

Revisão taxonômica e filogenia do gênero *Promenaea* (Orchidaceae)

Introdução

A família Orchidaceae é pantropical e, provalvemente, a segunda maior dentre as Angiospermae. Pertence à ordem Asparagales e o número de espécies estimado é de 24.500-24.900, integrando ca. 810 gêneros (Chase *et al.* 2003; Dressler 2005). A maior parte desta riqueza encontra-se em áreas neotropicais, especialmente as montanhosas (Dressler 1981, 1993). Nesse cenário, o Brasil é o terceiro país com maior número de espécies de Orchidaceae, depois de Colômbia e Equador, sendo o leste do Brasil a segunda região do mundo mais rica em espécies, pois os Andes são, reconhecidamente, a região com maior riqueza do grupo (Dressler 1993; Pridgeon 1995). Para o território brasileiro, Pabst & Dungs (1975, 1977) assinalaram ca. 191 gêneros e 2.356 espécies, porém este número foi recentemente retificado para 2.650 por Giulietti *et al.* (2009), mostrando ser crescente em virtude de novas espécies descritas e de novos registros de ocorrência para o país. A família destaca-se também pelo elevado número de endemismos e alta riqueza absoluta na Floresta Atlântica, com 791 e 1.257 táxons, respectivamente (Stehmann *et al.* 2009).

Atualmente, Orchidaceae é subdividida em cinco subfamílias: Apostasioideae, Vanilloideae, Cyripedioideae, Orchidoideae e Epidendroideae, que diferem por inúmeras características morfológicas vegetativas e florais, com destaque para o número de anteras férteis e a presença ou ausência de políneas típicas (Pridgeon *et al.* 1999; Chase *et al.* 2003; Singer *et al.* 2008). Epidendroideae é a subfamília mais numerosa, correspondendo a aproximadamente 80% do total de espécies de Orchidaceae, com cerca de 525 gêneros e 19.785 espécies (Chase *et al.* 2003; Pridgeon *et al.* 2005). A subfamília abrange 13 tribos, das quais Cymbidieae Pfitzer é a segunda mais representativa, com mais de 3.000 espécies, distribuídas em 10 subtribos (Chase *et al.* 2003).

A subtribo Zygopetalinae Schlechter, pertencente à Cymbidieae, compreende 418 espécies, restritas à América Tropical e distribuídas em 32 gêneros, dentre os quais, do ponto de vista ornamental e de conservação, pode-se destacar o gênero *Promenaea* Lindl. (Dressler 1993; Chase *et al.* 2003; Barros *et al.* 2009). Descrito por Lindley (1843), este gênero teve duas revisões, porém realizadas há mais de 50 anos – uma de autoria de Schlechter (1921) e outra de

Hoehne (1953), que trataram, respectivamente, de 14 e 15 espécies. Recentemente, Pabst & Dungs (1977) assinalaram 15 espécies para o gênero, distribuídas em três agrupamentos: “aliança *Promenaea rolissoni*”, caracterizada pela calosidade do disco do labelo estendendo-se sobre os lóbulos laterais, com três espécies; “aliança *Promenaea xanthina*”, caracterizada pela calosidade do disco do labelo que não atinge os lóbulos laterais e pelas flores amarelas, e com dez espécies; e “aliança *Promenaea stapelioides*”, reconhecida pelas flores marrom-arroxeadas e representado somente por duas espécies. Chase *et al.* (2003) estimaram, para o gênero, um total de 19 espécies e Barros *et al.* (2009) consideraram a existência de 20 táxons, sendo 13 endêmicos da Mata Atlântica, com ocorrência restrita às Florestas Ombrófilas Densa/Aberta ou Mistas. Recentemente, Barros *et al.* (2010) relacionaram 18 espécies, enquanto na base de dados do sítio eletrônico TROPICOS (2010), 30 binômios são listadas para o gênero. Desse modo, observa-se que o número de espécies de *Promenaea* mostra-se ainda duvidoso e que há necessidade de uma reavaliação das circunscrições dos táxons.

Endêmico do Brasil, o gênero é encontrado desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, especialmente na Mata Atlântica, com espécies primordialmente epífitas, higrófilas e ciófilas, de distribuição relativamente restrita e exclusivas do interior de florestas pluviais tropicais (Barros & Catharino 1994). Neste trabalho, os autores descreveram uma nova espécie para o gênero e ressaltaram que outras espécies do gênero devem ocorrer nos estados do Espírito Santo e Bahia, apesar de não haver, naquela ocasião, registros em herbários. Posteriormente, Barros & Felix (2006) evidenciaram também a ocorrência de *P. xanthina* para a Região Nordeste, precisamente no estado da Bahia.

Levantamento prévio nos herbários RB e HB permite destacar o pequeno número de espécimes de *Promenaea* documentados em herbários para a grande maioria das espécies, exceto para *P. xanthina* Lindl. (Tabela 1). Nesse contexto, ressalta-se que, em função do pouco conhecimento do gênero e sua baixa representatividade em coleções de herbários, espécimes de *Promenaea* podem não ser reconhecidos, serem identificados equivocadamente como outra espécie ou, até mesmo como uma espécie de outros gêneros de Orchidaceae.

Levantamentos florísticos recentes, realizados em diferentes regiões do Brasil, indicaram a existência de apenas uma ou duas espécies de *Promenaea*, em cada um, e a ocorrência muito rara nas áreas estudadas (Miller 1996; Toscano-de-Brito & Queiroz 2003; Miller *et al.* 2006;

Menini Neto *et al.* 2007; Pansarin & Pansarin 2008; Alves & Kolbek 2009; Amorim *et al.* 2009; Barberena *et al.* Inédito). Uma síntese dessas informações encontra-se listada na Tabela 2.

Apesar do crescente aumento do conhecimento, revisões taxonômicas e levantamentos florísticos recentes das Orchidaceae ainda são pouco expressivos no Brasil (Barberena *et al.* inédito). Tomando-se como um exemplo *Promenaea* na Região Sul, verifica-se o pequeno número de espécimes em herbário e principalmente a realização de inventários florísticos de epífitas em flóculas regionais (Kersten & Silva 2001; Müller & Waechter 2001; Gonçalves & Waechter 2002; Giongo & Waechter 2004; Buzatto *et al.* 2008) e a carência de trabalhos voltados especificamente para o estudo das orquídeas, pois os poucos que foram desenvolvidos focaram outras tribos e subtribos que não Zygoteliinae e com ênfase nas plantas terrestres (Rocha & Waechter 2006, Buzatto *et al.* 2007, Dettke *et al.* 2008, Perleberg *et al.* 2008, Tognon *et al.* 2008), além de estarem centralizados no estado do Rio Grande do Sul. Assim, para a realização do presente estudo, é extremamente relevante a realização de coletas nas localidades de onde procederam os exemplares-tipo e também na Região Sul, pois a ocorrência de espécimes de *Promenaea* nessa área já foi constatada através de levantamentos prévios em herbários, embora os trabalhos citados acima, e recentemente publicados, não registrem essa ocorrência para o gênero.

No contexto de conservação, consultas às listas de espécies ameaçadas de extinção para a Região Sudeste (Fraga & Menezes 2000; Mendonça & Lins 2000; Mamede *et al.* 2007; Simonelli & Fraga 2007) permitiram evidenciar apenas *P. fuerstenbergiana* Schltr. como Vulnerável no estado de São Paulo, devido à distribuição restrita e a ausência de informação em Unidades de Conservação. Tal fato indica a necessidade de se avaliar mais detalhadamente o real estado de conservação das espécies do gênero.

Historicamente, características do polinário, como textura, composição e forma, estão entre as mais importantes nos sistemas de classificação de orquídeas. Avanços nas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) têm possibilitado a utilização de outros caracteres dessa estrutura, como, por exemplo, a ornamentação da superfície e o número de aberturas do polinário, contribuindo para aumentar a relevância dos polinários no estudo taxonômico da família (Freudenstein 2008). Nesse caso, o uso de políneas e/ou polinários mostra-se importante

não apenas para identificação em nível de subfamília, mas de tribos, subtribos e até mesmo de espécies (Nieto & Damon 2008; Singer *et al.* 2008).

Os primeiros estudos em Orchidaceae envolvendo dados de DNA foram desenvolvidos por Chase *et al.* (1994) e Cameron *et al.* (1999) e resultaram em novas propostas de Sistemas de Classificação para Orchidaceae e uma melhor compreensão das relações filogenéticas entre as subfamílias. Posteriormente, com base nesses dados, Pridgeon *et al.* (1999) propuseram uma nova subdivisão de Orchidaceae, que constitui a circunscrição mais aceita atualmente, ao considerar as seguintes subfamílias: Apostasioideae, Cyclopodioidae, Orchidoideae, Vanilloideae e Epidendroideae. Chase (2005) destacou oportunamente que os estudos de DNA subsequentes, desenvolvidos por Cameron (2004) e Freudenstein *et al.* (2004), confirmaram os padrões anteriormente observados, além de uma nova classificação, proposta por Chase *et al.* (2003).

O avanço dos estudos moleculares trouxe modificações também em níveis infra-familiares de Orchidaceae. Estudos recentes de filogenia, especialmente a molecular, têm alterado a circunscrição de gêneros com características morfológicas diagnósticas bem definidas, proporcionando a fragmentação de diversos grupos, como *Pleurothallis* R. Br., *Maxillaria* e *Oncidium* Sw., e, em outros, a fusão de gêneros previamente aceitos, como em *Cattleya* Lindl. e *Sophronitis* Lindl. (Pridgeon & Chase 2001; Docha Neto *et al.* 2006; Whitten *et al.* 2007; van den Berg 2008). Entretanto, devido ao grande número de modificações em curto espaço de tempo, algumas mudanças ainda não foram plenamente aceitas pela comunidade científica (F. Barros, com. pess.). Mesmo assim, as contribuições decorrentes da utilização da análise cladística são notórias e o avanço no entendimento da sistemática e taxonomia de Orchidaceae é inegável, principalmente quando abordam análises filogenéticas combinadas (morfológica+molecular) ou quando empregam diferentes marcadores moleculares. Nesse sentido, pode-se destacar o trabalho de Higgins *et al.* (2003), que possibilitou corroborar dados pretéritos levantados por Higgins (1997), e também favoreceu novas conclusões no estudo de *Encyclia* Hook. ao desenvolverem análise filogenética molecular utilizando-se de diferentes marcadores genéticos. Especificamente para *Promenaea*, até o momento não foi feita qualquer análise filogenética, apesar do gênero ter sido incluído em um estudo de filogenia molecular em Orchidaceae por Freudenstein *et al.* (2004), na qual evidenciaram a proximidade de *Promenaea*

com *Cryptarrhena* R. Br. e *Zygopetalum* Hook. Whitten *et al.* (2005) avaliaram as relações genéricas em Zygopetalinae através de dados moleculares e destacaram a existência de três clados principais, porém *Promenaea* não foi abordado de forma abrangente e as relações intra-específicas ainda permanecem obscuras.

Desse modo, considerando a escassez de informações atualizadas em literatura e coleções de herbários sobre a riqueza de *Promenaea*, e visando ampliar o conhecimento sobre o gênero, propõe-se: (a) uma revisão taxonômica, com descrições, ilustrações, chave analítica para identificação das espécies reconhecidas com base em caracteres morfológicos diagnósticos; (b) testar o monofiletismo de *Promenaea*, com base em dados morfológicos e macromoleculares, e analisar as relações das espécies e a evolução de caracteres morfológicos; (c) testar a hipótese de que características morfológicas do labelo e dos polinários são informativas para o reconhecimento de clados monofiléticos no gênero; e (d) reconhecer o estado de conservação e padrões de distribuição geográfica das espécies.

Justificativa

Estudos taxonômicos possibilitam ampliar o conhecimento da biodiversidade e das relações entre os táxons, sistematizando inúmeras informações sobre a diversidade biológica e os diferentes ecossistemas. A Floresta Atlântica apresenta expressiva riqueza e grande número de endemismos de espécies, sendo Orchidaceae a família de Angiospermae mais numerosa nesses dois aspectos. Diante da elevada biodiversidade nesse ecossistema, e particularmente da família em questão, o gênero *Promenaea* merece destaque, pois representa um grupo com grande número de espécies endêmicas da Mata Atlântica e de expressivo valor ornamental, sujeito constantemente a ações extrativistas ilegais e predatórias. As últimas monografias do gênero foram feitas há mais de 50 anos e o número real de espécies ainda é controverso. Dificulta, ainda, o conhecimento atual desse grupo, a existência de complexos taxonômicos, de fragilidades em circunscrições específicas e de dados imprecisos ou escassos quanto à distribuição geográfica das espécies, além da ausência de informações quanto ao estado de conservação de praticamente todas as espécies. Desse modo, é necessário avaliar uma hipótese filogenética para *Promenaea*, a fim de entender as relações entre as espécies e avaliar as circunscrições taxonômicas propostas. Os dados obtidos com os estudos taxonômicos e filogenéticos serão relevantes para a categorização do estado

de conservação das espécies estudadas, bem como poderão auxiliar na indicação de áreas prioritárias para conservação em Mata Atlântica. A existência de poucos especialistas em Orchidaceae no Brasil, em relação ao tamanho da família, estimula a formação de novos taxonomistas e possibilita atualizar e ampliar a sistemática dessa família no país, principalmente de gêneros complexos e com o reconhecimento de agrupamentos monofiléticos.

Objetivo geral

Proceder à revisão taxonômica e propor uma hipótese filogenética para a evolução de *Promenaea*, com base em dados morfológicos e macromoleculares, e associar esses resultados com padrões de distribuição geográfica e de conservação das espécies, além de contribuir para o conhecimento das Orchidaceae no domínio Mata Atlântica.

Objetivos específicos

- Realizar o estudo taxonômico de *Promenaea* e atualizar as circunscrições do gênero e das espécies reconhecidas;
- Realizar estudos filogenéticos, com base em dados morfológicos e macromoleculares, em *Promenaea* e em espécies selecionadas de gêneros afins;
- Reconhecer caracteres morfológicos diagnósticos para identificação das espécies e informativos para a filogenia do gênero;
- Reconhecer caracteres qualitativos diagnósticos e informativos nas políneas e polinários, com uso de MEV e verificar se as características morfológicas dos polinários podem ter valor diagnóstico específico e para a filogenia de *Promenaea*.
- Testar o monofiletismo de *Promenaea* e interpretar as relações entre as espécies, com base em análises cladísticas morfológica, molecular e combinada, aplicando os resultados à taxonomia do gênero;
- Atualizar e mapear a distribuição geográfica das espécies, assinalando padrões de distribuição, particularmente de endemismos;
- Reconhecer o estado de conservação das espécies com base em critérios e categorias da IUCN, identificando dados relevantes e diagnósticos que apóiam proposições de áreas prioritárias para a conservação no domínio Mata Atlântica.

MATERIAL E MÉTODOS

Consultas à literatura, sítios eletrônicos e herbários

Será realizado o levantamento bibliográfico, considerando não só obras clássicas em taxonomia, como trabalhos de floras regionais, listagens e estudos filogenéticos, além de informações disponíveis em sítios eletrônicos.

Será feito o levantamento de diferentes coleções de herbários, principalmente os das Regiões Sudeste e Sul do Brasil (ALCB, BHCB, ESA, FLOR, GUA, HB, HBR, HRCB, MBM, HURG, ICN, PACA, PEL, PMSP, R, RB, RBR, RFA, RUSU, SP, SPF, SPSF, UEC, UPCB), os do estado da Bahia (ALCB, CEPEC, HRB, HUEFS, IBGE) e os herbários BR, G, GH, K, S, W e WU, onde coleções de *Promenaea* encontram-se depositadas. Material-tipo será solicitado, a título de empréstimo, a herbários nacionais e do exterior para atestar a identificação correta dos táxons estudados e elucidar dúvidas nomenclaturais e taxonômicas. Nesse contexto, diferentes sítios eletrônicos também serão consultados, em particular o *Species Link* para coleções de herbários, e outros, internacionais, para busca de imagem de exemplares-tipo ou relativos à coleções históricas.

Trabalhos de campo: observações, coletas e herborização de material

Considerando o levantamento prévio dos herbários e informações de literatura, as expedições para coletas e observações ecológicas serão feitas em áreas com ocorrência conhecida, priorizando regiões pouco ou não visitadas nos estados das Regiões Sudeste e Sul e na Bahia, além de áreas adjacentes a estas, que representem ocorrência potencial para o grupo em estudo. Nesse contexto, também serão priorizadas localidades de onde provêm os tipos nomenclaturais, pois para muitas espécies, principalmente as descritas por R. Schlechter, uma vez que não existem tipos disponíveis referentes a esse coletor e o herbário B foi praticamente destruído durante a Segunda Guerra Mundial. Para a coleta de espécimes, serão realizadas em torno de dez expedições bimensais, utilizando-se o método de caminhamento (Filgueiras *et al.* 1994), GPS e altímetro. O material coletado será herborizado segundo técnicas usuais (Guedes-Bruni *et al.* 2002) e depositado no herbário R, com duplicatas nos herbários RB e SP. Parte do material poderá ser enviado para cultivo *ex-situ* no Orquidário do Instituto de Pesquisas Jardim

Botânico do Rio de Janeiro. Igualmente nesta instituição serão depositadas amostras no Banco de DNA. Amostras de folhas jovens serão conservadas em sílica gel para extração de DNA, e políneas, polinários e sementes serão preservadas em glutaraldeído, para estudos em MEV. Amostras florais e frutíferas também serão fixadas em etanol a 70%, para análise em laboratório. Detalhes de espécimes na natureza e de particularidades do ambiente serão registrados através de fotografias digitais, visando à identificação dos táxons e documentação em um banco de imagens. Licenças para coletas em Unidades de Conservação, tanto de material para coleções de herbários como de amostras para estudos moleculares, serão solicitadas aos órgãos governamentais competentes.

Análise morfológica, tratamento taxonômico e estado de conservação

No tratamento taxonômico serão apresentados uma chave para identificação dos táxons, descrições, listagem dos materiais examinados, ilustrações e mapas de distribuição geográfica, além de dados fenológicos e comentários sobre afinidades taxonômicas e aspectos ecológicos.

Na análise e identificação do material, serão utilizados microscópios óptico, estereoscópico e/ou MEV. Para mensuração das estruturas foliares e reprodutivas, será utilizado paquímetro digital ou régua milimetrada. Amostras florais fixadas em etanol a 70% também serão analisadas, a fim de facilitar a identificação dos exemplares. Na identificação dos espécimes serão utilizadas as principais obras de referência para a taxonomia das orquidáceas brasileiras, como Rodrigues (1877, 1882), Cogniaux (1893-1896, 1898-1902, 1904-1906), Hoehne (1940, 1942, 1945, 1949, 1953), Pabst & Dungs (1975, 1977) e Sprunger *et al.* (1996). Nessa atividade, material de herbário identificado por especialistas também será usado para comparação.

Para a descrição dos táxons, serão utilizados, de modo geral, os conceitos morfológicos, vegetativos e reprodutivos de Radford *et al.* (1974) e, mais especificamente para Orchidaceae, os conceitos de Dressler (1981, 1993). A citação do material examinado obedecerá à ordem cronológica das coletas. Será adotado o sistema de classificação para Orchidaceae proposto por Chase *et al.* (2003). As abreviações dos nomes dos autores dos gêneros e espécies seguirão Brummit & Powell (1992). A correção dos nomes científicos atenderá as regras do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (McNeill *et al.* 2006).

Na análise em MEV, o material coletado será fixado em solução de glutaraldeído 2,5%,

paraformaldeído 4% e tampão cacodilato 0,05 M em pH 7,2. Posteriormente, as amostras serão lavadas neste tampão e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1% e tampão cacodilato 0,05 M, à temperatura ambiente. Novamente as amostras serão lavadas em tampão, posteriormente desidratadas em série crescente de acetona a cada hora - 50%, 70%, 90%, 3x 100% - e submetidas para secagem a ponto crítico, sob temperatura de 5°C e utilizado CO₂ como agente. As amostras serão montadas em suportes (*stubs*) de alumínio, com diâmetro de 1 cm, metalizadas com uma fina camada de ouro de 20 nm (Bal-Tec Sputer Coater SCD 050) e observadas no microscópio eletrônico de varredura ZEISS EVO 40, em condições de alto vácuo na coluna. As amostras serão observadas e eletromicrografadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Museu Nacional/UFRJ.

A distribuição geográfica das espécies será obtida em literatura, dados contidos nas exsicatas examinadas e em dados divulgados nos sítios eletrônicos do CRIA, *Kew Herbarium Catalogue*, TROPICOS, *World Checklist of Selected Plants Families* e Lista de Espécies da Flora do Brasil, além de informações básicas contidas em Pabst & Dungs (1975). No reconhecimento de padrões de distribuição serão avaliados a distribuição geográfica das espécies, endemismos, dados de altitude, de coordenadas geográficas e particularidades de habitats.

Na categorização dos estados de conservação serão adotados os critérios da IUCN (2008), com base nos estudos de revisão taxonômica e na filogenia de *Promenaea*. Na indicação de áreas prioritárias para a conservação das espécies estudadas, será analisada a congruência entre os graus de ameaça e os padrões de distribuição geográfica, os centros de diversidade e os endemismos reconhecidos no presente estudo, além de uma estimativa do grau de pressão antrópica nas áreas de ocorrência. Esses dados também podem constituir importantes subsídios para fortalecer planos de manejo de Unidades de Conservação.

Análise filogenética morfológica

Após a conclusão das análises morfológicas das espécies de *Promenaea* reconhecidas no presente estudo, caracteres morfológicos, foliares e reprodutivos informativos serão selecionados para elaboração de uma matriz de dados. Espécies previamente selecionadas dos gêneros

Cryptarrhena, *Dichaea* Lindl. e *Zygopetalum* para representarem o grupo externo, serão igualmente analisadas.

Os dados serão analisados pelo critério de máxima parcimônia com o aplicativo PAUP*4 (Swofford 2001). A análise Bayesiana será realizada com o aplicativo MrBayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). A análise de máxima verossimilhança será realizada com o programa PAUP*4 (Swofford 2001). A consistência da monofilia dos ramos será avaliada pelo suporte de Bremer (Bremer 1994), teste de “bootstrap” (Felsenstein 1985) e teste de probabilidade a posteriori (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Para a construção de árvores filogenéticas será utilizado o programa MacClade v. 4.06 (Maddison & Maddison 2001), possibilitando estudos sobre a evolução dos caracteres. Serão conduzidas outras análises de busca da “árvore ótima”, em função do tamanho dos dados e resultados obtidos, como os métodos heurísticos das árvores mais parcimoniosas, valores de suporte de “bootstrap” e árvores de consenso estrito e de maioria, bem como calculados, para as árvores mais parcimoniosas, os índices de consistência (IC), de retenção (IR) e de consistência rescalonado (RC). Para casos de complexos taxonômicos será utilizado o protocolo baseado no polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado (Vos *et al.* 1995), utilizando sistema de análise AFLPTM (*Analysis System I. Life Technologies*).

Análise filogenética molecular

Para estudar as relações filogenéticas em *Promenaea*, fragmentos de folhas jovens serão desidratados em sílica-gel (Chase & Hills 1991) com posterior extração de DNA pelo método CTAB, modificado a partir 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. A partir das diluições, as regiões serão amplificadas através da reação em cadeia de polimerase (Polymerase Chain Reaction-PCR, Palumbi 1996). Os marcadores a serem utilizados serão ITS, TrnL e TrnL-F e matK (Whitten *et al.* 2005). Após um número pré-definido de ciclos no termociclador os produtos amplificados serão purificados com kits apropriados. Posteriormente, os produtos de PCR purificados serão estocados em freezer a -20° C. A partir do DNA purificado serão realizadas as reações de seqüenciamento para as amostras que, posteriormente, serão analisadas com auxílio de seqüenciadores automáticos de

DNA no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. As seqüências utilizadas por Whitten *et al.* (2005) na avaliação das relações genéricas em Zygotetaliinae estão disponíveis no *Genbank* e serão utilizadas visando à construção da filogenia para *Promenaea*. O material para análise será coletado em campo e, eventualmente, obtido em coleções particulares. As seqüências serão alinhadas usando os softwares ClustalX versão 1.83 (Thompson *et al.* 1997) e as possíveis correções, realizadas através do programa BioEdit versão 5.0.9. A partir das seqüências alinhadas, as análises filogenéticas serão realizadas pelos métodos de parcimônia (com otimizações realizadas usando o algoritmo ACCTRAN) e bayesiano com o uso, respectivamente, dos softwares PAUP 4.0 b10 (Swofford 2001) e Mr. Bayes 3.0 (Ronquist & Huelsenbeck 2003), segundo a metodologia adotada em outros estudos similares. Para a construção de árvores filogenéticas será utilizado o programa MacClade v. 4.06 (Maddison & Maddison 2001), possibilitando estudos sobre a evolução dos caracteres. As matrizes de caracteres serão construídas no programa Mesquite 2.6, assim como a visualização das árvores obtidas. Na análise Bayesiana (AB), o modelo de substituição nucleotídica utilizado será selecionado através do programa MrModeltest versão 2.2 (Nylander 2004), através do Teste de Razão de Verossimilhança Hierárquico (hLRTs).

Tabela 1 - Levantamento preliminar dos táxons de *Promenaea* depositados nos herbários RB e R.

Herbário RB		
Espécie	Número de exsicatas	Ocorrência (Estado)
<i>P. dusenii</i> Schltr.	1	Morretes (PR)
<i>P. melingustiana</i> Schltr.	1	Petrópolis (RJ)
<i>P. rollisonii</i> Lindl.	1	Rio de Janeiro (RJ)
<i>P. stapelioides</i> (Link & Otto) Lindl.	4	Nova Iguaçu, Teresópolis e Rio de Janeiro (RJ)
<i>P. xanthina</i> Lindl.	15	Santa Maria do Salto (MG/BA), Lima Duarte e Rosário da Limeira (MG), Itatiaia, Nova Iguaçu, Paraty, Teresópolis e Rio de Janeiro (RJ)
Indeterminadas	8	(MG, ES, RJ, SP)
Herbário R		
Espécie	Número de exsicatas	Ocorrência (Estado)
<i>P. guttata</i> Rchb. f.	1	(RJ)
<i>P. paulensis</i> Schltr.	1	(SP)
<i>P. rollisonii</i> Lindl.	1	(RJ)
<i>P. stapelioides</i> (Link & Otto) Lindl.	1	(PR)
<i>P. xanthina</i> Lindl.	4	(RJ)
Indeterminadas	1	(RJ)

Tabela 2 – Levantamentos florísticos recentes, com destaque para a representatividade do gênero *Promenaea*.

Trabalhos	Ano	Estado	Nº de espécies	Espécie(s)
Miller	1996	RJ	2	<i>P. xanthina</i> Lindl. <i>P. stapelioides</i> Lindl.
Toscano de Brito & Queiroz	2003	BA	1	<i>P. aff. xanthina</i> Lindl.
Miller <i>et al.</i>	2006	RJ	2	<i>P. xanthina</i> Lindl.
Menini Neto <i>et al.</i>	2007	MG	1	<i>P. xanthina</i> Lindl. <i>P. stapelioides</i> Lindl.
Romanini & Barros	2007	SP	2	<i>P. rollissonii</i> (Lindl.) Lindl. <i>P. stapelioides</i> Lindl.
Pansarin & Pansarin	2008	SP	1	<i>P. rollissonii</i> (Lindl.) Lindl.
Alves & Kolbek	2009	MG	1	<i>P. ovatiloba</i> (Klinge) Cogn.
Amorim <i>et al.</i>	2009	BA	2	<i>P. silvana</i> F.Barros & Cath. <i>P. xanthina</i> Lindl.
Barberena <i>et al.</i>	inédito	RJ/MG	1	<i>P. xanthina</i> Lindl.

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO (ANUAL)

Atividades	1º ano				2º ano				3º ano				4º ano			
Obtenção de créditos	X	X	X	X	X	X										
Levantamento e atualização bibliográficas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Levantamento de coleções de herbários	X	X	X	X	X	X	X	X								
Expedições científicas	X	X	X	X	X	X	X	X								
Análise, identificação e descrição dos espécimes					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Análise do material no MEV					X	X	X	X	X	X						
Extração de DNA			X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Análises filogenéticas									X	X	X	X	X	X		
Elaboração de chave analítica													X	X		
Ilustração das espécies											X	X	X	X		
Confecção de mapas de distribuição geográfica													X	X		
Redação final															X	X
Divulgação de resultados (parciais) e defesa de tese								X				X				X

CRONOGRAMA FINANCEIRO (VALORES EM R\$)

Itens e Custos/Quadrimestres	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	TOTAL
Expedição científica (diárias + combustível)	2.000	2.000	2.000	2.000	2.000	0	0	0	0	0	0	0	10.000
Visitas técnicas/herbários	500	500	500	500	500	500	0	0	0	0	0	0	3.000
Auxiliar de campo	450	450	450	450	0	0	0	0	0	0	0	0	1.800
Material de campo (sílica gel + etanol)	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	400
Seqüenciamento de DNA	0	0	0	1.000	0	1.000	0	0	0	0	0	0	2.000
Primers	0	0	0	500	0	0	0	0	0	0	0	0	500
Passagens aéreas Rio – Ilhéus - Rio	0	0	0	900	0	0	0	0	0	0	0	0	900
Passagens aéreas Rio-Porto Alegre - Rio	0	0	1.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.000
Material de papelaria	200	0	0	200	0	0	200	0	0	200	0	200	1.000
Serviço de ilustração	0	0	0	0	800	0	0	0	0	0	0	800	1.600
Xerox	100	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	300	900
Participação em Congresso	0	0	750	0	0	750	0	0	750	0	0	0	2.250
Impressão de painel	0	0	75	0	0	75	0	0	75	0	0	0	225
TOTAL	3.350	3.100	4.925	5.700	3.350	2.825	250	50	875	250	50	1.300	25.575

Referências

- Alves, R. J. V. & Kolbek, J. 2009. Summit vascular flora of Serra de São José, Minas Gerais, Brazil. *Check List* 5(1): 35–73.
- Amorim, A. M. et al. 2009. Angiospermas em remanescentes de floresta Montana no Sul da Bahia, Brasil. *Biota Neotropica* 9(3): 1-35.
- Barberena, F. F. V. A., Baumgratz, J. F. A. & Barros, F. (inédito) Diversidade das Orchidaceae no Parque Nacional do Itatiaia, Sudeste do Brasil.
- Barros, F. & Catharino, E. L. M. 1994. *Promenaea silvana* F. Barros & Catharino (Orchidaceae), nova espécie do Brasil. *Hoehnea* 21(1/2): 93-96.
- Barros, F. & Felix, L.P. 2006. Orchidaceae. In: Barbosa, M.R.V.; Sothers, C.; Mayo, S.; Gamarra-Rojas, C.F.L. & Mesquita, A.C. (orgs.). Checklist das plantas do Nordeste brasileiro: Angiospermas e Gimnospermas. Brasília, Ministério da Ciência e Tecnologia. Pp.115-122.
- Barros, F.; Rodrigues, V. T. & Batista, J. A. N. 2009. Orchidaceae. In: Stehmann, J. R.; Forzza, R. C.; Salino, A.; Sobral, M.; Costa, D. P. & Kamino, L. H. Y. (eds.). Plantas da Floresta Atlântica. Rio de Janeiro, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Pp.372-403.
- Barros, F. de; 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>). Acesso em 22/5/2010.
- Bremer, K. 1994. Branch support and tree stability. *Cladistics* 10: 295-304.
- Brummit, R. K. & Powell, C. 1992. Authors of plants names. Royal Botanical Gardens, Kew. p.732.
- Buzatto, C. R.; Freitas, E. M.; Silva, A. P. M. & Lima, L. F. P. 2007. Levantamento florístico das Orchidaceae ocorrentes na Fazenda São Maximiano, Município de Guaíba, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biociências* 5 (2-3): 19-25.
- Buzatto, C. R.; Severo, B. M. A. & Waechter, J. L. 2008. Composição florística e distribuição ecológica de epífitos vasculares na Floresta Nacional de Passo Fundo, Rio Grande do Sul. *Iheringia* 63(2): 231-239.
- Cameron, K. M.; Chase, M. W.; Whitten, W. M.; Kores, P. J.; Jarrell, D. C.; Albert, V. A.; Yukawa, T.; Hills, H. G. & Goldman, D. H. 1999. A phylogenetic analysis of the

- Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 86: 208–224.
- Cameron, K. M. 2004. Utility of plastid psbB gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. *Molecular Phylogenetic Evolution* 31: 1157–1180.
- Chase, M. W. & Hills, H. M. 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: Dixon, K. W.; Kell, S. P.; Barrett, R. L. & Cribb, P. J. (eds.). *Orchid Conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah. Pp.69–89.
- Chase, M. W. 2004. Monocot relationships: an overview. *American Journal of Botany* 91: 1645–1655.
- Chase, M. W. 2005. Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew.
- Cogniaux, A. 1893–1896. Orchidaceae. In: Martius, C. F. P.; Eichler, A. G. & Urban, I. (eds.). *Flora brasiliensis* 3(4). Monachii, Typographia Regia. Pp.1–672.
- Cogniaux, A. 1898–1902. Orchidaceae. In: Martius, C. F. P.; Eichler, A. G. & Urban, I. (eds.). *Flora brasiliensis* 3(5). Monachii, Typographia Regia. Pp.1–664.
- Cogniaux, A. 1904–1906. Orchidaceae. In: Martius, C. F. P.; Eichler, A. G. & Urban, I. (eds.). *Flora brasiliensis* 3(6). Monachii, Typographia Regia. Pp.1–604.
- Dettke, G. A.; Fernandes, A. C. & Singer, R. B. O gênero *Elleanthus* C. Presl (Orchidaceae: Sobralieae) no Rio Grande do Sul, Brasil. 2008. *Revista Brasileira de Biociências* 6 (4): 329–333.
- Docha Neto, A.; Baptista, D. H. & Campacci, M. A. 2006. Coletânea de orquídeas brasileiras 3: Novos gêneros (baseados em *Oncidium*). Editora Brasil Orquídeas, São Paulo. Pp. 65–96.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. S. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Dressler, R. L. 1981. *The orchids, natural history and classification*. Harvard University Press, Harvard. 332p.

- Dressler, R. L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland. 312p.
- Dressler, R. L. 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 753-779.
- Filgueiras, T. S.; Nogueira, P. E.; Brochado, A. L. & Guala II, G. F. 1994. Caminhamento: um método expedito para levantamentos florísticos qualitativos. *Cadernos de Geociências* 12: 39-43.
- Fraga, C. N. & Menezes, L. F. T. 2000. Orchidaceae. In: Di Maio, F. R. & Silva, M. B. R. (coords.). Espécies ameaçadas de extinção do município do Rio de Janeiro: flora e fauna. Rio de Janeiro, Secretaria Municipal de Meio Ambiente. Pp.33-34.
- Freudenstein, J. V.; van den Berg, C.; Goldman, D. H.; Kores, P. J.; Molvray, M. & Chase, M. W. 2004. An expanded plastid DNA phylogenetic analysis of Orchidaceae and analysis of jackknife clade support strategy. *American Journal of Botany* 91: 149–157.
- Freudenstein, J. V. 2008. A historical perspective on orchid pollium and pollen characters. *Selbyana* 29(1): 1-5.
- Giongo, C. & Waechter, J. L. 2004. Composição florística e estrutura comunitária de epífitos vasculares em uma floresta de galeria na Depressão Central do Rio Grande do Sul. *Revista Brasil de Botânica* 27(3): 563-572.
- Giulietti, A. M.; Rapini, A.; Andrade, M. J. G.; Queiroz, L. P. & Silva, J. M. C. (orgs.). 2009. Plantas raras do Brasil. Belo Horizonte, MG: Conservação Internacional. 496p.
- Gonçalves, C. N. & Waechter, J. L. 2002. Epífitos vasculares sobre espécimes de *Ficus organensis* isolados no norte da planície costeira do Rio Grande do Sul: padrões de abundância e distribuição. *Acta botanica brasílica* 16(4): 429-441.
- Guedes-Bruni, R. R.; Morim, M P.; Lima, H. C. & Sylvestre, L. S. 2002. Inventário florístico. In: Sylvestre, L. S. & Rosa, M. M. T. (org.). Manual Metodológico para Estudos Botânicos na Mata Atlântica. Edur, Seropédica.
- Higgins, W. E. 1997. A reconsideration of the genus *Prosthechea* (Orchidaceae). *Phytologia* 82: 370–383.

- Higgins, W. E.; Van den Berg, C. & Whitten, W. M. 2003. A combined molecular phylogeny of *Encyclia* (Orchidaceae) and relationships within *Laeliinae*. *Selbyana* 24(2): 165-179.
- Hoehne, F. C. 1940. Orchidaceas. In: Hoehne, F. C. (ed.). *Flora Brasílica* 12(1). São Paulo, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo. Pp.1-254.
- Hoehne, F. C. 1942. Orchidaceas. In: Hoehne, F. C. (ed.). *Flora Brasílica* 12(6). São Paulo, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo. Pp.1-218.
- Hoehne, F. C. 1945. Orchidaceas. In: Hoehne, F. C. (ed.). *Flora Brasílica* 12(2). São Paulo, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo. Pp.1-389.
- Hoehne, F. C. 1949. *Iconografia das Orchidaceas do Brasil*. São Paulo, Secretaria da Agricultura. 601p.
- Hoehne, F. C. 1953. Orchidaceas. In: Hoehne, F. C. (ed.). *Flora Brasílica* 12(7). São Paulo, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo. Pp.1-397.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. 2001. MrBayes: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- IUCN. 2008. Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria. Version 7.0. Prepared by the Standards and Petitions Working Group of the IUCN SSC Biodiversity Assessments Subcommittee in August 2008. Disponível em: <http://intranet.iucn.org/webfiles/doc/SSC/RedList/RedListGuidelines>.
- Kersten, R. A. & Silva, S. M. 2001. Composição florística e estrutura do componente epifítico vascular em floresta daplâncie litorânea na Ilha do Mel, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 24(2): 213-226.
- Lindley, J. 1843. *Maxillaria*. *Botanical Register (miscellaneous matter)* 29: 10-16.
- Maddison, D. R. & Maddison, W. P. 2001. *MacClade 4.06: Analysis of phylogeny and character evolution*. Version 4.03. Sinauer Associates, Sunderland.
- Mamede, M. C. H.; Souza, V. C.; Prado, J.; Barros, F.; Wanderley, M. G. L. & Rando, J. G. (orgs.). 2007. *Livro vermelho das espécies vegetais ameaçadas do estado de São Paulo*. São Paulo, Instituto de Botânica. 165p.
- McNeill, J.; Barrie, F. R.; Burdet, H. M.; Demoulin, V.; Hawksworth, D. L.; Marhold, K.; Nicolson, D. H.; Prado, J.; Silva, P. C.; Skog, J. E.; Wiersema, J. H. & Turland, N. J. 2006. *International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code)*. *Regnum Vegetabile*. 146.

- Mendonça, M. P. & Lins, L. V. (orgs.). 2000. Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais. Belo Horizonte, Fundação Biodiversitas, Fundação Zôo-Botânica de Belo Horizonte. 157p.
- Menini Neto, L.; Alves, R. J. V.; Barros, F. & Forzza, R. C. 2007. Orchidaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 21(3): 687-696.
- Miller, D. & Warren, R. 1996. Orquídeas do Alto da Serra da Mata Atlântica pluvial do Sudeste do Brasil. Salamandra Consultoria Editorial, Rio de Janeiro. 256p.
- Miller, D.; Warren, R.; Miller, I. M. & Seehawer, H. 2006. Serra dos Órgãos: Sua história e suas orquídeas. Editora Scart, Nova Friburgo. 567p.
- Müller, S. C. & Waechter, J. L. 2001. Estrutura sinusal dos components herbáceos e arbustivos de uma floresta costeira subtropical. 2001. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, 24(4): 395-406.
- Nylander, J. A. A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Pabst, G. F. J. & Dungs, F. 1975. Orchidaceae Brasilienses, v. 1. Hildesheim, Kurt Schmiersow. 408p.
- Pabst, G. F. J. & Dungs, F. 1977. Orchidaceae Brasilienses, v. 2. Hildesheim, Kurt Schmiersow. 418p.
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic acids II. The polymerase chain reaction. In: Hillis, D. M.; Moritz, C. & Mable, B. K. (eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Pansarin, E. R. & Pansarin, L. M. 2008. A família Orchidaceae na Serra do Japi, São Paulo, Brasil. *Rodriguésia* 59(1): 99-111.
- Perleberg, T. D., Hentschke, G. S. & Singer, R. B. 2008. O gênero *Corymborkis* Thouars (Orchidaceae: Tropicidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 6 (4): 375-379.
- Pridgeon, A. M. 1995. *The illustrated encyclopaedia of orchids*. Timber Press, Portland. 83p.
- Pridgeon, A. M.; Cribb, P. J.; Chase, M. W. & Rasmussen, F. N. 1999. *Genera Orchidacearum*, vol. 1: General Introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae. Oxford University Press, Oxford. 197p.

- Pridgeon, A. M. & Chase, M. W. 2001. A phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Lindleyana* 16: 235-271.
- Pridgeon, A. M.; Cribb, P. J.; Chase, M. W. & Rasmussen, F. N. 2005. *Genera Orchidacearum*, v. 4: Epidendroideae (Part 1). Oxford University Press, Oxford. 672p.
- Rocha, F. S. & Waechter, J. L. 2006. Sinopse das Orchidaceae terrestres ocorrentes no litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta botanica brasílica* 20(1): 71-86.
- Rodrigues, J. B. 1877. *Genera et Species Orchidearum Novarum*. v. 1. Rio de Janeiro, Typographia Nacional. 206p.
- Rodrigues, J. B. 1882. *Genera et Species Orchidearum Novarum*. v. 2. Rio de Janeiro, Typographia Nacional. 315p.
- Romanini, R. P. & Barros, F. 2007. Orchidaceae. In: Melo, M. M. R. F.; Barros, F.; Wanderley, M. G. L.; Kirizawa, M.; Jung-Mendaçolli, S. L. & Chiea, S. A. C. (eds.). *Flora Fanerogâmica da Ilha do Cardoso* 12: 29-275.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. Mr Bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Schlechter, R. 1921. Die Gattung Promenaea Ldl. *Notizblatt des Botanischen Gartens und Museums zu Berlin-Dahlen* 7(70): 467-482.
- Simonelli, M. & Fraga, C. N. (orgs.). 2007. *Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo*. Vitória, Ipema. 146p.
- Singer, R. B.; Gravendeel, B.; Cross, H. & Ramirez, S. R. 2008. The use of orchid pollinia or pollinaria for taxonomic identification. *Selbyana* 29(1): 6-19.
- Sprunger, S.; Cribb, P. & Toscano de Brito, A. L. V. 1996. João Barbosa Rodrigues – *Iconographie des orchidées du Brésil*. v. 1: The illustrations. Basle, Friedrich Reinhardt. 324p.
- Stehmann, J. R.; Forzza, R. C.; Salino, A.; Sobral, M.; Costa, D. P. & Kamino, L. H. Y. (eds.). 2009. *Plantas da Floresta Atlântica*. Rio de Janeiro, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 516p.
- Swofford, D. L. 2001. *PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony version 4.b.8*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

- Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. 1997. The ClustalX-Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Tognon, G. B.; Buzatto, C. R. & Singer, R. B. 2008. O gênero *Eulophia* R. Brown Ex Lindl. (Orchidaceae: Eulophiinae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* 6 (4): 335-339.
- Toscano-de-Brito, A. L. V. & Queiroz, L. P. 2003. Orchidaceae. In: Zappi, D. C.; Lucas, E.; Stannard, B.L.; Lughadha, E. N.; Pirani, J. R.; Queiroz, L. P.; Atkins, S.; Hind, D. J. N.; Giuliatti, A. M.; Harley, R. M. & Carvalho, A. M. (eds.). Lista das plantas vasculares de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 21: 396-397.
- TROPICOS-TROPICOS.org 2010. Missouri Botanical Garden. Published on internet; <http://www.tropicos.br/> Acesso em 2/3/2010.
- Van den Berg, C. 2008. New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). *Neodiversity* 3: 3-12.
- Vos, P.; Hogers, R. & Blecker, M. 1995. Aflp: a new technique for DNA fingerprinting *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Whitten, W. M.; Williams, N. H.; Dressler, R. L.; Gerlach, G. & Pupulin, F. 2005. Generic relationships of Zygopetalinae (Orchidaceae: Cymbidieae) combined molecular evidence. *Lankesteriana* 5(2): 87-107.
- Whitten, W. M.; Blanco, M. A.; Williams, N. H.; Koehler, S.; Carnevali, G.; Singer, R. B.; Endara, L. & Neubig, K. M. 2007. Molecular phylogenetics of *Maxillaria* and related genera (Orchidaceae: Cymbidieae) based upon combined molecular data sets. *American Journal of Botany* 94: 1860-1889.