
**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 Meste 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

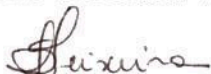
ORIENTADORA: ALESSANDRA IKE COAN

CO-ORIENTADOR: FABIO PINHEIRO

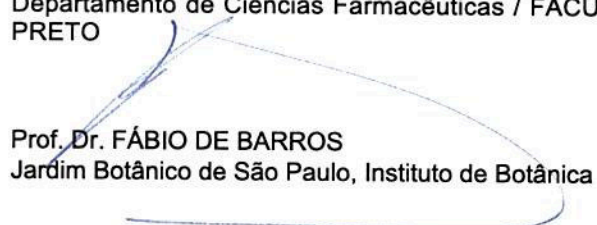
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA VEGETAL), pela Comissão Examinadora:



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 ‘procrastinação’ 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

(MG). Além destes, especificamente para as análises moleculares, também foram analisados indivíduos de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. e *Epidendrum* sp. Os detalhes dos dados de coleta encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Lista dos indivíduos amostrados das espécies estudadas para análises em microscopia de luz e eletrônica de varredura, com dados de coleta.

Espécie	Locais de Coleta	N ^{*1}	Voucher ^{*2}	Códigos das populações e dos indivíduos ^{*3}
<i>E. secundum</i>	Santa Bárbara, MG, Brasil	2	F. Pinheiro 637	Es1-SB, Es2-SB
<i>E. secundum</i>	Nova Friburgo, RJ, Brasil	3	F. Pinheiro 559	Es3-NF, Es4-NF, Es5-NF
<i>E. xanthinum</i>	Santa Bárbara, MG, Brasil	1	-	Ex1-SB
<i>E. xanthinum</i>	Nova Friburgo, RJ, Brasil	4	F. Pinheiro 566	Ex2-NF, Ex3-NF, Ex4-NF, Ex5-NF

^{*1}Número de indivíduos analisados, por população. ^{*2}Para alguns indivíduos, o processamento nos herbários ainda está sendo realizado. ^{*3}Optou-se por utilizar esses códigos para ressaltar a análise de diferentes espécimes de cada táxon estudado. Legenda: NF – Nova Friburgo; SB – Santa Bárbara; Es – *Epidendrum secundum*; Ex – *Epidendrum xanthinum*.

Tabela 2: Lista dos indivíduos amostrados das espécies estudadas para as análises moleculares, com dados de coleta.

Espécie	Locais de Coleta	N ^{*1}	Voucher ^{*2}	Códigos das populações e dos indivíduos ^{*3}
<i>E. secundum</i>	Santa Bárbara, MG, Brasil	3	F. Pinheiro 638	S1-SB, S2-SB, S3-SB
<i>E. secundum</i>	Nova Friburgo, RJ, Brasil	2	F. Pinheiro 639	S4-NF, S5-NF
<i>E. secundum</i>	Santa Maria Madalena, RJ, Brasil	2	F. Pinheiro 640	S6-SMM, S7-SMM
<i>E. xanthinum</i>	Santa Bárbara, MG, Brasil	3	F. Pinheiro 545, F. Pinheiro 565	X1-SB, X2-SB, X3-SB
<i>E. xanthinum</i>	Santo Antônio do Itambé, MG, Brasil	1	F. Pinheiro 568	X4-SAI
<i>E. xanthinum</i>	Santa Maria Madalena, RJ, Brasil	2	F. Pinheiro 641, F. Pinheiro 642	X9-SMM, X10-SMM
<i>Epidendrum</i> sp.	Cadeia dos Andes, Equador	1	F. Pinheiro 546	E1-EQ
<i>E. orchidiflorum</i>	Areia Branca, SE, Brasil	1	F. Pinheiro 21	E2-OUT

^{*1}Número de indivíduos analisados, por população. ^{*2}Para alguns indivíduos, o processamento nos herbários ainda está sendo realizado. ^{*3}Optou-se por utilizar esses códigos para ressaltar a análise de diferentes espécimes de cada táxon estudado. Legenda: EQ – Equador; NF – Nova Friburgo; OUT – grupo externo; SAI – Santo Antônio do Itambé; SB – Santa Bárbara; SMM – Santa Maria Madalena; S – *E. secundum*; X – *E. xanthinum*.

Para as análises em microscopia de luz e eletrônica de varredura, a realização do estudo com indivíduos provenientes de duas localidades apenas (Santa Bárbara - MG e Nova Friburgo - RJ), bem como a amostragem de apenas um indivíduo de *Epidendrum xanthinum* de Santa Bárbara - MG, se deveu à baixa disponibilidade de material botânico, pela falta de flores para o estudo. As exsiccatas do material estudado foram depositadas no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo (SP). Pelo menos um indivíduo de cada população foi herborizado, sendo que para os demais o processamento no herbário ainda está sendo realizado. Durante os estudos, exemplares dos indivíduos foram mantidos em cultivo no Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado do Instituto de Botânica de São Paulo e/ou no Jardim Experimental do Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP.

3.2. Microscopia de Luz (ML)

Inflorescências de *Epidendrum secundum* e *Epidendrum xanthinum* foram fixadas em FAA 50 (Johansen, 1940) e armazenadas em etanol 70%, com algumas gotas de glicerina.

O material destinado às análises em microscopia de luz (ML) foi dissecado sob estereomicroscópio e as peças florais foram desidratadas isoladamente, em bateria de álcool n-butílico, e incluídas em historresina Leica (Leica Historesin Embedding Kit), conforme instruções do fabricante. Em seguida, as amostras foram seccionadas com auxílio de micrótomo de rotação (RM 2235, Leica), com espessuras de 5-10 µm, com navalha de aço descartável. As secções foram coradas com Azul de Toluidina O 0,05% 0,1 M em tampão fosfato de sódio pH 6,8 (O'Brien et al., 1965) para análises gerais e, posteriormente, montadas em Entellan. O teste histoquímico com Vermelho Neutro foi realizado para a detecção de osmóforos e nectários ativos (Kearns & Inouye, 1993). O estudo foi realizado no Laboratório de Morfologia Vegetal do Departamento de Botânica (Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP).

A análise e a interpretação dos resultados foram feitas a partir das lâminas permanentes confeccionadas e das observações anatômicas ao microscópio de luz. As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio Leica DM4000 com câmera acoplada (DFC450).

3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura

A seleção do material para as análises sob Microscopia Eletrônica de Varredura foi feita sob estereomicroscópio. As peças florais, previamente fixadas em FAA 50 (Johansen, 1940) e armazenadas em etanol 70% com algumas gotas de glicerina, foram então desidratadas em FDA (dimetoximetano) por pelo menos 24 h (Gerstberger & Leins, 1978) e submetidas a ponto crítico (Critical Point Dryer CPD030 – Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein). As amostras foram fixadas aos suportes metálicos e metalizadas com ouro (Sputter Coater SCD 050 - Bal-Tec AG, Balzers, Liechtenstein), para observação ao microscópio eletrônico de varredura (Zeiss Sigma VP SEM), no Lehrstuhl für Evolution und Biodiversität der Pflanzen, na Ruhr-Universität em Bochum, sob a supervisão do Prof. Dr. Thomas Stützel (estágio BEPE processo FAPESP n. 2015/10055-2).

3.4. Análises Moleculares

Para as análises moleculares, foram selecionados sete indivíduos de *Epidendrum secundum* e dez de *E. xanthinum*, provenientes de populações de Nova Friburgo e Santa Maria Madalena (RJ), e de Santa Bárbara e Santo Antônio do Itambé (MG); um indivíduo de *Epidendrum* sp., proveniente da Cadeia dos Andes (Equador) e de flores amarelas, também foi incluído nas análises, enquanto *E. orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. foi utilizado neste trabalho como grupo externo (detalhes na Tabela 2). Para cada indivíduo estudado, foi coletada uma folha que foi desidratada em sílica gel. O DNA genômico total foi extraído de

tecido fresco ou desidratado seguindo o protocolo de CTAB descrito por Doyle & Doyle (1990). As regiões plastidiais *clp-psb* e *ndhJ-tabE* e a região nuclear *ITS* foram amplificadas através de PCR (“polymerase chain reaction”) seguindo o protocolo de Pinheiro et al. (2009) e usando primers *Forward* e *Reverse* descritos por Scarcelli et al. (2011), Shaw et al. (2007) e Sun et al. (1994), respectivamente. O ciclo de PCR utilizado para as regiões plastidiais foi de 94 °C por 3 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58 °C (*clp-psb*) ou 60 °C (*ndhJ-tabE*) por 1 minuto, e 72 °C por 1,5 minuto; seguidos por uma extensão final de 7 minutos a 72 °C. Para a região nuclear *ITS* o ciclo programado foi de 94 °C por 5 minutos; 28 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 54 °C por 1 minuto, e 72 °C por 3 minutos; seguidos pela extensão a 72 °C por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram purificados e sequenciados pela empresa MacroGen®. As extrações e amplificações foram realizadas no Laboratório de Ecologia Molecular (Departamento de Ecologia, Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP).

As sequências foram, então, editadas manualmente usando o programa Geneious versão 8.1.5., e o mesmo programa foi utilizado para a geração de alinhamentos de múltiplas sequências. As matrizes usadas para a reconstrução filogenética foram sequências concatenadas do conjunto de dados dos três marcadores filogenéticos (*clp-psb*; *ndhJ-tabE*; *ITS*), dos marcadores plastidiais (*clp-psb*; *ndhJ-tabE*) e do marcador nuclear isolado (*ITS*), produzidas no SequenceMatrix versão 1.8 (Vaidya et al., 2011). O melhor modelo de substituição de DNA para a matriz concatenada foi determinado usando o programa MrModeltest (Nylander, 2004). O modelo GTR (General Time Reversible) de evolução, com parâmetros para sítios invariáveis e heterogeneidade dos táxons modelados sob uma distribuição gama (GTR + I + G), foi determinado como sendo o melhor modelo de substituição. A reconstrução filogenética usando inferência Bayesiana foi realizada através do programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). As análises foram feitas com

50 milhões de gerações, salvando as árvores produzidas a cada 1000 gerações, com descarte de 25% das primeiras árvores geradas.

As análises de máxima verossimilhança (“maximum likelihood”) foram conduzidas usando o programa RAxML versão 7.0.4 (Stamatakis, 2006) e RAxML-GUI versão 1.3 (Silvestro & Michalak, 2011). O modelo de substituição encontrado, usando o programa MrModeltest (Nylander, 2004), também sugeriu o uso do modelo GTR (General Time Reversible) de evolução com parâmetros para locais invariantes e heterogeneidade dos táxons modelados sob uma distribuição gama (GTR + I + G). Para encontrar a árvore com melhor verossimilhança, as análises foram feitas com 100 repetições independentes para a busca de árvores na matriz concatenada; os valores de bootstrap (BS) foram calculados e inseridos na árvore de melhor topologia de acordo com as análises de máxima verossimilhança.

4. RESULTADOS

4.1. Morfologia floral

Epidendrum secundum e *E. xanthinum* são caracterizadas por apresentar inflorescências terminais, de hastes longas e dispostas em corimbos, compostas por aproximadamente 10 a 25 flores não ressupinadas (Fig. 1A, B). As flores de *E. secundum* apresentam cor lilás (Fig. 1A, C), enquanto que as de *E. xanthinum* são amarelas (Fig. 1B, D); as sépalas e pétalas são livres, de tamanhos semelhantes (Fig. 1A-D). O labelo encontra-se parcialmente fundido à coluna, apresentando-se livre apenas em seu ápice, no disco e lobos (Figs 1C, D, 2A-D). O labelo é 3-lobado (Figs 1A-D, 2A-D), unguiculado (Fig. 2B, D); o calo é carnoso, recortado de diversas formas (Figs 1C, D, 2A-D); os lobos são fimbriados (Figs 1C, D, 2A-D); o unguículo é adnato às margens ventrais do ginostêmio até o ápice deste (Fig. 2B, D). A coluna é projetada do centro da flor, com a antera localizada ligeiramente deslocada

para o dorso da coluna e superfície estigmática abaixo desta (Figs 1C, D, 2A-D); o ovário projeta-se até o cunículo (Fig. 2B).

4.2. Micromorfologia e anatomia floral

O estudo micromorfológico e anatômico floral de indivíduos de ambas as espécies estudadas, pertencentes às populações de Nova Friburgo (RJ) e de Santa Bárbara (MG), revelou caracteres compartilhados, que serão descritos a seguir. Alguns caracteres variaram entre os indivíduos das diferentes populações e espécies e serão apresentados conforme detectados em cada peça floral estudada. Para simplificar o entendimento e a descrição dos resultados, os cinco indivíduos de *E. secundum* serão identificados pelas iniciais “Es”, seguidas do respectivo número de identificação (Tabela 1); para aqueles cinco pertencentes a *E. xanthinum*, a abreviação será “Ex”, também seguida do número de identificação da amostra em questão. Além disso, para identificar a população de procedência dos indivíduos, serão assinaladas as iniciais “NF”, para aqueles procedentes de Nova Friburgo, e “SB”, para aqueles de Santa Bárbara.

Para todas as peças florais estudadas sob microscopia eletrônica de varredura, foram analisadas as regiões apical, mediana e dorsal, uma vez que foi constatada uma possível variação nas características nesse gradiente; os dados relativos à microscopia de luz são apresentados para a região mediana das peças, exceto para estruturas como o ginostêmio, em que o detalhamento também foi feito para as três regiões da peça estudada. Um sumário com 216 características micromorfológicas e anatômicas florais é apresentado nas Tabelas 3 a 7, nas quais estão destacados, em **negrito**, os caracteres que podem ser utilizados na distinção entre as espécies; em sublinhado, destaque para aqueles caracteres que podem distinguir indivíduos da mesma espécie, pertencentes às populações disjuntas; e em sobrescrito, identificação dos indivíduos para os quais os caracteres foram variáveis.

- Sépala dorsal

Na região apical desta peça, na face adaxial, as células epidérmicas possuem parede periclinal externa com ornamentação inconspícua ou levemente estriada (Fig. 3A), ausente apenas em Ex1-SB (Fig. 3B) e Es5-NF; nas regiões mediana e basal, a ornamentação é estriada para todas as amostras analisadas (Fig. 3C), exceto para Ex1-SB, na qual a ornamentação é inconspícua na região basal (Fig. 3D). A ornamentação também ocorre na parede anticlinal das células epidérmicas da maioria dos indivíduos amostrados (Fig. 3A, C, D), ausente apenas em Ex1-SB (Fig. 3B) e Es5-NF.

Em vista frontal, as células epidérmicas apresentam formato irregular em todas as regiões da sépala dorsal e para a maioria dos indivíduos analisados (Fig. 3A-D), com exceção de Ex2-NF, Ex3-NF, Ex5-NF (Fig. 3E), Es1-SB e Es2-SB, que apresentam células com formato hexagonal na região basal da peça. Em secção transversal, a face adaxial da sépala dorsal possui epiderme uniestratificada, com paredes periclinais externas convexas e espessas (Fig. 3F). Na região apical, foram observados estômatos em todos os indivíduos analisados (Fig. 3A); estômatos também foram encontrados na região mediana da peça de todos os indivíduos de *E. xanthinum* analisados (Fig. 3G).

Na face abaxial da epiderme da sépala dorsal, a ornamentação das paredes celulares periclinal externa e anticlinal é inconspícua (Fig. 3H). Em vista frontal, nas regiões apical e mediana, as células têm formato irregular (Fig. 3H), exceto em Ex2-NF (Fig. 3I) e Ex3-NF, nas quais as células são alongadas longitudinalmente. Na região basal, as células epidérmicas são longitudinalmente alongadas (Fig. 3J), com exceção de Ex5-NF, que possui células irregulares (Fig. 3K). Em secção transversal, as células epidérmicas são retangulares, com paredes periclinais externas retas e espessas (Fig. 3L). Estômatos foram observados no ápice e na região mediana desta peça floral (Fig. 3H, I), ausentes apenas na região mediana em Ex5-NF e Es5-NF (Fig. 3M); na região basal, estômatos não foram observados para a maioria das

amostras (Fig. 3J, K), exceto para Ex1-SB e Ex4-NF (Fig. 3N). Em ambas as faces, a cutícula é inconspícua, exceto na face abaxial da peça de todos os indivíduos amostrados de Santa Bárbara - MG, em que é espessa (Fig. 3L).

A margem da sépala dorsal é lisa externamente e formada por células da epiderme e do mesofilo (Fig. 3O-Q). Todas as amostras estudadas, de ambas as espécies, apresentam mesofilo homogêneo, formado por células parenquimáticas de paredes delgadas (Fig. 3P, Q). Ocorre um número variável de idioblastos com ráfides, principalmente nas margens da peça floral (Fig. 3P, Q). A vascularização é dada geralmente por sete feixes vasculares colaterais (Fig. 3P), com exceção de todos os indivíduos analisados de *E. secundum* de Nova Friburgo - RJ, que apresentam seis feixes vasculares (Fig. 3Q). Em secção transversal, observa-se que o formato da sépala dorsal é plano para todos os espécimes aqui estudados, de ambas as espécies e localidades (Fig. 3P, Q).

- Sépalas laterais

As sépalas laterais assemelham-se micromorfológica e anatomicamente à sépala dorsal. Na face adaxial, as células epidérmicas apresentam ornamentação nas paredes periclinais externas que varia de inconspícua a estriada (Fig. 4A), embora Ex4-NF não apresente ornamentação na região apical da peça (Fig. 4B). Na parede anticlinal das células epidérmicas, a ornamentação ocorre na maioria das amostras (Fig. 4A), exceto para Ex4-NF (Fig. 4B), Es1-SB, Es2-SB e Es5-NF, nas quais a ornamentação está ausente no ápice da peça. Em vista frontal, as células da epiderme possuem formato irregular (Fig. 4A, B), exceto em Ex1-SB, na qual possuem formato hexagonal na região mediana da peça (Fig. 4C). Em secção transversal, a epiderme é uniestratificada, apresentando células isodiamétricas, com paredes periclinais externas espessas e de formato convexo (Fig. 4D). Estômatos foram observados no

ápice da peça floral para todos os espécimes (Fig. 4B), e na região mediana apenas para Ex1-SB (Fig. 4C).

Na face abaxial da sépala lateral, as células epidérmicas possuem paredes periclinais externas com ornamentação inconspícua (Fig. 4E); para as células do ápice, a ornamentação é ausente em Ex1-SB (Fig. 4F) e Es1-SB; nas paredes anticlinais das células, a ornamentação também está presente (Fig. 4E), embora na região apical da peça a ornamentação esteja ausente para Ex1-SB (Fig. 4F), Ex2-NF e Es1-SB. No ápice e na região mediana, o formato das células epidérmicas é irregular em vista frontal (Fig. 4E); na região basal, as células são longitudinalmente alongadas (Fig. 4G), exceto em Ex2-NF (Fig. 4H) e Ex4-NF, nos quais as células são irregulares. Em secção transversal, as células epidérmicas são retangulares, sendo que as paredes periclinais externas possuem formato reto e são espessas (Fig. 4I); na região apical, ocorrem estômatos (Fig. 4F, H). Para ambas as faces, a cutícula é inconspícua, exceto para os indivíduos de Santa Bárbara - MG, em que a mesma é espessada da face abaxial (Fig. 4I).

Nas sépalas laterais, a margem é lisa, sendo formada por células da epiderme e do mesofilo (Fig. 4J, K). O mesofilo da sépala lateral é similar ao da sépala dorsal, diferenciando-se pela presença de oito feixes vasculares em todos os indivíduos de ambas as espécies provenientes de Nova Friburgo - RJ (Fig. 4J), enquanto que aqueles de Santa Bárbara - MG apresentam dez feixes distribuídos assimetricamente pelo mesofilo (Fig. 4K). As sépalas laterais apresentam formato plano em secção transversal, levemente curvado, sendo que a nervura central é levemente proeminente para os indivíduos estudados de ambas as espécies e para as duas localidades (Fig. 4J, K).

- Pétalas

Na face adaxial das pétalas, as regiões apical, mediana e basal apresentam células epidérmicas com paredes periclinais externas e anticlinais com ornamentação estriada em todos os espécimes (Fig. 5A). Em vista frontal, as células da epiderme apresentam formato irregular (Fig. 5A); já em secção transversal, a epiderme é uniestratificada, composta por células isodiamétricas de paredes periclinais externas espessas e convexo-papilosas, recobertas por cutícula inconspícua para todos os indivíduos das duas espécies, de ambas as localidades estudadas (Fig. 5B). Apenas na região apical da peça foram observados estômatos (Fig. 5C), ausentes apenas em Es1-SB (Fig. 5D).

Já na face abaxial, as células da epiderme apresentam paredes periclinais externas e anticlinais com ornamentação que varia de inconspícua a densamente ornamentada (Fig. 5E); a exceção é Es2-SB, em que a ornamentação é ausente na região mediana da peça (Fig. 5F). Em vista frontal, nas regiões apical e mediana, as células epidérmicas têm formato irregular (Fig. 5E, F); na região basal, as células têm formato irregular para todos os espécimes de Nova Friburgo - RJ (Fig. 5G) e longitudinalmente alongado para aqueles de Santa Bárbara - MG (Fig. 5H), exceto para Ex5-NF, cujas células são longitudinalmente alongadas (Fig. 5I). A epiderme é semelhante àquela da face adaxial, mas as células apresentam paredes periclinais externas convexas na face abaxial (Fig. 5J). Apenas na região apical da peça, foram observados estômatos (Fig. 5K), exceto em Es2-SB.

As pétalas apresentam margem externamente lisa e, em secção transversal, é possível observar que a mesma é formada por células epidérmicas e do mesofilo (Fig. 5L-N). O mesofilo é homogêneo, formado por parênquima regular, com células de paredes delgadas e, geralmente, contém sete feixes vasculares colaterais (Fig. 5M), exceto para todos os indivíduos de *E. secundum* de Nova Friburgo - RJ, que apresentam cinco feixes (Fig. 5N). Ocorrem idioblastos com ráfides, em número variável, próximos às margens das pétalas (Fig.

5J, M, N). Em secção transversal, as pétalas apresentam formato plano para todos os indivíduos aqui analisados (Fig. 5M, N).

- Labelo

No labelo, os lobos central e laterais apresentam características de revestimento semelhantes, tanto para a face adaxial quanto para a abaxial: as células epidérmicas possuem paredes periclinais externas e anticlinais com ornamentação estriada (Fig. 6A-D); em vista frontal, essas células apresentam formato irregular (Fig. 6A-D). Em secção transversal, a epiderme é formada por células isodiamétricas, de paredes periclinais externas espessas, de formato convexo-papiloso na face adaxial e convexo na face abaxial, recobertas por cutícula inconspícua (Fig. 6E, F). Não foram observados estômatos nos lobos do labelo (Fig. 6A-D), com exceção da face adaxial do lobo central de Ex4-NF (Fig. 6G).

A margem dos lobos do labelo é lisa (Fig. 6H, I) e formada por células da epiderme e do mesofilo (Fig. 6J-L); os lobos são caracterizados por mesofilo homogêneo, formado por parênquima com células de paredes delgadas, além de idioblastos com ráfides (Fig. 6J-L). No lobo central, para os indivíduos amostrados de Nova Friburgo - RJ, ocorrem sete feixes vasculares colaterais para os indivíduos de *E. xanthinum* (Fig. 6J) e dez feixes para aqueles de *E. secundum* (Fig. 6K); para *E. secundum* e *E. xanthinum* de Santa Bárbara - MG, ocorrem nove feixes vasculares colaterais (Fig. 6L). Já nos lobos laterais, a vascularização é dada por cinco feixes vasculares para os indivíduos de *E. xanthinum* de ambas as localidades analisadas (Fig. 7A) e por seis feixes vasculares para aqueles de *E. secundum* (Fig. 7B).

Na região apical e mediana do labelo, na face adaxial, o calo apresenta células epidérmicas com paredes periclinais externas e anticlinais de ornamentação estriada (Fig. 7C). Em vista frontal, as células da epiderme apresentam formato irregular (Fig. 7C); em

secção transversal, essas células são isodiamétricas, com paredes periclinais externas espessas, retas e recobertas por cutícula inconspícua (Fig. 7D).

Na região basal do calo do labelo, na face adaxial, ocorre um sulco central em todos os indivíduos de ambas as espécies e localidades (Fig. 7E), que se acentua conforme a proximidade da porção estigmática do ginostêmio (Fig. 7F, G). Nessa mesma região, as células epidérmicas possuem paredes periclinais externas e anticlinais com ornamentação estriada (Fig. 7H), e formato longitudinalmente alongado em vista frontal (Fig. 7H). Em secção transversal, a epiderme do calo é formada por células isodiamétricas, de paredes periclinais externas espessas e convexas, com cutícula inconspícua (Fig. 7I); já a epiderme do sulco é formada por pequenas células papilosas, de paredes muito espessadas, sendo que as periclinais externas são densamente ornamentadas (Fig. 7J). Não foram observados estômatos no calo do labelo (Fig. 7C, D, I). O mesofilo do calo é semelhante àquele dos lobos do labelo (Fig. 7D, F, G, I); o calo apresenta uma maior quantidade relativa de idioblastos com ráfides e não possui vascularização (Fig. 7D, F, G).

Já na face abaxial do labelo, estendendo-se também por toda a porção abaxial da coluna, o unguículo apresenta uma cavidade rasa e é homogêneo por toda a sua extensão (Fig. 8A). As células da epiderme possuem paredes periclinais externas e anticlinais com ornamentação estriada (Fig. 8B), exceto na região basal de Ex2-NF, em que é inconspícua (Fig. 8C). As células epidérmicas têm formato longitudinalmente alongado em vista frontal (Fig. 8B, C), mas na região basal do unguículo, para Ex1-SB, Ex5-NF (Fig. 8D) e todos os indivíduos de *E. secundum* amostrados, as células possuem formato irregular; na região apical do unguículo, próximo ao ápice do lobo central, as células epidérmicas também têm formato irregular para todas as amostras analisadas (Fig. 8E).

A epiderme do unguículo é formada por células isodiamétricas, de paredes periclinais externas espessas e convexas em secção transversal, por toda sua extensão (Fig. 8F),

recobertas por uma cutícula espessa (Fig. 8F). Estômatos geralmente estão ausentes (Fig. 8B-D), mas presentes em Ex5-NF na região apical (Fig. 8G), Ex4-NF na região mediana (Fig. 8H), e para todos os espécimes estudados na região apical próxima ao lobo central (Fig. 8E, I). O mesofilo do unguículo é semelhante ao dos lobos do labelo (Fig. 7F, G); a vascularização de todo o calo do labelo se restringe à porção ventral, no unguículo: ocorrem sete feixes vasculares para os indivíduos de ambas as espécies provenientes de Nova Friburgo - RJ (Fig. 7F), e nove feixes vasculares para os indivíduos de Santa Bárbara - MG (Fig. 7G), de ambas as espécies.

- Ginostêmio

No ginostêmio, na face adaxial da epiderme da coluna, as paredes periclinais externas e anticlinais apresentam ornamentação estriada (Fig. 9A); na região basal, os indivíduos de *E. xanthinum* de Nova Friburgo – RJ, apresentam ornamentação inconspícua (Fig. 9B), exceto por Ex5-NF, cuja ornamentação é estriada (Fig. 9C). Na região apical, as células da epiderme apresentam formato irregular em vista frontal (Fig. 9D), enquanto que nas regiões mediana e basal as células são alongadas longitudinalmente (Fig. 9A-C). Em secção transversal, a epiderme é caracterizada por apresentar células de paredes periclinais externas espessas, que variam de convexo-papilosas na região apical a convexas na região mediana (Fig. 9E) a retas na região basal do ginostêmio (Fig. 9F). Não foram observados estômatos (Fig. 9A-F). O ginostêmio é caracterizado por apresentar mesofilo homogêneo, formado por parênquima regular de células de paredes delgadas, contendo idioblastos com ráfides por toda sua extensão (Fig. 9G-J). O número de feixes vasculares varia de acordo com a porção do ginostêmio analisada e com os espécimes estudados, e serão descritos a seguir.

Em secção transversal do ginostêmio, é possível observar que o sulco do calo se amplia na cavidade estigmática (Fig. 9G-J); em secção transversal, é possível observar uma

clara distinção entre as células epidérmicas que a revestem (Fig. 10A). Na porção superior da cavidade estigmática, as células epidérmicas são pequenas e isodiamétricas, frouxamente dispostas em uma matriz mucilaginosa (Fig. 10B); na porção inferior, essas células são pequenas e papilosas, de paredes periclinais externas muito espessas e ornamentadas (Fig. 10C). Nessa região, feixes vasculares geralmente estão ausentes lateralmente à abertura da cavidade estigmática (Fig. 9G-I), com exceção de *E. xanthinum* de Santa Bárbara - MG, que apresenta dois feixes vasculares colaterais nessa altura (Fig. 9J). Na porção ventral do unguículo, ocorrem oito feixes vasculares para os indivíduos de *E. secundum* de Santa Bárbara - MG (Fig. 9G) e seis feixes para aqueles de Nova Friburgo - RJ (Fig. 9I); em *E. xanthinum*, são encontrados cinco feixes vasculares nos indivíduos de Nova Friburgo (Fig. 9H) e sete feixes para o de Santa Bárbara (Fig. 9J).

A antera apresenta células epidérmicas com paredes periclinais externas e anticlinais de ornamentação estriada (Fig. 10D); em vista frontal, essas células têm formato irregular (Fig. 10D). Em secção transversal, a antera é formada por epiderme uniestratificada, de células papilosas, com cutícula inconspícua (Fig. 10E); estômatos estão densamente distribuídos (Fig. 10D), ausentes apenas em Es4-NF (Fig. 10F). O conectivo apresenta feixe vascular colateral único (Fig. 10E). O polinário contém quatro polínias, proporcionais ao tamanho da superfície estigmática (Fig. 10G-J). Nesta região do ginostêmio, ocorrem dois feixes vasculares colaterais na lateral da cavidade estigmática para o indivíduo de *E. xanthinum* de Santa Bárbara - MG (Fig. 10G) e um feixe para aqueles de Nova Friburgo - RJ (Fig. 10H), enquanto que os indivíduos de *E. secundum* de ambas as localidades não apresentam os feixes laterais (Fig. 10I, J). São encontrados sete feixes ventrais para os indivíduos provenientes de Santa Bárbara - MG (Fig. 10G, I); para os indivíduos de Nova Friburgo - RJ, ocorrem três feixes para os de *E. xanthinum* (Fig. 10H) e seis feixes vasculares colaterais para aqueles de *E. secundum* (Fig. 10J).

Na região mediana do ginostêmio (Fig. 11A-D), ainda é possível observar a distinção entre as células epidérmicas que revestem a cavidade estigmática (Fig. 10A-C), tal qual descrito para a região apical. Em secção longitudinal, é possível observar a formação de viscido na região do rostelo (Fig. 11E). Nesta região do ginostêmio, para todos os indivíduos estudados, ocorre um feixe vascular colateral dorsal (Fig. 11A-D). Para o indivíduo de *E. xanthinum* de Santa Bárbara - MG, ocorrem também dois feixes vasculares laterais, na altura da cavidade estigmática (Fig. 11C); para *E. xanthinum* de Nova Friburgo - RJ e *E. secundum* de ambas as localidades, ocorre apenas um feixe vascular lateralmente à cavidade estigmática (Fig. 11A, B, D). Com relação aos feixes ventrais, para os indivíduos de Santa Bárbara - MG, aqueles de *E. secundum* apresentam sete feixes vasculares ventrais (Fig. 11A) e o de *E. xanthinum*, cinco destes feixes (Fig. 11C); *E. secundum* e *E. xanthinum* de Nova Friburgo - RJ apresentam apenas três feixes vasculares colaterais ventrais (Fig. 11B, D). Todos os feixes vasculares, com exceção de um dos feixes dorsais que aparece abaixo da altura da antera, apresentam uma calota de fibras, abaixo do floema (Fig. 11A-D).

Na região basal do ginostêmio, em secções transversais, é possível observar que a cavidade estigmática vai se restringindo progressivamente (Fig. 12A, B), até individualizar duas cavidades (Fig. 12C, D). A epiderme da cavidade superior é formada por células pequenas e isodiamétricas, dispostas em uma matriz mucilaginosa (Fig. 12E). Já a cavidade inferior é o nectário floral, e é formado pela junção do unguículo do labelo à coluna, e se estende paralelamente ao ovário por aproximadamente $2/3$ de seu comprimento total; as células da epiderme interna são pequenas e papilosas, de paredes periclinais externas muito espessas e ornamentadas, o citoplasma é denso e o núcleo é proeminente, indicando intensa atividade celular (Fig. 12F). Nessa região do ginostêmio, a cutícula que recobre as células epidérmicas é conspícua e podem ocorrer estômatos (Fig. 12G).

Na região basal do ginostêmio, há dois feixes vasculares colaterais dorsais, para todos os indivíduos de ambas as espécies (Fig. 12C, D); para os indivíduos de ambas as espécies provenientes de Santa Bárbara - MG, são observados outros dois feixes vasculares colaterais lateralmente à cavidade superior, um de cada lado da cavidade, somando-se quatro feixes laterais (Fig. 12C), enquanto que para os indivíduos das duas espécies de Nova Friburgo - RJ, ocorre apenas um feixe vascular lateralmente à cavidade superior (Fig. 12D). Na porção ventral, ocorrem três feixes vasculares colaterais para todos os indivíduos das duas espécies analisadas (Fig. 12C, D). Todos os feixes vasculares apresentam uma calota de fibras abaixo do floema (Fig. 12A-D), exceto para o segundo feixe dorsal nos indivíduos de Nova Friburgo – RJ (Fig. 12D), de ambas as espécies.

No cunículo, por toda sua extensão e em ambas as faces, as células epidérmicas possuem paredes periclinais externas e anticlinais com ornamentação que varia de inconspícua a lisa (Fig. 13A, B). Todos os espécimes analisados apresentam células epidérmicas de formato longitudinalmente alongado em vista frontal (Fig. 13A, B). Em secção transversal, a epiderme externa é uniestratificada, formada por células isodiamétricas de paredes periclinais externas retas, muito espessas e ornamentadas (Fig. 13C); a cutícula é espessa e acompanha a ornamentação das paredes periclinais externas das células epidérmicas (Fig. 13C). Estômatos ocorrem por toda a extensão do cunículo (Fig. 13A, C). O mesofilo é homogêneo, composto por parênquima com células de paredes delgadas, contendo idioblastos com ráfides (Fig. 13C-E). É possível identificar a presença das duas cavidades individuais ao longo das regiões apical e mediana do cunículo (Fig. 13D, E), mas em sua região basal, onde está situado o ovário (Fig. 13G), a cavidade inferior do nectário não é mais observada.

O ovário é formado por três lobos externos, provenientes do prolongamento das sépalas dorsal e laterais, unidos a uma estrutura formada também por três lobos do cunículo, que são mais internos (Fig. 13F, G). A epiderme do ovário é uniestratificada; a epiderme

externa é semelhante àquela do cunículo (Fig. 13H, I), já a epiderme interna possui células menores e com a parede periclinal externa reta, delgada e não ornamentada (Fig. 13J). Ocorrem três feixes vasculares colaterais em cada um dos lobos externos do ovário (Fig. 13F, G) e dois feixes vasculares nas porções formadas pelo cunículo (Fig. 13F, G).

4.3. Análises moleculares

Ao final da edição das sequências, excluindo-se as regiões com baixa resolução das extremidades, que apresentavam discordâncias, aquelas do gene nuclear *ITS* apresentaram 791 pares de bases (pb) de comprimento, enquanto as da região delimitada pelo gene *clp-psb* foram constituídas por 805 pb e as de *ndhJ-tabE* por 486 pb. Para a região plastidial *clp-psb*, dados estavam disponíveis apenas para 17 das 19 sequências, uma vez que para duas amostras (X3-SB e E1-EQ) o eletroferograma apresentou sinal com muitas ambiguidades e as sequências não puderam ser geradas e incluídas no alinhamento; apesar disso, foram utilizados os dados dessas amostras para as demais regiões analisadas, e as análises no RaxML e MrBayes foram geradas como dados faltantes para essas duas sequências. A matriz molecular combinada apresentou 1291 pb para as sequências do cloroplasto e 2082 pb para as sequências nuclear e plastidiais concatenadas.

As topologias encontradas para as árvores de reconstrução filogenética em máxima verossimilhança e por inferências bayesianas foram idênticas para os filogramas resultantes da combinação das regiões nuclear e plastidiais (*ITS*, *clp-psb* e *ndhJ-tabE*; Fig. 14A, B), para a árvore gerada apenas a partir dos dados da região nuclear (*ITS*; Fig. 15A, B) e para a combinação apenas das regiões plastidiais (*clp-psb* e *ndhJ-tabE*; Fig. 16A, B). Para os filogramas gerados com os dados das regiões nucleares e plastidiais combinados, *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum* estão representados como clados monofiléticos, com alto suporte (BS86/93, prob. 100%; Fig. 15A, B). No clado de *E. secundum*, *Epidendrum* sp. amostrado do

Equador, que apresenta flores amarelas, aparece como grupo-irmão das demais espécies (Fig. 14A, B).

Para as reconstruções filogenéticas baseadas nas informações apenas do marcador nuclear, a árvore em máxima verossimilhança sugere também a formação de dois clados monofiléticos para *E. secundum* e *E. xanthinum* (BS100/93; Fig. 15A); nas análises bayesianas, não são formados dois clados, embora sejam formados agrupamentos com indivíduos de cada espécie (prob. 100%; Fig. 15B). Embora estes filogramas apresentem alto suporte para a divisão dos clados correspondentes às espécies estudadas, a resolução interna de cada clado não está tão clara para os indivíduos amostrados, com valores de BS particularmente baixos para a inferência pelo marcador *ITS*, representando uma grande politomia para os indivíduos de *E. xanthinum* (Fig. 15A, B). Nas duas análises, também não foi possível observar uma separação entre indivíduos de diferentes populações.

Já com relação aos dados dos marcadores plastidiais combinados, para ambos os filogramas gerados, não há a divisão de dois clados para as espécies de *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum* (Fig. 16A, B), não havendo apoio para o reconhecimento destas como espécies distintas, de acordo com o conceito filogenético de espécies. Contudo, para *E. xanthinum*, há um agrupamento monofilético, tanto nas análises em máxima verossimilhança quanto bayesianas (BS96, prob. 99%; Fig. 16A, B), incluindo *Epidendrum* sp. amostrado do Equador, cujas flores também são amarelas. Para *E. secundum*, há um pequeno agrupamento formado em ambas as reconstruções filogenéticas, compostos pelos indivíduos amostrados de Santa Bárbara - MG e Santa Maria Madalena - RJ (BS54, prob. 100%; Fig. 16A, B).

4.4. Figuras e tabelas

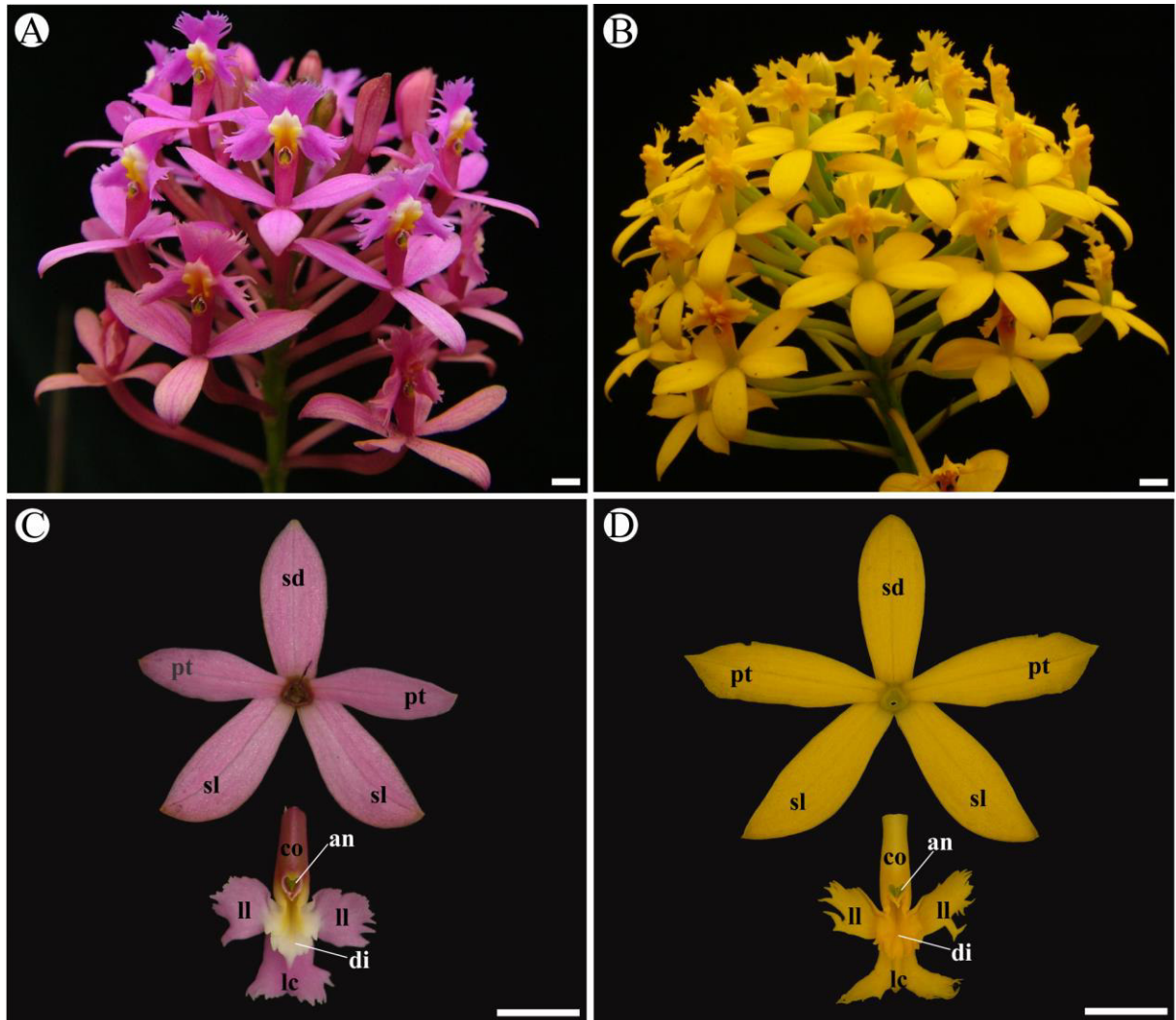


Figura 1. Morfologia floral de *Epidendrum secundum* Jacq. Es2-SB (A, C) e de *Epidendrum xanthinum* Lindl. Ex3-NF (B, D). A,B) Visões gerais das inflorescências. C, D) Detalhes das peças florais. an: antera; co: coluna; di: disco do labelo; lc: lobo central; ll: lobo lateral; pt: pétala; sd: sépala dorsal; sl: sépala lateral. Barras de escalas: A, B= 5mm; C, D= 1cm.

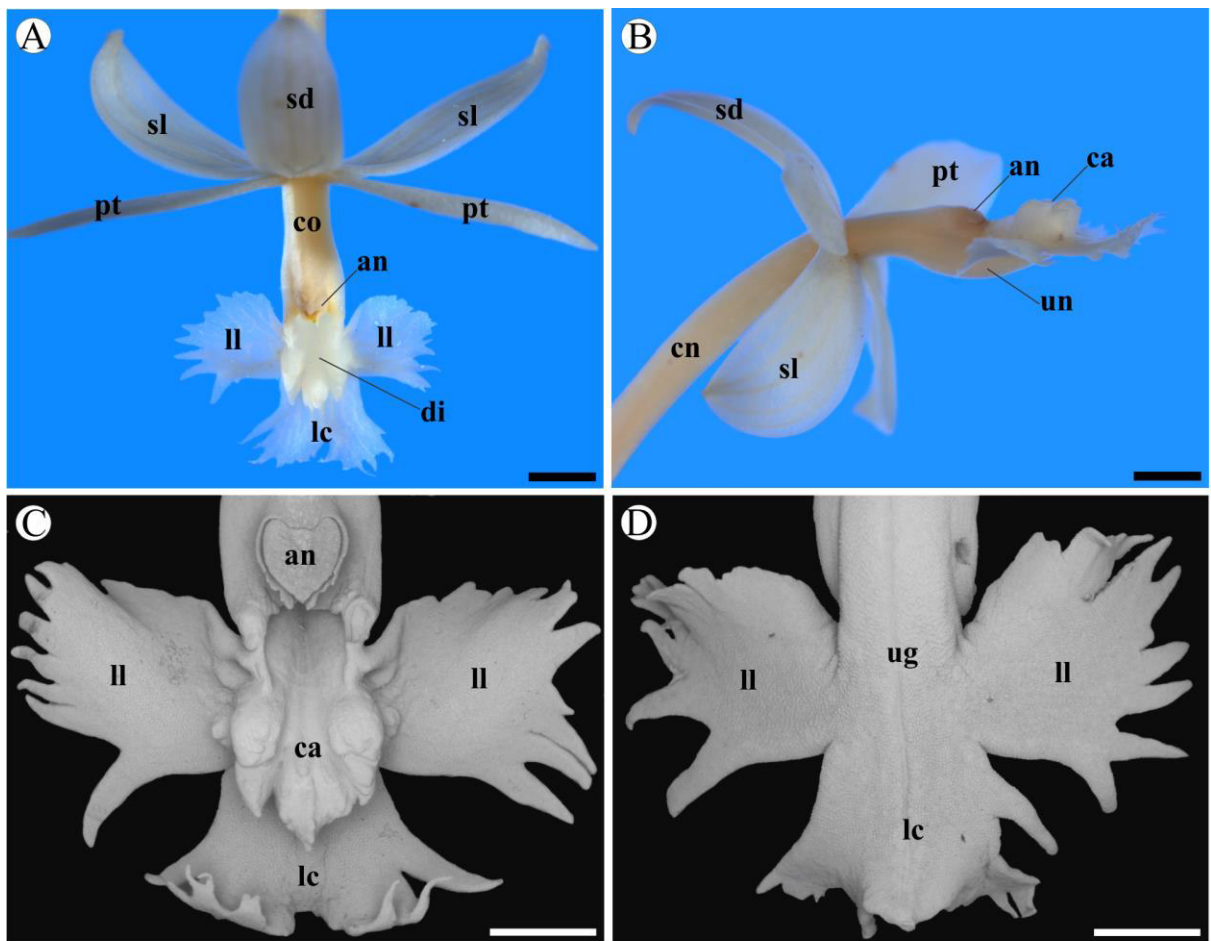


Figura 2. Morfologia floral de *Epidendrum xanthinum* Lindl. Ex3-NF (A-D). A, B) Visões gerais das flores e suas peças, em vistas frontal (A) e lateral (B). C, D) Visões gerais dos labelos, nas faces adaxial (C) e abaxial (D), em microscopia eletrônica de varredura (MEV). an: antera; ca: calo do disco do labelo; cn: cunículo; co: coluna; di: disco do labelo; lc: lobo central; ll: lobo lateral; pt: pétala; sd: sépala dorsal; sl: sépala lateral; ug: unguículo. Barras de escalas: A, B= 2mm; C, D= 1mm.

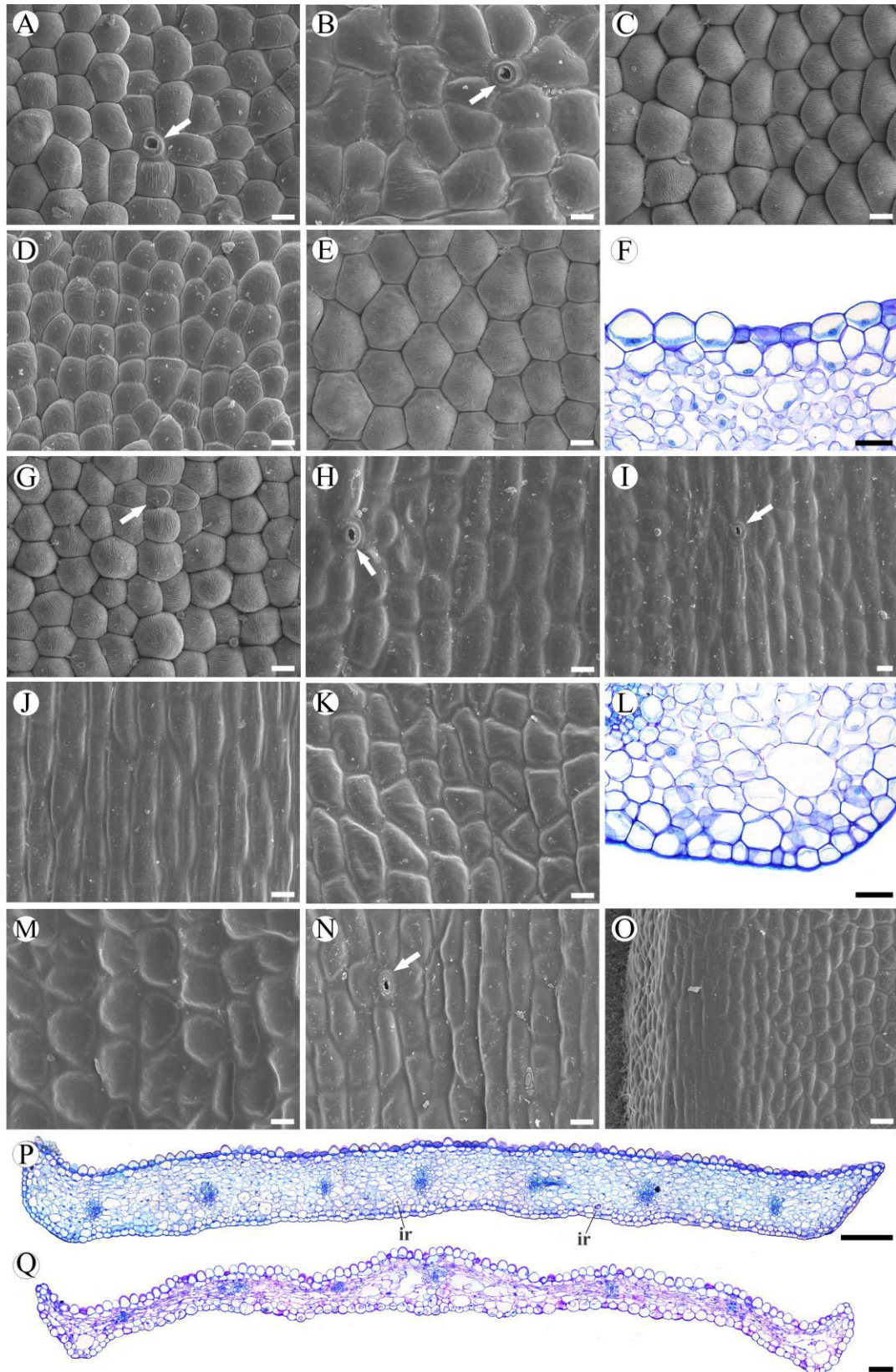


Figura 3. Micromorfologia e anatomia da sépala dorsal de *Epidendrum xanthinum* Lindl. Ex2-NF (A, G, I), Ex1-SB (B, D, F, L), Ex5-NF (E, K, O), Ex4-NF (N) e Ex3-NF (P); e de *E. secundum* Jacq. Es1-SB (C), Es2-SB (H, J), Es5-NF (M) e Es3-NF (Q). A-E, G) Face adaxial da epiderme, nas regiões apical (A, B), mediana (C, G) e basal (D, E), em microscopia eletrônica de varredura (MEV). F) Detalhe da epiderme, face adaxial, em secção transversal (ST). H-K, M-O) Face abaxial da epiderme, nas regiões mediana (H-I, O), basal (J-K, N) e apical (M), em MEV. L) Detalhe da epiderme, face abaxial, em ST. P, Q) Aspectos gerais em ST. ir: idioblasto com ráfides; seta: estômato. Barras de escalas: A-E, G-K, M-O= 20µm; F, L= 50µm, P= 200µm; Q= 100µm.

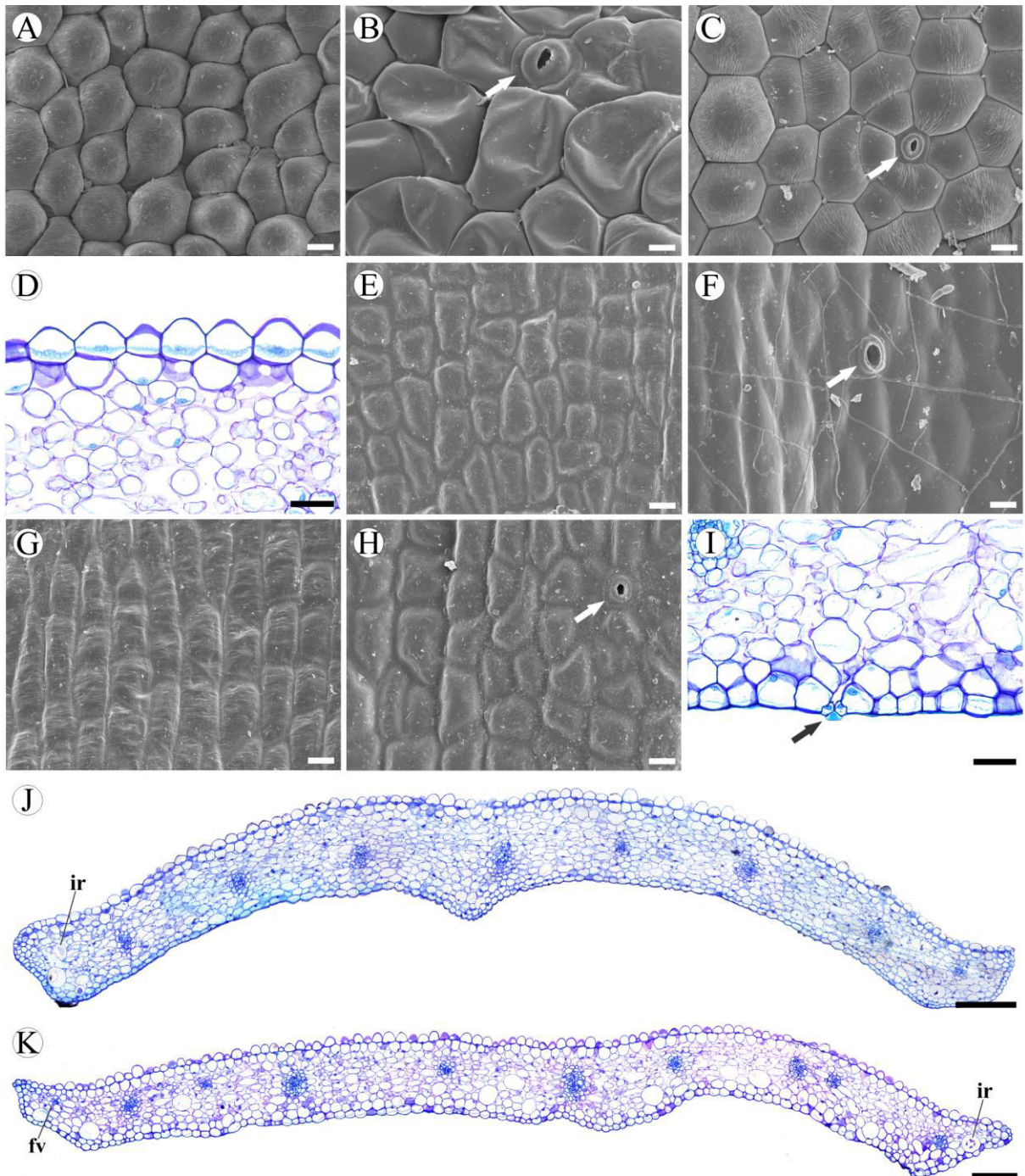


Figura 4. Micromorfologia e anatomia da sépala lateral de *Epidendrum secundum* Jacq. Es5-NF (A) e Es1-SB (K); e de *E. xanthinum* Lindl. Ex4-NF (B), Ex1-SB (C, D, F, I), Ex3-NF (E, G, J) e Ex2-NF (H). A-C) Face adaxial da epiderme, nas regiões mediana (A, C) e apical (B), em microscopia eletrônica de varredura (MEV). D) Detalhe da face adaxial da epiderme, em secção transversal (ST). E-H) Face abaxial da epiderme, nas regiões mediana (E), apical (F) e basal (G-H), em MEV. I) Detalhe da face abaxial da epiderme, em ST. J-K) Aspectos gerais em ST. fv: feixe vascular; ir: idioblasto com ráfides; seta: estômato. Barras de escalas: A, C, E-H=20µm; B=10µm; D, I=50µm; J, K=200µm.

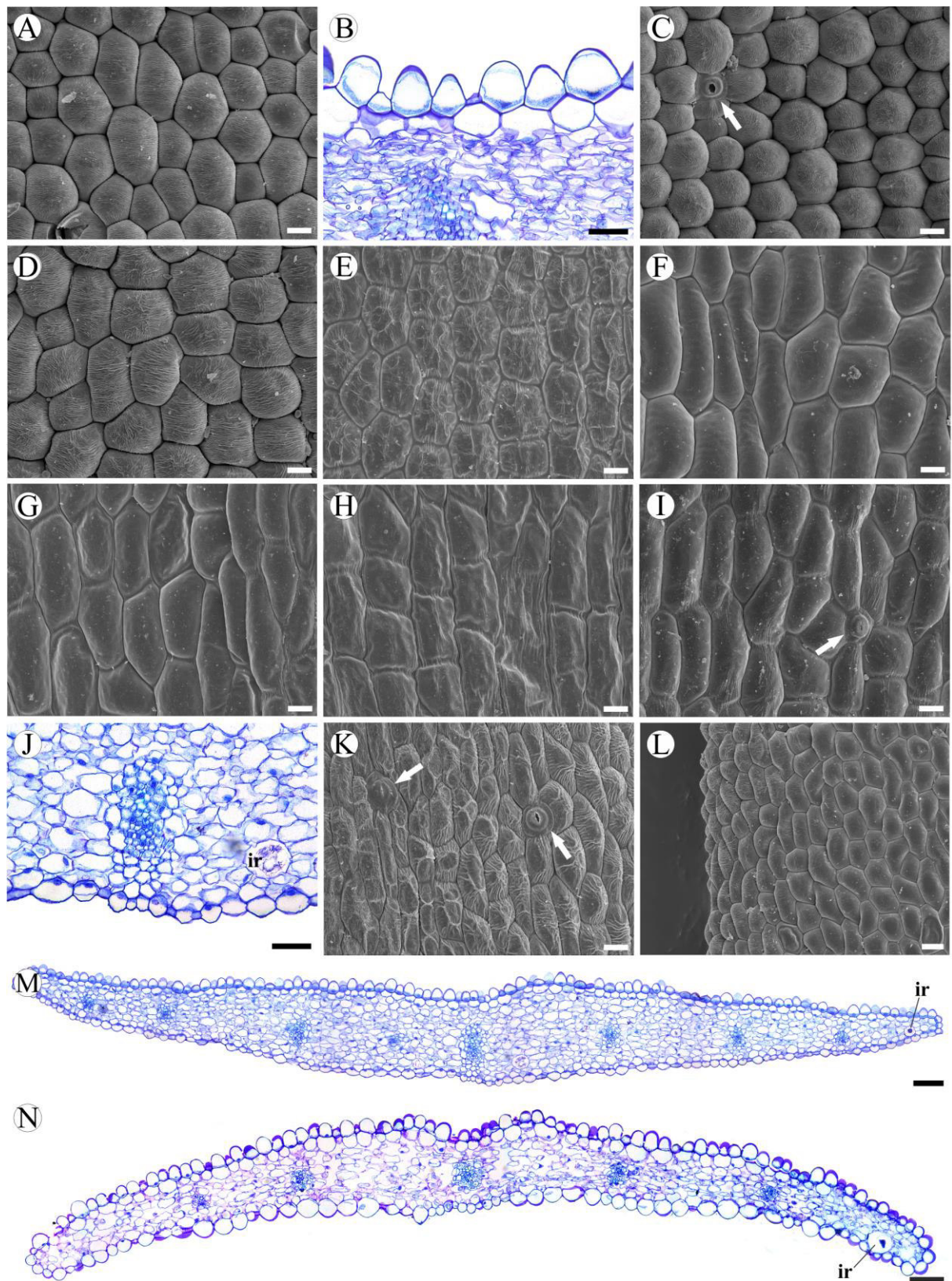


Figura 5. Micromorfologia e anatomia da pétala de *Epidendrum secundum* Jacq. Es4-NF (A,G), Es1-SB (D), Es2-SB (F, L) e Es3-NF (N); e de *E. xanthinum* Lindl. Ex1-SB (B, H), Ex5-NF (C, I) e Ex3-NF (E, J-K, M). A, C, D) Face adaxial da epiderme, nas regiões mediana (A) e apical (C, D), em microscopia eletrônica de varredura (MEV). B) Detalhe da face adaxial da epiderme, em secção transversal (ST). E-I, K, L) Face abaxial da epiderme, nas regiões mediana (E, F, L), basal (G-I) e apical (K), em MEV. J) Detalhe da face abaxial da epiderme, em ST. M, N) Aspectos gerais em ST. ir: idioblasto com ráfides; seta: estômato. Barras de escalas: A, C-I, K= 20µm; B, J= 50µm; L= 40µm; M, N= 100µm.

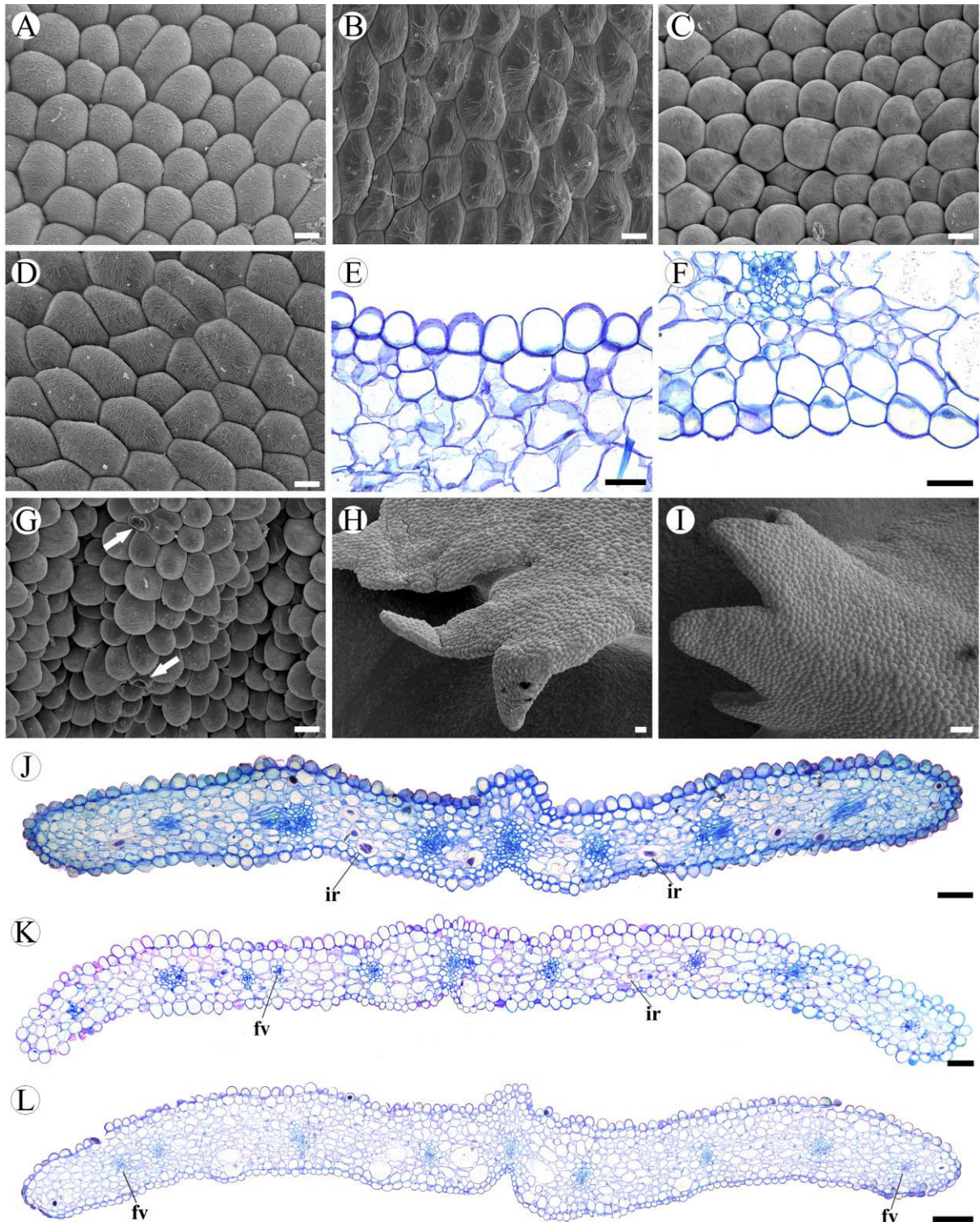


Figura 6. Micromorfologia e anatomia do labelo de *Epidendrum secundum* Jacq. Es1-SB (A, D) e Es3-NF (K); e de *E. xanthinum* Lindl. Ex2-NF (B, C, I), Ex1-SB (E, F, L), Ex4-NF (G, H) e Ex3-NF (J). A, B, G) Face adaxial da epiderme da região mediana do lobo central, em microscopia eletrônica de varredura (MEV). C, D) Face adaxial da epiderme da região mediana do lobo lateral, em MEV. E) Detalhe da face adaxial da epiderme do lobo lateral, em secção transversal (ST). F) Detalhe da face abaxial da epiderme do lobo central, em ST. H, I) Aspectos gerais da face adaxial das margens dos lobos central (H) e lateral (I), em MEV. J-L) Aspectos gerais do lobo central do labelo, em ST. fv: feixe vascular; ir: idioblasto com ráfides; seta: estômato. Barras de escalas: A-D, G= 20µm; E, F= 50µm; H-K= 100µm; L= 200µm.

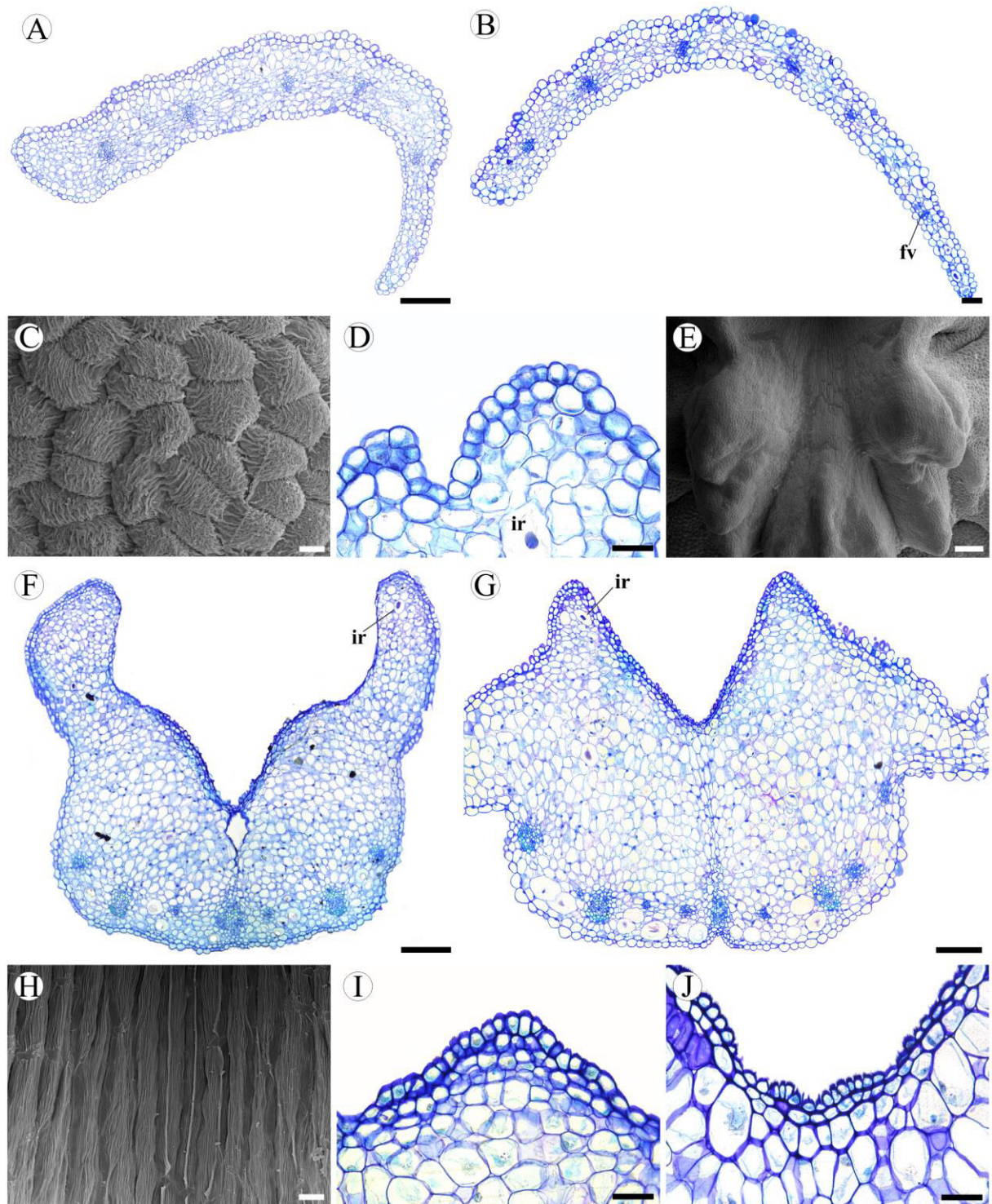


Figura 7. Micromorfologia e anatomia do labelo de *Epidendrum xanthinum* Lindl. Ex1-SB (A, D, J), Ex5-NF (C), Ex2-NF (E) e Ex3-NF (F); e de *E. secundum* Jacq. Es1-SB (B, G, I) e Es2-SB (H). A, B) Visões gerais do lobo lateral do labelo, em secção transversal (ST). C) Face adaxial da epiderme do disco do calo do labelo, em microscopia eletrônica de varredura (MEV). D) Detalhe da face adaxial da epiderme do disco do calo do labelo, em ST. E-G) Visões gerais da região basal do sulco no calo do labelo, em MEV (E) e em ST (F, G). H) Face adaxial da epiderme do sulco do calo do labelo, em MEV. I, J) Detalhes da epiderme do calo e do sulco do calo do labelo, respectivamente, em ST. fv: feixe vascular; ir: idioblasto com ráfides. Barras de escalas: A, E-G= 200µm; B= 100µm; C= 10µm; D, I, J= 50µm.

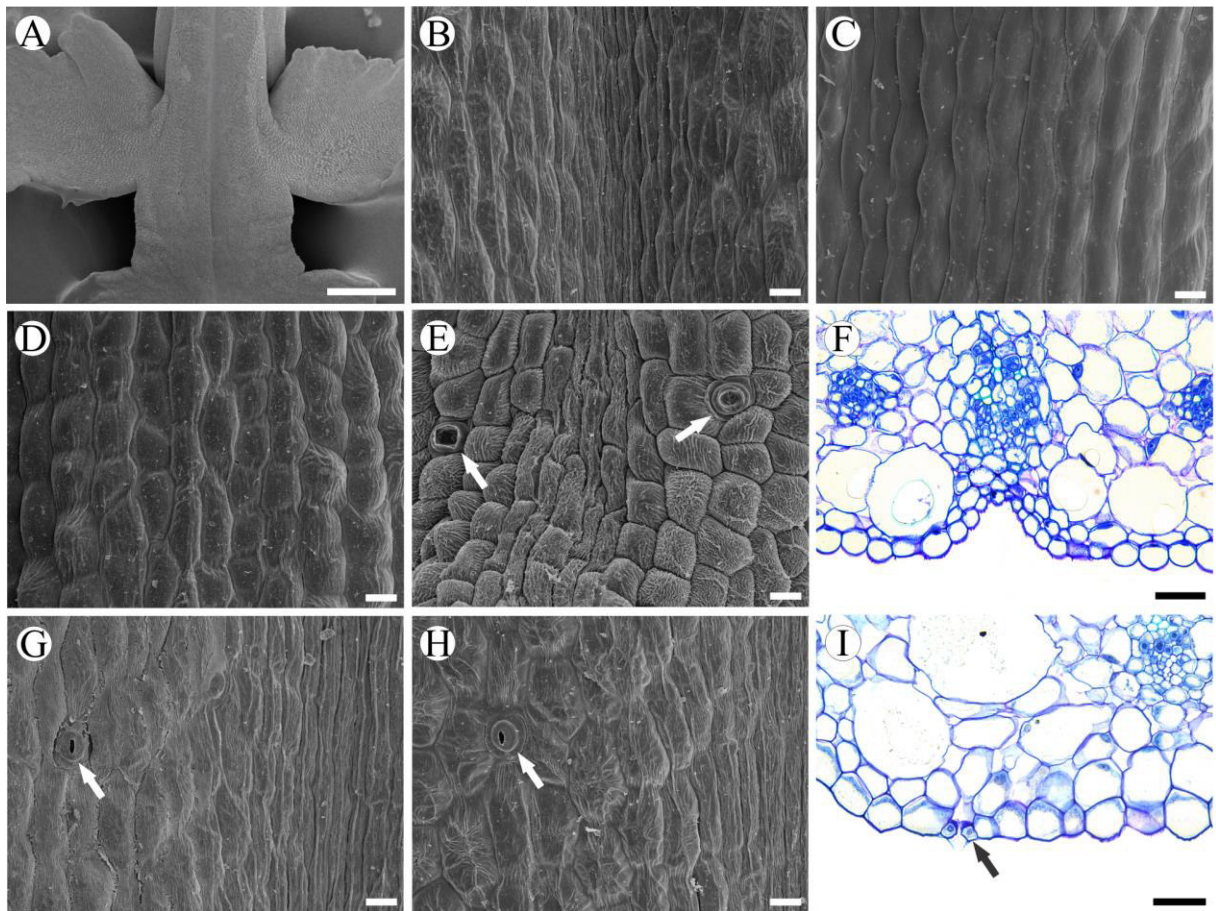


Figura 8. Micromorfologia e anatomia do labelo de *Epidendrum xanthinum* Lindl. Ex4-NF (A, B, H), Ex2-NF (C), Ex5-NF (D, G) e Ex1-SB (I); e de *E. secundum* Jacq. Es2-SB (E) e Es1-SB (F). A) Visão geral da face abaxial do labelo e unguículo, em microscopia eletrônica de varredura (MEV). B-E, G-H) Epiderme do unguículo, nas regiões mediana (B, H), basal (C, D) e apical (E-G), em MEV. F, I) Detalhes da epiderme do unguículo, nas regiões mediana (F) e apical (I), em secções transversais (ST). seta: estômato. Barras de escalas: A= 1mm; B-E, G-H= 20μm; F, I= 50μm.

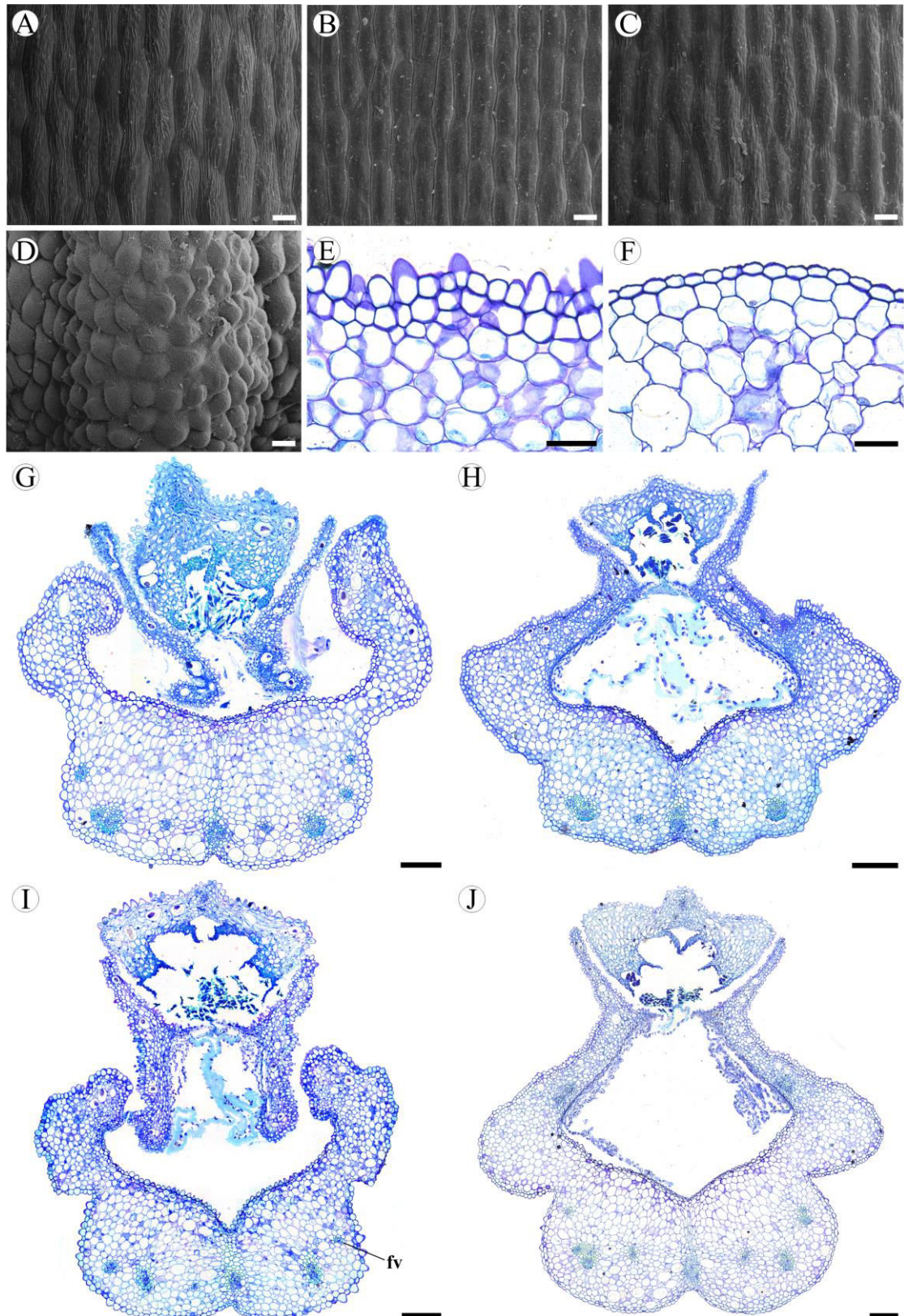


Figura 9. Micromorfologia e anatomia do ginostêmio de *Epidendrum xanthinum* Lindl. Ex2-NF (A), Ex3-NF (B, H), Ex5-NF (C) e Ex1-SB (D-F, J); e de *E. secundum* Jacq. Es1-SB (G) e Es3-NF (I). A-D) Face adaxial da epiderme da coluna, nas regiões mediana (A), basal (B, C) e apical (D), em microscopia eletrônica de varredura (MEV). E-F) Detalhes da face adaxial da epiderme da coluna, nas regiões apical/mediana (E) e basal (F), em secções transversais (ST). G-J) Aspectos gerais da cavidade estigmática, em ST. fv: feixe vascular. Barras de escalas: A-D= 20μm; E, F= 50μm; G-J= 200μm.

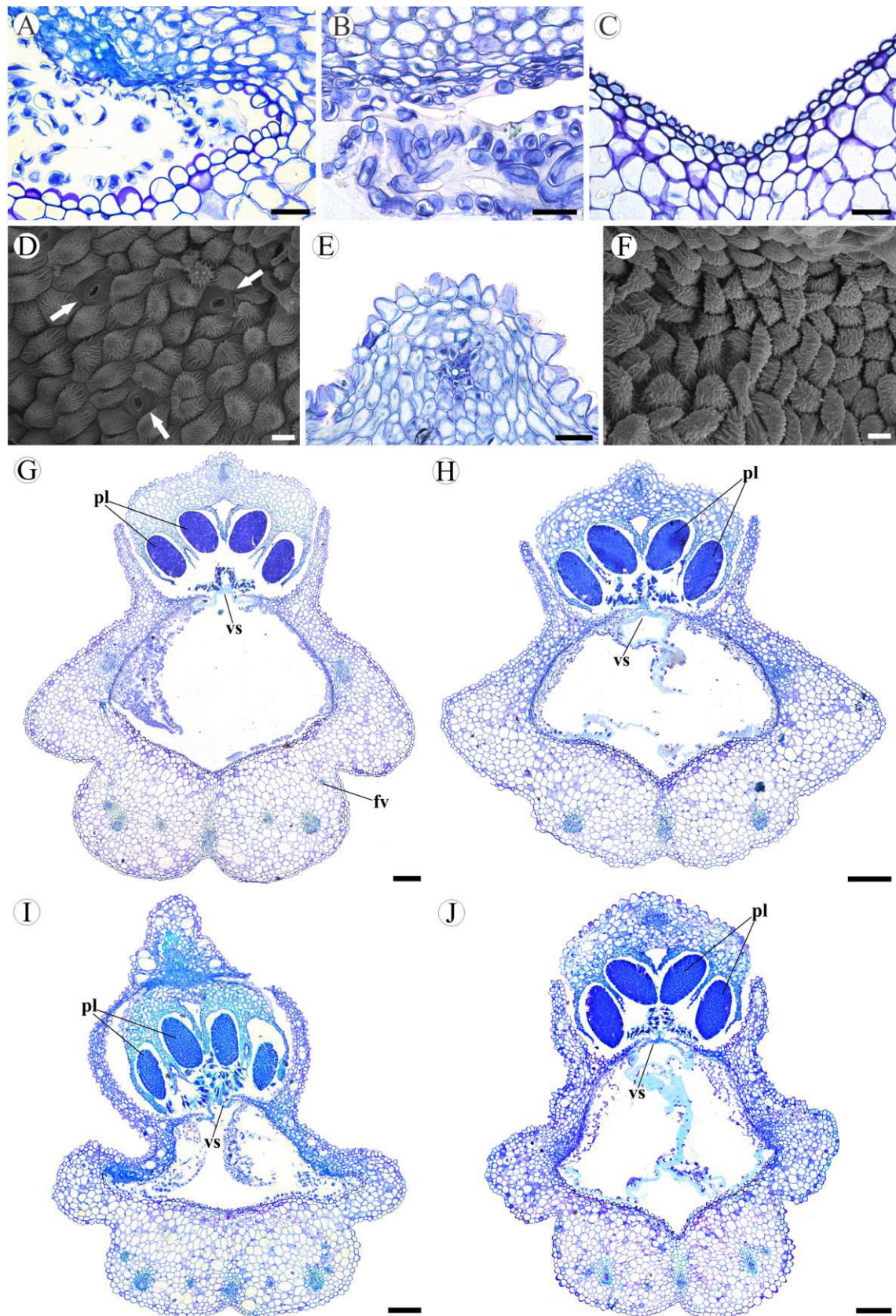


Figura 10. Micromorfologia e anatomia do ginostêmio de *Epidendrum secundum* Jacq. Es1-SB (A, D, I), Es4-NF (F) e Es3-NF (J); e de *E. xanthinum* Lindl. Ex1-SB (B, C, E, G) e Ex3-NF (H). A-C) Detalhes da epiderme da cavidade estigmática, na transição entre as porções superior e inferior (A), na porção superior (B) e inferior (C), em secções transversais (ST). D-F) Detalhes da epiderme da antera, em microscopia eletrônica de varredura (MEV) (D, F) e em ST (E). G-J) Aspectos gerais da região apical do ginostêmio, em ST. fv: feixe vascular; pl: polínias; seta: estômato; vs: viscidio. Barras de escalas: A-C, E= 50µm; D= 20µm; F= 10µm; G-J= 200µm.

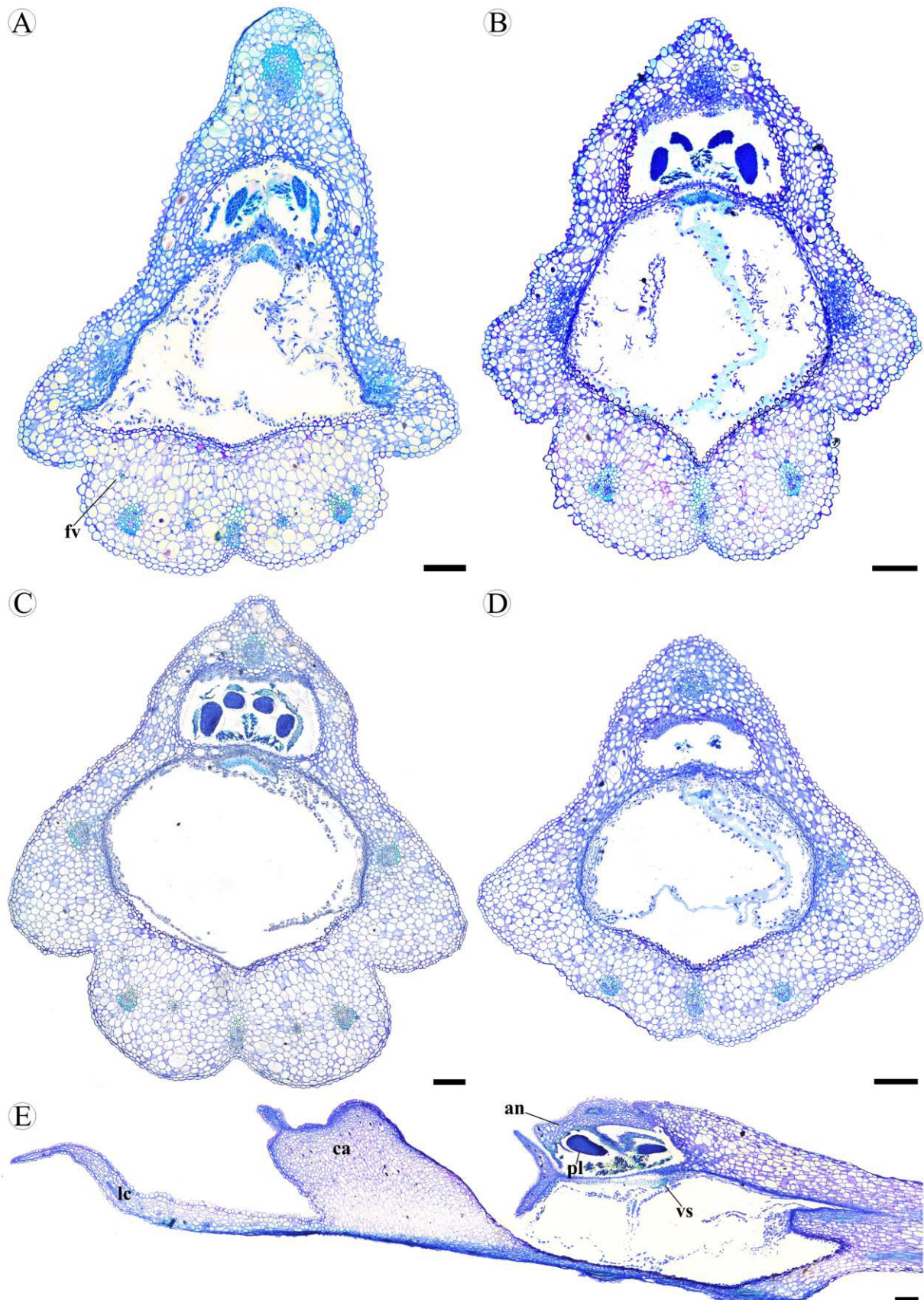


Figura 11. Anatomia do ginostêmio de *Epidendrum secundum* Jacq. Es1-SB (A) e Es3-NF (B); e de *E. xanthinum* Lindl. Ex1-SB (C) e Ex3-NF (D, E). A-D) Aspectos gerais da região mediana do ginostêmio, em seções transversais (ST). E) Aspecto geral, em secção longitudinal (SL), da região mediana do ginostêmio. an: antera; ca: calo do labelo; fv: feixe vascular; lc: lobo central do labelo; pl: polínias; vs: viscido. Barras de escalas: A-E=200μm.

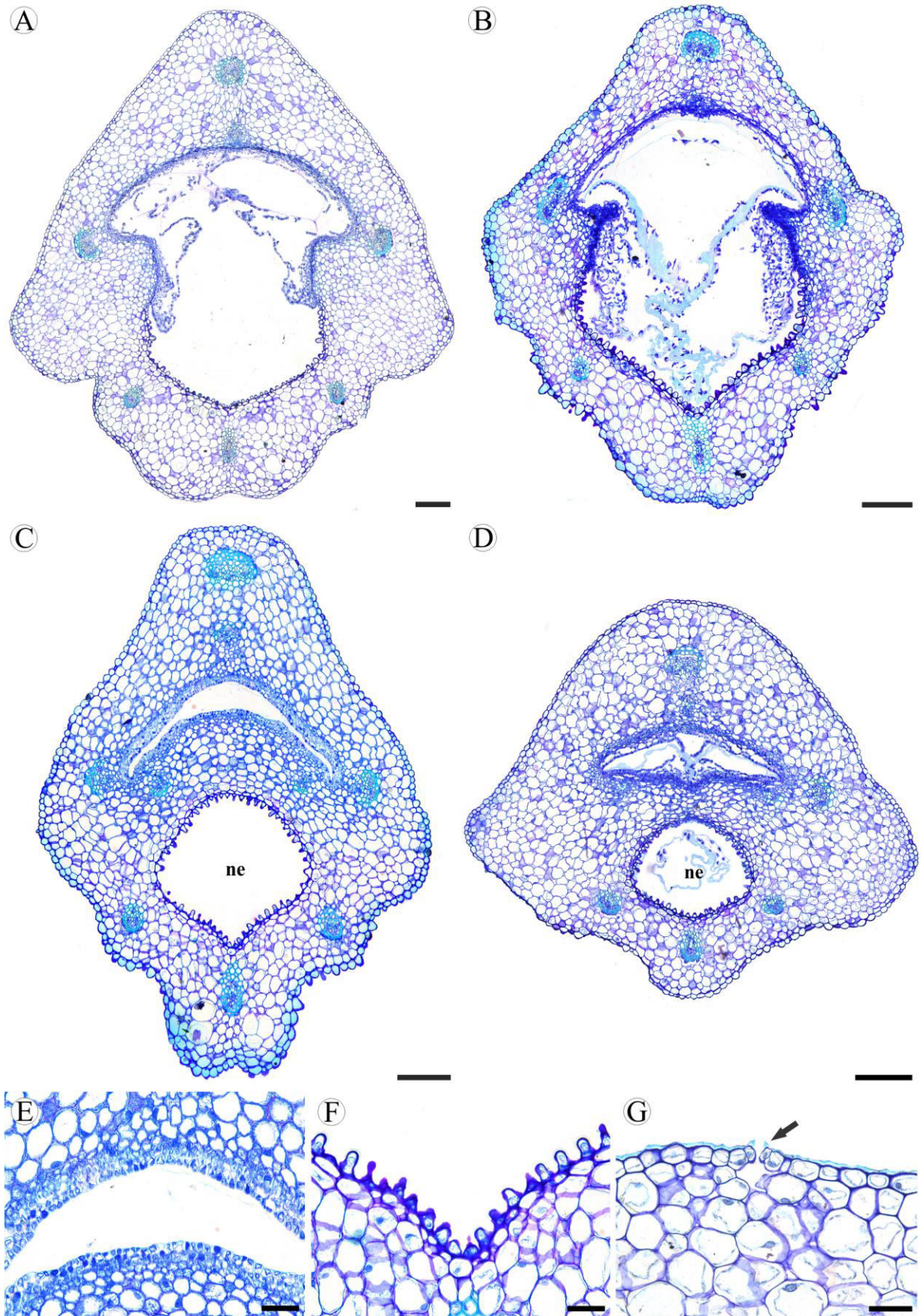


Figura 12. Anatomia do ginostêmio de *Epidendrum xanthinum* Lindl. Ex1-SB (A, G) e Ex3-NF (D); e de *E. secundum* Jacq. Es3-NF (B) e Es1-SB (C, E, F). A-D) Aspectos gerais da região basal do ginostêmio, em secções transversais (ST). E) Detalhe da epiderme da cavidade superior do ginostêmio, em ST. F) Detalhe da epiderme do nectário, em ST. G) Detalhe da epiderme externa do ginostêmio, em ST. ne: nectário; seta: estômato. Barras de escalas: A-D= 200 μ m; E-G= 50 μ m.

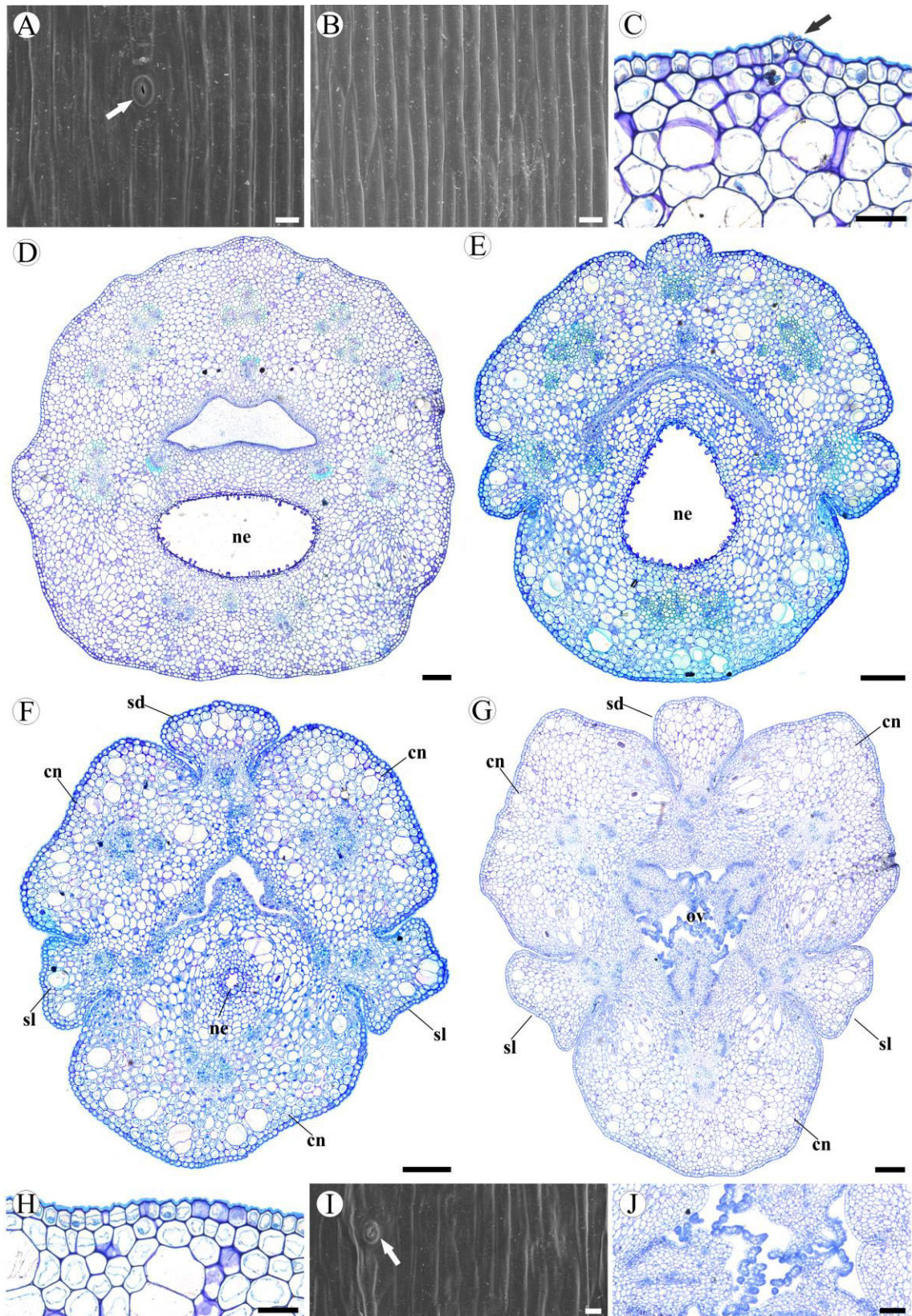


Figura 13. Micromorfologia e anatomia do ginostêmio *Epidendrum xanthinum* Lindl. Ex2-NF (A), Ex5-NF (B), Ex3-NF (C, H) e Ex1-SB (D, G, J); e de *E. secundum* Jacq. Es1-SB (E, F) e Es4-NF (I). A, B) Epiderme da região mediana do cuniculo, faces adaxial e abaxial, respectivamente, em microscopia eletrônica de varredura (MEV). C) Detalhe da face adaxial da epiderme do cuniculo, em secção transversal (ST). D, E) Visões gerais do cuniculo, regiões apical (D) e mediana (E), em ST. F, G) Visões gerais do ovário, em ST. H, I) Detalhes da epiderme externa do ovário, em ST e MEV, respectivamente. J) Detalhe da epiderme interna do ovário, em ST. cn: cuniculo; ne: nectário; ov: ovário; sd: sépal dorsal; seta: estômato; sl: sépal lateral. Barras de escalas: A, B, I= 20µm; C, H= 50µm; D-G= 200µm; J= 100µm.

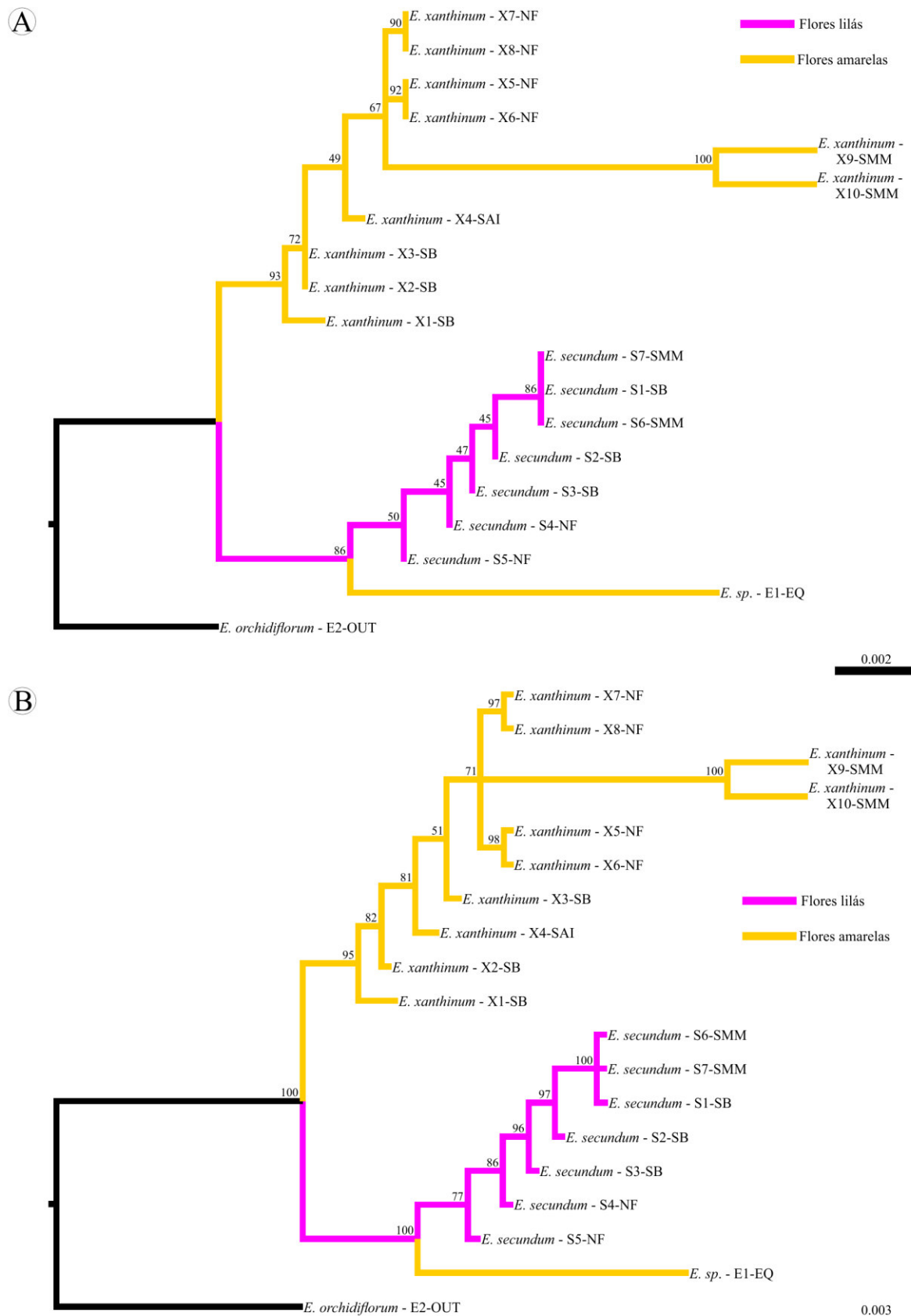


Figura 14. Filogramas de máxima verossimilhança (A) e inferências bayesianas (B), baseadas em dados combinados dos marcadores nuclear e plastidiais (*ITS*, *clp-psb* e *ndhJ-tabE*), de indivíduos de *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. xanthinum* Lindl., incluindo *Epidendrum* sp. e *E. orchidiflorum* Salzm. Ex Lindl. como grupo externo. Os filogramas gerados foram baseados nas árvores de melhor topologia encontradas; os valores de bootstrap (A) e de probabilidade em porcentagem (B) são indicados nos nós e ramos. EQ – Equador; NF – Nova Friburgo; OUT – grupo externo; SAI – Santo Antônio do Itambé; SB – Santa Bárbara; SMM – Santa Maria Madalena.

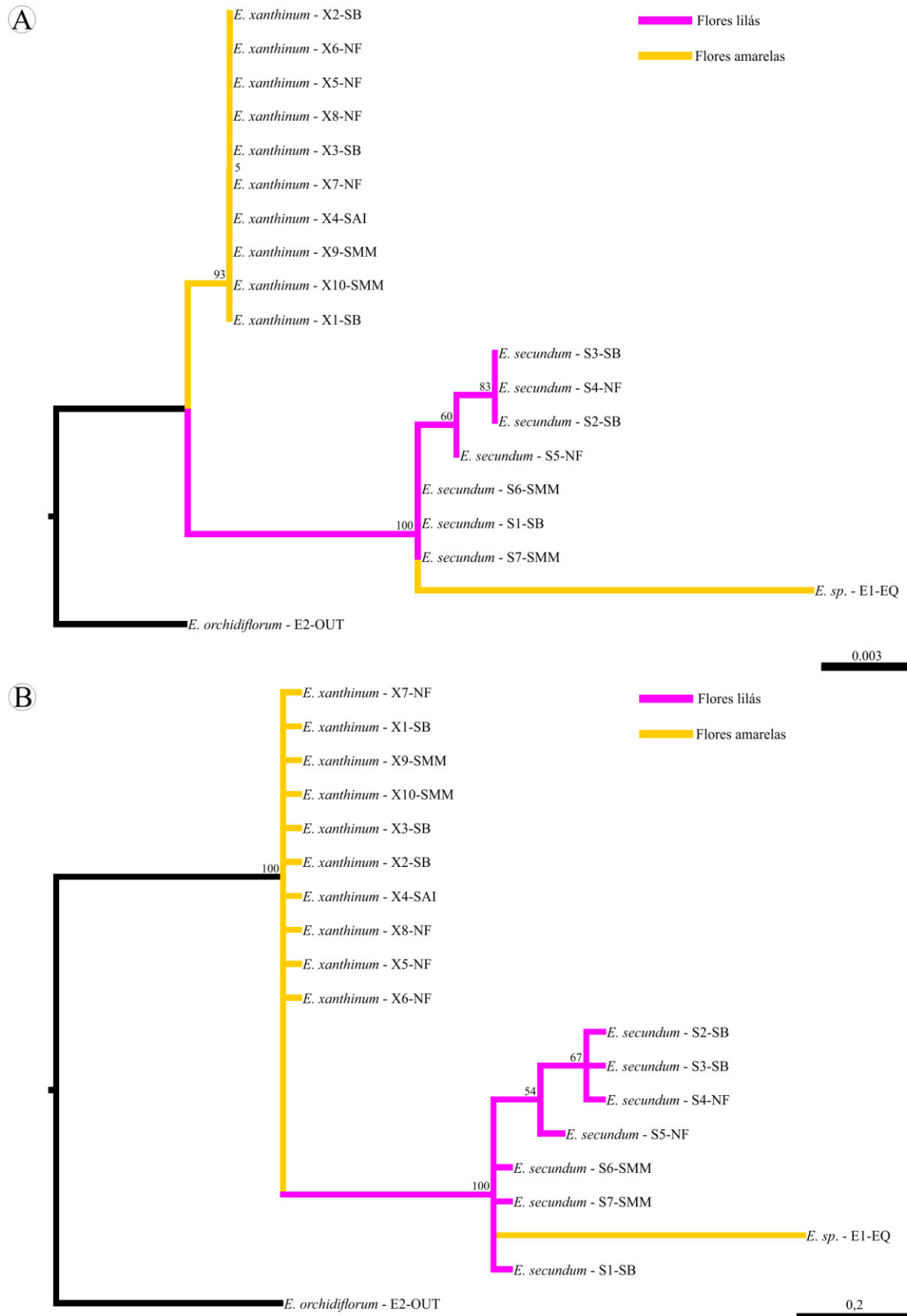


Figura 15. Filogramas de máxima verossimilhança (A) e inferências bayesianas (B), baseadas em dados do marcador molecular nuclear *ITS*, de indivíduos de *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. xanthinum* Lindl., incluindo *Epidendrum* sp. e *E. orchidiflorum* Salzm. Ex Lindl. como grupo externo. Os filogramas gerados foram baseados nas árvores de melhor topologia encontradas; os valores de bootstrap (A) e de probabilidade em porcentagem (B) são indicados nos nós e ramos. EQ – Equador; NF – Nova Friburgo; OUT – grupo externo; SAI – Santo Antônio do Itambé; SB – Santa Bárbara; SMM – Santa Maria Madalena.

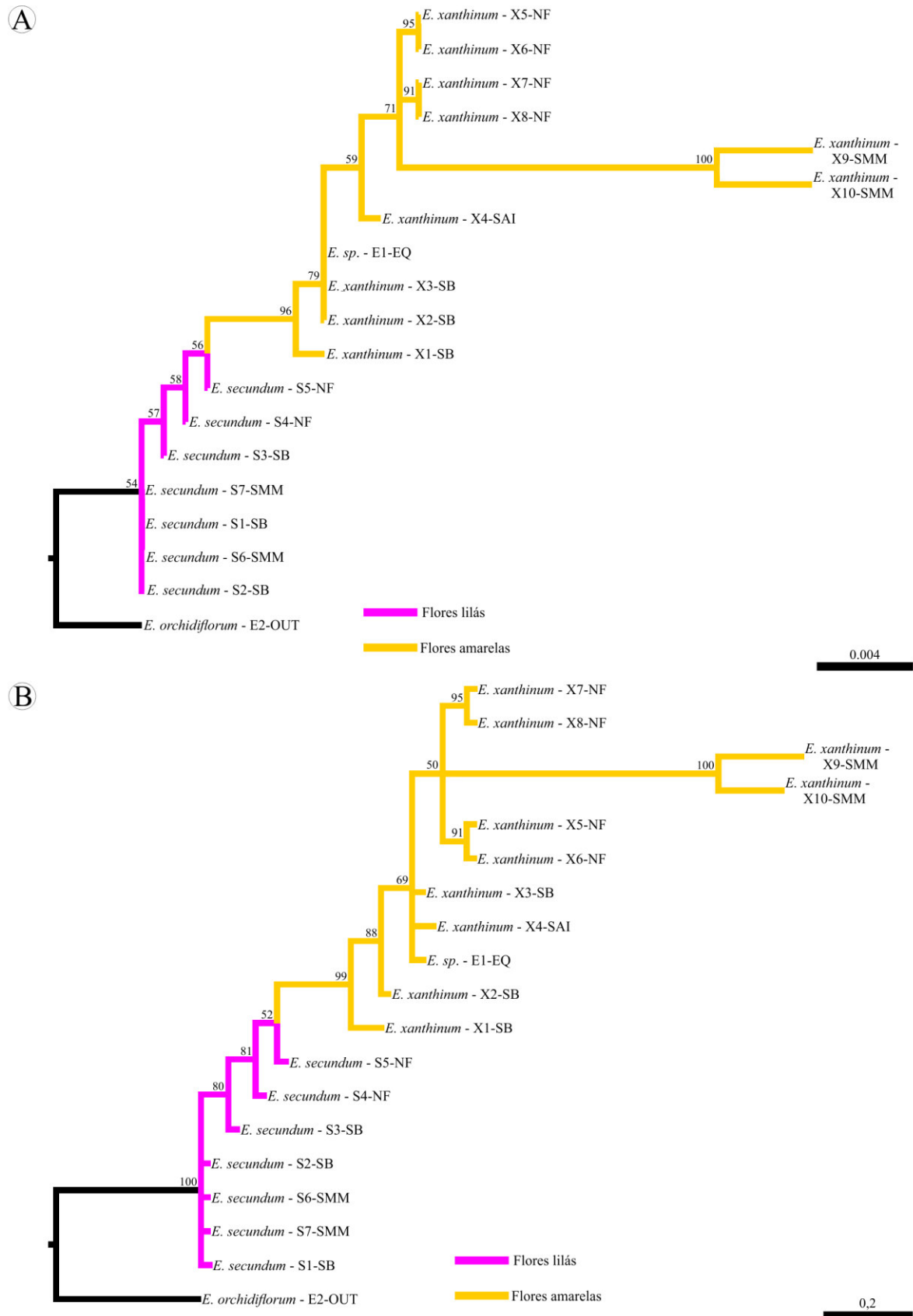


Figura 16. Filogramas de máxima verossimilhança (A) e inferências bayesianas (B), baseadas em dados combinados dos marcadores moleculares plastidiais *clp-psb* e *ndhJ-tabE*, de indivíduos de *Epidendrum secundum* Jacq. e *E. xanthinum* Lindl., incluindo *Epidendrum* sp. e *E. orchidiflorum* Salzm. Ex Lindl. como grupo externo. Os filogramas gerados foram baseados nas árvores de melhor topologia encontradas; os valores de bootstrap (A) e de probabilidade em porcentagem (B) são indicados nos nós e ramos. EQ – Equador; NF – Nova Friburgo; OUT – grupo externo; SAI – Santo Antônio do Itambé; SB – Santa Bárbara; SMM – Santa Maria Madalena.

Tabela 3: Caracteres micromorfológicos e anatômicos da sépala dorsal de amostras de *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum*, de populações de Santa Bárbara (MG) e Nova Friburgo (RJ).

		<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>	
Número da amostra		Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1,Es2	Es3, Es4, Es5
Localidades		Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)
Sépala Dorsal	Epiderme adaxial	<u>Ornamentação na parede periclinal</u>	<u>lisa</u>	<u>estriada</u> ^{Es2} <u>inconspícua</u> ⁴	<u>lisa</u> ^{Es5} <u>inconspícua</u> ^{Es4}
		Ornamentação na parede anticlinal	ausente	presente	presente ausente ^{Es5}
		Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo
		Presença de estômatos	presente	presente	presente
		Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	estriada inconspícua ^{Es5}
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente
		Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo
		Presença de estômatos	presente	ausente	ausente
	Base	<u>Ornamentação na parede periclinal</u>	<u>inconspícua</u>	<u>estriada</u>	<u>estriada</u>
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente
		Formato em vista frontal	irregular	hexagonal irregular ^{Ex4}	irregular
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo
		Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente

		<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>		
Número da amostra		Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1,Es2	Es3, Es4, Es5	
Localidades		Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	
Sépala Dorsal	Ápice	Ornamentação na parede periclinal	inconspícua	inconspícua	inconspícua	inconspícua
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
		Formato em vista frontal	irregular	irregular longit. alongado ^{Ex2, Ex3}	irregular	irregular
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
		Presença de estômatos	presente	presente	presente	presente
	Meio	Ornamentação na parede periclinal	inconspícua	inconspícua	inconspícua	inconspícua
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
		Formato em vista frontal	irregular	irregular longit. alongado ^{Ex2, Ex3}	irregular	irregular
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
		Presença de estômatos	presente	presente ausente ^{Ex5}	presente	presente ausente ^{Es5}
	Base	Ornamentação na parede periclinal	inconspícua	inconspícua	inconspícua	inconspícua
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
		Formato em vista frontal	longit. alongado	longit. alongado irregular ^{Ex5}	longit. alongado	longit. alongado
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
		Presença de estômatos	presente	ausente presente ^{Ex4}	ausente	ausente
Margem da peça		lisa epiderme+mesofilo	lisa epiderme+mesofilo	lisa epiderme+mesofilo	lisa epiderme+mesofilo	
Mesofilo	Número de feixes vasculares	7	7	7	6	

Obs.: Em negrito, destaque para caracteres que podem ser utilizados na distinção entre as espécies; sublinhado, destaque para aqueles que podem distinguir indivíduos da mesma espécie, pertencentes a populações disjuntas; sobrescrito, identificação dos indivíduos para os quais os caracteres foram variáveis.

Tabela 4: Caracteres micromorfológicos e anatômicos da sépala lateral de amostras de *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum*, de populações de Santa Bárbara (MG) e Nova Friburgo (RJ).

		<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>			
Número da amostra		Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1,Es2	Es3, Es4, Es5		
Localidades		Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)		
Sépala Lateral	Epiderme adaxial	Ápice	Ornamentação na parede periclinal	estriada	inconspícua lisa ^{Ex4} estriada ^{Ex5}	estriada ⁴ inconspícua ^{Es2}	inconspícua
			Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente ausente ^{Ex4}	ausente	ausente presente ^{Es4}
			Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular	irregular
			Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
			Presença de estômatos	presente	presente	presente	presente
		Meio	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	estriada	estriada inconspícua ^{Es4}
			Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
			<u>Formato em vista frontal</u>	<u>hexagonal</u>	<u>irregular</u>	irregular	irregular
			Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
			<u>Presença de estômatos</u>	<u>presente</u>	<u>ausente</u>	ausente	ausente
	Base	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada inconspícua ^{Ex4}	estriada	estriada inconspícua ^{Es4}	
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente	
		Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular	irregular	
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convex	
		Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente	ausente	

		<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>		
Número da amostra		Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1,Es2	Es3, Es4, Es5	
Localidades		Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	
Sépala Lateral	Ápice	<u>Ornamentação na parede periclinal</u>	<u>lisa</u>	<u>inconspícua</u>	inconspícua lisa ^{Es1}	inconspícua
		Ornamentação na parede anticlinal	ausente	presente ausente ^{Ex2}	presente ausente ^{Es1}	presente
		Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular	irregular
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
		Presença de estômatos	presente	presente ausente ^{Ex2}	presente	presente
	Meio	Ornamentação na parede periclinal	inconspícua	inconspícua	inconspícua	inconspícua
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
		Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular	irregular
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
		Presença de estômatos	presente	ausente presente ^{Ex4}	presente	presente ausente ^{Es5}
	Base	Ornamentação na parede periclinal	inconspícua	inconspícua	inconspícua	inconspícua
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
		Formato em vista frontal	longit. alongado	longit. alongado irregular ^{Ex2, Ex4}	longit. alongado	longit. alongado
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
		Presença de estômatos	presente	ausente presente ^{Ex4}	<u>presente</u>	<u>ausente</u>
	Margem da peça		lisa epiderme+mesofilo	lisa epiderme+mesofilo	lisa epiderme+mesofilo	lisa epiderme+mesofilo
	Mesofilo	<u>Número de feixes vasculares</u>	<u>10</u>	<u>8</u>	<u>10</u>	<u>8</u>

Obs.: Em sublinhado, destaque para caracteres que podem ser utilizados para distinguir indivíduos da mesma espécie, pertencentes a populações disjuntas; sobrescrito, identificação dos indivíduos para os quais os caracteres foram variáveis.

Tabela 5: Caracteres micromorfológicos e anatômicos da pétala de amostras de *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum*, de populações de Santa Bárbara (MG) e Nova Friburgo (RJ).

		<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>		
Número da amostra		Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1,Es2	Es3, Es4, Es5	
Localidades		Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	
Pétala	Ápice	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	Estriada	estriada
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	Presente	presente
		Formato em vista frontal	irregular	irregular	Irregular	irregular
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	Convexo	convexo
		Presença de estômatos	presente	presente	presente ausente ^{Es1}	presente
	Meio	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	Estriada	estriada
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	Presente	presente
		Formato em vista frontal	irregular	irregular	Irregular	irregular
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	Convexo	convexo
		Presença de estômatos	ausente	ausente	Ausente	ausente
	Base	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	Estriada	estriada
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	Presente	presente
		Formato em vista frontal	irregular	irregular	Irregular	irregular
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	Convexo	convexo
		Presença de estômatos	ausente	ausente	Ausente	ausente

		<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>		
Número da amostra		Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1,Es2	Es3, Es4, Es5	
Localidades		Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	
Pétala	Ápice	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	Estriada	estriada
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	Presente	presente
		Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular hexagonal ^{Es1}	irregular
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	Convexo	convexo
		Presença de estômatos	presente	presente	presente ausente ^{Es2}	presente
	Meio	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada inconspícua ^{Ex4}	estriada lisa ^{Es2}	estriada inconspícua ^{Es4}
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente ausente ^{Es2}	presente
		Formato em vista frontal	irregular	irregular	Irregular	irregular
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
		Presença de estômatos	ausente	ausente	Ausente	ausente
	Base	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada inconspícua ^{Ex4, Ex5}	estriada inconspícua ^{Es1}	estriada inconspícua ^{Es4}
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	Presente	presente
		<u>Formato em vista frontal</u>	long. alongado	irregular longit. alongado ^{Ex5}	<u>longit. Alongado</u>	<u>irregular</u>
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	Convexo	convexo
		Presença de estômatos	ausente	ausente	Ausente	ausente
Margem da peça		lisa epiderme+mesofilo	lisa epiderme+mesofilo	lisa epiderme+mesofilo	lisa epiderme+mesofilo	
Mesofilo	<u>Número de feixes vasculares</u>	7	7	<u>7</u>	<u>5</u>	

Obs.: Em sublinhado, destaque para caracteres que podem ser utilizados para distinguir indivíduos da mesma espécie, pertencentes a populações disjuntas; sobrescrito, identificação dos indivíduos para os quais os caracteres foram variáveis.

Tabela 6: Caracteres micromorfológicos e anatômicos do labelo e ginostêmio de amostras de *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum*, de populações de Santa Bárbara (MG) e Nova Friburgo (RJ).

		<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>	
Número da amostra		Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1,Es2	Es3, Es4, Es5
Localidades		Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)
Labelo	Epiderme adaxial	Lobo central	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada
			Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente
			Formato em vista frontal	irregular	irregular
			Formato em secção transversal	papiloso	papiloso
			Presença de estômatos	ausente	ausente
			Margem do lobo central	ausente presente ^{Ex4}	ausente
				lisa	lisa
			epiderme+mesofilo	epiderme+mesofilo	epiderme+mesofilo
			<u>Número de feixes vasculares</u>	<u>9</u>	<u>10</u>
	Lobo lateral		Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada
			Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente
			Formato em vista frontal	irregular	irregular
			Formato em secção transversal	convexo-papiloso	convexo-papiloso
			Presença de estômatos	ausente	ausente
			Margem do lobo lateral	ausente	ausente
				lisa	lisa
			epiderme+mesofilo	epiderme+mesofilo	epiderme+mesofilo
			Número de feixes vasculares	5	6

			<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>		
Número da amostra			Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1,Es2	Es3, Es4, Es5	
Localidades			Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	
Labelo	Epiderme adaxial	Disco do calo	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	estriada	estriada
			Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
			Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular	irregular
			Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
			Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente	ausente
		Sulco do calo	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	estriada	estriada
			Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
			Formato em vista frontal	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado
			Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
			Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente	ausente

Número da amostra		<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>	
Localidades		Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1, Es2	Es3, Es4, Es5
		Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)
Labelo Epiderme abaxial Unguículo	Ápice	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	estriada
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente
		Formato em vista frontal	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo
		Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente
		Número de feixes vasculares	7	7	7
	Meio	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	estriada
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente
		Formato em vista frontal	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo
		Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente
		Número de feixes vasculares	7	7	7
	Base	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada ^{Ex2}	estriada
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente
		Formato em vista frontal	irregular	longit. alongado irregular ^{Ex5}	irregular
		Formato em secção transversal	convexo	papiloso	papiloso
		Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente
		<u>Número de feixes vasculares</u>	<u>9</u>	<u>9</u>	<u>7</u>

			<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>		
Número da amostra			Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1,Es2	Es3, Es4, Es5	
Localidades			Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	
Etiqueta	Epiderme abaxial	Unguículo Ápice (lobo central)	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	estriada	estriada
			Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
			Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular	irregular
			Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
			Presença de estômatos	presente	presente	presente	presente
		Lobo central	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	estriada	estriada
			Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
			Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular	irregular
			Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
			Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente	ausente
			Margem do lobo central	lisa	lisa	lisa	lisa
				epiderme+mesofilo	epiderme+mesofilo	epiderme+mesofilo	epiderme+mesofilo
		Lateral Lobe	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	estriada	estriada
			Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
			Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular	irregular
			Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
			Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente	ausente
			Margem do lobo lateral	lisa	lisa	lisa	lisa
		epiderme+mesofilo	epiderme+mesofilo	epiderme+mesofilo	epiderme+mesofilo		

			<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>	
Número da amostra			Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1,Es2	Es3, Es4, Es5
Localidades			Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)
Ginostêmio	Cavidade estigmática	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	estriada	estriada
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
		Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular	irregular
		Formato em secção transversal	convexo-papiloso	convexo-papiloso	convexo	convexo
		Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente	ausente
		<u>Número de feixes vasculares (laterais+ventrais)</u>	<u>2+7</u>	<u>0+5</u>	<u>0+8</u>	<u>0+6</u>
	Apíce	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	estriada	estriada
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
		Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular	irregular
		Formato em secção transversal	convexo-papiloso	convexo-papiloso	convexo	convexo
		Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente	ausente
		<u>Número de feixes vasculares (laterais+ventrais)</u>	<u>2+7</u>	<u>1+3</u>	<u>0+7</u>	<u>0+3</u>
	Meio	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	estriada	estriada
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
		Formato em vista frontal	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado
		Formato em secção transversal	convexo	convexo	convexo	convexo
		Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente	ausente
		<u>Número de feixes vasculares (dorsais+laterais+ventrais)</u>	<u>1+2+5</u>	<u>1+1+3</u>	<u>1+1+7</u>	<u>1+1+3</u>

		<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>			
Número da amostra		Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1,Es2	Es3, Es4, Es5		
Localidades		Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)		
Ginostêmio	Face adaxial	Base	Ornamentação na parede periclinal	estriada	inconspícua striate ^{Ex5}	estriada	estriada
			Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente
			Formato em vista frontal	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado
			Formato em secção transversal	reto	reto	reto	reto
			Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente	ausente
			<u>Número de feixes vasculares (dorsais+laterais+ventrais)</u>	<u>2+4+3</u>	<u>2+1+3</u>	<u>2+4+3</u>	<u>2+1+3</u>
	Antera	Ornamentação na parede periclinal	estriada	estriada	estriada	estriada	
		Ornamentação na parede anticlinal	presente	presente	presente	presente	
		Formato em vista frontal	irregular	irregular	irregular	irregular	
		Formato em secção transversal	papiloso	papiloso	papiloso	papiloso	
		Presença de estômatos	presente	presente	presente	presente ausente ^{Es4}	
		Número de feixes vasculares (conectivo)	1	1	1		

Obs.: Em negrito, destaque para caracteres que podem ser utilizados na distinção entre as espécies; sublinhado, destaque para aqueles que podem distinguir indivíduos da mesma espécie, pertencentes a populações disjuntas; sobrescrito, identificação dos indivíduos para os quais os caracteres foram variáveis.

Tabela 7: Caracteres micromorfológicos e anatômicos do cunículo e ovário de amostras de *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum*, de populações de Santa Bárbara (MG) e Nova Friburgo (RJ).

		<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>	
Número da amostra		Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1,Es2	Es3, Es4, Es5
Localidades		Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)
Cunículo e ovário	Ápice	Ornamentação na parede periclinal	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua
		Ornamentação na parede anticlinal	inconspícua	inconspícua	inconspícua
		Formato em vista frontal	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado
		Formato em secção transversal	reto/convexo	reto/convexo	reto/convexo
		Presença de estômatos	presente	presente	presente
	Meio	Ornamentação na parede periclinal	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua
		Ornamentação na parede anticlinal	inconspícua	inconspícua	inconspícua
		Formato em vista frontal	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado
		Formato em secção transversal	reto/convexo	reto/convexo	reto/convexo
		<u>Presença de estômatos</u>	ausente	<u>presente</u>	<u>ausente</u>
	Base	Ornamentação na parede periclinal	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua
		Ornamentação na parede anticlinal	inconspícua	inconspícua	inconspícua
		Formato em vista frontal	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado
		Formato em secção transversal	reto/convexo	reto/convexo	reto/convexo
		<u>Presença de estômatos</u>	<u>ausente</u>	presente	presente ausente ^{Es5}

		<i>Epidendrum xanthinum</i>		<i>Epidendrum secundum</i>		
Sample number		Ex1	Ex2, Ex3, Ex4, Ex5	Es1,Es2	Es3, Es4, Es5	
Localities		Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	Santa Bárbara (MG)	Nova Friburgo (RJ)	
Cunículo e ovário	Ápice	Ornamentação na parede periclinal	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua
		Ornamentação na parede anticlinal	inconspícua	inconspícua	inconspícua	inconspícua
		Formato em vista frontal	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado
		Formato em secção transversal	reto/convexo	reto/convexo	reto/convexo	reto/convexo
		Presença de estômatos	presente	presente	presente ausente ^{Es2}	presente
	Meio	Ornamentação na parede periclinal	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua
		Ornamentação na parede anticlinal	inconspícua	inconspícua	inconspícua	inconspícua
		Formato em vista frontal	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado
		Formato em secção transversal	reto/convexo	reto/convexo	reto/convexo	reto/convexo
		Presença de estômatos	ausente	ausente	ausente	ausente
	Base	Ornamentação na parede periclinal	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua	lisa/inconspícua
		Ornamentação na parede anticlinal	inconspícua	inconspícua	inconspícua	inconspícua
		Formato em vista frontal	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado	longit. alongado
		Formato em secção transversal	reto/convexo	reto/convexo	reto/convexo	reto/convexo
		<u>Presença de estômatos</u>	presente	ausente presente ^{Ex5}	<u>presente</u>	<u>ausente</u>
Mesofilo	Número de feixes vasculares (lobos externos+lobos internos)	3+2	3+2	3+2	3+2	

Obs.: Em sublinhado, destaque para caracteres que podem ser utilizados para distinguir indivíduos da mesma espécie, pertencentes a populações disjuntas; sobrescrito, identificação dos indivíduos para os quais os caracteres foram variáveis.

5. DISCUSSÃO

Os caracteres morfológicos florais são amplamente utilizados por taxonomistas para a classificação de gêneros e espécies em Orchidaceae (Pinheiro et al., 2009), uma vez que as flores são as partes mais conspícuas e ricas em informação para esse grupo. Em gêneros como *Epidendrum*, que apresenta grande representatividade em número de espécies e cuja variação morfológica floral tem sido extensivamente reconhecida e discutida (Garay & Sweet, 1974; Pabst & Dungs, 1975; Brieger, 1976-1977; Dressler, 1989; Sastre, 1990a, b; Pinheiro & Cozzollino, 2013), trabalhos que investiguem caracteres micromorfológicos e anatômicos florais são ainda mais importantes, pois podem contribuir substancialmente para a elucidação de problemas de delimitação taxonômica.

Embora *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum* apresentem extensa variação de caracteres morfológicos, até mesmo entre indivíduos de uma mesma população, principalmente relacionadas ao tamanho e forma do labelo (Pinheiro & Barros, 2007b; Pinheiro et al., 2009), o presente estudo constatou que a maioria das características micromorfológicas e anatômicas florais levantadas é compartilhada pelos indivíduos amostrados, de populações de Minas Gerais e Rio de Janeiro. Essa uniformidade nos caracteres levantados poderia ser esperada para indivíduos de populações de localidades disjuntas, mas pertencentes a uma mesma espécie; nesse caso, a homogeneidade encontrada poderia estar relacionada à proximidade filogenética entre os indivíduos, e o baixo número de diferenças nas características epidérmicas analisadas, mesmo entre indivíduos de populações afastadas, poderia ser explicado pela menor influência das condições ambientais nesses habitats que pudesse levar à diferenciação das mesmas (ver Barthlott, 1981).

Entretanto, esta condição de uniformidade também é observada mesmo em relação a indivíduos pertencentes ao que se consideram espécies distintas (*Epidendrum secundum* e *E. xanthinum*). Vale destacar que das 216 características micromorfológicas e anatômicas florais

avaliadas no presente trabalho (Tabelas 3 a 7), 162 são uniformes entre as espécies e populações e apenas 54 delas são variáveis: dentre esses 54 caracteres que variam, apenas 18 deles poderiam ser utilizados para a distinção entre indivíduos de diferentes populações mas pertencentes à mesma espécie, tanto para *E. secundum* quanto para *E. xanthinum* (por isso, optou-se por salientar a identificação das amostras nos resultados), enquanto que somente 5 poderiam ser utilizados para distinguir indivíduos em nível específico.

Dentre esses últimos, a grande maioria dos caracteres reportados não permite a distinção entre indivíduos de uma mesma espécie, amostrados em localidades diferentes, nem a separação dos indivíduos analisados em espécies distintas, uma vez que os estados de caráter variam de forma irregular, sem apresentar um padrão para as populações ou espécies. Desse modo, a única característica morfológica que permanece claramente distinta entre as espécies estudadas é a cor das flores, característica esta que foi utilizada por muitos autores para distinguir as espécies até então reconhecidas (Pabst & Dungs, 1975; Brieger, 1976-1977; Sastre, 1990a, b).

A concepção de que a diversidade fenotípica floral pode estar ligada a uma especialização para diferentes grupos de polinizadores, através de síndromes de polinização, tem sido um modelo conceitual importante na compreensão da interação entre plantas e polinizadores, bem como para o entendimento da evolução das características florais para muitas espécies (Vogel, 1954; Faegri & van der Pijl, 1966; van der Pijl & Dodson, 1966; Stebbins, 1970; Johnson & Steiner, 2000; Fenster et al., 2004); segundo esta hipótese, a evolução floral poderia resultar da seleção sobre as características florais pelos polinizadores mais frequentes ou eficientes (Stebbins, 1970). Atualmente, este modelo é uma das propostas para explicar a grande riqueza de espécies em Orchidaceae, cuja especialização do polinizador é considerada a mais alta dentre as plantas com flores (van der Pijl & Dodson, 1966; Tremblay, 1992; Ibsch et al., 1996).

Para os espécimes aqui estudados, de ambas as espécies e de todas as localidades amostradas, foi observada a ornamentação das paredes periclinais externas das células

epidérmicas, acompanhada da ornamentação da cutícula para as peças florais, que pode desempenhar um papel importante na atração de polinizadores. Na face adaxial das partes florais, que na inflorescência está completamente voltada para a parte mais externa no ambiente, a ornamentação das paredes periclinais e anticlinais das células da epiderme é normalmente estriada para a maioria dos indivíduos analisados, sendo ainda mais conspícua e ornamentada no calo do disco do labelo; na face abaxial, por outro lado, a ornamentação é frequentemente inconspícua. A superfície epidérmica nas plantas é a área de contato primário para a aproximação de um inseto, seja para a procura de alimento, seja como local para a deposição de ovos ou abrigo contra predadores, parasitas ou condições abióticas desfavoráveis (Müller, 2006).

Assim, a ornamentação das paredes periclinais externas das células da epiderme e, conseqüentemente, da cutícula na superfície adaxial das peças florais aqui estudadas, está provavelmente associada com a polinização, fornecendo atração visual aos polinizadores pela incidência de luz solar, já que as visitas ocorrem principalmente quando luz direta do sol incide sobre as inflorescências, como foi reportado previamente para *E. secundum* (Pansarin & Amaral, 2008). Na superfície abaxial, que provavelmente não está ligada à atração de polinizadores devido à posição das flores na inflorescência, a ornamentação das paredes periclinais externas das células é normalmente ausente ou inconspícua, o que pode representar um custo energético menor para as plantas, em relação ao aparato de cobertura ornamentada observada na superfície adaxial.

Nos espécimes aqui analisados, para ambas as espécies e localidades amostradas, a anatomia do ovário revelou a existência de uma cavidade abaixo deste, que o percorre paralelamente por aproximadamente 2/3 de seu comprimento, denominada cunículo. Essa cavidade, formada pela junção da porção ventral do labelo, o unguículo, que se encontra unido à coluna, é revestida por pequenas células papilosas e é aqui interpretada como nectário, uma vez que apresenta estrutura semelhante ao nectário do cunículo já relatado para outras espécies de

Epidendrum, como *E. densiflorum* Barb.Rodr., *E. fulgens* Brogn. e *E. secundum* (Pansarin, 2003; Moreira et al., 2008; Pansarin & Amaral, 2008; Fuhro et al., 2010).

De acordo com van der Pijl e Dodson (1966), o labelo das flores de orquídeas não está apenas relacionado às funções como suporte ao pouso de polinizadores ou à exposição e atração para as flores, mas também pode ter função como um guia para o centro da flor. Nesse sentido, tanto para *Epidendrum secundum* quanto para *E. xanthinum* aqui estudados, no disco do labelo, especialmente na porção do calo, a densa ornamentação estriada nas paredes periclinais externas da célula epidérmicas, que é escamiforme, pode corroborar sua função para a atração de polinizador, considerando sua localização no labelo, próxima à entrada do calo para o cunículo, que aqui é interpretado como a região produtora de néctar. Ainda, o arranjo das células e a ornamentação da cutícula na entrada do calo para o cunículo, alongada longitudinalmente para ambos os caracteres por toda sua extensão, pode atuar como um guia mecânico para o posicionamento do polinizador na flor, facilitando tanto o evento de polinização quanto o alcance da recompensa no cunículo.

Estudos reportam borboletas e mariposas como polinizadores para diferentes espécies de *Epidendrum* L. (p.e. van der Pijl & Dodson, 1966; van der Cingel, 2001). Os estudos realizados para espécies brasileiras do gênero apontam borboletas como polinizadoras de *E. denticulatum* Barb.Rodr. (Almeida & Figueiredo, 2003), *E. fulgens* Brogn. (Pansarin & Amaral, 2008; Fuhro et al., 2010) e *E. secundum* Jacq. (Pansarin & Amaral, 2008), enquanto que tanto borboletas quanto mariposas diurnas foram registradas como polinizadoras para *E. densiflorum* Lindl. (Pansarin, 2003). Assim, a uniformidade dos dados micromorfológicos e anatômicos aqui obtidos para *E. secundum* e *E. xanthinum*, e principalmente para o nectário do cunículo de *E. xanthinum*, que apresenta estrutura muito semelhante à de *E. densiflorum* (Pansarin, 2003), *E. fulgens* (Moreira et al., 2008) e *E. secundum* (Pansarin & Amaral, 2008), corroboram a indicação

de que a polinização para a espécie seja realizada por lepidópteros (van der Pijl & Dodson, 1966; van der Cingel, 2001).

O aroma das flores e a recompensa do néctar são importantes no estabelecimento da interação planta-polinizador (Melo et al., 2010), e dentro do grupo Lepidoptera, tanto mariposas quanto borboletas dependem em grande parte de sinais olfativos como indicadores de fontes atraentes ou não, para atividades relacionadas à reprodução e forrageio (Hansson, 1995). A presença de estômatos permanentemente abertos em todas as peças florais dos espécimes de *E. secundum* e *E. xanthinum* estudados, para todas as populações, densamente encontrados nas regiões apicais, pode sugerir sua função como canais para compostos voláteis produzidos por tecidos secretores adjacentes. O papel do aroma floral na atração do polinizador já foi reportado para muitas espécies de Orchidaceae, incluindo representantes de *Epidendrum* (e. g. van der Pijl & Dodson, 1966; Stpiczyńska, 2001; Pansarin, 2003; Moya & Ackerman, 2008; Melo et al., 2010) e muitos estudos também apontam para o papel da fragrância na atração na polinização por Lepidoptera (e. g. Hansson, 1995; Andersson et al., 2002; Knudsen et al., 2004; Martins & Johnson, 2007), e sendo assim, a presença desses estômatos seria uma evidência da presença de osmóforos nas peças florais.

Estômatos com micromorfologia semelhante também já foram reportados em espécies de *Acianthera* (Melo et al., 2010), com a emissão de odores florais voláteis estando associada a sua presença nas sépalas. Embora os osmóforos possam estar localizados em diferentes partes do perianto nas orquídeas (Pridgeon & Stern, 1983, 1985; Stern et al., 1987, Vogel, 1990), os dados apresentados no presente estudo mostram não apenas a presença de estômatos no perianto e no labelo, mas também sua presença em grandes quantidades na região da antera, no ginostêmio. Os locais onde estômatos foram observados, principalmente no ápice do labelo e antera, podem sugerir o seu papel como canal de liberação de odores ao polinizador para a parte do cunículo,

onde a recompensa de néctar é provavelmente produzida e armazenada (van der Pijl & Dodson, 1966).

Os estômatos presentes nas espécies aqui estudadas poderiam também ser interpretados como canais para a liberação de compostos produzidos em tecidos nectaríferos adjacentes, como já foi reportado para representantes de Orchidaceae e de outras famílias (Waddle & Lersten, 1973; Teuber et al., 1980; Davis & Gunning, 1991; O'Brien et al., 1996; Davis, 1997; Davis et al., 1998; Razem & Davis, 1999; Radice & Galati, 2003; Weryszko-Chmielewska et al., 2003; Davies et al., 2005). Estômatos secretores de néctar podem apresentar similaridades morfológicas aos estômatos encontrados no presente trabalho, com relação à perda do mecanismo de abertura e fechamento das células-guarda. Entretanto, apesar da extensa variação nos tipos de nectários em orquídeas, o tipo mais comum são os esporões; em muitas Laeliinae, inclusive em *Epidendrum* L., o esporão é menos óbvio, sendo chamada de cunículo, e está unida e localizada paralelamente ao ovário, sendo visível apenas quando a flor é cortada longitudinalmente (van der Pijl & Dodson, 1966; Dressler 1990, 1993; Pridgeon et al., 1999; Davies et al., 2003; Singer & Koehler, 2004). De acordo com Hágsater & Soto Arenas (2005), a presença de tecido nectarífero no cunículo é, até mesmo, uma das características que define o gênero dentro da subtribo Laeliinae. Desse modo, a presença de nectário no cunículo, para as espécies aqui estudadas, corrobora a sugestão de que os poros dos estômatos podem estar envolvidos em uma secreção exógena, e que eles podem atuar como possíveis rotas para secreções voláteis, como sugerido por Vogel (1990).

Com relação ao néctar disponível no nectário, para *Epidendrum secundum*, apesar da existência de um nectário no cunículo, o mesmo não produz néctar, e a polinização provavelmente ocorre por mecanismos de engano (Pansarin & Amaral, 2008), condição encontrada também em *E. ibaguense* e *E. radicans* (Boyden, 1980); em *E. densiflorum*, embora o nectário do cunículo produza néctar como recompensa, o mesmo não fica disponível, sendo

liberado somente após a raspagem das papilas do nectário pela probóscide do polinizador (Pansarin, 2003), condição relatada para a maioria das espécies de *Epidendrum* (van der Pijl & Dodson, 1966). No presente estudo, o teste histoquímico realizado com Vermelho Neutro (Kearns & Inouye, 1993) mostrou uma reação positiva para o conteúdo das papilas da epiderme do cunículo nos indivíduos de *E. xanthinum*, o que pode indicar a presença de néctar. Ainda, as demais observações anatômicas aqui apresentadas para o nectário, cujas células possuem citoplasma denso e núcleo proeminente, indicando intensa atividade celular, além das observações realizadas no campo (observação pessoal) para a presença de néctar em *E. xanthinum*, permitem inferir que o nectário do cunículo nessa espécie é responsável pela produção de néctar como oferta ao polinizador, e a liberação da recompensa provavelmente ocorre por mecanismo semelhante ao registrado para *E. densiflorum* (Pansarin, 2003).

Além da atração de polinizadores através de odores florais e da oferta de néctar, a coloração das flores também pode desempenhar um papel importante; alguns polinizadores podem apresentar uma diferença significativa na sensibilidade para cores enquanto outros podem apresentar uma constância na preferência por certas colorações, como observado no comportamento de certas borboletas (van der Pijl & Dodson, 1966). Uma vez que *Epidendrum secundum* apresenta flores de cor lilás e *E. xanthinum*, de cor amarela, isso pode ter implicação importante na hipótese de diferenciação de polinizadores para essas duas espécies. Essa hipótese pode ser ainda corroborada pela separação e coesão das espécies demonstrada pelas análises moleculares do presente trabalho, sendo que a cor das flores poderia servir como uma barreira reprodutiva entre as duas espécies de ocorrência simpátrica, devido à preferência dos polinizadores por flores de uma ou outra cor.

Contudo, o papel da cor das flores na atração de polinizadores e como barreira pré-zigótica ao fluxo gênico interespecífico é, neste caso, meramente especulativo; a ocorrência de híbridos naturais suporta a ideia de que os polinizadores, apesar de poderem apresentar

preferências por uma coloração ou outra das flores, podem incorrer em enganos e, além disso, muitos trabalhos já demonstraram o papel majoritário dos odores na atração a polinizadores do grupo Lepidoptera (e. g. Hansson, 1995; Andersson et al., 2002; Knudsen et al., 2004; Martins & Johnson, 2007). Desse modo, estudos mais aprofundados de biologia da polinização e de química de frangâncias (compostos voláteis) são necessários, principalmente para *Epidendrum xanthinum*, para investigar se a espécie possui um polinizador preferencial e qual seu comportamento em relação à cor e ao aroma das flores de *E. xanthinum* e das flores de populações de espécies simpátricas.

Os resultados das análises moleculares do presente estudo mostram que as reconstruções filogenéticas resultantes apenas da combinação dos marcadores plastidiais apresentam uma topologia diferente, sem a divisão dos clados para *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum*, ao contrário do filograma gerado apenas com os dados do marcador nuclear *ITS*, cuja topologia sugere claramente a divisão das espécies em dois agrupamentos. Essa divergência entre as topologias resultantes de dados de núcleo e cloroplasto é comum em trabalhos que propõem reconstrução de filogenias (Devey et al., 2008, Koehler et al., 2008; van den Berg et al., 2009). Petit & Excoffier (2009) discutem essas diferenças e relacionam sua ocorrência ao fluxo diferencial entre pólen e sementes.

Em plantas, a dispersão de sementes é considerada menos eficiente que a dispersão de pólen e, assim, a taxa de fluxo gênico do DNA nuclear, ligado ao grão de pólen, é muito maior que o fluxo gênico do DNA plastidial, intimamente relacionado às sementes. De acordo com Rieseberg et al. (1996) e Petit & Excoffier (2009), como o fluxo de sementes é baixo na maioria das Angiospermas, o DNA plastidial encontra mais facilidade para introgridir em espécies distintas; já o fluxo gênico intraespecífico promovido pelas altas taxas de dispersão do grão de pólen gera um mecanismo para manter a coesão das espécies, uma vez que diminui os efeitos decorrentes da deriva genética e dos eventos de introgressão de alelos em casos de contato entre

populações adjacentes de espécies distintas. Assim, marcadores moleculares ligados ao fluxo gênico intraespecífico, como é o caso do DNA nuclear, seriam mais informativos para estudos de delimitação taxonômica para espécies, enquanto que marcadores plastidiais, que se encontram dispersos apenas por sementes, sofrem mais frequentemente eventos de introgressão e desse modo, apresentam menor valor taxonômico na delimitação de espécies.

Apesar da grande taxa de mutação apresentada pelo DNA plastidial, deve-se considerar também o uso de componentes do genoma com altas taxas de fluxo gênico para estudos de delimitação de espécies, devido à sua capacidade potencial de demonstrar a coesão da unidade taxonômica (Petit & Excoffier, 2009). Além disso, nas árvores geradas através de dados combinados, o DNA de cloroplasto contribui para uma maior resolução dentro dos grupos, enquanto o DNA nuclear, aparentemente, contribui para uma resolução entre espécies (Harris & Ingram, 1991; Rieseberg et al., 1996; Petit & Excoffier, 2009). Desse modo, para o presente trabalho, consideraram-se as informações combinadas dos dois tipos de marcadores moleculares, plastidial e nuclear, uma vez que a utilização dos dados concatenados gera informações mais precisas para o estudo de delimitação de espécies aqui proposto. Para uma discussão mais precisa do filograma gerado, optou-se por considerar a reconstrução filogenética dos dados nucleares e plastidiais combinados, resultado das análises bayesianas.

No filograma proposto no presente estudo (Fig. 14B), a divisão dos clados monofiléticos de *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum* tem alto suporte (prob. 100%), e essa divisão acompanha a classificação anteriormente proposta baseada na cor das flores como caracter diagnóstico para a distinção dessas espécies (Pabst & Dungs, 1975; Brieger, 1976-1977; Sastre, 1990a, b). Analisando os dados micromorfológicos e anatômicos florais apresentados no presente trabalho, não é possível relacionar nenhuma das características encontradas ao resultado observado nas reconstruções filogenéticas e assim, a característica morfológica da coloração das flores para as duas espécies continua sendo aquela que apresenta um traço filogenético.

Analizando precisamente cada clado, aquele formado por *Epidendrum xanthinum* apresenta maior resolução interna, com agrupamentos mais distintos, como é o caso dos grupos formados por indivíduos pertencentes às populações de Nova Friburgo – RJ e Santa Maria Madalena – RJ. A relação filogenética entre os indivíduos de *E. xanthinum* de Santa Bárbara - MG e Santo Antônio do Itambé – MG se explica pela distância física entre essas duas populações (aprox. 300 Km de distância), que apesar de serem disjuntas atualmente, podem ter sido mais próximas ou até mesmo conectadas no passado, o que possibilitaria o fluxo gênico entre os indivíduos e poderia explicar a atual semelhança genética entre os mesmos. Desse modo, a resolução interna do clado de *E. xanthinum* deixa clara a proximidade entre indivíduos de populações adjacentes e o distanciamento genético entre aqueles de populações disjuntas.

Já para *Epidendrum secundum*, a resolução dos grupos internos não é tão clara; não há a formação de grupos para indivíduos provenientes de uma mesma população e ocorre, até mesmo, uma politomia com representantes de Santa Maria Madalena - RJ e Santa Bárbara - MG, marcadamente oriundos de populações atualmente não conectadas, e que aqui são apresentados como muito próximos filogeneticamente. Apesar da reconhecida diversidade morfológica encontrada em indivíduos dessa espécie, cuja variação morfológica é muito ampla tanto entre populações quando dentro de cada uma delas (Pinheiro & Barros, 2007b), é difícil avaliar quanto dessa variabilidade está expressa na diversidade genética amostrada nesse estudo. A avaliação da extensão dessas variações morfológicas e seu alcance na estrutura genética depende da escolha dos métodos e marcadores que serão utilizados, especialmente para casos de estudos em nível intraespecífico (Nybom, 2004). Assim, as diferenças na morfologia apresentadas pelo grupo podem não estar necessariamente expressas no conjunto de dados moleculares apresentado nesse trabalho, o que dificulta o esclarecimento das relações dos indivíduos dentro do clado de *E. secundum*.

É interessante notar o posicionamento do indivíduo identificado como *Epidendrum* sp., proveniente do Equador, como grupo irmão dos demais pertencentes ao clado de *E. secundum*; o mesmo apresenta flores de coloração amarela e, mesmo assim, não aparece incluído no clado de *E. xanthinum*. Espécimes de *Epidendrum* com flores amarelas também ocorrem na Cadeia dos Andes e Planalto das Guianas (Pinheiro et al., 2009), mas sugerir intuitivamente seu posicionamento no clado de *E. xanthinum*, apenas pela coloração amarela de suas flores, resulta numa delimitação equivocada, como demonstrado no presente estudo; *E. xanthinum* compreende indivíduos que ocorrem no Planalto Brasileiro, em serras na Cadeia do Espinhaço e na Serra dos Órgãos. Estas plantas correspondem ao espécime descrito por Lindley (1844) como *E. xanthinum*, o qual era proveniente de áreas montanhosas do Rio de Janeiro. A inserção de um indivíduo de flores amarelas no clado de *E. secundum* corrobora a grande diversidade morfológica floral encontrada no chamado “complexo *E. secundum*”, que compreende plantas extremamente polimorfas e de difícil delimitação taxonômica (Brieger, 1976-1977; Dunsterville, 1979; Pinheiro & Barros, 2007b), e reforça a importância de outros estudos que envolvam as demais entidades taxonômicas associadas a este complexo, como sinônimos de *E. secundum* ou como espécies distintas (e.g. *E. elongatum*, *E. crassifolium*, *E. ellipticum*, *E. ansiferum*, *E. versicolor*, entre outras) (Pinheiro & Barros, 2007b).

Epidendrum é conhecido por possuir espécies com fracas barreiras reprodutivas, o que permite a ocorrência de hibridações (e.g. Dunsterville, 1979; Hágsater & Soto-Arenas, 2005; Pansarin & Amaral, 2008), especialmente no subg. *Amphiglottium*, em que a ocupação frequente de ambientes originados pela ação antrópica permite zonas de hibridação entre espécies previamente isoladas (Dunsterville, 1979; Hágsater e Soto-Arenas, 2005). Apesar disso, o presente estudo, realizado com representantes de *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum* de ocorrência simpátrica, que permite até mesmo a formação de híbridos naturais (observação pessoal), mostra um importante resultado relativo à manutenção da coesão das espécies, devido à

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*, *Lanium* 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.