



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



ALINE JOSEPH RAMALHO

ANÁLISE FILOGENÉTICA DO CLADO NEOTROPICAL DE
***Habenaria* (ORCHIDACEAE) BASEADA EM DADOS**
MOLECULARES E MORFOLÓGICOS

Dissertação 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 Mestre em Biologia Vegetal.

Área de Concentração Taxonomia Vegetal

BELO HORIZONTE – MG

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Botânica

Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal



ALINE JOSEPH RAMALHO

ANÁLISE FILOGENÉTICA DO CLADO NEOTROPICAL DE
***Habenaria* (ORCHIDACEAE) BASEADA EM DADOS**
MOLECULARES E MORFOLÓGICOS

Dissertação 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 Mestre em Biologia Vegetal.

Área de Concentração Taxonomia Vegetal

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

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Cézanne de Souza Assis
Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE – MG

2014

043

Ramalho, Aline Joseph.

Análise filogenética do clado neotropical de *Habenaria* (Orchidaceae) baseada em dados moleculares e morfológicos [manuscrito] / Aline Joseph Ramalho. – 2014.

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

Orientador: João Aguiar de Nogueira Batista. Co-orientador: Leandro Cézarne de Souza Assis.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Botânica.

1. *Habenaria* – América Latina - Teses. 2. Orquídea – Teses. 3. Filogenia- Teses. 4. Morfologia vegetal – Teses. 5. Plantas – Biologia molecular. 6. Biologia vegetal – Teses. I. Batista, João Aguiar de Nogueira. II. Assis, Leandro Cézarne de Souza. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Botânica. IV. Título.

CDU: 581

**Dissertação defendida e aprovada, em 19 de fevereiro de 2014, pela
banca examinadora constituída pelos professores:**

João Nogueira

Dr. João Aguiar Nogueira Batista – orientador

Luiz Menini Neto

Dr. Luiz Menini Neto

Alexandre Salino

Dr. Alexandre Salino

“Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou tv. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas próprias árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sobre o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver”

Amyr Klink, em “Mar sem fim”

Dedico aos **MEUS QUERIDOS AMIGOS**

E, em **ESPECIAL** aos eternos amores da minha
vida: Aurino, Celia e Andreia.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à todos os amigos, que de formas diferentes me proporcionaram momentos de alegria, reflexões, aprendizado, troca de conhecimentos, companheirismo, leituras, discussões científicas e da vida, carinhos, cuidados e de uma verdadeira amizade. O mestrado foi construído com todos esses momentos, juntamente com as alegrias e choros, lanches e jejuns e de muitas conversas criativas regada a muito café com chocolate.

Às empresas de fomento (CNPq, Fapemig, Capes), por aprovarem os projetos que garantiram a bolsa nesse mestrado, o desenvolvimento do trabalho específico, os auxílios financeiros aos congressos e viagens.

Ao meu orientador, João Aguiar Nogueira Batista, pela oportunidade de trabalhar, aprender e apreender sobre sistemática e taxonomia de um grande gênero na família Orchidaceae: *Habenaria*. Pela paciência em me ensinar sobre esse gênero, suas peculiaridades, analisar o grupo em um contexto ecológico, filogenético e biogeográfico. Pela confiança depositada em mim desde 2007. Pelos desafios gerados em cada projeto.

Ao meu coorientador, Leandro Cézanne de Souza Assis, por ter aceitado esse desafio de me auxiliar nesse trabalho com ideias excelentes e inovadoras (para mim), dando subsídio para o desenvolvimento das análises morfológicas, que pouco eu conhecia, discussões sobre os vários conceitos de homologia e comparar as análises morfológica e molecular.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite de avaliar o trabalho e a disponibilidade em contribuir com os seus conhecimentos para a melhoria e crescimento desse trabalho.

À todos os professores do Departamento de Botânica, por me mostrarem a importância da botânica e ensinarem-me a conhecer o funcionamento dos sistemas das plantas, suas células, classificação em um grupo e a interação com outros vegetais ou outros organismos totalmente diferente e o ambiente.

Ao colegiado do programa de pós-graduação em Biologia Vegetal, nos professores que tiveram presente na coordenação no período que cursei o mestrado: Cleber Cunha

Figueiredo, Denise Maria Trombert de Oliveira e João Renato Stehmann. Obrigada por vocês estarem sempre dispostos e solícitos a atenderem os “probleminhas”, nossas angústias e aflições, além de proporcionarem momentos de muito conhecimento e atenção na ciência das plantas e na vida.

Às secretárias que acompanharam minha caminhada no departamento de Botânica: Maria Márcia Araújo Dias, Sara Rocha de Almeida Costa, Sônia Mara de Oliveira Costa, Terezinha de Jesus Alves e Denise Márcia Figueiredo Monteiro pelo apoio logístico e principalmente pela amizade incondicional, atenção e carinho. A nossa querida Selma Carvalho Lema, “Selminha”, por manter a organização e higienização, indispensáveis para o desenvolvimento dos nossos trabalhos, além da preocupação com todos, sem distinção.

À todos os amigos que fiz em todos os laboratórios do departamento, sem nenhuma diferença, sempre sendo bem tratada por todos com carinho, atenção, preocupação e amizade. Peço desculpa por não citar o nome de todos, não gostaria de deixar ninguém de fora, mas lembrarei sempre de todos os momentos que passamos e das risadas compartilhadas.

Aos amigos pela força e apoio em cada jornada e em especial aos que a botânica me proporcionou. A Thaís Almeida, Luciana Kamino, Leandro Giacomini, Bruna Ladeira Lau, Antônio Massensini Jr., Bárbara Leal, Cleber Chaves, Frederic Hughes, Francine Costa, Giovanna Giudicelli, Marcela Baroni, Ana Carolina Marinho, Renê Carneiro, Anete Formiga, Denise Trombert, Élder Paiva, Eduardo Borba, Luzia Modolo, Márcio Werneck, Queila Garcia, Gustavo Santos, Vinícius Kuster, Rosy Isaías, Fernando Silveira, Fernando Vale, Ary Oliveira Filho, Cláudio Nicoletti, Livia Echternacht, Nara Mota, Pedro Viana, Pablo Burkowski, André Arruda, Érica Borsali, Rafaela Cardoso, Cecília Fiorini, Ariane Raquel Barbosa, Ana Paula Vimieiro, Karina Schulz, Marcos de Melo, Ravena Dias, Danilo Neves, Ana Paula Faria, Bruno Garcia. E, os amigos além dos muros da botânica: Fabiana Cerqueira Martins, Fabrício Vinhas, Isis Caroline Oliveira, Letícia Gentilini, Maria Acácia Tiburcio, Lelia Silva de Assis, Karina Vasconcelos. Sei que vocês sempre torceram por essa conquista e sou grata por tudo.

Em especial, agradeço a minha família por sempre estarem comigo e apoiaram incondicionalmente cada escolha feita e por correm riscos com essas escolhas. Por

acreditarem em mim e por tornarem o meu sonho, sonho de todos. Pelo amor, carinho, paciência e compreensão dos grandes exemplos de vida, Aurino Ramalho e Celia Maria Joseph, pelo incentivo e permanente apoio em todas as etapas. À minha irmã, Andreia Joseph Ramalho, pela cumplicidade incondicional, pelas alegrias e tristezas compartilhadas e a vibração em cada conquista. Amo vocês!!!!

A Deus por abençoar e iluminar a minha caminhada e a minha mente na incessante busca pelo conhecimento, sustentando a minha fé ao longo desta árdua jornada e por todas as pessoas, indistintamente, que entrariam em minha vida e que me proporcionariam crescimento pessoal e profissional, e que me enriquecessem com as suas histórias.

A todos esses amigos maravilhosos existentes em minha vida, **MUITO OBRIGADA!**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diversidade da morfologia floral de *Habenaria* para a Região Neotropical. A. *H. rupicola* Barb.Rodr.; B. *H. paranaensis* Barb.Rodr.; C. *H. parviflora* Lindl.; D. *H. trifida* Kunth.; E. *H. hamata* Barb.Rodr.; F. *H. mystacina* Lindl.; G. *H. leucosantha* Barb. Rodr.; H. *H. rolfeana* Schltr; I. *H. pungens* Cogn. 14
- Figura 2. Morfologia floral de *Habenaria*. A. Planta, B. Morfologia da Flor; C. Morfologia da Coluna 16
- Figura 3a. Árvore Bayesiana da análise combinada dos marcadores *ITS* e *matK*. Os valores de probabilidade posterior da análise Bayesiana e de *bootstrap* da parcimônia são mostrados acima dos ramos. As abreviaturas de três letras a direita do nome da espécie indica em qual seção está inserida de acordo com os tratamentos de Kränzlin (1892, 1901) e Cogniaux (1893). Nomes entre parênteses indicam os gêneros propostos por Szlachetko (2003a, 2003b, 2004a, 2004b). A classificação seccional das espécies africanas também é mostrada. Os subclados terminais bem suportados do clado Neotropical estão numerados de 1 a 21 19
- Figura 3b. Continuação da figura 3a. Na árvore da direita são mostrados os comprimentos dos ramos 20
- Figura 4. Árvore filogenética de consenso estrito dos dados morfológicos. Os valores nos ramos indicam suporte de *bootstrap*. As cores representam *Bonatea* (vermelho), *Habenaria* africanas (azul) e *Gennaria* (verde) 39
- Figura 5. Árvore de consenso estrito, a partir de dados moleculares (marcadores *ITS* e *matK*). Os valores nos ramos indicam suporte de *bootstrap*. As cores representam *Bonatea* (vermelho), *Habenaria* africanas (azul) e *Gennaria* (verde) 41
- Figura 6. Árvore de consenso estrito, a partir de dados morfológicos e moleculares (marcadores *ITS* e *matK*). Os valores indicados nos ramos são valores de *bootstrap*. Os valores nos ramos indicam suporte de *bootstrap*. As cores representam *Bonatea* (vermelho), *Habenaria* africanas (azul) e *Gennaria* (verde) 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação das principais propostas de classificação (seções e tratamentos informais) do gênero <i>Habenaria</i> para a Região Neotropical, Brasil e México entre os diferentes autores	17
Tabela 2. Lista das espécies analisada nesse estudo com os respectivos números de acessos das sequências no GenBank	22
Tabela 3. Matriz Morfológica. Lista dos caracteres levantados para cada espécie analisada. A interrogação (?) representa o estado de caráter não conhecido	35
Tabela 4. Dados das análises de parcimônia	38

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1. Introdução	13
1.1. Análise filogenética do gênero <i>Habenaria</i>	17
2. Objetivos	21
3. Material e métodos.....	22
3.1. Táxons amostrados.....	22
3.2. Enraizamento	24
3.3. Levantamento dos dados moleculares	24
3.4. Levantamento dos dados morfológicos	25
3.5. Análises filogenéticas	25
4. Resultados	26
4.1. Caracteres morfológicos	26
4.2. Análise filogenética dos dados morfológicos	38
4.3. Análise filogenética dos dados moleculares	40
4.4. Análise filogenética dos dados combinados	42
5. Discussão	44
6. Conclusão.....	46
7. Referências bibliográficas.....	47

RESUMO

O presente trabalho apresenta uma análise filogenética do clado neotropical de *Habenaria* (Orchidaceae) com base em dados moleculares e morfológicos. Os objetivos foram: (i) analisar as relações evolutivas de *Habenaria* da Região Neotropical, a partir de análises filogenéticas baseadas em dados moleculares e morfológicos; (ii) comparar as topologias obtidas das análises separadas e combinadas; e (iii) auxiliar no entendimento da taxonomia e da evolução morfológica do grupo. Foram utilizadas 75 espécies, incluindo *Habenaria* (Região Neotropical e africana), *Bonatea* e *Gennaria*. Foram obtidos 36 caracteres morfológicos, enquanto os 1383 caracteres moleculares foram extraídos de análises previamente publicadas. Foram executadas análises de parcimônia dos dados separados e combinados, e apresentadas árvores de consenso estrito. A maior resolução foi obtida pela análise molecular, enquanto as topologias morfológica e combinada apresentaram baixa resolução. O monofilismo do clado neotropical de *Habenaria* foi recuperado apenas nas análises molecular e combinada. Sinapomorfias morfológicas para esse clado e seus subclados não foram identificadas. *Bonatea* apareceu como um grupo monofilético em todas as análises, com várias sinapomorfias morfológicas. Embora a análise morfológica não tenha gerado resultados satisfatórios, este foi o primeiro trabalho do clado neotropical de *Habenaria* utilizando caracteres morfológicos e combinados num contexto filogenético.

Palavras chaves: *Habenaria*, Orchidaceae, Região Neotropical, caracteres morfológicos, análise filogenética

ABSTRACT

This work presents a phylogenetic analysis of the neotropical clade of *Habenaria* (Orchidaceae) based on molecular and morphological data. The objectives were: (i) analyze the evolutionary relationships of the neotropical clade of *Habenaria* from phylogenetic analyzes based on molecular and morphological data; (ii) compare the topologies obtained from separate and combined analyzes; and (iii) assist in the understanding of the taxonomy and morphological evolution of the group. 75 species, including *Habenaria* (Neotropical and African), *Bonatea* and *Gennaria* were used. 36 morphological characters were obtained, while 1383 molecular characters were obtained from previously published analyzes. Parsimony analysis of separate and combined data were performed and strict consensus trees presented. The highest resolution was obtained by molecular analysis, while the morphological and combined topologies presented low resolution. The monophyly of the Neotropical clade of *Habenaria* was recovered only in the molecular and combined analyzes. Morphological synapomorphies for this clade and its subclades were not identified. *Bonatea* appeared as a monophyletic group in all analyzes, with several morphological synapomorphies. Although the morphological analysis did not produce satisfactory results, this was the first work of the neotropical clade of *Habenaria* using morphological characters and combined with molecular data in a phylogenetic context.

Kew words: *Habenaria*, Orchidaceae, neotropical, morphological characters, phylogenetic analyzes.

1. Introdução

Orchidaceae é uma das maiores famílias de angiospermas no mundo, com aproximadamente 25.000 espécies (Dressler, 2005), com distribuição em praticamente todos os continentes (Dressler, 1993, 2005). O gênero *Habenaria* Willd. pertence à subfamília Orchidoideae, à tribo Orchideae e à subtribo Orchidinae. *Habenaria* é o maior gênero de orquídeas terrícolas, com aproximadamente 835 espécies (Govaerts et al., 2010). O gênero está distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do Velho e Novo Mundo (Pridgeon et al., 2001a), e possui centros de diversidade no Brasil, África central e sul, e leste da Ásia (Kurzweil & Weber, 1992). Aproximadamente 300 espécies ocorrem na Região Neotropical (Batista et al., 2011a, Batista et al. 2011b).

A morfologia vegetativa de *Habenaria* para a Região Neotropical caracteriza-se pelo caule ereto, simples; folhas alternas, espiraladas, muitas vezes adpressas ao caule, parecendo áfilas; inflorescência terminal, simples, geralmente multiflora. A parte reprodutiva caracteriza-se por apresentar flores de tamanhos variáveis, geralmente verdes, mas também brancas ou amareladas; pétalas e labelo geralmente partidos, com os segmentos filiformes, o labelo com um nectário basal (calcar ou esporão); ginostêmio curto; antera ereta fusionada à coluna, persistente (não caduca), dividida em dois lóculos; polínias duas (hemipolinários), sécteis (polínia subdividida em pequenos pacotes, ligados por um material elástico), com caudículo e viscidio, basal; um estigma, dividido em dois lobos, inteiros e livres, não fusionados às pétalas ou ao labelo, projetados, circundando a abertura do calcar (figura 1 e 2) (Pridgeon et al., 2001).

As flores, geralmente, são pequenas e pouco vistosas, produzem néctar e exalam um perfume noturno. A polinização é feita durante a noite por mariposas ou mosquitos. Os insetos são atraídos pela fragrância e pela oferta de néctar. A taxa de polinização é alta e a quantidade de frutos formados normalmente é grande. A maturação dos frutos é rápida e em alguns casos uma mesma inflorescência pode ter frutos abertos na base e flores novas no ápice. Após a maturação dos frutos, a parte aérea (caule e folhas) geralmente seca e morre (Singer, 2001, 2007).

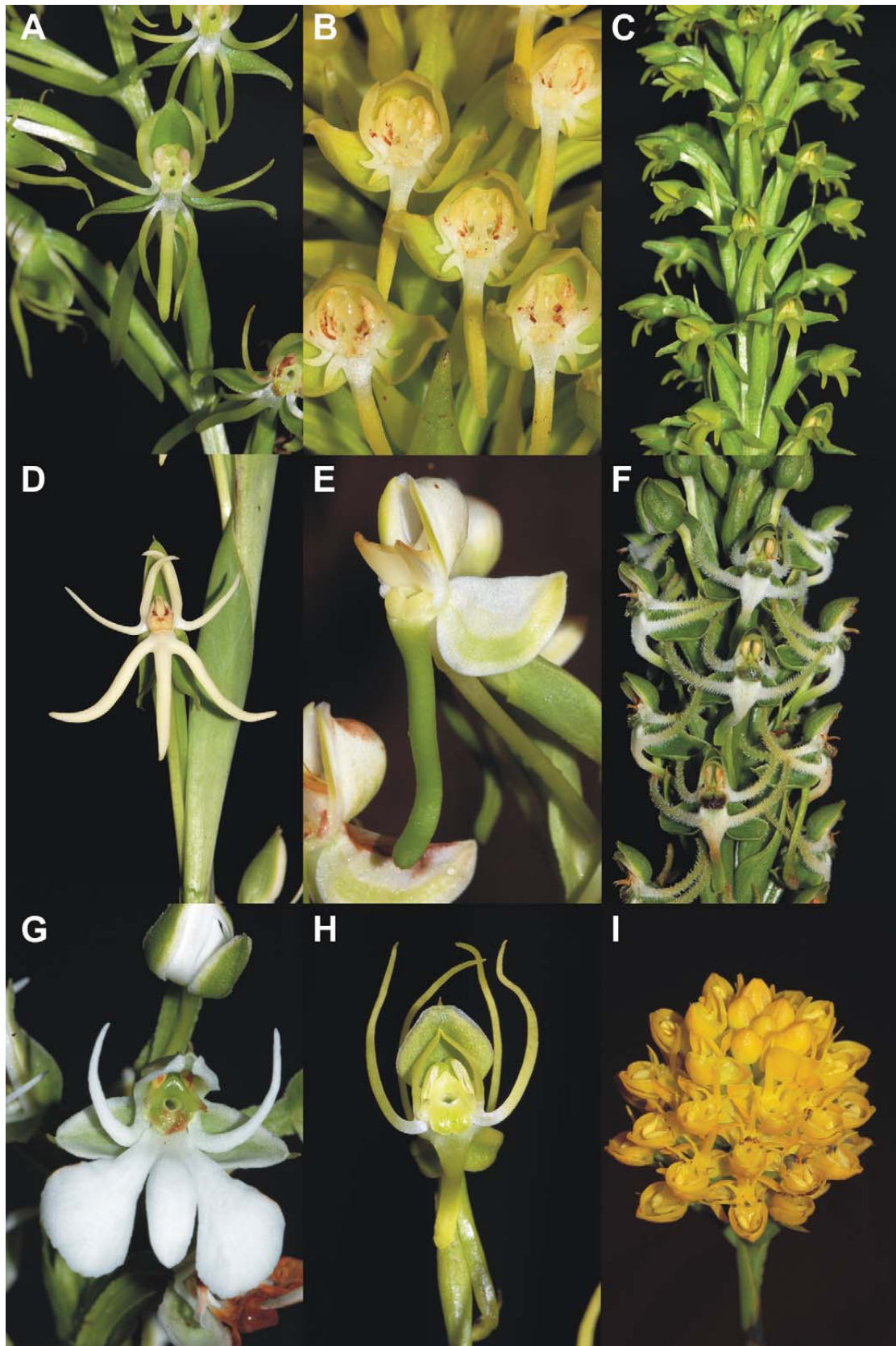


Figura 1. Diversidade da morfologia floral de *Habenaria* para a Região Neotropical. **A.** *H. rupicola* Barb.Rodr.; **B.** *H. paranaensis* Barb.Rodr.; **C.** *H. parviflora* Lindl.; **D.** *H. trifida* Kunth.; **E.** *H. hamata* Barb.Rodr.; **F.** *H. mystacina* Lindl; **G.** *H. leucosantha* Barb. Rodr.; **H.** *H. rolfeana* Schltr; **I.** *H. pungens* Cogn.

Habenaria é exclusivamente terrícola, todavia, há registro de uma espécie africana de hábito epifítico (Pridgeon et al., 2001a). O gênero é encontrado principalmente em regiões de clima sazonal, com uma estação chuvosa bem definida e uma estação seca. As plantas são perenes, mas os caules e folhas são anuais. Cada ciclo de crescimento anual normalmente inicia-se com a chegada das chuvas. Com a disponibilidade de água, brota um novo caule a partir da reserva de nutrientes acumulados na tubera subterrânea. Com os recursos produzidos pela nova brotação é formado um nova tubera (Hoehne, 1940). A tubera anterior subsiste por algum tempo ao lado do novo, mas depois degenera. Com a chegada do período de seca a parte aérea morre gradualmente, e a planta subsiste apenas pela tubera enterrada no solo até a estação chuvosa seguinte (Hoehne, 1940). O crescimento e floração da grande maioria das espécies ocorrem entre novembro a abril, que corresponde ao período chuvoso. Algumas poucas espécies crescem e florescem durante a estação seca, entre maio a outubro, mas nesse caso, as plantas são sempre de ambientes muito úmidos, onde há disponibilidade de água durante todo o ano (Batista et al., 2005).

A maioria das espécies é de distribuição ampla na Região Neotropical, como exemplo a *Habenaria trifida* Kunth, entretanto, algumas espécies possuem distribuição mais ou menos restrita, é o caso da *Habenaria itacolumia* Garay (Batista et al., 2011a). Grande parte das espécies ocorre em formações campestres, sendo que o maior número é encontrado nos campos limpos úmidos. Algumas espécies também ocorrem em campos secos, cerrados ou encostas rochosas secas. Poucas espécies ocorrem em ambientes florestais e poucas são tipicamente aquáticas, crescendo dentro da água na margem de lagos, córregos ou rios (Hoehne, 1940; Pridgeon, 2001a). Algumas espécies podem ocupar áreas antropizadas, como pastos e beiras de estradas, tornando-se comuns, como *Habenaria petalodes* Lindl. (Batista et al., 2004).

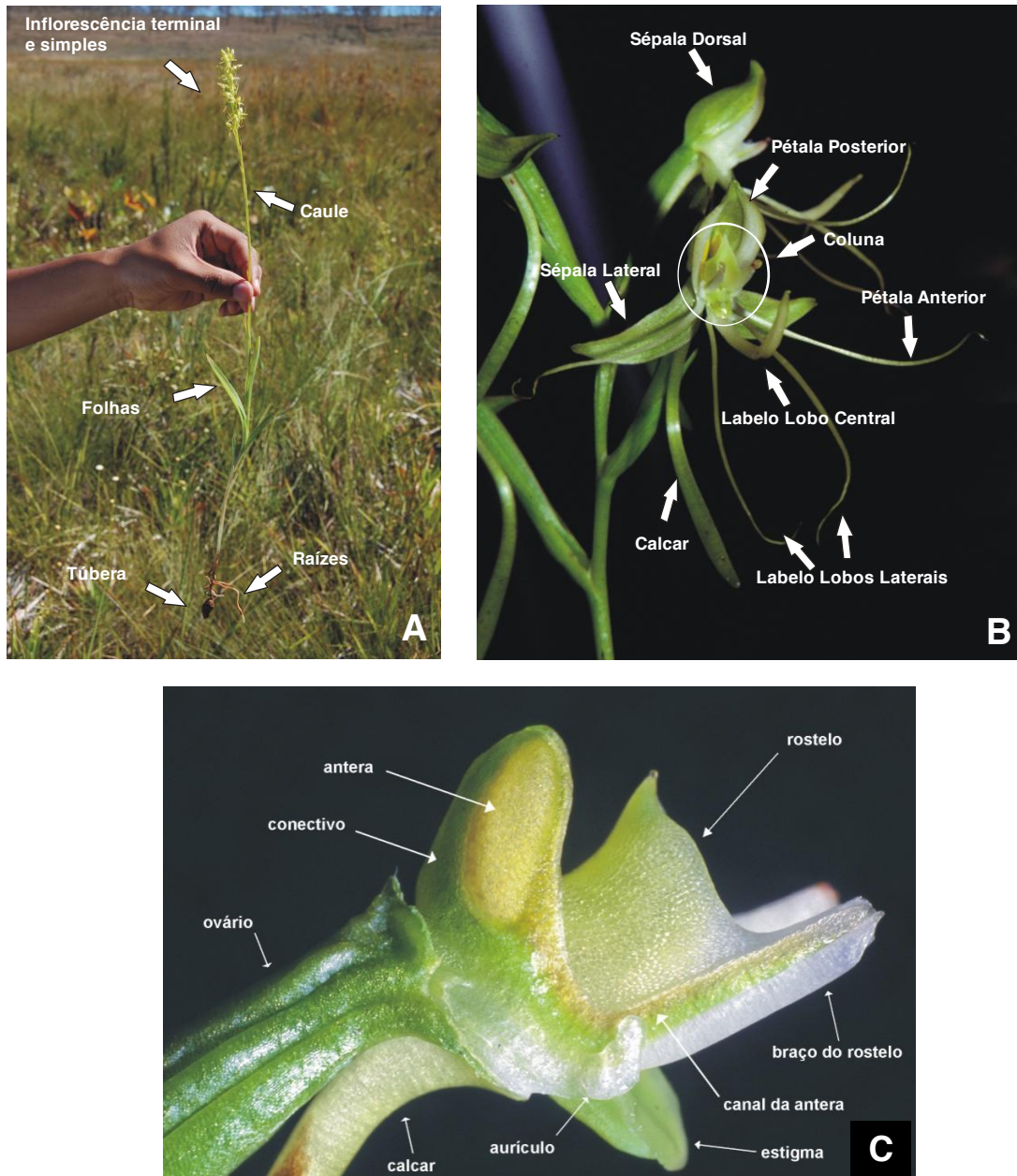


Figura 2. Morfologia floral de *Habenaria*. A. Planta, B. Morfologia da Flor; C. Morfologia da Coluna.

As únicas revisões realizadas para o gênero em nível mundial foram feitas por Kränzlin (1892, 1901), que reconheceu 427 espécies distribuídas em 32 seções, sendo que para a Região Neotropical foram reconhecidas 105 espécies em 12 seções. Kränzlin baseou a caracterização das seções principalmente no grau de divisão das pétalas e do labelo, na estrutura da coluna, e no comprimento dos estigmas. Cogniaux (1893), no tratamento do gênero na Flora *Brasiliensis*, seguiu praticamente o mesmo tratamento de Kränzlin (1892, 1901). Na Flora *Brasilica*, Hoehne (1940) revisou as

espécies brasileiras, reconhecendo 170 espécies distribuídas em nove grupos. Tais grupos foram criados como grupos informais com objetivo de estabelecer chaves para as espécies. No inventário de orquídeas do Brasil realizado por Pabst & Dungs (1975, 1977), foram reconhecidas 165 espécies. Os autores seguiram a mesma divisão proposta por Hoehne (1940), mas com algumas modificações e novas características para distinguir grupos que foram chamados de alianças. Tamayo (1993) fez um tratamento das espécies mexicanas e reconheceu 12 grupos supostamente naturais, mas sem fazer nenhuma correlação com os tratamentos seccionais previamente feitos (tabela 1).

Tabela 1. Comparação das principais propostas de classificação (seções e tratamentos informais) do gênero *Habenaria* para a Região Neotropical, Brasil e México entre os diferentes autores.

Kraenzlin (1892) Neotropical Seção (12)	Cogniaux (1893) Brasil Seção (12)	Kraenzlin (1901) Neotropical Seção (12)	Hoehne (1940) Brasil Grupos (9)	Pabst & Dungs (1975) Brasil Aliança (13)	Tamayo (1993) México Complexo (12)
<i>Macroceratitae</i> Kraenzl.	<i>Macroceratitae</i> Kraenzl.	<i>Macroceratitae</i> Kraenzl.	Macroceratitis	<i>H. gowrleiana</i>	alata
<i>Sartores</i> Kraenzl.	<i>Nudae</i> Cogn.	<i>Spathaceae</i> Kraenzl.	Laxifloras	<i>H. trifida</i>	pauciflora
<i>Microdactylae</i> Kraenzl.	<i>Microdactylae</i> Kraenzl.	<i>Microdactylae</i> Kraenzl.	Leptoceras	<i>H. leptoceras</i>	distans
<i>Micranthae</i> Kraenzl.	<i>Micranthae</i> Kraenzl.	<i>Micranthae</i> Kraenzl.	Seticauda	<i>H. platanthera</i>	quinqueseta
<i>Pentadactylae</i> Kraenzl.	<i>Pentadactylae</i> Kraenzl.	<i>Pentadactylae</i> Kraenzl.	Subnudas	<i>H. repens</i>	clypeata
<i>Pratenses</i> Kraenzl.	<i>Pratenses</i> Kraenzl.	<i>Pratenses</i> Kraenzl.	Nudas	<i>H. seticauda</i>	clypeata
<i>Maculosae</i> Kraenzl.	<i>Maculosae</i> Kraenzl.	<i>Maculosae</i> Kraenzl.	Pratensis	<i>H. subnuda</i>	schaffneri
<i>Clypeatae</i> Kraenzl.	<i>Clypeatae</i> Kraenzl.	<i>Clypeatae</i> Kraenzl.	Humilis	<i>H. nuda</i>	diffusa
<i>Quadratae</i> Kraenzl.	<i>Microstylinae</i> Kraenzl.	<i>Quadratae</i> Kraenzl.	Guilleminii	<i>H. pratensis</i>	flexuosa
<i>Microstylinae</i> Kraenzl.	<i>Seticaudae</i> Kraenzl.	<i>Microstylinae</i> Kraenzl.		<i>H. humilis</i>	filifera
<i>Seticaudae</i> Kraenzl.	<i>Odontopetalae</i> Kraenzl.	<i>Seticaudae</i> Kraenzl.		<i>H. guilleminii</i>	monorrhiza
<i>Odontopetalae</i> Kraenzl.	<i>Pycnostachyae</i> Cogn.	<i>Odontopetalae</i> Kraenzl.		<i>H. rotundifolia</i>	adenantha
				<i>H. itacolumia</i>	jaliscana
					mitodes

1.1. Análise filogenética do gênero *Habenaria*

Habenaria, apesar de ser o maior gênero da subtribo Orchideae e de ampla distribuição, encontra-se sub-representado em estudos filogenéticos, comparativamente a outros gêneros na tribo, como *Orchis* Tourn. ex L., *Ophrys* L. e *Platanthera* L.C. Rich., que foram extensivamente investigados (Pridgeon et al., 1997; Bateman et al., 1997; Bateman et al., 2003). Provavelmente tal fato pode ser explicado pela dificuldade de acesso ao material genético das espécies, que ocorrem

principalmente no hemisfério sul e são raramente cultivadas. Até o ano de 2013 havia apenas um trabalho que abordou a filogenia de *Habenaria* usando dados moleculares e análises cladísticas (Bateman et al., 2003). Além deste trabalho, algumas poucas espécies foram incluídas no contexto de análises filogenéticas da família (Cameron et al., 1999; Douzery et al., 1999; Kores, et al., 2001; Bellstedt et al., 2001; Ponsie et al., 2007) ou do código de barra de DNA (Lahaye et al., 2008). O trabalho de Bateman et al. (2003), utilizando sequências de *ITS* do DNA ribossomal nuclear, indicou que *Habenaria* é polifilético. Porém, os resultados foram baseados em uma baixa amostragem (apenas 8 espécies foram amostradas) e principalmente em espécies africanas e asiáticas. Contrário aos resultados de Bateman et al. (2003), a relativa homogeneidade na morfologia floral das espécies presentes na Região Neotropical, particularmente quanto a morfologia do ginostêmio, sugeria que as mesmas constituíssem um grupo monofilético (Batista et al., 2013). Mais recentemente, Szlachetko (2003a, 2003b, 2004a, 2004b) elevou várias seções de *Habenaria* ao nível genérico, incluindo algumas seções do novo mundo.

A filogenia molecular de *Habenaria* no Novo Mundo (figura 2a e 2b) proposta por Batista et al. (2013), amostrou 151 táxons, incluindo 113 táxons para a Região Neotropical e 38 táxons em 11 gêneros do Velho Mundo. Nesse trabalho foram utilizados dois marcadores: o espaçador interno transcrito (*ITS*) da família multigênica do RNA ribossomal e parte do gene maturase K (*matK*), do genoma plastidial. Esses marcadores têm sido utilizados nas análises filogenéticas de diversos grupos de Orchidaceae, incluindo a tribo Orchideae (Pridgeon et al., 1997; Bateman et al., 1997; Bateman et al., 2003; Ponsie et al., 2007).

Nesse trabalho foi inferido que (i) as espécies do Novo Mundo formam um grupo monofilético com alto suporte; (ii) o clado Neotropical consiste de ao menos 21 subgrupos monofiléticos bem resolvidos; (iii) todas as 12 seções neotropicais do tratamento seccional (Kränzlin, 1892, 1901) atual são polifiléticas e precisarão ser revistas e circunscritas; (iv) espécies africanas nas seções *Diphyllae*, *Dolichostachyae*, *Ceratopetalae* e *Bilabrellae* formam o grupo-irmão do clado neotropical; (v) os gêneros *Bertauxia* Szlach., *Kusibabella* Szlach. e *Habenella* Small, recentemente segregados do gênero, são parafiléticos ou polifiléticos.

Entre os subgrupos apontados por Batista et al. (2013), alguns são bastante coesos morfologicamente e correspondem em parte a seções previamente descritas.

Entretanto, em vários casos, a uniformidade morfológica dos subgrupos não é clara, diversos táxons não foram bem resolvidos dentro dos subgrupos, e as relações entre esses não puderam ser bem estabelecidas, uma vez que os ramos internos apresentaram, de um modo geral, um suporte baixo.

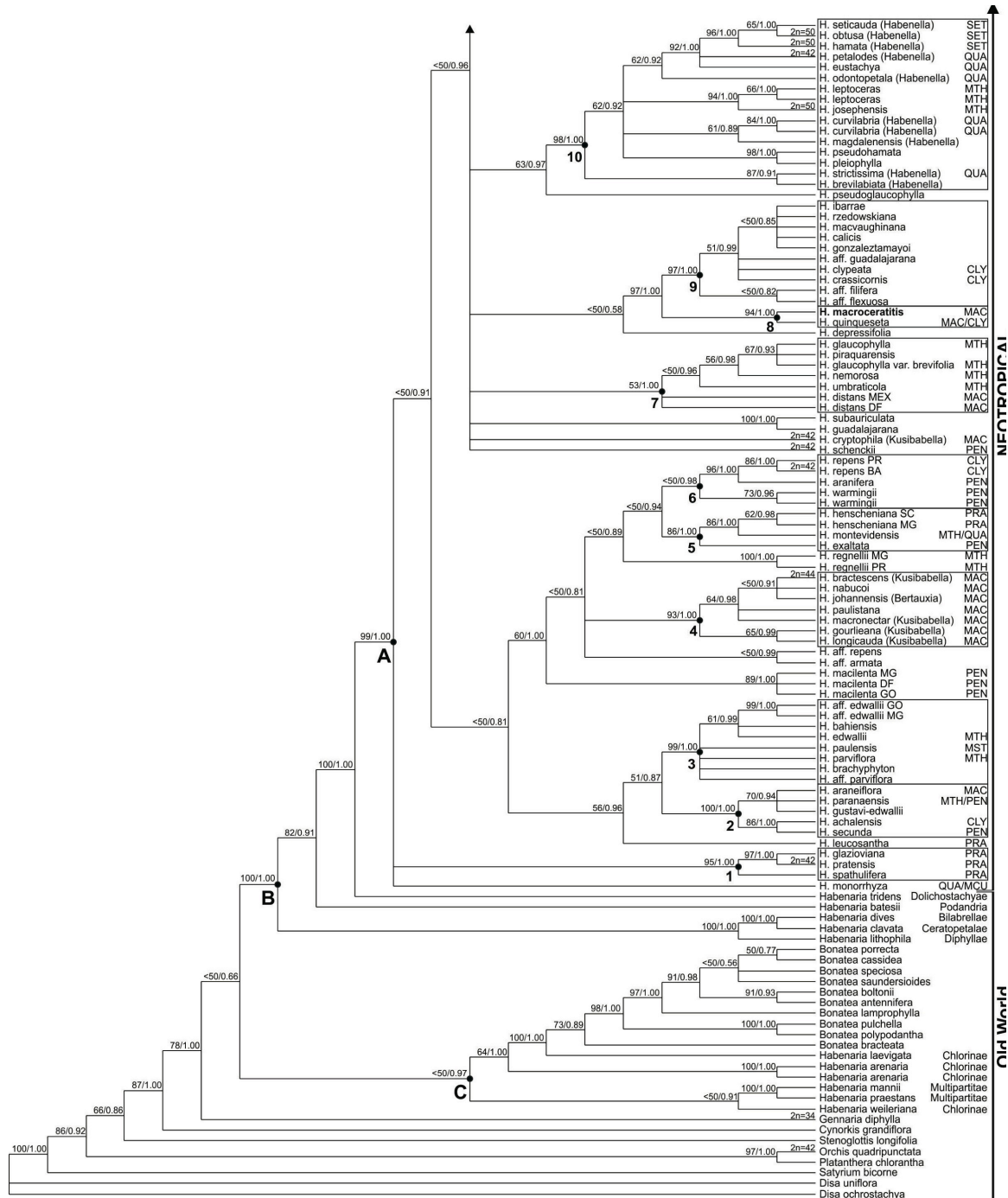


Figura 3a. Árvore Bayesiana da análise combinada dos marcadores *ITS* e *matK*. Os valores de probabilidade posterior da análise Bayesiana e de *bootstrap* da parcimônia são mostrados acima dos ramos. As abreviaturas de três letras a direita do nome da espécie indica em qual seção está inserida de acordo com os tratamentos de Kränzlin (1892, 1901) e Cogniaux (1893). Nomes entre parênteses indicam os gêneros propostos por Szlachetko (2003a, 2003b, 2004a, 2004b). A classificação seccional das espécies africanas também é mostrada. Os subclados terminais bem suportados do clado Neotropical estão numerados de 1 a 21.

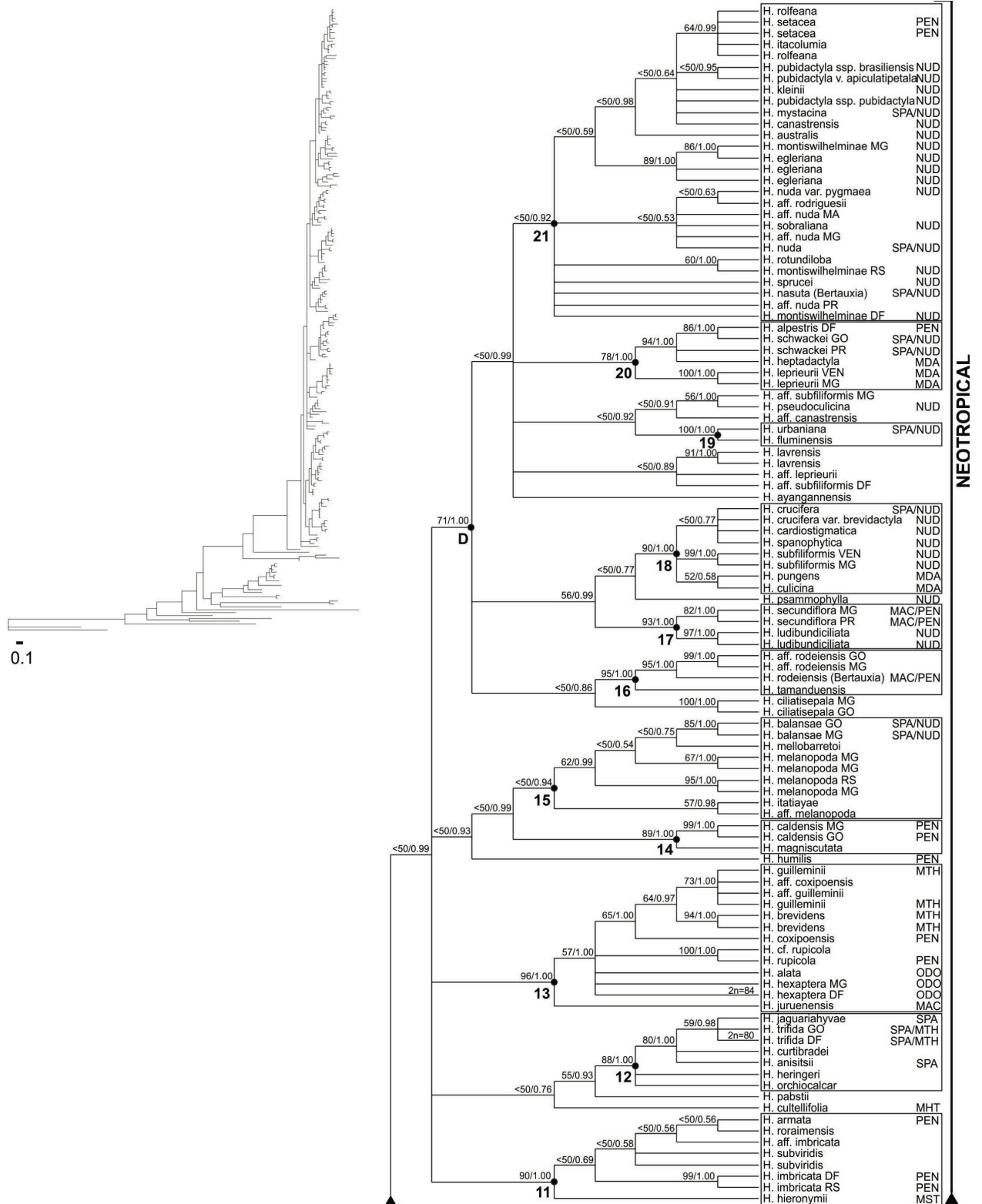


Figura 3b. Continuação da figura 3a. Na árvore da direita são mostrados os comprimentos dos ramos.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivos: (i) analisar as relações evolutivas de *Habenaria* para a Região Neotropical, a partir de análises filogenéticas baseadas em dados moleculares e morfológicos; (ii) comparar as topologias obtidas das análises separadas e combinadas; e (iii) auxiliar no entendimento da taxonomia e da evolução morfológica do grupo.

3. Material e métodos

3.1. Táxons amostrados

A partir da análise filogenética de Batista et al. (2013), dos 151 táxons amostrados nesse trabalho, foram escolhidas 75 espécies, incluindo *Habenaria* (para a Região Neotropical e africana), *Bonatea* Willd. e *Gennaria* Parl.. Esses táxons foram selecionados de clados bem resolvidos e com alto suporte, bem como táxons cujas posições não foram resolvidas devido à politomia e/ou baixo suporte. A lista das espécies incluídas nas análises é apresentada na tabela 2.

Tabela 2. Lista das espécies analisada nesse estudo com os respectivos números de acessos das sequências no GenBank.

Táxons	Origem	N° de acesso no GenBank	
		<i>ITS</i>	<i>matK</i>
<i>Bonatea antennifera</i> Rolfe	África	DQ522049	DQ522082
<i>B. boltonii</i> (Harv.) Bolus	África	DQ522054	DQ522083
<i>B. bracteata</i> G. McDonald & McMurtry	África	DQ522057	DQ522084
<i>B. cassidea</i> Sond.	África	DQ522059	DQ522085
<i>B. lamprophylla</i> J.Stewart	África	DQ522060	DQ522086
<i>B. polypodantha</i> (Rchb.f.) L.Bolus	África	DQ522062	DQ522087
<i>B. porrecta</i> (Bolus) Summerh.	África	DQ522064	DQ522088
<i>B. pulchella</i> Summerh.	África	DQ522066	DQ522089
<i>B. saundersioides</i> (Kraenzl. e Schltr.) Cortesi	África	DQ522067	DQ522090
<i>B. speciosa</i> (Lf.) Willd.	África	DQ522069	DQ522091
<i>Gennaria diphylla</i> (Link) Parl.	Europa	AY351380	AY368383
<i>Habenaria achalensis</i> Kraenzl.	Região Neotropical	HM777526	HM777794
<i>H. alpestris</i> Cogn.	Região Neotropical	HM777655	HM777952
<i>H. arenaria</i> Lindl.	África	HF560563	HF560587
<i>H. armata</i> Rchb.f.	Região Neotropical	HM777677	HM777931
<i>H. ayangannensis</i> Renz	Região Neotropical	HM777706	HM777934
<i>H. balansae</i> Cogn.	Região Neotropical	HM777682	HM777884
<i>H. brevidens</i> Lindl.	Região Neotropical	HM777535	HM777903
<i>H. caldensis</i> Kraenzl.	Região Neotropical	HM777646	HM777882
<i>H. ciliatisejala</i> J.A.N.Bat. & Bianch.	Região Neotropical	HM777576	HM777997

<i>H. clavata</i> (Lindl.) Rchb.f.	África	DQ522074	DQ522093
<i>H. cryptophila</i> Barb.Rodr.	Região Neotropical	HM777582	HM777870
<i>H. cultelifolia</i> Barb.Rodr.	Região Neotropical	HM777675	HM777923
<i>H. curvilabria</i> Barb.Rodr.	Região Neotropical	HM777598	HM777860
<i>H. depressifolia</i> Hoehne	Região Neotropical	HM777601	HM777868
<i>H. distans</i> Griseb.	Região Neotropical	HM777630	HM777871
<i>H. dives</i> Rchb.f.	África	DQ522075	DQ522095
<i>H. edwallii</i> Cogn.	Região Neotropical	HM777564	HM777803
<i>H. glaucophylla</i> Barb.Rodr. var. <i>glaucophylla</i>	Região Neotropical	HM777631	HM777875
<i>H. hamata</i> Hoehne	Região Neotropical	HM777586	HM777865
<i>H. hexaptera</i> Lindl.	Região Neotropical	HM777537	HM777908
<i>H. humilis</i> Cogn.	Região Neotropical	HM777581	HM777879
<i>H. imbricata</i> Lindl.	Região Neotropical	HM777650	HM777927
<i>H. itacolumia</i> Garay	Região Neotropical	HM777723	HM777975
<i>H. johannensis</i> Barb.Rodr.	Região Neotropical	HM777609	HM777841
<i>H. laevigata</i> Lindl.	África	DQ522076	DQ522096
<i>H. lavrensis</i> Hoehne	Região Neotropical	HM777710	HM777938
<i>H. leprieurii</i> Rchb.f.	Região Neotropical	HM777660	HM777951
<i>H. leptoceras</i> Hook.	Região Neotropical	HM777597	HM777855
<i>H. leucosantha</i> Barb.Rodr.	Região Neotropical	HM777568	HM777790
<i>H. lithophila</i> Schltr.	África	DQ522077	DQ522098
<i>H. lundibundiciliata</i> J.A.N.Bat & Bianch.	Região Neotropical	HM777639	HM778007
<i>H. macilenta</i> (Lindl.) Rchb.f.	Região Neotropical	HM777606	HM777811
<i>H. macronectar</i> (Vell.) Hoehne	Região Neotropical	HM777614	HM777833
<i>H. magniscutata</i> Catling	Região Neotropical	HM777641	HM777880
<i>H. mannii</i> Hook.f.	África	DQ560579	HF560603
<i>H. melanopoda</i> Hoehne & Schltr.	Região Neotropical	HM777689	HM777890
<i>H. montevidensis</i> Spreng.	Região Neotropical	HM777619	HM777826
<i>H. mystacina</i> Lindl.	Região Neotropical	HM777728	HM777970
<i>H. nasuta</i> Rchb.f. & Warm.	Região Neotropical	HM777716	HM777959
<i>H. nuda</i> var. <i>pygmaea</i> Hoehne	Região Neotropical	HM777651	HM777984
<i>H. orchioalcar</i> Hoehne	Região Neotropical	HM777662	HM777914
<i>H. pabstii</i> J.A.N.Bat. & Bianch.	Região Neotropical	HM777666	HM777912
<i>H. paranaensis</i> Barb.Rodr.	Região Neotropical	HM777528	HM777796
<i>H. parviflora</i> Lindl.	Região Neotropical	KC257475	KC257478
<i>H. praestans</i> Rendle	África	DQ522079	DQ522100
<i>H. pratensis</i> (Salzm. ex Lindl.) Rchb.f.	Região Neotropical	HM777546	HM777847
<i>H. psammophyla</i> J.A.N.Bat., Bianch. & B.M. Carvalho	Região Neotropical	HM777550	HM778000
<i>H. pseudohamata</i> Toscano	Região Neotropical	HM777593	HM777856

<i>H. pubidactyla</i> var.	Região Neotropical		
<i>apiculatipetala</i> J.A.N.Bat. & Bianch.		HM777729	HM777973
<i>H. pungens</i> Cogn.	Região Neotropical	HM777570	HM778011
<i>H. regnellii</i> Cogn.	Região Neotropical	HM777603	HM777830
<i>H. rodeiensis</i> Barb.Rodr.	Região Neotropical	HM777577	HM777995
<i>H. rolfeana</i> Schltr.	Região Neotropical	HM777727	HM777977
<i>H. rotundiloba</i> Pabst	Região Neotropical	HM777717	HM778017
<i>H. schenckii</i> Cogn.	Região Neotropical	HM777580	HM777869
<i>H. secunda</i> Lindl.	Região Neotropical	HM777525	HM777791
<i>H. secundiflora</i> Barb.Rodr.	Região Neotropical	HM777637	HM778004
<i>H. setacea</i> Lindl.	Região Neotropical	HM777731	HM777980
<i>H. subviridis</i> Hoehne & Schltr.	Região Neotropical	HM777679	HM777929
<i>H. tamanduensis</i> Schltr.	Região Neotropical	HM777600	HM777993
<i>H. tridens</i> Lindl.	África	DQ522080	DQ522101
<i>H. trifida</i> Kunth	Região Neotropical	HM777672	HM777917
<i>H. warmingii</i> Rchb.f. & Warm.	Região Neotropical	HM777616	HM777821
<i>H. weileriana</i> Schltr.	África	HF560585	HF560609

3.2. Enraizamento

Para enraizar a árvore utilizou-se a espécie *Gennaria diphylla*, que nas análises de Batista et al. (2013) é irmã do clado formado por *Habenaria* e *Bonatea*.

3.3. Levantamento dos dados moleculares

Foram utilizadas as mesmas sequências dos marcadores *ITS* e *matK* da filogenia de Batista et al. (2013). Os códigos de acesso das sequências no GenBank são apresentados na tabela 2.

3.4. Levantamento dos dados morfológicos

Foram analisadas exsicatas, flores conservadas em álcool 70%, fotos e fichas de diagnose floral, que correspondem às partes do perianto dissecadas e distendidas sobre uma ficha de cartolina. Para a caracterização das espécies africanas foram utilizadas imagens de exsicatas disponíveis na *internet* e dados da literatura (Linder & Kurzweil, 1999, Ponsie et al., 2007a, 2007b). As hipóteses de homologia ou similaridade dos estados de caracteres morfológicos foram baseadas em identidade topográfica e conectividade dos órgãos (Patterson, 1982; Rieppel, 1988). Uma descrição e caracterização dos caracteres morfológicos e seus estados é apresentada nos resultados. A análise da distribuição dos caracteres sobre as topologias obtidas foi feita no programa Mesquite (Maddison & Maddison, 2011).

3.5. Análises filogenéticas

As matrizes moleculares e morfológicas foram analisadas utilizando-se critérios de otimização de parcimônia de Fitch (Fitch, 1971) no programa PAUP 4.0 (Swofford, 1998). As matrizes obtidas dos marcadores moleculares e morfológicas foram avaliadas em separado e conjuntamente, de forma a detectar possíveis incongruências entre os diferentes conjuntos de dados. O suporte estatístico dos resultados obtidos em cada uma das análises foi avaliado utilizando-se valor de *bootstrap* acima de 50% dos caracteres analisados (Felsenstein, 1985).

Para as análises com o método de máxima parcimônia foram realizadas duas buscas heurísticas usando o *Tree Bisection Reconnection* (TBR) como algoritmo de rearranjo com adição de sequências de modo aleatório. Na primeira, determinou-se o número de árvores por replicação igual a 15, com 1000 replicações. Na segunda busca, aplicou-se apenas uma replicação com um número infinito de árvores. O suporte das análises foi determinado pelo *bootstrap* realizado com 1000 replicações associado aos parâmetros da primeira busca heurística, com apenas uma replicação. As árvores salvas nas análises foram visualizadas e editadas no programa Figtree v.1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>) e Mesquite (Maddison & Maddison, 2011).

4. Resultados

4.1. Caracteres morfológicos

A matriz completa formada pelo conjunto de caracteres combinados é constituída de um total de 1419 caracteres (tabela 4), desses 36 são caracteres morfológicos (tabela 3). As definições para caracterizar cada termo morfológico foram retiradas de literatura especializada (Stearn, 1992; Simpson, 2006, Gonçalves & Lorenzi, 2011).

Caracteres vegetativos

Caráter 1. Comprimento da planta: (0) pequena; (1) mediana; (2) grande.

Para o comprimento de cada indivíduo mediu-se o comprimento da base do caule até a última flor da inflorescência. Esse valor quantitativo foi categorizado da seguinte maneira: 0-30 cm = planta pequena; 31-60 cm = planta de porte mediano; acima de 61cm = planta grande.

Caráter 2. Número de tubera: (0) simples; (1) múltiplo.

Esse caráter separa *Habenaria* de *Bonatea*. Em *Habenaria* o número de tubera é sempre simples e em *Bonatea* é quase sempre múltiplo.

Caráter 3. Disposição das folhas no caule: (0) adpressa; (1) patente.

A disposição das folhas no caule foi dividida em dois tipos: adpressas ao caule ou patentes. No primeiro caso a maior parte ou toda a lâmina da folha encontra-se em contato íntimo (muito próxima), envolvendo o caule. No caso da folha patente, o crescimento da estrutura ocorre em um ângulo aberto em relação ao eixo de sustentação.

Caráter 4. Distribuição das folhas mais desenvolvidas no caule: (0) ao longo; (1) na base; (2) adpressa ao solo.

Neste caso foi analisada a posição das folhas mais desenvolvidas no caule. As folhas apresentam-se praticamente ao longo de todo o caule. Mesmo assim é possível observar um desenvolvimento maior das folhas ocorrendo ao longo de todo o caule, apenas na base ou adpressa ao solo.

Caráter 5. Formato das folhas: (0) linear; (1) lanceolado; (2) lanceovado; (3) ovado; (4) oblonga; (5) cordiforme.

O formato da folha varia muito em algumas espécies, devido a variação fenotípica que pode ocorrer de acordo com o ambiente que a espécie está inserida, mas em outras plantas, esse caráter se mantém constante. Desse modo, muitas espécies apresentaram mais de um estado para esse caráter.

Caráter 6. Margem da folha: (0) inteira; (1) ondulada.

Praticamente todas as espécies analisadas de *Habenaria* neotropicais apresentam a margem da folha inteira, sendo apenas algumas espécies de *Bonatea* que apresentam a margem ondulada.

Inflorescência

Caráter 7. Número de flores por inflorescência: (0) poucas; (1) mediano; (2) muitas.

Os valores absolutos foram categorizados da seguinte maneira: poucas – até 10 flores; mediano – entre 11 a 20 flores; e muitas – acima de 21 flores.

Caráter 8. Inflorescência: (0) laxa; (1) intermediária; (2) congesta.

De acordo com a quantidade de flores que os indivíduos apresentavam e o seu arranjo na inflorescência (flores mais próximas ou distantes no eixo da inflorescência), foram levantados as categorias abordadas acima.

Pedicelo

Caráter 9. Comprimento do pedicelo em relação ao ovário: (0) menor; (1) mesmo comprimento ou maior.

O comprimento do pedicelo é comparado com o comprimento do ovário. Foram quantificados os valores absolutos do pedicelo e do ovário das espécies analisadas.

Corola

Caráter 10. Tricomas na corola: (0) ausentes; (1) presentes.

A presença de tricomas foi observadas em duas espécies neotropicais: *Habenaria mystacina*, *H. pubidactyla* var. *apiculatipetala* e em uma espécie africana *H. lithophila*.

Sépala

Caráter 11. Comprimento da sépala dorsal: (0) pequena; (1) mediano; (2) grande.

Foi quantificado o comprimento da sépala dorsal a partir das fichas de diagnose floral. No caso de sépalas muito côncavas, essas apresentavam-se deformadas nas fichas de diagnose, sendo possível apenas a obtenção do valor absoluto do segmento do eixo principal. Foram categorizados os seguintes valores: sépala dorsal pequena = até 5 mm; mediana = 6-10 mm; e grande = acima de 11 mm.

Caráter 12. Posição da sépala dorsal: (0) inflexa; (1) reflexa.

Foi observada a disposição espacial da sépala dorsal em cada flor na inflorescência.

Caráter 13. Concavidade da sépala dorsal: (0) plana; (1) côncava; (2) convexa.

Foi analisada a angulação que a sépala dorsal cria no seu próprio eixo principal e assim deixa menos ou mais exposta a coluna. Desse modo, a sépala dorsal plana apresenta um ângulo próximo a 90°, na sépala côncava ângulo inferior a 90° e sépala convexa superior a 90°.

Caráter 14. Sépala laterais adnatas aos lobos do estigma: (0) presente; (1) ausente.

Esse caráter avalia se as sépalas laterais apresentam-se fundidas aos lobos do estigma. Esta característica é comumente presente apenas em *Bonatea*.

Pétalas

Caráter 15. Partição das pétalas: (0) bipartida; (1) simples.

Pétalas com algum grau de partição foram classificadas como bipartidas e os segmentos nomeados de pétala posterior (o segmento geralmente maior e que se encontra mais próximo da sépala dorsal) e pétala anterior. Espécies sem partição nas pétalas foram classificadas como tendo pétalas simples.

Caráter 16. Pétalas adnatas às sépalas: (0) presentes; (1) ausentes.

Esse caráter está presente apenas nas espécies de *Bonatea*, exceto *B. bracteata*.

Caráter 17. Pétala anterior adnata aos lobos do estigma: (0) presente; (1) ausente.

Esse caráter está presente apenas nas espécies de *Bonatea*, exceto *B. bracteata*.

Caráter 18. Comprimento da pétala anterior em relação a pétala posterior: (0) menor; (1) mesmo comprimento; (2) maior.

O comprimento das pétalas anterior e posterior varia nas espécies. Nesse caráter foram medidos os valores absolutos de cada segmento, a partir do seu eixo principal e, depois, comparados os valores encontrados e assim categorizados em: menor, quando o segmento da pétala anterior é menor do que a pétala posterior; mesmo comprimento, quando os dois segmentos apresentam aproximadamente o mesmo comprimento; ou maior, quando o segmento da pétala anterior é maior do que a pétala posterior.

Labelo

Caráter 19. Partição do labelo: (0) tripartido; (1) simples; (2) multipartido.

Normalmente o labelo em *Habenaria* apresenta partições. O eixo principal é denominado de lobo mediano do labelo e os laterais de lobos laterais do labelo. Geralmente o labelo é tripartido, no entanto em algumas espécies apresenta-se simples. Algumas espécies africanas apresentam esse segmento muito ramificado e, nesse caso, foi classificado como multipartido.

Caráter 20. Comprimento do segmento mediano do labelo: (0) menor; (1) mesmo comprimento; (2) maior.

Nesse caráter, foi verificada a relação entre o comprimento do segmento mediano e laterais do labelo, a partir da obtenção dos valores absolutos para cada um. Foram classificados como: menor, quando o segmento mediano era menor do que os segmentos laterais; mesmo comprimento, quando os dois segmentos tinham aproximadamente o mesmo comprimento; e maior, quando o segmento mediano era maior do que os laterais.

Projeção na entrada do calcar

Caráter 21: Projeção dentiforme na entrada do calcar: (0) ausente; (1) presente/calcar; (2) presente/estigma.

Em *Habenaria* o calcar, também conhecido como esporão, é uma estrutura geralmente cilíndrica, originária do labelo, dentro do qual o néctar é produzido e armazenado. Algumas espécies apresentam uma projeção dentiforme na entrada do calcar que provavelmente está relacionada ao direcionamento da probóscide do polinizador em relação a abertura do calcar. Essa projeção pode ser originária do labelo ou dos lobos do estigma.

Calcar

Caráter 22. Comprimento do calcar em relação ao comprimento do ovário com o pedicelo: (0) menor; (1) mesmo comprimento; (2) maior.

Neste caso foi feita uma comparação entre o comprimento absoluto do calcar e o comprimento do ovário com o pedicelo.

Hemipolinário

Caráter 23. Hemipolinários: (0) separados; (1) unidos.

Os hemipolinários foram considerados separados quando é possível retirar apenas um conjunto contendo o viscido, caudículo e a polínia, e unidos quando os viscidos se encontram em contato e os dois conjuntos (hemipolinários) são retirados unidos um ao outro.

Caráter 24. Forma geral dos viscidos: (0) plana; (1) globosa; (2) globosa/sulcada

Este caráter analisa a tridimensionalidade dos viscidos. Na maioria das espécies analisadas o viscido é uma estrutura mais ou menos globosa. No grupo da *H. parviflora* o viscido apresenta um sulco central, no qual se encaixa a probóscide do polinizador. No grupo da *H. secunda* o viscido apresenta-se achatado dorso-ventralmente, apresentando um formato mais ou menos plano.

Ginostêmio

Caráter 25. Comprimento dos canais da antera em relação ao comprimento do estigma: (0) menor; (1) mesmo comprimento; (2) maior.

Neste caso foi verificada a relação entre comprimento do canal da antera em relação ao comprimento do estigma.

Caráter 26. Posição dos lobos dos estigmas: (0) para frente; (1) para cima; (2) para o lado

Tanto *Habenaria* como *Bonatea* apresentam os estigmas bilobados. Em relação ao eixo principal da coluna, a porção receptiva dos lobos do estigma pode estar voltada para frente, para cima ou para os lados. A posição para os lados é encontrada apenas em *Bonatea* e algumas espécies neotropicais tradicionalmente incluídas na seção *Macroceratitae*.

Caráter 27. Comprimento do estigma em relação ao comprimento geral da flor: (0) curto; (1) mesmo comprimento; (2) longo

Foi verificada a relação entre comprimento da parte receptiva dos lobos do estigma em relação ao comprimento geral da flor. Este foi um dos caracteres centrais utilizados no tratamento seccional de Kränzlin (1892, 1901).

Caráter 28. Margem dos estigmas: (0) não involuta; (1) involuta.

Esse caráter aparece apenas nas espécies neotropicais tradicionalmente incluídas na seção *Macroceratitae*, em algumas espécies do Velho Mundo (*H. dives*) e todas as espécies de *Bonatea*.

Caráter 29. Posição do lobo mediano do rostelo em relação as anteras: (0) encoberto; (1) parcialmente; (2) totalmente projetado.

Foi verificado como o lobo mediano do rostelo encontra-se em relação aos lobos da antera. Se totalmente encoberto pelas anteras, parcialmente ou totalmente projetado.

Caráter 30. Posição dos lobos laterais do rostelo: (0) paralelos; (1) convergentes em direção ao ápice.

Foi observado se os lobos laterais do rostelo são paralelos ou convergentes.

Caráter 31. Fusão do lobo mediano do rostelo com os segmentos laterais do labelo: (0) ausente; (1) presente.

Esse caráter está presente nas espécies de *Bonatea* exceto em *B. bracteata*.

Caráter 32. Projeção dos lobos laterais do rostelo em relação aos lóculos da antera: (0) ausente; (1) presente.

Esse caráter verificou se os lobos laterais do rostelo são compreendidos ou não pelos lóculos da antera.

Caráter 33. Fusão dos lobos laterais do rostelo com os canais da antera: (0) ausente; (1) presente.

Em *Habenaria*, os lobos laterais do rostelo apresentam um sulco sobre o qual estão dispostos os canais da antera, não havendo qualquer fusão entre eles. Em todas as espécies de *Bonatea* estas estruturas são fundidas exceto *Bonatea bracteata*.

Caráter 34. Presença de papilas no rostelo: (0) ausente; (1) presente.

Este caráter está presente apenas em *Bonatea*, exceto em *B. bracteata*, *B. polypodantha* e *B. pulchella*.

Caráter 35. Margem do rostelo: (0) lisa; (1) ciliada.

Esse caráter está presente apenas em *Bonatea*, exceto em *B. bracteata*, *B. polypodantha* e *B. pulchella*.

Caráter 36. Forma do lobo mediano do rostelo: (0) não cuculado; (1) cuculado.

Esse caráter está presente apenas em *Habenaria macilenta* e em *Bonatea*, exceto em *B. bracteata*, *B. polypodantha* e *B. pulchella*.

A partir do levantamento dos caracteres morfológicos para cada espécie analisada foi obtida a matriz morfológica (tabela 3). Algumas espécies possuem dois ou mais estado de caráter para o mesmo caráter, em outros casos não foi possível observar o estado de caráter em questão, nesses casos a interrogação (?) é o indicativo. Na figura 3 é possível observar a diversidade da morfologia floral das espécies de *Habenaria* para a Região Neotropical.

Tabela 3. Matriz Morfológica. Lista dos caracteres levantados para cada espécie analisada. A interrogação (?) representa o estado de caráter não conhecido

Espécies	Estados de Caracteres																																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
<i>Bonatea antennifera</i>	1,2	1	1	0	4	1	0,1,2	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0	2	2	1	2	0	1	0	1	1	1	1	1
<i>B. boltonii</i>	0	1	1	0	4	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0	2	2	1	2	0	1	0	1	1	1	1	1
<i>B. bracteata</i>	0	0	1	0	4	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	?	0	0	0	2	0	1	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. cassidea</i>	0,1	1	1	0	0,1	1	0,2	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0	2	2	1	2	0	1	0	1	1	1	1	1
<i>B. lamprophylla</i>	1	1	1	0	3	1	0,1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	2	0	1	0	2	2	1	2	0	1	0	1	1	1	1	1
<i>B. polypodantha</i>	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	2	0	1	0	2	2	1	2	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>B. porrecta</i>	0,1	1	1	0	1	1	0,1,2	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	2	0	1	0	2	2	1	2	0	1	0	1	1	1	1	1
<i>B. pulchella</i>	0	1	1	1	3	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	2	0	1	0	2	2	1	2	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>B. saundersioides</i>	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	1	0	2	2	1	2	0	1	0	1	1	1	1	1
<i>B. speciosa</i>	0,1	1	1	0	4	1	0,1,2	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0	2	2	1	2	0	1	0	1	1	1	1	1
<i>Gennaria diphylla</i>	0,1	0	1	0	4	0	1,2	2	0	0	0	0	0	1	1	1	1	?	0	1	0	0	0	1	?	0	?	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0
<i>Habenaria achalensis</i>	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	2	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. alpestris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	2	0	0	1	1	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. arenaria</i>	0,1	0	1	1	4	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	?	0	2	?	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. armata</i>	0,1	0	1	0	3	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	2	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>H. ayangannensis</i>	0	0	1	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	2	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>H. balansae</i>	1	0	0	0	0	0	0,1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	2	0	1	0	0	1	1	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. brevidens</i>	0	0	1	0	1,4	0	1	2	0	0	0,1	0	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>H. caldensis</i>	0,1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	2	0	0	0	2	1	1	0	1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>H. clavata</i>	1,2	0	1	0	1,4	0	0,1,2	1,2	1	0	2	0	1	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>H. ciliatisepala</i>	1,2	0	1	0	0,1	0	1,2	2	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	0	1	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. cryptophilla</i>	1	0	1	0	4	0	1	0,1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	2	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>H. cultelifolia</i>	0,1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

<i>H. curvilabris</i>	1	0	1	0	3	0	2	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	?	1	?	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>H. depressifolia</i>	0	0	1	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. distans</i>	0	0	1	1	4	0	0,1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	2	0	0	0	2	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0		
<i>H. dives</i>	0,1	0	1	0	1	0	2	2	0	0	0	1	0	1	0	1	1	2	0	2	0	1	0	1	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. edwallii</i>	1	0	1	0	1	0	0,1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	2	0	0	1	2	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<i>H. glaucophylla</i>	1	0	1	1	4	0	0,1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	?	0	0	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. hamata</i>	1,2	0	1	0	1,3	0	1	2	0	0	2	0	1	1	1	1	1	?	1	?	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. hexaptera</i>	2	0	1	0	3	0	2	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. humilis</i>	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	2	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. imbricata</i>	0	0	1	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>H. itacolumia</i>	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	?	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. johannensis</i>	2	0	1	0	1	0	0	1	1	0	2	0	1	1	0	1	1	2	0	0	0	2	0	1	2	2	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. laevigata</i>	0,1	0	1	0	1	0	0,1,2	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	?	0	2	0	2	0	0	0	1	?	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<i>H. lavrensis</i>	0,1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	0	1	1	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. leprieurii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	2	0	0	1	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<i>H. leptoceras</i>	2	0	1	0	3	0	2	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	2	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>H. leucosantha</i>	0	0	1	0	3	0	0	1,2	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	2	0	0	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>H. lithophila</i>	0,1	0	1	2	4	0	0,1,2	2	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	2	0	2	0	0	1	2	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. lundibundiciliata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
<i>H. macilenta</i>	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	2	0	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	1	2	1	0	0	2	1	0	1	0	0	0	1	
<i>H. macronectar</i>	1,2	0	1	0	1	0	0	1,2	1	0	2	0	1	1	0	1	1	2	0	0	1	2	0	1	2	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. magniscutata</i>	0,1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	2	0	0	0	0	1	2	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. mannii</i>	0,1	0	1	0	1	0	0,1	1,2	0	0	2	0	0	1	0	1	1	0	2	2	0	1	0	1	0	?	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<i>H. melanopoda</i>	0,1	0	0	0	0	0	1,2	2	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	2	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
<i>H. montevidensis</i>	1,2	0	1	0	3	0	1,2	1,2	0	0	1	1	2	1	1	1	1	?	0	0	0	2	0	1	0	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. mystacina</i>	1,2	0	0	0	0	0	1	2	0	1	0	0	1	1	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
<i>H. nasuta</i>	1,2	0	0	0	0	0	0,1	2	0	0	2	0	1	1	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	

<i>H. nuda pygmae</i>	2	0	0	0	0	0	0,1	2	0	0	1	0	1	1	0	1	1	2	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
<i>H. orchioalcar</i>	0,1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	1	1	0	1	1	0	0	1,2	0	0	1	1	0	1	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0		
<i>H. pabstii</i>	0,1,2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	1	1	0	1	1	2	0	0	0	2	0	0	1	2	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0		
<i>H. paranaensis</i>	1	0	1	0	1	0	2	2	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
<i>H. parviflora</i>	0,1,2	0	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	2	0	0	1	2	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
<i>H. praestans</i>	1,2	0	1	0	4	0	2	2	0	0	2	0	0	1	1	1	1	?	2	1	0	0	0	1	0	?	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0		
<i>H. pratensis</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0		
<i>H. psammophylla</i>	1	0	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	2	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
<i>H. pseudohamata</i>	2	0	1	0	1,3	0	2	2	0	0	2	0	1	1	1	1	?	0	2	0	2	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0		
<i>H. pubidactyla</i> var. <i>apiculatipetala</i>	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0		
<i>H. pungens</i>	1,2	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	2	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>H. regnellii</i>	0,1	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	2	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
<i>H. rodeiensis</i>	1,2	0	0	0	1	0	0	0,1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	2	1	0	1	0	0	0	0	0	0	
<i>H. rolfeana</i>	0,1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	2	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<i>H. rotundiloba</i>	0,1,2	0	0	0	0	0	1	2	0	0	1	0	1	1	1	1	?	0	2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
<i>H. schenckii</i>	0	0	1	2	4	0	0	0,1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	2	0	0	0	2	0	1	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
<i>H. secunda</i>	1,2	0	1	0	3	0	2	1,2	0	0	0	0	0	1	0	1	1	2	0	1	2	0	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>H. secundiflora</i>	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. setacea</i>	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	2	0	0	0	0	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. subviridis</i>	0,1	0	1	0	1	0	0	2	0	0	1	0	1	1	0	1	1	2	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. tamanduensis</i>	1,2	0	1	0	1	0	1,2	1	1	0	0,1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	2	1	1	0	0	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. tridens</i>	0	0	1	0	1	0	0,1	0,2	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	2	0	1	0	1	0	?	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. trifida</i>	0,1,2	0	1	0	1	0	0	0	1	0	2	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. warmingii</i>	2	0	1	0	1	0	2	1,2	0	0	1	0	0	1	0	1	1	2	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>H. weileriana</i>	0	0	1	0	1	0	0	0,1,2	0	0	1	0	1	1	1	1	?	0	2	0	2	0	1	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

4.2. Análise filogenética dos dados morfológicos

Tabela 4. Dados das análises de parcimônia.

	Caracteres morfológicos	Caracteres moleculares	Combinada
Quantidade de caracteres	36	1383	1419
Caracteres informativos	36	320	356
Número de árvores	210	1489	1260
Número de passos	238	954	1291
Índice de consistência (IC)	0,23	0,69	0,55
Índice de Retenção (IR)	0,70	0,86	0,79

Com os dados da matriz de caracteres morfológicos, foram obtidas 210 árvores igualmente mais parcimoniosas, com 238 passos, com o IC = 0,23 e IR = 0,70. Todos 36 caracteres morfológicos foram informativos (tabela 4). Foram obtidas árvores de consenso estrito, maioria 50%, 85% e de Adams, e as topologias obtidas foram as mesmas, sendo apresentado na figura 4 o consenso estrito. Nessa análise *Habenaria* mostrou-se polifilético, não sendo possível avaliar nenhuma relação entre as espécies, exceto o clado formado por *Bonatea* (*bootstrap* = 73%) e o clado formado por *H. johannensis* e *H. macronectar* (*bootstrap* = 79%).

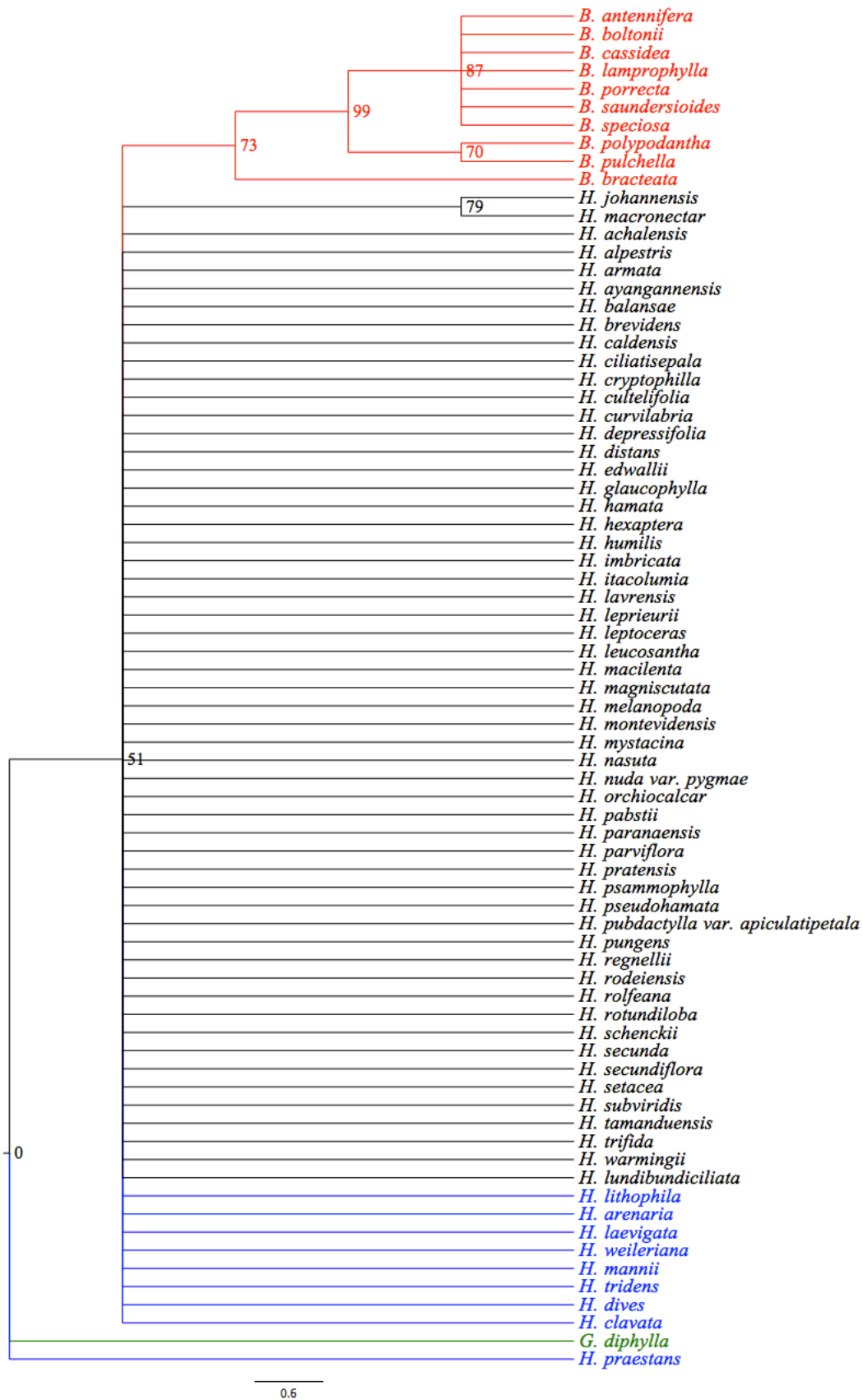


Figura 4. Árvore filogenética de consenso estrito dos dados morfológicos. Os valores nos ramos indicam suporte de *bootstrap*. As cores representam *Bonatea* (vermelho), *Habenaria* africanas (azul) e *Gennaria* (verde).

4.3. Análise filogenética dos dados moleculares

Com os dados da matriz de caracteres moleculares, foram obtidas 1489 árvores igualmente mais parcimoniosas, com 954 passos, com o IC = 0,69 e IR = 0,86. Dos 1383 caracteres, 320 foram informativos (tabela 4). Na árvore de consenso estrito (figura 5), o clado neotropical de *Habenaria* mostrou-se monofilético (*bootstrap* = 94%) e *Habenaria tridens* Lindl. configura como espécie irmã do mesmo (*bootstrap* = 100%). *Bonatea* manteve-se como um grupo monofilético (*bootstrap* = 73%), tornando *Habenaria* parafilético.

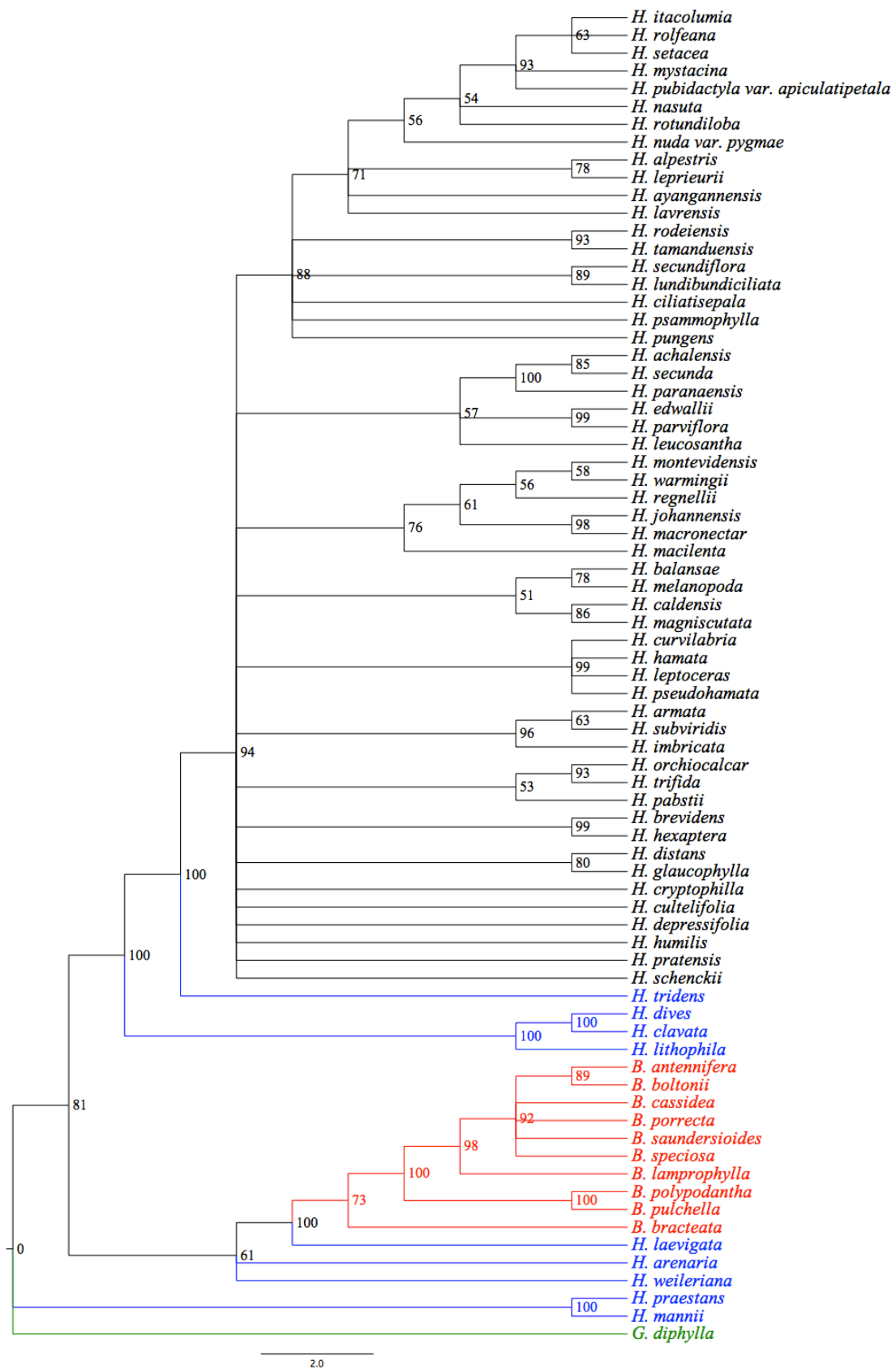


Figura 5. Árvore de consenso estrito, a partir de dados moleculares (marcadores *ITS* e *matK*). Os valores nos ramos indicam suporte de *bootstrap*. As cores representam *Bonatea* (vermelho), *Habenaria* africanas (azul) e *Gennaria* (verde).

4.4. Análise filogenética dos dados combinados

Com relação à análise dos dados combinados (tabela 4), foram obtidas 1260 árvores igualmente mais parcimoniosas, com 1291 passos, com o IC = 0,55 e IR = 0,79. Dos 1419 caracteres, 356 foram informativos. Os resultados foram basicamente os mesmos da análise molecular: o clado neotropical de *Habenaria* mostrou-se monofilético (*bootstrap* = 90%) e *Habenaria tridens* aparece como espécie irmã do mesmo (*bootstrap* = 100%). *Bonatea* manteve-se como um grupo monofilético (*bootstrap* = 98%), tornando *Habenaria* parafilético (figura 6).

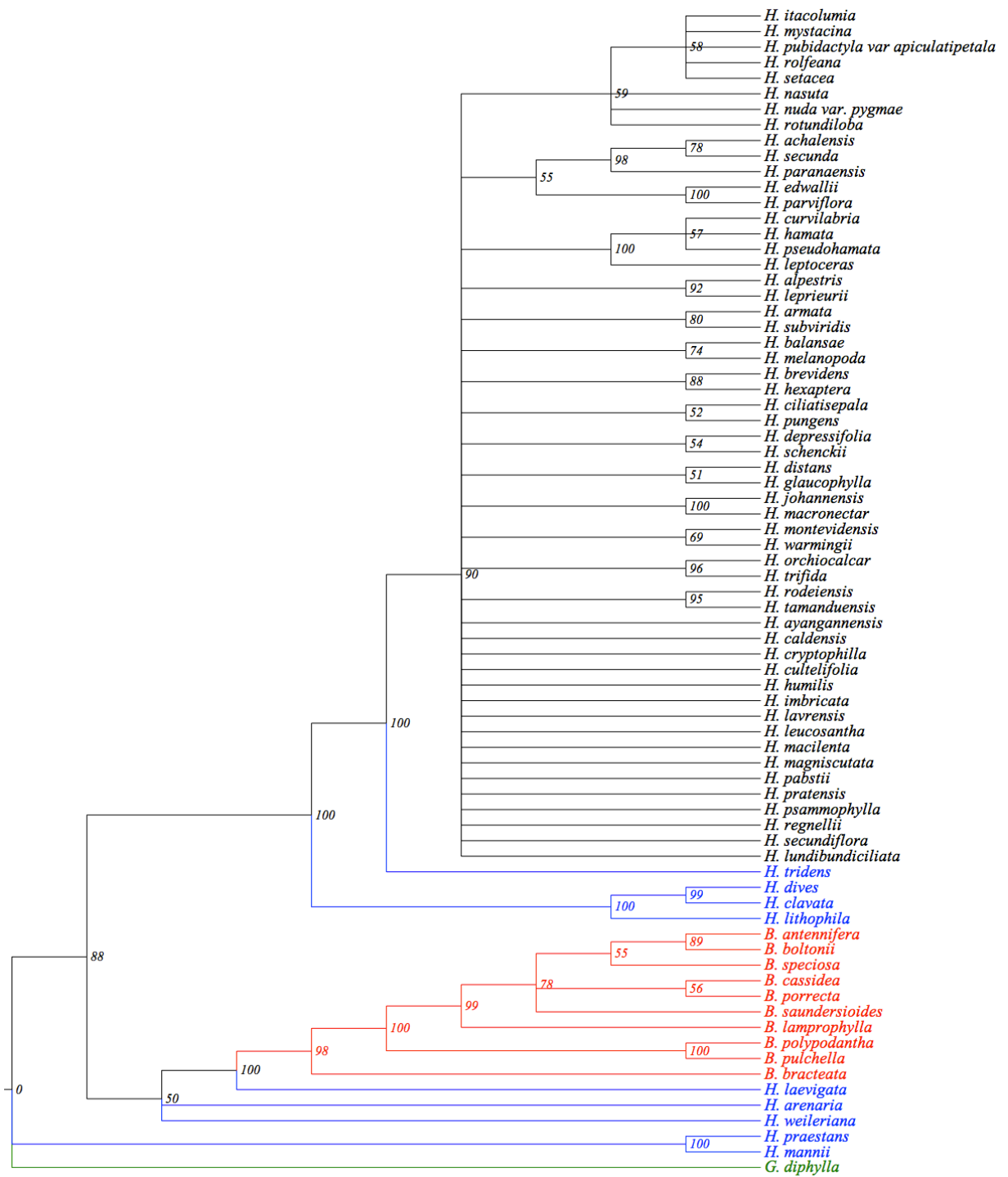


Figura 6. Árvore de consenso estrito, a partir de dados morfológicos e moleculares (marcadores *ITS* e *matK*). Os valores indicados nos ramos são valores de *bootstrap*. Os valores nos ramos indicam suporte de *bootstrap*. As cores representam *Bonatea* (vermelho), *Habenaria* africanas (azul) e *Gennaria* (verde).

5. Discussão

A comparação de análises separadas e combinadas de dados moleculares e morfológicos tem sido discutidas por diversos autores (Assis, 2009 e referências citadas ali). Observa-se que em alguns casos, quando tais dados são combinados, a resolução e o suporte aumentam, enquanto em outros casos tendem a diminuir.

No presente trabalho, observou-se que a topologia resultante da análise combinada foi mais resolvida do que a análise morfológica e menos resolvida do que a análise molecular. Além disso, os valores de *bootstrap* foram relativamente mais baixos na topologia dos dados combinados, quando comparada com a dos dados moleculares. Existem diversas causas para explicar esses resultados: baixo número de caracteres para resolver as árvores, alto número de caracteres conflitantes e alto número de árvores igualmente mais parcimoniosas conflitantes, cujo consenso estrito é pouco resolvido. No caso da análise morfológica mostrada aqui, as três causas se aplicam. No caso da análise molecular, como já esperado, os resultados foram similares à Batista et al. (2013). Quando comparada com a análise morfológica, a análise molecular apresentou um número mais alto de caracteres, com menos conflito entre eles e, conseqüentemente, um consenso estrito mais resolvido. Essa interpretação acima explica, em parte, os resultados da análise combinada em relação ao clado neotropical, onde os caracteres moleculares e morfológicos potencialmente conflitantes resultaram numa árvore de consenso estrito menos resolvida e com valores de suporte mais baixos, em comparação a dos dados moleculares. Diferentemente, em *Bonatea*, a combinação dos dados resultou em maior resolução e suporte.

Embora a análise combinada tenha recuperado certos clados, não foi possível reconhecer sinapomorfias morfológicas para os mesmos. Isso se aplica tanto ao clado neotropical quanto aos seus subclados. Tal resultado deve-se à ocorrência de homoplasias e falta de resolução filogenética dentro do clado neotropical. Desse modo, o clado neotropical de *Habenaria* e seus subclados não puderam ser morfológicamente circunscritos. Logo, suas circunscrições taxonômicas, mas não filogenéticas, deverão ser feitas com base numa combinação de caracteres.

O monofiletismo de *Bonatea*, como indicado por Ponsie et al. (2006), foi confirmado.

Esse clado apresenta várias sinapormofias, incluindo a presença de mais de um tubera, margem da folha ondulada, sépalas laterais adnatas aos lobos do estigma, pétalas adnatas as sépalas, lobo mediano do rostelo fusionado aos lobos laterais do labelo, lobos laterais do rostelo fusionados aos canais da antera, rostelo com papilas e margem ciliada. Caracteres normalmente considerados sinapomorfias do gênero, como lobo mediano do rostelo cuculado e uma projeção dentiforme na entrada do calcar aparecem em *H. macilenta* e no clado *H. johannensis* + *H. macronectar*, respectivamente. Além disso, esse último clado também apresenta em comum com *Bonatea* os estigmas muito longos, com superfície receptiva voltada para o lado e margens involutas.

Outro caso relevante é o de *Habenaria schenkii* e *H. depressifolia*, as únicas espécies neotropicais que apresentam as folhas orbiculares e adpressas ao solo. Nas análises com dados moleculares de Batista et al. (2013), a posição dessas duas espécies é incerta. No entanto, na análise combinada as mesmas aparecem como irmãs.

6. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os caracteres morfológicos utilizados não foram suficientes para resolver as relações filogenéticas entre as espécies do clado neotropical de *Habenaria*. Dessa forma, torna-se necessária a reavaliação desses caracteres, a partir de um estudo mais detalhado de homologia envolvendo ontogenia e anatomia, bem como a busca por novos caracteres. Embora os caracteres morfológicos não tenham gerado resultados satisfatórios para o entendimento das relações das espécies, esse foi o primeiro trabalho do gênero no qual tais caracteres foram empregados no contexto de uma abordagem filogenética.

7. Referências bibliográficas

- Assis, L.C.S. 2009. Coherence, correspondence, and the renaissance of morphology in phylogenetic systematics. *Cladistics* 25: 528-544.
- Bateman, R.M., Pridgeon, A.M. & Chase, M.W. 1997. Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear *ITS* sequences. 2. Infrageneric relationships and reclassification to achieve monophyly of *Orchis sensu stricto*. *Lindleyana* 12: 113–141.
- Bateman, R.M., Hollingsworth, P.M., Preston, J., Yi-Bo, L., Pridgeon, A.M. & Chase, M.W. 2003. Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 142: 1–40.
- Batista, J.A.N., Bianchetti, L.B., Nogueira, R.E., Pellizzaroi, K.F. & Ferreira, F.E. 2004. The genus *Habenaria* (Orchidaceae) in Itacolomi State Park, Minas Gerais, Brazil. *Sitientibus série Ciências Biológicas* 4: 25-36.
- Batista, J.A.N., Bianchetti, L.B. & Pellizzaro, K.F. 2005. Orchidaceae da reserva ecológica do Guará, Distrito Federal, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 19(2): 221-232
- 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 Pap. Bot.* 16: 1–47
- 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 Pap. Bot.* 16: 233-273.
- Batista, J.A.N., Borges, K.S., Faria, M.W.F. de, Proite, K., Ramalho, A.J., Salazar, G.A. & Van Den Berg, C. 2013. Molecular phylogenetics of the species-rich genus *Habenaria* (Orchidaceae) in the New World based on nuclear and plastid DNA sequences. *Molec. Phylog. Evol.* 67: 95-109.
- Bellstedt, D.U., Linder, H.P. & Harley, E.H. 2001. Phylogenetic relationships in *Disa* based on non-coding *trnL-trnF* chloroplast sequences: evidence of numerous repeat regions. *Amer. J. Bot.* 88: 2088– 2100.
- Bonfield, J.K., Smith, K.F. & Staden, R. 1995. A new DNA sequence assembly program. *Nucl. Acids Res.* 24: 4992–4999.
- Cameron, K.M., Chase, M.W., Whitten, W.M., Kores, P.J., Jarrel, D.C., Albert, V.A., Yukawa, T., Hills, H.G. & Goldman, D.H. 1999. A phylogenetic analysis

- of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *Am. J. Bot.* 86: 208–224.
- Cogniaux, A.** 1893. Pp 18-102. Orchidaceae. *Habenaria* in: Martius, C.F.P., Eichler, A.G., Urban, I. (Eds.). *Flora Brasiliensis* 3(4). Munich: F. Fleischer.
- Douzery, E.J.P., Pridgeon, A.M., Kores, P., Linder, H.P., Kurzweil, H. & Chase, M.W.** 1999. Molecular phylogenetics of Diurideae (Orchidaceae): a contribution from nuclear ribosomal *ITS* sequences. *Amer. J. Bot.* 86: 887–899.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.S.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.* 19: 11–15.
- Dressler, L.R.** 1993. Phylogeny and classification of the orchid Family. Portland: Dioscorides Press.
- Dressler, L.R.** 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158.
- Edgar, R.C.** 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids Res.* 32: 1792–1797.
- Fitch, W.M.** 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20: 406–416.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the *bootstrap*. *Evolution* 39: 783–791.
- Giulietti, A.M., Harley, R.M., Queiroz, L.P. de, Wanderley, M.G.L. & Van Den Berg, C.** 2005. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiversidade* 11: 52-61.
- Govaerts, R., Pfahl, J., Campacci, M.A., Baptista, D.H., Tigges, H., Shaw, J., Cribb, P., George, A., Kreuz, K. & Wood, J.** 2010. *World Checklist of Orchidaceae*. Kew: The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens.
- Hoehne, F.C.** 1940. Pp. 52-254. Orchidaceae, *Habenaria*. In: Hoehne, F.C. (Ed.), *Flora Brasílica* 12(1). São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., Nielsen, R. & Bollback, J.P.** 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.
- Kores, P.J., Molvray, M., Weston, P.H., Hopper, S.D., Brown, A.P., Cameron, K.M. & Chase, M.W.** 2001. A phylogenetic analysis of Diurideae (Orchidaceae) based on plastid DNA sequence data. *Am. J. Bot.* 88: 1903–1914.

- Kränzlin, F.** 1892. Beiträge zu einer monographie der gattung *Habenaria* Willd. *Engl. Bot. Jahrb.* 16: 52–223.
- Kränzlin, F.** 1901. *Orchidacearum genera et species*. Vol. I. *Habenaria*. Berlin: Mayer and Müller.
- Kurzweil, H. & Weber, A.** 1992. Floral morphology of southern African Orchideae. II. Habenariinae. *Nord. J. Bot.* 12: 39–61.
- Linder, H.P. & Kurzweil, H.** 1999. *Orchids of Southern Africa*. Netherlands: A.A.Balkema.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R.** 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>. Accessed: 20th July 2013.
- Nylander, J.A.A.** 2004. MrModeltest, version 2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. <http://www.abc.se/~nylander/mrmodeltest2/mrmodeltest2.html>.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F.** 1975. *Orchidaceae Brasilienses*, Vol. 1. Hildesheim: Brucke-Verlag Kurt Schmiersow.
- Patterson, C.** 1982. Pp. 21-74. Morphological characters and homology in: Joysey, K.A. & Friday, A.E. (eds.), *Problems of Phylogenetic Reconstruction*. London: Academic Press.
- Ponsie, M.E., Edwards, T.J. & Johnson, S.D.** 2007a. A taxonomic revision of *Bonatea* Willd. (Orchidaceae: Orchidoideae: Habenariinae). *S. African J. Bot.* 73: 1–21.
- Ponsie, M.E., Mitchell, A., Edwards, T.J. & Johnson, S.D.** 2007b. Phylogeny of *Bonatea* (Orchidaceae: Habenariinae) based on molecular and morphological data. *Pl. Syst. Evol.* 263: 253–268.
- Pridgeon, A.M., Bateman, R.M., Cox, A.V., Hapeman, J.R. & Chase, M.W.** 1997. Phylogenetics of subtribe Orchidinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear *ITS* sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis sensu lato*. *Lindleyana* 12: 89–109.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** 2001a. *Genera Orchidacearum* Vol. 2, Orchidoideae, part 1. New York: Oxford University Press.
- Pridgeon, A.M., Solano, R. & Chase, M.W.** 2001b. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *Am. J. Bot.* 88: 2286–2308.

- Rieppel, O.C.** 1988. *Fundamentals of Comparative Biology*. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. & van den Mark, P.** 2005. MrBayes 3.1 Manual. Home page at: <http://mrbayes.net>
- Simpson, M.G.** 2006. *Plant systematics*. Waltham, Massachusetts: Elsevier Academic Press.
- Singer, R.B.** 2001. Pollination biology of *Habenaria parviflora* (Orchidaceae: Habenariinae) in Southeastern Brazil. *Darwiniana* 39: 201-207.
- Singer, R.B., Breier, T.B., Flach, A. & Farias-Singer, R.** 2007. The pollination mechanism of *Habenaria pleiophylla* Hoehne & Schlechter (Orchidaceae: Orchidoideae). *Funct. Ecosyst. Communities* 1: 10-14.
- Stern, W.T.** 1992. *Botanical Latin*. New Hampshire: David & Charles.
- Swofford, D.L.** 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0 Beta. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Szlachetko, D.L.** 2003a. Matériaux pour la révision de *Habenaria* (Orchidaceae, Orchidoideae) – 2. *Richardiana* 3: 153–157.
- Szlachetko, D.L.** 2003b. Matériaux pour la révision de *Habenaria* (Orchidaceae, Orchidoideae) – 3. *Richardiana* 3: 158–162.
- Szlachetko, D.L.** 2004a. Matériaux pour la révision des *Habenariinae* (Orchidaceae, Orchidoideae) – 4. *Richardiana* 4: 52–65.
- Szlachetko, D.L.** 2004b. Matériaux pour la révision des *Habenariinae* (Orchidaceae, Orchidoideae) – 5. *Richardiana* 4: 103–108.
- Tamayo, R.G.** 1993. Algunas consideraciones sobre el género *Habenaria* (Orchidaceae) en México. *Bol. Inst. Bot. Uni. Guadalajara* 1: 485–511.
- Tamura, K., Nei, M. & Kumar, S.** 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 11030–11035.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molec. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.