

Leonardo Ramos Seixas Guimarães

**Filogenia e citotaxonomia do “clado
Stenorrhynchos” (Spiranthinae, Cranichideae,
Orchidoideae, Orchidaceae)**

Projeto de tese de doutorado

Orientador: Dr. Fábio de Barros

São Paulo

2010

RESUMO

A delimitação genérica da subtribo Spiranthinae tem sido objeto de controvérsias desde os primeiros sistemas de classificação para Orchidaceae, porém só recentemente trabalhos baseados em relações filogenéticas têm esclarecido o posicionamento e os limites dos gêneros e grupamentos dentro da subtribo, em especial o trabalho de Salazar *et al.* (2003). Para as relações entre os gêneros, os dados das sequências nucleotídicas desse estudo permitiram identificar quatro clados principais em Spiranthinae: “clado *Stenorrhynchos*”, “aliança *Pelexia*”, o par *Eurystyles* e *Lankesterella*, e “clado *Spiranthes*”. A citotaxonomia, por sua vez, é o estudo das características estruturais e numéricas dos cromossomos e seu uso taxonômico. Dos parâmetros citotaxonômicos, o número cromossômico é o mais amplamente conhecido. Neste projeto serão realizadas análises filogenéticas moleculares para explicar as relações filogenéticas internas do “clado *Stenorrhynchos*” e esclarecer os limites dos gêneros nele contidos. Além disso, serão analisados dados citológicos para conhecer números cromossômicos e descrever ideogramas de espécies do mesmo clado. Para as análises filogenéticas moleculares, serão utilizadas sequências de ITS (DNA nuclear), *matK-trnK* e *trnL-trnF* (DNA plastidial), as quais serão analisadas pelos métodos de máxima parcimônia, verossimilhança e Bayesiano. Serão obtidos cladogramas para cada marcador em separado, bem como árvores de consenso. Para as análises citotaxonômicas, serão coletadas pontas de raiz (região em que se encontra o meristema radicular), que sofrerão pré-tratamento com solução de 8-hidroxiquinoleína 0,002 M (8-Hq), sendo posteriormente esmagadas sobre lâmina, coradas com Giemsa e observadas sobre microscópio para contagem cromossômica. Quando possível serão confeccionados ideogramas. É digno de ressalva que o estudo filogenético do grupo será uma importante contribuição para estabelecer uma base sólida para revisões taxonômicas posteriores dos gêneros analisados, e que estudos cromossômicos praticamente inexistem nos táxons do referido clado.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A família Orchidaceae

A família Orchidaceae, pertencente à ordem Asparagales (Stevens 2001), é constituída por aproximadamente 25.000 espécies (Dressler 2005) distribuídas em 850 gêneros (Atwood 1986, Pridgeon *et al.* 1999, Chase *et al.* 2003). Tem distribuição cosmopolita, com exceção da região Antártica, mas é mais abundante e diversificada em florestas tropicais e subtropicais úmidas. É caracterizada por incluir plantas herbáceas perenes, terrícolas ou, mais comumente, epífitas, raízes com velame, flores trímeras, ovário ínfero, 1-2(3) estames férteis, filete concrescido com o estilete formando um ginostêmio (coluna), pólen aglutinado em polínias, e fruto cápsula com grande número de sementes minúsculas.

Quanto à classificação, os sistemas mais recentes para Orchidaceae são os de Dressler (1993) e Pridgeon *et al.* (1999, 2001, 2003, 2005, 2009), este último baseado também em dados moleculares, propondo a divisão da família em cinco subfamílias: Cypripedioideae, Apostasioideae, Vanilloideae, Orchidoideae e Epidendroideae.

1.2. A subtribo Spiranthinae

A subtribo Spiranthinae compreende cerca de 40 gêneros, quase exclusivamente restritos à região Neotropical, à exceção do gênero cosmopolita *Spiranthes* (Salazar 2003). Pode ser reconhecida pela união das margens do labelo com a base da coluna, formando um nectário profundo, e pelas polínias macias e granulosas (Dressler 1993).

O primeiro sistema completo para as Spiranthinae foi esboçado na classificação de Orchidaceae publicada por Schlechter (1926), apresentada na forma de chaves dicotômicas. Nessa obra a subtribo Spiranthinae foi caracterizada pela antera mais ou menos ereta, raízes fasciculadas, folhas basais, e margens do labelo aderentes aos lados da coluna.

Duas revisões genéricas de Spiranthinae foram publicadas independentemente no começo da década de 80 do século 20, por Garay (1980) e Balogh (1982); estas diferem no número de gêneros aceitos e na atribuição das espécies para esses gêneros. Garay (1980) reconheceu 44 gêneros em Spiranthinae, incluindo *Manniella*,

posicionado por Schlechter (1926) em uma subtribo própria, e *Nothostele* e *Pseudocranichis*, transferidos subsequentemente para Cranichidinae e Prescottiinae, respectivamente (Dressler 1983, Szlachetko 1995). Garay (1980) não reconheceu grupos infra-genéricos na subtribo. Por outro lado, Balogh (1982) aceitou apenas 17 gêneros em cinco alianças genéricas, e considerou cinco deles como isolados e não atribuíveis a nenhuma dessas alianças.

Szlachetko (1995) distribui Spiranthinae em três subtribos baseadas nas diferenças da estrutura do rostelo e viscido, referindo esses três grupos como “subclados”, porém não forneceu nenhuma indicação clara sobre quais características distinguem cada um deles. Esse autor apenas alegou que as diferenças entre essas subtribos estreitamente delimitadas são, por exemplo, maiores do que aquelas entre Spiranthinae e Prescottiinae.

1.3. Estudos filogenéticos em Spiranthinae e o “clado *Stenorrhynchos*”

Das classificações citadas anteriormente, nenhuma delas foi baseada em hipóteses explícitas de relações filogenéticas de subtribos ou gêneros. Dressler (1993) apresentou um diagrama filogenético da tribo Cranichideae, porém não incluiu as subtribos Manniellinae e Pachyplectroninae, e encontrou poucas características suportando as relações sugeridas. Outros estudos visando explorar as relações filogenéticas dos gêneros ou grupos de gêneros, como, por exemplo, a “aliança *Pelexia*” (Burns-Balogh & Robinson 1983) ou Prescottiinae (Vargas 1997), contaram com um pequeno número de caracteres provenientes da morfologia floral, que é homogênea e relativamente simples no grupo.

A primeira avaliação filogenética dos limites dos gêneros e subtribos de Spiranthinae, baseada em dados de sequências nucleotídicas de cinco regiões do núcleo e do plastídio do DNA, foi publicada por Salazar *et al.* (2003) e mostrou alguns padrões definidos. Os dados indicam que *Galeottiella* não pertence às Spiranthinae, sendo grupo-irmão de um clado bem-suportado, no qual a subtribo Manniellinae é irmã de um grupo monofilético formado por Prescottiinae, Cranichidinae e Spiranthinae. Excluindo *Galeottiella*, Spiranthinae (*sensu* Dressler 1993) é monofilética e bem-suportada por alta porcentagem de *bootstrap*. Os limites entre Cranichidinae e Prescottiinae não são claramente resolvidos, e poderá haver alguns rearranjos taxonômicos nessas subtribos,

mas tais mudanças provavelmente não afetarão o *status* de Spiranthinae (Salazar *et al.* 2003).

Para as relações entre os gêneros, os dados das sequências nucleotídicas de Salazar *et al.* (2003) permitiram identificar quatro clados principais em Spiranthinae:

- a) *Stenorrhynchos* s.s. e outros gêneros tradicionalmente considerados estreitamente relacionados a ele ou combinados com ele, que são, *Eltroplectris*, *Mesadenella*, *Pteroglossa* e *Sacoila*;
- b) os gêneros previamente atribuídos à “aliança *Pelexia*” (Burns-Balogh & Robinson 1983) e à subtribo Cyclopogoninae (Szlachetko 1995), incluindo *Cyclopogon* s.l., *Pelexia*, *Sarcoglottis* e *Veyretia*, mais *Odontorrhynchus* e *Coccineorchis*;
- c) o par *Eurystyles* e *Lankesterella*;
- d) *Spiranthes* e outros gêneros na maior parte ou exclusivamente diversificados no limite norte dos Neotrópicos, como, por exemplo, *Aulosepalum*, *Beloglottis*, *Deiregyne*, *Dichromanthus*, *Funkiella*, *Mesadenus*, *Microthelys* e *Svenkoeltzia*.

Embora existam, ainda, alguns gêneros ausentes nas análises moleculares, principalmente vários gêneros monoespecíficos com distribuição geográfica restrita, esses quatro clados são estáveis e bem suportados por altas porcentagens de *bootstrap* (Salazar *et al.* 2003).

Recentemente foi publicada uma análise filogenética molecular de Spiranthinae, baseada em sequências de DNA ribossomal nuclear ITS (nrITS, Górniak *et al.* 2006), que sustenta a não monofilia das subtribos Spiranthinae e Stenorrhynchidinae (*sensu* Szlachetko 1995), o que é congruente com o trabalho de Salazar *et al.* (2003).

1.4. Citotaxonomia

A citotaxonomia é o estudo das características estruturais e numéricas dos cromossomos (Stace 1989). Dos parâmetros citotaxonômicos, o número cromossômico é o mais amplamente conhecido para um grande número de táxons e, portanto, o mais utilizado como subsídio a estudos taxonômicos e evolutivos.

Para um melhor conhecimento das espécies vegetais e para subsidiar a análise do posicionamento taxonômico destas nos respectivos táxons, estudos biosistemáticos envolvendo observações de campo, juntamente com análises laboratoriais com diferentes enfoques, como, por exemplo, de compostos químicos, estruturas anatômicas, palinológicas ou de cromossomos das espécies, são essenciais e importantes (Stace 1989). A variação no número cromossômico é muito útil na verificação da integridade de uma espécie ou no reconhecimento de espécies distintas a partir de um grupo com grande variabilidade morfológica, fisiológica ou de distribuição geográfica (Pierozzi & Mendaçolli 1997, Bortoleti *et al.* 2002).

Apesar de investigações citogenéticas sobre a família Orchidaceae já estarem sendo realizadas desde a muitos anos, menos de 1% de suas espécies são conhecidas quanto ao número cromossômico, com informações em número ainda menor para seus ideogramas. E, ainda assim, os estudos disponíveis contemplam, de maneira preferencial, apenas os gêneros economicamente importantes.

2. OBJETIVOS

- Explicar as relações filogenéticas no “clado *Stenorrhynchos*”, através de análises moleculares;
- Esclarecer os limites genéricos entre *Eltroplectris*, *Mesadenella*, *Pteroglossa*, *Sacoila*, *Lyroglossa*, *Skeptrostachys*, *Cotylolabium* e *Thelyschista*;
- Analisar a evolução dos caracteres morfológicos no clado, com base na filogenia molecular produzida;
- Conhecer números cromossômicos e descrever ideogramas de espécies selecionadas de Spiranthinae;
- Analisar os números cromossômicos frente às árvores filogenéticas obtidas.

3. JUSTIFICATIVAS

A delimitação genérica de Spiranthinae tem sido objeto de controvérsias desde o primeiro sistema classificação para tribo Spiranthinae (Schlechter 1926) e revisões posteriores (Garay 1980, Balogh 1982). Grande número de artigos taxonômicos posteriores às revisões de Garay (1980) e Balogh (1982) propuseram novos gêneros

(Burns-Balogh *et al.* 1985, Burns-Balogh 1989, Szlachetko 1991a, b, Szlachetko & Tamayo 1996, Szlachetko *et al.* 2000). Entretanto estes trabalhos estão baseados completamente em uma abordagem estritamente intuitiva, de poucas características da morfologia floral e carecem de uma hipótese filogenética explícita.

Nas recentes propostas filogenéticas para a tribo Spiranthinae (Salazar *et al.* 2003, Górnaiak *et al.* 2006), poucos representantes da flora brasileira foram amostrados, havendo inclusive gêneros inteiros ausentes nas análises moleculares, principalmente vários gêneros monoespecíficos com distribuição geográfica restrita como, por exemplo, *Cotylolabium* Garay e *Thelyschista* Garay, ambos endêmicos do Brasil (Barros *et al.* 2010). A inserção de representantes dos gêneros *Cotylolabium* Garay, *Lyroglossa* Schltr., *Pteroglossa* Schltr., *Skeptrostachys* Garay e *Thelyschista* Garay, ainda não amostrados nas propostas filogenéticas anteriormente citadas, e ampliação do número de representantes dos gêneros *Eltroplectris* Raf., *Mesadenella* Pabst & Garay e *Sacoila* Raf. (pertencentes ao “clado *Stenorrhynchos*”) será uma importante contribuição para estabelecer de maneira mais precisa os limites genéricos, fornecendo uma base sólida para revisões taxonômicas futuras, além de outros trabalhos, como por exemplo, estudos sobre a evolução dos caracteres florais.

O estudo filogenético do grupo será uma importante contribuição para estabelecer uma base sólida para revisões taxonômicas posteriores dos gêneros analisados, além de outros trabalhos, como por exemplo, estudos sobre a evolução dos caracteres florais (Salazar, com. pess.).

Existem poucos trabalhos sobre a citotaxonomia da subtribo Spiranthinae, e estes se concentram especialmente no gênero *Spiranthes* (Tanaka & Kamemoto 1984, Vij & Vohra 1974, Sheviak 1982, Martínez 1985). Para os gêneros do “clado *Stenorrhynchos*”, são conhecidos os números cromossômicos para poucas espécies de *Eltroplectris*, *Mesadenella*, *Pteroglossa* e *Sacoila* (Martínez 1981, 1985).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Trabalho de campo

Serão realizadas coletas no território brasileiro das espécies dos gêneros *Cotylolabium* Garay, *Eltroplectris* Raf., *Lyroglossa* Schltr., *Mesadenella* Pabst & Garay, *Pteroglossa* Schltr., *Sacoila* Raf., *Skeptrostachys* Garay e *Thelyschista* Garay,

especialmente nas regiões Sudeste e Sul e na província de Misiones, Argentina (Tabela 1). As exsicatas serão depositadas preferencialmente no herbário do Instituto de Botânica (SP), e as duplicatas, quando houver, serão distribuídas a outros herbários do Brasil e do exterior. Serão também utilizadas plantas vivas da coleção do Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado (Instituto de Botânica).

Tabela 1. Espécies do “clado *Stenorrhynchos*” de *Spiranthinae* e sua distribuição geográfica no Brasil e Argentina.

Espécie	Distribuição geográfica (segundo Pabst & Dungs 1975, Barros <i>et al.</i> 2010)
<i>Buchtienia boliviensis</i> Schltr.	MT
<i>Cotylolabium lutzii</i> (Pabst) Garay	MG, ES
<i>Eltroplectris assumpcaoana</i> Campacci & Kautsky	ES
<i>Eltroplectris calcarata</i> (Sw.) Garay & H.R. Sweet	BA, ES, RJ
<i>Eltroplectris cogniauxiana</i> (Schltr.) Pabst	MT, GO, DF, MG
<i>Eltroplectris janeirensis</i> (Porto & Brade) Pabst	RJ, MG
<i>Eltroplectris kuhlmanniana</i> (Hoehne) Szlach. & Rutk.	ES
<i>Eltroplectris longicornu</i> (Cogn.) Pabst	MG, MT, GO
<i>Eltroplectris macrophylla</i> (Schltr.) Pabst	MG
<i>Eltroplectris misera</i> (Kraenzl.) Szlach.	MT
<i>Eltroplectris schlechteriana</i> (Porto & Brade) Pabst	SP, PR, Argentina (Misiones)
<i>Eltroplectris triloba</i> (Lindl.) Pabst	BA, RJ, SP, Argentina (Misiones)
<i>Lyroglossa grisebachii</i> (Cogn.) Schltr.	GO, DF, MG, RJ, SP, PR
<i>Mesadenella atroviridis</i> (Barb. Rodr.) Garay	MG, SP, RJ, SC
<i>Mesadenella cuspidata</i> (Lindl.) Garay	MT, GO, DF, MG, SP, RJ, PR, SC, RS, Argentina
<i>Mesadenella meeae</i> R.J.V. Alves	MG
<i>Mesadenella tonduzii</i> (Schltr.) Pabst & Garay	PA
<i>Mesadenus glaziovii</i> (Cogn.) Schltr.	RJ, MG, BA
<i>Mesadenus rhombiglossus</i> (Pabst) Garay	MG
<i>Pteroglossa euphlebica</i> (Rchb. f.) Garay	RJ
<i>Pteroglossa glazioviana</i> (Cogn.) Garay	PA, ES, MG, RJ, SP, PR
<i>Pteroglossa hilariana</i> (Cogn.) Garay	GO, DF, SP
<i>Pteroglossa lurida</i> (M.N. Correa) Garay	SC, Argentina (Chaco, Salta)
<i>Pteroglossa luteola</i> Garay	Argentina (Corrientes)
<i>Pteroglossa macrantha</i> (Rchb. f.) Schltr.	SP, MG, GO, DF, MT
<i>Pteroglossa regia</i> (Kraenzl.) Schltr.	Argentina (Posadas, Loreto, Misiones)
<i>Pteroglossa roseoalba</i> (Rchb. f.) Salazar & M.W. Chase	MG, RJ
<i>Pteroglossa travassosii</i> (Rolfe) Salazar & M.W. Chase	Argentina (Misiones)
<i>Sacoila duseniana</i> (Kraenzl.) Garay	PR, SP
<i>Sacoila foliosa</i> (Schltr.) Garay	RJ
<i>Sacoila hassleri</i> (Cogn.) Garay	BA, MG, RJ, SP, PR
<i>Sacoila pedicellata</i> (Cogn.) Garay	MT, GO, DF, MG, PR
<i>Skeptrostachys arechavaletanii</i> (Barb. Rodr.) Garay	SP, PR, SC, RS, Argentina
<i>Skeptrostachys balanophorostachya</i> (Rchb. f. & Warm.) Garay	MT, MG, RJ, SP, PR, SC, RS, Argentina (Chaco)
<i>Skeptrostachys congestiflora</i> (Cogn.) Garay	MG, BA, RS
<i>Skeptrostachys disoides</i> (Kraenzl.) Garay	MG, PR, Argentina (Misiones)

<i>Skeptrostachys gigantea</i> (Cogn.) Garay	TO, GO, DF, MG, SP, Argentina (Misiones)
<i>Skeptrostachys latipetala</i> (Cogn.) Garay	BA, MG
<i>Skeptrostachys montevidensis</i> (Barb. Rodr.) Garay	SP, PR, Uruguai
<i>Skeptrostachys paraguayensis</i> (Rchb. f.) Garay	MG, SP, PR, SC, RS, Argentina, Paraguai
<i>Skeptrostachys paranahybae</i> (Kraenzl.) Garay	MG, PR
<i>Skeptrostachys rupestris</i> (Lindl.) Garay	SP, PR, RS, Uruguai
<i>Skeptrostachys stenorrhynchoides</i> Szlach.	MG
<i>Thelyschista ghillanyi</i> (Pabst) Garay	BA, GO

4.2. Estudos de filogenia molecular

Ainda em campo, amostras de tecido foliar serão cortadas em pequenos quadrados e acondicionadas em potes plásticos contendo sílica gel em *pellets* com indicador de umidade (Chase & Hills 1991). A extração, amplificação e sequenciamento do DNA, bem como a análise dos dados, serão realizados em parceria com o Dr. Geraldo A. Salazar do Departamento de Botânica da Universidade Nacional Autónoma do México.

O DNA será extraído das amostras de tecido foliar seco em sílica utilizando-se o protocolo de Doyle & Doyle (1987). Para todas as extrações (de acordo com a concentração de cada amostra) serão realizadas as devidas diluições em tampão TE, que serão estocadas em freezer a -20 °C. As regiões-alvo selecionadas serão ampliadas através de reações em termociclador (*Polimerase Chain Reaction* – PCR), com a utilização dos iniciadores adequados a cada caso. A princípio serão utilizadas as sequências de ITS (DNA nuclear), *matK-trnK* e *trnL-trnF* (DNA plastidial). O DNA amplificado será purificado e as amostras serão analisadas em um sequenciador.

As sequências utilizadas por Salazar *et al.* (2003) na reclassificação filogenética de *Spiranthinae* estão disponíveis no banco de dados Genbank e serão utilizadas visando reconstrução da filogenia proposta por estes autores sendo inseridas na análise as sequências de DNA das espécies brasileiras da citada subtribo não estudadas previamente. As sequências serão alinhadas usando os softwares Clustal_X versão 1.83 (Thompson *et al.* 1997). A partir das sequências alinhadas, as análises filogenéticas serão realizadas utilizando-se o programa PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002), e os critérios de máxima parcimônia (Fitch 1971) e verossimilhança. O programa MrBayes 3 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) será utilizado para as análises Bayesianas. Os dados serão analisados independentemente e também de maneira combinada, e o suporte estatístico dos clados será avaliado utilizando *bootstrap*. Serão considerados clados bem suportados os que apresentarem valores de *bootstrap* maiores que 80%, medianamente

suportados os que apresentarem valores entre 70% e 80%, e pouco suportados os que apresentarem valores inferiores a 70%. Também serão calculados os índices de retenção (RI) e de consistência (CI) para cada árvore.

4.3. Citotaxonomia

Serão utilizados meristemas radiculares das espécies de *Spiranthinae* coletadas em campo e mantidas sob cultivo na coleção viva do Núcleo de Pesquisa Orquidário do Estado do Instituto de Botânica.

Pontas de raiz com aproximadamente 1 cm de comprimento (região em que se encontra o meristema radicular), serão coletadas e pré-tratadas com solução de 8-hidroxiquinoleína 0,002 M (8-Hq) por aproximadamente 5 horas, à temperatura de 14-15 °C. Posteriormente, serão fixadas em álcool:ácido acético (3:1) por 24 horas, em temperatura ambiente. Depois de fixadas, as raízes serão guardadas em álcool 70% e freezer a -15 °C até o momento de confecção das lâminas. As lâminas com bom espalhamento e coloração serão fotomicrografadas em microscópio óptico.

Para a confecção das lâminas, as raízes armazenadas serão lavadas com água destilada e hidrolisadas com solução de HCl 5 N, o meristema radicular será fragmentado sobre uma lâmina, com adição de uma gota de ácido acético 45%. Será adicionada uma lamínula e o material será esmagado. Para a retirada da lamínula será utilizado nitrogênio líquido.

Para a coloração convencional de Giemsa (Guerra 1983), as raízes armazenadas serão lavadas com água destilada e hidrolisadas em HCl 5N por 25 minutos; após uma nova lavagem, o meristema será fragmentado sobre lâmina, com adição de uma gota de ácido acético 45%. Será adicionada uma lamínula e o material será esmagado. Nitrogênio líquido será utilizado para a retirada da lamínula. As lâminas serão mergulhadas em solução de Giemsa 2% por aproximadamente 20 minutos, após o que serão lavadas em água corrente, secas e montadas com nova lamínula, usando resina Entellan.

5. CRONOGRAMA

As atividades estão previstas para serem desenvolvidas num prazo de 36 meses, de acordo com o cronograma a seguir:

Semestres						
Atividades	Semestre 1	Semestre 2	Semestre 3	Semestre 4	Semestre 5	Semestre 6
Levantamento bibliográfico						
Viagens de coleta						
Análises filogenéticas						
Citotaxonomia						
Disciplinas						
Aula de qualificação						
Organização dos dados, redação e editoração da tese						
Entrega da tese						
Defesa da tese						

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atwood, J.T.** 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9: 171-186.
- Balogh, P.** 1982. Generic redefinition in subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 69: 1119-1132.
- Barros, F., Vinhos, F., Rodrigues, V.T., Barberena, F.F.V.A. & Fraga, C.N.** 2010. Orchidaceae. *In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.* <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000179>.
- Bortoleti, K.C.A., Benko-Iseppon, C.A.M. & Gitaí, J.** 2002. Variabilidade citogenética intra e interpopulacional em *Genipa americana* L. detectada com os Fluorocromos CMA e DAPI. *In: Anais do 53º Congresso Nacional de Botânica.* Recife, PE.

- Burns-Balogh, P.** 1989. *Svenkoeltzia* Burns-Balogh, eine neue Gattung aus Mexico. Die Orchidee 40: 11-16.
- Burns-Balogh, P. & Robinson, H.** 1983. Evolution and phylogeny of the *Pelexia* alliance (Orchidaceae: Spiranthoideae: Spiranthinae). Systematic Botany 8: 263-268.
- Burns-Balogh, P., Robinson, H. & Foster, M.S.** 1985. The capitate-flowered epiphytic Spiranthinae (Orchidaceae) and a new genus from Paraguay. Brittonia 37: 154-162.
- Chase, M.W. & Hills, H.H.** 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.S. & Freudenstein, J.V.** 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: K.W. Dixon, S.P. Kell, R.L. Barrett & P.J. Cribb (eds.). Orchid Conservation. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, pp. 69-89.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.
- Dressler, R.L.** 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland.
- Dressler, R.L.** 2005. How many orchid species? Selbyana 26: 155-158.
- Fitch, W.M.** 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. Systematic Zoology 20: 406-416.
- Garay, L.A.** 1980. A generic revision of the Spiranthinae. Botanical Museum Leaflets. 28: 278-425.
- Górniak, M., Mytnik-Ejsmont, J., Rutkowski, P., Tukallo, P., Minasiewicz & Szlachetko, D.L.** 2006. Phylogenetic relationships within the subtribe Spiranthinae *s.l.* (Orchidaceae) inferred from the nuclear ITS region. Biodiversity Research and Conservation. 1-2: 18-24.
- Guerra, M.** 1983. O uso de Giemsa na citogenética vegetal – Comparação entre a coloração simples e o bandeamento. Ciência e Cultura 35: 190-193.
- Martínez, A.J.** 1981. Notas citotaxonómicas sobre el género *Cyclopogon* Presl. Parodiana 1: 139-148.
- Martínez, A.J.** 1985. The chromosomes of orchids VIII. Spiranthinae and Cranichidinae. Kew Bulletin 40: 139-147.

- Pabst, G.F.J. & Dungs, F.** 1975. *Orchidaceae Brasilienses*, v. 1. Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Pierozzi, N.I. & Mendaçolli, S.L.J.** 1997. Karyotype and C-Band analysis in two species of *Genipa* L. (Rubiaceae, Gardenieae tribe). *Cytologia* 62: 81-90.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 1999. *Genera Orchidacearum*, v. 1: General Introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae. Oxford University Press, New York.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 2001. *Genera Orchidacearum*, v. 2: Orchidoideae (part 1). Oxford University Press, New York.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 2003. *Genera Orchidacearum*, v. 3: Orchidoideae (part 2), Vanilloideae. Oxford University Press, New York.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 2005. *Genera Orchidacearum*, v. 4: Epidendroideae (part one). Oxford University Press, New York.
- Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. & Rasmussen, F.N.** (eds.). 2009. *Genera Orchidacearum*, v. 5: Epidendroideae (part two). Oxford University Press, New York.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P.** 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Salazar, G.A.** 2003. Subtribe *Spiranthinae*. In: A.M. Pridgeon, P.J. Cribb, M.W. Chase & F.N. Rasmussen (eds.). *Genera Orchidacearum*, v. 3: Orchidoideae (part 2), Vanilloideae. Oxford University Press, New York, pp. 164-168.
- Salazar, G.A., Chase, M.W., Soto Arenas, M.A. & Ingrouille, M.** 2003. Phylogenetics of *Cranichideae* with emphasis on *Spiranthinae* (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear DNA sequences. *American Journal of Botany* 90: 777-795.
- Schlechter, R.** 1926. Das System der Orchidaceen. *Notizblatt des Botanischen Gartens und Museums zu Berlin-Dahlem* 9: 563-591.
- Sheviak, C.J.** 1982. Biosystematic study of the *Spiranthes cernua* complex. Bulletin of the New York State Museum No. 48. The State Education Department. Albany, New York.
- Stace, C.A.** 1989. *Plant Taxonomy and Biosystematics*. 2nd ed. New York, Cambridge University Press.

- Stevens, P.F.** 2001 [2008]. Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb> (acesso em 22.04.2010).
- Swofford, D.L.** 2002. PAUP*, Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.
- Szlachetko, D.L.** 1991a. *Oestlundorchis* (Orchidaceae, Spiranthinae), a new orchid genus from Mesoamerica. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 36: 23-31.
- Szlachetko, D.L.** 1991b. *Burnsbaloghia*, a new Mexican genus of the subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 26: 397-402.
- Szlachetko, D.L.** 1995. *Systema Orchidaliu*m. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* Supplement 3: 1-152.
- Szlachetko, D.L. & Tamayo, R.G.** 1996. *Ochyrella* (Orchidaceae, Stenorrhynchidinae), a new genus from South America. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 41: 697-700.
- Szlachetko, D.L., Tamayo, R.G. & Rutkowski, P.** 2000. *Zhukowskia*, a new orchid genus from Mesoamerica. *Adansonia* 22: 235-238.
- Tanaka, R. & Kamemoto, H.** 1984. Chromosomes in orchids: counting and numbers. *In*: J. Arditti (ed.). *Orchid biology: reviews and perspectives III*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G.** 1997. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Vargas, C.A.** 1997. Phylogenetic analysis of Cranichideae and Prescottiinae (Orchidaceae), with some taxonomic changes in Prescottiinae. M.Sc. Thesis. University of Missouri, St. Louis.
- Vij, S.P. & Vohra, N.** 1974. Cytomorphological studies in the genus *Spiranthes* Rich. *Cytologia* 39: 139-143.