Estudos filogenéticos e biogeográficos no clado Ornithocephalus da subtribo Oncidiinae (Orchidaceae): gêneros Zygostates Lindl. e Centroglossa Barb. Rodr.

Resumo

Zygostates Lindl. é um gênero composto por 23 espécies que ocorrem na Mata Atlântica brasileira (uma espécie alcança a Argentina e o Paraguai) e norte e noroeste da América do Sul. Este gênero nunca foi estudado sob o ponto de vista da sistemática filogenética e apenas cinco espécies foram amostradas para o seu perfil molecular e incluídas em trabalhos que visavam o estudo mais geral da subtribo Oncidiinae. *Centroglossa* consiste de seis espécies endêmicas da Mata Atlântica. O hábito e a morfologia de *Centroglossa* e *Zygostates* têm levado alguns autores à sugerir uma estreita relação entre tais gêneros, contudo a presença de um cálcar verificado no labelo de *Centroglossa* só é observado no gênero *Dunstervillea* pertencente ao mesmo subclado. O objetivo deste estudo será investigar as relações filogenéticas de *Zygostates*, *Centroglossa* e tentativamente, devido à raridade e difícil acesso, também o posicionamento de *Dunstervillea* no subclado *Ornithocephalus*, baseando-se em caracteres moleculares e morfológicos, além de verificar padrões de distribuição desses táxons, indicando barreiras e áreas ancestrais. Os estudos serão realizados através de consulta às coleções dos principais herbários e coleta em campo. Ao final do projeto, pretende-se também realizar o tratamento taxonômico das espécies de *Centroglossa;* a monografia de *Zygostates* para o estado do Paraná e São Paulo e *Centroglossa* para o estado de São Paulo; verificar o estado de conservação segundos os critérios da IUCN para os gêneros estudados e por fim, elaborar um *Rapid Color Guide* (www.fieldmuseum.org) com as espécies do bioma Mata Atlântica.

1.INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae possui 20.000 a 25.000 espécies (Dressler, 1981, 1993; Pridgeon *et al*., 1999) divididas em cinco subfamílias (Chase *et al.*, 2003). Epidendroideae possui aproximadamente 18.000 espécies em 650 gêneros, com distribuição cosmopolita (Cribb e Chase, 2005). Dentre as Epidendroideae, encontra-se a subtribo Oncidiinae, um grupo com distribuição neotropical com 61 gêneros e cerca de 1600 espécies (Neubig *et al*., 2012).

A subtribo Oncidiinae é a segunda maior subtribo do Neotrópico e subtrópicos e uma das mais diversas em Orchidaceae (1600 espécies, 61 gêneros) (Chase, 1988; Neubig *et al*, 2012), com uma grande variedade na morfologia floral e vegetativa. Elas incluem a maior diversidade de sistema de polinização e a maior variedade no número de cromossomos conhecidos para Orchidaceae (maior do que o resto da família das orquídeas combinada) (Neubig *et al.*, 2012).

Vários estudos filogenéticos concentrados em Oncidiinae foram realizados nos últimos anos, com destaque para Chase e Palmer (1989), Williams *et al.*(2001), Chase (2009) e Neubig *et al.* (2012). A partir de Williams *et al.*(2001) as antigas subtribos Ornithocephalinae e Teligoninae foram incorporadas em Oncidiinae, sendo a partir de então reconhecido informalmente como clado *Ornithocephalus*, onde foram amostrados seis gêneros do grupo. Em Neubig *et al.* (2012) o clado se manteve monofilético com a análise de seis gêneros incluídos: *Chytroglossa*Rchb.f., *Eloyella* P.Ortiz, *Hintonella* Ames, *Ornithocephalus* Hook., *Phymatidium* Lindl e *Zygostates* Lindl.. Este clado é caracterizado por possuírem flores pequenas, verdes a brancas ou amarelas que secretam óleo através de elaióforos labelar e são polinizadas por abelhas (Toscano de Brito, 2001; Neubig *et al.*, 2012).

O gênero *Zygostates* foi estabelecido por John Lindley, em 1837, baseando-se em duas espécies brasileiras: *Z. cornuta* Lindl. E *Z. lunata* Lindl. De acordo com a recente revisão taxonômica proposta por Toscano de Brito (2015), *Zygostates* consiste de 23 espécies com distribuição disjunta em duas grandes áreas de ocorrência: a Mata Atlântica brasileira (uma espécie alcança a Argentina e o Paraguai) e a região norte e noroeste da América do Sul, incluindo Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela. Dentre as espécies conhecidas até o momento, 15 ocorrem no Brasil, todas endêmicas do bioma Mata Atlântica. Trata-se de plantas epífitas, das matas úmidas e secas, distribuídas desde o nível do mar até ca. 1800 m de altitude.

Embora o gênero *Zygostates* tenha sido recentemente foco de estudos de Toscano de Brito (2001) e Chase e Toscano de Brito (2009), e uma revisão taxonômica encontrar-se no prelo (Toscano de Brito, 2015), o gênero nunca foi estudado sob o ponto de vista da sistemática filogenética. Apenas cinco espécies foram até o momento amostradas para o seu perfil molecular e incluídas em trabalhos que visavam o estudo mais geral da subtribo Oncidiinae (Williams *et al*., 2005; Neubig *et al*., 2012).

O gênero *Centroglossa* foi descrito por Barbosa Rodrigues em 1877, baseando-se em duas espécies, *C. macroceras* Barb. Rodr.e *C. tripollinica* (Barb. Rodr.) Barb. Rodr.,esta última previamente posicionada em *Ornithocephalus* e recentemente selecionada como lectótipo (Toscano de Brito, 2001). É constituído de seis espécies endêmicas da Mata Atlântica do sudeste brasileiro (Barros *et al.,* 2014), apresenta hábito e morfologia floral muito semelhante a *Zygostates*, mas difere deste, principalmente, por apresentar o labelo calcarado.

A semelhança em hábito e morfologia floral entre *Zygostates* e *Centroglossa*, levou alguns autores (Toscano de Brito, 2001; Chase e Toscano de Brito, 2005; Neubig *et al*., 2012) a hipotetizarem uma possível afinidade entre esses gêneros. Uma análise filogenética ampla do clado *Ornithocepallus*, (Toscano de Brito *et al.* em prep., *apud* Neubig*et al.,* 2012), baseada em DNA nuclear (nrITS), demonstrou que *Centroglossa* encontra-se inserido em *Zygostates*. De acordo com Toscano de Brito (pers. com. 2014) os exemplares de *Centroglossa* utilizados na referida análise encontravam-se estéreis e, sendo assim, os resultados obtidos devem ser considerados com cautela, pois *Centroglossa* e *Zygostates* são praticamente indistinguíveis vegetativamente. Além disso, o material cultivado que serviria para *voucher* foi perdido, não havendo desta forma como verificar a correta identidade daqueles exemplares.

Dentro deste complexo também encontra-se o gênero *Dunstervillea* Garay, gênero monotípico distribuído na Venezuela, norte do Brasil, Equador e Guiana (Toscano de Brito, 2001; Chase e Toscano de Brito, 2005), assemelha-se a *Centroglossa* devido ao seu labelo distintamente calcarado. Porém ao ser descrito por Garay (1972), foi relacionado a *Omoea* Blume (2 spp) e *Papillilabium* Dockr. (1 sp.), gêneros asiático e australiano, respectivamente. Por outro lado, Dressler (1981, 1993), baseando-se em características morfológicas, discorda dessa opinião e inclui *Dunstervillea* no clado *Ornithocephalus*, ponto de vista compartilhado por Toscano de Brito (2001) e Chase e Toscano de Brito (2005).

Os membros do clado *Ornithocephalus* apresentam morfologia floral extremamente complexa, sem dúvida uma das mais complexas das Oncidiinae. Alguns segmentos florais, tais como: tábula infraestigmática, calosidade do labelo e apêndices da coluna, estruturas compartilhadas por vários gêneros e espécies desse clado, são muito difíceis de serem interpretados. Em alguns casos parecem ser derivados da coluna, e outros originários do labelo e, por vezes, derivados de mais de um órgão. Tal complexidade impede que essas estruturas sejam utilizadas de forma precisa em filogenias morfológicas ou, quando utilizadas, geram dúvidas quanto ao resultado das análises, sendo que a elucidação destas características do ponto de vista de desenvolvimento e filogenético, imprescindíveis para se tratar de homologia entre elas.

A região Neotropical é conhecida mundialmente por sua distinta biodiversidade, resultado da heterogeneidade ambiental e da complexa história geológica, ambos responsáveis por padrões de distribuição de táxons e clados (Morrone, 2013). Hipóteses sobre a diversificação do Neotrópico têm sido estudada para entender processos que explicam a origem da diversificação desta região (Sigrist e Carvalho, 2009).

Embora a idade e origem geográfica dos muitos grupos neotropicais estão bem estabelecidos, menos se sabe de seus padrões de diversificação (Condamine *et al.*, 2012). Em Oncidiinae estudos biogeográficos são inéditos, o que torna o grupo importante e interessante tanto para prever uma idade e uma origem geográfica quanto os padrões que levaram a tal diversidade.

As abordagens dentro da biogeografia atual desenvolvem suas análises partindo da concordância entre hipóteses filogenéticas e ocorrência geográfica, através da qual são gerados cladogramas de área hierárquicos, aos quais se atribui o significado de retratarem a relação biótica entre as áreas estudadas (Xiang e Soltis, 2001; Sanmartín e Ronquist, 2004, Arias *et al*., 2011). Os trabalhos de Hovenkamp (1997, 2001) e Ronquist (1997) propuseram abordagens alternativas dentro da biogeografia, independentes da premissa adotada pelas metodologias baseadas em cladogramas de área, sendo chamados de métodos baseados em eventos. Ronquist (1997) propôs um método baseado em eventos, que considera, além da vicariância, o processo de dispersão e através de critérios específicos, reconstrói as distribuições ancestrais a partir de uma dada filogenia, sem assumir, no entanto, hipóteses sobre a relação entre as áreas. Já para Hovenkamp (1997, 2001), a identificação das barreiras separando biotas seria mais importante dentro de estudos em biogeografia de vicariância do que a descoberta de relações entre áreas pré-estabelecidas. Ou seja, o foco dos estudos biogeográficos

não deveria ser identificar relações entre áreas e sim a identificação de barreiras que delimitam as distribuições dos táxons, pois não há uma correlação tão direta e determinística entre história geológica e história biológica a ponto de extrapolar tão diretamente eventos internos de especiação a grandes eventos geológicos.

2.OBJETIVOS

Investigar as relações filogenéticas de *Zygostates* Lindl.,*Centroglossa* Barb. Rodr. E tentativamente, devido à raridade e difícil acesso, também o posicionamento de *Dunstervillea* Garay baseando-se em caracteres moleculares e morfológicos além de verificar padrões biogeográficos desses táxons.

Objetivos específicos

- Realizar o tratamento taxonômico das espécies de *Centroglossa*, com descrições, ilustrações dos caracteres diagnósticos, chave de identificação e comentários taxonômicos e ecológicos.
- Testar a monofilia de *Zygostates* e *Centroglossa*, utilizando o maior número possível de espécies brasileiras e extra-brasileiras, através de análises macro- e micro-morfológicas e de anatomia floral além de moleculares de regiões do genoma nuclear e plastidial;
- Testar a relação filogenética de *Dunstervillea* com o clado *Ornithocephalus*.
- Identificar detalhadamente a distribuição das espécies de *Zygostates* e *Centroglossa* através de estudos biogeográficos e avaliar possíveis padrões que levaram a sua atual distribuição através de analises de vicariância e dispersão.
- Identificar o tempo de divergência das espécies de *Zygostates* e *Centroglossa;*
- Realizar a monografia de *Zygostates* para do Paraná e São Paulo;
- Realizar a monografia de *Centroglossa* para o estado de São Paulo;
- Verificar o estado de conservação segundos os critérios da IUCN para os gêneros estudados;
- Elaborar um *Rapid Color Guide* (www.fieldmuseum.org) com as espécies, do bioma Mata Atlântica;

3.CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Atividades	1° Ano				2° Ano				3° Ano				4°Ano			
	Trimestre				Trimestre				Trimestre				Trimestre			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Levantamento Bibliográfico																
Disciplinas/Obtenção dos créditos																
Expedições de coleta/Aquisição de material vegetal																
Análise de material de herbário																
Extração DNA total, amplificação das regiões específicas e sequenciamento																
Processamento de material para ML e MEV																
Período "sanduiche" – visita a herbários e análises filogenéticas complementares																
Análise, descrição e interpretação dos resultados																
Qualificação																
Elaboração de trabalhos científicos para apresentação em eventos nacionais e/ou internacionais																
Elaboração e submissão de artigos científicos para periódicos internacionais																
Redação da tese																
Entrega do boneco da tese para acompanhamento do orientador e co-orientador																
Entrega da tese																
Defesa da tese																

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DE MATERIAL BOTÂNICO E TRATAMENTO TAXÔNOMICO

As espécies de *Zygostates* Lindl.e *Centroglossa* Barb. Rodr. (Figura 1) e tentativamente de *Dunstervillea* Garay serão coletadas em expedições científicas nos locais indicados como áreas de ocorrência das espécies e, caso necessário, serão obtidas através de colaborações científicas ou comercialmente. O material fértil será herborizado, devidamente prensado em prensas de madeira e submetido à secagem, em

estufa, a uma temperatura média de 37ºC. Após a secagem será feita a montagem das exsicatas de acordo com técnicas convencionais segundo Fidalgo e Bononi (1989) e depósito nos herbários da Universidade Federal do Paraná (UPCB) e Rioclarense (HRCB). Quando necessário, o material coletado será cultivado até floração na coleção viva da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sendo posteriormente analisado e herborizado.

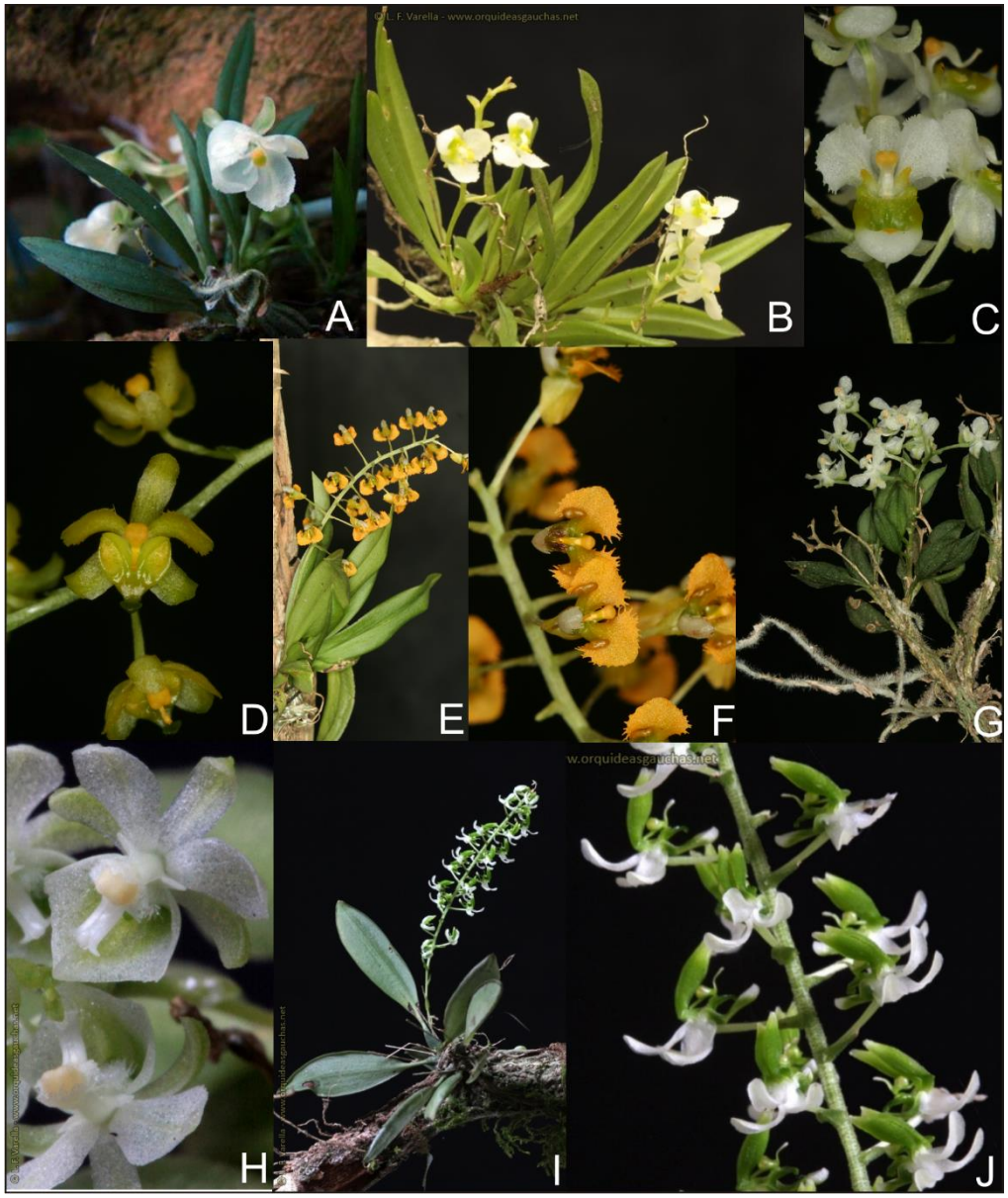

Figura 1- Variação da morfologia vegetativa e floral de *Centroglossamacroceras* (A)e algumas espécies de *Zygostates*: B e C. *Z. alleniana*; D. *Z. bradei;* E e F. *Z. cornuta;* G e H *Z. dasyrhiza;* I e J. *Z. pellucida.*

Além do material coletado, exsicatas depositadas nos principais herbários nacionais e internacionais serão analisadas. O material tipo das espécies será levantado e solicitado empréstimo, caso não seja possível o empréstimo, serão solicitadas fotos

dos tipos. Além do material tipo, serão estudadas as obras príncipes de todas as espécies. Serão preparadas pranchas com ilustrações botânicas de cada espécie, contendo todos os detalhes morfológicos necessários à determinação dos espécimes mediante a comparação com as descrições originais. Além disso, será elaborado um *Rapid Color Guide* (www.fieldmuseum.org) com as espécies, *a priori*, do bioma Mata Atlântica, proporcionando informação e identificação rápida em campo através de fotos de plantas vivas.

Prevê-se um período de estudos no New York Botanical Garden para análise de materiais não disponibilizados para envio e estudos no Brasil, principalmente para o tratamento taxonômico de *Centroglossa* e os estudos biogeográficos de *Centroglossa* e *Zygostates*.

4.2 ESTUDOS FILOGENÉTICOS

Parte das amostras de tecidos vegetais será armazenada em freezer -20ºC ou em sílica-gel (Chase e Hills, 1991), na proporção de 95% de sílica-gel branca e 5% de sílica-gel azul indicadora. Os materiais secos em sílica serão estocados em temperatura ambiente por até um ou dois meses com pouca perda de qualidade, e em freezer -20ºC ou, preferivelmente, ultrafreezer (-80ºC) por até dois anos. Outra parte, será fixada em FAA 50 (Johansen, 1940) e armazenadas em etanol 70%. O restante das amostras será fixado em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato 0.1 M, pH 7,2 (McDowelleTrump, 1976) e armazenadas no próprio fixador.

Amostras foliares serão usadas para a extração de DNA utilizando-se a metodologia baseada no protocolo de CTAB 2X de Doyle e Doyle (1987), com algumas modificações, incluindo a maceração manual das amostras em cadinhos com nitrogênio líquido. A extração com CTAB é bastante eficiente, produzindo grandes quantidades de DNA para estocagem, visto que bancos que se propõe ao intercâmbio e/ou fornecimento de amostras no futuro devem considerar extrações em escala maior. Antes do armazenamento, será feita uma verificação da qualidade da amostra para futura referência, através de visualização em gel de agarose/brometo de etídio com um controle de massa e peso molecular (*DNA massladder*). As alíquotas do material serão mantidas na Coleção de DNA Total de Plantas da UFPR, vinculadas à *vouchers*no herbário UPCB e às duplicatas no HRCB. Algumas espécies já possuem amostras no banco de DNA da UFPR (Tabela 1).

Espécie	País	Estado	Localidade	Coletor
*Centroglossa*sp.	Brasil	-	-	Toscano de Brito, A.L.V.
Centroglossamacroceras	Brasil	São Paulo	Cantareira	Zandona, L.

Centroglossamacroceras	Brasil	São Paulo	Cantareira	Zandona, L.
Centroglossa nunes-limae	Brasil	-	-	Cabral, M.R.
*Zygostates*sp.	Brasil	Santa Catarina	Bombinhas	Mancinelli, W.S. 1198
Zygostatesalleniana	Brasil	-	-	Smidt, E.C. 1094
Zygostatescornigera	Brasil	Paraná	Morretes	Blum, C.T.
Zygostatescornuta	Brasil	São Paulo	Caraguatatuba	Smidt, E.C. 972
Zygostatesdasyrhiza	Brasil	Santa Catarina	Três Barras	Mancinelli, W.S. 1066
Zygostatesdasyrhiza	Brasil	Santa Catarina	São Bento do Sul	Mancinelli, W.S. 1359
Zygostatesdasyrhiza	Brasil	-	-	Klein, J. 62
Zygostatesdasyrhiza	Brasil	Rio Grande do Sul	São Francisco de Paula	Klein, J. 62
Zygostatesdasyrhiza	Brasil	Rio Grande do Sul	Cambará do Sul	Klein, J. 222
*Zygostates*aff. *inflexus*	Brasil	-	-	Toscano de Brito, A.L.V. 2773
*Zygostates*aff. *inflexus*	Brasil	-	-	Toscano de Brito, A.L.V. 2774
Zygostateskuhlmannii	Brasil	-	-	Smidt, E.C. 1049
Zygostateslunata	Brasil	-	-	Smidt, E.C. 1033
Zygostatespustulata	Brasil	Paraná	Morretes	Mancinelli, W.S. 1217A

Tabela 1- Espécies com material armazenado no banco de DNA da UFPR.

Será amplificada e sequenciada a região do DNA nuclear, ITS (ITS1, gene 5.8S e ITS2), e as regiões codificadoras do DNA plastidial, *matK*, *atpL-atpH*, *psbD-trnT*e *trnLC-trnLF*.As amplificações de PCR serão realizadas em reações de 25µl constituídas de tampão1X, 2,5mM de MgCl2, 0,2mM de dNTPs, 0,5mM de cada *primer*, 10ng de BSA, 2,0 unidades de Taq DNA polimerase e 20-50ng de DNA genômico. As amplificações serão feitas seguindo o programa de 1 minuto de aquecimento à 94 °C e 40 ciclos de 30 segundos de desnaturação à 94 °C, 40 segundos de anelamento à 49-55 °C e 40 segundos de extensão à 72 °C, seguido de uma extensão final à 72 °C por 5 minutos. As condições de amplificação serão ajustadas em relação às reações e aos programas do termociclador conforme a necessidade de cada material. Os produtos de PCR serão verificados em eletroforese horizontal em gel de agarose 1% e posteriormente corados em banho com brometo de etídio. Os produtos de PCR com boa amplificação (i.e. de 70-100ng) serão purificados com PEG 20% e verificadas em eletroforese horizontal em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio. A reação de sequenciamento será feita com o kit Big Dye Terminator version 3.1 (Applied Biosystems, California, USA) através da empresa Macrogen Inc. (http://dna.macrogen.com). Todas as sequências obtidas neste estudo serão submetidas ao GenBank através do programa Sequin, seguindo todas as recomendações deste banco de sequências público.

Para a realização da filogenia morfológica, serão analisadas obras príncipes, exsicatas de herbários nacionais e internacionais, e materiais coletados em campo onde parte das amostras será fixada em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% em tampão fosfato 0.1 M, pH 7,2 (Mcdowell eTrump, 1976) e armazenadas no próprio fixador. Preliminarmente, serão levantados cerca de 70 caracteres qualitativos e quantitativos, morfológicos e anatômicos florais e vegetativos, selecionados ao longo do trabalho com o exame de espécimes e com base na literatura disponível (Dressler 1981, Dressler 1993, Chase e Toscano de Brito, 2005, Royer, 2013) para estudos filogenéticos combinados. Os caracteres quantitativos serão codificados segundo o método de Thiele (1993) e a matriz resultante adicionada a matriz de caracteres qualitativos. Neste método é possível arbitrariamente escolher o número de estados permitidos para cada caráter quantitativo, nesta análise optaremos por permitir a codificação em quatro estados para cada caráter. A matriz será construída utilizando o programa NEXUS Editor (Page, 2001).

Os caracteres serão levantados através de caracteres neomórficos e transformacionais baseados na observação da diversidade morfológica encontrada nos órgãos vegetativos (rizoma, pseudobulbo e folha) e reprodutivos (inflorescência, flores, sépalas, pétalas, labelo e coluna). Os caracteres serão analisados quanto ao seu estado, de acordo com os quatros componentes proposto por Sereno (2007).

Serão utilizadas também, técnicas usuais para processamento de material vegetal para as microscopias de luz (ML) e eletrônica de varredura (MEV). O material destinado à ML será incluído em historesina Leica conforme instruções do fabricante e seccionado com espessuras de 3-7 μm, com navalha de vidro ou aço descartável. As secções serão 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. Serão realizados também os seguintes testes histoquímicos: PAS (ácido periódico-reagente de Schiff) (Jensen, 1962) para carboidratos, IKI para amido (Johansen, 1940); CoomassieBrilliant Blue 0,25% em ácido acético 7% para proteínas totais (Southworth, 1973), Vermelho de Rutênio, para ácidos pécticos (Jensen, 1962). A análise, interpretação, descrição e documentação dos resultados far-se-á a partir das lâminas permanentes e semi-permanentes e as fotomicrografias serão obtidas ao fotomicroscópio com câmera digital acoplada e projeção de escala micrométrica.

Para a análise em MEV, as amostras serão desidratadas em série de propanona, submetidas a ponto crítico e metalizadas com ouro. Serão analisadas principalmente as

estruturas do labelo, polinários, polínias e pólen. Também serão realizadas observações ao estereomicroscópio, conforme metodologia sugerida por Charlton *et al.* (1989).

Prevê-se um período de estudos na Universidade da Florida sob orientação do Professor PhD. William Mark Whitten com o objetivo de complementar as análises filogenéticas principalmente na obtenção de amostras de DNA de espécies extra-brasileiras.

4.3 ESTUDOS BIOGEOGRÁFICOS

A distribuição geográfica das espécies de *Zygostates* e *Centroglossa* será baseada na análise de exsicatas de todos os herbários nacionais e internacionais significativos para o grupo, complementadas com dados de materiais coletados em campo e a hipótese filogenética definida nos estudos sistemáticos e taxonômicos será utilizada para inferir padrões biogeográficos do grupo.

O levantamento das coordenadas será realizado através de dados do IBGE (2013) e do programa Google Earth, com base nas informações contidas nas etiquetas das exsicatas. Os mapas de distribuição geográfica, assim como as análises de riqueza, diversidade e complementaridade serão feitos através de ferramentas do programa DIVA-GIS versão 7.5 (Hijmans *et al.,* 2012). Serão feitas análises de riqueza (número total de espécies por quadrícula, levando em conta duas quadrículas vizinhas), diversidade (calculada através do índice de Shannon), com quadrículas de tamanho de um grau de latitude por um grau de longitude (1°x1°).

Para determinar os locais ideais para conservar o máximo da diversidade de espécies, um estudo baseado em espécies complementares será realizado usando o algoritmo descrito por Rebelo e Sigfried (1992) e Rebelo (1994). O objetivo é identificar as quadrículas com tamanho 1°x1°, que se complementam em termos de composição de espécies. A análise realizada pelo DIVA-GIS consiste em selecionar a quadrícula mais rica em número de espécies, e em seguida, localizar a segunda quadrícula mais rica em espécies ainda não representada na primeira interação.

As análises de vicariância para a identificação de barreiras entre os táxons serão realizadas através do *software* VIP – *Vicariance Inference Program* (Arias, 2010) e os eventos biogeográficos e áreas de distribuição ancestrais serão reconstruídos através do S-DIVA (*Statistical Dispersal-Vicariance Analysis*, Yu*et al*., 2010), incluído no *software* RASP (*Reconstruct Ancestral State in Phylogenies*, Yu*et al.*, 2012), além disso

a análise de tempo de divergência será feita através do programa BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*, Drummond *et al*., 2012).

O *software* VIP detecta potenciais barreiras dentro da distribuição de um grupo a partir de uma árvore filogenética, com inclusão de informação de distribuição geográfica em seus terminais. Utilizando-se de um critério de otimização, o algoritmo seleciona um conjunto de reconstruções distribucionais para as quais os casos de disjunção de ramos irmãos são maximizados. As distribuições disjuntas identificadas são plotadas em um mapa e as barreiras são delineadas graficamente. Ao identificar barreiras, o programa não faz distinção entre eventos de dispersão e vicariância, apenas identifica através da distribuição a provável barreira responsável pela disjunção (Arias *et al*., 2011).

O método baseado em parcimônia, denominado DIVA (*Dispersal-Vicariance-Analysis*; Ronquist, 2001), proposto por Ronquist (1997), é amplamente utilizado em estudos de biogeografia (Xiang e Soltis, 2001; Simpson *et al.*, 2004; Buerki *et al*., 2011). O algoritmo considera a topologia da árvore filogenética e a ocorrência geográfica dos táxons, atribuindo pesos diferentes para os eventos de dispersão e vicariância, buscando reconstruir o cenário mais parcimonioso possível dentro do contexto analisado, reconstruindo áreasancestrais e minimizando o número de eventos de dispersão e extinção necessários para seexplicar um dado padrão de distribuição (Ronquist, 1997; Davis *et al.*, 2002). Para isso, oprograma baseia-se na otimização de uma matriz tridimensional, que considera os estados dosramos descendentes em sua reconstrução para buscar o cenário mais parcimonioso dentro doconjunto de resultados. Será utilizada a variante S-DIVA, que agrega suporte estatístico ao método de reconstrução de distribuições ancestrais e incorpora novas atualizações ao programa DIVA 1.2, base do S-DIVA, além de apresentar uma interface gráfica mais moderna e didática (Yu *et al.*, 2010).

Apesar de o *software* DIVA ser mais comumente utilizado em reconstruções biogeográficas, optou-se pelo uso conjunto com o VIP porque, diferente das outras ferramentas de análises biogeográficas, este não necessita de qualquer delimitação prévia de áreas, que é uma crítica comum a métodos como o DIVA (Arias *et al.*, 2011). Outro viés evitado com o uso do VIP é que, diferentemente da maioria dos algoritmos, o programa não assume uma analogia táxon/área, portanto não pressupõe a existência de cladogramas de áreas ou de áreas endemismo, os quais são hipóteses prévias sobre a relação das áreas que, comumente, não possuem suporte teórico consistente e ainda não

apresentam uma padronização de métodos de delimitação eficiente (Axelius, 1991; Harold e Mooi, 1994; Hovenkamp, 2001; Arias *et al*., 2011). Com o intuito de minimizar os efeitos de hipóteses pré-estabelecidas sobre as áreas e buscar extrair da distribuição e filogenia do táxon informações menos enviesadas, o VIP utiliza-se de dados de ocorrência pontual, projetados em uma matriz de quadrículas de tamanhos iguais.

5. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Para a filogenia molecular, as sequências serão editadas e as fitas consenso obtidas utilizando-se o programa Staden Package (Staden *et al.*, 2003). O alinhamento múltiplo e a matriz das sequências serão editados a partir do programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) implementado no programa MEGA 5 (Tamura *et al*., 2011), com os parâmetros usuais, sendo as matrizes conferidas manualmente. Para avaliar a relação entre as espécies do gênero, serão utilizadas abordagens filogenéticas padrão: Máxima Parcimônia (MP), através do programa PAUP4b10 (Swofford, 2002), utilizando busca heurística com 2000 réplicas com adições aleatórias retendo 20 árvores por replicação, algoritmo TBR, seguida de uma análise de TBR para explorar todas as topologias obtidas na análise, estabelecendo-se um limite de 10000 árvores. Deste resultado de múltiplas árvores igualmente parcimoniosas será construída uma árvore de consenso estrito. Análises Bayesianas (BI) serão realizadas como o programa MrBayes Versão 3.1.2 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003).

Para a filogenia morfológica, a codificação dos caracteres morfológicos será feita segundo a abordagem de maioria (“majority approach”) ou codificação escalonada (“scaledcoding”) para os caracteres multiestado (Campbell e Frost, 1993). Após o levantamento dos dados, serão realizadas análises preliminares à aplicação dos métodos filogenéticos comparativos (MFC) propriamente ditos. Existem muitos MFC disponíveis para a análise de caracteres contínuos ou quantitativos, sendo o método dos contrastes filogenéticos independentes de Felsenstein (1985) reconhecido como o mais adequado e robusto na maioria dos casos (Diniz-Filho, 2000). Porém, para caracteres qualitativos ainda há muita discussão sobre quais procedimentos utilizar (Harvey e Nee, 1997), especialmente para caracteres multiestado. Desta forma, poderão ser utilizados testes como o de mudanças inferidas (Maddison, 1991 - com modificação), índice de retenção de Farris (1989), ou uma combinação de métodos (Harvey ePagel, 1991) de acordo com os dados levantados e com a análise preliminar dos mesmos.

Para a análise através do *software* S-DIVA, haverá a necessidade de delimitação de áreas de endemismo. Uma área de endemismo constitui uma unidade histórica de congruência distribucional de táxons monofiléticos (Harold e Mooi, 1994). As áreas de endemismo serão estabelecidas com base nas barreiras apontadas pela análise com o VIP. Também serão consideradas barreiras propostas por outros autores, como as divisões propostas para América do Sul e Central por Morrone (2014).

A análise de tempo de divergência será feita através do programa BEAST 1.8.1 (Drummond *et al* 2012), sendo a escala de tempo calibrada usando a idade do nó *Cattleya– Masdevallia*, de 22 milhões de anos, como estimado por Gustafsson *et al.*, (2010), como um ponto único de calibração.

A avaliação dos critérios de conservação será feita de acordo com IUCN (2001). A extensão da ocorrência (EOO) e a área de ocupação (AOO) serão estimadas usando o programa GeoCAT (Bachman *et al.*, 2011).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Arias J.S. 2010. *VIP: Vicariance Inference Program, version 18*. Disponível em:http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/vip.Acesso em:junho de 2014.

Arias J.S., Szumik C.A., Goloboff P.A. 2011. Spatial analysis of vicariance: a method for using direct geographical information in historical biogeography. *Cladistics* 27, 617-628.

Axelius B. 1991. Areas of distribution and areas of endemism. *Cladistics* 7, 197-199.

Bachman S., Moat J., Hill A.W., De La Torre J., Scott B. 2011. Supporting Red List Threat assessments with GeoCAT: geospatial conservation assessment tool. In: Smith, V.; Penev, L. (Eds) e-Infratructures for data publishing in biodiversity science. *Zookeys*, v.150, p. 117-126.

Barros F. de; Vinhos F.; Rodrigues V.T.; Barberena F.F.V.A.; Fraga C.N.; Pessoa E.M.; Forster W.; Menini Neto L.; Furtado S.G.; Nardy C.; Azevedo C.O.; Guimarães L.R.S. 2014. *Orchidaceae* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11348>. Acessoem: 01 Dez. 2014

Buerki S., Forest F. 2011. An evaluation of new parsimony-based versus parametric inference methods in biogeography: a case study using the globally distributed plant family Sapindaceae. *Journal of Biogeography* 38, 531-550.

Campbell J.A., Frost D.R. 1993. Anguid lizards of the genus Abronia: revisionary notes, descriptions of four new species, a phylogenetic analysis, and key. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, number 216. New York: American Museum of Natural History, 128p.

Charlton W.A., Macdonald A.D., Posluszny U., Wilkins C.P. 1989. Additions to the technique of epi-illumination light microscopy for the study of floral and vegetative apices. *Canadian Journal of Botany* 67, 1739-1743.

Chase M.W. 1988. Obligate twig epiphytes: a distinct subset of Neotropical orchidaceous epiphytes. *Selbyana* 10, 24–30.

Chase M.W., Palmer J.D. 1989. Chlroplast DNA systematics of Lilioid Monocots: resources, feasibility, and an example from the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 76(12), 1720- 1730.

Chase M.W., Hills H.G. 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40, 215-220.

Chase M.W., Cameron K.M., Barrett R.L., Freudenstein J.V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In *Orchid conservation*, ed. K. W. Dixon, S. P. Kell, R. L. Barrett, and P. J. Cribb. Borneo: Natural History Classification, Kota Kinabalu, Sabah.

Chase M.W. 2009. Subtribe Oncidiinae: Phylogenetics. *In* Pridgeon, A.M; Cribb, P.J.; Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. *Genera Orchidacearum.* Vol.5. Epidendroideae (Part Two). Oxford University Press, Oxford, pp. 212-220.

Chase, M.W., Toscano de Brito, A.L.V. 2009. *Zygostates*. In: A.M. Pridgeon; P.J.Cribb; M.W. Chase; F. Rasmussen. (Org.). Genera Orchidacearum: Epidendroideae (Part 2), 1 ed. New York: Oxford University Press Inc., vol. 5, pp. 391-394

Condamine F.L., Silva-Brandão K.L., Kergoat G.J., Sperling F.A.H. 2012. Biogeographic and diversification patterns of Neotropical Troidini butterflies (Papilionidae) support a museum model of diversity dynamics for Amazonia. *BMC Evolutionary Biology*, 12, 2–16.

Cribb P.J., Chase M.W. 2005. Epidendroideae. *In* Pridgeon, A.M; Cribb, P.J.; Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. *Genera Orchidacearum.* Vol. 4. Epidendroideae (Part One). Oxford University Press, Oxford, pp. 3.

Davis C.C., Bell C.D., Fritsch P.W., Mathews S. 2002. Phylogeny of *Acridocarpus-Brachylophon* (Malpighiaceae): implications for tertiary tropical floras and Afroasian biogeography. *Evolution; international journal of organic evolution* 56, 2395-2405.

Diniz-Filho J.A. 2000. *Métodos Filogenéticos Comparativos*. Ribeirão Preto: Holos.

Doyle J., Doyle J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19, 810–815.

Dressler, R.L. 1981. *Theorchids: natural history and classification.* Cambridge: Harvard University Press.

Dressler, R.L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge: Harvard University Press.

Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D., Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology And Evolution* 29, 1969-1973.

Farris J.S. 1989. The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5, 417–419.

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

Fidalgo O., Bononi V.L.R. 1989. *Técnica de coleta, preservação e herborização de material botânico*. Série Documentos: São Paulo. 62p.

Garay L.A. 1972. On the systematics of the monopodial orchids I. *Botanical Museum Leaflets* 23, 152.

Gustafsson A.L.S.; Verola C.F., Antonelli A. 2010. Reassessing the temporal evolution of orchids with new fossils and a Bayesian relaxed clock, with implications for the diversification of the rare South American genus Hoffmannseggela (Orchidaceae: Epidendroideae). *BMC Evolutionary Biology* 10, 177.

Harold A.S., Mooi R.D. 1994. Areas of endemism: Definition and recognition criteria. *Systematic Biology* 43, 261-266.

Harvey P.H., Nee S. 1997.The phylogenetic foundations of behavioural ecology. In: Krebs, J.R., Davies, N.B., *Behavioural Ecology: an evolutionary approach*. London: Blackwell, pp. 334-349.

Harvey P.H., Pagel M.D. 1991. *The comparative method in Evolutionary Biology*. New York: Oxford University Press.

Hijmans R.J., Guarino L., Bussink C., Mathur P., Cruz M., Barrentes I., Rojas E. DIVA-GIS: A geographic information system for the analysis of species distribution data. Versão 7.5. http://www.diva-gis.org. 2012.

Hovenkamp P. 1997 Vicariance events, not areas, should be used in biogeographical analysis. *Cladistics* 79, 67-79.

Hovenkamp P. 2001. A direct method for the analysis of vicariance patterns. *Cladistics* 2 65, 260-265.

IBGE. 2011. Índice de nomes Geográficos. Base cartográfica contínua do Brasil ao Milionésimo - BCIM. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Vol.1. biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20.../56282.pdf.

IUCN. 2001. – IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. Gland, Switzerland and Cambridge, IUCN, UK, 32p.

Jensen W.A. 1962. *Botanical microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company.

Johansen D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Company.

Maddison W.P. 1991. Squared-change parsimony reconstruction of ancestral states for continuous-valued on a phylogenetic tree. *Systematic Zoology* 40, 304-314.

McDowell E., Trump B.F. 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 100, 405-413.

Morrone, J.J. 2013. Cladistic biogeography of the Neotropical region: identifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. *Cladistic*,1-13.

Morrone J.J. 2014.Biogeographicalregionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa* 3782 (1), 1–110.

Neubig K.M., Whitten W.M., Williams N.H., Blanco M.A., EndaraL., Burleigh J.G., SilveraK., Cushman J.C., Chase M.W.2012. Generic recircumscriptions of Oncidiinae (Orchidaceae: Cymbidieae) based on maximum likelihood analysis of combined DNA datasets. *Botanical Journal of the Linnean Society* 168, 117-146.

O'Brien T.P., Feder N., McCully M.E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368-373.

Page, R.D.M. 2001. Nexus Data Editor. Disponível em <http:// taxonomy.zoology.gla.ac.uk/ rod/ NDE.html>. Acesso em: abril de 2011.

Pridgeon A.M.,Cribb P.J., Chase M.W., Rasmussen F.N. 1999. Genera Orchidacearum. Vol. 1. Oxford University Press, Oxford.

Rebelo A.G. 1994. Iterative selection procedures: Centers of endemism and optimal placement of reserves. *Strelitzia* 1, 231–257.

Rebelo A.G., Sigfried W.R. 1992. Where should nature reserves be located in the Cape Floristic Region, South Africa? Models for the spatial configuration of a reserve network aimed at maximizing the protection of diversity. *Conservation Biology* 6, 243–252.

Ronquist F. 1997. Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* 46, 195-203.

Ronquist F. 2001. *DIVA, version 1.2*. Computer program for MacOS and Win32. EvolutionaryBiology Centre, Uppsala University. Disponível em: http://www.ebc.uu.se/systzoo/research/diva/diva.html. Acesso em: 03 de novembro de 2014.

Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.

Royer, C.A. (2013). *Filogenia, riqueza, diversidade e endemismo de PhymatidiumLindley (Orchidaceae) e monografia do gênero para o estado do Paraná.* Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba

Sanmartín I., Ronquist F. 2004. Southern hemisphere biogeography inferred by eventbased models: plant versus animal patterns. *Systematic biology*, 53, 216-243.

Sereno, P. C. 2007. Logical basis for morphological characters in phylogenetics. *Cladistics* 23, 565-587.

Sigrist M.S., Carvalho C.J.B. 2009. Historical relationships among areas of endemism in the tropical South America using Brooks parsimony analysis (BPA). *Biota Neotropica* 9, 79–91.

Simpson B., Tate J., Weeks A. 2004. The biogeography of *Hoffmannseggia*(Leguminosae, Caesalpinioideae, Caesalpinieae): a tale of many travels. *Journal of Biogeography* 32, 15–27.

Southworth D. 1973. Cytochemical reactivity of pollen walls. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 21, 73.

Staden R., Judge D.P., Bonfield J.K. 2003. Analysing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. In: Krawetz SA, Womble DD (eds.), *Introduction to Bioinformatics: A theoretical and practical approach*. Totawa: Human Press.

Swofford D.L. 2002. PAUP: Phylogenetic analysis using parcimony and others methods, version 4.0b10. Sunderland: Sinauer Associaties, Inc. Sunderland, Mass. http://paup.csit.fsu.edu/downl.html.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.

Thiele, K. 1993. The holy grail of the perfect character: the cladistic treatment of morphometric data. *Cladistics* 9, 275-304.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.

Toscano de Brito A.L.V. 2001. Systematic review of the *Ornithocephalus*group (Oncidiinae:Orchidaceae) with comments on *Hofmeisterella. Lindleyana* 16, 157-217.

Toscano de Brito, A.L.V. 2015 (no prelo). A taxonomic revision of the genus *Zygostates*Lindl. (Orchidaceae: Oncidiinae). *Selbyana* 31(3).

Williams N.H., Chase M.W., Fulcher T., Whitten W.M. 2001. Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA sequence regions: expanded

circumscriptions of *Cyrtochilum*, *Erycina*, *Otoglossum*, and *Trichocentrum* and a new genus (Orchidaceae). *Lindleyana* 16, 113-139.

Williams N.H., Whitten W.M., Dressler R.L. 2005. Molecular systematics of *Telipogon*(Orchidaceae: Oncidiinae) and ITS allies: nuclear and plastid DNA sequence data. *Lankesteriana* 5, 163-184.

Xiang Q., Soltis D. 2001. Dispersal-vicariance analyses of intercontinental disjuncts: historical biogeographical implications for angiosperms in the Northern Hemisphere. *International Journal of Plant Sciences* 162, S29-S39.

Yu Y., Harris A.J., He X.J. 2010. S-DIVA (statistical dispersal-vicariance analysis): a tool for inferring biogeographic histories. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 848-850.

Yu Y., Harris A.J., He, X.J. 2012. RASP *(Reconstruct Ancestral State in Phylogenies) 2.1b.* Disponível em: http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/RASP, Acesso em: 03 denovembro de 2014.