CEPEC, COL, G, HBG, HUEFS, JBB, K, MO, NY, P, RENZ, S, SEL, US and W (acronyms according to Thiers 2020). We examined and illustrated plants' habit from dry herbarium material, and flowers' perianth and the gynostemium from liquid-preserved material using a stereo microscope, and measured them using a digital caliper. Data concerning flowering times, habitats, and geographic distributions were based on herbarium specimens and field observations. We based Morphological terminology on Stearn (1992) and Simpson (2006). We performed estimates of extent of occurrence and area of occupancy using a beta version of GeoCAT (Bachman, Moat, Hill, Torre, & Scott, 2011) as implemented in the Royal Botanic Gardens, Kew Web site, with default setting of 2 km width cell. Conservation status was inferred using the World Conservation Union Red List Categories and Criteria (IUCN, 2012) and the guidelines for using the IUCN red list categories and criteria (IUCN, 2016).

Results

Data matrices and Phylogenetic analyses

The matrix with the combined ITS, ETS, complete *matK* gene, part of the *trnK* intron, and the *rps16-trnK* intergenic spacer consisted of 4233 aligned characters, of which 422 (10.0%) were parsimony informative. The MP analysis retained the 1314 most parsimonious trees, with a tree length of 1550 steps, consistency index (CI) of 0.73, and a retention index (RI) of 0.79. The strict consensus tree from MP analysis was, for the most part, congruent with the Bayesian majority-rule consensus tree. Since the latter was fully resolved and showed stronger overall support, we chose it for presentation and discussion in this study (Fig. 1).

In all analyses, the New World *Habenaria* species formed a monophyletic group that is sister to the African *H. tridens* Lindl. (1.00 PP, 100% BS) (Fig. 1). *Habenaria brachydactyla* J.A.N.Bat. & Bianch. was recovered as sister to the remaining species of the New World clade, although with only low to moderate support (0.94 PP, 59% BS). Several well-supported subclades were recovered within the New World clade, corresponding to the same subclades identified in previous studies (Batista et al., 2013, 2017; Pedron et al., 2014; Lau et al., in press), and were numbered accordingly (subclades 1–21). *Habenaria parviflora* and the morphologically similar species *H. brachyphyton*, *H. paulensis*, *H. ulei*, and *H. uruguayensis* formed a highly supported subclade (1.00 PP, 89% BS). *Habenaria gollmeri* was also placed within this subclade, where it was supported as sister to *H. uruguayensis* (1.00 PP, 62% BS). The specimens of the EMR, one from the State of Bahia and another from the State of Minas Gerais, previously identified as *H. bahiensis* (now *H. abscondita* J.A.N.Bat. & G.Cruz-Lustre; see taxonomic treatment), were recovered as sister-groups (1.00 PP, 99% BS), in a clade with *H. edwallii* Cogn. (1.00 PP, 62% BS). This last clade, in turn, was sister to the species of the *H. parviflora* complex plus *H. gollmeri*, forming a highly supported clade (1.00 PP, 100% BS) (subclade 3 in Fig. 1). On the other hand, the sample from Serra dos Maracás, where the type of *H. bahiensis* was collected, was recovered by all analyses as sister to *H. repens* Nutt. with high support (1.00 PP, 86% BS). With the exception of *H. parviflora* (synonyms: *H. angulosa* Barb.Rodr. and *H. reichenbachiana* Barb.Rodr.) and *H. uruguayensis*, other species previously assigned to *H. sect. Micranthae* (Table 1) were scattered in several subclades across the tree, which included: subclade 2 (*H. paranaensis* Barb.Rodr.); sister to subclades 5+6 (*H. regnelli* Cogn.); subclade 7 (*H. glaucophylla* Barb.Rodr., *H. nemorosa* Barb.Rodr., and *H. umbraticola* Barb.Rodr.); subclade 10 (*H. josephensis* Barb.Rodr. and *H. leptoceras* Hook. (synonym: *H. gnoma* Barb.Rodr.); placed in a polytomy with subclades 11 and 13–21 (*H. cultellifolia*

Barb.Rodr. and *H. trifida* Kunth (synonym: *H. angustifolia* Kunth), and subclade 13 (*H. brevidens* Lindl. and *H. guilleminii* Rchb.f.). *Habenaria hexaptera* Lindl., *H. armata* (synonym: *H. moritzii* Ridl.), *H. monorrhiza* (Sw.) Rchb.f., and *H. macilenta* (Lindl.) Rchb.f. were distantly related to *H. gollmeri*, with which they were previously compared.

Morphological analyses

The sample from Serra dos Maracás (*Batista & Cruz-Lustre 3418*) presented remarkably similar vegetative and floral morphology (Figs 2.18–2.22; Appendix 2, see online supplemental material), as well as habitat type and phenology, to *H. repens*. The plants grew as paludal herbs in a swampy field by a lagoon shore, with a well-developed root system with many roots, usually without a tuberosity, well-developed lanceolate leaves, and a congested inflorescence, with numerous small, green flowers (Appendix 2). The stigmatophores are rhomboid, parallel only at the base, with the apices usually separated from each other (Appendix 2). The viscidia are subglobose and not sulcate.

The morphological analysis of the specimens from the EMR (Figs 2.1–2.17, 3.1–3.6) revealed that they are similar to *H. parviflora* and related species (Fig. 4). Specifically, the specimens' viscidia from the EMR present a longitudinal groove (Figs 2.17 and 3.6), also present in all these species. On the other hand, the specimens from the EMR differ from *H. parviflora* and related species due to their: (1) median segment of the labellum straight, non-convex (vs. convex in the *H. parviflora* complex); (2) spur clavate, slightly sinuate, about the same length or slightly longer than the pedicellate ovary (Figs 2.9–2.10, 3.6) (vs. mostly linear, straight or arched forward, and usually shorter than the pedicellate ovary); (3) petal's anterior segment slightly falcate, with the base narrower than the apex (vs. straight with the base wider than the apex); (4) angle between the median and lateral segments of the labellum 15.0–45.0(–61.0) ° (vs. usually ≤ 15.0 °); and (5) median segment of the labellum narrowly oblong (vs. narrowly triangular) (Figs 2.7–2.8).

To elucidate the identity of *H. bahiensis*, we compared the original description of the species with the sample collected in Serra dos Maracás (*Batista & Cruz-Lustre 3418*), the specimens from the EMR, and morphologically related species, such as *H. repens* and *H. parviflora* (Table 2). The description does not exactly match any of the samples or species compared. Overall, most of the characters of *H. bahiensis* fit within the range of the samples or species compared. Among the few distinctive characters, the petal's anterior segment being shorter than the posterior segment and the lateral segments of the labellum shorter than the

median segment more closely resemble *H. parviflora*. However, the measurements of the labellum are larger than those recorded for *H. parviflora*. In contrast, the pedicellate ovary measurements and the spur morphology are much more similar to *H. repens*. However, Schlechter described the apex of the spur as obtuse, while in *H. repens*, it is acute. To test the possibility that *H. bahiensis* corresponds to some other species without recent records for Maracás, we also compared the original description with the floral morphology of different species known from the State of Bahia. However, we found no match with the 46 examined taxa occurring in this State (data not shown).

Habenaria gollmeri (Fig. 5) also shows vegetative and floral morphologies similar to *H. parviflora* (Fig. 4). Nonetheless, it is distinguished by its slightly larger flowers, non-convex lateral segments of the labellum, and the presence of a depression and an obtuse keel at the base of the median segment of the labellum (Figs 5.5 and 5.10).

Discussion

Phylogeny and taxonomy of *Habenaria* sect. *Micranthae*

Our results corroborate previous studies (Batista et al., 2013, 2017; Batista, Reis, Leite, & Bianchetti, 2018; Pedron et al., 2014), showing that *H. sect. Micranthae*, as circumscribed by Kränzlin (1892, 1901) and Cogniaux (1893–1896), represents a morphologically heterogeneous and phylogenetically unrelated assemblage of species. It leads us to propose a new circumscription for the section, comprising a monophyletic group of eight morphologically related species. We were unable to test the phylogenetic placement of *H. amalfitana* F. Lehm. & Kraenzl. within *H. sect. Micranthae* (Table 1), due to the lack of material suitable for molecular analysis. However, this species is morphologically distinct from the current circumscription of *H. sect. Micranthae* proposed by us, and there is no justification for retaining it in the section.

The section's main distinctive morphological character is its longitudinally sulcate viscidia (Figs 2.16–2.17, 3.6). This character is not found in any other group of Neotropical *Habenaria*. Therefore, we propose it as a synapomorphy for the section. However, it is less evident in *H. gollmeri* (Fig. 5.13). This character was first noticed and described by Singer (Singer & Cocucci, 1997; Singer, 2001), who showed it works like a saddle or a glove to optimize pollinaria's removal and transport, fitting the viscidium to the pollinator's proboscis (i.e., female crane-flies [Diptera: Tipulidae], and pyralid moths [Lepidoptera: Pyralidae]). Other

common characters to the section include leaves usually patent and congested at the stem base, flowers small and green, and the connivent viscidia.

In addition to the species herein included in *H. sect. Micranthae*, those from the *H. parviflora* complex, includes several synonyms and several morphological variants (Cruz-Lustre et al., 2020), which make up one of the most taxonomically difficult species complexes among Neotropical *Habenaria*. We refrain from including the currently recognized species from the complex in our identification key to the section since all characters we have examined, which have traditionally been used in the taxonomy of the complex, overlap to some degree. Resolving the exact identity of the species and taxonomy of the *H. parviflora* complex is beyond the scope of this study and will be dealt with elsewhere.

Kränzlin (1892) did not designate a type for *H. sect. Micranthae* and the precise identity of the section is uncertain. Among the five species first assigned to *H. sect. Micranthae* (Table 1), *H. angustifolia* – a synonym of *H. trifida* – is morphologically very distinct and belongs to *H. sect. Spathaceae* Kraenzl. The other four species barely fit in Kränzlin's original morphological characterization of the section. Out of these, *H. amalfitana* has a unique morphology, and its relationship with other species of the genus is unclear, while *H. brevidens* is morphologically similar and phylogenetic related to *H. guilleminii*, from *H. sect. Microstylinae* Kraenzl. Out of the remaining two, *H. montevidensis* Lindl. is the basionym of *H. uruguayensis*, which is remarkably similar to *H. parviflora* and a synonym of such according to Sanguinetti (2015). Thus, we chose *H. parviflora* to typify *H. sect. Micranthae*, which is the species that best matches Kränzlin's description of the section. A new circumscription, including typifications, descriptions, characterization, and comments, are presented in the abovementioned taxonomic treatment.

Taxonomy of *Habenaria bahiensis* and the EMR specimens

Our results, both phylogenetic and morphological, show that the sample from Serra dos Maracás (Batista & Cruz-Lustre 3418), where the type of *H. bahiensis* was collected, is related to *H. repens* instead to the specimens from the EMR or *H. parviflora*. A particularly distinctive character of *H. repens* is the rhomboid stigmatophores, with the apices usually well separated from each other, which are present in the sample from Serra dos Maracás. Besides *H. repens* and *H. bahiensis*, there are records of only three other species of *Habenaria* from Serra dos Maracás: *H. leptoceras*, *H. melvillei* Ridl., and *H. rodeiensis* Barb.Rodr. However, all of them

are morphologically very different, phylogenetically unrelated, and flower during different periods from *H. repens* and *H. bahiensis* (Appendix 3, see online supplemental material).

The sample from Serra dos Maracás is from the same locality, blooms at the same time, grows in the same habitat, and is the one that best fits the original description of *H. bahiensis*, among the known local species. Altogether, these facts suggest that *H. bahiensis* could be conspecific with *H. repens*. On the other hand, Schlechter (1914) noted that *H. bahiensis* is close to *H. parviflora*. Typical specimens of *H. repens* and *H. parviflora* are very distinct, and it is hard to imagine that Schlechter could confuse the two species. Although, in some cases, poorly developed specimens of the two species may eventually be confused in a superficial analysis (Batista, personal observation). A critical analysis of the original description of *H. bahiensis* revealed that it does not precisely match either *H. repens* or *H. parviflora* (Table 2), raising doubts on the real identity of this name. Considering that the information available in the protologue of *H. bahiensis* was not sufficient to clarify its identity undoubtedly, we propose to place this name as *incertae sedis* until new data, such as additional collections in the Maracás region, can shed further light on the issue.

Although the original description of *H. bahiensis* does not allow to clarify exactly its identity, the specimens from the EMR previously identified as *H. bahiensis* (e.g., Batista et al., 2011a, 2013; Cruz-Lustre et al., 2020) are clearly differentiated by the type of habitat. While all samples from EMR specimens are restricted to this mountain range and restricted to quartzitic rocky fields, there are no quartzitic rocky fields in Serra dos Maracás, making their occurrence in that region unlikely. Thus, regardless of the exact identity of *H. bahiensis*, the use of this name for the specimens from the EMR was erroneous, leaving them unnamed. Therefore, we proposed here the new name *H. abscondita* for these specimens.

The first collection of *Habenaria abscondita* is from the municipality of Lençóis, State of Bahia, in 1979 by Larry Noblick. It is morphologically similar to other species from *H.* sect. *Micranthae* (Fig. 4), hence the previous identifications as either *H. parviflora* (Queiroz 682 HUEFS) or *H. edwallii* (Noblick 1154, 1186 ALCB; Guedes s.n. ALCB 15985) in the labels of some of the visited herbaria. The most distinct character separating *H. abscondita* from these species is the median segment of the labellum straight or at most slightly concave (Figs 2.5–2.6, 3.3–3.5), while in the species of the *H. parviflora* complex, it is convex (Figs 4.1, 4.3–4.6), or strongly concave in *H. edwallii* (Fig. 4.2). Additionally, *H. abscondita* occurs in dry or seasonally flooded fields, while all other species of the *H. parviflora* clade occur in flooded areas, usually with water visible on the soil's surface. In addition to these, we describe other morphological differences in the taxonomic treatment.

Previously, *H. abscondita* was also identified as *H. heptadactyla* Rchb.f. (Harley *et al.* 22628 K, SEL), but this identification is unwarranted. Although general floral morphology is somewhat similar between both species, *H. heptadactyla* is differentiated by its linear leaves adpressed to the stem, short and congested inflorescences (average of 2.1–4.9 flowers/cm of inflorescence), perianth bright yellow, and labellum lateral segments curved upwards. *Habenaria heptadactyla* belongs to *H. sect. Microdactylae* Kraenzl. (i.e., clade 20), being related to *H. leprieurii* Rchb.f., *H. cruegeri* Cogn., and *H. omissa* J.A.N.Bat. & Bianch. (Batista *et al.*, 2018).

Phylogeny and taxonomy of *H. gollmeri*

Our results undoubtedly place *H. gollmeri* into *H. sect. Micranthae*, since we recovered it as sister to *H. uruguayensis* within the subclade of the *H. parviflora* complex. However, the exact relationship between *H. gollmeri* and other members of the complex is not yet well understood. This group is not yet internally fully resolved and *H. gollmeri* lacks the main morphological characters that characterize the complex (i.e., median segment of the labellum convex and narrowly triangular).

The main distinctive characters of *H. gollmeri* are the presence of a depression and an obtuse keel at the base of the median segment of the labellum (Figs 5.5 and 5.10). This structure was first noticed, described (*'labello supra basin gibbo obtuso retrorso ornata'*), and illustrated by Schlechter (Schlechter, 1919; Mansfeld, 1929). Later Foldats (1969) also illustrated and described this structure in Flora de Venezuela. In fact, we are unaware of the existence of a similar structure on the labellum in any other species of Neotropical *Habenaria*, probably constituting an autapomorphy for this species. The prominent stigmatophores in this species partially cover this depression, but beyond that, we have no clue as to what its function might be.

Our results confirm the observations of Renz (1992), who suggested *H. gollmeri* as closely related to *H. parviflora*. However, we could not verify his observation that there are intermediate forms between the two species in Venezuela and the Guianas. Renz probably based this comment on the significant morphological variability of *H. gollmeri*, which reflects its wide distribution range and frequency in the highlands of northern South America. All specimens of *H. parviflora* from this region that we have examined are closer, although not identical, to the typical *H. parviflora* from Southeastern Brazil, than to *H. gollmeri*. The comparisons of *H. gollmeri* with *H. macilenta*, *H. hexaptera* (Schlechter, 1919), *H. armata*, and *H. monorrhiza*

(Szlachetko et al., 2016, 2017) are not supported since *H. gollmeri* is morphologically quite different and phylogenetically unrelated to these species (Fig. 1).

Garay (1978) considered *H. maderoi*, from Colombia, as a synonym of *H. gollmeri* without providing any justification for his decision. Garay probably based this proposal only on the original description of *H. maderoi* since the holotype has been lost, and no duplicate is known. At AMES herbarium, there are several drawings of Madero's collections, including many types. However, we were unable to locate there any drawing referring to *H. maderoi*. On the other hand, Szlachetko et al. (2017) accepted *H. maderoi* stating that it differs from *H. gollmeri* by the petal's anterior lobe reduced to a small acute basal tooth, versus frequently prominent in the latter. However, as far as we can verify, this character is variable in *H. gollmeri* and does not seem sufficient to separate the two species. At RENZ herbarium, where there are several specimens of *H. gollmeri*, the anterior segment of the petals ranges from a basal tooth-like projection to more than half the length of the posterior segment. Furthermore, the specimens of *H. maderoi* cited by Szlachetko et al. (2017) that we examined (*Martin 3733* [AMES], *Holm-Nielsen et al. 3448* [AAU]) agree with *H. gollmeri* in all aspects. Lastly, the original description of *H. maderoi* (Schlechter, 1920) strongly agrees with *H. gollmeri*, so we follow Garay (1978) considering them as conspecific.

As stated before (Batista et al., 2011a), the type of *H. moritzii* is composed of two syntypes representing two distinct species: *E.F. in Thurn 367* (K000463530) is *H. armata*, whereas *J.W.K. Moritz 630b* (BM 32626, 32627) is *H. gollmeri*. Consequently, *H. moritzii* needs to be lectotypified. Szlachetko et al. (2017) stated that Ridley's original description (Ridley, 1887) cites only the *Moritz 630b* collection and that this must be the type of *H. moritzii*. Indeed, in Ridley's original description, only the *Moritz 630b* collection appears at the end of the species description. However, Thurn collection numbers precede each of the species treated in that study and the number 367 preceding the description refers to the Thurn collection since this study comprises a list of the plant species collected by Thurn during his Mount Roraima expedition in 1884. Despite the numerous differences between *H. armata* and *H. gollmeri*, Ridley's description of *H. moritzii* is somewhat generic and we could not precisely define which collection it was based on or whether it corresponds to a mixture of the two. Due to this lack of definition, any of the two collections could be used to lectotypify this name. However, if the *Moritz 630b* collection were used, as Szlachetko et al. (2017) suggested, the name *H. moritzii* would have priority over *H. gollmeri* since it precedes the publication of the latter. On the other hand, Thurn's collections represented the primary specimens in the study where *H. moritzii* was described. To avoid unnecessary changes and retain nomenclatural stability, we propose the

lectotypification of *H. moritzii* based on the *Thurn 367* collection. Thus, this name is henceforward a synonym of *H. armata*, which precedes *H. moritzii*.

Taxonomic treatment

Habenaria sect. *Micranthae* Kraenzl., Bot. Jahrb. Syst. 16: 112. 1892; emend. J.A.N.Bat. & G.Cruz-Lustre

TYPE SPECIES: *Habenaria parviflora* Lindl., designated here.

Description

Herbs terrestrial, caulescent, 7–101 cm high, including the inflorescence, usually leafy. Tuberoles ellipsoid. Roots cylindrical. Stems cylindrical, seasonal. Leaves linear to linear-lanceolate, occasionally elliptic, usually patent, concentrated on the lower half or evenly distributed along stems, blades with length to width ratio 4:1–23:1, flat to conduplicate. Inflorescences few to many-flowered, lax to congest, 1.0–11.4 flowers/cm inflorescence. Flowers 4–110, small, green, glabrous, pedicel shorter than the ovary. Dorsal sepal 2.3–6.0 × 1.2–3.6 mm. Petals bipartite, occasionally simple, anterior segment 0.1–0.8 times longer than the posterior segment. Labellum tripartite, lateral segments 0.5–1.0(–1.2) times longer than the median segment, forming an acute angle with the median segment. Spur 2.5–11.0 mm long, 0.4–0.9(–1.1) times longer than the pedicellate ovary. Stigmatophores parallel to closely parallel, usually connivent. Rostellum mid-lobe placed between the anther loci. Viscidia globose, longitudinally sulcate, connivent, or slightly divergent.

SPECIES INCLUDED: *Habenaria abscondita* J.A.N.Bat. & G.Cruz-Lustre, *H. brachyphyton* Schltr., *H. edwallii* Cogn., *H. gollmeri* Schltr., *H. parviflora* Lindl., *H. paulensis* Porsch, *H. ulei* Cogn. and *H. uruguayensis* Garay (Figs 2.1–2.17, 3–5)

REMARKS: A small section composed of eight species, widespread from northern South America (Ecuador, Colombia, Venezuela, Guyana), central Andes (Peru, Bolivia) to Brazil (Northern region: States of Pará and Roraima; Northeastern: Bahia and Sergipe; Central-Western: Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, and Distrito Federal; Southeastern: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, and São Paulo; and Southern: Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul), Argentina, Paraguay and Uruguay (Batista et al., 2011a, 2011b). The section is particularly frequent and diverse in Southeastern and Southern Brazil, where seven

species occur. The species grow mainly in seasonally or permanently flooded grasslands, from sea level to 3700 m a.s.l.

Identification key to the species or subgroups of *Habenaria* sect. *Micranthae*

- 1a. Labellum median segment base with a depression followed by an obtuse keel *H. gollmeri*
- 1b. Labellum median segment flat throughout 2
- 2a. Labellum median segment convex, narrowly triangular *H. parviflora* complex
- 2b. Labellum median segment concave or straight, narrowly oblong 3
- 3a. Labellum median segment straight, angle between median and lateral segments of 15–45(–61) °; spur slightly sinuate, about the same length or slightly longer than the pedicellate ovary; petal’s anterior segment base slightly constricted, narrower than the apex; plants from dry grassland or at most seasonally humid grasslands *H. abscondita*
- 3b. Labellum median segment concave, angle between median and lateral segments ≤ 15 °; spur straight or arched forward, shorter than the pedicellate ovary; petal’s anterior segment base straight, linear throughout; plants from permanently humid grasslands *H. edwallii*

Habenaria abscondita J.A.N.Bat. & G.Cruz-Lustre sp. nov.

(Figs 2.1–2.17, 3.1–3.6)

TYPE: BRAZIL. Bahia: Palmeiras, Parque Nacional da Chapada Diamantina, trilha entre a Vila do Capão e a Cachoeira da Fumaça, 12°36’11”S, 41°28’36”W, 1330 m, 31 Jul 2016 (fl), G. Cruz-Lustre & J.A.N. Batista 206 (holotype: BHCB 201999!; isotypes: ALCB, CEN, HUEFS, MBM, RB, SP).

ETYMOLOGY: From the Latin *absconditus* (hidden, concealed), referring to the new species being previously misidentified and thus overlooked by taxonomists.

DIAGNOSIS: Morphologically similar to other species of *H.* sect. *Micranthae* by the sulcate viscidia, but differing by the straight median segment of the labellum, slightly sinuate spur, about the same length or slightly longer than the pedicellate ovary, and petal’s anterior segment with the base slightly constricted, narrower than the apex.

Description

Herbs seasonal, terrestrial. Tuberoles ca. 6×4 mm, ellipsoid. Roots few, cylindrical. Stems erect, 11–29(–37) cm long, including the inflorescence. Leaves 2–4(–5) per stem, spirally-alternate, evenly distributed along the stem, blades (2.7–)3.3–8.7(–11) \times 0.5–1.2(–1.35) cm, reducing towards the apex of the stem, lanceolate, membranaceous, conduplicate, base sheathing, apex acute, margin entire. Inflorescences 2.1–8.9(–16.3) cm long, usually lax; floral bracts oblong, acuminate, shorter than the pedicellate ovary. Flowers 4–26(–54), green; pedicellate ovary oblique in relation to the rachis, 8.9–12.9 mm long; ovary slightly curved, 7.1–10.8 mm long; pedicel 0.9–3 mm long. Sepals green, margins slightly smooth, translucent; dorsal sepal 3.1–4.5 \times 2.2–3.6 mm, concave, ovate when flattened, apex truncate or rounded, mucronulate; lateral sepals 3.8–5.1 \times 1.7–2.4 mm, obliquely ovate, apex acute, patent. Petals bipartite, base whitish-green, greenish-yellow towards the apex; posterior segment 2.6–3.9 \times 1.1–1.9 mm, triangular, slightly falcate, not adherent to the dorsal sepal, apex acute; anterior segment 1.4–2.7 \times 0.4–0.7 mm, inserted at the base of the posterior segment, curved backward, shorter than the posterior segment, base slightly constricted, narrower than the apex. Labellum tripartite, base whitish-green, greenish-yellow towards the apex; undivided basal part short, 0.2–0.7 mm long; lateral segments 3.0–4.5 mm long, linear, shorter than the median segment; median segment 4.1–5.9 mm, linear, straight or slightly concave, narrowly oblong, angle between the lateral and median segments 15–45(–61) °; spur 8.8–11.4 \times 0.8–1.5 mm, slightly clavate, slightly sinuate, curved backward, free from the bract, about the same length or slightly longer than the pedicellate ovary, greenish-yellow. Gynostemium 1.6–2.2 mm long, erect; connective green, apex emarginate; lateral appendages (auricles) 1.4–1.6 \times 1.1–1.3 mm, fleshy, verrucose, apex truncate. Anther bilocular, loculi 1.0–1.2 mm high, parallel; pollinarium 1.6–1.7 mm long, divergent, pollinia 0.8–1.0 \times 0.5–0.6 mm; viscidium 0.4–0.7 \times 2.0–3.0 mm, longitudinally sulcate, 0.2–0.3 mm apart from each other; caudicles 0.6 mm long. Stigmatophores (stigma lobes) 2.0 mm long, closely parallel, 0.4–0.5 mm apart from each other, light green, receptive surface 1.2–1.3 \times 0.5–0.6 mm, convex, turned frontwards, apex obtuse or truncate. Rostellum 1.2–1.4 mm long, light green; mid lobe 0.7–0.8 mm high, triangular, erect, held between the anther loculi, fleshy; side-lobes 0.4–0.6 mm long, convergent. Capsules 9–13 mm long, elliptic in lateral view; seeds dust-like.

HABITAT, PHENOLOGY, AND DISTRIBUTION: *Habenaria abscondita* is restricted to the EMR (Fig. 6) where it grows on dry and seasonally flooded grasslands (i.e., *campo limpo seco*

and *campo limpo estacionalmente inundável*; Fig. 3.1), associated with rocky fields vegetation, in sandy, shallow, rocky soils, at 1200–1600 m a.s.l. The soil may become superficially flooded during the rainy season but usually completely dries out during the dry season. Flowering occurs during the rainy season. In the State of Minas Gerais (municipalities of Buenópolis, Conceição do Mato Dentro, Diamantina, Itabira, and São Gonçalo do Rio Preto), from the middle to the end of the rainy season, from February to early May; and in the State of Bahia (municipalities of Lençóis and Palmeiras), from April to September. Like other grassland species of *Habenaria*, dry season bushfires promote flowering in the species in the subsequent rainy season (i.e., flowering specimens were found mainly in previously burned areas).

CONSERVATION ASSESSMENT: According to the IUCN Red List Categories, Criteria, and Guidelines (IUCN, 2012, 2016), *H. abscondita* is tentatively classified as endangered (EN) due to its small area of occupancy (Fig. 6), estimated at 52 km² [B2bc(iii); C2a(i)]. Seventeen records are currently known from seven localities in the EMR, of which six are located in federal or state conservation units. Still, populations are small and rare across its entire distribution range. We estimated the extent of occurrence of *H. abscondita* at 37,680 km², and the populations in the States of Bahia and Minas Gerais are approximately 650 km apart, without any known record between them. This extensive distribution gap may be partly due to the lack of sampling throughout its distribution range, but it could also correspond to a disjunction pattern. All collections of *H. abscondita*, so far, are from areas characterized by large extensions of grasslands, which are concentrated mainly in the meridional parts of the EMR, both in the States of Minas Gerais and Bahia, locally known as *campos gerais*. Large extensions of grasslands are less common between these areas, and records of this species are unknown.

ADDITIONAL MATERIAL EXAMINED: BRAZIL. Bahia: Lençóis, 24 Apr 1979 (fl), *L.R. Noblick 1154, 1186* (ALCB!); Serra dos Lençóis, Serra da Larguinha, ca. 2 km N.E. de Caeté-Açú (Capão Grande), 12°36'S, 41°29'W, 25 May 1980 (fl), *R.M. Harley et al. 22628* (K!, MO!, SEL!; K and SEL mixed with *Habenaria* sp.; material in CEPEC only with *Habenaria* sp.); Palmeiras, caminho para cachoeira Glass, 30 Jun 1983 (fl), *M.L. Guedes s.n.* (ALCB 15985!); Palmeiras, Caeté-Açú, estrada para a cachoeira Glass, 30 Jun 1983 (fl), *L.P. Queiroz 682* (HUEFS!); Palmeiras, Chapada Diamantina, campos acima da cachoeira da Fumaça, na trilha entre o topo da cachoeira e a vila do Capão, 13 Sep 1996 (fl), *J.A.N. Batista & R.S. Oliveira 621* (CEN!). Minas Gerais: Buenópolis, Parque Nacional das Sempre-Vivas, campo a sudeste

da casa do pesquisador, 20 Feb 2012 (fl), *A.A. Vale & V.A.O. Dittrich 79* (BHCB!); Conceição do Mato Dentro, Parque Natural Municipal do Ribeirão do Campo, 10 Feb 2003 (fl), *R.C. Mota & P.L. Viana 1703* (BHCB!); Diamantina, Parque Nacional das Sempre Vivas, Campos de São Domingos, 7 Mar 2009 (fl), *J.A.N. Batista et al. 2867* (BHCB!); Itabira, Parque Nacional da Serra do Cipó, Currais, 22 Mar 2008 (fl), *A.C.D. Munhoz et al. 160* (BHCB!); São Gonçalo do Rio Preto, Parque Estadual do Rio Preto, 10 May 2004 (fl), *P.L. Viana et al. 1754* (BHCB!); São Gonçalo do Rio Preto, Parque Estadual do Rio Preto, Chapada, campos na base do Pico dos Irmãos, 20 Mar 2007 (fl), *J.A.N. Batista 2029* (BHCB!); São Gonçalo do Rio Preto, Parque Estadual do Rio Preto, Próxima a Lapa da Santa, 28 Feb 2008, *A.J. Ramalho et al. 3A* (BHCB!); São Gonçalo do Rio Preto, Parque Estadual do Rio Preto, Lapa do Tropeiro, 28 Feb 2008 (fl), *A.J. Ramalho et al. 7* (BHCB!); São Gonçalo do Rio Preto, Parque Estadual do Rio Preto, Morro Redondo (campo das abobadas), 29 Feb 2008 (fl), *A.J. Ramalho et al. 15, 16* (BHCB!); São Gonçalo do Rio Preto, Parque Estadual do Rio Preto, caminho a Pindaíba, 29 Feb 2008 (fl), *A.J. Ramalho et al. 23 & 24* (BHCB!).

Habenaria gollmeri Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 6: 27. 1919.

TYPE: VENEZUELA, Miranda: Silla of Caracas, 20 Jan 1856 (fl), *J. Gollmer s.n.* (holotype: B, destroyed; lectotype designated by Szlachetko et al. 2017: AMES 23185!, drawing of the holotype).

Habenaria madero Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 7: 37. 1920.

TYPE: COLOMBIA. Cauca: *M. Madero s.n.* (holotype: B, destroyed, no isotype located; lectotype, designated here: Mansfeld (1929, table 9, fig. 32) reproduction of Schlechter's original drawing of a flower from the holotype).

DISTRIBUTION: *Habenaria gollmeri* is restricted to highlands of northern South America and central Andes (Colombia, Ecuador, Venezuela, Peru, and Bolivia) (for the complete list of materials examined see Appendix 4, in the online supplemental material). We have not examined any material from Peru, but it is likely to occur in this country. We believe the occurrence of this species in Guyana still needs confirmation. Among the specimens cited by Szlachetko et al. (2016), only *McConnell & Quelch 4* (K) is possibly *H. gollmeri*, but its flowers are in an advanced stage of maturation or damaged, not allowing a proper verification, while the other specimens – *Harrison 1426* and *Thurn 212, 367*, both at K – are, in fact, *H. armata*.

ILLUSTRATIONS: Mansfeld (1929, table 1, fig. 3 [reproduction of Schlechter's original drawing of the type specimen of *H. gollmeri*, *Gollmer s.n.*], table 9, fig. 32 [reproduction of Schlechter's original drawing of the type specimen of *H. maderoi*, *Madero s.n.*]; Foldats (1969, fig. 17); Dunsterville & Garay (1979, pg. 338); Dodson & Dodson (1980, plate 388), based on *Dodson & Thien 869*; Szlachetko *et al.* (2016, fig. 36 [redrawn from *Gollmer s.n.*, AMES]) and Szlachetko *et al.* (2017, fig. 149 [based on *Moritz 630b*, W], fig. 150 [based on *Martin 3777*, MO], fig. 151 [based on *Callejas et al. 2548*, NY], fig. 152 [based on *Rusby & Pennell 1262*, NY], fig. 153 [based on *Betancur & Pohl 207*, MO], fig. 154 [based on *Lehmann 8259*, W], fig. 236 [redrawn from Schlechter's original illustration of *H. maderoi*], fig. 237 [based on *Bonaci et al. 108*, MO], fig. 238 [based on *Martin 3733*, AMES], both as *H. maderoi*).

MISIDENTIFIED ILLUSTRATIONS: Szlachetko *et al.* (2016, fig. 37 [based on *Pittier 8006*, US] = *H. armata*, fig. 38 [based on *Pittier 7340*, US] = *H. cf. ludibundiciliata* J.A.N.Bat. & Bianch.); Szlachetko *et al.* (2017, fig. 155 [based on *Pittier 7340*, US] = *H. cf. ludibundiciliata*, fig. 156 [based on *Rudas et al. 2291*, MO] = *Habenaria* sp.).

SELECTED SPECIMENS EXAMINED: COLOMBIA. Antioquia: Rio Negro, *F.C. Lehmann 3184* (G!); Mpio. de Yarumal, *R. Callejas et al. 2548* (NY!). Boyacá: Mun. Boavita, *A. Etter et al. 906* (COL!); Mun. Arcabuco, *F. Cortés Pérez 438* (COL!); Mun. Moniquirá, *H. Dueñas 3090* (COL!); Mun. Tibaná, *M.P. Córdoba et al. 2944* (COL!); Mun. Tota, *O. Rangel & J. Aguirre 476* (COL!); Sierra Nevada del Cocuy, *P.J. Grubb et al. 597* (COL!); Somondoco, *M. Ospina H. 1151* (COL!). Cauca: entre le Rio Trubalá et Quilichao, *F.C. Lehmann 2686* (G!); Mun. Caldono, *D. Stancik 59* (COL!); Mun. El Tambo, *F. González et al. 3118* (COL!). Popayán, *F.C. Lehmann 2858* (G!); Mount El Derrumbo, *F.W. Pennell 7490* (AMES!, NY!); Coconuco to Popayán, *F.W. Pennell 6903* (AMES!, NY!); San Isidro, *F.W. Pennell & E.P. Killip 6468* (NY!). Cundinamarca: Base Cerro Quinini, *J.L. Fernández-Alonso et al. 26485* (COL!); Bogotá, *H. Schmidt 120* (COL!); Mun. Suesca, *J.P. Groenendijk 1589* (COL!); Páramo de Guasca, *H. García-Barriga 17404* (AMES!, COL!, NY!); Páramo of Usaquén, *M. Schneider 244/1* (K!, S!); Sibate, *F.W. Pennell 2446* (NY!). Magdalena: Sierra Nevada de Sta. Marta, *G.W. Martin 3733* (AMES!). Risaralda: Mun. Marsella, *W.G. Vargas 5669* (COL!). Santander: between Piedecuesta and Las Vegas, *E.P. Killip & A.C. Smith 15570* (AMES!); Vía Curos - Málaga, *J.L. Fernández-Alonso & C.N. Díaz-Pérez 28147* (COL!). ECUADOR. Azuay: Pan American Highway N of Loja, *L. Holm-Nielsen et al. 5113* (AAU!, AMES!, SEL!); Quebradas leading into the Rio Collay, *W.H. Camp E-4998* (AMES!, NY!); vicinity of El Pan, *I.L. Wiggins*

10791 (AMES!). El Oro: road from Paccha del Inca to Pasaje, A. Hirtz 3864 (SEL!). Imbabura: above Laguna Pinan, W.B. Drew E-99 (AMES!). Loja: 6 km SE Loja, Zamora-Huaico, R. Espinosa 1567 (AMES!). Pichincha: Quito to Santo Domingo, C. Dodson et al. 3741 (SEL!). Tungurahua [Tunguragua], Baños, F.C. Lehmann 8259 (AMES!, G!, K!, NY!, RENZ!, W-R!). Zamora-Chinchipe: Road Loja-Zamora, L. Holm-Nielsen et al. 3448 (AAU!, AMES!, K!, SEL!). VENEZUELA. Aragua: Colonia Tovar, A. Fendler 1416 (G!, K!, K-L!, P!). Barinas: O. Renz 7391 (RENZ!). Distrito Capital: O. Renz 8739 (RENZ!). Lara: O. Renz 7843 (RENZ!). Mérida: O. Renz 5488 (RENZ!). Miranda: Silla de Caracas, C.E.O. Kuntze 1651(?) (RENZ!, W-R!). Táchira: entre Michelena y Boca de Monte, J.A. Steyermark & M. Rabe 96786 (K!, RENZ!). Betanía, P.J.M. Maas & S.S. Tillett 5244 (NY!); Mpio. Boconó, B. Stergios et al. 20837 (US!).

Habenaria armata Rchb.f., Bonplandia 2(2): 10. 1854.

TYPE: VENEZUELA. Caracas, H. Wagener s.n. (holotype: W-R 51209!; isotype: RENZ! [photocopy, drawing and fragment of the holotype]).

Habenaria moritzii Ridl., Trans. Linn. Soc. London, Bot., Ser. 2, 2: 284. 1887.

TYPE: GUYANA. [Cuyuni-Mazaruni], Roraima, 4000 ft, Oct 1884–Jan 1885, E.F. im Thurn 367 (lectotype, designated here: K000463530!; isolectotypes: BM000032610!, RENZ! [Photocopy of type specimen from K], W-R 21181! [drawing of type specimen from K]). VENEZUELA. Prov. Aragua, Aug-Sep 1865, J.W.K. Moritz 630b (= *H. gollmeri*, remaining syntypes: BM000032626!, BM000032627!; HBG-501303!, K! [drawing of a flower from the specimen from W], RENZ 14031! [Photocopy, drawing and fragment of the specimen from W], W 0028644!).

REMARKS: The Moritz collection in HBG bears the number 603b, but it is from the same locality and date and the difference possibly corresponds to a misspelling.

Acknowledgements

The authors thank the curators and staff of the AAU, ALCB, AMES, BHCB, BM, CEN, CEPEC, COL, G, HBG, HUEFS, JBB, K, MO, NY, P, RENZ, S, SEL, US and W herbaria for specimen loans, images, or for providing access to their collections; Instituto Estadual de Florestas (IEF Minas Gerais), and Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for collecting licenses and logistical support; and Alessandro Rapini, Cássio van den Berg, João R. Stehmann and Leonardo R.S. Guimarães for helpful suggestions. GCL thanks

FAPEMIG (process 5308/15) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES, Finance Code 001) for her doctoral scholarships. JANB also acknowledges a research productivity grant (process 310690/2016-1) received from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) under Grant [CRA - APQ-03350-16].

Supplemental data

Supplemental data for this article can be accessed here:

ORCID

Gabriela Cruz-Lustre <https://orcid.org/0000-0003-0094-2594>

Eduardo L. Borba <https://orcid.org/0000-0002-9881-8630>

João A. N. Batista <https://orcid.org/0000-0003-4640-0942>

References

- Bachman, S., Moat, J., Hill, A. W., Torre, J. de la, & Scott, B. (2011). Supporting red list threat assessments with GeoCAT: Geospatial conservation assessment tool. *ZooKeys*, *150*, 117–126. doi:10.3897/zookeys.150.2109
- Batista, J. A. N., Bianchetti, L. B., González-Tamayo, R., Figueroa, X. M. C., & Cribb, P. J. (2011a). A synopsis of new world *Habenaria* (Orchidaceae) I. *Harvard Papers in Botany*, *16*, 1–47. doi:10.3100/025.016.0101
- Batista, J. A. N., Bianchetti, L. B., González-Tamayo, R., Figueroa, X. M. C., & Cribb, P. J. (2011b). A synopsis of new world *Habenaria* (Orchidaceae) II. *Harvard Papers in Botany*, *16*, 233–273. doi:10.3100/0.25.016.0202

- Batista, J. A. N., Borges, K. S., Faria, M. W., Proite, K., Ramalho, A. J., Salazar, G. A., & Berg, C. van den. (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. doi:10.1016/j.ympev.2013.01.008
- Batista, J. A. N., Proite, K., & Bianchetti, L. B. (2017). Descriptions and phylogenetic relationships of four new species and a new name of *Habenaria* (Orchidaceae) from the *cerrado* and *campos rupestres* of Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, *303*, 873–899. doi:10.1007/s00606-017-1415-x
- Batista, J. A. N., Reis, A. F. de S., Leite, J. L., Jr., & Bianchetti, L. B. (2018). Phylogeny and taxonomy of *Habenaria leprieurii*, *H. alpestris* and *H.* sect. *Microdactylae* (Orchidaceae), with descriptions of two new taxa. *Phytotaxa*, *373*, 241–271. doi:10.11646/phytotaxa.373.4.1
- Bonfield, J. K., Smith, K. F., & Staden, R. (1995). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, *24*, 4992–4999. doi:10.1093/nar/23.24.4992
- Butzin, F. (1978). In Berlin vorhandene Typen von Schlechtens Orchideenarten [Types of Schlechter's orchid species that exist in Berlin]. *Willdenowia*, *8*, 401–407.
- Butzin, F. (1981). Typenstudien im Berliner Orchideen-Herbar: Diverse markierte Typen [Studies of the types in the Berlin orchid herbarium: various marked types]. *Willdenowia*, *11*, 119–121.
- Cogniaux, C. A. (1893–1896). Orchidaceae. In C.F.P. Martius, A.W. Eichler, & I. Urban (Eds.), *Flora Brasiliensis* (vol 3, pp. 1–672). Munich: Fleischer.
- Cruz-Lustre, G., Batista, J. A. N., Radins, J. A., González, A., & Borba, E. L. (2020). Morphometric analysis of the *Habenaria parviflora* complex (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, *306*, 37. doi:10.1007/s00606-020-01634-2
- Dodson, C. H., & Dodson, P. M. (1980). Orchids of Ecuador. *Icones Plantarum Tropicarum*, *4*, 301–400.
- Dunsterville, G. C. K., & Garay, L.A. (1972). *Venezuelan Orchids Illustrated* (Vol. 5). London, UK: Andre Deutsche.
- Echternacht, L., Trovó, M., Oliveira, C. T., & Pirani, J. R. (2011). Areas of endemism in the Espinhaço Range in Minas Gerais, Brazil. *Flora*, *206*, 782–791. doi:10.1016/j.flora.2011.04.003
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, *32*, 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340

- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783–791. doi:10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x
- Fitch, W. M. (1971). Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, 20, 406–416. doi:10.1093/sysbio/20.4.406
- Foldats, E. (1969). *Habenaria*. In T. Lasser (Ed.), *Flora de Venezuela, Orchidaceae* [Flora of Venezuela, Orchidaceae] (vol. 15, pp. 37–98). Caracas: Instituto Botánico.
- Garay, L. A. (1978). 225(1). Orchidaceae (Cypripedioideae, Orchidoideae, Neottioideae). In G.W. Harling, & B. B. Sparre (Eds.), *Flora of Ecuador* (vol. 9, pp. 1–305). Göteborg & Stockholm: University of Göteborg & Swedish Museum of Natural History.
- Giulietti, A. M., & Pirani, J. R. (1988). Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In P. E. Vanzolini, & W. R. Heyer (Eds.), *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns* (pp. 39–69). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.
- Giulietti, A. M., Bocage Neta, A. L. du, Castro, A. A. J. F., Gamarra-Rojas, C. F. L., Sampaio, E. V. S. B., Virgínio, J. F., & Harley, R. M. (2003). Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga [Diagnosis of native vegetation in the Caatinga biome]. In J. M. C. Silva, M. Tabarelli, M. T. Fonseca, & L. V. Lins (Eds.), *Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação* [Caatinga biodiversity: priority areas and actions for conservation] (pp. 48–131). Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco.
- Govaerts, R., Bernet, P., Kratochvil, K., Gerlach, G., Carr, G., Alrich, P., ... Wood, J. (2020). World Checklist of Orchidaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Retrieved from: <http://apps.kew.org/wcsp/> (accessed March 18, 2020).
- Hiepko, P. (1987). The collections of the Botanical Museum Berlin-Dahlem (B) and their history. *Englera*, 7, 219–252. doi:10.2307/3776724
- Hoehne, F. C. (1940). *Habenaria*. In F. C. Hoehne (Ed.), *Flora Brasílica* (vol. 12, pp. 52–254). São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo.
- IUCN. (2012). IUCN red list categories and criteria, version 3.1. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN. Retrieved from: <http://www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria> (accessed 4 February 2020)
- IUCN. (2016). Guidelines for using the IUCN red list categories and criteria, version 12. Prepared by the standards and petitions subcommittee. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. Retrieved from:

- <http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf> (accessed 4 February 2020)
- Jin, W.-T., Schuiteman, A., Chase, M. W., Li, J.-W., Chung, S.-W., Hsu, T.-C., & Jin, X.H. (2017). Phylogenetics of subtribe Orchidinae s.l. (Orchidaceae; Orchidoideae) based on seven markers (plastid *matK*, *psaB*, *rbcL*, *trnL-F*, *trnH-psba*, and nuclear nrITS, Xdh): implications for generic delimitation. *BMC Plant Biology*, *17*: 222. doi/10.1186/s12870-017-1160-x
- Jørgensen, P. M., Nee, M. H., & Beck, S. G. (2014). Catálogo de las plantas vasculares de Bolivia [Catalog of the vascular plants of Bolivia]. *Monographs in Systematic Botany*, *127*, 1–1744.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33*, 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Kränzlin, F. (1892). Beiträge zu einer monographie der gattung *Habenaria* Willd. [Contributions to a monograph of the genus *Habenaria* Willd.]. *Engler's Botanische Jahrbücher*, *16*, 52–223.
- Kränzlin, F. (1901). Orchidacearum genera et species (vol. 1), *Habenaria*. Mayer and Müller, Berlin.
- Kress, W. J., M. Prince, L., & Williams, K. J. (2002). The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): Evidence from molecular data. *American Journal of Botany*, *89*, 1682–1696. doi:10.3732/ajb.89.10.1682
- Lau, B. L., Batista, J. A. N., Massensini Junior, A., Whitten, W. M., & Borba, E. L. (in press). Unravelling the *Habenaria repens* (Orchidaceae) complex in Brazil: a biosystematic and molecular phylogenetic approach. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Mansfeld, R. (1929). Figuren-Atlas zu den Orchideenfloren der Südamerikanischen Kordillerenstaaten [Figure atlas of the orchid flora of the South American Cordilleras]. *Repertorium specierum novarum regni vegetabilis Beihefte*, *57*, 1–142.
- Merrill, E. D. (1943). Destruction of the Berlin Herbarium. *Science*, *3*, 490–491. doi:10.1126/science.98.2553.490
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)* (pp. 1–8). New Orleans: Gateway Computing. Retrieved from <http://www.phylo.org/index.php/> (accessed 18 April 2020)

- Monteiro S. H. N., Selbach-Schnadelbach, A., Oliveira, R. P. de, & Berg, C. van den. (2010). Molecular phylogenetics of *Galeandra* (Orchidaceae : Catasetinae) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Systematic Botany*, 35, 476–486. doi:10.1600/036364410792495944
- Nylander, J. A. A. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author. Uppsala: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Pabst, G. F. J., & Dungs, F. (1975). *Orchidaceae Brasilienses I*. Hildesheim: Brücke-Verlag Kurt Schmiersow.
- Pedron, M., Buzatto, C. R., Ramalho, A. J., Carvalho, B. M., Radins, J. A., Singer, R. B., & Batista, J. A. N. (2014). Molecular phylogenetics and taxonomic revision of *Habenaria* section *Pentadactylae* (Orchidaceae, Orchidinae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 175, 47–73. doi:10.1111/boj.12161
- Rapini, A., Mello-Silva, R., & Kawasaki, M. L. (2002). Richness and endemism in Asclepiadoideae (Apocynaceae) from the Espinhaço Range of Minas Gerais, Brazil – a conservationist view. *Biodiversity and Conservation*, 11, 1733–1746. doi:10.1023/A:1020346616185
- Rapini, A., Ribeiro, P. L., Lambert, S., & Pirani, J. R. (2008). A flora dos *campos rupestres* da Cadeia do Espinhaço [The flora of the rocky fields of Cadeia do Espinhaço]. *Megadiversidade*, 4, 15–23.
- Renz, J. (1992). The Genus *Habenaria* (Orchidaceae) in the Guianas. *Candollea*, 4, 483–512.
- Ridley, H. N. (1887). Orchideae. In E. F. im Thurn (Ed.), *The Botany of the Roraima Expedition of 1884: being notes on the plants observed, by Everard F. im Thurn; with a list of the species collected, and determinations of those that are new, by Prof. Oliver, F.R.S., F.L.S., and others* (pp. 281–284). *Transactions of the Linnean Society of London, 2nd series Botany*, 2, 249–300.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., ... Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539–542. doi:10.1093/sysbio/sys029
- Sanguinetti, A. (2015). *Habenaria parviflora* (Orchidaceae), extension of its austral distributional limit and new synonymy. *Nordic Journal of Botany*, 33, 361–365. doi/10.1111/njb.00724

- Schlechter, F. R. R. (1914). Orchidaceae. In R. Pilger (Ed.), *Plantae Uleanae novae vel minus cognitae. Notizblatt des Botanischen Gartens und Museums zu Berlin-Dahlem*, 6, 120–126.
- Schlechter, F. R. R. (1919). Die Orchideenfloren der Südamerikanischen kordillerenstaaten. I Venezuela [The orchid floras of the South American Cordilleras, I Venezuela]. *Repertorium specierum novarum regni vegetabilis, Beihefte*, 6, 1–80.
- Schlechter F. R. R. (1920). Die Orchideenfloren der Suedamerikanischen Kordillerenstaaten, II Colombia [The orchid floras of the South American Cordillera States, II Colombia]. *Repertorium specierum novarum regni vegetabilis, Beihefte*, 7, 1–301.
- Simpson, M. G. (2006). *Plant systematics*. Burlington, San Diego and London: Elsevier Academic Press.
- Singer, R. B. (2001). Pollination biology of *Habenaria parviflora* (Orchidaceae: Habenariinae) in southeastern Brazil. *Darwiniana*, 39, 201–207.
- Singer, R. B., & Cocucci, A. A. (1997). Eye attached hemipollinaria in the hawkmoth and settling moth. Pollination of *Habenaria* (Orchidaceae): a study on functional morphology in five species from subtropical South America. *Botanica Acta*, 110, 328–337.
- Stearn, W. T. (1992). *Botanical Latin* (4th ed.). Portland, OR: Timber Press.
- Swofford, D. L. (2002). PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4. Sunderland, UK: Sinauer Associates.
- Szlachetko, D.L., Nowak, S., Baranow, P., & Kolanowska, M. (2016). *Orchids of the Guianas. Guyana, Suriname, French Guiana* (vol. 1). Oberreifenberg: Koeltz Botanical Books.
- Szlachetko, D.L., Kolanowska, M., Nowak, S., & Vieira-Urbe, S. (2017). *Materials to the Orchid Flora of Colombia* (vol. 1). Oberreifenberg: Koeltz Botanical Books.
- Thiers, B. (2020 [continuously updated]). *Index Herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff*. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Retrieved from: <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/> (accessed 3 December 2020).

Table 1. Comparison of the species assigned to *Habenaria* sect. *Micranthae* by different authors. Species sampled in the molecular phylogenetic analyses, including synonyms, are indicated by an asterisk.

Kränzlin (1892)	Cogniaux (1893–1896)	Kränzlin (1901)	This study
<i>H. amalfitana</i>	<i>H. angulosa</i> *	<i>H. amalfitana</i>	<i>H. abscondita</i> *
<i>H. angustifolia</i> *	<i>H. angustifolia</i> *	<i>H. angustifolia</i> *	<i>H. brachyphyton</i> *
<i>H. brevidens</i> *	<i>H. brevidens</i> *	<i>H. brevidens</i> *	<i>H. edwallii</i> *
<i>H. montevidensis</i> * ^a	<i>H. cultellifolia</i> *	<i>H. cultellifolia</i> *	<i>H. gollmeri</i> *
<i>H. parviflora</i> *	<i>H. glaucophylla</i> *	<i>H. glaucophylla</i> *	<i>H. parviflora</i> *
	<i>H. gnoma</i> *	<i>H. guilleminii</i> *	<i>H. paulensis</i> *
	<i>H. guilleminii</i> *	<i>H. leptoceras</i> *	<i>H. ulei</i> *
	<i>H. josephensis</i> *	<i>H. montevidensis</i> * ^a	<i>H. uruguayensis</i> *
	<i>H. leptoceras</i> *	<i>H. parviflora</i> *	
	<i>H. montevidensis</i> * ^a	<i>H. regnellii</i> *	
	<i>H. nemorosa</i> *		
	<i>H. paranaensis</i> *		
	<i>H. parviflora</i> *		
	<i>H. regnellii</i> *		
	<i>H. reichenbachiana</i> *		
	<i>H. umbraticola</i> *		

^a *H. montevidensis* Lindl. = *H. uruguayensis* Garay

Table 2. Comparison of the main characters of *H. bahiensis*, based on Schlechter's original description, with the samples and species examined in this study, plus *H. parviflora*.

	<i>H. bahiensis</i> (Ule 44 Ba)	<i>H. repens</i> (Batista & Cruz-Lustre 3418)	<i>H.</i> <i>repens</i>	<i>H. abscondita</i>	<i>H. parviflora</i>
Plant high, including the inflorescence (cm)	10–18	(5–)20–34(–50)	9–94	11–29(–37)	(13–)25–70(–122)
Largest leaf length (cm)	5	6–15	7–31	(2.7–)3.3–8.7(–11)	7–18(–32)
Flowers (number)	3–8	6–20(–48)	3–68	4–26(–54)	(5–)15–50(–80)
Dorsal sepal length (mm)	4.5	4–5	3.7–5(–6)	3.1–4.5	3–5
Lateral sepals length (mm)	6	5–6	4–6.2(–7.3)	3.8–5.1	3.5–5(–7)
Petal posterior segment length (mm)	≈ 4.5	3.5–4.5	3–5(–6)	2.6–4	3–4.5
Petal anterior segment length (mm)	≈ 2.5	3–4	3–6	1.4–2.7	(0–)0.5–2.5
Labellum median segment length (mm)	6	3–4.2	3–5(–6.3)	4–6	(2–)2.5–3(–5)
Labellum lateral segments length (mm)	4.5	4.2–5.3	3.5–6.2	3.0–4.5	1.5–3
Labellum lateral segments/median segment length ratio	0.8	1.2–1.4	0.8–1.7	0.8–1(–1.2)	0.7–1
Spur length (mm)	8	6–7.5	6–10.5	8.8–11.4	5–9
Pedicellate ovary length (mm)	12	11–14	11–16(–20)	9–13	7–11
Spur/pedicellate ovary length ratio	0.7	0.5–0.6	0.4–0.7(–0.9)	0.7–1.1	0.7–1
Spur morphology	narrowly cylindrical	linear	linear	clavate to slightly clavate	linear to slightly clavate
Spur apex	obtuse	acute	acute	obtuse	acute to obtuse

Figure captions

Fig. 1. Bayesian 50% majority-rule consensus tree of the combined ITS, ETS, *matK-trnK*, and *rps16-trnK* datasets. Numbers above the lines, next to the nodes, represent the posterior probabilities (PP) from the Bayesian analysis and bootstrap percentages (BP) from parsimony analyses. Bootstrap percentages $\leq 50\%$ are indicated by a hyphen (-). Neotropical subclades are numbered (1–21), according to Batista et al. (2013). Species discussed in this study are highlighted by an asterisk. Species previously assigned to *H. sect. Micranthae* are highlighted in bold. Species previously compared with *H. gollmeri* are pointed by arrows. Acronyms for the Brazilian States: BA = Bahia; MG = Minas Gerais; PR = Paraná. The generic name for all *Habenaria* species is abbreviated.

Fig. 2. Morphological characters from *Habenaria abscondita* and *H. repens*. *H. abscondita*. 2.1–2.2. Habit. 2.3–2.4. Leaves. 2.5. Flower, front view. 2.6. Flower, lateral view. 2.7–2.8. Perianth, dissected. 2.9–2.10. Ovary, pedicel, spur and gynostemium, lateral view. 2.11. Gynostemium, lateral view. 2.12. Gynostemium, dorsal view. 2.13. Gynostemium, front view. 2.14. Stigmatophores (stigma lobes), top view. 2.15. Rostellum, top/frontal view. 2.16–2.17. Pollinarium; note the longitudinally sulcate viscidium (arrows). *H. repens*. 2.18–2.19. Habit. 2.20. Leaf. 2.21. Perianth, dissected. 2.22. Ovary, pedicel, spur and gynostemium, lateral view. 2.1–2.3, 2.5–2.6 and 2.11–2.17 from: *Cruz-Lustre & Batista 206* (holotype); 2.7 and 2.9 from *Batista & Oliveira 621*; 2.4, 2.8 and 2.10 from *Batista et al. 2867*; 2.18–2.22 from: *Batista & Cruz-Lustre 3418*. Abbreviations: an = anther; au = auricles; ca = caudicle; cn = connective; ov = ovary; po = pollinia; ro = rostellum mid lobe; sp = spur; st = stigmatophores; vi = viscidium.

Fig. 3. Habitat and morphological characters of *Habenaria abscondita*. 3.1. Habitat, dry grasslands (*campo limpo seco*) in Parque Nacional das Sempre Vivas, municipality of Diamantina, State of Minas Gerais. 3.2. Habitat. 3.3. Inflorescence detail. 3.4. Flowers, front and side views. 3.5. Flower, front view. 3.6. Gynostemium, front view; note the sulcate viscidium (arrow). 3.2, 3.6 from *Cruz-Lustre & Batista 206*; 3.3 from *Batista et al. 2029*; 3.4 from *Batista et al. 2867*; 3.5 from *Batista & Oliveira 621*. Abbreviations: an = anther; cn = connective; ro = rostellum mid lobe; st = stigmatophores; vi = viscidium. Scale bars: 3.2 = 5 cm; 3.3–3.5 = 5 mm; 3.6 = 1 mm.

Fig. 4. Inflorescence and flowers of species of *Habenaria* sect. *Micranthae*. 4.1. *H. brachyphyton*. 4.2. *H. edwallii*. 4.3. *H. parviflora*. 4.4. *H. paulensis*. 4.5. *H. ulei*. G. 4.6. *H. uruguayensis*. 4.1 from *Batista* 2511 & 2512 (municipality of Arroio do Sal, State of Rio Grande do Sul); 4.2 from *Batista* 842 (Chapada dos Veadeiros, municipality of Teresina de Goiás, State of Goiás); 4.3 from *Batista* 2638 (Parque Estadual do Itacolomi, municipality of Ouro Preto, State of Minas Gerais); 4.4 from *Batista* 2481 (municipality of Cambará do Sul, State of Rio Grande do Sul); 4.5 from *Cruz-Lustre* 281 (municipality of Urubici, State of Santa Catarina); 4.6 from *Batista* 2470 (municipality of Cambará do Sul, State of Rio Grande do Sul).

Fig. 5. Morphological characters of *Habenaria gollmeri*. 5.1–5.2. Habit. 5.3. Inflorescence. 5.4–5.6. Flower, front view, side view, and $\frac{3}{4}$ side view, respectively. 5.7. Sepals and petals, dissected. 5.8–5.10. Labellum and spur, $\frac{3}{4}$ side view, front view, and side view, respectively. 5.11–5.12. Pedicellate ovary and gynostemium, front view, and side view. 5.13. Pollinarium. An obtuse keel at the base of the median segment of the labellum is indicated by an arrow. All from *Castro* 2000.

Fig. 6. Distribution map of *Habenaria abscondita*. Acronyms for Brazilian States: BA = Bahia; ES = Espírito Santo; MG = Minas Gerais.

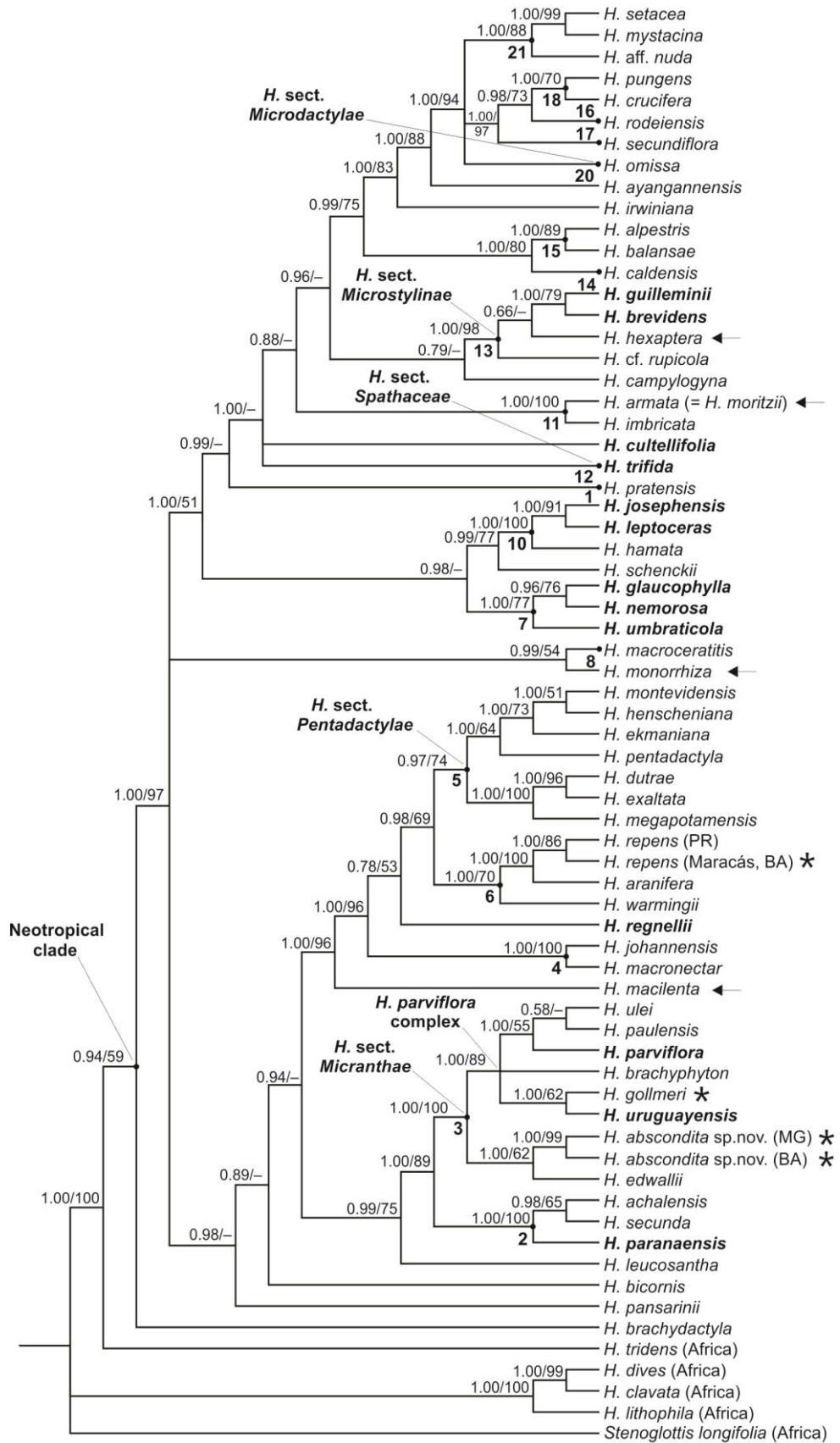


Fig. 1. Bayesian 50% majority-rule consensus tree of the combined ITS, ETS, *matK-trnK*, and *rps16-trnK* datasets.

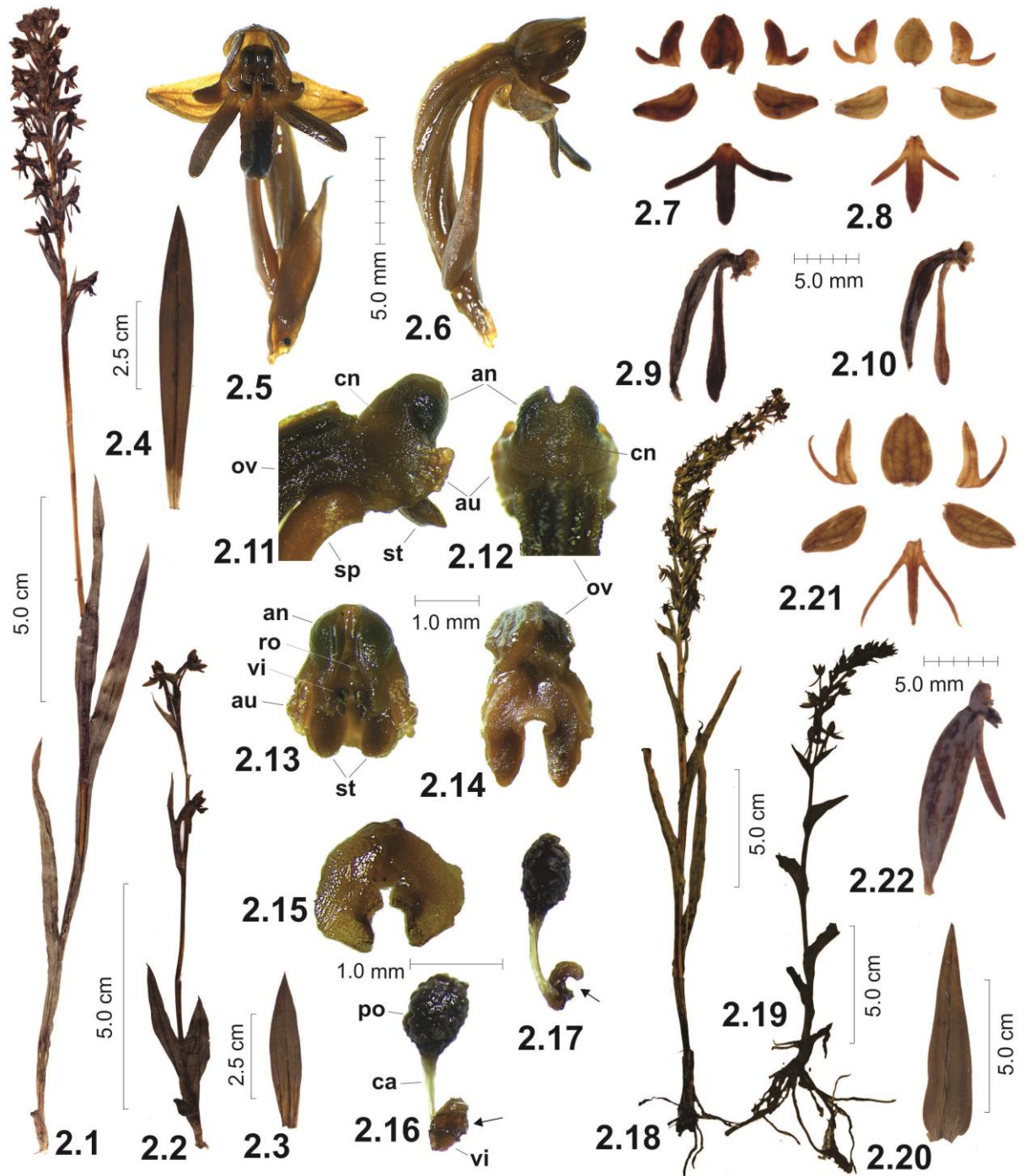


Fig. 2. Morphological characters from *Habenaria abscondita* and *H. repens*.

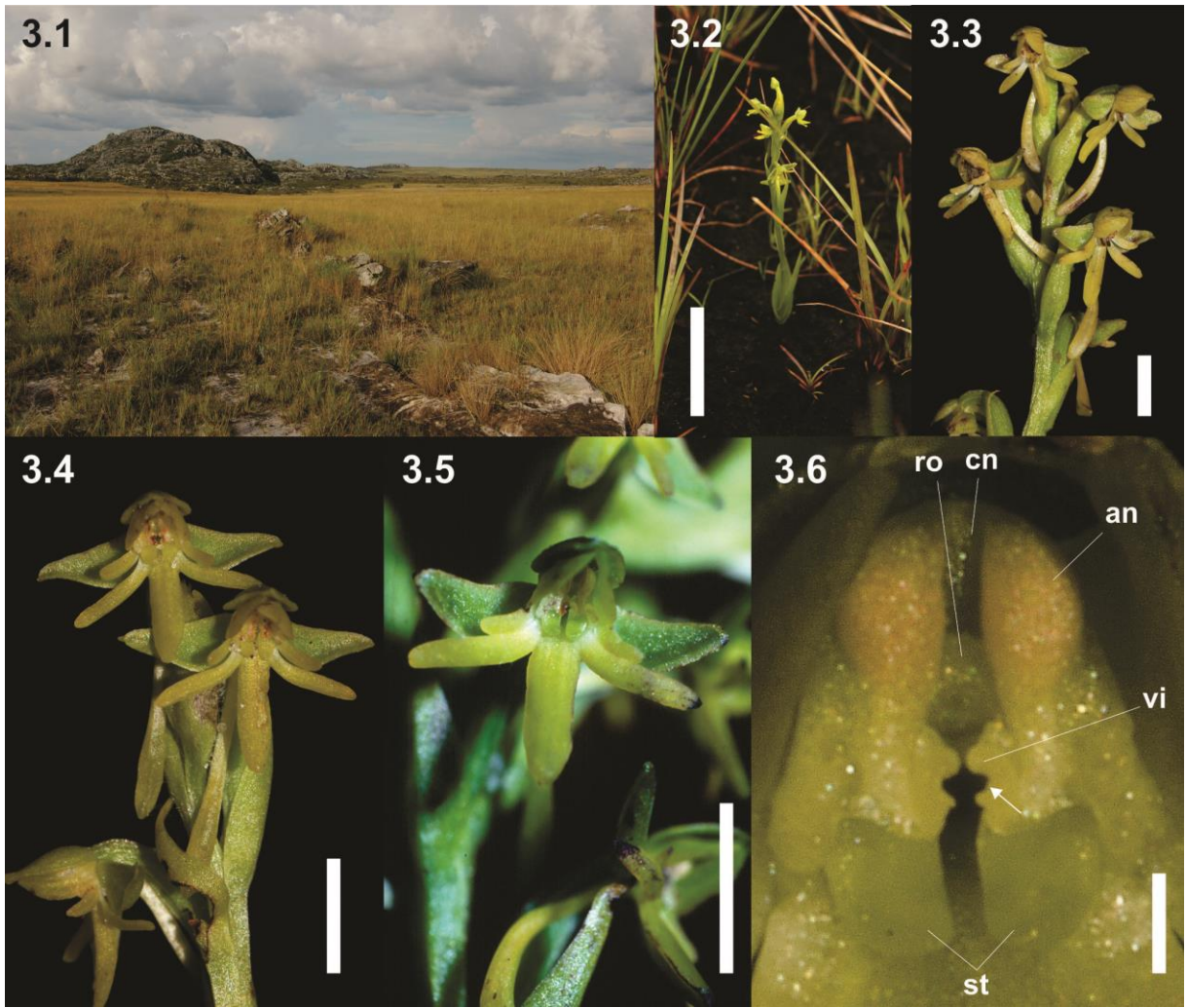


Fig. 3. Habitat and morphological characters of *Habenaria abscondita*.

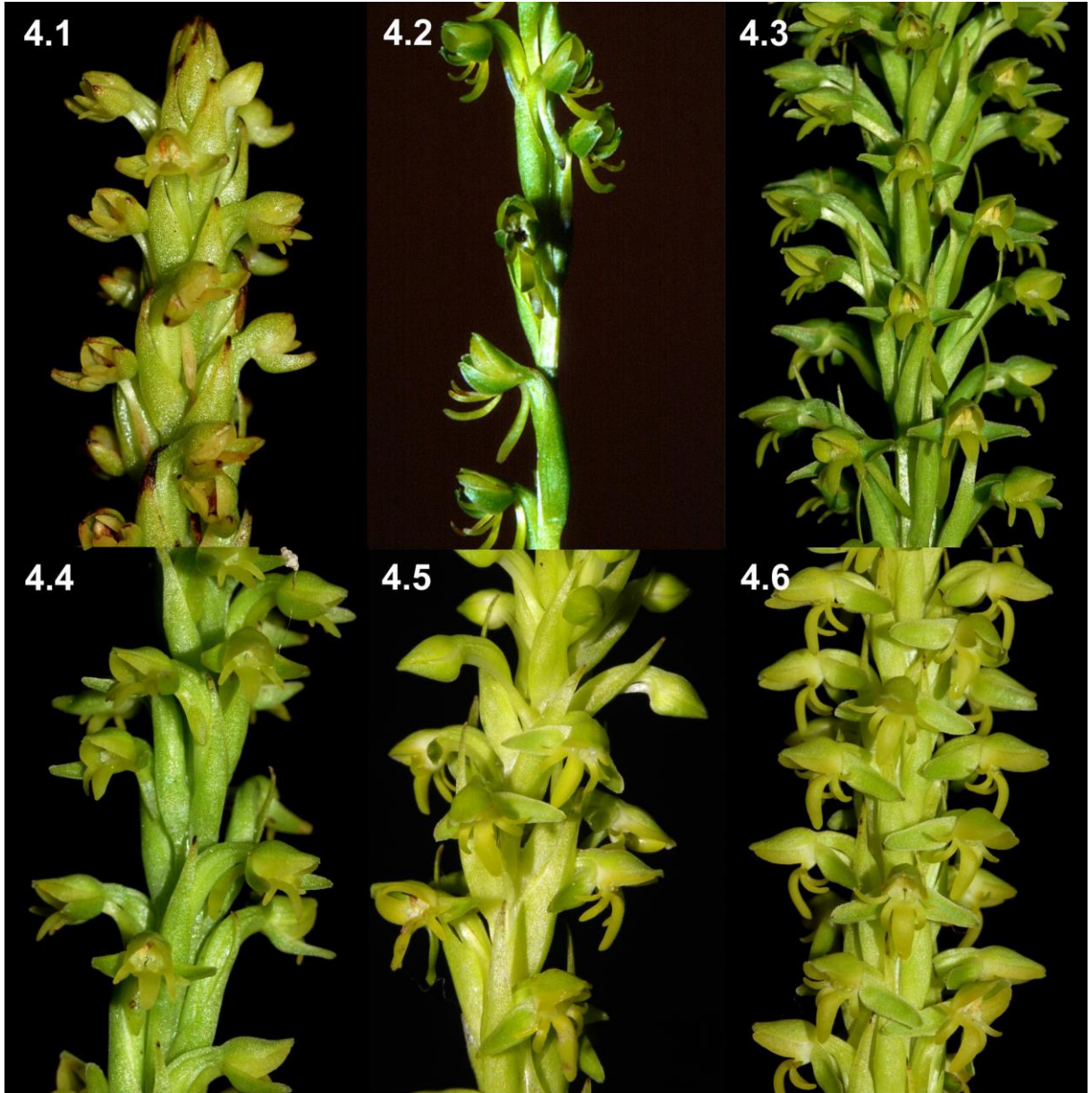


Fig. 4. Inflorescence and flowers of species of *Habenaria* sect. *Micranthae*.

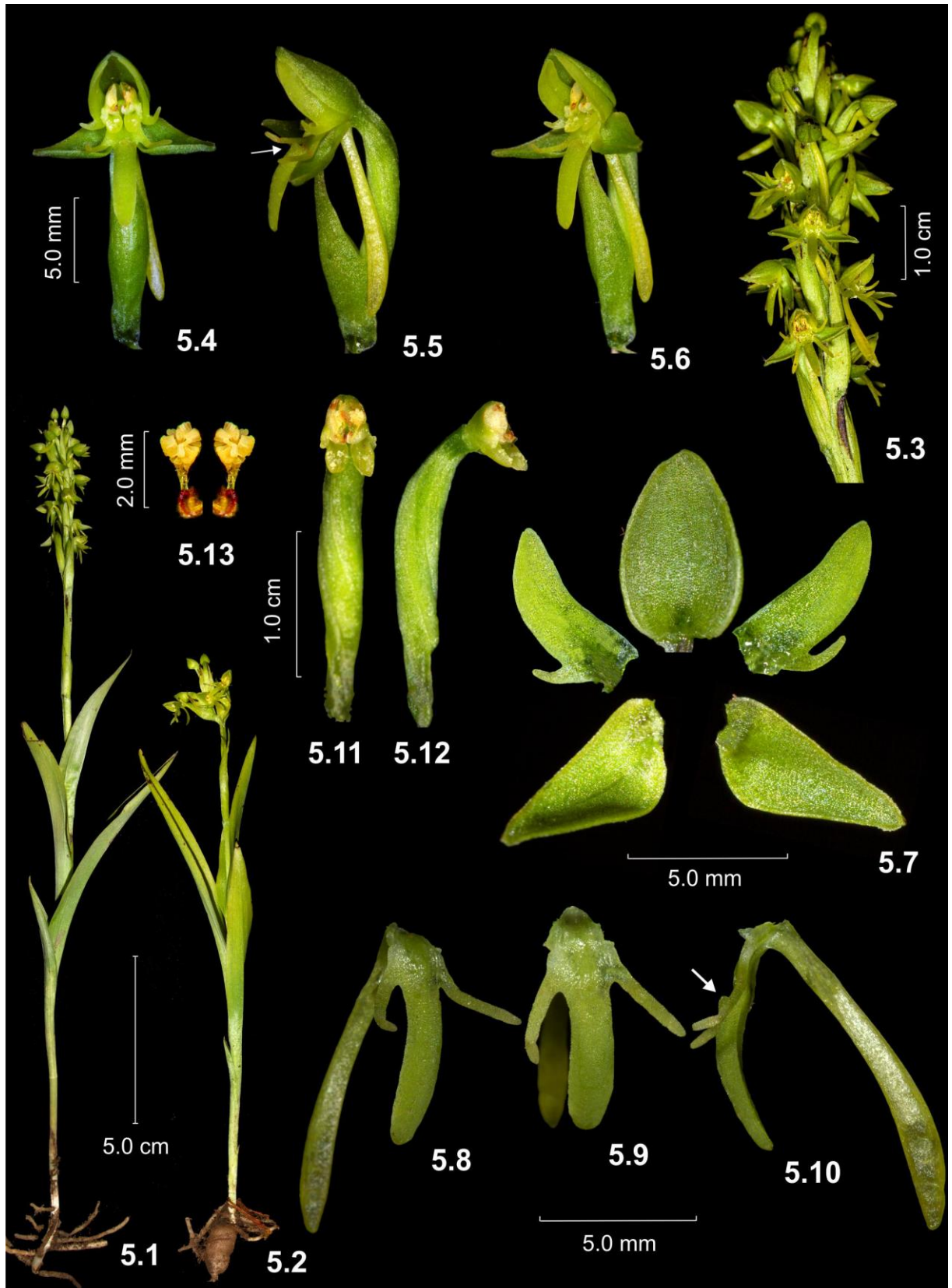


Fig. 5. Morphological characters of *Habenaria gollmeri*.

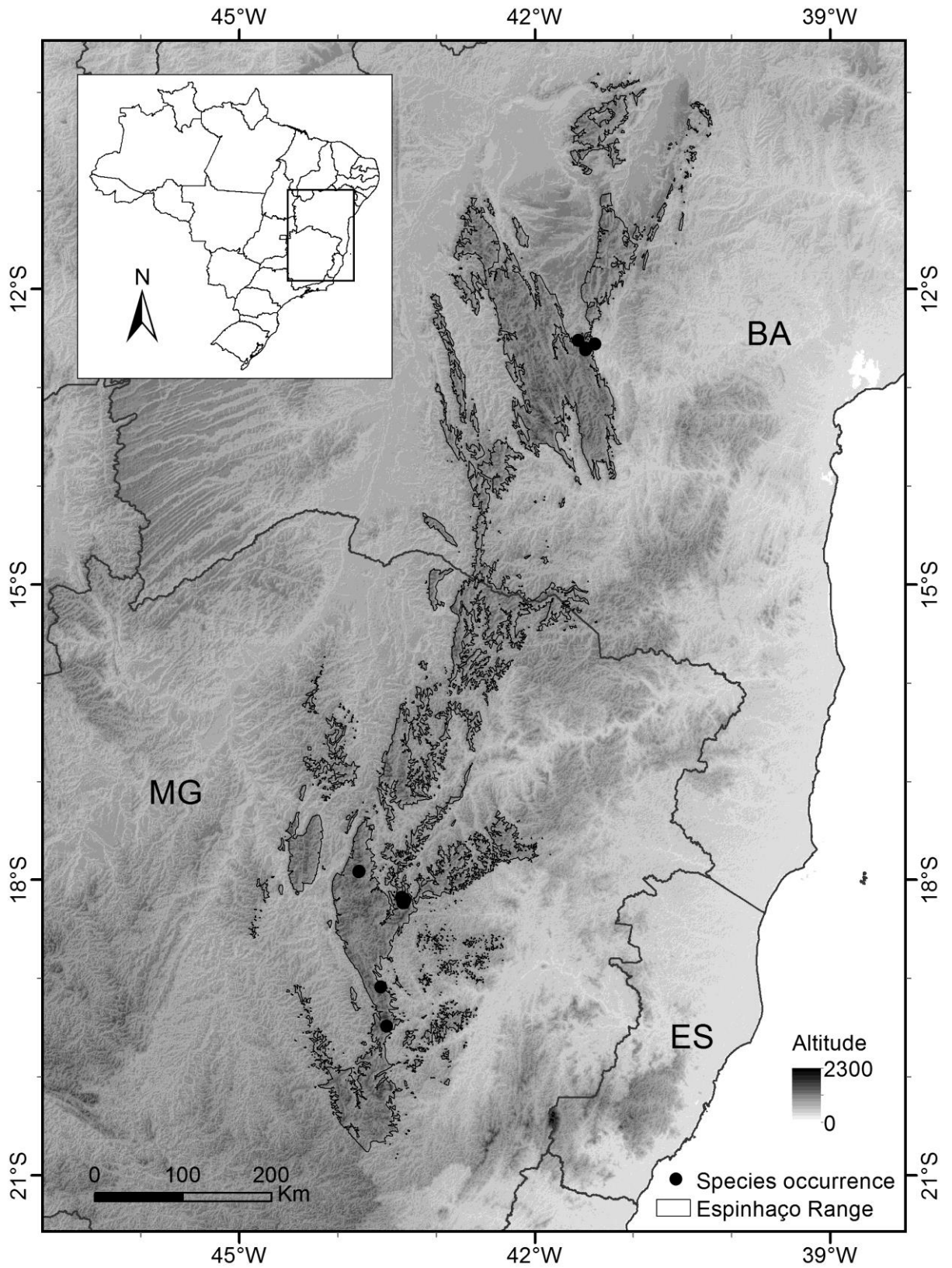


Fig. 6. Distribution map of *Habenaria abscondita*.

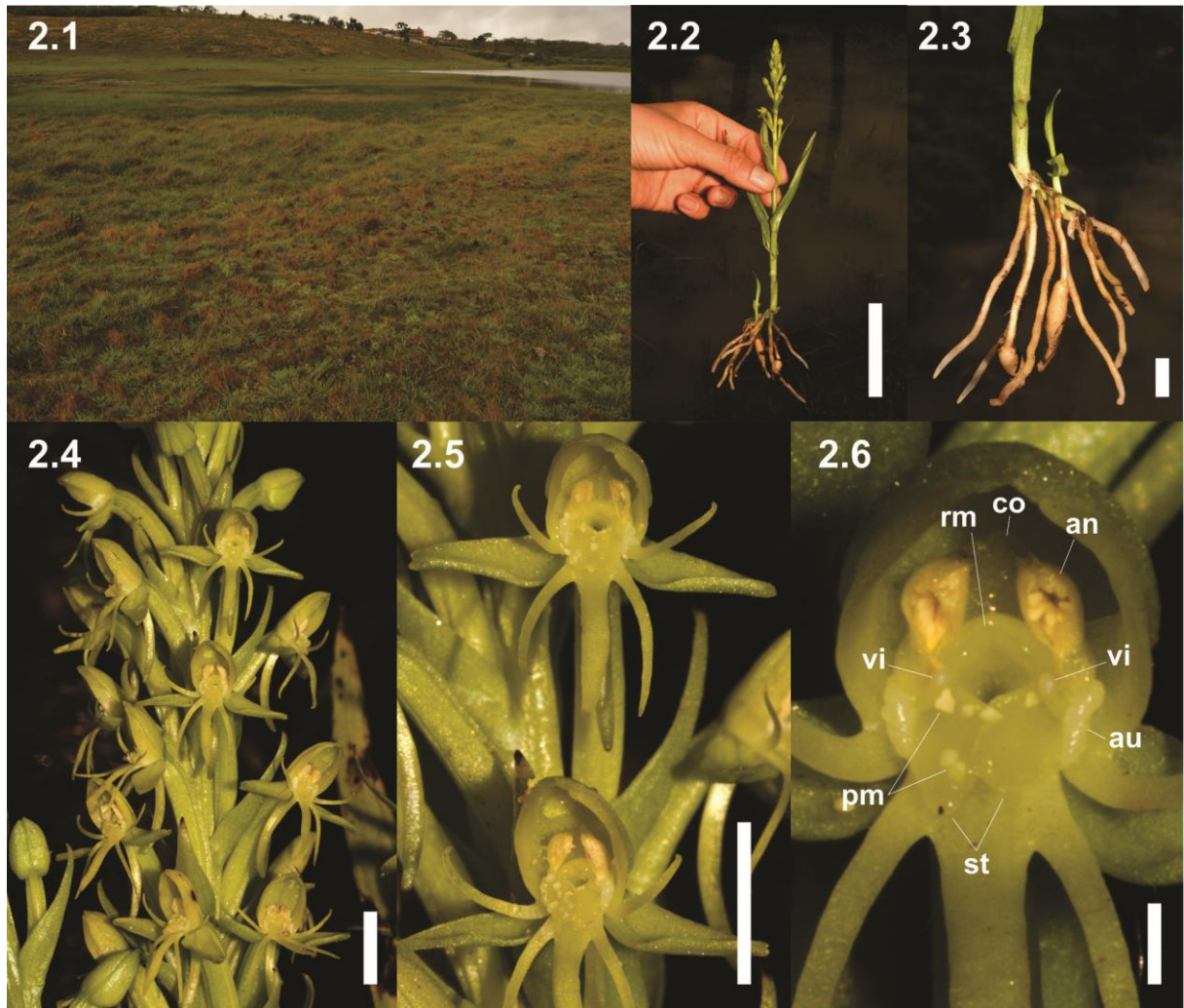
Appendix 1. GenBank accessions and voucher data of the terminals used in the phylogenetic analyses of *Habenaria* sect. *Micranthae*. Acronyms for the Brazilian states: BA=Bahia; GO=Goiás; MG=Minas Gerais; MT=Mato Grosso; PB=Paraíba; PR=Paraná; RJ=Rio de Janeiro; RS=Rio Grande do Sul; SC=Santa Catarina. DF=Distrito Federal. USA: United States of America; FL = Florida.

Taxon	Voucher	Origin	ITS	<i>matK-trnK</i>	<i>rps16-trnK</i>	ETS
<i>Habenaria</i> Neotropical						
<i>H. abscondita</i> J.A.N.Bat. & G.Cruz-Lustre	Batista 2867 (BHCB)	Brazil, MG	HM777562	pending	pending	pending
<i>H. abscondita</i> J.A.N.Bat. & G.Cruz-Lustre	Cruz-Lustre 206 (BHCB)	Brazil, BA	MW567131	pending	pending	pending
<i>H. achalensis</i> Kraenzl.	Batista 2506 (BHCB)	Brazil, RS	HM777526	KJ021403	KJ021457	MT623244
<i>H. alpestris</i> Cogn.	Batista 1832, 2539 (BHCB)	Brazil, MG	HM77768	KJ021361	KJ021416	MT623218
<i>H. araniifera</i> Lindl.	Batista 2472 (BHCB)	Brazil, RS	HM777626	KJ021394	KJ021448	MT623173
<i>H. armata</i> Rchb.f.	Batista 1297 (CEN)	Brazil, DF	HM777677	KJ021367	KJ021422	-
<i>H. ayangannensis</i> Renz	Batista 1919 (BHCB)	Brazil, MG	HM777706	KJ021360	KJ021415	-
<i>H. balansae</i> Cogn.	Batista 2336 (BHCB)	Brazil, MG	HM777683	KJ021362	KJ021417	MT623217
<i>H. bicornis</i> Lindl.	Felix 10803 (E:AN)	Brazil, PB	KF998087	KX784170	KX784174	MT623247
<i>H. brachydactyla</i> J.A.N.Bat. & Bianch.	Batista & Proite 3109 (BHCB)	Brazil, DF	KX784176	KX784171	KX784175	MT623252
<i>H. brachyphyton</i> Schltr.	Batista 2515 (BHCB)	Brazil, RS	HM777557	pending	pending	pending
<i>H. brevidens</i> Lindl.	Batista 2616 (BHCB)	Brazil, MG	HM777535	pending	pending	pending
<i>H. caldensis</i> Kraenzl.	Batista 250 (CEN)	Brazil, GO	HM777645	KJ021363	KJ021418	MT623219
<i>H. campylogyna</i> J.A.N.Bat. & Bianch.	Batista 1901 (BHCB)	Brazil, MG	HM777581	KJ021364	KJ021419	MT623220
<i>H. crucifera</i> Rchb.f. & Warm.	Batista 1826 (BHCB)	Brazil, MG	HM777574	KJ021356	KJ021411	MT623212
<i>H. cultellifolia</i> Barb.Rodr.	Batista 1487 (CEN)	Brazil, GO	HM777675	pending	pending	pending
<i>H. dutrae</i> Schltr.	Pedron 3 (ICN)	Brazil, RS	KJ021339	KJ021387	KJ021441	-
<i>H. edwallii</i> Cogn.	Batista 1717 (BHCB)	Brazil, MG	HM777564	KJ021402	KJ021456	MT623243
<i>H. ekmaniana</i> Kraenzl.	Radins s.n. (BHCB)	Argentina	KJ021340	KJ021383	KJ021438	MT623233
<i>H. exaltata</i> Barb.Rodr.	Batista 2771 (BHCB)	Brazil, MG	HM777621	KJ021388	KJ021442	MT623234

<i>H. glaucophylla</i> Barb.Rodr.	Batista 761 (CEN)	Brazil, DF	HM777631	KJ021373	KJ021428	MT623231
<i>H. gollmeri</i> Schltr.	Castro 2000 (COL)	Colombia	MW567127	pending	pending	pending
<i>H. guillemii</i> Rchb.f.	Batista 1795 (BHCB)	Brazil, MG	HM777539	HM777900	-	-
<i>H. hamata</i> Hoehne	Batista 1519 (CEN)	Brazil, DF	HM777586	KJ021371	KJ021426	MT623228
<i>H. henscheniana</i> Barb.Rodr.	Batista 2802 (BHCB)	Brazil, MG	HM777623	KJ021376	KJ021431	-
<i>H. hexaptera</i> Lindl.	Batista 2399 (BHCB)	Brazil, MG	HM777538	KJ021366	KJ021421	MT623221
<i>H. imbricata</i> Lindl.	Batista 1123 (CEN)	Brazil, DF	HM777648	KJ021368	KJ021423	MT623226
<i>H. irviniana</i> J.A.N.Bat. & Bianch.	Batista 249 (CEN)	Brazil, GO	HM777642	KX784167	KX784172	MT623251
<i>H. johannensis</i> Barb.Rodr.	Mota 2777 (BHCB)	Brazil, MG	HM777609	KJ021398	KJ021452	MT623240
<i>H. josephensis</i> Barb.Rodr.	Batista 2452 (BHCB)	Brazil, MG	HM777596	HM777854	-	-
<i>H. leptoceras</i> Hook.	Batista 2658 (BHCB)	Brazil, RJ	HM777597	KJ021370	KJ021425	MT623227
<i>H. leucosantha</i> Barb.Rodr.	Batista 1604 (BHCB)	Brazil, DF	HM777568	KJ021406	KJ021460	MT623248
<i>H. macilentia</i> (Lindl.) Rchb.f.	Batista 2393 (BHCB)	Brazil, MG	HM777606	KJ021400	KJ021454	MT623241
<i>H. macrocarattis</i> Willd.	Whitten 2827 (FLAS)	USA, FL	MT582231	MT623329	MT623281	MT623230
<i>H. macronectar</i> (Vell.) Hoehne	Batista 2519 (BHCB)	Brazil, PR	HM777614	KJ021399	KJ021453	MT623239
<i>H. megapotamensis</i> Hoehne	Pedron 10 (ICN)	Brazil, RS	KJ021345	KJ021384	KJ021439	MT623235
<i>H. monorrhiza</i> Rchb.f.	Whitten 2721 (FLAS)	Ecuador	MT582232	MT623330	MT623282	MT623249
<i>H. montevidensis</i> Spreng.	Batista 2479 (BHCB)	Brazil, RS	HM777619	KJ021378	KJ021433	-
<i>H. mystacina</i> Lindl.	Batista 1812 (BHCB)	Brazil, MG	HM777728	KJ021353	KJ021408	MT623205
<i>H. nemorosa</i> Barb.Rodr.	Batista 2567 (BHCB)	Brazil, MG	HM777634	pending	pending	pending
<i>H. pansarnii</i> J.A.N.Bat. & Bianch.	Batista et al. 1926 (BHCB)	Brazil, MG	HM777520	KX784168	KX784173	MT623250
<i>H. aff. nuda</i> Lindl.	Batista 2869 (BHCB)	Brazil, MG	HM777718	KJ021354	KJ021409	MT623206
<i>H. omissa</i> J.A.N.Bat. & Bianch.	Batista 1576 (BHCB)	Brazil, DF	HM777655	KJ021357	KJ021412	MT623207
<i>H. paramaensis</i> Barb.Rodr.	Batista 2436 (BHCB)	Brazil, MG	HM777528	KJ021405	KJ021459	MT623246
<i>H. parviflora</i> Lindl.	Cruz-Lustre 325 (BHCB)	Brazil, RJ	MW567128	pending	pending	pending
<i>H. paulensis</i> Porsch	Batista 2481 (BHCB)	Brazil, RS	HM777556	pending	pending	pending

<i>H. pentadactyla</i> Lindl.	Pedron 11 (ICN)	Brazil, RS	KJ021348	KJ021380	KJ021435	MT623236
<i>H. pratensis</i> (Salzm. ex Lindl.) Rchb.f.	Batista 2686 (BHCB)	Brazil, BA	HM777546	KJ021374	KJ021429	MT623225
<i>H. pungens</i> Cogn.	Batista 2095 (BHCB)	Brazil, GO	HM777570	KJ021355	KJ021410	MT623213
<i>H. quinqueseta</i> (Michx.) Sw.	Whitten 3324 (FLAS)	USA, FL	MT582230	MT623331	MT623283	MT623229
<i>H. regnellii</i> Cogn.	Batista 2801 (BHCB)	Brazil, MG	HM777603	KJ021391	KJ021445	-
<i>H. repens</i> Nutt.	Batista 3418 (BHCB)	Brazil, BA	MW567129	pending	pending	pending
<i>H. repens</i> Nutt.	Lau 87 (BHCB)	Brazil, BA	MT582206	MT623293	MT623258	MT623176
<i>H. repens</i> Nutt.	Felix s.n. (EAN 12371)	Brazil, PB	MT582207	MT623295	MT623260	MT623179
<i>H. repens</i> Nutt.	Batista 2522 (BHCB)	Brazil, PR	HM777627	KJ021395	KJ021449	MT623178
<i>H. rodieiensis</i> Barb.Rodr.	Mota 2824 (BHCB)	Brazil, MG	HM777577	KJ021359	KJ021414	MT623216
<i>H. cf. rupicola</i> Barb.Rodr.	Batista 2568 (BHCB)	Brazil, MG	HM777533	KJ021365	KJ021420	MT623222
<i>H. schenckii</i> Cogn.	Batista 2882 (BHCB)	Brazil, BA	HM777580	KJ021372	KJ021427	MT623232
<i>H. secunda</i> Lindl.	Batista 2640 (BHCB)	Brazil, RJ	HM777525	KJ021404	KJ021458	MT623245
<i>H. secundiflora</i> Barb.Rodr.	Batista 2392 (BHCB)	Brazil, MG	HM777637	KJ021358	KJ021413	MT623214
<i>H. setacea</i> Lindl.	Mota 3019 (BHCB)	Brazil, MG	HM777731	KJ021352	KJ021407	MT623204
<i>H. trifida</i> Kunth	Batista 1783 (BHCB)	Brazil, DF	HM777672	KJ021369	KJ021424	MT623223
<i>H. ulei</i> Cogn.	Cruz-Lustre 281 (BHCB)	Brazil, SC	MW567130	pending	pending	pending
<i>H. umbraticola</i> Barb.Rodr.	Mota 3569 (BHCB)	Brazil, MG	HM777605	pending	pending	pending
<i>H. uruguayensis</i> Garay	Batista 2477 (BHCB)	Brazil, RS	KC257475	pending	pending	pending
<i>H. warmingii</i> Rchb.f. & Warm.	Batista 2584 (BHCB)	Brazil, MG	HM777617	KJ021397	KJ021451	MT623237
<i>Habenaria</i> Africa						
<i>H. clavata</i> (Lindl.) Rchb.f.	Peter CP4185 (GRA), Peter CP4103 (GRA): GenBank	Africa	DQ522074	DQ522093	-	-
<i>H. dives</i> Rchb.f.	Peter CP4104 (GRA): GenBank	Africa	DQ522075	DQ522095	-	-

<i>H. lithophila</i> Schltr.	Peter CP4085 (GRA): GenBank	Africa	DQ522077	DQ522098	-	-
<i>H. tridens</i> Lindl.	Truter JT182 (NU): GenBank	Africa	DQ522080	DQ522101	-	-
Outgroup Habenariinae						
<i>Stenoglossis longifolia</i> Hook.f.	Batista 3279 (BHCB)	Africa	MT582234	MT623335	MT623287	MT623253



Appendix 2. Habitat and morphological characters of *Habenaria repens* (municipality of Maracás, State of Bahia). 2.1. Habitat, flooded field by lagoon shore in Serra dos Maracás, State of Bahia. 2.2. Habit. 2.3. Roots and basal part of the stem. 2.4. Inflorescence detail. 2.5. Flowers, front view. 2.6. Gynostemium, front view. All from *Batista & Cruz-Lustre 3418*. Abbreviations: an = anther; au = auricles; co = connective; pm = pollen massulae; rm = rostellum mid lobe; st = stigmatophores; vi = viscidia. Scale bars: 2.2 = 5 cm; 2.3 = 1 cm; 2.4–2.5 = 5 mm; 2.6 = 1 mm.

Appendix 4. Specimens examined of *Habenaria gollmeri*: COLOMBIA. Antioquia: Rio Negro, 2200 m, 21 Sep 1883 (fl), *F.C. Lehmann 3184* (G!); 2500 m, 28 Dec 1936 (fl), *O. Renz 4105* (RENZ!); Mpio. de Yarumal, llanos de Cuivá, sobre la carretera al cementerio, 2790 m, 21 Aug 1986 (fl), *R. Callejas et al. 2548* (NY!). Boyacá: Mun. Boavita, bosque Chulavita, Cañon del Chicamocha, 1800 m, 2 Oct 1991 (fl), *A. Etter et al. 906* (COL!); límite entre los departamentos Santander y Boyacá: corregimiento de Virolín, Finca ‘La Sierra’, 2500-2600 m, 16 May 1976 (fl), *G. Lozano et al. 2569* (COL!); Mun. Arcabuco, vereda Peñas Blancas, 2865 m, 4 Feb 2008 (fl), *F. Cortés Pérez 438* (COL!); Mun. Moniquirá, vereda Colorado, sector alto, Río Pómeica, 2200-2300 m, 9 Jul 2001 (fl), *H. Dueñas 3090* (COL!); Mun. Tibaná, vereda Bayetá, 2490 m, 29 Nov 2003 (fl), *M.P. Córdoba et al. 2944* (COL!); Mun. Tota, cerro los Arcos, alrededores del Lago de Tota, 3050 m, 1976, *O. Rangel & J. Aguirre 476* (COL!); Sierra Nevada del Cocuy, Laguna Seca, 2750 m, 18 Aug 1957 (fl), *P.J. Grubb et al. 597* (COL!); Somondoco, 18 Dec 1975 (fl), *M. Ospina H. 1151* (COL!). Cauca: Entre le Rio Trubalá et Quilichao, 2000 m, 5 Mar 1883 (fl), *F.C. Lehmann 2686* (G!); Munic. Caldono, Village Pijoya, road from Pijoyato to Granadillo (km 2), 2400 m, 9 Mar 1998 (fl), *D. Stancik 59* (COL!); Mun. El Tambo, Parque Nacional Natural Munchique, camino de la Romelia al cerro Santana, 2590-2620 m, 12 Apr 1994 (fl), *F. González et al. 3118* (COL!); Mun. El Tambo, Parque Nacional Natural Munchique, vereda La Romelia, carretera Santana, 2720 m, 27 Jul 1993 (fl), *G. Lozano et al. 6684* (COL!); Mun. El Tambo, Parque Nacional Natural Munchique, carretera a Santa Ana y sendero, 2600-2700 m, 15 Apr 1994 (fl), *F. González et al. 3179* (COL!); Mun. El Tambo, La Romelia, Parque Nacional Natural Munchique, Camino a la Gallera, 1900-1650 m, 28 Jan 1995 (fl), *G. Lozano et al. 6753* (COL!); Tambo, La Romelia, 2500 m, 23 Apr 1979 (fl), *G. Morales et al. 128* (COL!); Popayán, 1700-1900 m, 23 Apr 1883 (fl), *F.C. Lehmann 2858* (G!); Popayán, 1700-2000 m, 23 Feb 1884 (fl), *F.C. Lehmann 3688* (G!); Popayán, 1700-2400 m, *F.C. Lehmann 7118* (NY!); Mount El Derrumbo, 2700-3000 m, 29 Jun 1922, *F.W. Pennell 7490* (AMES!, NY!); Coconuco to Popayán, near hacienda Coconuco, 2300-2500 m, 19 Jun 1922 (fl), *F.W. Pennell 6903* (AMES!, NY!); San Isidro, Purace, Cordillera Central, 2200-2500 m, 10-11 Jun 1922 (fl, fr), *F.W. Pennell & E.P. Killip 6468* (NY!). Cundinamarca: Base Cerro Quinini, 1753 m, 16 Apr 2008 (fl), *J.L. Fernández-Alonso et al. 26485* (COL!); municipio de Gachalá, Vda. Tendidos del río Negro, sector de Caño Negro, 2514 m, *D. Hernández 208* (COL!); Bogotá, urbanización Rosales, 2700 m, 26 Aug 1962 (fl), *H. Schmidt 120* (COL!); Mun. Suesca, Hacienda Susatá, 2750 m, 19 Aug 2000 (fl), *J.P. Groenendijk 1589* (COL!); Near Bogotá, 20 Oct 1914 (fl), *E. Bernard s.n.* (K!); Páramo de Guasca, vertiente occidental de la cordillera oriental, 3500-3700 m, 10 Feb 1962 (fl), *H. García-Barriga 17404* (AMES!, COL!,

NY!); carretera a La Calera, 2900 m, 24 Nov 1946 (fl), *M. Schneider 244/1* (COL!); Páramo of Usaquén, above Bogotá, 2800-2900 m, 24 Nov 1946 (fl), *M. Schneider 244/1* (K! [drawing], S!); Páramo of Usaquén, above Bogotá, 2800-2900 m, 23 Jul 1949 (fl), *M. Schneider 244/2* (COL!, K! [drawing], S!); 15 km N of Usaquén, 2600 m, 24 Sep 1947 (fl), without collector 6200 (COL000421198!); May 1938 (fl), *O. Renz 4112* (RENZ!); 27 Aug 1955 (fl), *O. Renz 8493* (RENZ!); 10 Mar 1955 (fl), *O. Renz 8375* (RENZ!); Sibate, 2700-2800 m, 13-15 Oct 1917 (fl, fr), *F.W. Pennel 2446* (NY!); Bogotá D.C., localidad de Sumapaz corregimiento de Nazareth, 2908 m, Sep (fl), *C. Castro et al. 1943* (COL!, JBB!); Bogotá D.C., Nazareth Localidad de Sumapaz, 2908 m, 26 Sep 2019 (fl), *C. Castro et al. 2000* (COL!, JBB!); Bogotá D.C., Localidad de Usme, Parque Ambiental Cantarrana, 2726 m, 19 Oct 2018 (fl), *S. Urbano et al. 2012* (JBB!). Magdalena: Sierra Nevada de Sta. Marta, trail above Hacienda Cincinnati, cerro Quemado, 2200-2500 m, 26 Aug 1933 (fl), *G.W. Martin 3733* (AMES!); Sierra Nevada de Sta. Marta, trail above Hacienda Cincinnati, 2200 m, 28 Aug 1935 (fl), *G.W. Martin 3777* (AMES!). Risaralda: Mun. Marsella, corregimiento de la Nona, Convención, Reserva de la Nona, 1700-2000 m, 12-17 Mar 1999 (fl), *W.G. Vargas 5669* (COL!). Santander: between Piedecuesta and Las Vegas, 2000-2500 m, 19-24 Dec 1926 (fl), *E.P. Killip & A.C. Smith 15570* (AMES!); Vía Curos – Málaga, 2893 m, 27 Jun 2009 (fl), *J.L. Fernández-Alonso & C.N. Díaz-Pérez 28147* (COL!). ECUADOR. Azuay: Km 10 S of Cumbe on Pan American Highway, ca. 2600 m, 6-10 May 1973 (fl), *L. Holm-Nielsen et al. 5136* (AAU!); Km 85 on Pan American Highway N of Loja, 2850-2950 m, 3 May 1973 (fl), *L. Holm-Nielsen et al. 4827* (AAU!); Km 91 on Pan American Highway N of Loja, 2900 m, 3 May 1973 (fl), *L. Holm-Nielsen et al. 4851* (AAU!); Km 91 on Pan American Highway N of Loja, 2900 m, 5 May 1973 (fl), *L. Holm-Nielsen et al. 5113* (AAU!, AMES!, SEL!); Quebradas leading into the Rio Collay. 3-8 km north of Sevilla de Oro, 7000-8300 ft, 27 Aug 1945 (fl), *W.H. Camp E-4998* (AMES!, NY!); vicinity of El Pan, 8500 ft, 24 Sep 1944 (fl), *I.L. Wiggins 10791* (AMES!). El Oro: road from Paccha del Inca to Pasaje, 1800 m, 23 May 1988 (fl), *A. Hirtz 3864* (SEL!). Imbabura: above Laguna Pinan, slopes of Volcan de Cotacachi, 10800 ft, 12 Mar 1944 (fl), *W.B. Drew E-99* (AMES!); road branching from Pan American highway just north of Otovalo to Lago Cuicocha, and on to Selva Alegre, km 20, 2900 m, 20 Mar 1986 (fl), *C.H. Dodson et al. 16389* (SEL!). Loja: 6 km SE Loja, Zamora-Huaico, 2300-2400 m, 3 Jul 1947, *R. Espinosa 1567* (AMES!); Loja, Argelia, 2300 m, 14 Jun 1946, *R. Espinosa 560* (AMES!); near Loja, 2300 m, 27 Jul 1939, *C.W. Penland & R.H. Summers 1114* (AMES!). Pichincha: km 87 Quito to Santo Domingo (old road), 1400 m, 15 Jun 1967 (fl), *C. Dodson et al. 3741* (SEL!); old road from Quito to Santo Domingo, between km 68 and 77, 1700-2200 m, 15 Aug 1975 (fl), *C.H. Dodson 5968* (SEL!);

La Iberia, km 4-6, Calacali-Hacienda Gallopellado a lado de la carretera en la región de Niebli, 2800 m, 4 Apr 1985, *C. Dodson et al.* 15753 (AMES!); South of Quito, 13 Apr 1930 (fl), *M.R. Benoist* 2370 (P!). Tungurahua: [Tunguragua], Baños, *F.C. Lehmann* 8259 (AMES!, G!, K!, NY!, RENZ! [Photocopy and drawing of a specimen from G], W-R!); slope near Baños, 2100 m, 7 Oct 1961 (fl), *C.H. Dodson & L.B. Thien* 869 (SEL!); Baños, Baños-Puyo road at Agoyan falls, 24 Jul 1981, *L. Bohs* 1573 (GH!); 5 km above Baños, 2200 m, 23 Jul 1975 (fl), *C. Luer et al.* 487 (SEL!). Zamora-Chinchipe: Road Loja-Zamora, km 24-25, 1950-2100 m, 15 Apr 1973 (fl), *L. Holm-Nielsen et al.* 3448 (AAU!, AMES!, K!, SEL!). VENEZUELA. Aragua: Colonia Tovar, *A. Fendler s.n.* (P00386989!); Colonia Tovar, 1854-5, *A. Fendler* 1416 (G!, K!, K-L!, P!); Aug-Sept 1865 (fl), *J.W.K. Moritz* 630b (BM000032626!, BM000032627!; HBG-501303!, K! [drawing of a flower from the specimen from W], RENZ 14031! [Photocopy, drawing and fragment of the specimen from W], W 0028644!); 05 Jul 1953 (fl), *O. Renz* 7980 (RENTZ!). Barinas: 19 Sep 1951 (fl), *O. Renz* 7391 (RENTZ!). Distrito Capital: 13 Oct 1956 (fl), *O. Renz* 8739 (RENTZ!). Lara: 20 Oct 1952 (fl), *O. Renz* 7843 (RENTZ!); 25 Oct 1952 (fl), *O. Renz* 7859 (RENTZ!). Mérida: 04 Jun 1949 (fl), *O. Renz* 5488 (RENTZ!); 29 Jul 1949 (fl), *O. Renz* 5700 (RENTZ!); 27 Jul 1949 (fl), *O. Renz* 5704 (RENTZ!); 27 Jul 1949 (fl), *O. Renz* 5706 (RENTZ!); 02 Aug 1949 (fl), *O. Renz* 5718 (RENTZ!); 29 Jul 1949 (fl), *O. Renz* 5873 (RENTZ!); 14 Sep 1949 (fl), *O. Renz* 5911 (RENTZ!); 14 Sep 1949 (fl), *O. Renz* 5916 (RENTZ!); 14 Sep 1949 (fl), *O. Renz* 5958 (RENTZ!); 02 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6026 (RENTZ!); 04 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6044 (RENTZ!); 05 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6046 (RENTZ!); 05 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6059 (RENTZ! 6059.2); 05 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6060 (RENTZ!); 07 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6066 (RENTZ!); 11 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6087 (RENTZ!); 12 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6102 (RENTZ!); 12 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6108 (RENTZ!); 13 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6117 (RENTZ!); 13 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6118 (RENTZ!); 19 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6143 (RENTZ!); 20 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6166 (RENTZ!); 23 Nov 1949 (fl), *O. Renz* 6182 (RENTZ!); 23 Nov 1949 (fl, fr), *O. Renz* 6186 (RENTZ!); 20 Jul 1951 (fl), *O. Renz* 7303 (RENTZ!); 30 Sep 1951 (fl), *O. Renz* 7416 (RENTZ!). Miranda: Silla de Caracas, 21 Oct 1874 (fl), *C.E.O. Kuntze* 1651(?) (RENTZ! [Photocopy, drawing and fragment of the specimen from W], W-R!). Táchira: entre Michelena y Boca de Monte, oeste de Zumbador, 1700 m, 28 Aug 1966 (fl), *J.A. Steyermark & M. Rabe* 96786 (K!, RENZ! [Photocopy, drawing and fragment of a specimen from K]). Without locality: 3 Sep 1856 (fl), *A. Fendler* 2132 (K-L!); 26 Oct 1856 (fl), *A. Fendler* 2131 (K-L!); Betanía, 2450 m, 12 Nov 1980 (fl, fr), *P.J.M. Maas & S.S. Tillett* 5244 (NY!); 28 Apr 1949 (fl), *O. Renz* 5232 (RENTZ!); 21 Aug 1949 (fl), *O. Renz* 5711 (RENTZ!); 03 Aug 1949 (fl), *O. Renz* 5715 (RENTZ!); 13 Aug 1949 (fl), *O. Renz* 5722 (RENTZ!); 13 Aug 1949 (fl), *O. Renz* 5725 (RENTZ!); 25 Aug

1949 (fl), *O. Renz* 5792 (RENZ!); 23 Aug 1949 (fl), *O. Renz* 5848 (RENZ!); 05 Aug 1949 (fl), *O. Renz* 5854 (RENZ!); 25 Aug 1949 (fl), *O. Renz* 5892 (RENZ!); 19 Sep 1949 (fl), *O. Renz* 5928 (RENZ!); 15 Sep 1949 (fl), *O. Renz* 5930 (RENZ!); 21 Oct 1949 (fl), *O. Renz* 5993 (RENZ!); 30 Nov 1949 (fl, fr), *O. Renz* 6240 (RENZ!); 08 Oct 1950 (fl), *O. Renz* 6541 (RENZ!); 03 Jul 1951 (fl), *O. Renz* 7148 (RENZ!); 14 Jul 1951 (fl), *O. Renz* 7209 (RENZ!).
 Trujillo: 3000 m, 16 Oct 1947(fl), *O. Renz* 4336 (RENZ!); 13 Sep 1947 (fl), *O. Renz* 4350 (RENZ!); 13 Sep 1947 (fl), *O. Renz* 4351 (RENZ!); 2000 m, 19-20. Oct 1947 (fl), *O. Renz* 4361 (RENZ!); 13 Sep 1947 (fl), *O. Renz* 4375 (RENZ!); 19 Sep 1948 (fl), *O. Renz* 4781 (RENZ!); 12 Nov 1948 (fl), *O. Renz* 4964 (RENZ!); 13 Nov 1948 (fr), *O. Renz* 5015 (RENZ!); 09 Nov 1948 (fl, fr), *O. Renz* 5017 (RENZ!); 09 Dec 1948 (fr), *O. Renz* 5097 (RENZ!); 09 Dec 1948 (fl, fr), *O. Renz* 5098 (RENZ!); 24 Feb 1950 (fl), *O. Renz* 6266 (RENZ!); 25 Oct 1951 (fl), *O. Renz* 7480 (RENZ!); 03 Nov 1951 (fl), *O. Renz* 7509 (RENZ!); 29 Jan 1953 (fl), *O. Renz* 7892 (RENZ!); 02 Jul 1960 (fl), *O. Renz* 9816 (RENZ!); Mpio. Boconó, Parque Nacional Guaramacal, El Campamento, below Cerro El Diablo, 1800-2000 m, 16-18 Aug 2005 (fl), *B. Stergios et al.* 20837 (US!). UNSPECIFIED COUNTRY. *É.-F. André* s.n. (K!); *F.C. Lehmann* 5372 (K!).

**CAPÍTULO 2. MORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE *Habenaria parviflora*
COMPLEX (ORCHIDACEAE)**

Cruz-Lustre, G., Batista, J. A. N., Radins, J. A., González, A., & Borba, E. L.

doi:10.1007/s00606-020-01634-2

(Publicado na *Plant Systematics and Evolution*)



Morphometric analysis of the *Habenaria parviflora* complex (Orchidaceae)

Gabriela Cruz-Lustre¹ · João A. N. Batista¹ · José A. Radins² · Andrés González³ · Eduardo L. Borba¹

Received: 27 May 2019 / Accepted: 8 January 2020
 © Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2020

Abstract

We analyzed patterns of morphological differentiation of the *Habenaria parviflora* complex (Orchidaceae), through morphometric analyses of populations and morphotypes, aiming at evaluating current taxonomic proposals and at identifying discriminative characters for the delimitation of taxa. We performed multivariate and univariate morphometric analyses using 18 morphological characters of 675 individuals from 65 populations distributed throughout Brazil, Argentina and Uruguay, representing 12 morphotypes that comprise nearly all the morphological diversity and geographic distribution of the complex. The group presents morphological patterns difficult to understand which suggest that the complex does not correspond to a single species, nor does each morphotype correspond to a taxon. It was possible to clearly differentiate only two taxa, apart from *H. parviflora*, by a combination of characters: *H. paulensis* and *H. ulei*. Characters associated with flower size, leaf width and opening angle of the sepals were the most discriminatory for both species. The relationships between the populations of the remaining morphotypes exhibited high overlap in the analyses, making it impossible to define morphological groups with the characters used. The number of flowers, ovary length and angles between floral structures, not previously used in the taxonomy of this complex, are important characters for the recognition of taxa and can be further explored by future taxonomic studies of both the group and the genus.

Keywords Grassland vegetation · Morphometrics · Morphotypes · Orchidinae · Species complex · Taxonomy

Introduction

Habenaria Willd. (Orchidaceae, Orchidoideae, Orchidinae) is the largest terrestrial orchid genus, consisting of approximately 870 species (Govaerts et al. 2018), and distributed in tropical, subtropical and temperate regions of the Old and New Worlds (Pridgeon et al. 2001). The genus has about 300 species in the Neotropical Region, of which 167 occur in Brazil (Batista et al. 2011a). Plants of this genus are seasonal, herbaceous and, in South America, occur mainly in grass-dominated formations (Batista et al. 2013).

Due to the high number of species, their morphological similarity and the existence of intermediate forms among species in the Neotropical Region, we can find several complexes of species that make the taxonomy of *Habenaria* particularly difficult. Among these, the *H. parviflora* Lindl. complex stands out due to its high frequency and wide geographic distribution in South America. The complex currently comprises four accepted species: *H. brachyphyton* Schltr., *H. parviflora*, *H. paulensis* Porsch and *H. ulei* Cogn. (Sanguinetti 2015; Govaerts et al. 2018). *Habenaria parviflora* was

Handling Editor: Mike Thiv.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00606-020-01634-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Gabriela Cruz-Lustre
 gcruzlustre@gmail.com

¹ Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Caixa Postal 486, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-910, Brazil

² Dirección de Biodiversidad, Ministerio de Ecología y Recursos Naturales Renovables, Calle San Lorenzo 1538, Código Postal 3300, Posadas, Misiones, Argentina

³ Departamento de Botânica, Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay

the first species described for this group, in 1835, since then 20 names have been proposed that can be attributed to the complex (Table 1). Garay (1976) carried out the only taxonomic treatment of the complex so far, who recognized four species (*H. parviflora*, *H. brachyphyton*, *H. paulensis* and *H. uruguayensis* Garay), defined morphological characters to characterize each of them and established, in general, the current taxonomic circumscription of the complex. In a synopsis of the American species of the genus, Batista et al. (2011a, b) followed Garay's delimitation and suggested that *H. ulei* should also belong to the complex due to its morphological similarity with *H. parviflora*. In a phylogenetic analysis of the genus using molecular data, Batista et al. (2013) found *H. parviflora*, *H. brachyphyton* and *H. paulensis* to form a clade, with high statistical support, together with *H. bahiensis* Schltr. and *H. edwallii* Cogn. However, these last two species form a subclade that is sister to the clade including the first three species and are genetically and morphologically distinct, mainly by the direction of the segments of the lip: straight in *H. bahiensis*, concave in *H. edwallii* and convex in the species of the *H. parviflora* complex. More recently, Sanguinetti

(2015) synonymized *H. uruguayensis* under *H. parviflora*, arriving at the current circumscription of the complex.

The *H. parviflora* complex is a widely distributed group, occurring from Colombia, Venezuela and the Guiana Shield to northern Argentina, including Paraguay, Uruguay and Brazil (Correa 1950; Pabst 1952; Foldats 1969; Garay 1976; Renz 1992; Funk et al. 2007; Carnevali et al. 2008; Batista et al. 2011a, b; Szlachetko et al. 2017). The highest frequency and diversity of the *H. parviflora* complex is found in southeastern and southern Brazil, where *H. parviflora* alone accounts for 1017 of the total 11,514 (9%) of the records of the genus in Brazil (speciesLink 2019). Elsewhere, the species is rare or occasional. In Northern South America, particularly in Colombia and Venezuela, *H. parviflora* has often been confused with *H. gollmeri* Schltr., a morphologically similar species and equivalent to *H. parviflora* in frequency and distribution in these countries (Renz 1992). *Habenaria parviflora* was also cited for Ecuador (Schweinfurth 1967), but there is no other evidence that the species occurs in this country, since a later inventory of the Orchidaceae from that country makes no mention of its occurrence (Garay 1978).

Table 1 Names related to the *Habenaria parviflora* complex. Acronyms for Brazilian states: BA Bahia; ES Espírito Santo, PR Paraná, RJ Rio de Janeiro, SC Santa Catarina, SP São Paulo. See the topic

"Materials and methods" and Online Resource 1 for an explanation of the morphotypes. Accepted taxa are in bold and italic

Taxon	Type-material location	Taxonomic status	Morphotype (in this study)
<i>H. angulosa</i> Barb.Rodr.	Rodeio, RJ, Brazil	= <i>H. parviflora</i>	parviflora (PV)
<i>H. brachyphyton</i> Schltr.	Guaratuba, PR, Brazil	Accepted	brachyphyton (BR)
<i>H. caaguazuensis</i> Cogn.	Caaguazú, Paraguay	= <i>H. parviflora</i>	caaguazuensis (CG)
<i>H. demerarensis</i> Rchb.f. ex M.R.Schomb., nom. nud.	Guyana	= <i>H. parviflora</i>	parviflora2 (PV2)
<i>H. edentula</i> Schltr.	Itatiaia, RJ, Brazil	= <i>H. paulensis</i>	edentula (ED)
<i>H. mello-leitonii</i> Ruschi	Santa Teresa, ES, Brazil	= <i>H. parviflora</i>	parviflora (PV)
<i>H. minimiflora</i> Kraenzl.	São Paulo, SP, Brazil	= <i>H. paulensis</i>	paulensis (PL)
<i>H. montevidensis</i> Lindl., nom. illeg.		Basionym of <i>H. uruguayensis</i>	uruguayensis (UR)
<i>H. montevidensis</i> f. <i>parviflora</i> (Lindl.) Pabst		Basionym: <i>H. parviflora</i>	parviflora (PV)
<i>H. montevidensis</i> f. <i>nana</i> (Schltr.) Pabst		Basionym: <i>H. nana</i>	brachyphyton (BR)
<i>H. montevidensis</i> f. <i>reichenbachiana</i> (Barb.Rodr.) Pabst		Basionym: <i>H. reichenbachiana</i>	parviflora (PV)
<i>H. montevidensis</i> var. <i>tucumanensis</i> Griseb.	Tucumán, Argentina	= <i>H. parviflora</i>	tucumanensis (TU)
<i>H. nana</i> Schltr., nom. illeg.		Basionym of <i>H. brachyphyton</i>	brachyphyton (BR)
<i>H. pariquerensis</i> Hoehne	Pariquera-Mirim, SP, Brazil	= <i>H. parviflora</i>	parviflora (PV)
<i>H. parviflora</i> Lindl.	Salvador, BA & Rio de Janeiro, RJ, Brazil	Accepted	parviflora (PV)
<i>H. parviflora</i> Lindl. f. <i>robusta</i> Hoehne, nom. nud.	Paraná, Brazil	= <i>H. parviflora</i>	parviflora (PV)
<i>H. paulensis</i> Porsch	Campo Grande, SP, Brazil	Accepted	paulensis (PL)
<i>H. reichenbachiana</i> Barb.Rodr.	Capivari & Rio Bonito, RJ, Brazil	= <i>H. parviflora</i>	parviflora (PV)
<i>H. ulei</i> Cogn.	Serra Geral, SC, Brazil	Accepted	ulei (UL)
<i>H. uruguayensis</i> Garay	Montevideo, Uruguay	= <i>H. parviflora</i>	uruguayensis (UR)

The species of the complex occur mainly in grass-dominated wetlands, occasionally on the edges of forest formations, from sea level up to 2800 m above sea level. According to Singer (2001), *H. parviflora* is self-compatible and pollinated by moths and dipterans.

Analysis of both herbarium and field material of this group shows that the accepted species of the complex, and the corresponding nomenclatural types, are reasonably distinguishable. However, the morphological boundaries of each species are not well defined, with a range of intermediate forms of ambiguous identification. In addition to extensive morphological variation, the group also exhibits broad ecological range. The morphological characters traditionally used in the group's taxonomy are plant height, leaf shape and size, shape and size of the dorsal sepal, size of petal and labellum and the proportion between them, and spur length (Hoehne 1940; Garay 1976), all of which are highly variable within the group. In addition to these, we observed that rachis length, number of flowers, ovary length, spur width, angle between lateral sepals, and the angle of the curvature of the median segment of the labellum are also variable and potentially discriminative. Other variable characters include flowering period, habit, altitude, soil type and geographical distribution. The structuring of this variability is unknown, and so its examination can provide data that allow not only taxonomic delimitation in one of the most difficult complexes in Neotropical *Habenaria*, but also a better understanding of the evolution of the group. There are no data to date on variation within and among populations and throughout the distribution area of the complex to determine whether the accepted species are part of a morphological continuum between species with divergence still incipient or, alternatively, that the intermediate forms represent hybrids between species.

For biological groups in which morphological complexity is reflected in taxonomic difficulty, a multidisciplinary methodological approach is required (Pinheiro et al. 2018). In this sense, the use of morphometry can be effective at solving complexes of species in different groups of plants (e.g., Lambert et al. 2006; Conceição et al. 2008a, b; Oliveira et al. 2008; Ribeiro et al. 2018), including orchids (e.g., Borba et al. 2002; Ribeiro et al. 2008; Ponsie et al. 2007, 2009; Pinheiro and Barros 2009; Melo and Borba 2011; Pessoa et al. 2012; Pace and Cameron 2017). An additional advantage of such analyses is the possibility of identifying characters that have been neglected in the taxonomy of a particular group, but which can be very informative for later application. In the present work, we carried out a multivariate morphometric analysis of populations of all accepted species of the *H. parviflora* complex and several recognizable morphological groups (here denominated morphotypes). For this purpose, we covered the morphological diversity and almost the entire geographic distribution of the complex, with the following

objectives: (1) determine the degree of morphological differentiation between populations and morphotypes of the complex; (2) identify characters (or combinations thereof) that discriminate morphotypes; and (3) establish relationships among morphotypes and their correspondence with the described taxa of the complex.

Materials and methods

Sampled populations

We collected 685 individuals from 65 populations belonging to the *Habenaria parviflora* complex, aiming at covering its morphological and ecological variation throughout its geographic distribution and attempting to sample populations occurring in localities where the types of taxa were collected, of both currently accepted species and synonyms. We selected the localities based on the collection location of the types, as indicated by Batista et al. (2011a, b) and the examination of material of the complex deposited in several herbaria. Sampling was restricted to the regions with the highest diversity and frequency of the complex. Collections in northern Brazil were not possible due to logistical limitations, and a collection attempt in Colombia was unsuccessful. The field collections were carried out in Brazil (states of Bahia, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina and São Paulo, and the Distrito Federal), Argentina (province of Misiones) and Uruguay (departments of Canelones and Rocha; Online Resource 1; Fig. 1). The population structure and size of the species or morphotypes are quite variable, ranging from small groups of plants (about 5–20 individuals) restricted to small areas (approx. 10 m²), to hundreds of individuals dispersed in large areas, usually forming groups with variable numbers of individuals. Occasionally, we found populations with less than five individuals, in some cases only two, which we sampled due to their morphological, geographical or taxonomic importance. We sampled individuals in each population to cover the largest possible area of their occurrence and spaced not less than 30 cm to avoid sampling clones. In order to use the total length of the plant and of completely developed inflorescence as variables in the analyses, we collected individuals presenting the terminal portion of the inflorescence with all the flowers in anthesis. However, when it was not possible to follow this criterion, we used plants with buds at the apex of the inflorescence, since observations on cultivated plants revealed that subsequent elongation of the inflorescence and the plant is reduced after beginning of the anthesis. Whenever possible we used non-pollinated flowers, but in some cases, we used pollinated flowers that still had well-preserved perianth.

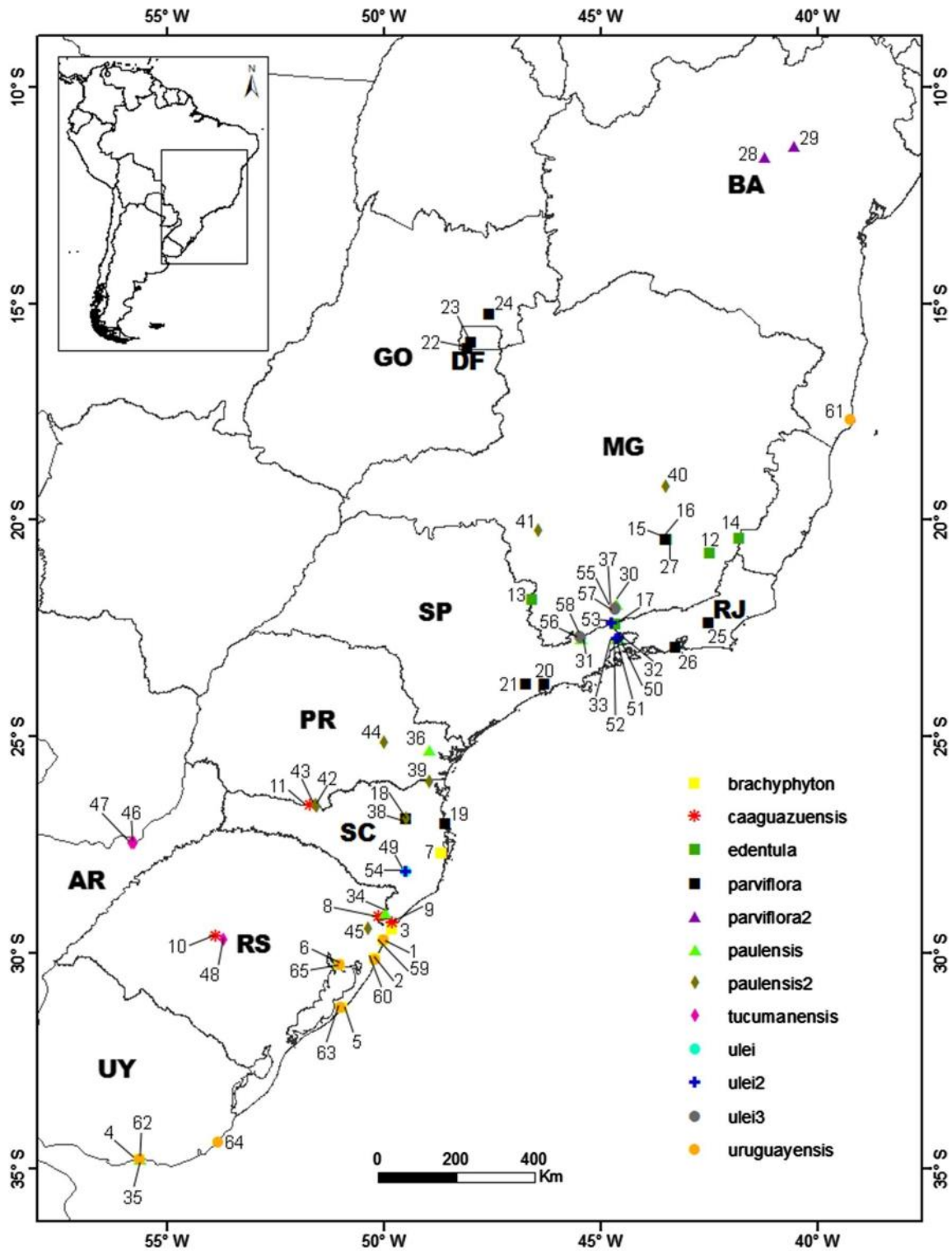


Fig.1 Distribution map of the 65 sampled populations of morphotypes of the *Habernaria parviflora* complex. Acronyms for the Brazilian states: *BA* Bahia, *GO* Goiás, *MG* Minas Gerais, *PR* Paraná, *RJ*

Rio de Janeiro, *RS* Rio Grande do Sul, *SC* Santa Catarina, *SP* São Paulo, *DF* Distrito Federal. *AR* Argentina, *UY* Uruguay. See Online Resource 1 for population names

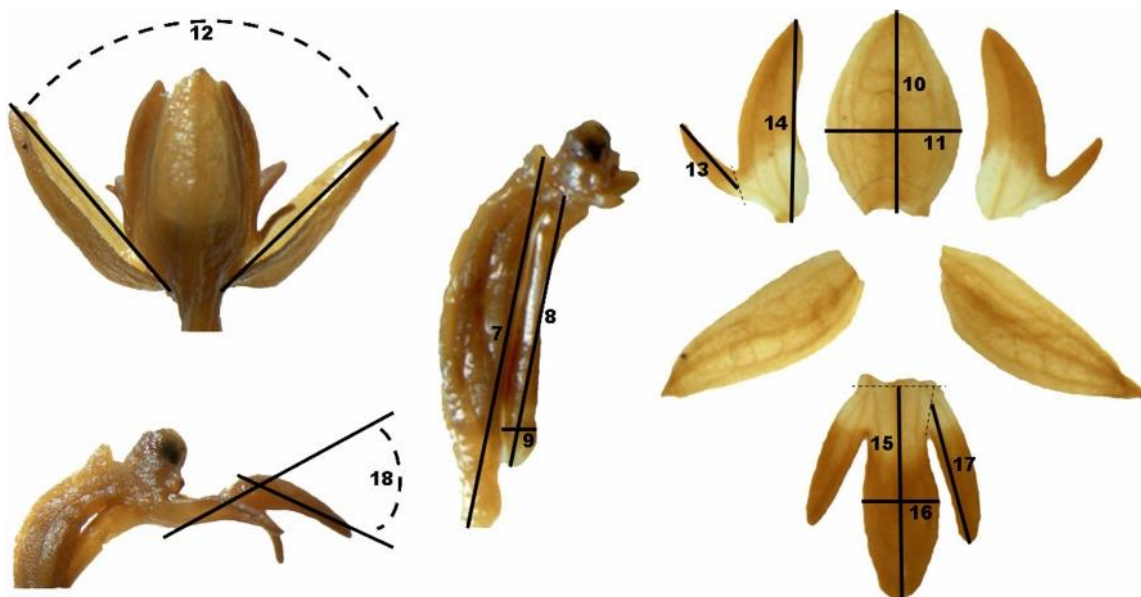
Table 2 Characters used in the morphometric analysis of the 65 populations of the *Habenaria parviflora* complex

Character	Code
Plant height (cm)	#1
Leaf	
Length of most developed leaf (cm)	#2
Greatest width of most developed leaf (mm)	#3
Number of leaves (including scape bracts)	#4
Inflorescence	
Rachis length (cm)	#5
Number of flowers	#6
Ovary	
Length (including pedicel; mm)	#7
Spur	
Length (mm)	#8
Greatest width (mm)	#9
Sepal	
Length of dorsal sepal (mm)	#10
Greatest width of dorsal sepal (mm)	#11
Angle between lateral sepals (axis: dorsal sepal; upper view)	#12
Petal	
Length of largest anterior segment (mm)	#13
Length of largest posterior segment (mm)	#14
Labellum	
Length of median segment (mm)	#15
Greatest width of median segment (mm)	#16
Length of largest lateral segment (mm)	#17
Angle of curvature of the median segment (axis: proximal third; lateral view)	#18

In these cases, we observed no difference in ovary length, only in width (a character that we did not use in the analyses). We collected and herborized the epigenous portion of each individual and conserved in 70% ethanol the most basal flowers, completely opened and with the floral parts intact. We deposited vouchers, one for each sampled population, in the herbarium BHCB of the Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil (Online Resource 1).

Character selection

Based on the morphological variation observed in the material for the complex, we selected and measured 18 continuous morphological characters, of which 12 are floral and six vegetative (Table 2; Fig. 2). We obtained characters #1 to #6 from prepared exsiccates of the collected individuals. Some individuals presented incomplete leaves, making it possible to measure directly only width. To solve this problem, and considering that variation in leaf length and width is extensive, we calculated the average length/width ratio of leaves per population and used to estimate the length of incomplete leaves based on width. We standardized the flower to measure as the most basal flower in anthesis in the inflorescence. We measured character #12 in incompletely symmetrical flowers by measuring the angle between the lateral sepals and dividing it by two. We photographed the flowers due to their small size, with both the natural position of the flower pieces (for the measurement of some angles) and the floral parts separated and distended, using an Olympus SZX7 stereomicroscope with an adapted camera. We made

**Fig. 2** Floral characters (#7–#18) used in the morphometric analyses of the 65 populations of the *Habenaria parviflora* complex. See Table 2 for variable names

the measurements from these pictures using Image Pro Plus software (Media Cybernetics 2006).

Multivariate analyses

We submitted the morphological patterns within the *H. parviflora* complex to multivariate statistical analyses using Statistica 8.0 (StatSoft 2007). First, we carried out a principal component analysis (PCA) using the correlation matrix for the 18 characters as variables and including all 685 individuals to identify the presence of high correlation between variables. Because we found high correlation (above 0.92) among the variables length of the dorsal sepal (#10), length of the posterior segment of the petal (#14) and length of the median segment of the labellum (#15), we randomly removed two of them (#10 and #14) from subsequent analyses. We performed the PCA again to detect possible outliers, examine the general structure of the data and identify the main variables associated with structuring. We did not find any outliers, so there was no need to remove individuals from the analyses.

Due to the high number of populations (65), some of which having very small sample sizes (less than five individuals), when possible we merged some of them, based on morphology and geographic proximity, resulting in 49 expanded populations (Online Resource 1). We performed discriminant analysis and canonical variable analysis (CVA) using the expanded populations as categorical variables. We carried out cluster analyses using the generalized Mahalanobis distances among the centroids of the populations and unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) and neighbor-joining (NJ) as clustering algorithms. We performed preliminary analyses using the expanded populations, either including or excluding populations with low sample sizes (2–4 individuals, Online Resource 1). We found that only populations with $n < 5$ interfered in the topology of clustering, and thus they were excluded in the final population analyses (46 expanded populations included; 675 individuals). Based on the multivariate analyses of the expanded populations, the morphological characters used by Garay (1976) and comparisons of material (both herborized and fresh) with the morphology and geographic origin of previously published taxa (Table 1), we determined 12 morphological groups—here designated as morphotypes (Online Resource 1; Figs. 3 and 4). Of the 12 morphotypes, four corresponded to the four currently accepted species (*H. brachyphyton*, *H. parviflora*, *H. paulensis* and *H. ulei*), four corresponded to synonyms (*H. caaguazuensis* Cogn., *H. edentula* Schltr., *H. montevidensis* Lindl. var. *tucumanensis* Griseb. and *H. uruguayensis*) and four corresponded to morphological variants related to accepted species (parviflora2, paulensis2, ulei2 and ulei3). Finally,

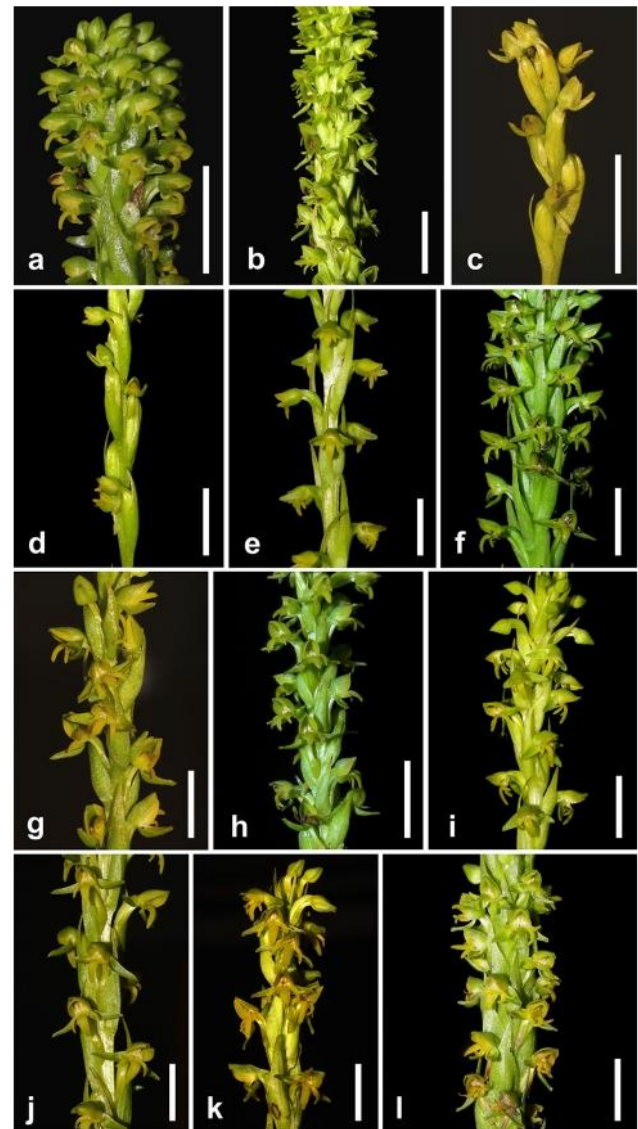
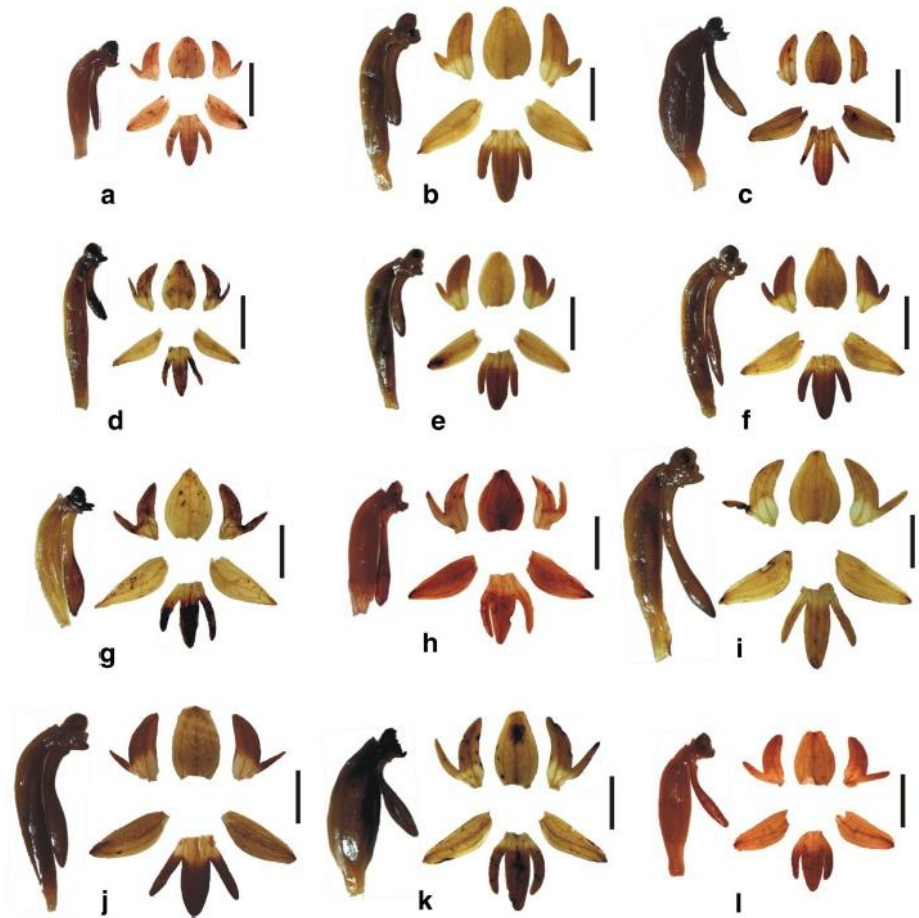


Fig. 3 Floral morphology of the morphotypes of the *Habenaria parviflora* complex analyzed in this work. **a** BR-brachyphyton (Mostardas, RS, Brazil); **b** CG-caaguazuensis (Palmas, PR, Brazil); **c** ED-edentula (Itatiaia, RJ, Brazil); **d** PL-paulensis (Quatro Barras, PR, Brazil); **e** PL2-paulensis2 (Palmas, PR, Brazil); **f** PV-parviflora (Tijuca, RJ, Brazil); **g** PV2-parviflora2 (Morro do Chapéu, BA, Brazil); **h** TUTucumanensis (Santa Maria, RS, Brazil); **i** UL-ulei (Urubici, SC, Brazil); **j** UL2-ulei2 (Itatiaia, RJ, Brazil); **k** UL3-ulei3 (UL3, Aiuruoca, MG, Brazil); **l** UR-uruguayensis (Canelones, Uruguay). Scale = 1 cm

we performed discriminant analysis and CVA, along with cluster analyses, using the morphotypes as group variables to determine the possibility of discriminating taxa. We used the standardized coefficients for the canonical variables obtained from the CVA of the morphotypes to identify the most important characters for morphological discrimination of taxa.

We performed descriptive statistical analysis and analyses of variance (one-way ANOVA) for each variable separately

Fig. 4 Floral morphology (distended segments) of the morphotypes of the *Habenaria parviflora* complex analyzed in this work. **a** BR-brachyphyton (Mostardas, RS, Brazil); **b** CG-caaguazuensis (Palmas, PR, Brazil); **c** ED-edentula (Itatiaia, RJ, Brazil); **d** PL-paulensis (Quatro Barras, PR, Brazil); **e** PL2-paulensis2 (Palmas, PR, Brazil); **f** PV-parviflora (Tijuca, RJ, Brazil); **g** PV2-parviflora2 (Morro do Chapéu, BA, Brazil); **h** TU-tucumanensis (Santa Maria, RS, Brazil); **i** UL-ulei (Urubici, SC, Brazil); **j** UL2-ulei2 (Itatiaia, RJ, Brazil); **k** UL3-ulei3 (Aiuruoca, MG, Brazil); **l** UR-uruguayensis (Canelones, Uruguay). All figures are to the same scale. Scale = 3 mm



for all morphotypes. We tested the significance of differences between means with Bonferroni correction ($p < 0.05$) using Statistica 8.0.

Results

In the PCA of the 16 variables (highly correlated variables excluded) with 685 individuals belonging to 65 sampled populations of the *Habenaria parviflora* complex, four axes presented eigenvalues above 1.00, accounting for 73.19% of the accumulated variance (Table 3). The first axis accounts for 41.63% of the variance and is mainly explained by variables related to flower size, such as the length of the median segment (#15), length of the lateral segments of the labellum (#17) and width of the dorsal sepal (#11). The 16 analyzed variables are negatively correlated with the first axis. The second axis accounts for 16.08% of the variance and is explained mainly by the number of flowers (#6) and variables related to plant size, such as plant height (#1) and leaf length (#2), all of which were positively correlated with the axis. The third axis accounted for 8.92% of the variance and is explained mainly by variables associated with the flower, such as the angle of curvature of the median segment of the

labellum (#18), number of flowers (#6) and ovary length (#7). The fourth axis accounts for 6.56% of the variance and is explained by mainly variables related to plant size, such as leaf length (#2) and width (#3) and plant height (#1). This analysis revealed that, even with large overlap, the data present a slightly arched gradient structure, with individuals from the populations of Morro da Igreja-SC (large, few flowers) and the southern coast of Brazil (small, numerous flowers) at the extremes of the first axis (not shown).

Analyses of the 46 expanded populations

It was possible to discriminate statistically ($p < 0.001$) the majority of the populations, with the exception of 11 pairs (only three of them belonging to different morphotypes: EDcp–PLal, PL2pl–URca-cd and BRpa–URmo). The Mahalanobis distance between centroids of the populations ranges from 3.39 (PL2be-qu–PL2pd-ph) to 198.95 (PLin–ULur). Discriminant analysis revealed that the percentage of incorrect classifications (individuals classified in populations other than the predefined population) in the classification matrix ranges from 0.00% (10 populations) to 52.38% (BRpa, where some of the individuals are closer to

Table 3 Correlation between variables and axes with eigenvalues > 1.00 of PCA, of CVA of the 46 expanded populations and of CVA of the 12 morphotypes of the *Habenaria parviflora* complex. Values with * correspond to the three largest for each axis (A). See Table 2 for variable names

Variable	PCA (N=685)						CVA 46 Exp. Pop. (N=675)						CVA 12 morphotypes (N=685)					
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A1	A2	A3			
#1	-0.440	0.659*	-0.174	-0.378*	0.020	-0.374	0.469	-0.140	0.602*	-0.262	0.115	-0.649*	0.156					
#2	-0.366	0.643*	0.012	-0.436*	0.041	0.235	-0.038	0.008	0.430*	0.008	-0.027	0.146	-0.178					
#3	-0.605	0.322	-0.221	0.431*	-0.216	-0.359	-0.077	0.588*	-0.090	-0.394	-0.162	-0.165	-0.101					
#4	-0.351	0.619	-0.329	-0.196	-0.145	-0.163	-0.106	0.463*	0.235	0.354	-0.064	-0.072	-0.177					
#5	-0.443	0.600	0.344	0.305	0.019	-0.025	0.238	-0.413	-0.431*	-0.016	0.050	-0.181	0.178					
#6	-0.177	0.702*	0.452*	0.394	0.258*	0.567*	-0.712*	0.094	-0.029	0.285	0.142	0.949*	-0.304					
#7	-0.716	0.004	-0.396*	0.066	0.072	-0.663*	0.261	-0.254	-0.387	0.140	0.187	-0.540*	0.102					
#8	-0.764	-0.128	-0.258	-0.091	-0.857*	-0.076	-0.527*	-0.348	0.113	-0.006	-0.847*	0.078	-0.649*					
#9	-0.714	-0.239	-0.295	0.044	0.004	-0.086	0.481*	0.224	-0.212	-0.056	-0.016	-0.200	0.491*					
#11	-0.854*	-0.134	0.046	0.239	0.031	0.410	-0.226	0.202	-0.341	0.001	-0.124	0.482	0.130					
#12	-0.612	-0.280	0.101	0.031	-0.095	0.276	-0.099	0.224	-0.312	-0.288	-0.082	0.457	0.189					
#13	-0.699	-0.255	0.390	-0.138	0.061	0.336	0.104	-0.415*	-0.207	0.718*	-0.086	0.045	0.200					
#15	-0.918*	-0.238	0.048	-0.039	-0.148	-0.144	0.246	-0.027	0.113	-0.042	-0.051	-0.270	0.061					
#16	-0.782	-0.164	-0.199	0.157	-0.297*	-0.025	0.042	0.344	0.124	0.488*	-0.228*	-0.098	-0.134					
#17	-0.847*	-0.228	0.281	-0.160	-0.078	0.439*	0.247	0.085	0.374	-0.376	-0.224*	0.218	0.340*					
#18	-0.498	-0.118	0.567*	-0.317	0.029	0.365	0.185	0.130	0.105	-0.426*	-0.061	0.036	0.270					
Eigenvalue	6.66	2.57	1.43	1.05	11.76	5.13	2.57	1.80	1.74	1.20	7.53	2.33	1.61					
Accumulated variance (%)	41.63	57.71	66.63	73.19	43.07	61.87	71.29	77.87	84.22	88.62	58.37	76.44	88.93					

the centroids of the populations of BR and UR of the coast of Rio Grande do Sul and Uruguay, respectively; not shown).

The CVA resulted in six axes presenting eigenvalues higher than 1.00, the first three of which accounted for 71.29% of the accumulated variance (Table 3). We observe a slightly arched gradient structure in the association of the first two axes (Online Resource 2). Canonical axis 1 explains 43.07% of the variance and separates mainly the populations assigned to the morphotypes UL, UL2, UL3, PV and PV2 from populations of the morphotypes BR, ED, PL and PL2. This axis separates ULur from populations of the last three morphotypes and populations of TU. Canonical axis 2 explains 18.80% of the variance and separates the populations assigned to morphotypes UR and BR from the ED and PL populations. Canonical axis 3 explains 6.58% of the variance and essentially separates the populations of PV from the populations of TU, as well as populations of BR from populations of ED, PL and PL2 (Online Resource 2). The variables most correlated with these axes correspond mainly to floral characters: spur length (#8), width of the median segment of the labellum (#16) and the number of flowers (#6) being most correlated with axis 1; and ovary length (#7), number of flowers (#6) and length of the lateral segments of the labellum (#17) being most correlated with axis 2; and the number of flowers (#6) and spur length (#8) and width (#9) being most correlated with axis 3.

Cluster analysis based on distances from centroids, using the NJ algorithm, indicated the presence of two main groups comprising, in turn, two subgroups each (Fig. 5), differentiated essentially by flower characters. Group I includes populations with reduced flowers. Within this group, a first subgroup consists of populations of the morphotypes ED, PL and PL2, which have shorter spur lengths and come from diverse localities from Minas Gerais to the coast of Uruguay. The second subgroup contains populations chaining externally to the first group, including the morphotypes BR and UR, with populations of the former nested among those of the latter, and comprises plants with a high number of flowers (#6) from the south coasts of Brazil and Uruguay, along with one population from northeastern Brazil (URcv). Group II contains populations with the largest flowers in the complex. Populations of the morphotypes UL and UL2 form a first subgroup of Group II, which comprise short plants with large flowers and a long spur (the largest of the complex). The morphotypes UL + UL2 externally link to populations of PV. A second subgroup contains the three populations of the morphotype TU from southern Brazil and Argentina, to which the only population of the PV2 morphotype (PV2an-ps) links. Three of the four populations of the UL3 morphotype connect to this set, all occurring in the Serra da Mantiqueira and comprise short plants with large flowers and medium-sized spurs; the UL3sa population appears external to both groups. The two populations

of the CG morphotype appear linked between the two main groups. In order to improve and resolve the clusters, mainly of the populations of CG and UL3sa, we performed separate analyses for groups I and II, including the populations of CG in both of them due to their intermediate position. The separate analysis of Group I (Online Resource 3) recovered the subgroup ED + PL + PL2, as well as the subgroup formed by the populations of BR, which now appears connected to a subgroup formed by all UR populations (except URca-cd) and CG populations, which remain clustered and now nested within UR. The URca-cd population, which was external to the subgroup ED + PL + PL2, now appears external to the subgroup BR + UR + CG. The separate analysis of Group II (Online Resource 3) also recovered the cluster of the two CG populations, but they do not appear nested inside any morphotype and their inclusion in this group caused chaining of populations. This analysis also did not improve the resolution of the positioning of UL3sa, since it dispersed the UL3 group previously formed in the analysis with all populations.

Analyses of the 12 morphotypes

It was possible to statistically ($p < 0.001$) discriminate all morphotypes, with the Mahalanobis distance between centroids ranging from 4.27 (ED–PL) to 110.19 (PL–UL). The classification matrix resulting from the discriminant analysis of the 12 morphotypes shows that the percentage of incorrect classifications in relation to the predicted morphotype ranges from 0.00% in UL to 28.57% in UR (where 16.07% of the individuals are closer to the centroid of BR; Table 4). There are a high number of incorrect classifications among morphotypes ED, PL and PL2 (except for three PL2 individuals). We observed similar results of incorrect classifications between the morphotypes BR and UR. Several individuals of the UL2 morphotype were also classified in the morphotypes PV and UL.

The CVA identified three axes with eigenvalues greater than 1.00 (Table 3; Fig. 6), which accounts for 88.93% of the accumulated variance. Canonical axis 1 explains 58.37% of the variance and separates morphotypes UL and UL2 from UR, BR, ED, PL and PL2, and the last four (BR, ED, PL and PL2) from PV, UL3 and TU. Morphotype UL is the most differentiated morphotype in this axis, occupying one end and only partially overlapping with UL2. Canonical axis 2 explains 18.07% of the variance and separates BR and UR from ED, PL and PL2. Morphotypes UL and UL2 form a gradient along this axis, as do TU, PV2, UL3 and PV, sets that overlap on the first axis. The third axis explains 12.49% of the variance and essentially separates PV from UL3, TU and PV2. The variables with the greatest contribution to the separation along the first axis are measures of the labellum, such as spur length (#8) and the length of the median (#16)

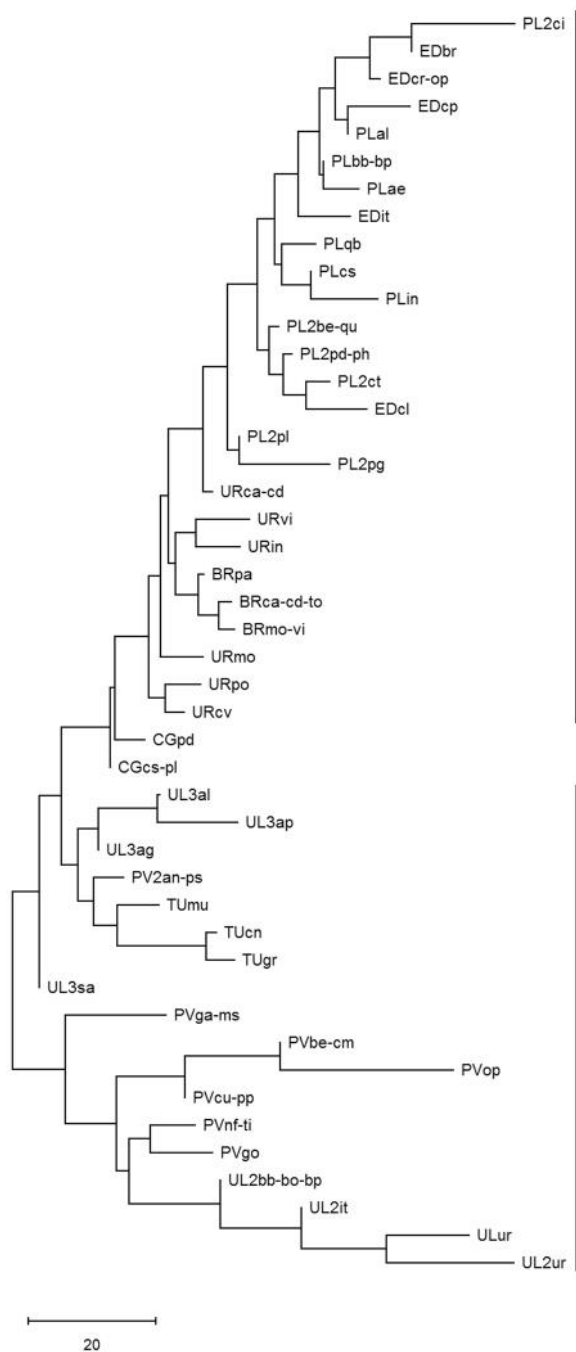


Fig. 5 Dendrogram presenting the phenetic relationships among the 46 expanded populations of the 12 morphotypes [brachyphyton (BR), caaguazuensis (CG), edentula (ED), parviflora (PV), parviflora2 (PV2), paulensis (PL), paulensis2 (PL2), tucumanensis (TU), ulei (UL), ulei2 (UL2), ulei3 (UL3) and uruguayensis (UR)] of the *Habenaria parviflora* complex (Orchidaceae), constructed using a generalized Mahalanobis distance matrix of population centroids and the Neighbor-joining clustering algorithm based on 16 morphological characters. See Online Resource 1 for population names

and lateral segments (#17) of the labellum, all of which negatively correlated with the axis. The variables with the highest correlation with axis 2 are the number of flowers (#6), plant height (#1) and ovary length (#7). The third axis is mainly associated with spur length (#8) and width (#9) and the length (#17) of the lateral segments of the labellum.

The cluster analysis based on centroid distances of the morphotypes, using UPGMA, revealed two main groups, plus morphotype UL linking externally to the second group (Fig. 7a). The first group comprises six morphotypes and is subdivided into two subgroups: (ED, PL, PL2) + (BR, UR, CG). The second group includes the remaining morphotypes, divided into two subgroups: (PV2, UL3, TU) + (UL2, PV). The topology obtained using the NJ algorithm (Fig. 7b) was very similar to that obtained with UPGMA, with the main difference being the grouping of the highly differentiated morphotype UL with UL2, and PV linking externally to them, besides the chaining of UL3, TU and PV2, and CG to the first group, indicating an unstable relationship among these morphotypes.

Descriptive statistical analysis of the morphological characters

We present the results of the descriptive statistical analysis of the morphological variables among morphotypes in Online Resource 4. No character exhibited statistically different means among all morphotypes. However, the means of characters #7, #9 and #10 for morphotype BR differed significantly from the means of the other groups, as well as character #8 for CG, characters #13 and #15 for ED, characters #3, #10, #11 and #12 for PL, character #8 for PV, character #18 for TU and characters #11, #12 for UL.

Discussion

Our analyses indicates that even Garay's (1976) revision and the four taxa currently recognized in the *Habenaria parviflora* complex (Batista et al. 2011a, b; Sanguinetti 2015; Govaerts et al. 2018) are not sufficient to cover all the morphological diversity of the complex. In this context, we defined and tested 12 morphotypes in our analyses, which did not corroborate the recognition of each morphotype as a taxon.

Initially, we separated the morphotypes ED, PL and PL2 based on differences in spur length compared to pedicellate ovary, flower size, length of lip lateral segments, degree of flower opening and leaf width. However, our analyses

Table 4 Classification of individuals by the discriminant analysis of 16 morphological characters of the 12 morphotypes, *BR* brachyphyton, *CG* caaguazuensis, *ED* edentula, *PV* parviflora, *PV2* parviflora2, *PL* paulensis, *PL2* paulensis2, *TU* tucumanensis, *UL* ulei, *UL2* ulei2, *UL3* ulei3 and *UR* uruguayensis, of the *Habenaria parviflora* complex. See Online Resource 1 for morphotype names

Morphotype	% correct ^a	BR	CG	ED	PL	PL2	PV	PV2	TU	UL	UL2	UL3	UR
BR	86.59	71	–	–	–	2	–	–	–	–	–	–	9
CG	80.00	–	20	–	–	–	1	–	–	–	–	1	3
ED	84.72	–	–	61	4	7	–	–	–	–	–	–	–
PL	75.28	–	–	9	67	13	–	–	–	–	–	–	–
PL2	76.64	–	–	16	6	82	–	–	–	–	–	–	3
PV	96.59	–	1	–	–	–	85	–	1	–	1	–	–
PV2	88.24	–	–	–	–	–	–	15	2	–	–	–	–
TU	79.07	–	–	–	–	2	1	1	34	–	3	1	1
UL	100.00	–	–	–	–	–	–	–	–	15	–	–	–
UL2	75.00	–	1	–	–	–	5	1	1	3	33	–	–
UL3	85.11	–	–	–	–	–	–	2	3	–	2	40	–
UR	71.43	9	2	1	1	2	–	–	–	–	–	1	40
Total	82.19	80	24	87	78	108	92	19	41	18	39	43	56

^aCorrect classifications correspond to classifications predicted by the analysis that coincide with previously defined groups

indicate the inclusion of these morphotypes in a single taxon, as can be seen by the cohesive group, without subgroups corresponding to sets of populations of the morphotypes. Furthermore, it is not possible to separate these populations along the significant axes of the canonical variable analysis, with several individuals of these populations being closer to the centroid of these distinct morphotypes than to the centroid of the population itself. Our results corroborate the application of the name *H. paulensis* for this taxon, the oldest name in the group, and the synonymization of *H. edentula* under *H. paulensis* as proposed by Garay (1976). In the circumscription, we propose here, *H. paulensis* differs from the rest of the complex by the short spur, narrow median segment of the labellum, lax inflorescences, narrow leaves, short lateral segments of the labellum, narrow dorsal sepal and slightly opened flowers.

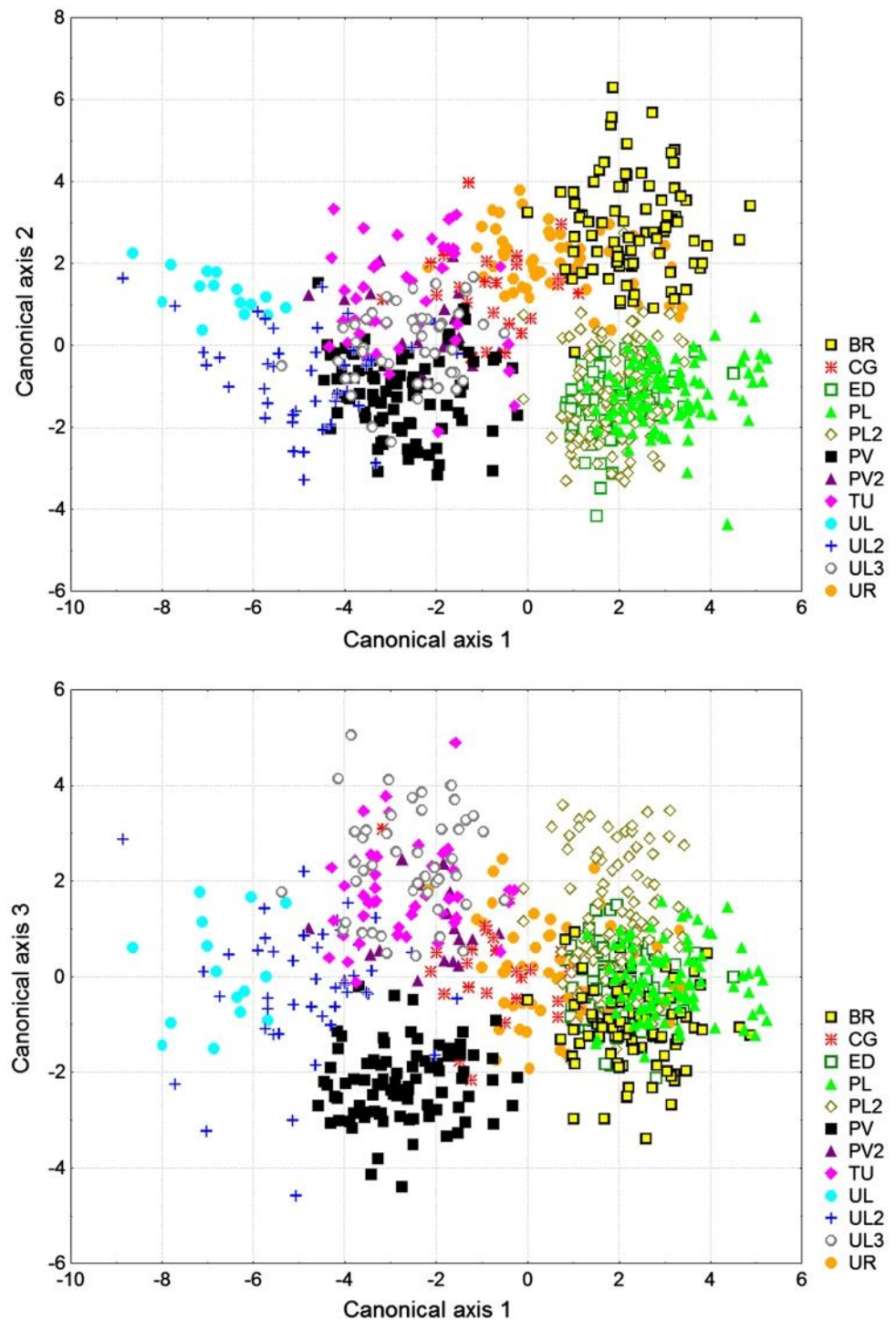
The second well-delimited group includes UL and UL2. The UL morphotype, which includes the type of *H. ulei*, is highly differentiated and characterized by reduced plant height, large flowers, broad leaves, short inflorescence and a long spur. All samples of this morphotype, and the only population included in the analyses (ULur), come from *campos de altitude* of Serra Geral Catarinense in southern Brazil. The morphotype UL2 differs from the typical form by having taller plants, longer leaves and rachis, more numerous leaves and flowers and more open flowers, comprising populations and samples from Serra da Bocaina (São José do Barreiro, São Paulo), Serra da Mantiqueira (Itatiaia, Rio de Janeiro) and Serra do Corvo Branco (Urubici, Santa Catarina). Our results show that it is not possible to separate the populations of these two morphotypes, which are characterized by the association of the highest values for spur and ovary lengths, leaf width and open flowers. This group corresponds to what was described as *H. ulei* by Cogniaux

(1893). As we can see in the NJ-dendrogram (see Fig. 7b), the UL-UL2 group presents one of the greatest distances between its components and the other groups.

Other morphotype groups could not be clearly defined due to their overlap, but they are here provisionally characterized and discussed based on the results obtained. The BR morphotype, which corresponds to the type of *H. brachyphyton*, is well differentiated and characterized by reduced plant height, congested inflorescence and small flowers. The analyzed populations and all samples examined of this morphotype are restricted to the coastal strip of southern Brazil and Uruguay. The UR morphotype, which corresponds to the type of *H. uruguayensis*, is essentially differentiated by its larger leaves and longer inflorescence. In all analyses, populations of the BR morphotype appear clustered and nested among the populations of the UR morphotype, making it impossible to separate them morphologically and suggesting that these two morphotypes may correspond to the same taxon. However, the linkage of UR + BR with populations of the CG morphotype makes it difficult to recognize the UR + BR as a taxon. Alternatively, a broader circumscription including these three morphotypes as a single taxon is difficult because there are significant differences between BR and CG. The CG morphotype, corresponding to the type of *H. caaguazuensis*, has taller plants, less-congested inflorescences and larger and more open flowers. Although it is not possible to make any taxonomic proposition at this moment in relation to morphotypes UR, BR and CG, our results indicate a greater similarity between them than with morphotype PV (*H. parviflora*), indicating that the synonymization of *H. uruguayensis* under *H. parviflora* by Sanguinetti (2015) needs to be reevaluated.

The morphotype PV, which comprises one of the syntypes of *H. parviflora* from Rio de Janeiro, is characterized by

Fig. 6 Representation of the values of the first three canonical axes of the CVA of the 12 morphotypes, *BR* brachyphyton, *CG* caaguazuensis, *ED* edentula, *PV* parviflora, *PV2* parviflora2, *PL* paulensis, *PL2* paulensis2, *TU* tucumanensis, *UL* ulei, *UL2* ulei2, *UL3* ulei3 and *UR* uruguayensis, of the *Habenaria parviflora* complex (Orchidaceae), belonging to 65 populations, using 16 morphological characters. Percentage accumulated variance for the first three axes = 88.93% (axis 1 = 58.37%, eigenvalue = 7.53; axis 2 = 18.07%, eigenvalue = 2.33; axis 3 = 12.49%, eigenvalue = 1.61). See Online Resource 1 for morphotype names



generally taller plants, more numerous and longest leaves of the complex, and relatively long and narrow spur. Although the populations of the *H. parviflora* (PV morphotype) are well characterized morphologically, they do not constitute a group, but show links to *H. ulei* (UL+UL2). The PV2 morphotype did not group with other PV morphotypes, but clustered with populations of the morphotypes TU and UL3. It comprised two populations from Chapada Diamantina

(Bahia) and distinguished from PV by the generally shorter rachis, ovary and spur, spur slightly inflated distally, longer segments of the labellum and more open flowers.

Similar to the previous case, the UL3 morphotype grouped with PV2 and TU morphotypes and not with UL+UL2, with which it is apparently similar to due to the large flowers, relatively short plants and similarity of habitat (*campos de altitude*). Morphotypes UL3, PV2 and TU were

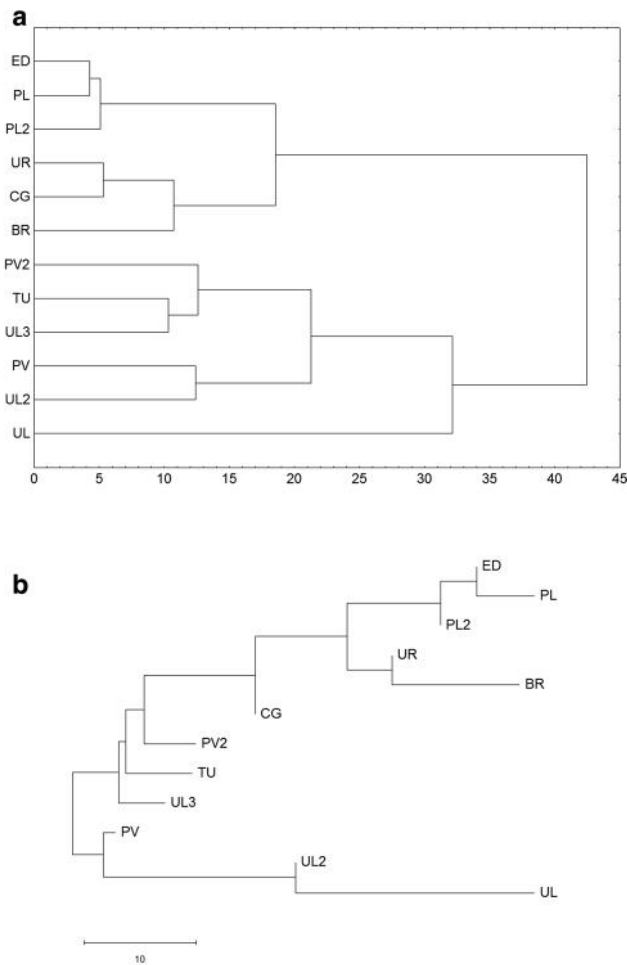


Fig. 7 Dendrogram presenting the phenetic relationships among the 12 morphotypes, *BR* brachyphyton, *CG* caaguazuensis, *ED* edentula, *PV* parviflora, *PV2* parviflora2, *PL* paulensis, *PL2* paulensis2, *TU* tucumanensis, *UL* ulei, *UL2* ulei2, *UL3* ulei3 and *UR* uruguayensis, of the *Habenaria parviflora* complex (Orchidaceae), belonging to 65 populations, constructed using a generalized Mahalanobis distance matrix of population centroids and UPGMA (a) and Neighbor-joining (b) clustering algorithms, based on 16 morphological characters. See Online Resource 1 for names of populations

clustered in the analysis due to their medium-sized spur; however, there are still differences between them, mainly regarding floral characters. Therefore, we leave it open if they are conspecific. Morphotype TU is formed by populations from the interior of Rio Grande do Sul, Brazil, and Misiones, Argentina, and its identification was based on *H. montevidensis* var. *tucumanensis*, described from material collected in the province of Tucumán, northern Argentina.

Because of the uncertainties in the relationships between PV and TU, UL3, PV2, within BR and UR, and of these morphotypes with CG, we do not recognize any of them as taxa. Still, we found variants of morphotypes close to *H. ulei* (UL) and *H. parviflora* (PV), where there is marked

morphological divergence between the populations of UL + UL2 in relation to UL3, and of PV in relation to PV2. Although we could not solve entirely the taxonomy of the complex in this study, an important contribution is the detailed characterization of the morphological diversity of the complex and the identification of characters useful for taxonomy of this group. Among them are the number of flowers, the length of the ovary, the angle between floral structures (sepals and labellum segments) and especially spur characters. Other studies on terrestrial orchids (Ponsie et al. 2007, 2009; Adhikari and Wallace 2013; Durka et al. 2017) also found that floral characters were more discriminative than vegetative characters and suggested that its size could be related to interactions with pollinators.

The complex patterns observed in these populations may be due to incipient divergence or reticulation by hybridization, as observed in other orchid groups (e.g., Ribeiro et al. 2008), and morphological characters alone proved insufficient for discovering their relationships. Other studies on complexes of species occurring in campos rupestres (rocky field vegetation; Borba et al. 2002; Conceição et al. 2008a, b; Ribeiro et al. 2008; Melo and Borba 2011), in Atlantic Rain Forest (Oliveira et al. 2008), as well as in other terrestrial orchids (Adhikari and Wallace 2013), demonstrate the importance of using various sources of information to make taxonomic decisions. This highlights the need of the inclusion of a high number of samples, as done in this study and the use of several kinds of characters like phylogenetic, phylogeographic and population genetic data, which is our future work, to understand the evolution of such complexes.

Acknowledgements We thank Instituto Estadual de Florestas (IEF Minas Gerais), Instituto Florestal and Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) for collecting licenses and logistical support; and the curators and staff of the herbaria for access to their collections. We also thank all those who helped with the field collections (Alexandre Medeiros, Carla Royer, Cecília Fiorini, Daniela Simão, Emerson Pansarin, Fernando Moro, George Fagundes, Geraldo Barfknecht, Ingo Bauer, Jacques Klein, Jader Caetano, Jomar Jardim, Leonardo Guimarães, Liliana Essi, Mônica Bolson, Silvia Estevez, Tadeu Motta, Thiago Meneguzzo and employees of the conservation units); Alexandre Salino, Cássio van den Berg, Luiz Eduardo Vieira del Bem, Rafael Felipe de Almeida for their suggestions on a preliminary version of the manuscript; two anonymous reviewers and Plant Systematics and Evolution editors Mike Thiv and Karol Marhold for improvements in the manuscript. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES, Finance Code 001) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, CRA - APQ-03350-16). GCL thanks FAPEMIG (process 5308/15) for the doctoral scholarship. JANB (process 310690/2016-1) and ELB (process 311918/2014-0) are grateful for the research productivity grant received from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Information on Electronic Supplementary Material

Online Resource 1. Populations of the morphotypes of the *Habenaria parviflora* complex used in this work.

Online Resource 2. Representation of the values of the first three canonical axes of the CVA of the 46 expanded populations of the *Habenaria parviflora* complex (Orchidaceae), belonging to 65 populations, using 16 morphological characters.

Online Resource 3. Dendrogram presenting the phenetic relationships of the separate analyses of Groups I and II with populations of the CG morphotype, constructed using a generalized Mahalanobis distance matrix of population centroids and the Neighbor-joining clustering algorithm.

Online Resource 4. Measurements of the 18 morphological characters used in the morphometric analysis of the 12 morphotypes of the *Habenaria parviflora* complex.

References

- Adhikari B, Wallace LE (2013) Does the *Platanthera dilatata* (Orchidaceae) complex contain cryptic species or continuously variable populations? *Pl Syst Evol* 300:1465–1476. <https://doi.org/10.1007/s00606-016-1381-8>
- Batista JAN, Bianchetti LB, González-Tamayo R, Figueroa XMC, Cribb PJ (2011a) A synopsis of new world *Habenaria* (Orchidaceae) I. *Harvard Pap Bot* 16:1–47. <https://doi.org/10.3100/025.016.0101>
- Batista JAN, Bianchetti LB, González-Tamayo R, Figueroa XMC, Cribb PJ (2011b) A synopsis of new world *Habenaria* (Orchidaceae) II. *Harvard Pap Bot* 16:233–273. <https://doi.org/10.3100/0.25.016.0202>
- 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. *Molec Phylogen Evol* 67:95–109. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.01.008>
- Borba EL, Shepherd G, van den Berg C, Semir J (2002) Floral and vegetative morphometrics of five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. *Ann Bot (Oxford)* 90:219–230. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf168>
- Carnevali G, Gerlach G, Romero-González GA (2008) Orchidaceae. In: Hokche O, Berry PE, Huber O (eds) Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela. Fundación Instituto Botánico de Venezuela, Caracas
- Cogniaux A (1893) Orchidaceae. In: Martius CFP, Eichler AG, Urban I (eds) Flora Brasiliensis, vol. 3, part 4. R. Oldenbourg, Munich, pp 16–102
- Conceição AS, Queiroz LP, Lambert SM, Pereira ACS, Borba EL (2008a) Biosystematics of *Chamaecrista* sect. *Absus* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae) based on allozyme and morphometric analyses. *Pl Syst Evol* 270:183–207. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0604-4>
- Conceição AS, Queiroz LP, Borba EL (2008b) Natural hybrids in *Chamaecrista* sect. *Absus* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae): genetic and morphological evidence. *Pl Syst Evol* 271:19–27. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0621-3>
- Correa MN (1950) Nota sobre las orquídeas argentinas del género *Habenaria*. *Notas Mus La Plata Bot* 15:151–168
- Durka W, Baum A, Michalski SG, Baum H (2017) Darwin's legacy in *Platanthera*: are there more than two species in the *Platanthera bifolia/chlorantha* group? *Pl Syst Evol* 303:419–431. <https://doi.org/10.1007/s00606-016-1381-8>
- Foldats E (1969) *Habenaria*. In: Lasser T (ed) Orchidaceae, Flora de Venezuela 15(1):37–98. Instituto Botánico, Caracas
- Funk VA, Hollowell TH, Berry PE, Kelloff CL, Alexander S (2007) Checklist of the plants of the Guiana Shield (Venezuela: Amazonas, Bolívar, Delta Amacuro; Guyana, Surinam, French Guiana). *Contr US Natl Herb* 55:1–584
- Garay LA (1976) Sprengel's *Habenaria montevidensis*. *Bradea* 19:115–120
- Garay LA (1978) 225(1). Orchidaceae: Cyripedioideae, Orchidoideae, Neottiodeae. In: Harling G, Sparre B (eds) Flora of Ecuador, vol 9. University of Göteborg, Stockholm, pp 1–305
- 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 (2018) World checklist of Orchidaceae. Royal Botanic Gardens, Kew. Available at: <http://apps.kew.org/wcsp/>. Accessed 15 Sep 2018
- Hoehne FC (1940) *Habenaria*. In: Hoehne FC (ed) Orchidaceae, Flora Brasílica, vol. 12. Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo, São Paulo, pp 52–254
- Lambert SM, Borba EL, Machado MC (2006) Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus X albicephalus* (*Melocactus ernestii* X *M. glaucescens*) in north-eastern. *Pl Spec Biol* 21:93–108. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2006.00155.x>
- Media Cybernetics (2006) Image pro plus. Version 6.0.1 for Windows 2000/XP Professional, Rockville
- Melo MC, Borba EL (2011) Morphological variability in rupicolous species of the *Acianthera prolifera* complex (Orchidaceae) occurring in southeastern Brazil. *Pl Syst Evol* 293:135–145. <https://doi.org/10.1007/s00606-011-0435-1>
- Oliveira RP, Borba EL, Longhi-Wagner HM (2008) Multivariate morphometrics in herbaceous bamboos of the *Raddia brasiliensis* complex (Poaceae—Bambusoideae): implications to taxonomy and new species from Brazil. *Pl Syst Evol* 270:159–182. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0614-2>
- Pabst GFJ (1952) Orchidaceae Uruguayenses Collectorum Variorum Collectae. *Rodriguésia* 27:109–119
- Pace MC, Cameron KM (2017) The systematics of the *Spiranthes cernua* species complex (Orchidaceae): untangling the Gordian Knot. *Syst Bot* 42:640–669. <https://doi.org/10.1600/036364417X696537>
- Pessoa EM, Alves M, Alves-Araújo A, Palma-Silva C, Pinheiro F (2012) Integrating different tools to disentangle species complexes: a case study in *Epidendrum* (Orchidaceae). *Taxon* 61:721–734. <https://doi.org/10.1002/tax.614002>
- Pinheiro F, Barros F (2009) Morphometric analysis of the *Brasiliorchis picta* complex (Orchidaceae). *Revista Brasil Bot* 32:11–21. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042009000100003>
- Pinheiro F, Dantas-Queiroz MV, Palma-Silva C (2018) Plant species complexes as models to understand speciation and evolution: a review of South American studies. *Crit Rev Pl Sci* 37:54–80. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1471565>
- Ponsie ME, Johnson SD, Edwards TJ (2007) A morphometric analysis of species boundaries in the *Bonatea cassidea* complex. *Nordic J Bot* 25:257–267. <https://doi.org/10.1111/j.0107-055X.2007.00080.x>
- Ponsie ME, Johnson SD, Edwards TJ (2009) A morphometric analysis of the *Bonatea speciosa* complex (Orchidaceae) and its

- implications for species boundaries. *Nordic J Bot* 27:166–177. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.2008.00259.x>
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (2001) *Genera Orchidacearum*, vol. 2, Orchidoideae (Part 1). Oxford University Press Inc., New York
- Renz J (1992) The genus *Habenaria* (Orchidaceae) in the Guianas. *Candollea* 47:483–512
- Ribeiro PL, Borba EL, Smidt EC, Lambert SM, Schnadelbach AS, van den Berg C (2008) Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Pl Syst Evol* 270:109–137. <https://doi.org/10.1007/s00606-007-0603-5>
- Ribeiro PL, Pereira ACS, Borba EL, Giulietti AM (2018) Genetic and morphological diversity and evidence of hybridization in the “sempre-vivas” (*Comanthera*, Eriocaulaceae) endemic to the Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. *Flora* 238:60–71. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.09.013>
- Sanguinetti A (2015) *Habenaria parviflora* (Orchidaceae), extension of its austral distributional limit and new synonymy. *Nordic J Bot* 33:361–365. <https://doi.org/10.1111/njb.00724>
- Schweinfurth C (1967) Orchidaceae of the Guayana highland. *Mem New York Bot Gard* 14:69–214
- Singer R (2001) Pollination biology of *Habenaria parviflora* (Orchidaceae: Habenariinae) in southeastern Brazil. *Darwiniana* 39:201–207
- speciesLink (2019) *specieslink*. CRIA, FAPES, Campinas, São Paulo. Available at: <http://slink.cria.org.br/tools>. Accessed 23 Apr 2019
- StatSoft Inc (2007) STATISTICA for Windows (data analysis software system). Version 8.0, Tulsa
- Szlachetko DL, Kolanowska M, Nowak S, Vieira-Uribe S (2017) *Materials to the Orchid Flora of Colombia*, vol. 1. Koeltz Botanical Books, Oberreifenberg

Publisher’s Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Plant Systematics and Evolution

Morphometric analysis of the *Habenaria parviflora* complex (Orchidaceae)

Gabriela Cruz-Lustre¹ · João A. N. Batista¹ · José A. Radins² · Andrés González³ · Eduardo L. Borba¹

¹ Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Caixa Postal 486, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-910, Brazil

² Dirección de Biodiversidad, Ministerio de Ecología y Recursos Naturales Renovables, Calle San Lorenzo 1538, Código Postal 3300, Posadas, Misiones, Argentina

³ Departamento de Botânica, Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay

Gabriela Cruz-Lustre, corresponding author e-mail: gacruzlustre@gmail.com

Online Resource 1. Populations of the morphotypes of the *H. parviflora* complex used in this work. Acronyms for Brazilian states: BA = Bahia; GO = Goiás; MG = Minas Gerais; PR = Paraná; RJ = Rio de Janeiro; RS = Rio Grande do Sul; SC = Santa Catarina; SP = São Paulo. DF = Distrito Federal. See the topic Materials and methods for an explanation of "expanded populations". Vouchers are deposited in herbarium BHCB

Morphotype	n° Population	Locality, municipality-state/department* (N)	Exp. Pop. (N)	Location	Voucher
brachyphyton (BR)					
BRca	1	Arroio Teixeira, Capão da Canoa-RS (10)		29°42'05"S, 49°59'04"W	G. Cruz-Lustre 290
BRcd	2	Cidreira-RS (12)	BRca-cd-to (36)	30°06'54"S, 50°10'55"W	G. Cruz-Lustre 287
BRto	3	Praia Paraíso, Torres-RS (14)		29°26'36"S, 49°48'24"W	G. Cruz-Lustre 291
BRin	4	El Pinar, Canelones, Uruguay (4)	BRin (4)**	34°46'21"S, 55°37'48"W	A. González s.n.
BRno	5	Lagoa do Peixe, Mostardas-RS (17)	BRmo-vi (21)	31°15'47"S, 50°57'30"W	G. Cruz-Lustre 308
BRvi	6	Viamão-RS (4)		30°15'51"S, 51°01'17"W	G. Cruz-Lustre 306
BRpa	7	Palhoça-SC (21)	BRpa (21)	27°41'09"S, 48°40'01"W	G. Cruz-Lustre 279
caaguazuensis (CG)					
CGcs	8	Cânon Itaimbezinho, Cambará do Sul-RS (3)		29°10'23"S, 50°06'13"W	G. Cruz-Lustre 297
CGpl	9	São Francisco de Paula-RS (5)	CGcs-pl (8)	29°18'38"S, 50°21'22"W	G. Cruz-Lustre 292
CGml	10	Pedra do Lagarto, Santa Maria-RS (2)	CGml (2)**	29°37'33"S, 53°52'19"W	G. Cruz-Lustre 323
CGpd	11	Palmas-Água Doce, Palmas-PR (15)	CGpd (15)	26°34'45"S, 51°53'30"W	G. Cruz-Lustre 238

edentula (ED)					
EDbr	12	Pedra do Pato, Araponga-MG (15)	EDbr (15)	20°44'50"S, 42°28'27"W	G. Cruz-Lustre 390
EDcl	13	Caldas-MG (5)	EDcl (5)	21°49'49"S, 46°36'32"W	G. Cruz-Lustre 381
EDep	14	Pico da Bandeira, Alto Caparaó-MG (15)	EDep (15)	20°25'10"S, 41°48'33"W	G. Cruz-Lustre 182
EDcr	15	Serra do Caraca, Catas Altas-MG (5)	EDcr-op (21)	20°25'51"S, 43°29'53"W	G. Cruz-Lustre 397
EDop	16	Pico do Itacolomi, Ouro Preto-MG (16)	EDit (16)	20°25'47"S, 43°29'10"W	G. Cruz-Lustre 392
EDit	17	Pico das Prateleiras, Itatiaia-RJ (16)		22°23'48"S, 44°40'17"W	G. Cruz-Lustre 365
parviflora (PV)					
PVbe	18	Cachoeira do Zinco, Benedito Novo-SC (3)	PVbe-cm (7)	26°54'07"S, 49°29'10"W	G. Cruz-Lustre 276
PVcm	19	Costa das Orquídeas, Balneário Camboriú-SC (4)		27°00'17"S, 48°35'18"W	G. Cruz-Lustre 278
PVcu	20	Serra do Mar (Curucutu), São Paulo-SP (8)	PVcu-pp (19)	23°59'13"S, 46°44'34"W	G. Cruz-Lustre 359
PVpp	21	Paranapiacaba, Santo André-SP (11)		23°46'47"S, 46°18'21"W	G. Cruz-Lustre 360
PVga	22	Gama, Brasília-DF (13)	PVga-ms (26)	15°59'34"S, 47°04'21"W	J.A.N. Batista 3440
PVms	23	MSPW, Núcleo Bandeirante-DF (13)	PVgo (9)	15°54'14"S, 47°56'44"W	J.A.N. Batista 3443
PVgo	24	São Gabriel de Goiás-GO (9)		15°16'6.2"S, 47°33'5.6"W	J.A.N. Batista 3477
PVnf	25	Nova Friburgo, RJ (5)	PVnf-ti (16)	22°21'46"S, 42°30'29"W	G. Cruz-Lustre 399
PVti	26	Pico da Tijuca, Rio de Janeiro-RJ (11)		22°56'38"S, 43°17'11"W	G. Cruz-Lustre 325
PVop	27	Itacolomi, Ouro Preto, MG (11)	PVop (11)	20°26'00"S, 43°30'32"W	G. Cruz-Lustre 395
parviflora2 (PV2)					
PV2an	28	Morro das Antenas, Morro do Chapéu-BA (15)		11°35'26"S, 41°12'34"W	G. Cruz-Lustre 204
PV2ps	29	Sete Passagens, Miguel Calmon-BA (2)	PV2an-ps (17)	11°20'56"S, 40°31'43"W	G. Cruz-Lustre 199
paulensis (PL)					
PLae	30	Aiuruoca-MG (13)	PLae (13)	21°55'58"S, 44°38'40"W	G. Cruz-Lustre 364
PLal	31	São José dos Alpes, Campos do Jordão-SP (8)	PLal (8)	22°43'23"S, 45°27'26"W	G. Cruz-Lustre 378
PLbb	32	Trilha da Bacia, São José do Barreiro-SP (6)	PLbb-bp (21)	22°43'03"S, 44°35'53"W	G. Cruz-Lustre 371
PLbp	33	Fazenda Pinheirinho, São José do Barreiro-SP (15)		22°43'41"S, 44°38'05"W	G. Cruz-Lustre 374
PLcs	34	Cânton Fortaleza, Cambará do Sul-RS (15)	PLcs (15)	29°04'04"S, 49°57'54"W	G. Cruz-Lustre 303
PLin	35	Bello Horizonte, Canelones, Uruguay (16)	PLin (16)	34°46'18"S, 55°37'43"W	A. González s.n.
PLqb	36	Quatro Barras-PR (16)	PLqb (16)	25°18'37"S, 48°56'05"W	G. Cruz-Lustre 317
paulensis2 (PL2)					
PL2ag	37	Vale dos Garcia, Aiuruoca-MG (4)	PL2ag (4)**	22°01'02"S, 44°40'19"W	G. Cruz-Lustre 362

PL2be	38	Cachoeira do Zinco, Benedito Novo-SC (14)	PL2be-qu (29)	26°54'07"S, 49°29'10"W	G. Cruz-Lustre 277
PL2qu	39	Alto Quiriri, Campo Alegre-SC (15)	PL2ci (15)	26°02'17"S, 48°57'27"W	G. Cruz-Lustre 274
PL2ci	40	Serra do Cipó, Santana do Riacho-MG (15)	PL2ct (12)	19°13'40"S, 43°30'30"W	G. Cruz-Lustre 327
PL2ct	41	Serra da Canastra, São Roque de Minas-MG (12)	PL2pd-ph (17)	20°14'09"S, 46°26'51"W	G. Cruz-Lustre 335
PL2pd	42	Palmas-Água Doce, Palmas-PR (2)	PL2pg (15)	26°36'54"S, 51°33'21"W	G. Cruz-Lustre 249
PL2ph	43	Palmas-Horizonte, Palmas-PR (15)	PL2pl (15)	26°35'39"S, 51°34'17"W	G. Cruz-Lustre 272
PL2pg	44	Ponta Grossa-PR (15)	TUcn (15)	25°08'24"S, 49°58'55"W	G. Cruz-Lustre 310
PL2pl	45	São Francisco de Paula-RS (15)	TUgr (15)	29°27'10"S, 50°36'22"W	G. Cruz-Lustre 293
tucumanensis (TU)			TUmu (13)	27°28'15"S, 55°47'04"W	J. Radins s. n.
TUcn	46	Candelaria, Misiones-Argentina (15)	ULur (15)	27°28'33"S, 55°50'42"W	J. Radins s. n.
TUgr	47	Garupá, Misiones-Argentina (15)	UL2bb-bo-bp (26)	29°42'54"S, 53°43'08"W	G. Cruz-Lustre 324
TUmu	48	Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS (13)	UL2it (13)	28°07'04"S, 49°28'58"W	G. Cruz-Lustre 281
ulei (UL)			UL2ur (5)	22°42'39"S, 44°35'04"W	G. Cruz-Lustre 372
ULur	49	Monro da Igreja, Urubici-SC (15)	UL3ag (11)	22°44'32"S, 44°36'58"W	G. Cruz-Lustre 369
ulei2 (UL2)			UL3al (15)	22°43'45"S, 44°38'14"W	G. Cruz-Lustre 373
UL2bb	50	Trilha da Bacia, São José do Barreiro-SP (7)	UL3ap (15)	22°21'46"S, 44°44'34"W	G. Cruz-Lustre 366
UL2bo	51	Trilha do Ouro, São José do Barreiro-SP (15)	UL3sa (6)	28°07'06"S, 49°29'39"W	G. Cruz-Lustre 285
UL2bp	52	Fazenda Pinheirinho, São José do Barreiro-SP (4)	uruguayensis (UR)	22°01'02"S, 44°40'19"W	G. Cruz-Lustre 363
UL2it	53	Casa de Pedra, Itatiaia-RJ (13)	URca-cd (9)	22°43'01"S, 45°27'37"W	G. Cruz-Lustre 377
UL2ur	54	Serra do Corvo Branco, Urubici-SC (5)	URcv (7)	22°03'17"S, 44°40'34"W	G. Cruz-Lustre 361
ulei3 (UL3)			URin (14)	22°41'09"S, 45°28'37"W	G. Cruz-Lustre 380
UL3ag	55	Vale dos Garcia, Aiuruoca-MG (11)		29°42'05"S, 49°59'04"W	G. Cruz-Lustre 289
UL3al	56	São José dos Alpes, Campos do Jordão-SP (15)		30°09'17"S, 50°12'00"W	G. Cruz-Lustre 286
UL3ap	57	Retiro dos Pedros, Aiuruoca-MG (15)		17°39'43"S, 39°13'25"W	G. Cruz-Lustre 235
UL3sa	58	Trilha do Rio Sapucaí, Campos do Jordão-SP (6)		34°46'21"S, 55°37'48"W	A. González s.n.
uruguayensis (UR)					
URca	59	Arroio Teixeira, Capão da Canoa-RS (5)			
URcd	60	Cidreira-RS (4)			
URcv	61	Caravelas-BA (7)			
URin	62	El Pinar-Jaureguiberry, Canelones, Uruguay (14)			

URmo	63	Lagoa do Peixe, Mostardas-RS (5)	URmo (5)	31°14'58"S, 50°59'30"W	G. Cruz-Lustre 307
URpo	64	Cabo Polonio, Rocha, Uruguay (1.5)	URpo (15)	34°22'27"S, 53°49'14"W	A. González s.n.
URvi	65	Viamão-RS (6)	URvi (6)	30°15'51"S, 51°01'17"W	G. Cruz-Lustre 305

*When the country is not provided it corresponds to Brazil

**Populations not considered in the analyses due to low sample size

Plant Systematics and Evolution

Morphometric analysis of the *Habenaria parviflora* complex (Orchidaceae)

Gabriela Cruz-Lustre¹ · João A. N. Batista¹ · José A. Radins² · Andrés González³ · Eduardo L. Borba¹

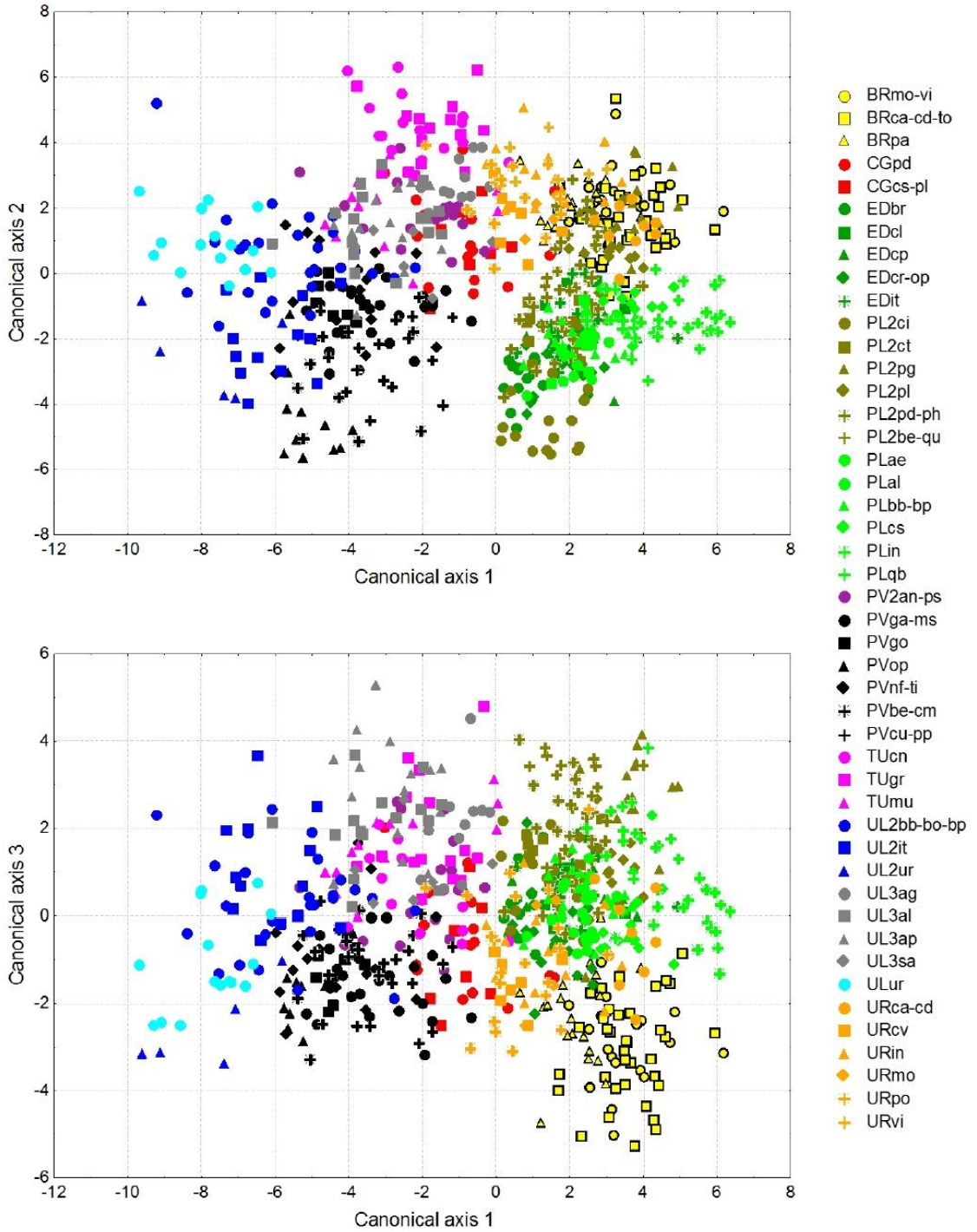
¹ Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Caixa Postal 486, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-910, Brazil

² Dirección de Biodiversidad, Ministerio de Ecología y Recursos Naturales Renovables, Calle San Lorenzo 1538, Código Postal 3300, Posadas, Misiones, Argentina

³ Departamento de Botánica, Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay

Gabriela Cruz-Lustre, corresponding author e-mail: gacruzlustre@gmail.com

Online Resource 2. Representation of the values of the first three canonical axes of the CVA of the 46 expanded populations of the *H. parviflora* complex (Orchidaceae), belonging to 65 populations, using 16 morphological characters. Percentage accumulated variance for the first three axes = 71.29% (axis 1 = 43.07%, eigenvalue = 11.76; axis 2 = 18.80%, eigenvalue = 5.13; axis 3 = 9.42%, eigenvalue = 2.57). See Online Resource 1 for population names



Plant Systematics and Evolution

Morphometric analysis of the *Habenaria parviflora* complex (Orchidaceae)

Gabriela Cruz-Lustre¹ · João A. N. Batista¹ · José A. Radins² · Andrés González³ · Eduardo L. Borba¹

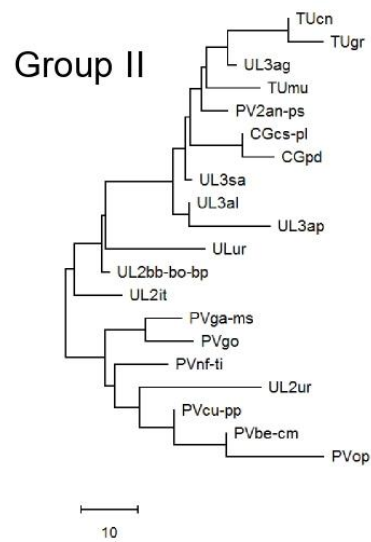
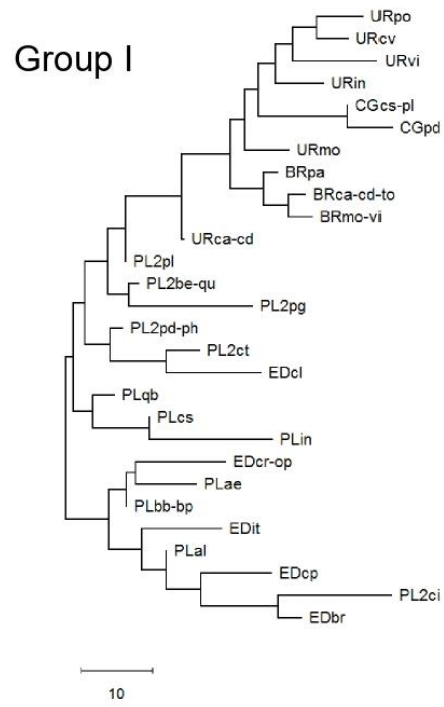
¹ Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Caixa Postal 486, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-910, Brazil

² Dirección de Biodiversidad, Ministerio de Ecología y Recursos Naturales Renovables, Calle San Lorenzo 1538, Código Postal 3300, Posadas, Misiones, Argentina

³ Departamento de Botánica, Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay

Gabriela Cruz-Lustre, corresponding author e-mail: gcruzlustre@gmail.com

Online Resource 3. Dendrogram presenting the phenetic relationships of the separate analyses of Groups I and II with populations of the CG morphotype, constructed using a generalized Mahalanobis distance matrix of population centroids and the Neighbor-joining clustering algorithm. Analyses were performed using 17 morphological characters [excluded variable = length of dorsal sepal (#10)]. Morphotypes abbreviations: brachyphyton (BR), caaguazuensis (CG), edentula (ED), parviflora (PV), parviflora2 (PV2), paulensis (PL), paulensis2 (PL2), tucumanensis (TU), ulei (UL), ulei2 (UL2), ulei3 (UL3) and uruguayensis (UR). See Online Resource 1 for population names



Plant Systematics and Evolution

Morphometric analysis of the *Habenaria parviflora* complex (Orchidaceae)

Gabriela Cruz-Lustre¹ · João A. N. Batista¹ · José A. Radins² · Andrés González³ · Eduardo L. Borba¹

¹ Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Caixa Postal 486, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-910, Brazil

² Dirección de Biodiversidad, Ministerio de Ecología y Recursos Naturales Renovables, Calle San Lorenzo 1538, Código Postal 3300, Posadas, Misiones, Argentina

³ Departamento de Botânica, Museo Nacional de Historia Natural, Montevideo, Uruguay

Gabriela Cruz-Lustre, corresponding author e-mail: gacruzlustre@gmail.com

Online Resource 4. Measurements of the 18 morphological characters used in the morphometric analysis of the 12 morphotypes of the *H. parviflora* complex. Data presented as mean±standard deviation (minimum–maximum) for each morphotype. See Online Resource 1 for morphotype names and Table 2 for variable names. Measurements presented in millimeters, except for variables #1, #2 and #5 (in centimeters). Different superscript letters in the same line indicate statistically different means by Bonferroni test ($p < 0.05$)

Variable	BR	CG	ED	PL	PL2	PV	PV2	TU	UL	UL2	UL3	UR
#1	20.2 [±] 7.9 ^a (7.2–45.2)	28.9 [±] 9.7 ^{de} (16.0–50.7)	30.2 [±] 14.7 ^{de} (7.3–73.4)	28.8 [±] 12.1 ^{de} (14.0–101.7)	37.8 [±] 10.4 ^b (15.0–64.8)	39.8 [±] 11.9 ^b (17.7–67.6)	32.3 [±] 16.9 ^{debb} (13.6–67.8)	35.1 [±] 11.1 ^{eb} (14.8–66.6)	20.1 [±] 5.2 ^{da} (13.1–30.7)	43.1 [±] 13.8 ^b (13.3–79.2)	26.8 [±] 9.5 ^{da} (8.7–50.7)	25.3 [±] 6.4 ^{da} (11.0–38.5)
#2	10.0 [±] 5.3 ^{de} (3.4–26.5)	9.2 [±] 3.2 ^{de} (4.5–15.4)	8.8 [±] 3.6 ^d (3.3–18.6)	8.7 [±] 3.6 ^d (2.5–21.5)	10.5 [±] 3.4 ^{de} (5.0–23.2)	14.0 [±] 5.9 ^a (4.1–35.1)	11.6 [±] 4.1 ^{dcb} (4.9–20.4)	13.5 [±] 3.8 ^{ba} (7.8–22.5)	7.5 [±] 1.1 ^d (5.4–9.5)	12.2 [±] 4 ^{cba} (6.2–24.2)	8.7 [±] 2.8 ^d (4.4–18.5)	10.8 [±] 3.6 ^{debb} (4.8–24.0)
#3	6.7 [±] 2.5 ^{ef} (3.0–14.0)	8.3 [±] 2.5 ^{efde} (5.0–14.0)	8.0 [±] 2.0 ^{fed} (5.0–15.0)	5.4 [±] 1.3 ^a (3.3–9.0)	6.6 [±] 2.0 ^{ef} (3.1–14.0)	8.9 [±] 4.0 ^{de} (2.8–19.0)	7.7 [±] 1.8 ^{efde} (4.4–11.5)	7.8 [±] 1.9 ^{efed} (4.5–14.0)	12.2 [±] 2.3 ^b (10.0–16.0)	10.0 [±] 2.6 ^{bb} (6.0–16.0)	8.4 [±] 2.2 ^{edc} (4.5–16.0)	6.9 [±] 2.5 ^{efb} (4.0–14.0)
#4	7.4 [±] 1.5 ^{de} (4.0–11.0)	9.6 [±] 1.8 ^{ba} (6.0–12.0)	7.4 [±] 2.1 ^{de} (3.0–14.0)	7.1 [±] 1.6 ^d (5.0–13.0)	8.2 [±] 1.7 ^{eb} (4.0–12.0)	9.9 [±] 3.1 ^a (5.0–17.0)	8.2 [±] 2.0 ^{dcb} (5.0–12.0)	7.5 [±] 1.3 ^{de} (5.0–11.0)	6.7 [±] 1.0 ^d (5.0–8.0)	8.9 [±] 1.6 ^{ba} (6.0–13.0)	7.4 [±] 2.0 ^{de} (4.0–13.0)	7.5 [±] 1.5 ^{de} (4.0–11.0)
#5	6.3 [±] 3.4 ^{debb} (1.1–14.3)	7.8 [±] 4.1 ^{dcb} (3.1–18.6)	6.1 [±] 4.3 ^{de} (1.4–28.3)	5.9 [±] 3.4 ^d (1.6–21.5)	6.6 [±] 3.1 ^{dcb} (2.4–21.1)	6.3 [±] 2.8 ^{de} (1.5–13.3)	5.0 [±] 3.5 ^{de} (1.5–13.3)	8.5 [±] 3.9 ^{ba} (3.0–17.5)	5.4 [±] 2.8 ^{debb} (2.5–11.8)	9.8 [±] 4.5 ^a (2.2–23.9)	7.2 [±] 3.8 ^{debb} (1.6–15.9)	8.3 [±] 3.4 ^{dcb} (1.8–16.5)
#6	48.8 [±] 27.7 ^a (10.0–118.0)	41.4 [±] 22.7 ^{ba} (18.0–104.0)	19.6 [±] 12.8 ^d (4.0–63.0)	21.4 [±] 11.9 ^{dc} (7.0–61.0)	28.4 [±] 12.0 ^{ec} (8.0–83.0)	27.2 [±] 14.3 ^{edc} (6.0–70.0)	20.2 [±] 14.3 ^{edc} (7.0–53.0)	31.7 [±] 15.7 ^{eb} (13.0–69.0)	19.4 [±] 6.3 ^{edc} (9.0–32.0)	31.8 [±] 13.4 ^{eb} (8.0–55.0)	23.5 [±] 11.1 ^{edc} (8.0–53.0)	42.6 [±] 18 ^{ba} (7.0–80.0)
#7	7.0 [±] 1.1 ^a (5.1–10.5)	9.2 [±] 1.2 ^{de} (7.5–11.8)	9.6 [±] 1.2 ^{ef} (6.5–12.9)	8.9 [±] 1.0 ^f (6.8–11.5)	9.4 [±] 1.9 ^{ef} (6.6–15.6)	10.9 [±] 1.1 ^d (8.1–14.9)	8.8 [±] 1.0 ^{fec} (7.5–11.0)	9.9 [±] 1.5 ^e (7.1–13.5)	11.9 [±] 1.3 ^{eb} (10.5–15.3)	12.7 [±] 1.8 ^b (9.1–15.8)	11.4 [±] 1.5 ^d (8.0–14.3)	8.0 [±] 1.1 ^c (4.9–10.4)

#8	4.2±0.6 ^{ef} (2.6–5.6)	5.6±0.6 ^b (4.4–6.4)	4.6±0.7 ^{cd} (2.5–5.9)	3.9±0.6 ^{ef} (2.7–5.5)	4.3±0.6 ^{ef} (3.0–6.1)	7.6±0.7 ^a (5.8–9.1)	6.4±0.8 ^f (5.3–8.1)	6.6±0.7 ^f (5.1–8.0)	9.1±0.6 ^c (8.4–10.3)	8.5±0.9 ^e (6.4–11.0)	6.3±0.7 ^f (5.1–8.0)	4.9±0.8 ^d (3.3–6.1)
#9	0.6±0.1 ^a (0.3–0.9)	0.9±0.2 ^{bc} (0.6–1.2)	0.8±0.1 ^{cd} (0.4–1.0)	0.7±0.1 ^d (0.5–1.0)	0.9±0.2 ^{bc} (0.5–1.3)	0.8±0.2 ^{bc} (0.5–1.3)	1.1±0.2 ^{ab} (0.8–1.4)	0.9±0.2 ^{bc} (0.6–1.3)	1.2±0.1 ^e (1.0–1.4)	1.1±0.2 ^e (0.6–1.6)	1.1±0.2 ^e (0.6–1.5)	0.7±0.1 ^d (0.4–1.1)
#10	2.7±0.3 ^b (2.0–3.4)	3.8±0.5 ^{cd} (3.1–5.0)	3.3±0.4 ^f (2.5–4.2)	3±0.3 ^a (2.3–3.6)	3.5±0.4 ^{ef} (2.9–4.8)	3.6±0.3 ^{cd} (2.7–4.7)	4.3±0.5 ^{fg} (3.7–5.5)	4.2±0.3 ^{bc} (3.5–5.4)	4.4±0.3 ^{fg} (4.0–5.3)	4.3±0.6 ^{fg} (3.2–5.6)	4.6±0.5 ^{fg} (3.6–6.2)	3.3±0.4 ^f (2.6–4.3)
#11	2.3±0.3 ^{ef} (1.7–2.9)	2.8±0.3 ^{ef} (2.3–3.2)	2.3±0.3 ^{ef} (1.8–2.9)	2.1±0.2 ^b (1.7–2.7)	2.3±0.2 ^{ef} (1.7–2.9)	2.5±0.2 ^c (1.9–3.2)	3.0±0.2 ^{ef} (2.6–3.4)	2.8±0.2 ^f (2.4–3.3)	3.3±0.2 ^a (3.0–3.7)	3.0±0.3 ^{cd} (2.3–3.8)	3.0±0.3 ^d (2.4–3.9)	2.5±0.3 ^c (1.9–3.2)
#12	60.6±15.7 ^{hgf} (17.0–101.0)	78.3±29.6 ^{cd} (36.0–132.5)	55.0±18.7 ^{hgf} (14.5–100.5)	38.8±22.4 ^b (3.5–90.0)	52.2±17.9 ^b (21.0–104.0)	60.9±18.3 ^{hgf} (23.5–104.0)	72.6±29.0 ^{gfgd} (32.0–136.5)	93.5±28 ^{cc} (47.5–158.0)	132.1±20.1 ^a (103.5–163.5)	107.6±31.9 ^e (48.5–165.0)	87.5±22.9 ^e (54.5–152.0)	69.7±20.6 ^{dd} (37.0–136.0)
#13	1.3±0.4 ^{cd} (0.6–2.1)	1.9±0.4 ^{ef} (1.1–2.8)	0.8±0.6 ^a (0.1–2.4)	1.2±0.4 ^d (0.2–2.0)	1.7±0.6 ^{ef} (0.2–2.6)	1.6±0.6 ^{ef} (0.4–2.8)	2.0±0.3 ^{bc} (1.6–2.8)	2.6±0.4 ^{ef} (2.0–3.5)	2.7±0.3 ^{bc} (2.1–3.2)	2.4±0.8 ^{bc} (0.3–4.9)	2.8±0.5 ^e (1.3–4.3)	1.9±0.5 ^{ef} (0.4–2.7)
#14	2.6±0.3 ^d (1.9–3.4)	3.7±0.5 ^{ga} (2.8–4.8)	3.1±0.4 ^c (2.5–4.1)	2.7±0.3 ^d (2.2–3.4)	3.3±0.4 ^b (2.8–4.6)	3.5±0.3 ^{ba} (2.5–4.5)	4.0±0.4 ^{ef} (3.4–4.9)	3.9±0.4 ^{ef} (3.2–4.8)	4.3±0.4 ^{ef} (3.9–5.2)	4.2±0.5 ^{ef} (3.2–5.6)	4.4±0.5 ^e (3.5–5.5)	3.1±0.3 ^c (2.3–3.8)
#15	2.8±0.4 ^f (2.1–3.8)	3.9±0.5 ^{cd} (3.0–5.4)	3.2±0.4 ^a (2.6–4.2)	2.8±0.3 ^f (2.2–3.5)	3.5±0.4 ^e (2.5–4.5)	3.8±0.4 ^d (2.6–5.1)	4.3±0.5 ^{bc} (3.7–5.4)	4.5±0.4 ^{bc} (3.5–5.9)	5.0±0.4 ^{ef} (4.4–6.2)	4.8±0.6 ^{fg} (3.5–6.3)	4.8±0.5 ^{fg} (3.9–6.1)	3.5±0.5 ^e (2.7–5.3)
#16	1.1±0.1 ^e (0.9–1.5)	1.5±0.2 ^{ab} (1.2–1.8)	1.2±0.2 ^{ab} (0.8–1.6)	1.1±0.1 ^e (0.8–1.4)	1.3±0.2 ^d (0.9–1.6)	1.4±0.2 ^f (1.1–1.9)	1.4±0.2 ^{fd} (1.2–1.7)	1.4±0.1 ^f (1.0–1.6)	1.7±0.1 ^c (1.5–1.9)	1.6±0.2 ^{ca} (1.3–2.2)	1.6±0.2 ^c (1.2–2.1)	1.3±0.2 ^{db} (0.8–1.8)
#17	2.0±0.4 ^{ef} (1.3–2.9)	2.7±0.4 ^{fab} (1.9–3.6)	1.9±0.4 ^{ef} (0.8–2.9)	1.8±0.3 ^{ef} (1.3–2.6)	2.4±0.4 ^b (1.3–3.4)	2.7±0.5 ^f (1.8–3.9)	3.2±0.3 ^{ca} (2.7–3.8)	3.8±0.5 ^c (3.0–5.0)	3.7±0.5 ^{cd} (3.1–4.6)	3.4±0.7 ^{cd} (1.8–5.9)	3.7±0.4 ^{cd} (2.7–4.5)	2.7±0.5 ^f (1.7–3.8)
#18	62.6±24.8 ^{ef} (17.0–135.0)	81.9±31.9 ^{fgcd} (30.0–180.0)	63.8±28.5 ^{ef} (0.1–150.0)	49.8±19.6 ^e (15.0–102.0)	73.4±33.3 ^{fd} (16.0–202.0)	63.4±30.0 ^{ef} (28.0–180.0)	105.3±44.5 ^{cd} (53.0–207.0)	160.7±54.0 ^a (67.0–245.0)	78.3±17.4 ^{efcd} (41.0–98.0)	91.7±25.3 ^{cd} (57.0–160.0)	102.2±32.8 ^b (44.0–180.0)	76.7±28.2 ^{fd} (33.0–172.0)

**CAPÍTULO 3. ANÁLISE FILOGENÔMICA E GENÉTICA POPULACIONAL
UTILIZANDO GENOTIPAGEM POR SEQUENCIAMENTO DO COMPLEXO
Habenaria parviflora (ORCHIDACEAE), UM GRUPO CAMPESTRE DE
DIVERGÊNCIA RECENTE NA AMÉRICA DO SUL**

ANÁLISE FILOGENÔMICA E GENÉTICA POPULACIONAL UTILIZANDO GENOTIPAGEM POR SEQUENCIAMENTO DO COMPLEXO *Habenaria parviflora* (ORCHIDACEAE), UM GRUPO CAMPESTRE DE DIVERGÊNCIA RECENTE NA AMÉRICA DO SUL

Resumo

Neste trabalho analisamos a variação genética e relações filogenéticas do complexo *Habenaria parviflora*, um grupo de orquídeas terrícolas originado no Pleistoceno inferior, com ampla distribuição em vegetações campestres da América do Sul e uma taxonomia desafiadora. Para isso utilizamos uma amostragem abrangente da variação morfológica, ecológica, geográfica e taxonômica, para elucidar sua sistemática e identificar seus padrões biogeográficos em um contexto geral. Amostramos 196 indivíduos em 65 populações ao longo da sua distribuição (Cerrado, Mata Atlântica e Pampa), procurando amostrar os mesmos indivíduos utilizados em uma análise morfométrica prévia. Exploramos os dados gerados com genotipagem por sequenciamento mediante análises de componentes principais, de estruturação genética e filogenéticas usando métodos baseados em coalescência, parcimônia e máxima verossimilhança. De maneira geral os dados genéticos do complexo apresentaram congruência com os padrões morfológicos, permitindo o reconhecimento de seis taxons: *H. brachyphyton*, *H. caaguazensis*, *H. parviflora*, *H. paulensis*, *H. tucumanensis* comb. & stat. nov. e *H. ulei*. Foram identificados padrões de mistura genética que sugerem a possibilidade de hibridação e introgressão no complexo. Nossos resultados sugerem uma origem austral para o complexo, com uma diversificação específica prévia à sua expansão geográfica em direção ao norte. Algumas das descontinuidades genéticas coincidem com disjunções geográficas reportadas para outros grupos biológicos. No bioma Cerrado identificamos três disjunções que separam áreas diferenciadas circundadas por campo rupestre: Serra da Canastra e Espinhaço sul apontados por *H. paulensis*, e Centro-Oeste por *H. parviflora*. Para a Mata Atlântica identificamos duas disjunções, uma próxima da zona de falhas de Além Paraíba e alinhamento Guapiara para *H. parviflora* e *H. paulensis*, respectivamente.

Palavras chave: Ambientes úmidos, Cerrado, complexo de espécies, GBS, Mata Atlântica, Pampa, taxonomia, variação genética, vegetações campestres

Introdução

Há tempos a radiação de espécies tem sido usada como modelo para estudos evolutivos de especiação e adaptação (Darwin, 1859; Bramwell, 1972; Eliasson, 1974), sendo considerada a fonte da maior parte da biodiversidade da Terra (Rundell, & Price, 2009). Entretanto, a sistemática de grupos de radiação recente é bastante desafiadora. É comum observar grande sobreposição de caracteres morfológicos, e a análise molecular desses grupos também costuma ser metodologicamente complexa devido à baixa divergência entre elas, normalmente acompanhada pela ocorrência de fluxo gênico interespecífico e polimorfismo ancestral (Shaffer, & Thomson, 2007). Por outro lado, a realização de um tratamento sistemático robusto, preferencialmente sustentado por filogenias bem resolvidas, contribui imensamente na compreensão dos fatores ecológicos, ambientais e biogeográficos que influenciaram a história evolutiva de grupos muito diversos, especialmente os que incluem espécies de divergência recente (Givnish et al., 2015; Fernández-Mazuecos et al., 2020).

Orchidaceae é uma das famílias vegetais mais interessantes para o estudo de mecanismos de diversificação e radiação evolutiva (Givnish et al., 2015). Nesta família, *Habenaria* Willd. constitui o gênero mais diverso de orquídeas terrícolas, com cerca de 900 espécies (Govaerts, Dransfield, Zona, Hodel, & Henderson, 2020). O gênero apresenta uma distribuição cosmopolita, mas é melhor representado nas regiões tropicais e subtropicais (Cribb, 2001). As espécies neotropicais compõem uma linhagem que divergiu de um ancestral africano (Batista et al., 2013) há aproximadamente 11,7 Ma, durante o final do Mioceno (Claessens et al., 2019), e concentra cerca de um terço do total de espécies do gênero (Govaerts et al., 2020). Nos Neotrópicos, o maior centro de diversidade está no Brasil, com cerca de 169 espécies (Batista, Bianchetti, González-Tamayo, Figueroa, & Cribb, 2011a; Govaerts et al., 2020), principalmente em vegetações campestres.

As relações filogenéticas no gênero têm sido baseadas em poucas regiões nucleares e plastidiais, obtidas mediante sequenciamento Sanger (Batista et al., 2013; Jin et al., 2017; Ngugi et al., 2020). Utilizando apenas um marcador nuclear (ITS) e um plastidial (parte do gene *matK*), Batista et al. (2013) recuperaram a monofilia e o arcabouço do clado Neotropical, formado por 21 subgrupos principais. Porém, naquele estudo foi obtido um baixo polimorfismo nucleotídico, refletido na baixa resolução e baixo suporte entre os subgrupos e dentro destes. De uma maneira geral, esse resultado foi mantido em estudos posteriores focados em grupos específicos, mas com uma maior amostragem de caracteres (Pedrón et al., 2014, Batista, Reis, Leite, & Bianchetti, 2018; CAPÍTULO 1), indicando a necessidade de um maior número de

caracteres informativos para resolver as relações filogenéticas entre as espécies neotropicais do gênero.

No clado Neotropical do gênero, um dos grupos de taxonomia mais difícil é o complexo *H. parviflora* Lindl., devido à grande sobreposição morfológica observada entre suas espécies, à sua amplitude geográfica e ecológica (Batista et al., 2011a; Batista, Bianchetti, González-Tamayo, Figueroa, & Cribb, 2011b; Cruz-Lustre, Batista, Radins, González, & Borba, 2020 - CAPÍTULO 2; CAPÍTULO 1), associadas à sua origem recente no Pleistoceno inferior (~0,86 Ma; Claessens et al., 2019). O grupo ocorre em vegetações campestres da América do Sul (Batista et al., 2011a, b; Cruz-Lustre et al., 2020 - CAPÍTULO 2), geralmente em solos com alta umidade e principalmente nos biomas Cerrado, Mata Atlântica e Pampa. A maior diversidade do complexo está no sul e sudeste do Brasil, mas sua distribuição se estende da Colômbia, Venezuela e Escudo das Guianas (incluindo a Serra dos Surucucús, Roraima, Brasil) à vertente atlântica, e desde o nordeste brasileiro (Serra de Itabaiana, Sergipe; Monteiro, Silva, Santos, Nascimento-Júnior, & Prata, 2012) até a Argentina (Sistema Tandilia), incluindo o Uruguai e Paraguai (Sanguinetti, 2015). Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, *H. parviflora* e táxons relacionados são particularmente frequentes, correspondendo a 19% do total de registros em herbário do gênero para essas regiões (speciesLink, 2020). O grupo compreende plantas sazonais que florescem principalmente durante o período chuvoso e perdem a porção epígea durante os meses secos, sobrevivendo a partir de uma túbera. As flores são fragrantas, produzem néctar e são polinizadas por mariposas Pyralidae e mosquitos Tipulidae (Singer, 2001).

O complexo *H. parviflora* foi revisado unicamente por Garay (1976), que aceitou quatro espécies, com base principalmente em caracteres florais: *H. parviflora*, *H. brachyphyton* Schltr., *H. paulensis* Porsch e *H. uruguayensis* Garay. Batista et al. (2011a, b) sugeriram uma similaridade morfológica de *H. bahiensis* Schltr., *H. edwallii* Cogn. e *H. ulei* Cogn. com *H. parviflora*, o que foi corroborado em análises filogenéticas posteriores (Batista et al., 2013; CAPÍTULO 1). No CAPÍTULO 1, mostramos pela primeira vez que as espécies do complexo (incluindo *H. ulei* e *H. gollmeri* Schltr.) formam um clado com alto suporte e que, junto com *H. abscondita* sp.nov. (como *H. bahiensis* em Batista et al., 2013) e *H. edwallii*, formam a redefinida *Habenaria* sect. *Micranthae*. Recentemente, Cruz Lustre et al. (2020 - CAPÍTULO 2) realizaram análises morfométricas do complexo *H. parviflora* a partir de uma amostragem populacional ampla, e reconheceram *H. paulensis* e *H. ulei* mediante uma associação de caracteres. Porém, devido à sobreposição de diversos grupos morfológicos variantes de *H. parviflora sensu lato* (lá e aqui designados como morfotipos) não foi possível a identificação de mais grupos que pudessem claramente ser associados a espécies.

Com o avanço no desenvolvimento das plataformas de sequenciamento massivo paralelo e das ferramentas bioinformáticas para a análise de grandes quantidades de dados, a abordagem genômica na análise da variação dos organismos tem se tornado mais frequente. Esta abordagem, além de gerar uma maior quantidade de dados informativos, permite propor hipóteses melhor sustentadas, uma vez que explora várias regiões do genoma, minimizando os vieses nas inferências das relações entre espécies proximamente relacionadas (Turchetto-Zolet, Pinheiro, Salgueiro, & Palma Silva, 2013; Hohenlohe et al., 2010). Métodos de sequenciamento que envolvem a redução na representação do genoma, como os que digerem o DNA com enzimas de restrição (*e.g.*, metodologia GBS - *genotyping-by-sequencing*, Elshire et al., 2011; Poland, Brown, Sorrells, & Jannink, 2012), possibilitam um melhor custo/benefício para uma análise genômica robusta de várias espécies e indivíduos simultaneamente. Vários estudos têm mostrado a utilidade desta metodologia para análises filogenéticas em orquídeas (*e.g.*, *Vanilla*, Hu et al., 2018; *Ophrys*, Cozzolino, Scopece, Roma, & Schlüter, 2019; *Cycnoches*, Pérez-Escobar et al., 2020) e em outras famílias de angiospermas (*e.g.*, Poaceae, Anderson, Thiele, Krauss, & Barrett, 2017; Rubiaceae, Hamon et al., 2017; Plantaginaceae, Fernández-Mazuecos et al., 2018; Cistaceae, Martín-Hernanz et al., 2019; Fabaceae, Donkpegan, Doucet, Hardy, Heuertz, & Piñeiro, 2020).

Os estudos filogenéticos com ampla amostragem genômica e populacional focados em grupos representativos podem aportar informação sobre padrões biogeográficos replicados por diferentes grupos (Turchetto-Zolet et al., 2013). Na América do Sul, os estudos com plantas não modelo de ambientes campestres, particularmente herbáceas, ainda são escassos. Neste trabalho estudamos o complexo *H. parviflora* com o uso de dados genômicos gerados por genotipagem por sequenciamento (GBS) e uma ampla amostragem populacional, com os seguintes objetivos: 1) inferir as relações filogenéticas do complexo *H. parviflora*, 2) comparar os padrões genéticos deste estudo com os padrões morfológicos de Cruz-Lustre et al. (2020 - CAPÍTULO 2), 3) subsidiar uma revisão taxonômica do complexo através da delimitação de táxons sustentados por dados morfológicos e genéticos e 4) identificar os padrões biogeográficos gerais do grupo e usá-lo como nosso modelo para contribuir no entendimento dos padrões de evolução e diversificação das vegetações campestres do centro-sul da América do Sul.

Material e métodos

Amostragem

Analizamos 196 indivíduos pertencentes a 65 populações, abrangendo a variação morfológica, ecológica, geográfica e taxonômica do complexo *H. parviflora* (Fig. 1; Tabela 1). A classificação das populações de *H. parviflora sensu lato* em 12 morfotipos [brachyphyton (BR), caaguazuensis (CG), edentula (ED), parviflora (PV), parviflora2 (PV2), paulensis (PL), paulensis2 (PL2), tucumanensis (TU), ulei (UL), ulei2 (UL2), ulei3 (UL3) e uruguayensis (UR)] seguiu a análise morfométrica de Cruz-Lustre et al. (2020 - CAPÍTULO 2) e, quando possível, utilizamos os mesmos indivíduos daquele estudo. Veja Cruz-Lustre et al. (2020 - CAPÍTULO 2) para detalhamento do desenho amostral realizado. Em geral, amostramos cerca de quatro a seis indivíduos por população para UL2, BR, TU, UL3, CG, UL e UR. Para os morfotipos ED, PV, PV2, PL e PL2, que formaram parte de grupos coesos nas análises genômicas preliminares (resultados não apresentados), realizamos uma amostragem menor (cerca de dois indivíduos por população), embora o número de populações amostradas seja geralmente maior. Incluímos as espécies restantes de *H. sect. Micranthae* (veja CAPÍTULO 1), bem como *H. secunda* Lindl. e *H. leucosantha* Barb.Rodr., como grupos externos, de acordo com Batista et al. (2013), totalizando 203 amostras. *Habenaria gollmeri* não foi incluída devido à indisponibilidade de material. Na coleta de amostras, tentamos cobrir toda a abrangência de cada população, e observamos um espaçamento mínimo de 30 cm entre indivíduos para evitar a amostragem de clones. Os vouchers de cada população foram depositados no herbário BHCB, da Universidade Federal de Minas Gerais (Tabela 1; Fig. 1).

Métodos moleculares

O DNA genômico total de cada indivíduo foi extraído a partir de tecido desidratado em sílica gel usando o protocolo de Doyle, & Doyle (1987) com algumas modificações. O DNA extraído foi digerido com RNase A, precipitado com etanol e quantificado com QubitTM Assays (Invitrogen). A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1%. Aproximadamente 150 ng de cada amostra foram enviados ao Centro de Biotecnologia da Universidade de Wisconsin-Madison para a otimização da metodologia GBS (Elshire et al., 2011; Poland et al., 2012), construção da biblioteca genômica e sequenciamento massivo de nova geração. A fragmentação do DNA foi realizada com as enzimas *NsiI/MspI*, e a normalização das amostras foi realizada após o passo de PCR. Ao todo foram preparadas três bibliotecas genômicas com 95 indivíduos

cada, identificados com *barcodes* específicos, dos quais foram selecionados 203 indivíduos para a realização desse estudo (segundo critérios descritos acima). O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina NovaSeq6000 em conjunto com outros projetos do Centro de Biotecnologia, objetivando gerar 250 milhões de *paired-end reads* de 150 pb para cada biblioteca.

Processamento dos dados genômicos

As análises foram realizadas no servidor Sagarana HPC Cluster (CEPAD-ICB-UFMG) com vários passos para garantir o controle de qualidade dos dados genômicos. A qualidade do sequenciamento foi analisada com FastQC 0.11.7 (Andrews, 2018). O *software* Trimmomatic-0.38 (Bolger, Lohse, & Usadel, 2014) foi utilizado para remover os adaptadores Illumina das *reads* e para padronizar o tamanho dos fragmentos a 50 pb, de forma a utilizar o máximo possível de *reads* geradas no sequenciamento (tamanho máximo observado para cerca de 20% das *reads* geradas). Os dados genômicos foram processados com Stacks 2.41 com o pipeline para análises *de novo* (Catchen, Amores, Hohenlohe, Cresko, & Postlethwait, 2011; Rochette, Rivera-Colón, & Catchen, 2019). As *reads* de cada indivíduo foram identificadas com *process_radtags* a partir de sequências únicas (*barcodes*) utilizadas na montagem da biblioteca e apenas indivíduos com um mínimo de 1,5 milhão de *reads* foram incluídos nas análises posteriores. A seleção dos melhores parâmetros para a identificação dos SNPs bialélicos foi realizada de acordo com Paris, Stevens, & Catchen (2017; Fig. S1). Os *loci* de cada amostra foram identificados com *ustacks*, usando uma profundidade de cobertura mínima de três *reads* por alelo ($m = 3$) e com um máximo de quatro nucleotídeos de diferença entre dois alelos ($M = 4$). Obtivemos no total 1.057.356.455 *reads* com média de $3.887.339 \pm 1.200.092$ *reads* por indivíduo e uma cobertura média de 12,61x. Os *loci* de todas as amostras foram considerados para formar o conjunto de *loci* consenso (catálogo) com *cstacks*, observando um máximo de cinco nucleotídeos de diferença entre *loci* de indivíduos diferentes ($n = 5$). Os *loci* de cada indivíduo foram comparados contra o catálogo com *sstacks*, utilizamos *tsv2bam* para reordenar os dados genômicos por *locus* e incorporar a informação das *reads* reversas e construímos *contigs paired-end* com *gstacks*. Analisamos as amostras no *populations* de acordo com sua procedência geográfica, mantendo *loci* presentes em pelo menos duas populações, com frequência mínima do alelo menor = 0,02 e máxima heterozigosidade observada = 0,5. Para eliminar sítios altamente polimórficos possivelmente devidos a erros de sequenciamento, excluimos *loci* com valores de theta superiores a 95% do quantil da variabilidade observada

com um script customizado em R 4.0.2 (R Core Team, 2020; Thomaz, Malabarba, & Knowles, 2017; Fig. S2).

Utilizamos os resultados do PLINK 1.9 (Purcell et al., 2007; Chang et al., 2015) para manter apenas os SNPs com um máximo de 25% e de 40% de dados faltantes, devido à sensibilidade de algumas análises à quantidade de dados faltantes.

Estruturação genética do complexo *H. parviflora*

Exploramos a estrutura genética dos dados mediante duas abordagens, uma usando análise de componentes principais (PCA) e outra através de um enfoque bayesiano. Para ambas as análises utilizamos matrizes com até 25% de dados faltantes, e apenas incluindo os indivíduos do complexo *H. parviflora* (N = 196). A inclusão dos grupos externos aumentou a variância da matriz e separou as espécies geneticamente distantes, resultando pouco informativa para analisar as relações dentro do complexo (resultados não apresentados). A PCA consegue identificar a estrutura genética nos dados sem assumir um modelo genético das populações subjacentes (Jombart, 2008). Devido à capacidade desta ferramenta para analisar uma grande quantidade de dados, utilizamos todos os SNPs dos *loci*, num total de 61.405 SNPs. A análise foi realizada com o pacote adegenet 2.1.2 (Jombart, 2008) em R 4.0.2 (R Core Team, 2020) e os dados faltantes foram substituídos pela frequência média dos alelos da população.

Realizamos uma análise bayesiana para identificar os grupos genéticos (K), através do software Structure_threader 1.3.0 (Pina-Martins, Silva, Fino, & Paulo, 2017, 2017), o qual executa em paralelo o programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000). Nesta análise utilizamos um SNP por *locus*, resultando no total 17.587 SNPs. Testamos grupos de K = 1 a K = 12, com 10 réplicas independentes para cada valor de K, 100.000 gerações de burn-in e 500.000 gerações de MCMC. Utilizamos um modelo que assume mistura e correlação das frequências alélicas entre populações. Analisamos a convergência das corridas no Tracer (Rambaut, Drummond, Xie, Baele, & Suchard, 2018). Inferimos o melhor valor de K com STRUCTURE HARVESTER (Earl, & vonHoldt, 2012), a partir dos plots de probabilidade média e do valor de delta K proposto por Evanno, Regnaut, & Goudet (2005). A representação gráfica dos resultados foi realizada com Clumpak (Kopelman, Mayzel, Jakobsson, Rosenberg, & Mayrose, 2015).

Relações filogenéticas

Inferimos as relações filogenéticas do complexo *H. parviflora* incluindo nas análises os grupos externos (N = 203). Nestas análises utilizamos uma matriz com até 40% de dados faltantes e um SNP por *locus*, resultando no total 28.775 SNPs. Utilizamos três abordagens: parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML) e um método baseado em coalescência (SVDQuartets) para comparar os resultados entre as análises. Realizamos a análise de parcimônia com PAUP* 4.0 (Swofford, 2003), mediante buscas heurísticas e 1.000 réplicas, adição aleatória de táxons nas árvores iniciais e o algoritmo *tree bisection and reconnection* (TBR) para troca de ramos, salvando até 10 árvores mais parcimoniosas (AMP). O suporte dos clados foi avaliado com 1.000 réplicas bootstrap, cada uma realizada com os parâmetros para buscas heurísticas acima mencionados, salvando até 15 árvores mais curtas por réplica. Realizamos a análise de máxima verossimilhança com RAxML no portal CIPRES (Miller, Pfeiffer, & Schwartz, 2010) com a matriz concatenada, sob o modelo GTRCAT. Avaliamos o suporte dos clados com 1.000 réplicas bootstrap. Adicionalmente, utilizamos SVDQuartets (Chifman, & Kubatko, 2014), um programa implementado em PAUP* 4.0 (Swofford, 2003) que utiliza um modelo coalescente para estimar as relações filogenéticas diretamente dos dados, permitindo incorporar todas as fontes de variabilidade (Chifman, & Kubatko, 2014). A análise consistiu de uma amostragem exaustiva de quartetos e utilizou o algoritmo *Quartet FM* (QFM; Reaz, Bayzid, & Rahman, 2014) para amalgamação destes. Devido ao alto custo computacional requerido por SVDQuartets, o suporte dos clados foi estimado com 100 réplicas bootstrap. As árvores foram visualizadas e editadas utilizando o FigTree 1.4.3 (Rambaut, 2016).

Resultados

Variação genômica ao longo do complexo *H. parviflora*

Os quatro primeiros eixos do PCA explicam 23,05% da variação genômica no complexo *H. parviflora* (Fig. 2). No eixo 1, os indivíduos pertencentes aos morfotipos ED, PL e PL2 (com exceção de dois indivíduos) se separam do restante das populações e morfotipos, com grande sobreposição entre eles. Com exceção da população UL2ur, os morfotipos UL2 e UL3 se sobrepõem, e se separam do restante, exceto da população PL2ag, que apresenta alta sobreposição com a população UL3ag. Neste eixo, a única população de UL se sobrepõe apenas com populações de CG e UR, mas se separando deles no eixo 3. Adicionalmente o eixo 1 mostra a posição inesperada dos indivíduos BRin_08, CGpd_39, PL2pd_40 e PVbe_02 em relação ao

restante das suas respectivas populações.

No eixo 2, as 10 populações de PV e as duas de PV2 se separam de todas os demais, com exceção das populações UL2ur e URcv (Fig. 2a). Este eixo separa também as populações URca, URcd e URmo das populações restantes do morfotipo UR. O eixo 3 separa TU de todas as populações de BR e UR, que se sobrepujam nos eixos 1 e 2 (Fig. 2b). Por sua parte, o conjunto de morfotipos BR e UR se separam dos restantes, apenas se sobrepondo com morfotipos dos quais haviam se separado no eixo 2 (com exceção de CGml). Este eixo separa também o morfotipo CG de todos os demais, com raras exceções. O eixo 4 mostra a separação das populações PVga, PVgo e PVms das demais (Fig. 2b).

Relações filogenéticas em *H. sect. Micranthae*

As topologias recuperadas pelas três análises, MP (Fig. S3), ML (Fig. S4) e coalescência (Fig. 3) foram congruentes de maneira geral. Como a maioria das incongruências apresentaram baixo suporte entre os diferentes métodos de análise, selecionamos a árvore de coalescência do SVDQuartets para apresentação e discussão dos resultados (Fig. 3). Inicialmente, os indivíduos com posicionamento inesperado em relação às respectivas populações no PCA (BRin_08, CGpd_39, PL2pd_40 e PVbe_02) foram excluídos da análise devido à possibilidade de serem híbridos. Uma vez que a exclusão deles não causou alterações na topologia (resultados não apresentados), eles foram incluídos nas análises apresentadas. *Habenaria* sect. *Micranthae* (bootstrap; BS 100%) foi recuperada com *H. abscondita* como grupo irmão do restante da seção, seguida de *H. edwallii* e o complexo *H. parviflora*, que foi recuperado como monofilético com alto suporte (BS 100%). No entanto, o suporte para a posição de *H. edwallii* foi muito baixo (BS 54%). Dentro do complexo foram destacados 11 clados, a maioria com alto suporte (BS $\geq 89\%$), referidos aqui com o nome do morfotipo predominante. Oito deles, Tucumanensis, Brachyphyton, Ulei, Parviflora, Caaguazuensis B, Ulei3 A, Ulei2 e Paulensis, compreenderam a maioria das populações de um ou mais morfotipos. Diferentemente, Caaguazuensis A, Uruguayensis e Ulei3 B foram recuperados separados dos clados com indivíduos morfológicamente similares e incluíram apenas uma população, exceto Uruguayensis que incluiu três populações.

O clado Caaguazuensis A (BS 64%), formado por dois dos três indivíduos da população CGcs, foi recuperado como irmão do restante do complexo (BS 100%), o qual formou dois grandes clados. O primeiro deles incluiu o clado Tucumanensis como grupo irmão do clado Brachyphyton (BS 72%). O clado Tucumanensis (BS 100%) incluiu as três populações do

morfotipo TU. O clado Brachyphyton (BS 89%) conteve as sete populações do morfotipo BR, uma parte dos indivíduos do morfotipo UR e o único indivíduo amostrado da população CGml. Apenas o indivíduo BRin_08 não foi incluído neste clado, sendo recuperado como irmão do clado UL3 B. As populações do morfotipo BR foram as mais próximas entre si, apresentando comprimentos dos ramos curtos e baixa resolução interna, com poucos subclados bem suportados (Fig. S4b).

O segundo grande clado compreendeu uma grade formada pelos clados Ulei, Parviflora e Uruguayensis, seguido do clado Caaguazuensis B-Ulei3 A (BS 100%) e finalmente os clados Ulei2 e Ulei3 B encadeados sucessivamente ao clado Paulensis. O clado Ulei (BS 100%) incluiu todos os indivíduos da única população do morfotipo UL (ULur). O clado Parviflora (BS 100%) incluiu todas as populações dos morfotipos PV e PV2, bem como as populações URcv e UL2ur. Este clado se subdividiu em dois subclados fortemente suportados (BS 100%): o subclado ‘a’ compreendeu populações do Distrito Federal e Goiás; o subclado ‘b’ compreendeu as populações restantes. Apenas o indivíduo PVbe_02 não fez parte deste clado e foi recuperado em uma posição basal no clado Paulensis (BS 100%). O clado Uruguayensis (BS 70%) conteve a população URcd e os indivíduos das populações URca e URmo que não foram incluídas no clado Brachyphyton. O clado Caaguazuensis B (BS 100%) incluiu a maioria dos indivíduos do morfotipo CG e o indivíduo PL2pd_40. Por outro lado, não incluiu o indivíduo CGpd_39, que foi recuperado na base do clado Paulensis (BS 100%). O clado Ulei3 A (BS 100%) incluiu três das quatro populações do morfotipo Ulei3 e a população PL2ag. O clado Ulei2 abrangeu as populações do morfotipo UL2, exceto a população UL2ur, e o indivíduo UL3al_02. Apenas o indivíduo UL2it_02 não pertenceu a este clado, sendo recuperado como irmão do clado Ulei3 B, formado somente pela população UL3ap (BS 97%). Finalmente, o clado Paulensis (BS 100%) compreendeu as populações dos morfotipos ED, PL e PL2; exceto a população PL2ag e o indivíduo PL2pd_40.

As principais diferenças nas árvores de MP e RAxML em relação à de SVDQuartets foram o encadeamento dos indivíduos do clado Caaguazuensis A na base do segundo grande clado do complexo (BS 97% MP; BS 100% ML); a posição do clado Tucumanensis como irmão do restante do complexo (BS 100% MP e ML); e a relação dos indivíduos BRin_08, PVbe_02 e UL2it_02 com as populações PLin (BS 100%), PL2be (BS 100%) e UL2it (BS 100%), respectivamente. A análise de ML diferiu de SVDQuartets e MP ao segregar o subclado ‘a’ do clado Parviflora (BS 98%); suportar fortemente a relação de grupo irmão entre os clados Ulei e Parviflora (BS 98%); e recuperar o clado Caaguazuensis B em uma posição mais basal do segundo grande clado do complexo (BS 70%).

Estruturação genética no complexo *H. parviflora*

A análise bayesiana implementada no STRUCTURE identificou dois grupos genéticos principais, com algumas populações apresentando proporção variável de mistura entre os grupos ($K = 2$; Fig. 4). O grupo I incluiu as populações dos morfotipos ED, PL, PL2, exceto a população PL2ag e o indivíduo PL2pd_40. O grupo II congregou as populações dos morfotipos BR, UR e a população CGml, bem como as populações restantes, que foram designadas a novos grupos ao incrementar o valor de K . As populações de UL3 e UL2 apresentaram proporções de mistura dos dois grupos genéticos, com predominância do Grupo II. Uma vez que tem sido reportada uma propensão na escolha de $K = 2$ (Cullingham et al., 2020), resolvemos examinar alguns outros valores de K que poderiam ser informativos. É possível observar outro pico para $K = 4$ no gráfico de ΔK , sugerindo subestruturação (Fig. 4b). Considerando $K = 4$, foram separadas no grupo III as populações dos morfotipos PV, PV2 e as populações URcv e UL2ur (ancestralidade >50%) e no grupo IV as populações de CG, UL2, UL3 e as populações de PV do Centro-Oeste. É importante notar que à medida que mais grupos foram identificados até $K = 10$ (Fig. 4c), consistentemente os grupos previamente identificados foram subdivididos na formação de novos grupos, com certa correspondência entre novos grupos e morfotipos (resultados não apresentados). Entre eles, houve diferenciação nas populações do morfotipo TU (grupo VII), UL (grupo VIII) e UL3+UL2 (grupo X). Valores de K maiores que 10 não foram informativos uma vez que não separaram indivíduos com ancestralidade predominantemente pertencente ao novo grupo. Contudo, à exceção das populações de grupos genéticos exclusivos, algumas populações inteiras (*e.g.*, UL3ap, UL3sa, UL3ag, PL2ag e ULur) ou conjuntos de indivíduos (*e.g.*, URcd, URca e URmo) mostraram consistentemente uma mistura com proporções similares, ao invés de se separarem como pool gênico próprio. Este padrão de mistura foi observado a partir do $K = 2$ e se manteve nos subsequentes. Para explorar a estruturação dessas populações realizamos análises excluindo os grupos mais diferenciados (I e III; resultados não apresentados), porém o mesmo padrão foi mantido.

Adicionalmente, a análise revelou que alguns indivíduos apresentam alta proporção de ancestralidade mista (Fig. 4c): PVbe_02 (grupos III e I), BRin_08 (grupos II e I), CGpd_39 (grupos I e IV). O resultado para o indivíduo PL2pd_40 é notório, já que ele foi morfológicamente classificado como morfotipo PL2 (o que corresponderia ao grupo I) mas seu genótipo é predominantemente pertencente ao grupo IV.

Discussão

Este trabalho constitui um dos primeiros estudos que analisa com dados genômicos e amostragem populacional (196 indivíduos e 65 populações) a variação genética e relações evolutivas de um complexo de espécies Neotropical de ervas de vegetação campestre, com divergência recente e taxonomia intrincada. Nossos resultados evidenciaram linhagens congruentes com a morfologia e taxonomia do grupo, porém também revelaram padrões de mistura genética, desconhecidos para o gênero, que podem estar associados à complexidade morfológica e genética do grupo.

Evidência genômica vs morfológica e implicações taxonômicas

Os dados genômicos corroboraram que as duas espécies morfológicamente mais diferenciadas de *Habenaria* sect. *Micranthae* amostradas neste trabalho, *H. abscondita* sp. nov. (CAPÍTULO 1) e *H. edwalli*, não pertencem ao complexo *H. parviflora*. No que concerne ao complexo, os resultados foram altamente congruentes entre as análises, porém revelaram padrões de sobreposição, encadeamento e ascendência mista. Os resultados também mostraram que algumas populações foram classificadas em morfotipos inadequados no trabalho de Cruz-Lustre et al. (2020 - CAPÍTULO 2). Todas as incongruências entre dados genéticos e morfológicos foram revisadas *a posteriori* e as populações CGml, UL2ur, PL2ag e URcv foram reclassificadas como pertencentes aos morfotipos BR, PV, UL3 e PV, respectivamente. Os grupos recuperados, de modo geral, mostraram congruência com os padrões morfológicos encontrados por Cruz-Lustre et al. (2020 - CAPÍTULO 2), permitindo o reconhecimento de seis táxons discutidos a seguir.

Nossos resultados diferem do estudo de Cruz-Lustre et al. (2020 - CAPÍTULO 2), onde o morfotipo PV foi recuperado associado a UL e UL2, e o morfotipo PV2 associado a TU. O presente trabalho confirma a classificação inicial que identificou PV2 como uma variante morfológica associado a PV, pelo que ambos os morfotipos devem ser reconhecidos no mesmo táxon, *H. parviflora*. Cabe ressaltar que as populações correspondentes aos dois sítios da espécie, tanto o lectótipo proveniente da Bahia (Salzmann s.n.) como o sítio remanescente proveniente do Rio de Janeiro (Martius s.n.) foram recuperadas no mesmo clado (subclado b). A possibilidade de alguma associação entre a diferenciação genética de PV2 (ver Fig. 4c) com sua diferenciação morfológica é pouco provável, dado que populações com padrão genético similar, mas morfologia variada (PVti e URcv) formam parte do mesmo subgrupo (ver Fig. 3). Por outro lado, a diferenciação genética das populações amostradas da região Centro-Oeste

(Goiás e Distrito Federal) não justifica uma possível separação taxonômica, dado que morfologicamente estão intercaladas com as populações restantes do grupo (Cruz-Lustre et al., 2020 - CAPÍTULO 2).

Os dados genéticos concordam com Cruz-Lustre et al. (2020 - CAPÍTULO 2) em estabelecer que os morfotipos ED, PL e PL2 devem ser reconhecidos como uma única unidade, *H. paulensis*, corroborando a sinonimização de *H. edentula* sob esta espécie (Garay, 1976). Os morfotipos UL e TU apresentaram congruência total entre ambas as fontes de evidência pelo que é possível reconhecê-los como espécies. O morfotipo UL corresponde exatamente à circunscrição original de *H. ulei* (Cogniaux, 1893), enquanto o morfotipo TU está associado a *H. montevidensis* var. *tucumanensis* Griseb., que poderia ser elevado a nível específico.

As populações do morfotipo BR formaram um grupo coeso, mas inseparável da maioria das populações de UR pelo que é possível reconhecê-los como uma espécie, *H. brachyphyton*, sendo o nome mais recente (*H. uruguayensis*) um sinônimo. Estes resultados mostram que tanto a separação de *H. uruguayensis* como espécie distinta (Garay, 1976), quanto a sinonimização de *H. uruguayensis* sob *H. parviflora* (Sanguinetti, 2015), não tem sustentação genética nem morfológica (Cruz-Lustre et al., 2020 - CAPÍTULO 2). No entanto, algumas populações e indivíduos do morfotipo UR formam um pequeno clado separado do restante (Clado Uruguayensis). O reconhecimento desse clado como uma espécie distinta não é justificável, uma vez que não há diferenças morfológicas, fenológicas, geográficas ou ecológicas que sustentem sua separação. Atualmente estamos investigando a possível origem híbrida e ocorrência de introgressão nas populações do clado Uruguayensis, que podem ser responsáveis por esse padrão.

O morfotipo CG também pode ser reconhecido como um táxon, para o qual existe disponível o nome *H. caaguazuensis*, tratado até o momento como um sinônimo de *H. parviflora* (Garay, 1976). A separação de alguns indivíduos da população CGCs foi inesperada dado que a população é morfologicamente uniforme, mas que pode ser explicada pelo padrão de mistura genética observado nesses indivíduos. Interessantemente, este morfotipo está mais proximamente relacionado ao clado UL3 A do que de BR, como indicado por Cruz-Lustre et al. (2020 - CAPÍTULO 2). As discrepâncias entre os padrões morfológicos e relações filogenéticas dos clados UL3A, UL2 e UL3B não permitem inferências mais embasadas sobre seus status taxonômicos. Com base nas análises filogenéticas e de maneira similar ao observado no complexo da *H. repens* (Lau, Batista, Massensini Junior, Whitten, & Borba, 2021), hipotetizamos que estes clados podem constituir uma espécie afilética (Ebach, & Williams, 2010). Neste caso, ela corresponderia a uma metaespécie (Donoghue, 1985; Archibald, 1994)

progenitora de *H. caaguazuensis* e de *H. paulensis*. Entretanto, estudos mais detalhados estão em desenvolvimento para entender melhor a origem desses clados e suas implicações taxonômicas.

Pabst (1957) e Garay (1976) sugeriram que as espécies do complexo *H. parviflora* poderiam corresponder a ecótipos. No entanto, nossos resultados indicaram que as linhagens possuem uma base genética e nenhuma associação direta com tipos de habitat ou condições ecológicas. Em termos taxonômicos, uma alternativa possível é o reconhecimento de um único táxon no complexo, o que representaria uma grande praticidade em termos de identificação. Embora nossos resultados não sejam inequívocos quanto a classificação dos táxons do complexo, essa alternativa não nos parece a mais adequada uma vez que não representa a diversidade morfológica, genética e, conseqüentemente, a evolução do complexo.

Para grupos com divergência recente, o esclarecimento das relações filogenéticas e diferenciação morfológica incipiente é crucial para a delimitação taxonômica. Neste trabalho bem como em outros grupos (*e.g.*, Cozzolino et al., 2019) o uso de um maior número de caracteres permitiu resolver em uma escala mais fina as relações dentro do complexo. Entretanto, os ramos curtos nas árvores em grupos com radiações recentes (*e.g.*, Batista et al., 2013) sugerem que outros processos como separação incompleta de linhagens podem estar obscurecendo os limites entre táxons proximalmente relacionados. Uma das metodologias empregadas na análise filogenética desse trabalho é baseada na teoria da coalescência (SVDQuartets, Chifman, & Kubatko, 2014), sendo desenvolvida especificamente para lidar com as incongruências entre árvores gênicas e árvores de espécies, comumente observadas em diferentes cenários evolutivos. Entretanto, essa metodologia pode ainda não ser a mais adequada quando os níveis de separação incompleta de linhagens são muito altos (Chou et al., 2015), o que não pode ser descartado no caso do complexo *H. parviflora*.

A formação de híbridos naturais entre espécies simpátricas proximalmente relacionadas é um fenômeno comum em Orchidinae (Cozzolino, Nardella, Impagliazzo, Widmer, & Lexer, 2006; Wallace, 2006; Cortis et al., 2009; Ren, Cafasso, Rosaria, Lumaga, & Cozzolino, 2014; Johnson, 2018), embora não existam registros de híbridos naturais em *Habenaria* (Govaerts et al., 2020). A detecção de indivíduos com ascendência mista provenientes de localidades com espécies simpátricas (*e.g.*, Palmas-PR, Benedito Novo-SC e Canelones-UY) e padrões de mistura em populações inteiras indicam uma alta possibilidade de hibridação e introgressão dentro do complexo. As espécies simpátricas deste complexo geralmente apresentam floração sincrônica e não têm barreiras mecânicas evidentes no ginostêmio que limitem a polinização interespecífica. Considerando que estas linhagens são proximalmente relacionadas e

presumivelmente com pouca variação genética, a presença de barreiras reprodutivas parciais, reportadas para outras orquídeas de divergência recente (Borba, Semir, & Shepherd, 2001; Pinheiro et al., 2013) poderiam favorecer a hibridação. Atualmente, estamos desenvolvendo estudos com o objetivo de testar esta hipótese.

Padrões biogeográficos

As relações filogenéticas recuperadas neste estudo indicam uma estruturação geográfica no sentido sul-norte, tanto do complexo *H. parviflora* como da maioria das linhagens. *Habenaria tucumanensis* comb. & stat. nov. e *Habenaria brachyphyton* e populações do complexo que divergiram mais cedo em todas as análises filogenéticas são provenientes do Uruguai, Argentina e da região Sul do Brasil, sugerindo uma origem austral e diversificação local para o grupo seguida de uma posterior expansão em direção norte. Este padrão é coincidente com o observado para outros grupos de plantas (*e.g.*, *Passiflora elegans*, Lorenz-Lemke et al., 2005), e animais (*e.g.*, abelhas, Batalha-Filho, Waldschmidt, Campos, Tavares, & Fernandes-Salomão, 2010; anuros, Thomé et al., 2010). De modo correspondente, o complexo apresenta sua maior riqueza e abundância no sul do Brasil, nos biomas Mata Atlântica e Pampa, e é menos comum no Cerrado, onde clados mais derivados são encontrados. Esses resultados sugerem uma ocupação mais recente do Cerrado pelo complexo, corroborando a contínua transição para o Cerrado ao longo do tempo geológico, como observado em outros táxons vegetais que apresentam espécies de savana como derivadas de ancestrais que ocupavam ambientes associados a outros biomas (Simon et al., 2009; Simon, & Pennington, 2012; Antonelli et al., 2018).

Dentre os grupos identificados do complexo, foi possível observar alguns padrões intraespecíficos, especialmente naqueles com maior amostragem populacional, especificamente *H. parviflora* e *H. paulensis*. *Habenaria parviflora* apresentou uma diferenciação no sentido oeste-leste, com uma das linhagens associada a uma matriz de campo rupestre no Bioma Cerrado (clado a) e outra associada basicamente à Mata Atlântica (clado b). A linhagem oeste formada pelas populações do Centro-Oeste do Brasil (clado a) é diferenciada geneticamente e separada geograficamente das demais populações por uma área com menor número de ambientes favoráveis (áreas campestres inundáveis) e menor altitude no oeste de Minas Gerais. Esse padrão de diferenciação oeste-leste tem sido observado em várias outras espécies de plantas do Cerrado (revisado por Leal, Palma-Silva, & Pinheiro, 2016; Resende-Moreira et al., 2017; Buzatti et al., 2018), algumas das quais também apresentam distribuição

disjunta em áreas campestres (*e.g.*, Bonatelli et al., 2014). Na linhagem leste (clado b), por sua vez, a população irmã do restante do grupo ocorre no Sul (ULur), e no restante das populações do clado há uma separação em um clado do sul e outro do norte. Outros trabalhos com amostragem na Mata Atlântica têm reportado uma descontinuidade na distribuição de linhagens do norte e do sul, que se localiza entre Rio de Janeiro e o sul da Bahia (*e.g.*, Palma-Silva et al., 2009; Brunes, Sequeira, Haddad, & Alexandrino, 2010; Thomé et al., 2010; Fiorini, 2020). No entanto, nossos dados não coincidem com esse padrão, uma vez que as populações mais setentrionais (PV2 e URcv) estão relacionadas a uma população do Maciço da Tijuca-RJ (PVti). Contudo, a relação entre essas populações foi maior do que com as populações de São Paulo (PVpp, PVcu) e do Sul do Brasil (PVbe, PVcm), sugerindo uma disjunção entre os estados de São Paulo e Rio de Janeiro, próxima da área que ocupa a zona de falhas de Além Paraíba. Uma disjunção em áreas próximas tem sido associada a eventos neotectônicos para anuros da Mata Atlântica (Thomé et al., 2010). Estamos realizando análises filogeográficas para a espécie que ajudarão a entender melhor as causas das disjunções nas populações amostradas. Além dos grupos encontrados aqui para *H. parviflora*, não descartamos a possibilidade de existirem linhagens adicionais neste grupo para outras regiões da América do Sul, não amostradas neste trabalho.

As relações filogenéticas de *Habenaria paulensis* mostraram um padrão similar ao apontado pelos caracteres morfológicos (Cruz-Lustre et al., 2020 - CAPÍTULO 2) e apresenta um gradiente de diferenciação no sentido sul-sudeste do Brasil. As populações do sul, localizadas ao sul do estado de São Paulo ocorrem na Mata Atlântica e Pampa, e estão associadas a duas populações do Cerrado (EDcl e PL2ct). Nossos dados, mostraram uma diferenciação entre Paraná e São Paulo, que também tem sido indicada para outros táxons de divergência recente da Mata Atlântica (*e.g.*, Batalha-Filho et al., 2010; Brunes et al., 2010; Thomé et al., 2010), tendo sido associada nesses trabalhos à atividade do alinhamento Guapiara. A linhagem do Sudeste está formada pelas populações restantes do Cerrado e de campos de altitude dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. A separação da população da Serra da Canastra (PL2ct) das outras populações circundadas por campo rupestre do Espinhaço Sul (Serra do Caraça, EDcr; Serra do Cipó, PL2ci; Itacolomi, EDop) apoia as conclusões para outros grupos de plantas, incluindo Asteraceae (Collevatti et al., 2009), Cactaceae (Bonatelli et al., 2014), Gesneriaceae (Fiorini et al., 2019), além de Orchidaceae (Fiorini, 2020), sobre a importância da heterogeneidade e as disjunções geográficas dos campos rupestres para o entendimento dos padrões de diversidade desses ambientes. O fato de *H. paulensis* ocorrer exclusivamente em ambientes campestres, ter uma distribuição ao longo de vários biomas e

uma amostragem populacional que engloba toda sua distribuição geográfica, a converte em uma boa candidata para analisar seus padrões filogeográficos.

Habenaria tucumanensis comb. & stat. nov. e *H. brachyphyton* mostram uma diferenciação ligada à ocupação de regiões costeiras ou do interior do continente. Enquanto *H. brachyphyton* ocorre predominantemente ao longo da faixa litorânea do sul do Brasil, Uruguai e Argentina, *H. tucumanensis* comb. & stat. nov. ocorre no interior do Rio Grande do Sul no Brasil e Argentina. *Habenaria caaguazuensis*, contrariamente, ocorre principalmente no interior sul do continente, mais próximo de *H. brachyphyton*, porém sua distribuição não concorda com sua posição filogenética, dado que foi geneticamente mais próximo de uma linhagem de UL3 da Serra da Mantiqueira, geograficamente mais distante.

Os padrões de *H. ulei* (Serra Geral) e as linhagens UL2 e UL3 (Serra da Bocaina e Serra da Mantiqueira) revelam a importância do isolamento das áreas de altitude do Sul e Sudeste para a diferenciação inter e intra-específica, como foi encontrado para outros grupos de plantas, tais como *Epidendrum denticulatum* (Pinheiro et al., 2013), *Podocarpus lambertii* (Bernardi, Lauterjung, Mantovani, & Reis, 2020), *Petunia* (Kulcheski et al., 2006; Lorenz-Lemke et al., 2010, Barros et al., 2015), *Clusia criuva* subsp. *parviflora* (Cortez et al., 2019), e animais pequenos (Costa, Geise, Pereira, & Costa, 2011).

Embora as plantas do complexo ocorrem em sítios úmidos e a sua dispersão poder acontecer secundariamente por correntes de água de chuva, não observamos uma associação marcante entre a estrutura genética do complexo e as bacias hidrográficas, ao contrário do observado para a palmeira *Mauritia flexuosa*, que também ocorre em formações campestres (Lima, Lima-Ribeiro, Tinoco, Terribile, & Collevatti, 2014). Dado que o complexo *H. parviflora* ocorre em vegetações campestres ou beiras de estradas, mas nunca no interior da floresta, é possível que interações passadas entre vegetações abertas e comunidades florestais sejam um fator importante na sua distribuição atual. Também é possível que a presença de estruturas que permitem a dormência, como os órgãos subterrâneos das Orchidoideae e de outras plantas do bioma Cerrado, como *Mandirola hirsuta* (Fiorini et al., 2019), possa ter contribuído à sua persistência durante os períodos climáticos mais secos. Contudo, cenários de fragmentação, expansão e persistência a longo prazo devem ser analisados em um nível mais fino tanto no grupo como em outras plantas de ambientes campestres úmidos, as quais ainda estão negligenciadas em relação aos seus processos de diversificação.

Conclusão

Através de análises com uma ampla amostragem populacional incluindo a maior parte da diversidade morfológica, geográfica, genética e taxonômica do complexo *H. parviflora*, conseguimos identificar padrões genéticos com grande correspondência morfológica que nos permitiram reconhecer *H. parviflora*, *H. ulei*, e *H. paulensis*, corroborar a sinonimização de *H. edentula* com essa última, elevar ao nível específico *H. tucumanensis* comb. & stat. nov. (= *H. montevidensis* var. *tucumanensis*), restabelecer *H. caaguazuensis* e sugerir a sinonimização de *H. uruguayensis* sob *H. brachyphyton*. Os padrões gerais da estrutura genética do complexo, particularmente de *H. parviflora* e *H. paulensis*, indicam algumas disjunções para as quais a geografia, as comunidades vegetais e as condições climáticas podem ser importantes na diversificação do grupo. Desta forma, estudos genômicos detalhados sobre filogeografia e hibridação e de biologia reprodutiva são necessários para entender os padrões finos dentro das linhagens, estando estes em desenvolvimento pelo nosso grupo. Estes conhecimentos permitirão entender melhor os processos subjacentes à diversificação nos diferentes biomas da América do Sul, os quais apresentam um mosaico de ambientes, como foi observado neste trabalho.

Referências

- Anderson, B. M., Thiele, K. R., Krauss, S. L., & Barrett, M. D. (2017). Genotyping-by-sequencing in a species complex of Australian hummock grasses (*Triodia*): methodological insights and phylogenetic resolution. *PLoS One*, 12, e0171053. doi:10.1371/journal.pone.0171053
- Andrews, S. (2018). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Antonelli, A., Zizka, A., Antunes Carvalho, F., Scharn, R., Bacon, C. D., Silvestro, D., & Condamine, F. L. (2018). Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, 6034–6039. doi:10.1073/pnas.1713819115
- Archibald, J. D. (1994). Metataxon concepts and assessing possible ancestry using phylogenetic systematics. *Systematic Biology*, 43, 27–40. doi:10.1093/sysbio/43.1.27
- Barros, M. J. F., Silva-Arias, G. A., Fregonezi, J. N., Turchetto-Zolet, A. C., Iganci, J. R. V., Diniz-Filho, J. A. F., & Freitas, L. B. (2015). Environmental drivers of diversity in

- subtropical highland grasslands. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 17, 360–368. doi:10.1016/j.ppees.2015.08.001
- Batalha-Filho, H., Waldschmidt, A. M., Campos, L. A. O., Tavares, M. G., & Fernandes-Salomão, T. M. (2010). Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. *Apidologie*, 41, 534–547. doi:10.1051/apido/2010001
- Batista, J. A. N., Bianchetti, L. B., González-Tamayo, R., Figueroa, X. M. C., & Cribb, P. J. (2011a). A synopsis of new world *Habenaria* (Orchidaceae) I. *Harvard Papers in Botany*, 16, 1–47. doi:10.3100/025.016.0101
- Batista, J. A. N., Bianchetti, L.B., González-Tamayo, R., Figueroa, X. M. C., & Cribb, P. J. (2011b). A synopsis of new world *Habenaria* (Orchidaceae) II. *Harvard Papers in Botany*, 16, 233–273. doi:10.3100/0.25.016.0202
- Batista, J. A. N., Borges, K. S., Faria, M. W., Proite, K., Ramalho, A. J., Salazar, G. A., & Berg, C. van den. (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. doi:10.1016/j.ympev.2013.01.008
- Batista, J. A. N., Reis, A. F. de S., Leite Júnior, J. L., & Bianchetti, L. de Bem. (2018). Phylogeny and taxonomy of *Habenaria leprieurii*, *H. alpestris* and *H. sect. Microdactylae* (Orchidaceae), with descriptions of two new taxa. *Phytotaxa*, 373, 241–271. doi:10.11646/phytotaxa.373.4.1
- Bernardi, A. P., Lauterjung, M. B., Mantovani, A., & Reis, M. S. (2020). Phylogeography and species distribution modeling reveal a historic disjunction for the conifer *Podocarpus lambertii*. *Tree Genetics & Genomes*, 16, 40, 1–14. doi:10.1007/s11295-020-01434-2
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Bonatelli, I. A. S., Perez, M. F., Peterson, A. T., Taylor, N. P., Zappi, D. C., Machado, M. C., ... Moraes, E. M. (2014). Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. *Molecular Ecology*, 23, 3044–3063. doi:10.1111/mec.12780
- Borba, E. L., Semir, J., & Shepherd, G. J. (2001). Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany*, 88, 89–99. doi:10.1006/anbo.2001.1435

- Bramwell, D. (1972). A revision of the genus *Echium* in Macaronesia. *Lagasalia* 2:37–115.
- Brunes, T. O., Sequeira, F., Haddad, C. F. B., & Alexandrino, J. (2010). Gene and species trees of a Neotropical group of treefrogs: genetic diversification in the Brazilian Atlantic Forest and the origin of a polyploid species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, 1120–1133. doi:10.1016/j.ympev.2010.08.026
- Buzatti, R. S. O., Pfeilsticker, T. R., Magalhães, R. F., Bueno, M. L., Lemos-Filho, J. P. & Lovato, M. B. (2018). Genetic and historical colonization analyses of an endemic savanna tree, *Qualea grandiflora*, reveal ancient connections between Amazonian savannas and Cerrado core. *Frontiers in Plant Science*, 9, 981. doi:10.3389/fpls.2018.00981
- Catchen, J., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., & Postlethwait, J. (2011). Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 1, 171–182. doi:10.1534/g3.111.000240
- Chang, C. C., Chow, C. C., Tellier, L. C. A. M., Vattikuti, S., Purcell, S. M., & Lee, J. J. (2015). Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 4. doi:10.1186/s13742-015-0047-8
- Chifman, J., & Kubatko, L. (2014). Quartet inference from SNP data under the coalescent model. *Bioinformatics*, 30, 3317–3324. doi:10.1093/bioinformatics/btu530
- Chou, J., Gupta, A., Yaduvanshi, S., Davidson, R., Nute, M., Mirarab, S., & Warnow, T. (2015). A comparative study of SVDquartets and other coalescent-based species tree estimation methods. *BMC Genomics*, 16, S2. doi:10.1186/1471-2164-16-S10-S2
- Claessens, J., Bacallado, J. J., Bogarin, D., Dedroog, L., Heijungs, R., Langelaan, R., ... Gravendeel, B. (2019). Pollination of *Habenaria tridactylites* on the Canary Islands. *Nordic Journal of Botany*, e02401. doi:10.1111/njb.02401
- Cogniaux, A. (1893). Orchidaceae. *Habenaria*. In Martius, C. F. P., Eichler, A. G., Urban, I. (Eds.), *Flora Brasiliensis* 3(4), F. Fleischer, Munich, pp. 18–102.
- Cortez, M. B. S., Sforca, D. A., Alves, F. M., Vidal, J. D., Alves-Pereira, A., Mori, G. M., Andreotti, I. A., ... Souza, A. P. (2019). Elucidating the *Clusia criuva* species 'complex': cryptic taxa can exhibit great genetic and geographical variation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 190, 67–82. doi:10.1093/botlinnean/boz004
- Cortis, P., Vereecken, N. J., Schiestl, F. P., Lumaga, M. R. B., Scrugli, A. & Cozzolino, S. (2009). Pollinator convergence and the nature of species' boundaries in sympatric Sardinian *Ophrys* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 104, 497–506. doi:10.1093/aob/mcn219

- Costa, B. M. A., Geise, L., Pereira, L. G., & Costa, L. P. (2011). Phylogeography of *Rhipidomys* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) and description of two new species from southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy*, 92, 945–962. doi:10.1644/10-mamm-a-249.1
- Cozzolino, S., Nardella, A. M., Impagliazzo, S., Widmer, A., & Lexer, C. (2006). Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biological Conservation*, 129, 14–23. doi:10.1016/j.biocon.2005.09.043
- Cozzolino, S., Scopece, G., Roma, L., & Schlüter, P. M. (2019). Different filtering strategies of genotyping-by-sequencing data provide complementary resolutions of species boundaries and relationships in a clade of sexually deceptive orchids. *Journal of Systematics and Evolution*, 58, 133–144. doi:10.1111/jse.12493
- Cribb, P. (2001). *Habenaria*. In Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W. & Rasmussen, F. N. (Eds.) *Genera orchidacearum*, Vol. 2. Orchidoideae (part 1). Oxford University, Oxford, pp. 298–303.
- Cruz-Lustre, G., Batista, J. A. N., Radins, J. A., González, A., & Borba, E. L. (2020). Morphometric analysis of the *Habenaria parviflora* complex (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 306, 37. doi:10.1007/s00606-020-01634-2
- Cunningham, C. I., Miller, J. M., Peery, R. M., Dupuis, J. R., Malenfant, R. M., Gorrell, J. C., & Janes, J. K. (2020). Confidently identifying the correct K value using the ΔK method: when does $K = 2$? *Molecular Ecology*, 29, 862–869. doi:10.1111/mec.15374
- Darwin, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, London.
- Donkpegan, A. S. L., Doucet, J-L, Hardy, O. J., Heuertz, M., & Piñeiro, R. (2020). Miocene Diversification in the Savannas Precedes Tetraploid Rainforest Radiation in the African Tree Genus *Azalia* (Detarioideae, Fabaceae). *Frontiers in Plant Science*, 11, 798. doi:10.3389/fpls.2020.00798
- Donoghue, M. J. (1985). A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist*, 88, 172–181.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Earl, D. A., & Vonholdt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359–361. doi:10.1007/s12686-011-9548-7

- Ebach, M. C., & Williams, D. M. (2010). Aphyly: a systematic designation for a taxonomic problem. *Evolutionary Biology*, 37, 123–127. doi:10.1007/s11692-010-9084-5
- Eliasson, U. (1974). Studies in Galápagos Plants. XIV. The genus *Scalesia*. *Opera Botanica*, 36, 1–117.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS One*, 6, e19379. doi:10.1371/journal.pone.0019379
- 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. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Fernández-Mazuecos, M., Mellers, G., Vigalondo, B., Sáez, L., Vargas, P., & Glover, B. J. (2018). Resolving recent plant radiations: power and robustness of Genotyping-by-Sequencing. *Systematic Biology*, 67, 250–268. doi:10.1093/sysbio/syx062
- Fernández-Mazuecos, M., Vargas, P., McCauley, R. A., Monjas, D., Otero, A., Chaves, J. A., ... Rivas-Torres, G. (2020). The Radiation of Darwin's Giant Daisies in the Galápagos Islands. *Current Biology*, 30, 4989–4998.e7. doi:10.1016/j.cub.2020.09.019
- Fiorini, C. F. (2020). Evolutionary processes and the origin of plant biodiversity in old Neotropical sky-islands: a genomic and model-based approach. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Fiorini, C. F., Peres, E. A., da Silva, M. J., Araujo, A. O., Borba, E. L., & Solferini, V. N. (2019). Phylogeography of the specialist plant *Mandirola hirsuta* (Gesneriaceae) suggests ancient habitat fragmentation due to savanna expansion. *Flora*, 151522. doi:10.1016/j.flora.2019.
- Garay, L. A. (1976). Sprengel's *Habenaria montevidensis*. *Bradea*, 19, 115–120.
- Givnish, T. J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S. P., Hunter, S. J., Zuluaga, A., ... Cameron, K. M. (2015). Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B*, 282, 20151553. doi:10.1098/rspb.2015.1553
- Govaerts, R., Dransfield, J., Zona, S., Hodel, D.R., & Henderson, A. (2020). World Checklist of *Habenaria*. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Publicado na internet: <http://wmsp.science.kew.org/> (acesso: 10 out 2020).
- Hamon, P., Grover, C. E., Davis, A. P., Rakotomalala, J-J., Raharimalala, N. E., Albert, V.A., ... Guyot, R. (2017). Genotyping-by-sequencing provides the first well-resolved phylogeny for coffee (*Coffea*) and insights into the evolution of caffeine content in its

- species GBS coffee phylogeny and the evolution of caffeine content. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109, 351–361. doi:10.1016/j.ympev.2017.02.009
- Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Etter, P. D., Stiffler, N., Johnson, E. A., & Cresko, W. A. (2010). Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. *PLoS Genetics*, 6, e1000862. doi:10.1371/journal.pgen.1000862
- Hu, Y., Resende, M. F. R., Bombarely, A., Maria Brym, M., Bassil, E., & Chambers, A. H. (2019). Genomics-based diversity analysis of *Vanilla* species using a *Vanilla planifolia* draft genome and Genotyping-By-Sequencing. *Scientific Reports*, 9, 3416. doi:10.1038/s41598-019-40144-1
- Jin, W-T, Schuiteman, A., Chase, M. W., Li, J-W, Chung, S-W, Hsu, T-C, & Jin, X-H. (2017). Phylogenetics of subtribe Orchidinae *s.l.* (Orchidaceae; Orchidoideae) based on seven markers (plastid *matK*, *psaB*, *rbcL*, *trnL-F*, *trnH-psba*, and nuclear nrITS, *Xdh*): implications for generic delimitation. *BMC Plant Biology*, 17, 222. doi:10.1186/s12870-017-1160-x
- Johnson, S. D. (2018). Natural hybridization in the orchid flora of South Africa: comparisons among genera and floristic regions. *South African Journal of Botany*, 118, 290–298. doi:10.1016/j.sajb.2018.01.011
- Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24, 1403–1405. doi:10.1093/bioinformatics/btn129
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15, 1179–1191. doi:10.1111/1755-0998.12387
- Kulcheski, F. R., Muschner, V. C., Lorenz-Lemke, A. P., Stehmann, J. R., Bonatto, S. L., Salzano, F. M., & Freitas, L. B. (2006). Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica*, 126, 3–14. doi:10.1007/s10709-005-1427-2
- Lau, B. L., Batista, J. A. N., Massensini Junior, A., Whitten, W. M., & Borba, E. L. (2021). Unravelling the *Habenaria repens* (Orchidaceae) complex in Brazil: a biosystematic and molecular phylogenetic approach. *Botanical Journal of the Linnean Society*, boab022, 1–20. doi:10.1093/botlinnean/boab022
- Leal, B. S. S., Palma-Silva, C., & Pinheiro, F. (2016). Phylogeographic studies depict the role of space and time scales of plant speciation in a highly diverse Neotropical region. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35, 215–230. doi:10.1080/07352689.2016.1254494

- Lima, N. E., Lima-Ribeiro, M. S., Tinoco, C. F., Terribile, L. C., & Collevatti, R. G. (2014). Phylogeography and ecological niche modelling, coupled with the fossil pollen record, unravel the demographic history of a Neotropical swamp palm through the Quaternary. *Journal of Biogeography*, 41, 673–686. doi:10.1111/jbi.12269
- Lorenz-Lemke, A. P., Muschner, V. C., Bonatto, S. L., Cervi, A. C., Salzano, F. M., & Freitas, L. B. (2005). Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Annals of Botany*, 95, 799–806. doi:10.1093/aob/mci079
- Lorenz-Lemke, A. P., Togni, P. D., Mader, G., Kriedt, R. A., Stehmann, J. R., Salzano, F. M., Bonatto, S. L., & Freitas, L. B. (2010). Diversification of plant species in a subtropical region of eastern South American highlands: a phylogeographic perspective on native *Petunia* (Solanaceae). *Molecular Ecology*, 19, 5240–5251. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04871.x
- Martín-Hernanz, S., Aparicio, A., Fernández-Mazuecos, M., Rubio, E., Reyes-Betancort, J. A., Santos-Guerra, A., ... Albaladejo, R. G. (2019). Maximize Resolution or Minimize Error? Using Genotyping-By-Sequencing to Investigate the Recent Diversification of *Helianthemum* (Cistaceae). *Frontiers in Plant Science*, 10, 1416. doi:10.3389/fpls.2019.01416
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE) (pp. 1–8). New Orleans: Gateway Computing. Disponível em: <http://www.phylo.org/index.php/>
- Monteiro, S. H. N., Silva, T. C., Santos, L. A. S., Nascimento-Júnior, J. E. & Prata, A. P. N. (2012). Survey of Orchidaceae from the state of Sergipe, Brazil. *Biota Neotropica*, 12. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v12n2/en/abstract?inventory+bn01012022012>
- Ngugi, G., Péchon, T. L., Martos, F., Paillet, T., Bellstedt, D. U., & Bytebier, B. (2020). Phylogenetic relationships amongst the African genera of subtribe Orchidinae *s.l.* (Orchidaceae; Orchideae): implications for subtribal and generic delimitations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 153, 106946. doi:10.1016/j.ympev.2020.106946
- Pabst, J. (1957). Notícias orquidológicas 6. *Orquídea* (Rio de Janeiro), 19, 84–87.
- Palma-Silva, C., Lexer, C., Paggi, G. M., Barbara, T., Bered, F., & Bodanese-Zanettini, M. H. (2009). Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea*

- gigantea* (Bromeliaceae), a Neotropical forest species. *Heredity*, 103, 503–512. doi:10.1038/hdy.2009.116
- Paris, J. R., Stevens, J. R., & Catchen, J. M. (2017). Lost in parameter space: a road map for stacks. *Methods in Ecology and Evolution*, 8, 1360–1373. doi:10.1111/2041-210X.12775
- Pedron, M., Buzatto, C. R., Ramalho, A. J., Carvalho, B. M., Radins, J. A., Singer, R. B., & Batista, J. A. N. (2014). Molecular phylogenetics and taxonomic revision of *Habenaria* section *Pentadactylae* (Orchidaceae, Orchidinae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 175, 47–73. doi:10.1111/boj.12161
- Pérez-Escobar, O. A., Bogarín, D., Schley, R., Bateman, R. M., Gerlach, G., Harpke, D., ... Blattner, F. R. (2020). Resolving relationships in an exceedingly young Neotropical orchid lineage using Genotyping-by-sequencing data *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 144, 106672. doi:10.1016/j.ympev.2019.106672
- Pina-Martins, F., Silva, D. N., Fino, J., & Paulo, O. S. (2017). Structure_threader: an improved method for automation and parallelization of programs structure, fastStructure and MavericK on multicore CPU systems. *Molecular Ecology Resources*, 17, e268–e274. doi:10.1111/1755-0998.12702
- Pinheiro, F., Cozzolino, S., de Barros, F., Gouveia, T. M. Z. M., Suzuki, R. M., Fay, M. F., & Palma-Silva, C. (2013). Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the Neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. *Evolution*, 67, 2024–2039. doi:10.1111/evo.12085
- Poland, J. A., Brown, P. J., Sorrells, M. E., & Jannink, J-L. (2012). Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme Genotyping-by-Sequencing approach. *PLoS One*, 7, e32253. doi:10.1371/journal.pone.0032253
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., ... Sham, P. C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics*, 81, 559–575. doi:10.1086/519795
- R Core Team. (2020). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>
- Rambaut, A. (2016). FigTree v1.4.3. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67, 901–904. doi:10.1093/sysbio/syy032
- Reaz, R., Bayzid, M. S., & Rahman, M. S. (2014). Accurate phylogenetic tree reconstruction from quartets: a heuristic approach. *PLoS One*, 9, e104008. doi:10.1371/journal.pone.0104008
- Ren, M. X., Cafasso, D., Rosaria, M., Lumaga, B., & Cozzolino, S. (2014). Low pollination success of hybrids between nectar-rewarding and food-deceptive orchids. *Plant Systematics and Evolution*, 300, 1985–1993. doi:10.1007/s00606-014-1023-y
- Resende-Moreira, L. C., de Vasconcelos, P. N., Souto, A. P., Menezes, A. P. A., Lemos-Filho, J. P., & Lovato, M. B. (2017). East-west divergence in central Brazilian Cerrado revealed by cpDNA sequences of a bird-dispersed tree species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 70, 247–253. doi:10.1016/j.bse.2016.12.007
- Rochette, N. C., Rivera-Colón, A. G., & Catchen, J. M. (2019). Stacks 2: analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. *Molecular Ecology*, 28, 4737–4754. doi:10.1111/mec.15253
- Rundell, R. J., & Price, T. D. (2009). Adaptive radiation, nonadaptive radiation, ecological speciation and nonecological speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 394–399. doi:10.1016/j.tree.2009.02.007
- Sanguinetti, A. (2015). *Habenaria parviflora* (Orchidaceae), extension of its austral distributional limit and new synonymy. *Nordic Journal of Botany*, 33, 361–365. doi:10.1111/njb.00724
- Shaffer, H. B., & Thomson, R. C. (2007). Delimiting species in recent radiations. *Systematic Biology*, 56, 896–906. doi:10.1080/10635150701772563
- Simon, M. F., & Pennington, T. (2012). Evidence for adaptation to fire regimes in the tropical savannas of the Brazilian Cerrado. *International Journal of Plant Sciences*, 173, 711–723. doi:10.1086/665973
- Simon, M. F., Grether, R., de Queiroz, L. P., Skema, C., Pennington, R. T., & Hughes, C. E. (2009). Recent assembly of the Cerrado, a Neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 20359–20364.
- Singer, R. (2001). Pollination biology of *Habenaria parviflora* (Orchidaceae: Habenariinae) in southeastern Brazil. *Darwiniana*, 39, 201–207.

- speciesLink. (2020). *specieslink*. CRIA, FAPES, Campinas, São Paulo. Disponível em: <http://splink.cria.org.br/tools>. (acesso: 13 Set 2020).
- Swofford, D. L. (2003). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Disponível em: <https://paup.phylosolutions.com>.
- Thomaz, A. T., Malabarba, L. R., & Knowles, L. L. (2017). Genomic signatures of paleodrainages in a freshwater fish along the southeastern coast of Brazil: genetic structure reflects past riverine properties. *Heredity*, 119, 287–294. doi:10.1038/hdy.2017.46
- Thomé, M. T. C., Zamudio, K. R., Giovanelli, J. G. R., Haddad, C. F. B., Baldissera, F. A., & Alexandrino, J. (2010). Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 55, 1018–1031. doi:10.1016/j.ympev.2010.02.003
- Turchetto-Zolet, A. C., Pinheiro, F., Salgueiro, F., & Palma Silva, C. (2013). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22, 1193–1213. doi:10.1111/mec.12164
- Wallace, L. E. (2006). Spatial genetic structure and frequency of interspecific hybridization in *Platanthera aquilonis* and *P. dilatata* (Orchidaceae) occurring in sympatry. *American Journal of Botany*, 93, 1001–1009. doi:10.3732/ajb.93.7.1001

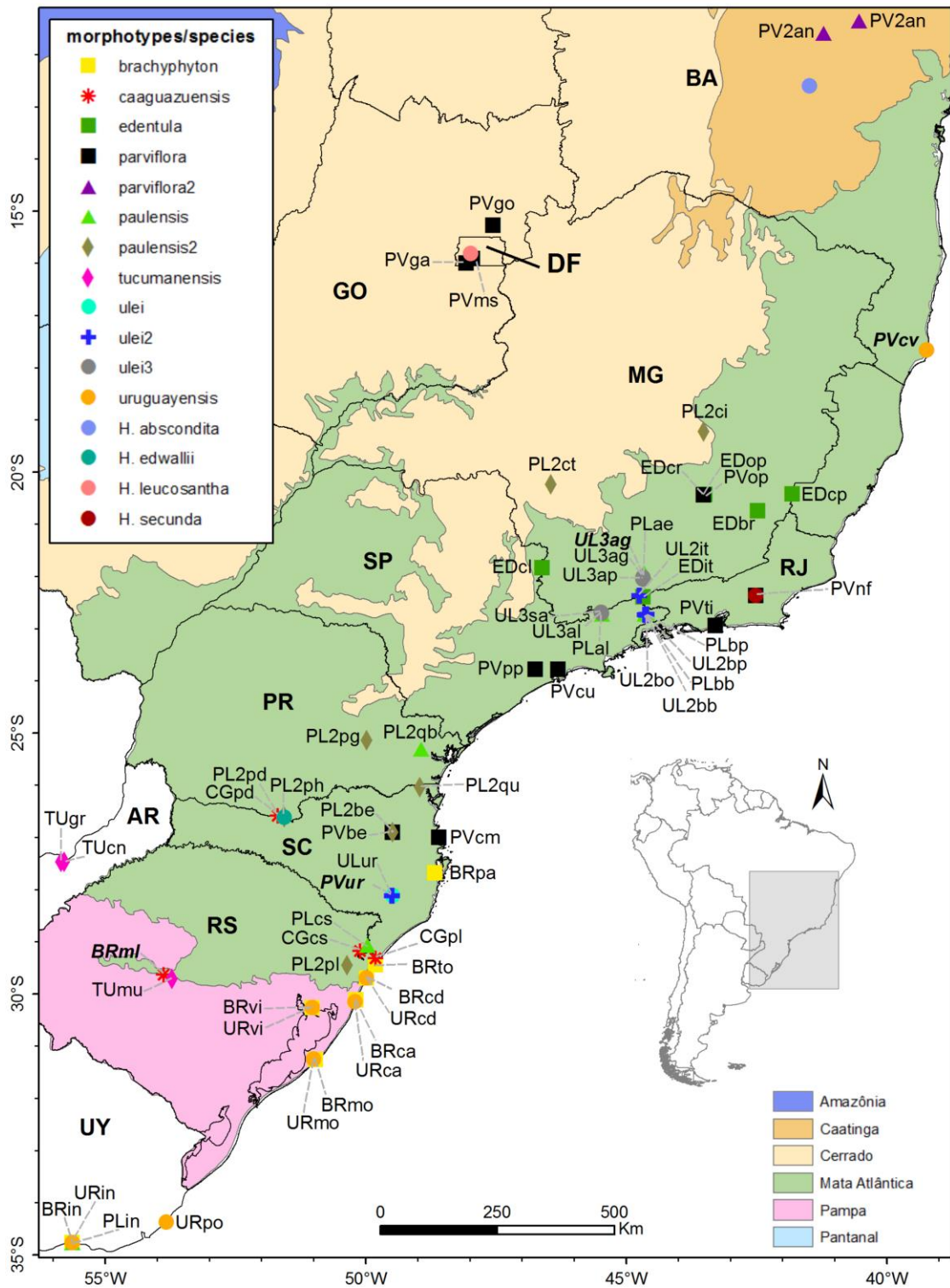


Figura 1. Mapa de distribuição das populações do complexo *Habenaria parviflora* e de outros representantes de *Habenaria* analisadas neste trabalho. Acrônimos dos estados brasileiros: BA = Bahia, GO = Goiás, MG = Minas Gerais, PR = Paraná, RJ = Rio de Janeiro, RS = Rio Grande do Sul, SC = Santa Catarina, SP = São Paulo. DF = Distrito Federal. AR = Argentina, UY = Uruguai. Populações com morfotipos reclassificados estão indicadas em negrito e itálico: *CGml* para *BRml*, *PL2ag* para *UL3ag*, *UL2ur* para *PVur*, *URcv* para *PVcv* (veja a seção Discussão para explicação sobre a reclassificação). Veja Tabela 1 para nomes das populações e morfotipos. As populações do Uruguai pertencem ao bioma Pampa e da Argentina à Mata Atlântica.

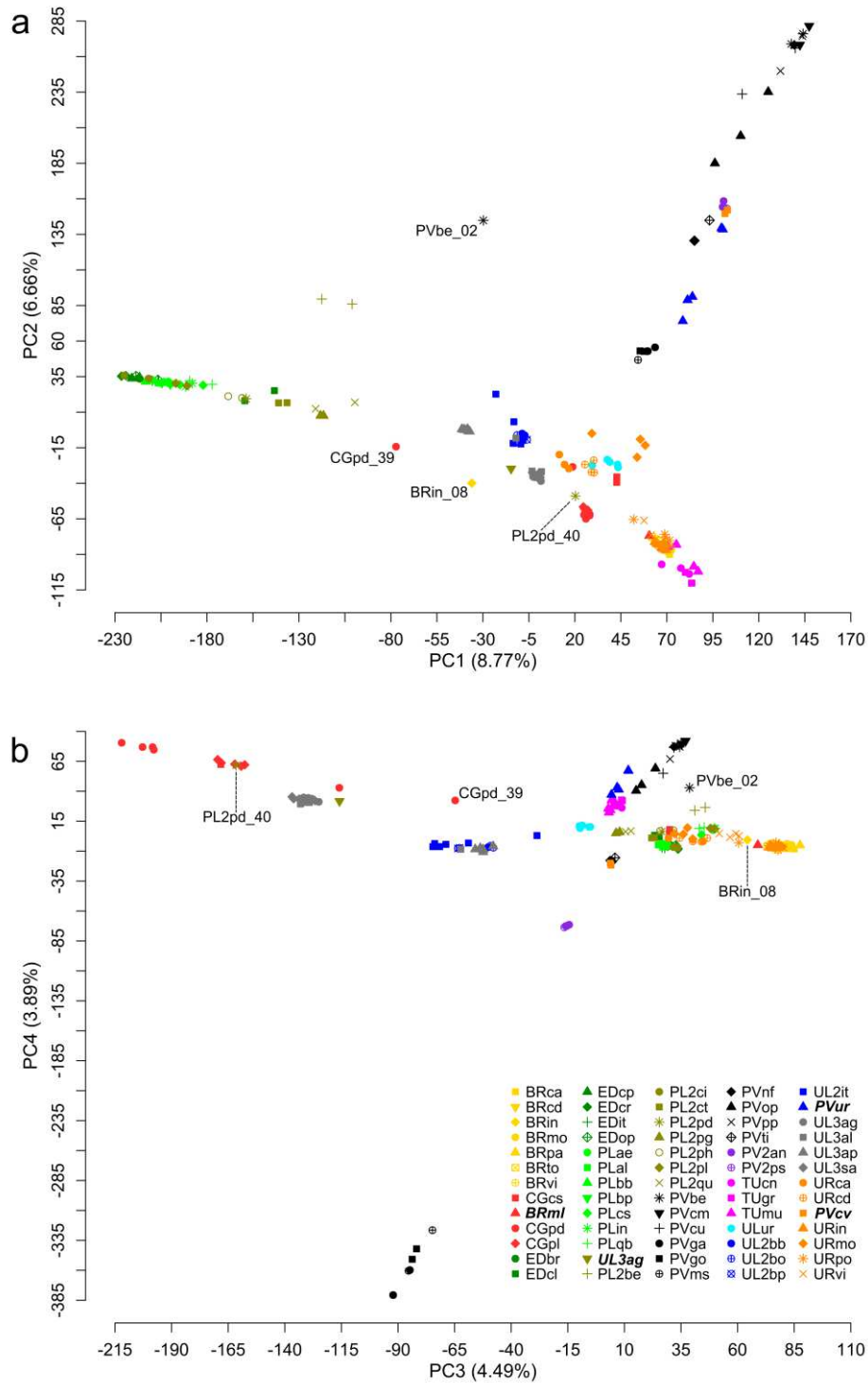


Figura 2. Representação dos quatro primeiros eixos do PCA de 196 indivíduos distribuídos em 65 populações do complexo *Habeneria parviflora* (Orchidaceae), classificados em 12 morfotipos, usando 61.405 SNPs obtidos por metodologia de redução de amostragem do genoma (*genotyping-by-sequencing* – GBS). Populações com morfotipos reclassificados estão indicadas em negrito e itálico: *CGml* para *BRml*, *PL2ag* para *UL3ag*, *UL2ur* para *PVur*, *URcv* para *PVcv* (veja a seção Discussão para explicação sobre a reclassificação). Indivíduos com posicionamento inesperado em relação à própria população estão indicados na figura. Veja Tabela 1 para nomes das populações e morfotipos.

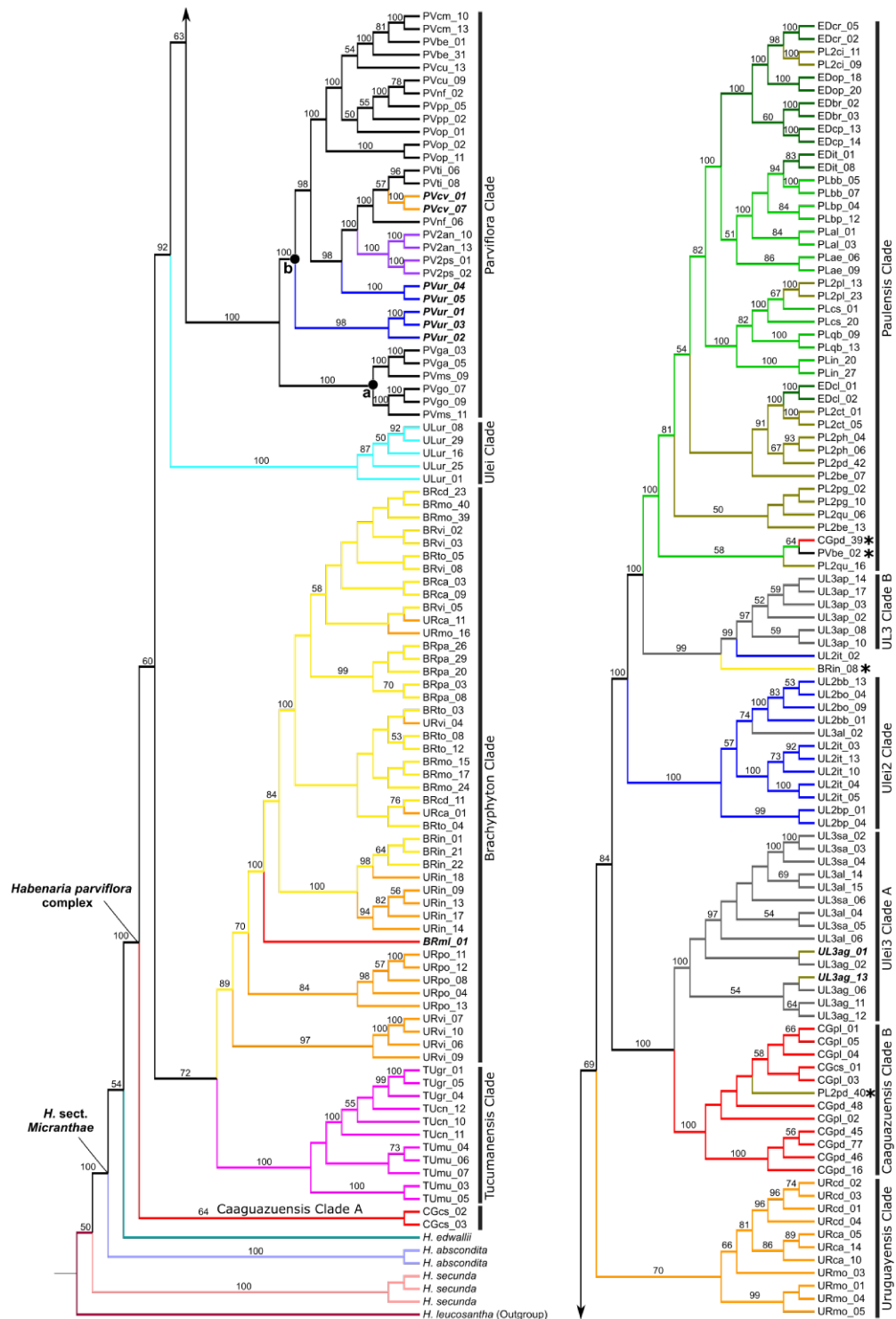


Figura 3. Relações filogenéticas de *Habeneria* sect. *Micranthae* e do complexo *H. parviflora* inferidas com SVDQuartets a partir de dados genômicos, incluindo 203 indivíduos e 28.775 caracteres. Números correspondem aos valores de suporte (bootstrap $\geq 50\%$). Clados principais estão delimitados por barras laterais e subclados por círculos nos nós. As cores representam a classificação com base em dados morfológicos (morfotipos) e indivíduos com posicionamento inesperado no PCA estão destacados por um asterisco. Indivíduos de populações com morfotipos reclassificados estão indicadas em negrito e itálico: *CGml* para *BRml*, *PL2ag* para *UL3ag*, *UL2ur* para *PVur*, *URcv* para *PVcv* (veja a seção Discussão para explicação sobre a reclassificação). Veja Tabela 1 para nomes das populações e morfotipos.

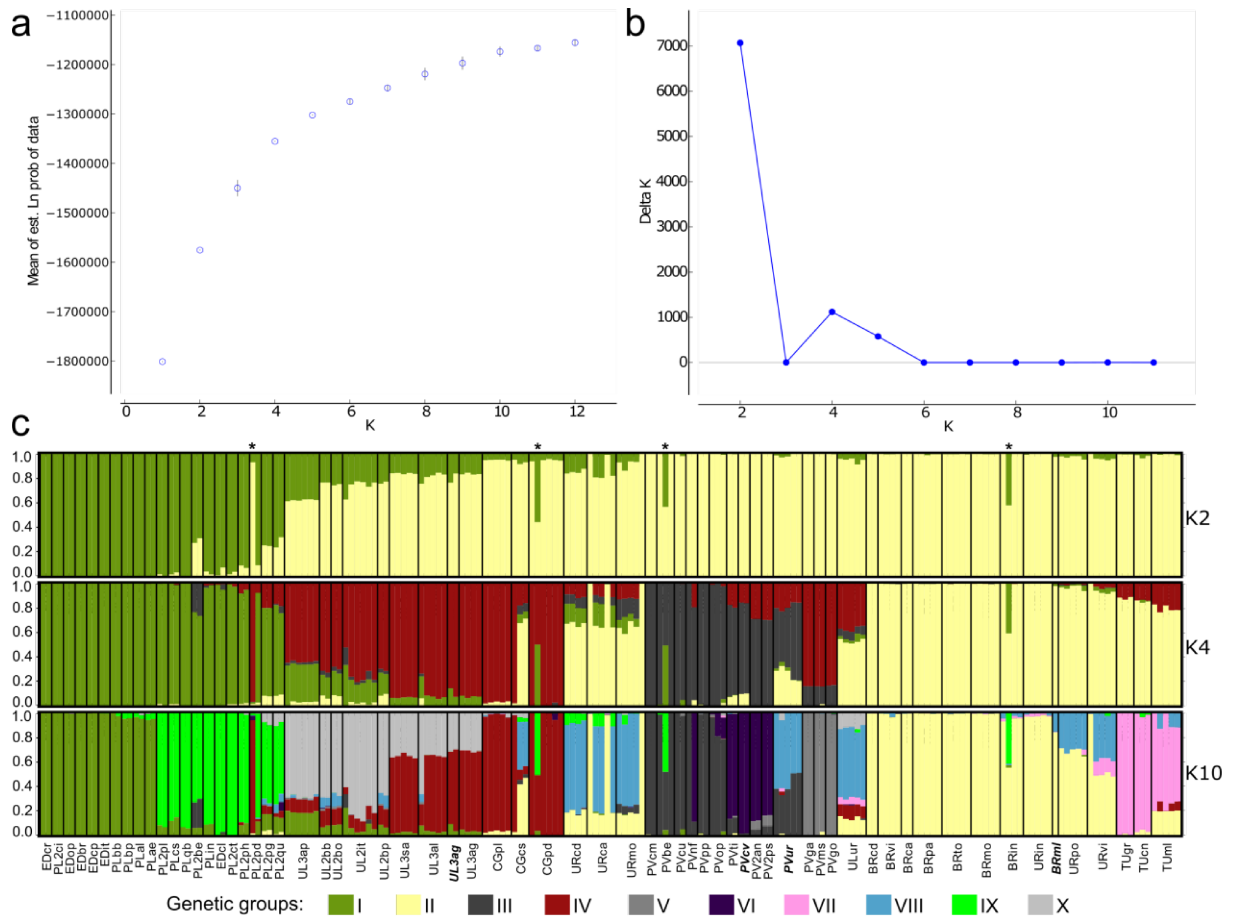


Figura 4. Análise de estruturação genética de 196 indivíduos distribuídos em 65 populações do complexo *Habenaria parviflora* inferida a partir de 17.587 SNPs. a) Gráficos dos valores de L(K) e (b) DeltaK gerados com STRUCTURE HARVESTER. c) Plots da análise de agrupamento bayesiano em STRUCTURE com a proporção de ancestralidade dos indivíduos para K = 2, K = 4 e K = 10. Linhas separam populações e barras verticais indicam indivíduos (N = 196). Indivíduos com posicionamento inesperado no PCA estão destacados por um asterisco. Populações com morfotipos reclassificados estão indicadas em negrito e itálico: *CGml* para BRml, *PL2ag* para UL3ag, *UL2ur* para PVur, *URcv* para PVcv (veja a seção Discussão para explicação sobre a reclassificação). Ordem das populações de acordo com as análises filogenéticas. Veja Tabela 1 para nomes das populações.

Tabela 1. Localidades de coleta das populações do complexo *Habenaria parviflora* e de outros representantes do gênero analisadas neste trabalho. O número de indivíduos amostrados por população encontra-se entre parênteses. Acrônimos dos estados brasileiros: BA = Bahia, GO = Goiás, MG = Minas Gerais, PR = Paraná, RJ = Rio de Janeiro, RS = Rio Grande do Sul, SC = Santa Catarina, SP = São Paulo. DF = Distrito Federal. AR = Argentina, UY = Uruguai. Populações com morfotipos reclassificados estão indicadas em negrito e itálico: *CGml* para BRml, *PL2ag* para UL3ag, *UL2ur* para PVur, *URcv* para PVcv (veja a seção Discussão para explicação sobre a reclassificação).

Morfotipo (complexo <i>H. parviflora</i>) ou espécie /População	Origem (N)	Localização	Voucher
brachyphyton (BR)			
BRca	Capão da Canoa, RS (2)	29°42'05"S, 49°59'04"W	GCL 290
BRcd	Cidreira, RS (2)	30°06'54"S, 50°10'55"W	GCL 287
Brin	Canelones, Uruguai (4)	34°46'21"S, 55°37'48"W	AG s.n.
<i>BRml</i>	Santa Maria, RS (1)	29°37'33"S, 53°52'19"W	GCL 292
BRmo	Canelones, Uruguai (5)	31°15'47"S, 50°57'30"W	GCL 308
BRpa	Palhoça, SC (5)	27°41'09"S, 48°40'01"W	GCL 279
BRto	Torres, RS (5)	29°26'36"S, 49°48'24"W	GCL 291
BRvi	Viamão, RS (4)	30°15'51"S, 51°01'17"W	GCL 306
caaguazuensis (CG)			
CGcs	Cambará do Sul, RS (3)	29°10'23"S, 50°06'13"W	GCL 297
CGpd	Palmas, PR (6)	26°34'45"S, 51°53'30"W	GCL 323
CGpl	São Francisco de Paula, RS (5)	29°18'38"S, 50°21'22"W	GCL 238
edentula (ED)			
EDbr	Araponga, MG (2)	20°44'50"S, 42°28'27"W	GCL 390
EDcl	Caldas, MG (2)	21°49'49"S, 46°36'32"W	GCL 381
EDcp	Alto Caparaó, MG (2)	20°25'10"S, 41°48'33"W	GCL 182
EDcr	Catas Altas, MG (2)	20°25'51"S, 43°29'53"W	GCL 397
EDit	Itatiaia, RJ (2)	22°23'48"S, 44°40'17"W	GCL 366
EDop	Ouro Preto, MG (2)	20°25'47"S, 43°29'10"W	GCL 392
parviflora (PV)			
PVbe	Benedito Novo, SC (3)	26°54'07"S, 49°29'10"W	GCL 276
PVcm	Balneário Camboriú, SC (2)	27°00'17"S, 48°35'18"W	GCL 278
PVcu	São Paulo, SP (2)	23°59'13"S, 46°44'34"W	GCL 359
<i>PVcv</i>	Caravelas, BA (2)	17°39'43"S, 39°13'25"W	GCL 235
PVga	Brasília, DF (2)	15°59'34"S, 47°04'21"W	JANB 3440
PVgo	São Gabriel de Goiás, GO (2)	15°16'6.2"S, 47°33'5.6"W	JANB 3477
PVms	Núcleo Bandeirante, DF (2)	15°54'14"S, 47°56'44"W	JANB 3443
PVnf	Nova Friburgo, RJ (2)	22°21'46"S, 42°30'29"W	GCL 399
PVop	Ouro Preto, MG (3)	20°26'00"S, 43°30'32"W	GCL 395
PVpp	Santo André, SP (2)	23°46'47"S, 46°18'21"W	GCL 360
PVti	Rio de Janeiro, RJ (2)	22°56'38"S, 43°17'11"W	GCL 325
<i>PVur</i>	Urubici, SC (5)	28°07'06"S, 49°29'39"W	GCL 285

parviflora2 (PV2)			
PV2an	Morro do Chapéu, BA (2)	11°35'26"S, 41°12'34"W	GCL 204
PV2ps	Miguel Calmón, BA (2)	11°20'56"S, 40°31'43"W	GCL 199
paulensis (PL)			
PLae	Aiuruoca, MG (2)	21°55'58"S, 44°38'40"W	GCL 364
PLal	Campos do Jordão, SP (2)	22°43'23"S, 45°27'26"W	GCL 378
PLbb	São José do Barreiro, SP (2)	22°43'03"S, 44°35'53"W	GCL 371
PLbp	São José do Barreiro, SP (2)	22°43'41"S, 44°38'05"W	GCL 374
PLcs	Cambará do Sul, RS (2)	29°04'04"S, 49°57'54"W	GCL 303
PLin	Canelones, Uruguai (2)	34°46'18"S, 55°37'43"W	AG s.n.
PLqb	Quatro Barras, PR (2)	25°18'37"S, 48°56'05"W	GCL 317
paulensis2 (PL2)			
PL2be	Benedito Novo, SC (2)	26°54'07"S, 49°29'10"W	GCL 277
PL2ci	Santana do Riacho, MG (2)	19°13'40"S, 43°30'30"W	GCL 327
PL2ct	São Roque de Minas, MG (2)	20°14'09"S, 46°26'51"W	GCL 335
PL2pd	Palmas, PR (2)	26°36'54"S, 51°33'21"W	GCL 249
PL2pg	Ponta Grossa, PR (2)	25°08'24"S, 49°58'55"W	GCL 310
PL2ph	Palmas, PR (2)	26°35'39"S, 51°34'17"W	GCL 272
PL2pl	São Francisco de Paula, RS (2)	29°27'10"S, 50°36'22"W	GCL 293
PL2qu	Campo Alegre, SC (2)	26°02'17"S, 48°57'27"W	GCL 274
tucumanensis (TU)			
TUcn	Candelaria, Misiones, AR (3)	27°28'15"S, 55°47'04"W	JR s.n.
TUgr	Garupá, Misiones, AR (3)	27°28'33"S, 55°50'42"W	JR s.n.
TUmu	Santa Maria, RS (5)	29°42'54"S, 53°43'08"W	GCL 324
ulei (UL)			
ULur	Urubici, SC (5)	28°07'04"S, 49°28'58"W	GCL 281
ulei2 (UL2)			
UL2bb	São José do Barreiro, SP (2)	22°42'39"S, 44°35'04"W	GCL 372
UL2bo	São José do Barreiro, SP (2)	22°44'32"S, 44°36'58"W	GCL 369
UL2bp	São José do Barreiro, SP (2)	22°43'45"S, 44°38'14"W	GCL 373
UL2it	Itatiaia, RJ (6)	22°21'46"S, 44°44'34"W	GCL 367
ulei3 (UL3)			
UL3ag	Aiuruoca, MG (4)	22°01'02"S, 44°40'19"W	GCL 363
UL3ag	Aiuruoca, MG (2)	22°01'02"S, 44°40'19"W	GCL 362
UL3al	Campos do Jordão, SP (5)	22°43'01"S, 45°27'37"W	GCL 377
UL3ap	Aiuruoca, MG (6)	22°03'17"S, 44°40'34"W	GCL 361
UL3sa	Campos do Jordão, SP (5)	22°41'09"S, 45°28'37"W	GCL 380
uruguayensis (UR)			
URca	Capão da Canoa, RS (5)	29°42'05"S, 49°59'04"W	GCL 289
URcd	Cidreira, RS (4)	30°09'17"S, 50°12'00"W	GCL 286
URin	Canelones, Uruguai (5)	34°46'21"S, 55°37'48"W	AG s.n.
URmo	Mostardas, RS (5)	31°14'58"S, 50°59'30"W	GCL 307
URpo	Rocha, Uruguai (5)	34°22'27"S, 53°49'14"W	AG s.n.
URvi	Viamão, RS (5)	30°15'51"S, 51°01'17"W	GCL 305

<i>H. abscondita</i>	Morro do Chapéu, BA (2)	12°36'11"S, 41°28'36"W	GCL 206
<i>H. edwallii</i>	Água Doce, PR (1)	51°34'17"S, 26°35'39"W	GCL 271
<i>H. leucosantha</i>	Guará, DF (1)	15°48'27"S, 47°58'27"W	JANB 1604
<i>H. secunda</i>	Nova Friburgo, RJ (3)	22°21'38"S, 42°30'50"W	JANB 2640

¹ Os vouchers estão depositados no herbário BHCB. Abreviações: GCL = G. Cruz-Lustre, AG = A. González,

JANB = J.A.N. Batista, JR = J. Radins.

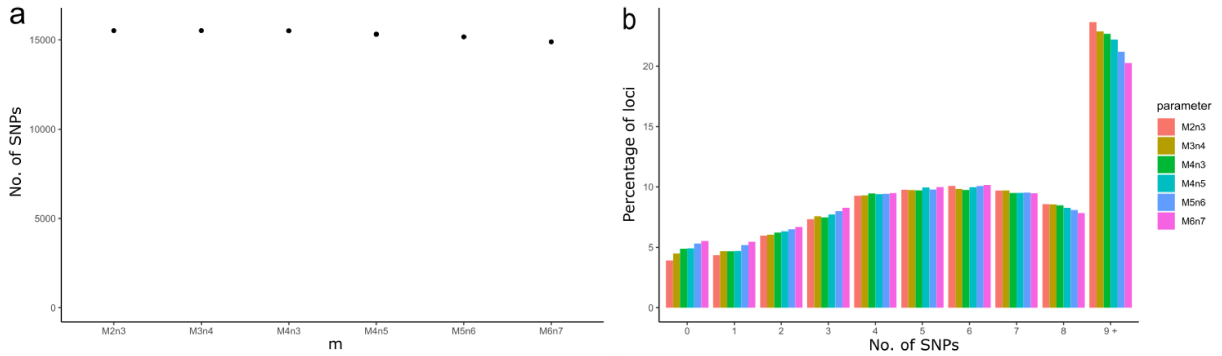


Figura S1. Seleção dos parâmetros para a análise *de novo* realizada no Stacks das amostras do complexo *Habenaria parviflora* e outros representantes de *Habenaria* recuperados em 80% das amostras incluídas. Uma sub-amostragem representativa (95 indivíduos) foi utilizada para otimizar a seleção de parâmetros. a) Número total de SNPs. b) Distribuição da porcentagem de *loci* com diferentes números de SNPs para cada combinação de parâmetros utilizados na análise. Todas as análises foram realizadas com a cobertura mínima de três *reads* por alelo ($m = 3$).

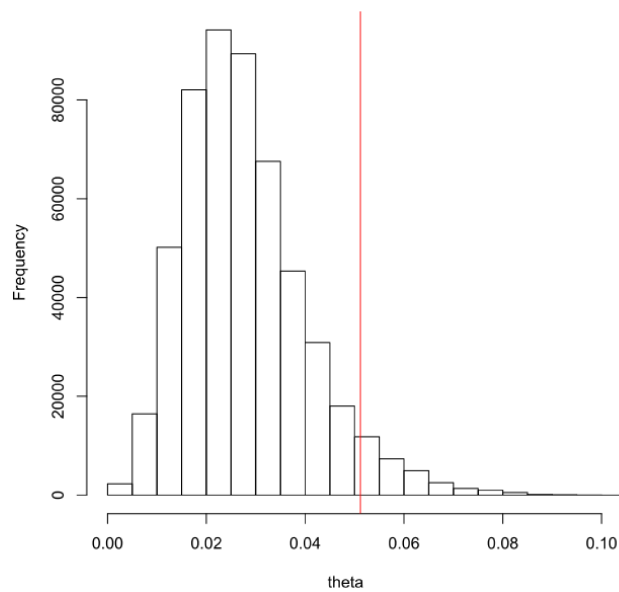


Figura S2. Histograma da frequência de *loci* com diferentes valores de variabilidade genética (baseada no valor estimado de theta) para as amostras do complexo *Habenaria parviflora* e outros representantes de *Habenaria*. A linha vermelha indica o quantil de variabilidade maior do que 95%.

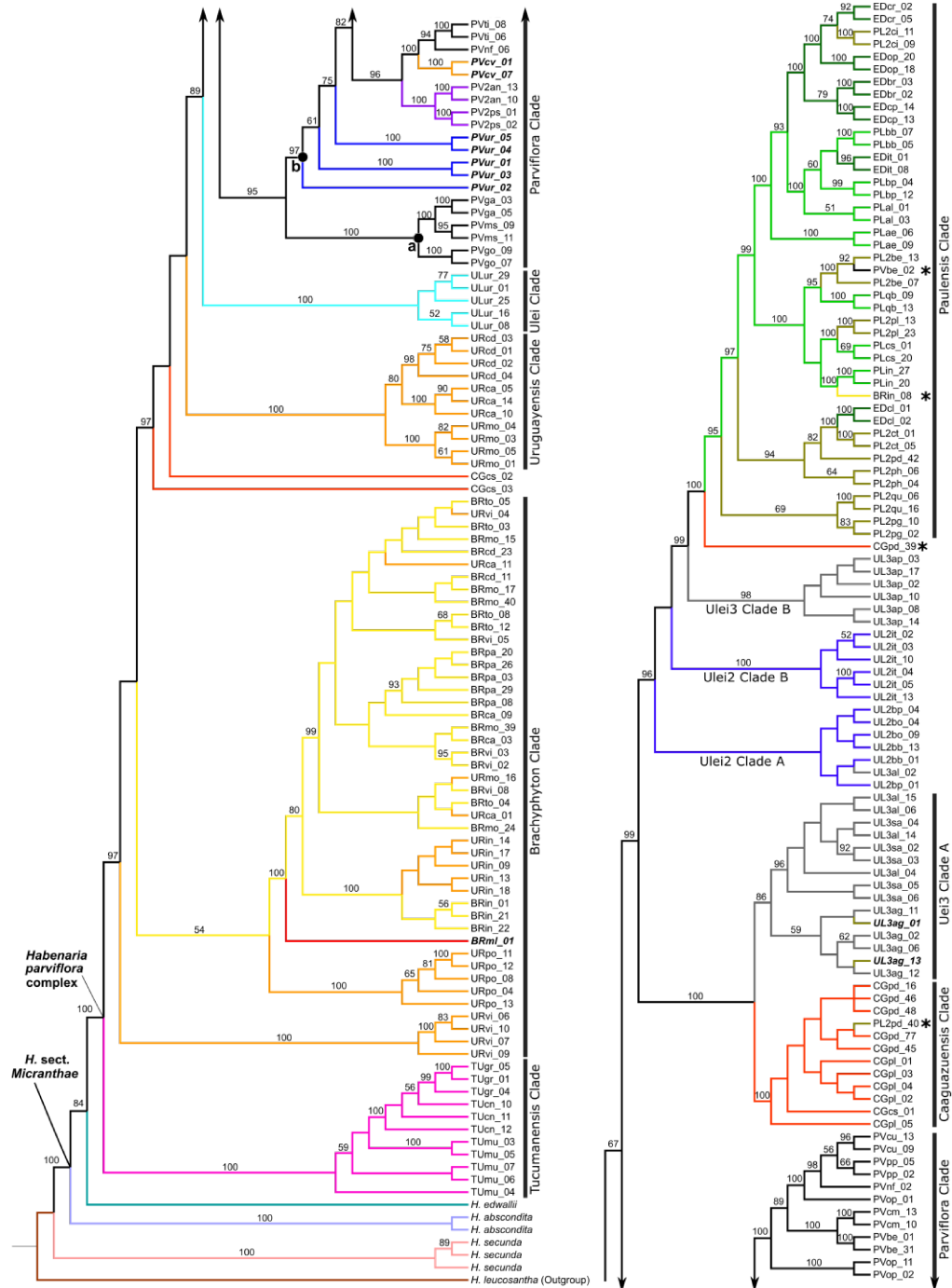


Figura S3. Árvore de consenso estrito das duas árvores mais parcimoniosas de *Habenaria* sect. *Micranthae* e do complexo *H. parviflora*, inferida com parcimônia a partir de dados genômicos, incluindo 203 indivíduos e 28.775 caracteres [21.244 (74%) caracteres informativos]. Comprimento das AMP = 114.272 passos, índice de consistência = 0,21, índice de retenção = 0,69. Números correspondem aos valores de suporte (bootstrap $\geq 50\%$). Clados principais estão delimitados por barras laterais e subclados por círculos nos nós. As cores representam a classificação com base em dados morfológicos (morfortipos), e indivíduos com posicionamento inesperado no PCA estão destacados por um asterisco. Indivíduos de populações com morfortipos reclassificados estão indicadas em negrito e itálico: *CGml* para *BRml*, *PL2ag* para *UL3ag*, *UL2ur* para *PVur*, *URcv* para *PVcv* (veja a seção Discussão para explicação sobre a reclassificação). Veja Tabela 1 para nomes das populações e morfortipos.

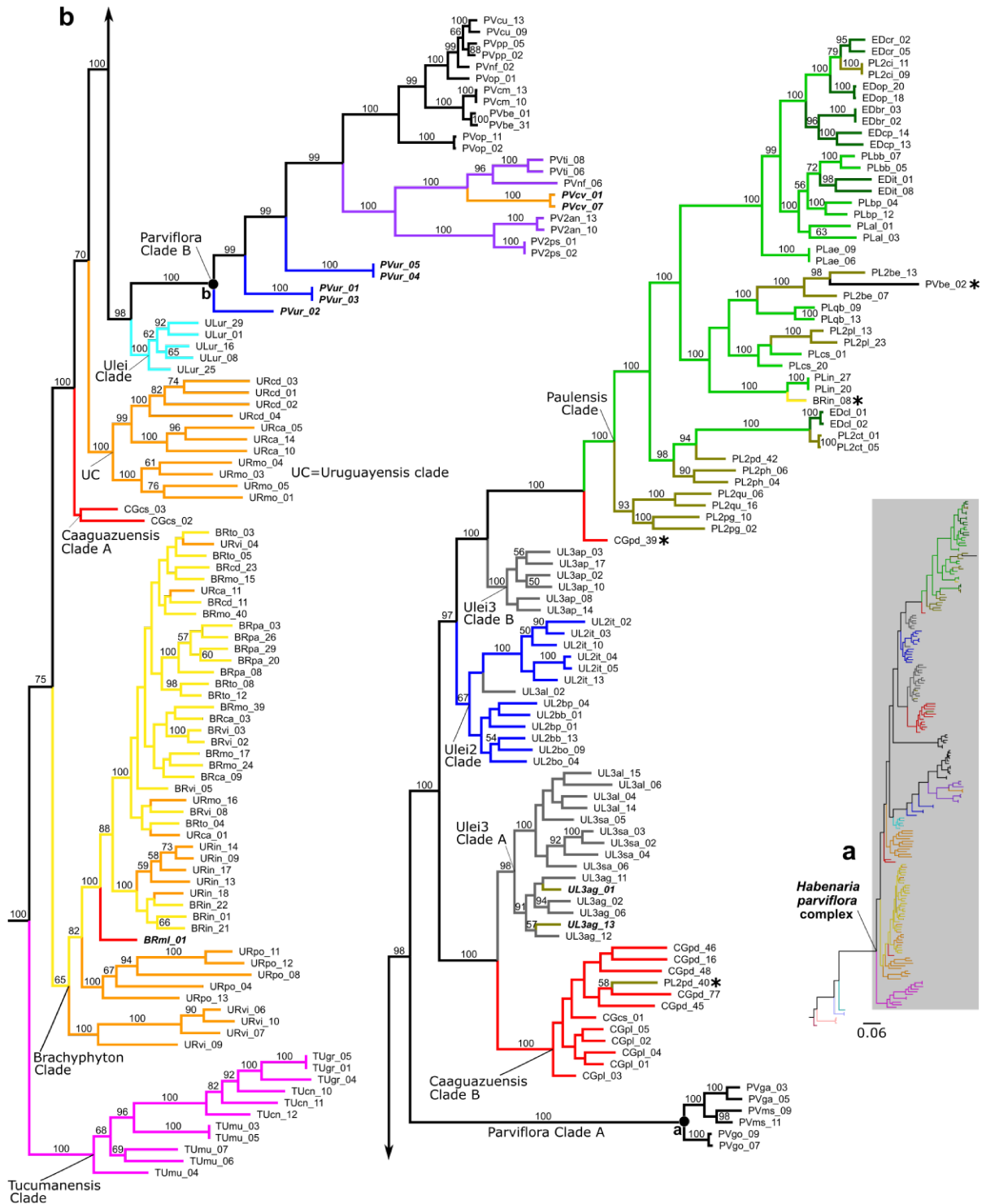


Figura S4. Filograma de *Habenaria* sect. *Micranthae* (a) e do complexo *H. parviflora* (b) inferido com RAxML a partir de dados genômicos, incluindo 203 indivíduos e 28.775 caracteres. Números correspondem aos valores de suporte (bootstrap $\geq 50\%$). Clados principais estão indicados diretamente, enquanto subclados estão indicados por círculos nos nós. As cores representam a classificação com base em dados morfológicos (morfortipos), e indivíduos com posicionamento inesperado no PCA estão destacados por um asterisco. Indivíduos de populações com morfortipos reclassificados estão indicadas em negrito: *CGml* para *BRml*, *PL2ag* para *UL3ag*, *UL2ur* para *PVur*, *URcv* para *PVcv* (veja a seção Discussão para explicação sobre a reclassificação). Veja Tabela 1 para nomes das populações e morfortipos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Trabalhar com grupos de divergência recente e com grande complexidade morfológica e genética constitui um desafio, mas ao mesmo tempo possibilita abordar não somente a delimitação de espécies, mas também o entendimento dos processos que direcionam essa diversidade e formular novas perguntas. Os dados gerados neste trabalho, embora ainda não tenham sido completamente explorados no entendimento da complexidade do grupo, possibilitaram a consecução da maior parte dos objetivos iniciais. Nossos resultados não apenas corroboraram que *H. gollmeri* pertence à *H. sect. Micranthae*, mas também desvendaram uma espécie nova, *H. abscondita* sp. nov., ressaltando a importância das unidades de conservação, das explorações botânicas e dos trabalhos taxonômicos. Adicionalmente este trabalho revelou novos caracteres morfológicos que podem ser taxonomicamente informativos para grupos similares.

No que concerne às análises moleculares, nossos resultados evidenciaram a potencialidade e versatilidade da abordagem experimental adotada (GBS), que através de um único procedimento produziu dados aplicáveis a diferentes tipos de análises. Na proposta original deste trabalho planejamos analisar a variação genética com marcadores microsatélites e as relações filogenéticas com marcadores pré-selecionados obtidos através de sequenciamento Sanger. No entanto, o baixo número de marcadores microsatélites disponíveis, as dificuldades na transferibilidade destes para as amostras do complexo *H. parviflora* e o baixo polimorfismo nucleotídico dos marcadores testados (ITS, *matK-trnK*, *rps16-trnK*, *atpI-atpH*, *petL-psbE*, *psbD-trnT*, *psbJ-petA*, *rpoB-trnC*, *trnL-trnF*, *ycf1*, *trnQ-5'-rps16*, *3'trnV-ndhC*) indicaram que seria difícil atingir os objetivos propostos com essas abordagens.

Através do sequenciamento massivo de amostras populacionais obtivemos um elevado número de caracteres informativos. Embora estes dados não tenham resolvido completamente as relações do complexo *H. parviflora*, mostraram uma resolução superior à obtida com os marcadores tradicionais, incluindo subestruturação em alguns grupos. Estes dados também revelaram padrões de mistura genética que atualmente estamos explorando. Tendo como base os resultados apresentados, esperamos desenvolver uma série de trabalhos adicionais sobre diversidade genética, filogeografia e hibridação para compreender melhor os processos associados à complexidade taxonômica e evolução do grupo e contribuir de maneira mais sólida na interpretação dos padrões de diversificação das vegetações campestres da América do Sul.