

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 10/06/2018.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA VEGETAL)**

**“COMPLEXO *Epidendrum secundum*” COMO MODELO DE ESTUDO
MULTIDISCIPLINAR NA DELIMITAÇÃO DE ESPÉCIES**

PAULA MALDONADO RABELO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Junho - 2016

PAULA MALDONADO RABELO

“Complexo *Epidendrum secundum*” como modelo de estudo
multidisciplinar na delimitação de espécies

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Ike Coan

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Pinheiro

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências do Campus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas (Biologia Vegetal).

Rio Claro

2016

581.4 Rabelo, Paula Maldonado
R114c Complexo Epidendrum secundum como modelo de
estudo multidisciplinar na delimitação de espécies / Paula
Maldonado Rabelo. - Rio Claro, 2016
89 f. : il., figs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Alessandra Ike Coan
Coorientador: Fábio Pinheiro

1. Anatomia Vegetal. 2. Anatomia floral de Orchidaceae.
3. Epidendroideae. 4. Cunículo. 5. Taxonomia integrativa. I.
Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Complexo *Epidendrum secundum*" como modelo de estudo multidisciplinar na delimitação de espécies

AUTORA: PAULA MALDONADO RABELO

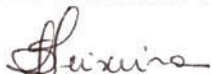
ORIENTADORA: ALESSANDRA IKE COAN

CO-ORIENTADOR: FABIO PINHEIRO

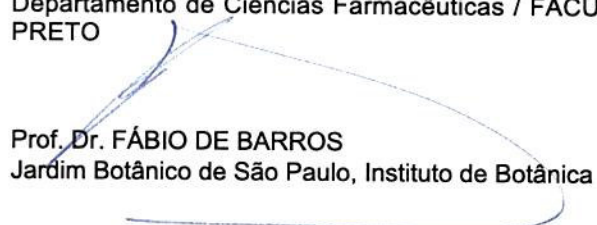
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ALESSANDRA IKE COAN
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Rio Claro - SP



Profa. Dra. SIMONE DE PÁDUA TEIXEIRA
Departamento de Ciências Farmacêuticas / FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO



Prof. Dr. FÁBIO DE BARROS
Jardim Botânico de São Paulo, Instituto de Botânica

Rio Claro, 10 de junho de 2016

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP, campus de Rio Claro), seu corpo docente e técnico-administrativo, por sete anos de aprendizado, vivenciados desde a minha formação inicial na graduação até a concretização deste mestrado.

À Ruhr-Universität Bochum, seu corpo docente, técnico-administrativo e discente, pela infraestrutura disponibilizada, todo o auxílio e prestatividade. É muito difícil se sentir em casa estando tão distante, e vocês tornaram isso possível para mim.

À FAPESP pelas bolsas concedidas, de mestrado regular (processo n. 2014/01416-9) e BEPE - bolsa estágio em pesquisa no exterior (processo n. 2015/10055-2), sem as quais esse trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

A Dra. Alessandra Ike Coan, por ter lido a carta no escaninho e aceitado me orientar desde a iniciação científica, por toda a paciência desde então, mas principalmente pela confiança em meu trabalho, às vezes maior do que a minha própria, por sempre me incentivar e respeitar minhas vontades de ir além.

Ao Dr. Fábio Pinheiro, que ajudou na idealização e realização deste projeto como coorientador, por toda a paciência em me ensinar desde os primeiros passos sobre as práticas de laboratório e estudos moleculares, e por ter aceitado e me proporcionado esse novo desafio.

Ao Dr. Thomas Stützel, por gentilmente ter me acolhido no “Lehrstuhl für Evolution und Biodiversität der Pflanzen (Ruhr-Universität Bochum)”, pela oportunidade de aprender com sua supervisão e aconselhamento.

A todos os colegas de laboratório, com os quais tive oportunidade de conviver por mais ou menos tempo durante esses anos, pela oportunidade de aprendizado que resultou dessa convivência. Agradeço também a todos os colegas da pós-graduação, de antes e durante, pelas risadas fáceis em meio a dias às vezes tão difíceis, em nossos encontros casuais.

Ao grupo de amigos (que coincidentemente eram colegas de trabalho - Blanca, Elaine, Kaire, Kleber, Luís Felipe, Mari Monteiro, Naiara), pela amizade, por toda a ajuda de sempre, por serem únicos e tornarem nossos momentos juntos sempre tão especiais.

Ao Luís Felipe, por ser um irmão-urso, pela parceria que fizemos, pela sinceridade, pelas ‘sessions’ de assuntos pessoais e profissionais, pelo laço dos ‘Abraços’, daqueles que se escrevem em livros, mas que uma vez no coração, não se rompem mais.

À Elaine, por toda a generosidade na parceria durante a graduação, por todos os ensinamentos e amizade que levo comigo desde então.

Ao Arthur, que não canso de repetir que me pegou pelas mãos e me ajudou a iniciar essa jornada, que foi tão altruísta para que pudéssemos comemorar a aprovação no programa de mestrado juntos.

À Missiani e à Adriana, em especial pelo apoio durante o período na Alemanha. Por todos os ‘kakao mit sahné oder tee’, pelas conversas e pela amizade, que ajudaram a tornar esse período na Alemanha tão familiar para mim.

Ao Christoph, que não vai entender uma palavra do que eu disser aqui, mas a quem não canso de agradecer por me acolher tão bem como colega e amiga, por me ajudar tanto com a dissertação, por não poupar esforços pra isso e não me deixar desistir.

A minha família, a que morava comigo e a que passei apenas a visitar, pelo amor e apoio incondicional, por compreender que foram meu maior incentivo a voar, mas por também mostrar que sempre tenho um refúgio para o qual voltar.

À Hellen Júlia, amiga-irmã que foi a primeira a mostrar que a distância é fácil de superar, que sempre estive tão presente mesmo estando longe.

Agradeço a todos que tive a oportunidade de conhecer e que de alguma forma, contribuíram para a realização dessa etapa, de perto ou de longe, por mais ou menos tempo.

Agradeço especialmente ao Thomas, por todo o amor e apoio, por estar sempre tão perto, mesmo que nossos braços estejam separados por um oceano de distância. Obrigada por ser a razão da minha ‘procuração’ e meu refúgio, principalmente nos meses finais. Obrigada por ser meu companheiro, por ser pessoa mais ‘wichtig’ pra mim, por ter começado a sonhar outros sonhos junto comigo.

Muito obrigada.

“Every new beginning comes from some other beginning’s end.”

- Sêneca

Resumo

O uso de fontes de dados diversas e de modo integrado tem facilitado o entendimento dos limites interespecíficos de grupos com difícil delimitação taxonômica, principalmente na região neotropical, que abriga a maior biodiversidade do planeta decorrente de processos de diversificação evolutiva. *Epidendrum* L. é o maior gênero de orquídeas nos neotrópicos; *E. secundum* e *E. xanthinum*, pertencentes ao denominado “complexo *E. secundum*” e distribuídas de maneira disjunta na Cadeia do Espinhaço e Serra do Mar, apresentam problemas de delimitação taxonômica devido ao grande polimorfismo quanto ao tamanho e forma das flores, sendo a existência de mais de uma espécie tema de muitos debates. Apesar de *E. secundum* e *E. xanthinum* apresentarem flores com cores contrastantes, estas espécies já foram consideradas como pertencentes a uma única espécie. O presente trabalho propôs responder as seguintes questões: 1) Existem diferenças micromorfológicas e anatômicas florais entre *E. secundum* e *E. xanthinum*, incluindo amostras de diferentes populações? 2) Indivíduos de *E. secundum* e *E. xanthinum*, provenientes de diferentes populações, exibem um padrão de monofiletismo recíproco, com diferentes ancestrais exclusivos? 3) Com base nessas diferentes fontes de dados, espécimes de *E. secundum* e *E. xanthinum* podem ser considerados como espécies distintas? Para tanto, foi estudada a micromorfologia e a anatomia floral de *E. secundum* e *E. xanthinum* a partir de técnicas usuais de microscopias de luz e eletrônica de varredura; também foram realizadas análises moleculares, utilizando sequências de DNA nuclear (região *ITS*) e do cloroplasto (*clp-psb*, *ndhJ-tabE*), previamente testadas em *Epidendrum*. Foi observada uniformidade nos caracteres micromorfológicos e anatômicos florais levantados, tanto para indivíduos de localidades disjuntas, mas de uma mesma espécie, quanto para aqueles de espécies diferentes. Contudo, algumas diferenças foram encontradas, especialmente para o labelo das amostras analisadas, com relação à presença de estômatos em diferentes regiões das peças florais estudadas, ao formato das células em vista frontal e do formato das suas paredes periclinais externas em secção transversal. Das 216 características micromorfológicas e anatômicas florais aqui avaliadas, apenas 54 delas são variáveis, sendo que somente cinco poderiam ser utilizadas para distinguir os indivíduos em nível específico. As análises moleculares, por outro lado, apresentaram grande suporte para a divisão dos indivíduos selecionados em dois clados monofiléticos, corroborando a divisão prévia das espécies de *E. secundum* e *E. xanthinum* proposta com base na coloração de suas flores.

Palavras-chave: Asparagales, cunículo, Epidendroideae, ginostêmio, labelo, monocotiledôneas, taxonomia integrativa.

Abstract

The use of various data sources in an integrated manner has facilitated the understanding of interspecific group limits, mainly in the neotropical region whose great biodiversity is related to evolutionary diversification processes. *Epidendrum* L. is the largest genus of orchids in the Neotropics; *E. secundum* and *E. xanthinum* belong to the called "*E. secundum* complex" with disjoint distribution in the Espinhaço Range (State of Minas Gerais, Brazil) and Serra do Mar (State of Rio de Janeiro, Brazil). The taxonomic delimitation problems in the complex are due to the large polymorphism as the size and shape of flowers, resulting in discussion about the existence of more than one species. Although *E. secundum* and *E. xanthinum* present flowers with contrasting colors, they have been considered as belonging to a single one. This work aimed to answer the following questions: 1) Are there floral micromorphological and anatomical differences between samples from different populations of *E. secundum* and *E. xanthinum*? 2) Does individuals from *E. secundum* and *E. xanthinum*, from distinct populations, display a reciprocal monophyly pattern, with different and exclusive ancestors? 3) Based on different data sources, can individuals from *E. secundum* and *E. xanthinum* be considered as distinct species? Therefore, we assessed the floral micromorphology and anatomy of *E. secundum* and *E. xanthinum* based on usual light and scanning electron microscopies; molecular analyzes were also performed using the nuclear (ITS region) and chloroplast (*clp-psb*, *ndhJ-tabE*) DNA sequences previously tested in *Epidendrum*. In the present study, we found that most of floral micromorphological and anatomical characters are shared by both *E. secundum* and *E. xanthinum* samples from disjoint populations, including individuals of what are previously considered different species. Nevertheless, some differences were found, especially for the labellum of the samples analyzed, mainly for the presence of stomata at different regions, the cell shape in frontal view and the shape of outer periclinal. From 216 floral micromorphological and anatomical characters assessed, only 54 are variable and just five could be used to distinguish individuals at specific level. On the other hand, molecular analysis strongly supports the division of the selected individuals into two monophyletic clades, corroborating the previous division of *E. secundum* and *E. xanthinum* as two different species based on colour of the flowers.

Keywords: Asparagales, cuniculus, Epidendroideae, gynostemium, lip, monocots, integrative taxonomy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Taxonomia Integrativa	9
1.2. Orchidaceae.....	11
1.3. O gênero <i>Epidendrum</i> e o “complexo <i>Epidendrum secundum</i> ”	13
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Coleta e identificação do material botânico	17
3.2. Microscopia de Luz (ML)	19
3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	20
3.4. Análises Moleculares	20
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Morfologia floral.....	22
4.2. Micromorfologia e anatomia floral	23
4.3. Análises moleculares.....	34
4.4. Figuras e tabelas	36
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

A definição conceitual de espécie tem sido extensivamente discutida ao longo da história e é possível encontrar na literatura diversos estudos teóricos que se propõem a explicar, definir e conceituar o termo (e.g. de Queiroz, 1998; Sites & Marshall, 2004). Os trabalhos empíricos de delimitação de espécies ainda são incipientes em comparação ao elevado número de publicações que se propõem à investigação conceitual e teórica (Sites & Marshall, 2004). A utilização de dados morfológicos, ecológicos e genéticos de um modo integrado tem se mostrado uma opção robusta para o entendimento dos limites interespecíficos de grupos com difícil delimitação taxonômica.

A ideia de uma ciência conjunta e integrativa tem sido proposta não apenas recentemente. Exemplo disso é o trabalho publicado por Clausen et al. (1939), em que se discutiu a importância dos estudos experimentais para a conceituação de espécies. Já nessa época, os autores apontavam para as limitações de estudos taxonômicos, ecológicos, geográficos, citológicos e genéticos, quando os mesmos eram realizados separadamente, com o propósito de delimitar espécies. Nesse sentido, Endress et al. (2000) afirmaram que a análise combinada de dados morfológicos e moleculares seria um grande passo nesse sentido: uma combinação de ambas as análises pode alcançar melhores resultados do que as abordagens isoladas de uma ou outra área de estudo.

1.1. Taxonomia Integrativa

Recentemente, a taxonomia integrativa vem se consolidando, buscando a delimitação de espécies usando abordagens múltiplas e complementares (Dayrat, 2005; Padial et al., 2010; Schlick-Steiner et al., 2010). Os estudos morfológicos e anatômicos sempre foram o eixo principal da sistemática de plantas, sendo utilizados na tentativa de elucidar a diversidade, filogenia e evolução dos grupos (Endress et al., 2000). Nos últimos anos, trabalhos baseados

em dados anatômicos e morfológicos combinados com outras fontes de dados têm apresentado grande destaque, evidenciando a importância de abordagens multidisciplinares para estudos de delimitação taxonômica.

Como exemplo de trabalho com múltiplos enfoques para famílias de monocotiledôneas, pode-se citar o trabalho de Giulietti et al. (2012), que buscou integrar a morfologia e anatomia aos dados de florística, taxonomia, biologia de populações, fisiologia e filogenia molecular, dentre outros, na tentativa de fornecer um amplo entendimento para Eriocaulaceae (Poales).

Mais especificamente, para Orchidaceae, há o trabalho de Salazar (2009), que analisou dados morfológicos e moleculares de duas espécies de *Galeoglossum* A.Rich. & Galeotti (subtribo Cranichidinae) com problemas de delimitação, levando às suas recircunscrições; o de Bell et al. (2009), no qual a estrutura do labelo de espécies da subtribo Orchidinae foi estudada para investigar a presença de néctar, relacionando os dados encontrados à filogenia obtida para o grupo a partir de sequências do espaçador *ITS*; o de Xiang et al. (2012), que inferiu a posição filogenética de dois gêneros asiáticos, *Thaia* Seidenf. e *Tangtsinia* S.C.Chen, através de evidências morfológicas e dados moleculares; e o trabalho de Pessoa et al. (2012), que investigou a delimitação de espécies pertencentes a *Epidendrum* subg. *Amphiglottium* Lindl., através da utilização de diferentes ferramentas e critérios (diferenciação fenética, monofiletismo e ausência de intermediários genéticos).

Além disso, a análise integrada de vários conjuntos de dados pode contribuir substancialmente para o entendimento dos processos evolutivos e de diversificação em regiões que apresentam cenários biogeográficos complexos, que não podem ser restritos a um intervalo de tempo ou mecanismo particulares, como é o caso da região Neotropical, que abriga a maior biodiversidade do planeta (Myers et al., 2000; Diniz-Filho et al., 2008; Antonelli & Sanmartín, 2011; Rull, 2011). A investigação e a compreensão da origem da

enorme diversidade observada na região neotropical devem estar atreladas a uma análise sistêmica e integrativa e deve contar com a disponibilidade de organismos-modelo para abordar questões fundamentais dos processos de diversificação evolutiva nessas regiões (Pinheiro & Cozzolino, 2013). Modelos que podem ser objetos de estudos como esse, tanto pela sua representatividade quanto pela diversidade na região Neotropical, são gêneros circunscritos em Orchidaceae. A família apresenta muitos grupos com problemas de delimitação, uma vez que grande parte é representada por novas delimitações taxonômicas, segregando espécies de outros gêneros, a uma taxa de 13 novos gêneros ao ano (Chase et al., 2015).

1.2. Orchidaceae

Orchidaceae é considerada a segunda maior família vegetal, com cerca de 27.500 espécies distribuídas em 736 gêneros (The Plant List, 2014; Chase et al., 2015). A família apresenta distribuição cosmopolita, sendo mais abundante e diversificada nas regiões tropicais. Orchidaceae é também reconhecida pela grande variação morfológica de seus representantes, principalmente em relação à morfologia floral, bem como pela alta taxa de hibridação ocorrente entre os indivíduos (Dressler, 1993, 2005). Tais características, altamente relacionadas à coevolução com a polinização do grupo por animais, principalmente por insetos (Dressler, 1981), resultam na enorme diversidade floral encontrada e tornam o grupo especialmente atrativo, com estudos extensamente documentados (e. g. Cameron et al., 1999; Borba & Semir, 2001; Borba et al., 2002; Prigdeon & Chase, 2003; Singer & Koehler, 2004; Davies et al., 2005; Stpiczyńska et al., 2005; van den Berg et al., 2009).

As flores em Orchidaceae, apesar de sua reconhecida diversidade floral, são caracterizadas, segundo Dressler (1993), por serem precedidas por uma bráctea e por serem hermafroditas, zigomórficas e ressupinadas durante o desenvolvimento (invertidas 180° de

sua posição original). As três tépalas externas são petalóides e imbricadas, conadas ou livres, enquanto as três internas são livres, variavelmente coloridas, sendo a mediana diferenciada em labelo. O androceu é composto de três ou menos estames, adnatos ao estilete e estigma pelos filetes, formando uma estrutura denominada de coluna ou ginostêmio. Os grãos de pólen geralmente são dispersos agrupados em massas chamadas polínias. O ovário é tricarpelar, com placentação parietal ou menos frequentemente axial, ínfero e em Laeliinae, geralmente pouco diferenciado durante o florescimento, terminando o desenvolvimento somente após a polinização. Estilete e estigma são bastante modificados, com uma porção do segundo não receptiva chamada rostelo. Em muitas Orchidaceae, o rostelo forma uma espécie de almofada viscosa, o viscídio, que, ligado à polínia, adere ao polinizador. Os óvulos são numerosos, com parede do nucelo delgada. O néctar, em geral, está ausente nas flores de Orchidaceae, mas pode ser produzido em esporas no labelo, ápices das sépalas ou nectários septais.

Dentre as cinco subfamílias propostas atualmente em Orchidaceae – Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae e Epidendroideae (Chase et al., 2003) – Epidendroideae é reconhecida como a maior delas, abrangendo aproximadamente 21.100 espécies, o que corresponde a 76% das espécies circunscritas na família (Govaerts et al., 2014). Ainda, as espécies inseridas em Epidendroideae representam a maior parte da radiação das orquídeas como um todo, apresentando muitas das características chaves presentes no grupo e que foram importantes na sua diversificação, como o epifitismo e caracteres nas anteras que evoluíram em conjunto com a especificidade de polinizador (Freudenstein & Chase, 2015; Endress, 2016). Desse modo, entender a diversificação das espécies dessa subfamília deve estar entre os principais objetivos atualmente para os estudos de sistemática em Orchidaceae.

Segundo Chase et al. (2015), desde a última classificação apresentada para Orchidaceae (Chase et al., 2003), houve muitas mudanças relacionadas aos limites genéricos

em muitas tribos e subtribos, que ocorreram em sua maioria para representantes da subfamília Epidendroideae. Apesar de mudanças na compreensão dos relacionamentos dentro da subfamília, Epidendroideae contém dois dos maiores gêneros de Orchidaceae: *Bulbophyllum* Thouars, com cerca de 2200 espécies (Gravendeel et al., 2014) e *Epidendrum* Lindl., com aproximadamente 1400 espécies (Chase et al., 2015).

1.3. O gênero *Epidendrum* e o “complexo *Epidendrum secundum*”

Epidendrum é um dos maiores gêneros dentre as orquídeas neotropicais, com 1413 espécies (Chase et al., 2015) que ocorrem desde o Sul da Flórida até o Norte da Argentina (Hágsater & Soto-Arenas, 2005). A sistemática do gênero é ainda controversa, principalmente devido à sua grande variação fenotípica (Pinheiro & Cozzolino, 2013); nesse sentido, a circunscrição de *Epidendrum* já foi objeto de muitos trabalhos (e. g. Dressler 1967, 1984; Hágsater, 1984; Hágsater & Soto-Arenas, 2005) e, atualmente, o gênero conta com revisões de alguns de seus subgêneros e seções (Pinheiro et al., 2009; Pinheiro & Cozzolino, 2013).

As espécies de *Epidendrum* apresentam grande variação morfológica e cromossômica, possuindo, ainda, fracas barreiras reprodutivas, o que permite a ocorrência de hibridações, extensamente documentadas na literatura (e.g. Dunsterville, 1979; Hágsater & Soto-Arenas, 2005; Pansarin & Amaral, 2008). Muitas espécies de *Epidendrum* subg. *Amphiglottium* Lindl. ocupam, frequentemente, ambientes originados por ação antrópica, como margens de rodovias e encostas desmatadas, originando populações com características morfológicas distintas (Pinheiro & Barros, 2007b), bem como zonas de hibridação entre espécies previamente isoladas (Dunsterville, 1979; Hágsater & Soto-Arenas, 2005).

Historicamente, 34 espécies de *Epidendrum* foram reconhecidas como pertencentes a *E.* subg. *Amphiglottium* (Lindley, 1852-1859), subdivididas em três seções, *Schistochila integra*, *Schistochila carinata* e *Schistochila tuberculata*, com base em características da

margem do labelo e forma do calo. Posteriormente, autores sugeriram sistemas de classificações alternativos para aquele proposto por Lindley (1852-1859), mas que se basearam em grande parte no sistema anteriormente proposto (Cogniaux, 1898-1902; Pabst & Dungs, 1975; Brieger, 1976-1977). De acordo com a última classificação proposta por Brieger (1976-1977), *E.* subg. *Amphiglottium* compreende três subseções: subsect. *Integra*, subsect. *Carinata* e subsect. *Tuberculata*. Embora estudos moleculares recentes apontem grande suporte para o monofiletismo de *Epidendrum* subg. *Amphiglottium*, apenas a subseção *Tuberculata* é suportada como grupo monofilético (Pinheiro et al., 2009), sendo que a subseção *Carinata* foi considerada polifilética e a subseção *Integra* carece de resultados conclusivos, necessitando investigações posteriores (Pinheiro et al., 2009).

Epidendrum sect. *Tuberculata* apresenta muitas incertezas taxonômicas, relacionadas principalmente com a delimitação de espécies (Pinheiro, 2005). Os caracteres morfológicos utilizados como diagnósticos para a delimitação de espécies distintas no grupo possuem uma extensa variação, e diferentes formas morfológicas podem ocorrer em localidades distintas ou estar reunidas numa única população. Um destes casos ocorre entre espécies do denominado “complexo *Epidendrum secundum*” (Dressler, 1989).

O “complexo *Epidendrum secundum*”, com plantas distribuídas por toda a América do Sul e que apresentam muitas polimorfias, é um dos grupos do gênero menos compreendido taxonomicamente (Brieger, 1976-1977; Dunsterville, 1979). A complexidade desse grupo, devido às variações apresentadas pelas espécies que o compõem, é alvo de discussão, uma vez que existe grande número de nomes associados, ora tratados como sinônimos de *Epidendrum secundum* Jacq., ora considerados como espécies distintas (*E. elongatum* Jacq., *E. crassifolium* Lindl., *E. ellipticum* Grah., *E. ansiferum* Rchb. f., *E. versicolor* Hoehne & Schltr., *E. xanthinum* Lindl., entre outras) (Pinheiro & Barros, 2007b). Alguns autores consideram cada morfologia ou coloração das flores como pertencente a uma espécie distinta

(Pabst & Dungs, 1975; Brieger, 1976-1977; Sastre, 1990a, b), enquanto outros afirmam que tais variações são contínuas, partes de uma mesma espécie polimórfica (Dunsterville & Garay, 1961; Garay & Sweet, 1974; Dressler, 1989).

Epidendrum secundum e *E. xanthinum* são duas espécies desse complexo com especial interesse por ocorrerem em simpatria e com distribuição disjunta em regiões da Cadeia do Espinhaço e Serra do Mar, com populações em Nova Friburgo e Santa Maria Madalena (Rio de Janeiro) e em Santa Bárbara e Santo Antônio do Itambé (Minas Gerais) (Pinheiro et al. 2009). *Epidendrum secundum* é uma das espécies com maior variação morfológica dentro do gênero (Pinheiro & Barros, 2007b), principalmente relacionadas ao tamanho e forma do labelo, enquanto que em *E. xanthinum* a única característica morfológica diagnóstica é a coloração amarela de suas flores (Pinheiro et al., 2009). Existem muitas incertezas taxonômicas relacionadas a essas duas espécies, que apresentam caracteres morfológicos vegetativos contínuos, sendo muito difícil distingui-las sem considerar a cor de suas flores. A escassez de informações ecológicas para essas espécies torna ainda mais complexo o esclarecimento de sua delimitação.

Se considerada cada espécie separadamente, existe um grande polimorfismo relacionado ao tamanho e à forma das flores provenientes destas localidades disjuntas nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, e a existência de mais de uma espécie é possível (Pinheiro, 2005). Além disso, o acúmulo de diferenças morfológicas pode estar também relacionado ao isolamento geográfico, visto que as populações ocorrem em localidades disjuntas, o que pode levar ao surgimento de barreiras reprodutivas entre diferentes populações e linhagens, sugerindo os estágios iniciais de formação de novas espécies, como já foi observado em *Epidendrum denticulatum* (Pinheiro et al., 2013), também pertencente ao mesmo subgênero.

A riqueza de variação morfológica, a diversidade cromossômica e o grande número de

interações ecológicas encontradas em *Epidendrum* fazem do mesmo um modelo potencial para o estudo de questões evolutivas, como seleção de habitat, biologia reprodutiva, polinização, mecanismos de especiação e isolamento reprodutivo (Hágsater & Soto-Arenas, 2005; Pinheiro et al., 2010, 2011). Esse modelo de estudo proposto possui características intrínsecas que conferem grande potencial para a investigação da evolução das orquídeas tropicais de modo semelhante aos estudos que vem sendo conduzidos para gêneros de orquídeas de regiões temperadas, como *Anacamptis* Rich. (Moccia et al., 2007), *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski (Paun et al., 2010) e *Ophrys* L. (Xu et al., 2011). Apesar da grande diversidade floral que *Epidendrum* apresenta, dos inúmeros estudos de morfologia e anatomia floral, biologia reprodutiva e de mecanismos de polinização (e. g. Pansarin, 2003; Pinheiro & Barros, 2007a; Moreira et al., 2008, Pansarin & Amaral, 2008; Pansarin & Pansarin, 2014), e mesmo de estudos que buscam elucidar a delimitação de espécies do gênero considerando diversas fontes de dados (e. g. Pessoa et al., 2012), aqueles que combinam os resultados anatômicos com alguma análise molecular são incipientes, não somente para o gênero, mas também para a família como um todo (e. g. Carlswald, 2004).

A investigação micromorfológica e anatômica floral pode representar, neste caso, uma contribuição fundamental para o levantamento de características que possam ser úteis na elucidação da delimitação taxonômica das espécies do grupo, constatando ou não a diversificação entre os indivíduos das populações amostradas, bem como de outras questões relativas à evolução e diferenciação de linhagens em populações de *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum*. Ainda, a anatomia floral dessas espécies pode revelar a presença de nectários, osmóforos, elaióforos e outras estruturas cujos papéis podem estar relacionados à atração de diferentes classes de polinizadores, sendo que as similaridades ou variações encontradas entre os indivíduos das diferentes populações podem indicar a tendência ou não para hibridações e especiações. Além disso, o sequenciamento de regiões de DNA nuclear e plastidial pode

revelar a existência de linhagens evolutivas distintas, auxiliando no entendimento sobre a distinção e a possível existência de diferentes espécies.

Neste contexto, a combinação de diferentes abordagens, integrando a morfologia e a anatomia floral a outras fontes de dados, como os moleculares, pode auxiliar no esclarecimento das relações evolutivas e de parentesco entre grupos de espécies que apresentam incertezas taxonômicas.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho se propôs a investigar as seguintes questões:

- 1) Existem diferenças micromorfológicas e anatômicas florais entre *E. secundum* e *E. xanthinum*, incluindo amostras de diferentes populações? Como estas diferenças estão ligadas aos variados mecanismos de polinização (ausência ou presença de nectários, osmóforos, elaióforos ou outras estruturas de recompensa a polinizadores)?
- 2) Considerando os conceitos filogenéticos e de caracteres diagnósticos para a delimitação de espécies, indivíduos de *E. secundum* e *E. xanthinum*, provenientes de diferentes populações, exibem um padrão de monofiletismo recíproco, com diferentes ancestrais exclusivos?
- 3) Com base nessas diferentes fontes de dados, espécimes de *E. secundum* e *E. xanthinum* podem ser considerados como espécies distintas?

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e identificação do material botânico

O material utilizado no presente trabalho compreendeu indivíduos de quatro populações de *Epidendrum secundum* Jacq. e *Epidendrum xanthinum* Lindl., provenientes de Nova Friburgo e Santa Maria Madalena (RJ) e de Santa Bárbara e Santo Antônio do Itambé

alta taxa de fluxo gênico intraespecífica, como observado pelos filogramas reconstruídos pelos dados do marcador molecular nuclear.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da grande diversidade floral que o gênero *Epidendrum* apresenta, informações sobre a morfologia e anatomia florais são incipientes; apenas alguns trabalhos propõem uma investigação anatômica e/ou micromorfológica e, desse modo, os dados aqui obtidos para caracteres florais, para populações de *E. secundum* e *E. xanthinum*, são apresentados pela primeira vez, e podem fornecer outros parâmetros que permitam a caracterização das espécies, além da coloração das flores. Além disso, foi possível discutir alguns aspectos relativos à biologia da polinização para *E. xanthinum*, de acordo com as suas similaridades com *E. secundum*, espécie para a qual já existem outros estudos mais detalhados sobre os mecanismos polinização.

Os dados micromorfológicos e anatômicos florais aqui obtidos, para *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum*, não indicaram padrões para variações em indivíduos de uma mesma espécie encontrados em localidades disjuntas, e também não foram encontradas variações significativas mesmo quando se considerou indivíduos de espécies diferentes. Contudo, o estudo molecular aqui conduzido, utilizando marcadores nucleares e plastidiais, permitiu claramente a percepção de *E. secundum* e *E. xanthinum* como duas espécies distintas, que apresentam relação filogenética próxima por pertencerem ao clado *Amphiglottium* subsect. *Tuberculata*, o que justifica suas similaridades micromorfológicas e anatômicas florais.

O presente estudo mostra a importância da consolidação de uma abordagem integrativa para a taxonomia, uma vez que considerar uma ou outra fonte de dados, isoladamente, poderia levar a interpretações equivocadas na delimitação das espécies aqui analisadas, pertencentes ao “complexo *E. secundum*”. O modelo de estudo aqui proposto, com a combinação de diferentes

abordagens, integrando a morfologia e anatomia a outras fontes de dados, como os moleculares e de biologia reprodutiva das plantas, pode ser adotado para outros grupos de espécies que apresentam incertezas taxonômicas, de modo a auxiliar a esclarecer as relações evolutivas e de parentesco entre elas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A.M., Figueiredo, R.A. 2003. Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a Brazilian rainforest: Effects on herbivory and pollination. *Brazilian Journal of Biology* 63: 551-558.
- Andersson, S., Nilsson, L.A.A., Groth, I., Bergström, G. 2002. Floral scents in butterfly-pollinated plants: possible convergence in chemical composition. *Botanical Journal of the Linnean Society* 140:129-153.
- Antonelli, A., Sanmartín, I. 2011. Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon* 60: 403-414.
- Barthlott, W. 1981. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nordic Journal of Botany* 1: 345-355.
- Bell, A.K., Roberts, D.L., Hawkins, J.A., Rudall, P.J., Box, M.S., Bateman, R.M. 2009. Comparative micromorphology of nectariferous and nectarless labellar spurs in selected clades of subtribe Orchidinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 160: 369-387.
- Borba, E.L., Semir, J. 2001. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) Species: A multiple population approach. *Annals of Botany* 88: 75-88.
- Borba, E.L., Shepherd, G.J., van den Berg, C., Semir, J. 2002. Floral and vegetative

- morphometrics of five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. *Annals of Botany* 90: 219-230.
- Boyden, T.C. 1980. Floral mimicry by *Epidendrum ibaguense* (Orchidaceae) in Panama. *Evolution*, 34, 135-136.
- Brieger, F.G. 1976-1977. Gattungsreihe Epidendra. In: Brieger, F.G., Maatsch, R., Senghas, K., eds. *Schlechter, Die Orchideen*. Berlin, Paul Parey, v.3(1). pp.509-549.
- Cameron, K.M., Chase, M.W., Whitten, W.M., Kores, P.J., Jarrell, D.C., Albert, V.A., Yukawa, T., Hills, H., Goldman, D.H. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: Evidence from *rbcl* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 86(2): 208-224.
- Carlsward, B.S. 2004. Molecular systematics and anatomy of *Vandaeae* (Orchidaceae): the evolution of monopodial leaflessness. PhD. Dissertation, University of Florida, Florida.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L., Freudenstein, J.V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L., Cribb, P.J., eds. *Orchid conservation*. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo), pp.69-89.
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Freudenstein, J.V., Pridgeon, A.M., Salazar, G., van den Berg, C., Schuiteman, A. 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177: 151-174.
- Clausen, J., Keck, D.D., Hiesey, W.M. 1939. The concept of species based on experiment. *American Journal of Botany* 26(2): 103-106.
- Cogniaux, A. 1898-1902. *Epidendrum*. In: Martius, C.F.P., Eichler, A.G., Urban, I., eds. *Flora Brasiliensis* 3(5). R. Oldenbourg, Munich, pp.30-186.
- Davies, K.L., Turner, M.P., Gregg, A. 2003. Lipoidal labellar secretions in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 91: 439-446.
- Davies, K.L., Stpiczyńska, M., Gregg, A. 2005. Nectar-secreting floral stomata in *Maxillaria anceps* Ames & C. Schweinf. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 96: 217-227.

- Davis, A.R. 1997. Influence of floral visitation on nectar-sugar composition and nectary surface changes in *Eucalyptus*. *Apidologie* 28: 27-42.
- Davis, A.R., Gunning, B.E.S. 1991. The modified stomata of the floral nectary of *Vicia faba* L.
2. Stomatal number and distribution as selection criteria for breeding for high nectar sugar production. *Acta Horticulturae* 288: 329-334.
- Davis, A.R., Pylatiuk, J.D., Paradis, J.C., Low, N.H. 1998. Nectar-carbohydrate production and composition vary in relation to nectary anatomy and location within individual flowers of several species of Brassicaceae. *Planta* 205: 305-318.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407-415.
- de Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. Pp. 57-75 In: Howard, D.J., Berlocher, S.H., eds. *Endless forms: Species and speciation*. Oxford: Oxford University Press.
- Devey, D. S., Bateman, R. M., Fay, M. F., & Hawkins, J. A. 2008. Friends or relatives? Phylogenetics and species delimitation in the controversial European orchid genus *Ophrys*. *Annals of Botany* 101(3): 385-402.
- Diniz-Filho, J.A.F., Telles, M.P.C., Bonatto, S.L., Eizirik, E., Freitas, T.R.O., Marco, P., Santos, F.R., Sole-Cava, A., Soares, T.N. 2008. Mapping the evolutionary twilight zone: Molecular markers, populations and geography. *Journal of Biogeography* 35: 753-763.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dressler, R. 1967. The genera *Amblostoma*, *Lanidium* and *Stenoglossum*. *Brittonia* 19: 237-243.
- Dressler, R. 1981. *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press, pp.332
- Dressler, R. 1984. La delimitación de géneros en el complejo *Epidendrum*. *Orquidea (Mexico City)* 9: 277-298.
- Dressler, R.L. 1989. Will the real *Epidendrum ibaguense* please stand up? *American Orchid*

- Society Bulletin* 58(8): 796-800.
- Dressler, R. 1990. *The orchids: natural history and classification*. London: Harvard University Press.
- Dressler, R. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Portland: Dioscorides Press, pp.316.
- Dressler, R. 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158.
- Dunsterville, G.C.K. 1979. Orchids of Venezuela – *Epidendrum elongatum*. *American Orchid Society Bulletin* 48: 447-454.
- Dunsterville, G.C.K., Garay, L.A. 1961. *Venezuelan Orchids Illustrated* v. 2. London, Andre Deutsch. pp.360.
- Endress, P.K., Baas, P., Gregory, M. 2000. Systematic plant morphology and anatomy: 50 Years of progress. *Taxon* 49: 401-434.
- Endress, P.K. 2016. Development and evolution of extreme synorganization in angiosperm flowers and diversity: a comparison of Apocynaceae and Orchidaceae. *Annals of Botany* 117(5): 749-767.
- Faegri, K., van der Pijl, L. 1966. *The principles of pollination ecology*. Oxford: Pergamon Press, pp.248.
- Fenster, C.B., Armbruster, W. S., Wilson, P., Dudash, M. R., & Thomson, J. D. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 375-403.
- Freudenstein, J.V., Chase, M.W. 2015. Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification. *Annals of Botany* 115: 665-681.
- Fuhro, D., Araújo, A.M.D., Irgang, B.E. 2010. Are there evidences of a complex mimicry system among *Asclepias curassavica* (Apocynaceae), *Epidendrum fulgens* (Orchidaceae), and *Lantana camara* (Verbenaceae) in Southern Brazil? *Brazilian Journal of Botany* 4: 589-598.
- Garay, L.A., Sweet, H. R. 1974. Orchidaceae. In: Howard, R.A., ed. *Flora of the Lesser Antilles*.

- Massachusetts, Harvard University. pp.235.
- Gerstberger, P., Leins, P. 1978. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Blütenknospen von *Physalis philadelphia* (Solanaceae). *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 91: 381-387.
- Giulietti, A.M, Andrade, M.J.G., Scatena, V.L., Trovó, M., Coan, A.I., Sano, P.T., Santos, F.A.R., Borges, R.L.B., van der Berg, C. 2012. Molecular phylogeny, morphology and their implications for the taxonomy of Eriocaulaceae. *Rodriguésia* 63(1): 1-19.
- Govaerts, R. 2014. *World checklist of Orchidaceae*. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Available at: <http://apps.kew.org/wcsp/> (acesso em 14 Abril 2016).
- Gravendeel, B., Smidt, E.C., Fischer, G.A., Vermeulen, J.J., Schuiteman, A. 2014. *Bulbophyllum*. In: Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W., Rasmussen, F.N., eds. *Genera Orchidacearum, Vol. 6, Epidendroideae (Part three)*. Oxford, Oxford University Press, pp.4-51.
- Hágsater, E. 1984. Towards an understanding of the genus *Epidendrum*. In: Tan, K.W., ed. *Proceedings of the 11th World Orchid Conference*. Miami: 11th World Orchid Conference. pp.195-201.
- Hágsater, E., Soto-Arenas, M.A. 2005. *Epidendrum* L. in: Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W., Rasmussen, F.N., eds. *Genera Orchidacearum*, vol. 4. Oxford: Oxford University Press, pp.236-251.
- Hansson, B.S. 1995. Olfaction in Lepidoptera. *Experientia*, 51: 1003-1027.
- Harris, S. A., Ingram, R. 1991. Chloroplast DNA and biosystematics: the effects of intraspecific diversity and plastid transmission. *Taxon*, 393-412.
- Ibisch, P.L., Boegner, A., Nieder, J., Barthlott, W. 1996. How diverse are neotropical epiphytes? An analysis based on the catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. *Ecotropica* 2: 13-28.

- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company, pp.523.
- Johnson, S. D., Steiner, K. E. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology & Evolution* 15(4): 140-143.
- Kearns, C.A., Inouye, D.W. 1993. *Techniques for pollination biology*. Texas: University of Texas Press.
- Knudsen, J.T., Tollsten, L., Groth, I., Bergström, G., Raguso, R.A. 2004. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in hummingbird-pollinated taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society* 146: 191-199.
- Koehler, S., Cabral, J. S., Whitten, W. M., Williams, N. H., Singer, R. B., Neubig, K. M., ... & Maria do Carmo, E. A. 2008. Molecular phylogeny of the neotropical genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): species delimitation and insights into chromosome evolution. *Annals of botany* 102(4): 491-507.
- Lindley, J. 1852-1859. *Epidendrum*. In: Lindley, J., ed. *Folia Orchidacea*. J. Matthews, London, pp.1-97.
- Martins, D.J., Johnson, S.D. 2007. Hawkmoth pollination of Aerangoid orchids in Kenya, with special reference to nectar sugar concentration gradients in the floral spurs. *American Journal of Botany* 94: 650-659.
- Melo, M.C., Borba, E.L., Paiva, E.A.S. 2010. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* 286: 141-151.
- Moccia, M.D., Widmer, A., Cozzolino, S. 2007. The strength of reproductive isolation in hybridizing food deceptive orchids. *Molecular Ecology* 16: 2855-2866.
- Moreira, A.S.F.P., Fuhro, D., Isaias, R.M.S. 2008. Anatomia floral de *Epidendrum fulgens* Brongn. (Orchidaceae - Epidendroideae) com ênfase no nectário e sua funcionalidade. *Revista de Biologia Neotropical* 5: 23-29.
- Moya, S., Ackerman, J. 2008. Variation in the floral fragrance of *Epidendrum ciliare*

- (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany* 13: 41-47.
- Müller, C. 2006. Plant–Insect interactions on cuticular surfaces. In: Riederer, M.; Müller, C., eds. *Biology of plant cuticle*. Oxford: Blackwell Publishing, pp.398-422.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A.B., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular ecology* 13(5): 1143-1155.
- Nylander, J.A.A. 2004 MrModeltest Version 2. Program Distributed by the Author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala.
- O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59: 368-373.
- O'Brien, S.P., Loveys, B.R., Grant, W.J. 1996. Ultrastructure and function of floral nectaries of *Chamelaucium uncinatum* (Myrtaceae). *Annals of Botany* 78: 189-196.
- Pabst, G.F.J., Dungs, F. 1975. *Orchidaceae Brasilienses v. I*. Hildesheim, Kurt Schmiersow. pp.408.
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I., Vences, M. 2010. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7: 16-30.
- Pansarin, E.R. 2003. Biologia reprodutiva e polinização em *Epidendrum paniculatum* Ruiz & Pavón (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26(2): 203-211.
- Pansarin, E.R., Amaral, M.C.E. 2008. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) floral variation: A consequence of natural hybridization? *Plant Biology* 10: 211-219.
- Pansarin, E.R., Pansarin, L.M. 2014. Reproductive biology of *Epidendrum tridactylum* (Orchidaceae: Epidendroideae): a reward-producing species and its deceptive flowers. *Plant Systematics and Evolution* 300: 321-328.
- Paun, O., Bateman, R.M., Fay, M.F., Hedrén, M., Civeyrel, L., Chase, M.W. 2010. Stable

- epigenetic effects impact adaptation in allopolyploid orchids (*Dactylorhiza*: Orchidaceae). *Molecular Biology and Evolution* 27: 2465-2473.
- Pessoa, E.M., 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.
- Petit, R. J., Excoffier, L. (2009). Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & evolution* 24(7): 386-393.
- Pinheiro, F. 2005. *Avaliação das relações intra e interespecíficas no complexo Epidendrum secundum e espécies afins (Orchidaceae) através de AFLP*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Pinheiro, F., Barros, F. 2007a. *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. denticulatum* Barb. Rodr. (Orchidaceae): caracteres úteis para a sua delimitação. *Hoehnea* 34(4): 563-570.
- Pinheiro, F., Barros F. 2007b. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany* 25:129-136.
- Pinheiro, F., Cozzolino, S. 2013. *Epidendrum* (Orchidaceae) as a model system for ecological and evolutionary studies in the Neotropics. *Taxon* 62: 77-88.
- Pinheiro, F., Koehler, S., Corrêa, A. M., Salatino, M. L. F., Salatino, A., Barros, F. 2009b. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 283:165-177.
- Pinheiro, F., Barros, F.D., Palma-Silva, C., Meyer, D., Fay, M.F., Suzuki, R.M., Lexer, C., Cozzolino, S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* 19: 3981-3994.
- Pinheiro, F., Barros, F., Palma-Silva, C., Fay, M.F., Lexer, C., Cozzolino, S. 2011. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: A Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of*

- Biogeography* 38: 1923-1935.
- Pinheiro, F., Cozzolino, S., 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.
- Pridgeon, A.M., Stern, W.L. 1983. Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 70: 1233-1243.
- Pridgeon, A.M., Stern, W.L. 1985. Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 146: 115-123.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W., Rasmussen, F.N. 1999. *Genera Orchidacearum*. Oxford: Oxford University Press. v. 1.
- Pridgeon, A.M., Chase, M.W. 2003. Phylogenetics of the subtribe Pleurothallidinae (Epidendreae: Orchidaceae) based on combined evidence from DNA sequences. *Lankesteriana* 7: 49-50.
- Radice, S., Galati, B.G. 2003. Floral nectary ultrastructure of *Prunus persica* (L.) Batch cv. Forastero (Newcomer), an Argentine peach. *Plant Systematics and Evolution* 238: 23-32.
- Razem, F.A., Davis, A.R. 1999. Anatomical and ultrastructural changes of the floral nectary of *Pisum sativum* L. during flower development. *Protoplasma* 206: 57-72.
- Rieseberg, L. H., Whitton, J., Linder, C. R. 1996. Molecular marker incongruence in plant hybrid zones and phylogenetic trees. *Acta Botanica Neerlandica* 45(3): 243-262.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian Phylogenetic Inference under Mixed Models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>>.
- Rull, V. 2011. Neotropical biodiversity: Timing and potential drivers. *Trends in Ecology & Evolution* 26: 508-513.

- Salazar, G.A. 2009. DNA, morphology, and systematics of *Galeoglossum* (Orchidaceae, Cranichidinae). In: Pridgeon, A.M., Suárez, J.P., eds. *Proceedings of the Second Scientific Conference on Andean Orchids*. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja, 161-172.
- Sastre, C. 1990a. *Epidendrum bambusiformes* de Guadeloupe et de Martinique 1. *L'Orchidophile* 93:149-158.
- Sastre, C. 1990b. *Epidendrum bambusiformes* de Guadeloupe et de Martinique 2. *L'Orchidophile* 94:197-203.
- Scarcelli, N., Barnaud, A., Eiserhardt, W., Treier, U. A., Seveno, M., d'Anfray, A., ..., Pintaud, J. C. 2011. A set of 100 chloroplast DNA primer pairs to study population genetics and phylogeny in monocotyledons. *Plos one* 6(5): e19954.
- Schlick-Steiner, B.C., Steiner, F.M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., Crozier, R.H. 2010. Integrative taxonomy: A multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology* 55: 421-438.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94:275-288.
- Silvestro, D., Michalak, I. 2011. raxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity Evol.* online, doi: 10.1007/s13127- 011-0056-0.
- Singer, R.B., Koehler, S. 2004. Pollinarium morphology and floral rewards in Brazilian Maxillariinae (Orchidaceae). *Annals of Botany* 93: 39-51.
- Sites, J.W., Marshall, J.C. 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35: 199-227.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Stebbins, G.L. 1970. Adaptative radiation of reproductive characteristics in angiosperms. In: *Pollination mechanisms. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 1: 307-326.

- Stern, W.L., Curry, K.J., Pridgeon, A.M. 1987. Osmophores of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 74: 1323-1331.
- Stpiczyńska, M. 2001. Osmophores of the fragrant orchid *Gymnadenia conopsea* L. (Orchidaceae). *Acta Soc Bot Pol* 70: 91-96.
- Stpiczyńska, M., Davies, K.L., Gregg, A. 2005. Comparative account of nectary structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 95: 749-756.
- Sun, Y., D. Z. Skinner, G. H. Liang, and S. H. Hulbert. 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 26–32.
- Teuber, L.R., Albersten, M.C., Barnes, D.K., Heichel, G.H. 1980. Structure of floral nectaries of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in relation to nectar production. *American Journal of Botany* 67: 433-439.
- The Plant List. 2014. Disponível em: www.theplantlist.org. (Acesso em 14 April 2016).
- Tremblay, R.L. 1992. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. *Canadian Journal of Botany* 70: 642-650.
- van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Soto-Arenas, M.A., Chase, M.W. 2009. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. *Annals of Botany* 104: 417-430.
- van der Cingel, N.A. 2001. *An atlas of orchid pollination: European orchids*. CRC Press.
- van der Pijl, L., Dodson, C.H. 1966. *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Fairchild Tropical Garden and the University of Miami Press.
- Vaidya, G., Lohman, D.J. and Meier, R. 2011. SequenceMatrix: Concatenation Software for the Fast Assembly of Multi-Gene Datasets with Character Set and Codon Information. *Cladistics* 27: 171-180.
- Vogel, S. 1954. *Blütenbiologische Typen als Elemente der Sippen-Gliederung*. Jena: G. Fischer.

- Vogel, S. 1990. *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. Amerind, New Delhi, India.
- Xiang, X.G., Li, D.Z., Jin, W.T., Zhou, H.L., Li, J.W., Jin, X.H. 2012. Phylogenetic placement of enigmatic orchid genera *Thaia* and *Tangtsinia*: evidence from molecular and morphological characters. *Taxon* 61: 45-54.
- Xu, S., Schlüter, P., Scopece, G., Bretkopf, H., Gross, K., Cozzolino, S., Schiestl, F.P. 2011. Floral isolation is the main reproductive barrier among closely related sexually deceptive orchids. *Evolution* 65: 2606-2620.
- Waddle, R.M., Lersten, N.R. 1973. Morphology of discoid floral nectaries in Leguminosae, especially tribe Phaseoleae (Papilionoideae). *Phytomorphology* 23: 152-161.
- Weryszko-Chmielewska, E., Masierowska, M.L., Konarska, A. 2003. Characteristics of floral nectaries and nectar in two species of *Crataegus* (Rosaceae). *Plant Systematics and Evolution* 238: 33-42.