



Universidade Estadual de Feira de Santana
Departamento de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Botânica



INVESTIGAÇÃO DO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES
IRMÃS *CATTLEYA FORBESII* LINDL. E *CATTLEYA INTERMEDIA*
GRAHAM EX HOOK. (ORCHIDACEAE): UMA ABORDAGEM
FILOGEOGRÁFICA

Evelyne Marques Marreira

Feira de Santana, Bahia
2019



Universidade Estadual de Feira de Santana
Departamento de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Botânica



Evelyne Marques Marreira

**INVESTIGAÇÃO DO PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES
IRMÃS *CATTLEYA FORBESII* LINDL. E *CATTLEYA INTERMEDIA*
GRAHAM EX HOOK. (ORCHIDACEAE): UMA ABORDAGEM
FILOGEOGRÁFICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Botânica da Universidade Estadual de Feira de Santana
como parte dos requisitos para a obtenção do título de
Doutora em Botânica.

Orientador: Cássio van den Berg

Feira de Santana, Bahia

2019

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

M324i Marreira, Evelyne Marques

Investigação do padrão de distribuição das espécies irmãs *Cattleya Forbesii* Lindl. e *Cattleya Intermedia* Graham Ex Hook. (Orchidaceae) : uma abordagem filogeográfica / Evelyne Marques Marreira. - 2019. 89 f. : il.

Orientador: Cássio Van der Berg.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2019.

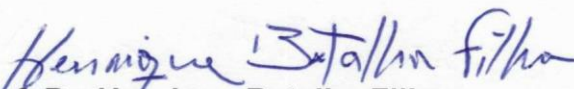
1. *Cattleya* - Distribuição geográfica. 2. *Cattleya* - Análise morfométrica. I. Van der Berg, Cássio, orient. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 582.594.2

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fabio Pinheiro
(Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP)



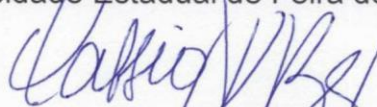
Prof. Dr. Henrique Batalha Filho
(Universidade Federal da Bahia – UFBA)



Profa. Dra. Alessandra Selbach Schnadelbach
(Universidade Federal da Bahia – UFBA)



Profa. Dra. Rejjane Patrícia de Oliveira
(Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS)



Prof. Dr. Cássio van den Berg
(Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS)
Orientador e Presidente da Banca

DEDICO

A você, MÃE ❤️

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a Deus por conduzir minha vida sempre a lugares e experiências Maravilhosas, toda Minha Gratidão.

A minha família, meus pais (Pedro e Mirtes) e irmãos (Evila, Pedro Jr., e Everton), por todo apoio e amor fraternal.

Ao meu orientador Cássio van den Berg, pela compreensão dos meus momentos difíceis, pela dedicação e auxílio nas análises, discussões e revisão dos manuscritos, por todo apoio logístico desde o campo ao laboratório, por todos os ensinamentos.

A CAPES, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da UEFS (PPGBot) pelo apoio durante todo o curso. Ao corpo de professores e funcionários que muito colaboraram direto ou indiretamente com esse trabalho.

Ao Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas (LAMOL), local que guardarei com carinho por tudo que aprendi, com os erros e acertos diários; pelos tantos que ali conheci trocando experiências, conhecimentos ou mesmo só algumas conversas informais, enfim foi onde passei mais de 80% da minha vida acadêmica.

Aos funcionários do Lamol, Evandro, Drica e Dani, obrigado por toda ajuda.

Ao Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) por apresentar estrutura e condições adequadas para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao Professor Elnatan pelos inúmeros ensinamentos, pela amizade, incentivos, orações e apoio constante.

Aos TANTOS e BONS amigos que fiz em Feira: Cassita, Dan, Fabio, Amandinha, (Raiz é raiz); Juan, Mateusito, Evandro, Anne, James, Aline, Iasmim, Mari, Tiago, Moa, Maria, Ykaro, Ray, pelos momentos de descontração. Vocês são todos especiais e ocupam um lugar especial no meu coração. Gabi, a você mais que agradeço, pois sem sua ajuda um desses capítulos não teria saído, mas mais que isso por sua amizade e sua disposição em me ajudar, obrigada de coração amiga! Ellen não tenho palavras pra agradecer a você por tudo que você significa pra mim, e por tudo que aprendi com você, sem dúvidas você me fez uma pessoa melhor!

Laísa a você agradeço pela compreensão, carinho, dedicação e amor! Você foi fundamental nessa fase final estando ao meu lado incentivando e acreditando em mim!

Por fim, obrigado a todos! Vocês foram fundamentais para mim.

RESUMO GERAL

As espécies irmãs, *Cattleya forbesii* Lindl. e *Cattleya intermedia* Graham ex Hooker são citadas como exclusivas da planície costeira sul do Brasil e não apresentam qualquer problema taxonômico para sua separação. Sua distribuição se dá ao longo do litoral sul e sudeste do Brasil ocorrendo em blocos disjuntos alternos. Nesta tese foram feitas análises filogeográficas e morfométricas. Para as análises filogeográficas foram coletadas 8 populações de *C. forbesii* e 18 populações de *C. intermedia*, para as quais foram sequenciados 200 indivíduos. Foram usados os marcadores plastidiais *rpl32-trnL*, *atpI-atpH* e o nuclear ITS, para investigar a estrutura e a diversidade genética em níveis de espécies e populações em relação às teorias atuais da biogeografia da Mata Atlântica Brasileira, principalmente em relação aos blocos populacionais. Uma forte estrutura genética foi encontrada, principalmente para os dados de cpDNA, não havendo grande diferença de estrutura entre as espécies. Mas considerando a estruturação a nível da distribuição em blocos disjuntos, apenas em *C. intermedia* foi positivo. Linhagens foram datadas para o plioceno, e possíveis refúgios ocorreram no norte de Santa Catarina e interior de São Paulo. Possivelmente há introgressão entre as espécies dado o compartilhamento de haplótipos em diversas linhagens. As análises morfométricas foram aplicadas apenas a *C. forbesii*, para as quais foram usadas sete populações, totalizando 71 indivíduos, para comparar a Assimetria Flutuante com dados de diversidade genética entre populações, assim como comparar entre os órgãos florais quais apresentariam um maior nível de AF. As digitalizações foram realizadas no TPSDig2, gerando dados para as demais análises estatísticas. Detectou-se Assimetria Flutuante para todos os órgãos florais, sendo o disco e os lóbulos laterais do labelo (DLL) aqueles que apresentaram maior porcentagem de AF dentre os órgãos. Para relação entre diversidade genética e níveis de AF nossos dados não exibiram um padrão.

PALAVRAS-CHAVE: Orchidaceae, *Cattleya*, Floresta Atlântica, Filogeografia, Refúgios, Morfometria Geométrica, Assimetria Flutuante.

ABSTRACT

The sister species, *Cattleya forbesii* Lindl. and *Cattleya intermedia* Graham ex Hooker are cited as exclusive to the southern coastal plain of Brazil and do not present any taxonomic problems for their separation. Its distribution occurs along the south and southeast coast of Brazil occurring in alternate disjoint blocks. In this thesis, phylogeographic and morphometric analyzes were made. For the phylogeographic analyzes were collected 8 populations of *C. forbesii* and 18 populations of *C. intermedia*, for which 200 individuals were sequenced. Plastid markers *rpl32-trnL*, *atpI-atpH* and nuclear ITS were used to investigate the structure and genetic diversity at species and population levels in relation to current theories of Brazilian Atlantic Forest biogeography, especially in relation to population blocks. A strong genetic structure was found, especially for cpDNA data, with no major structural differences between species. But considering the distribution-level structuring in disjoint blocks, only *C. intermedia* was positive. Lineages were dated to the Pliocene, and possible refuges occurred in northern Santa Catarina and inland São Paulo. Possibly there is introgression between species given the sharing of haplotypes in several lineages. Morphometric analyzes were applied only to *C. forbesii*, for which seven populations were used, totaling 71 individuals, to compare Floating Asymmetry with data of genetic diversity between populations, as well as to compare between floral organs which would have a higher level of FA. The digitalizations were performed in TPSDig2, generating data for the other statistical analyzes. Floating Asymmetry was detected for all floral organs, with the disc and the lateral lobes of the lip (DLL) showing the highest percentage of FA among the organs. For relationship between genetic diversity and FA levels our data did not exhibit a pattern.

KEYWORDS: Orchidaceae, *Cattleya*, Atlantic Forest, Phylogeography, Refuges, Geometric Morphometry, Floating Asymmetry.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	7
 CAPÍTULO 1 _ Phylogeographical studies of the epiphytic orchids <i>C. intermedia</i> and <i>C. forbesii</i> support the permanence of multiple refugia throughout the Pleistocene in the south of the Brazilian Atlantic Forest	12
INTRODUCTION	14
MATERIAL AND METHODS	16
RESULTS.....	21
DISCUSSION	33
ACKNOWLEDGEMENTS	38
REFERENCES	39
SUPPLEMENTARY MATERIALS.....	47
 CAPÍTULO 2 _ Assimetria Flutuante em flores de <i>Cattleya forbesii</i> Lindl. (Orchidaceae) associada a dados de diversidade genética.....	56
INTRODUÇÃO	58
MATERIAIS E MÉTODOS	60
RESULTADOS	66
DISCUSSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
 CONCLUSÕES FINAIS	79

INTRODUÇÃO GERAL

Floresta Atlântica Brasileira

A Floresta Atlântica Brasileira ocorre em uma ampla extensão geográfica, abrange diferentes condições climáticas e topográficas, e é caracterizada por níveis elevados de diversidade e endemismo (Metzger, 2009). Cerca de 95% da Floresta Atlântica se estende do Nordeste do Brasil, ao longo do litoral, até a fronteira com o Uruguai, e uma pequena porcentagem cobre parte da Argentina e do Paraguai (Silva et al., 2004). Este Bioma é considerado como um mosaico de vegetação composto pelo núcleo principal da Floresta Atlântica, e por comunidades vegetais periféricas, como as restingas, as florestas de altitude e as florestas alagadas (Scarano, 2002). A heterogeneidade e o isolamento podem ter influenciado no fato de a Floresta Atlântica abrigar um grande número de espécies endêmicas (Myers et al., 2000, Silva et al., 2004). Porém, ainda não existe um conhecimento detalhado sobre a complexa heterogeneidade ambiental encontrada na Floresta Atlântica (Stehamann et al., 2009). Os altos índices de biodiversidade encontrados na Mata Atlântica e a sua situação atual de perda e fragmentação do habitat, tornam seus remanescentes áreas críticas para a preservação da biodiversidade global (Myers et al., 2000; Ribeiro et al., 2009). Os remanescentes florestais de Mata Atlântica podem ser estimados em 7-8% (SOS Mata Atlântica/INPE 1993, 2008), variando com os critérios de inclusão adotados na classificação da vegetação. O sul e sudeste do Brasil abrigam as maiores áreas contínuas dessa vegetação. Áreas de endemismo na Floresta Atlântica têm sido identificadas ao longo dos anos por meio de diversos métodos, como para Carnaval et al. (2009) que realizaram um teste de modelagem da distribuição de espécies sob o paleoclima, utilizando o cruzamento da distribuição das espécies endêmicas de rãs (*Hypsiboas albomarginatus*, *H. semilineatus* e *H. faber*) com os extremos climáticos do Quaternário tardio (6.000 anos antes do presente) com a finalidade de determinar áreas de estabilidade e áreas instáveis. E de acordo com os mapas de estabilidade, foi encontrado um grande refúgio central em todo o quaternário (“Refúgio Bahia”), um refúgio secundário (“Refúgio Pernambuco”) e um terceiro refúgio para *H. faber* (“Refúgio São Paulo”).

Diversos modelos tem sido desenvolvidos para explicar a especiação e diversificação nas florestas neotropicais devido a notável diversidade desses ecossistemas. A hipótese dos refúgios no Pleistoceno (Haffer, 1969) é correlacionada a

essa grande diversidade genética e endemismo sul-americano. De acordo com esse modelo, as oscilações climáticas e a redução das florestas durante as glaciações ocorridas principalmente durante o Pleistoceno (começou há 2 Ma) teriam criado refúgios onde as populações em isolamento poderiam especiar e, em períodos interglaciais, hibridizar ou se misturar a espécies provenientes de diferentes refúgios. Para isso os estudos filogeográficos procuram investigar os processos evolutivos responsáveis pela distribuição de linhagens genealógicas num contexto geográfico, especialmente em grupos de espécies próximas (Avice, 2000), assim como, identificar áreas historicamente estáveis ou refúgios, onde as populações de muitos táxons sobreviveram durante os períodos glaciais (Carnaval et al., 2009). Na América do Sul, os estudos filogeográficos concentram-se em espécies associadas a ambientes de floresta úmida (Salgueiro et al., 2004; Ribeiro et al., 2011; Carnaval et al., 2009; Thomé et al., 2010), e poucos estudos contemplam espécies não relacionadas às áreas florestais, como as áreas de vegetação arbustiva aberta sob solos arenosos e salinos que ocorrem ao longo da planície litorânea, também conhecido como restinga (Scarano, 2002), sendo um campo ainda aberto a exploração (Pinheiro et al., 2011).

Objeto do Estudo

A família Orchidaceae possui cerca de 25.000 espécies (Dressler, 1981, 1993; Pridgeon et al., 1999); e no Brasil está distribuída em praticamente todo o território, sendo registradas 2.453 espécies, das quais 1.578 são endêmicas (Barros et al., 2015). No sistema de classificação mais recente para família (Pridgeon et al., 1999, 2001, 2003, 2005), baseado principalmente em dados moleculares, são reconhecidas cinco subfamílias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Orchidoideae, Vanilloideae e Epidendroideae. Sistemáticamente, a subtribo Laeliinae Benth é a terceira maior subtribo pertencente à subfamília Epidendroideae, depois de Pleurothallidinae e Oncidiinae. Seus representantes são estritamente neotropicais compreendendo cerca de 50 gêneros e 1.500 espécies (Dressler, 1981, 1993).

Cattleya faz parte da subtribo Laeliinae (Chase et al., 2003, van den Berg, 2008, van den Berg et al., 2009) é um gênero neotropical, incluindo 115 espécies (van den Berg, 2014) com a maioria delas registradas no Brasil, e provavelmente um dos gêneros mais vistosos e populares entre os colecionadores de orquídeas, com inúmeros híbridos, tanto naturais quanto artificiais (Withner, 1988).

A grande diversidade morfológica presente na subtribo, provavelmente relacionada à especialização em particular dos polinizadores, bem como adaptações aos diferentes habitats (van der Pijl e Dodson, 1966), assim como, as diferentes classificações propostas ao longo do tempo, tanto para as espécies brasileiras de *Cattleya* (Cogniaux, 1898; Pabst e Dungs, 1975; Fowlie, 1977) quanto para o gênero como um todo (Rolfe, 1895; Withner, 1988; van den Berg et al., 2000; van den Berg, 2008), fez crescer o número de espécies e também a sua heterogeneidade morfológica. Contudo, morfológicamente dois grandes grupos podem ser detectados: um formado pelas espécies unifoliadas (apresentam apenas uma folha sobre o pseudobulbo) e outro formado pelas espécies bifoliadas (apresentam apenas duas ou raramente três folha sobre o pseudobulbo).

O grupo bifoliolado é composto por cerca de 21 espécies, que de modo geral não é morfológicamente homogêneo, e vários são os questionamentos taxonômicos encontrados em suas relações internas (Santos, 2011). O subgênero *Intermediae* é composto por 23 espécies desse grupo bifoliolado (van den Berg, 2014), das quais *Cattleya forbesii* Lindl. e *Cattleya intermedia* Graham ex Hooker são citadas como exclusivas da planície costeira e não apresentam qualquer problema taxonômico para sua separação.

C. intermedia ocupa geralmente ambientes contíguos ao mar, seja entre arbustos na areia de restinga (ex. Litoral de SC e Cabo Frio, RJ), ou como epífita em florestas muito próximas ao mar (litoral norte de SP, Banhado do Taim, RS). *C. forbesii* apresenta distribuição similar, porém geralmente é epífita em florestas mais desenvolvidas sobre pântanos e margens de rios ao longo da costa, sobretudo em locais onde existem vales de baixa altitude (ex. Vale do Itajaí, Vale do Rio Ribeira de Iguape, fundo da Baixada Fluminense). Van den Berg (1996) relatu ainda a penetração dessa espécie no interior de São Paulo, onde ela ocorre em Itararé (Alto Paranapanema), Conchas e na região de Sorocaba. Raramente as espécies são sintópicas, porém já foi observado ambas as espécies crescendo juntas próximo a Guaramirim-SC, e neste ambiente foi encontrado o híbrido natural (*C. × isabellae* Rchb.f.). Isso concorda ainda com a elevada sobreposição fenológica relatada por van den Berg (1996), e indica que este par de espécies tem grande potencial para estudo de genética de populações para verificar o grau e o modo de isolamento reprodutivo, e a ocorrência e grau de introgressão em relação à distribuição geográfica. Van den Berg (1996), investigando possíveis padrões de distribuição das populações de *Cattleya*, apontou a região da Mata Atlântica nas proximidades de Rio de

Janeiro e São Paulo como um dos principais centros de especiação do grupo bifoliolado, com base na sobreposição de ocorrência das espécies do gênero.

Métodos Aplicados

Filogeografia

O uso de marcadores moleculares é uma forma de inferir os processos de fluxo de gênico que moldam a distribuição da diversidade genética dentro e entre populações, permitindo uma série de inferências sobre os padrões evolutivos, como por exemplo a comparação com mecanismos de isolamento reprodutivo, investigando a ocorrência de hibridações antigas e recentes, bem como os eventos de introgressão em relação à distribuição geográfica. Para estudos com orquídeas o genoma plastidial é bastante utilizado (Bateman et al., 2008; Micheneau et al., 2010; Pinheiro et al., 2009, 2013), mas o uso combinado de marcadores nucleares e plastidiais, num contexto filogeográfico, pode aumentar o poder de detectar oscilações demográficas históricas.

Alguns estudos filogeográficos com espécies de orquídeas para a Floresta Atlântica Brasileira tem sido realizado, principalmente com o gênero *Epidendrum* L., abordando diferentes aspectos e diferentes espécies desse gênero (Pinheiro et al., 2011, 2013, 2015). Em *Cattleya* Lindl., um trabalho recente de filogeografia foi realizado com duas espécies irmãs (*C. harrisoniana* Bateman ex Lindl. e *C. loddigesii* Lindl.) afim de esclarecer o relacionamento entre elas e a relação das populações introgrididas, assim como observar a estruturação das populações e os padrões filogeográficos envolvidos (Tomé, 2016). Ainda assim, há muito a saber sobre a origem e dispersão das espécies de orquídeas na Floresta Atlântica.

A partir dos estudos filogenéticos de Santos (2011) com a seção *Intermediae*, que demonstrou a relação de *C. intermedia* e *C. forbesii* como espécies irmãs, além dos apontamentos já considerados por van den Berg (1996), destacando o intrigante o padrão de distribuição alternada dessas espécies ao longo do litoral sul e sudeste do Brasil, sendo raramente encontradas em simpatria, consideramos que conhecer os padrões filogeográficos e a estrutura genética das populações naturais dessas espécies pode revelar dados importantes sobre a evolução e os mecanismos de especiação que atuam no início da diferenciação dessas linhagens. Dessa forma esse trabalho teve por objetivo investigar como a distribuição geográfica influenciou a estrutura genética dessas espécies irmãs, a fim entender possíveis processos nessa região de Floresta Atlântica no sudeste

do Brasil. Dentro deste cenário, partimos da premissa que as populações de ambas as espécies seriam mais estruturadas nas áreas mais ao norte do sudeste brasileiro do que no restante de sua distribuição, visto que as áreas mais ao sul do Brasil foram expostas a condições climáticas severas secas e de frio no Último Máximo Glacial (Last Glacial Maximum, LGM, Behling e Lichte, 1997; Behling e Negrelle, 2001; Behling, 2002), o que não é favorável para permanência dessas espécies nesses locais.

Morfometria

Além da distribuição geográfica, padrões fenológicos, a morfometria das populações destas espécies também foi explorada em detalhes por van den Berg (1996) e van den Berg e Martins (1998). O estudo de morfometria geométrica também vem sendo empregadas nas análises das causas das diferenças de formas entre os organismos, seja elas ecológicas ou filogenéticas (Monteiro e Reis, 1999). Dessa forma o uso desse método busca não só à quantificação, mas também consiste em investigar as causas e efeitos do surgimento de diferentes formas, utilizando a localização geométrica a partir de coordenadas cartesianas de marcos anatômicos (*landmarks*), e da homologia biológica que são pontos marcados em estruturas homólogas identificáveis entre indivíduos e espécies, possivelmente ligadas através de vias evolutivas (Bookstein, 1991). Diversos estudos relacionados aos fenômenos biológicos podem ser desenvolvidos usando a técnica da morfometria geométrica, dentre eles, a assimetria flutuante (AF), que vem sendo cada vez mais utilizada como indicador de perturbações ambientais nos organismos. Trata-se de sutis e aleatórias variações na simetria bilateral perfeita, ou seja, a diferença entre os lados direito e esquerdo, sendo uma medida de instabilidade no desenvolvimento de indivíduos, muito útil para o biomonitoramento, além de detectar mudanças ambientais antes que influenciem as populações de forma drástica (Graham et al., 2010; Lens et al., 2002; Sanseverino e Nessimian, 2008).

A partir das populações de *C. forbesii* buscamos comparar a Assimetria Flutuante presente nos órgãos florais com os dados de diversidade genética, avaliando o quanto estes dados se relacionam com base na morfologia dessas flores, além de comparar entre os diferentes órgãos a quantidade relativa de AF, onde nossa expectativa é de que diferenças genéticas em pequenas escalas possam estar associadas às modificações morfológicas e fenológicas intraespecíficas.

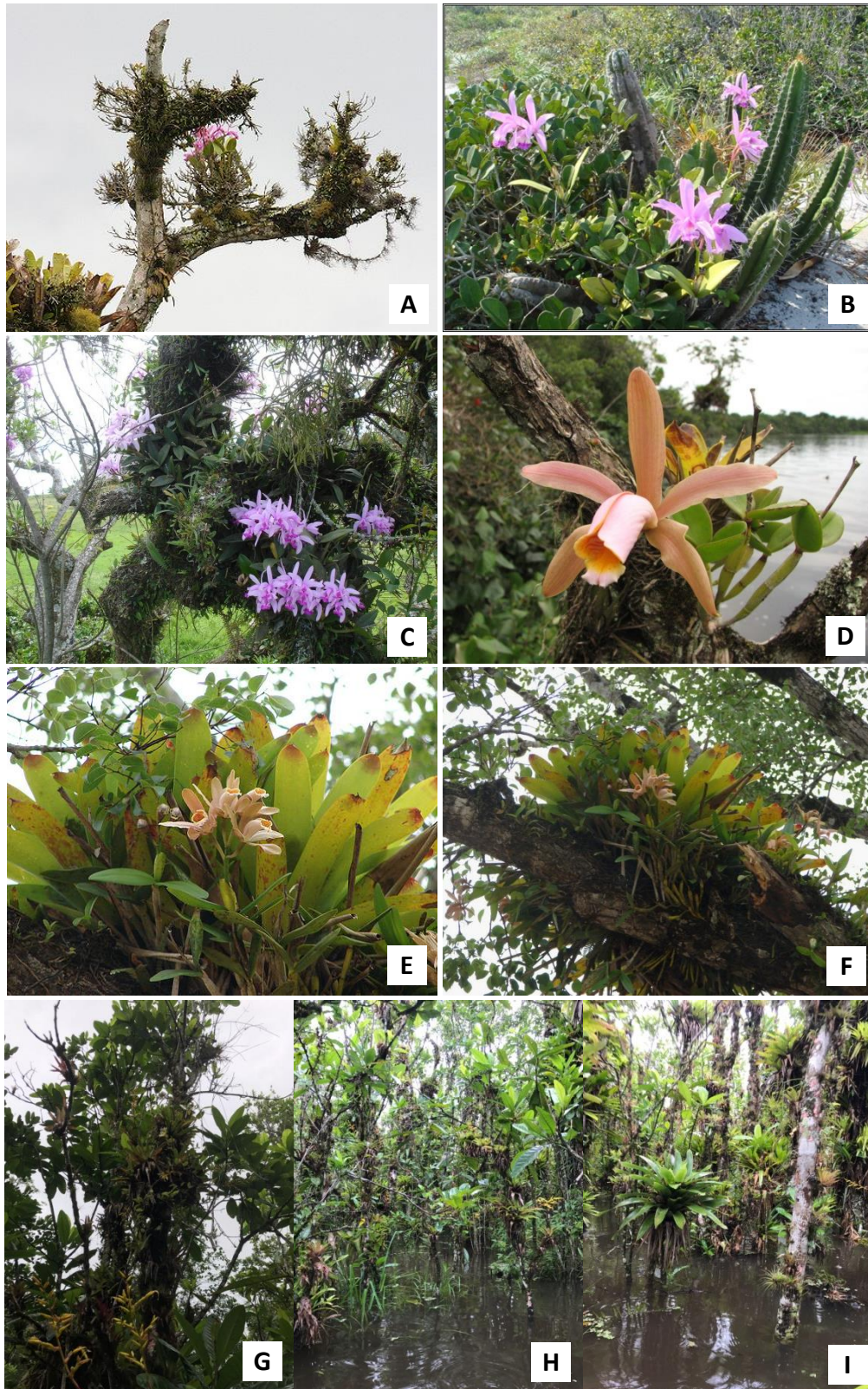


Figura 1 –*Cattleya intermedia*: A: Hábito epífito sobre árvore em decomposição; B: Hábito terrícola ocorrendo junto a cactáceas em ambientes arenosos; C: Hábito epífito com várias flores por inflorescência; *Cattleya forbesii*: D: Detalhe da flor. E-G: Hábito epífito ocorrendo junto a bromélias; H-I: Ambiente alagado .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antonelli, A.; Verola, C.; Parisod, C.; Lovisa, A.; Gustafsson, S. (2010). Climate cooling promoted the expansion and radiation of a threatened group of South American orchids (Epidendroideae: Laeliinae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 100: 597-607.
- Avice, J. (2000). *Phylogeography - The history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 447p.
- 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. (2015). Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB11329>>. Acesso em: 18 Ago. 2019
- Bateman, R.M.; Smith, R.J.; Fay, M.F. (2008). Morphometric and population genetic analyses elucidate the origin, evolutionary significance and conservation implications of *Orchis x angusticruris* (*O. purpurea* x *O. simia*), a hybrid orchid new to Britain. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 157: 687-711.
- Behling, H. (2002). South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 177: 19-27.
- Behling, H.; Lichte, M. (1997). Evidence of dry and cold climatic conditions at glacial times in tropical southeastern Brazil. *Quat. Res.* 48: 348-358.
- Behling, H.; Negrelle, R.R.B. (2001). Late Quaternary tropical rain forest and climate dynamics from the Atlantic lowland in southern Brazil. *Quat. Res.*; 56: 383-389.
- Bennett, K.D.; Provan, J. (2008). What do we mean by 'refugia'? *Quat. Sci. Rev.* 27: 2449-2455.
- Bookstein, F.L. (1991). Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge University Press, Cambridge, 435p.
- Carnaval, A.C.; Hickerson, M.J.; Haddad, C.F.B.; Rodrigues, M.T.; Moritz, C. (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, 323: 785-789.
- 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

- Cogniaux, A. (1898). Orchidaceae: Laelinae. pp. 188-254 In Martius, Flora Brasiliensis. Volume III (5).
- Dressler, R.L. (1981). *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press .
- Dressler, R.L. (1993). *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge: Harvard University Press .
- Fowlie, J.A. (1977). The Brazilian bifoliate *Cattleyas* and their color varieties. Azul Quinta Press, Pomona, California. 132p.
- Graham, J.H.; Raz, S.; Hel-Or, H.; Nevo, E. (2010). Fluctuating asymmetry: methods, theory, and applications. *Symmetry*, 2(2): 466-540.
- Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165: 131-137.
- Lens, L.; Van Dongen, S.; Matthysen, E. (2002). Fluctuating asymmetry as an early warning system in the critically endangered Taita thrush. *Conservation Biology*, 16(2): 479-487.
- Metzger, J.P. (2009). Editorial Conservation issues in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Conservation*, 142: 1138-1140.
- Micheneau, C.; Duffy, K.J.; Smith, R.J.; Stevens, L.J.; Stout, J.C.; Civeyrel, L.; Cowan, R.S.; Fay, M.F. (2010) Plastid microsatellites for the study of genetic variability in the widespread *Cephalanthera longifolia*, *C. damasonium* and *C. rubra* (Neottieae, Orchidaceae), and cross amplification in other *Cephalanthera* species. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 163: 181-193.
- Monteiro, L.R.; Reis, S.F. (1999). *Princípios de Morfometria Geométrica*. Holos, São Paulo, 188p.
- Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.; Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858.
- Pabst, G.F.J.; Dungs, F. (1975). *Orchidaceae Brasiliensis*. Vol. 1. Brucke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim, Alemanha, 408p.
- Pinheiro, F.; Barros, F.; Palma-Silva, C.; Fay, M.; Lexer, C.; Cozzolino, S. (2011). Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: A Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography*, 38: 1923-1935
- Pinheiro, F.; Cardoso-Gustavson, P.; Mamoru, R.; Abrao, M.; Guimaraes, L.; Draper, D.; Moraes, A. (2015). Strong postzygotic isolation prevents introgression between two

- hybridizing neotropical orchids, *Epidendrum denticulatum* and *E. fulgens*. *Evolutionary Ecology*, 29: 229-248.
- Pinheiro, F.; Cozzolino, S.; De Barros, F.; Gouveia, T.M.Z.M.; Suzuki, R.M.; Fay, M.F.; Palma-Silva, C. (2013). Phylogeographic Structure and Outbreeding Depression Reveal Early Stages of Reproductive Isolation in the Neotropical Orchid *Epidendrum denticulatum*. *Evolution*, 67: 2024-2039.
- Pinheiro, F.; Palma-Silva, C.; Barros, F.; Félix, L.P.; Lexer, C.; Cozzolino, S.; Fay, M.F. (2009). Chloroplast microsatellite markers for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*, and cross-amplification in other Laeliinae species (Orchidaceae). *Conservation Genetics Resources*, 1(1): 505-511.
- Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W.; Rasmussen, F.N.; (eds.), (1999). *Genera Orchidacearum*, v. 1. Oxford University Press, New York.
- Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W.; Rasmussen, F.N.; (eds.), (2001). *Genera Orchidacearum*, v. 2. Oxford University Press, New York.
- Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W.; Rasmussen, F.N.; (eds.), (2003). *Genera Orchidacearum*, v. 3. Oxford University Press, New York.
- Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W.; Rasmussen, F.N.; (eds.), (2005). *Genera Orchidacearum*, v. 4. Oxford University Press, New York.
- Ribeiro, C.R.; Metzger, J.P.; Martensen, A.C.; Ponzoni, F.J.; Hirota, M.M. (2009). The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142: 1141-1153.
- Ribeiro, R.A.; Lemos-Filho, J.P.; Ramos, A.C.S.; Lovato, M.B. (2011) Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, 106: 46-57.
- Rolfe, R.A. (1895). *Cattleya* - What constitutes a species? *Orchid Review*, 3: 266-270.
- Salgueiro, F.; Felix, D.; Caldas, J.F.; Margis-Pinheiro, M.; Margis, R. (2004) Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. *Diversity and Distributions*, 10: 201-210.
- Sanseverino, A.M.; Nessimian, J.L. (2008). Assimetria flutuante em organismos aquáticos e sua aplicação para avaliação de impactos ambientais. *Oecologia Brasiliensis*, 12(3): 4.

- Santos, T.M. (2011). *Eventos antigos de especiação híbrida no grupo bifoliado do gênero Cattleya Linl. (Orchidaceae) inferidos a partir de uma filogenia baseada em 16 regiões de DNA nuclear e plastidial*. Tese de Mestrado, UEFS, 66p.
- Scarano, F.R. (2002) Structure, function and floristic relationships of plant communities in stressful habitats marginal to the Brazilian Atlantic Rainforest. *Annals of Botany*, 90: 517-524.
- Silva, J.M.C.; Sousa, M.C.; Castelletti, C.H.M. (2004). Areas of endemism for passerine birds in the Atlantic forest, South America. *Global Ecology and Biogeography*, 13: 85-92.
- SOS Mata Atlântica, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. (2008). Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica, período de 2000 a 2005. São Paulo, Brasil.
- Stehmann, J.R.; Forzza, R.C.; Salino, A.; Sobral, M.; Costa, D.P.; Kamino, L.H.Y. (editores). (2009). *Plantas da Floresta Atlântica*. Ed. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 516p.
- Thomé, M.T.C.; Zamudio, K.R.; Giovanelli, J.G.R.; Haddad, C.F.B.; Baldissera, F.A.; Jr.; Alexandrino, J. (2010) Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 1018-1031.
- Tomé, T.M. (2016). *Filogeografia de Cattleya loddigesii Lindl. e Cattleya harrisoniana (ex Lindl.) Bateman (Orchidaceae)*. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 121p.
- van den Berg, C. (1996). *Estudo da variabilidade intra e interespecífica em populações de espécies brasileiras de Cattleya (Orchidaceae-Laeliinae)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 154 p.
- van den Berg, C. (2008). New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). *Neodiversity* 3: 3-12.
- van den Berg, C. (2014). Importance of hybridization for the evolution of *Cattleya*. *Renziana* 4: 74-79.
- van den Berg, C.; Higgins, W.E.; Dressler, R.L.; Whitten, W.M.; Soto Arenas, M.A.; Culham, A.; Chase, M.W. (2000). A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* 15(2): 96-114.

- van den Berg, C.; Higgins, W.E.; Dressler, R.L.; Whitten, W.M.; Soto-Arenas, M.A.; Chase, M.W. (2009). A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. *Ann. Bot.* 104 (3): 417-430.
- van den Berg, C.; Martins, P.S. (1998). Biogeography of Brazilian *Cattleyas*: geographic distribution, morphological variability, evolutionary and taxonomic consequences. In: Pereira, C. E. B. *Proceedings of the 15th World Orchid Conference (Rio de Janeiro, 1996)*. Naturalia Publications, Turriers, France, pp. 315-320.
- van der Pijl, L.; Dodson, C.H. (1966). *Orchid flowers: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables, Florida.

Capítulo 1

Title: Phylogeographical studies of the epiphytic orchids *C. intermedia* and *C. forbesii* support the permanence of multiple refugia throughout the Pleistocene in the south of the Brazilian Atlantic Forest

Evelyne Marques Marreira¹ & Cássio van den Berg¹

¹ Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina s.n., 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

Artigo submetido a publicação para a revista Plants

Phylogeographical studies of the epiphytic orchids *C. intermedia* and *C. forbesii* support the permanence of multiple refugia throughout the Pleistocene in the south of the Brazilian Atlantic Forest

Evellyne Marques Marreira¹ & Cássio van den Berg¹

¹ Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina s.n., 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

ABSTRACT:

Cattleya forbesii and *C. intermedia* are sister species of epiphytic orchids that occur in Southeast and South Brazil. They are distributed mostly along the coastal plains, and their populations form disjunct blocks of populations alternating between species, with almost no signal of introgression and rarely sympatric. The current study aims to investigate the structure and genetic diversity at species and population levels in relation to the current theories of the biogeography of the Brazilian Atlantic Forest (BAF), especially in relation to the population blocks. For this, we sequenced two plastid intergenic spacers (*rpl32-trnL* e *atpI-atpH*) and the nuclear internal transcribed spacers (ITS) for eight populations of *C. forbesii* and 18 of *C. intermedia*, that sample all the range of occurrence of both species. Phylogeographic analyses indicated a strong genetic structure, especially in cpDNA and evidence of continuous and recent population expansion. The overall levels of population genetic structure are similar between both species, however, it presents correspondence to the disjunct blocks in *C. intermedia* but not in *C. forbesii*. Divergence time estimates using the haplotypes point out to the persistence of multiple haplotype lineages since before the Pleistocene. The haplotype distributions and dating suggest the existence of multiple refugia in northern Santa Catarina for *C. intermedia*, and the São Paulo interior plateau for *C. forbesii*. We also found some haplotype sharing that suggests recurrent, subtle introgression along time that is possibly explained by ecological similarity and shared ancestry associated to niche conservatism.

KEY WORDS: Brazilian Atlantic Forest; Orchidaceae; *Cattleya*, genetic diversity; genetic structure; refugia; phylogeography

INTRODUCTION

The Brazilian Atlantic Forest (BAF) is a priority for conservation, especially due to its high levels of endemism, species richness and habitat loss, being one of the main world biodiversity hotspots [1,2]. The biome is rather complex and has been the focus of several studies aiming to clarify the origin of its species diversity and endemism. It occupies the eastern coast of Brazil, but also penetrates inland reaching eastern Paraguay and northeastern Argentina [3]. Only about 7.3% of the primary forest remains due to drastic changes in soil use that caused habitat loss and fragmentation [2]. Because of the threat, studies trying to assess the dynamics of this biome increased recently, but due to the high complexity and richness the biodiversity patterns are difficult to disentangle, and each additional contribution helps to solve and clarify the puzzle.

One of the probable causes of the high species diversity in BAF were evolutionary processes at a global scale, such as climatic oscillations during the Pleistocene [4]. According to these refuge theories, the glacial and interglacial cycles would cause reduction, fragmentation and re-expansion of forest habitats, in which the tropical forests would shrink in the colder glacial maxima becoming refuges, and later re-expand during the warmer periods, in the opposite fashion when compared to open vegetation types [5].

The model proposed by Carnaval e Moritz [4] was based in niche modeling and phylogeography of species endemic to BAF, and suggest an unequal distribution between the portions of the BAF in the Last Glacial Maximum (LGM). In this model, the stable areas with humid forest would have been restricted to the north and central part of the biome. In the southern portion (south of the Doce river) the forest habitats would be nearly eliminated by intense fragmentation, and later recolonized from sources in refuges in the north during the Holocene [4,6]. Several other studies tried to explore and assess this hypothesis, but different contrasting scenarios emerge. Some phylogeographical studies corroborate the hypotheses [7-13]. However, other studies found high levels of genetic diversity in the south portion of BAF, and indicated the likely existence of forest refuges in the south portion during the LGM [14-19], and therefore the distinct patterns recovered for the north and southern portion of BAF are still under debate.

In addition to refuge theory, some studies have proposed other causes for the species diversity in BAF, such as changes in sea level [20]. In this scenario, the successive marine transgressions and regressions during the Pleistocene and Holocene would be a

plausible explanation for species diversity patterns in BAF [20-23]. Based on niche modeling and coalescent simulations, Leite et al. [20] inferred that during the LGM there would have been an expansion of the climatic conditions in the continental platform that would have allowed population expansion of small mammal species. These authors hypothesized that the expansion was due to changes in sea level (regression) and proposed that this phenomenon could be one of the key factors to explain the historical biogeography and diversity patterns in BAF.

The orchid family (Orchidaceae) is one of the most diverse groups of flowering plants, with more than 26 thousand species [24]. It occurs in all biomes and is broadly distributed due to its adaptive success based on diverse pollination syndromes and large morphological variation [25]. *Cattleya* Lindl. is a Neotropical genus with ca. 115 showy species that are commonly cultivated in horticulture, and whose center of species diversity is in eastern Brazil. This diversity is probably related to pollinator specialization as well as adaptations to different habitats [26]. *Cattleya forbesii* Lindl. and *C. intermedia* Graham ex Hooker belong to a genus whose species are mostly broadly distributed epiphytes in BAF, and are sister species [27,28], cited by van den Berg [29] as distributed predominantly along the shore in the BAF between 22° S and 30° S (that correspond to the Brazilian States of Rio de Janeiro to Rio Grande do Sul). According to van den Berg [29] they do not present any taxonomic difficulty in terms of morphological separation, but display an intriguing alternating north-south distribution pattern along the shore. *C. intermedia* is separated in three disjunct population blocks along the north-south coast (northern Rio de Janeiro, northern São Paulo and a larger block from northern Santa Catarina to Rio Grande do Sul, Fig. 1), while *C. forbesii* is separated in two disjunct areas in the coastal area that intercalate those of *C. intermedia* (Angra dos Reis to Rio de Janeiro city, and southern São Paulo, Paraná and northern Santa Catarina). Besides these coastal distribution blocks, *C. forbesii* has some sparse populations that appear in the inland plateau of São Paulo and Paraná, and in this way, both species occur in several types of habitats, such as strand vegetation, coastal forests (flooded or not), and drier forests in the inland plateau [28]. This more or less linear, alternated and long distribution qualify *C. forbesii* and *C. intermedia*, as an excellent model to investigate the evolutionary history of BAF epiphytic species.

In the present study we combine DNA sequence data from nuclear and plastid loci with the purpose of examining the historical and phylogeographical patterns within *C. forbesii* and *C. intermedia* in the full range in the southern portion of the BAF, and the

following questions: (1) Can we identify areas of forest epiphyte refugia in BAF in relation to the three population disjunct blocks found in each species, and where they would be located? (2) Do the separate blocks correspond to old vicariant areas that were maintained in the Pleistocene or reflect recent colonization of the species? (3) How do the origin and dispersion along the time of the two species in different blocks compares with the current theories for the shrinking and expansion of the BAF and marine transgressions and regressions in the Pleistocene?

MATERIAL AND METHODS

Population sampling and DNA extraction

The population sampling was designed to represent the geographical range of the species including populations from the three disjunct blocks of populations (Table 1, Figure 1.) found in *C. intermedia* along the coast (north, central and south), and *C. forbesii* (coastal north, coastal south and interior), all located in the in the Southern portion of the Atlantic Forest (in the Carnaval & Moritz model), Brazilian states of Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul. We sampled 26 populations, being eight from *C. forbesii* and 18 from *C. intermedia* (Table 1, Figure 2-3).

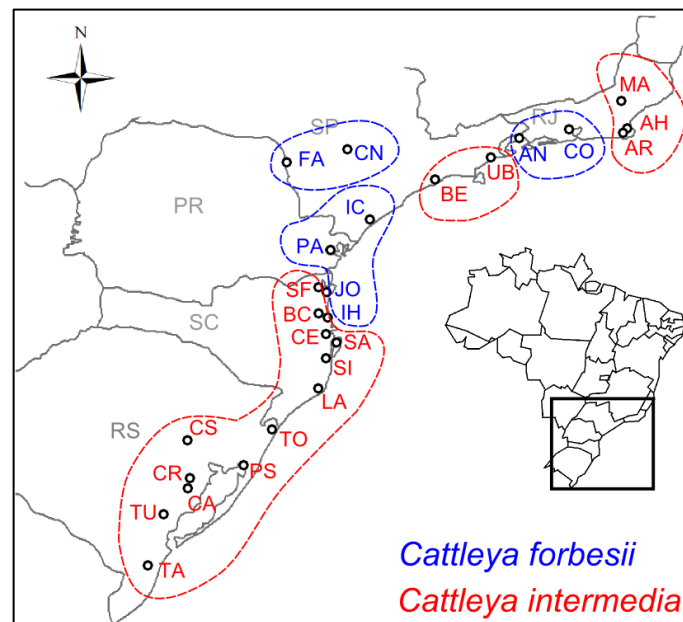


Figure 1 - Population distribution of *Cattleya forbesii* and *C. intermedia* along the Brazilian east coast, highlighting the occurrence of disjunct blocks between species.

Leaf samples were collected in the wild, and were stored in 1.5mL plastic vials with 1mL CTAB gel (30 mg CTAB, 350 mg NaCl dissolved in 1 mL distilled water; Rogstad [30]). DNA extractions were performed with a modified version of the Doyle e Doyle [31] CTAB protocol, which included grinding the leaf tissue in 1mL of STE (Sucrose Tris-EDTA, 50 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, 0.75 M Sucrose), followed by a centrifugation discarding the supernatant, and then moving the solid part to the standard CTAB protocol rescaled to 1mL. DNA quantity in samples were estimated by eye in 1% agarose gels stained with ethidium bromide, and by NanoDrop spectrophotometry (Thermo Fisher Scientific, Waltham city, MA, USA) spectrophotometry and standardized to 20ng/μL.

DNA regions, amplification and sequencing protocols

Due to the high levels of variation and comparability we used the previous selection of DNA regions (ITS, and *rpl32-trnL*, *atpI-atpH* intergenic spacers of cpDNA) used for the closely related *C. loddigesii* and *C. harrisoniana* [32]. This author screened a larger set of regions previously used at population levels in subtribe Laeliinae and Orchidaceae [23,28,33-35].

Amplification and sequencing were performed in the Plant Molecular Systematics Laboratory (LAMOL) at Universidade Estadual de Feira de Santana, using a GeneAmp System 9700 (Applied Biosystems) and the ABI3130XL automated sequencer (Applied Biosystems).

Polymerase chain reaction (PCR) amplifications were performed with the primers in Table S1. For cpDNA (*rpl32-trnL*, *atpI-atpH*) we used 20μL reactions with 0.5 units of Taq DNA polymerase (Phoenix Biotoools) 2 μL 10× buffer (100 mM Tris-HCl), 3 mM MgCl₂, 0.15 mM dNTP, 3 pmol each primer, 0.3 μL of TBT mixture [36] and 20ng total DNA. For ITS we used 16μL reactions with 1.5 units Taq polymerase (Phoenix Biotoools), 1.6 μL 10× buffer (100 mM Tris-HCl), 2.34 mM MgCl₂, 0.18 mM dNTP, 3 pmol each primer, 0.3 μL de TBT, 0.3 μL de DMSO 2% and 1M de Betaine and 20ng total DNA.

PCR products were checked for amplification in 1% agarose gels and ethidium bromide and then cleaned using Polyethylene glycol precipitation (PEG 8000 10% de NaCl 2,5 M, Parveen e Sahoo [37]) and then resuspended in ultrapure water and quantified with NanoDrop spectrophotometry. Sequencing was performed bidirectionally with 10 μL reactions with 1.75 μL 5× buffer, 0.5 μL of Big Dye 3.1 (Applied Biosystems),

3pmol of the same primers used in PCR and 3ng of PCR product for each 100bp of size. Sequencing reaction was 96° C for 3min and 35 cycles in plastids and 28 cycles in ITS, of 96° C for 15s 50°C 10 s and 60° C for 4 min.

Table 1 - Populations sampled with municipality, population code, number of individuals collected voucher information for the populations of *Cattleya forbesii* and *C. Intermedia* used in the present study. Acronyms for Brazilian States: RJ=Rio de Janeiro, SP=São Paulo, PR=Paraná, SC=Santa Catarina and RS=Rio Grande do Sul.

Species	Geographical block	Location	n	Population Code	Voucher	
					Collector	Collection
<i>C. forbesii</i>	North	Cordovil, RJ	8	CO	Brieger Coll .16028	ESA
	North	Angra dos Reis, RJ	10	AN	Brieger Coll .32070	ESA
	Interior	Conchas, SP	6	CN	Brieger Coll .2455	ESA
	Interior	Fartura, SP	6	FA	Brieger Coll .9947	ESA
	South	Ilha Comprida, SP	8	IC	Brieger Coll .9633	ESA
	South	Paranaguá, PR	6	PA	Brieger Coll .5358	ESA
	South	Ilhota, SC	8	IH	Van den Berg 2564	HUEFS
	South	Joinville, SC	8	JO	Mancinelli 1501	JOI
<i>C. intermedia</i>	North	Arraial do Cabo, RJ	7	AR	Van den Berg & Marreira 2745	HUEFS
	North	Arraial do Cabo, RJ	8	AH	Van den Berg & Marreira 2743	HUEFS
	North	Macaé, RJ	9	MA	Alan Jr. s.n.	HUEFS
	Central	Ubatuba, SP	6	UB	Van den Berg & Marreira 2746	HUEFS
	Central	Bertioga, SP	8	BE	Van den Berg 2618	HUEFS
	South	São Francisco do Sul, SC	8	SF	Van den Berg 3006	HUEFS
	South	Balneário Camboriú, SC	9	BC	Medeiros s.n.	CRI
	South	Gov. Celso Ramos, SC	8	CE	Van den Berg 3000	HUEFS
	South	Florianópolis, SC	6	SA	Van den Berg 2851	HUEFS
	South	Garopaba, SC	8	SI	Van den berg 2999	HUEFS
	South	Laguna, SC	6	LA	Van den Berg 3005	HUEFS
	South	Torres, RS	6	TO	Frosi 510	HAS
	South	Cruzeiro do Sul, RS	8	CS	Freitas s.n.	HVAT
	South	Palmares do Sul, RS	8	PS	Valduga 133	HUCS
	South	Cerro Grande do Sul, RS	8	CR	Van den Berg 2928	HUEFS
	South	Camaquã, RS	8	CA	De Marchi s.n.	PACA
	South	Turuçu, RS	8	TU	Van den Berg 3007	HUEFS
	South	Rio Grande, RS	8	TA	Waechter 2203	ICN

DNA sequences were assembled, checked and edited with Staden 1.6 [38]. The matrices were prepared with an initial alignment using MUSCLE [39] followed by manual corrections.

Phylogeographic Methods

For analyses of DNA polymorphism, such as haplotype number (h), sequence size (pb), number of polymorphic sites (S), Haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity (π) we used Arlequin 3.5 [40] and DNAsp [41], as well as the haplotype estimation necessary for using Network [42] and PhyloGeoViz [43].

We also used Arlequin to calculate F_s [44] e D [45] tests, with 1.000 permutations, in order to test neutrality since the variation in these values can indicate deviations from neutral equilibrium under influence of mutations in the populations. We also used Arlequin to perform Analysis of Molecular Variance (AMOVA) separately with the cpDNA and nuclear ITS, that was based on pairwise F_{ST} testes from pairwise distances and 1.000 permutations [46].

The haplotype distribution map of *C. forbesii* and *C. intermedia* was prepared using PhyloGeoViz [43] online software with the haplotypes generated in DNAsp, and geographical coordinates of each population. The same haplotypes were used to generate an haplotype network based in median-joining network estimation with the software Network [42].

The estimates of divergence times among haplotypes of ITS and plastid were built separately, using BEAST 1.10 [48]. For this purpose we used additional sequences of *Cattleya loddigesii*, *C. harrisoniana*, *C. amethystoglossa*, *C. tenuis*, *Guarianthe skinneri* e *Brassavola tuberculata* to serve as outgroups, after realigning them to the haplotype matrices. DNA sequence models were selected using MrModeltest v.2 [49]. The plastid regions were concatenated as a single locus with a single model, while only ITS1 and ITS2 were modeled together, after removing the flanking partial 18S and 26S, and the 5.8S sequences which are invariable. Molecular dating was performed with BEAST 1.10, using a the following parameters: strict clock, constant population size coalescent tree model, secondary calibration with normal distribution, initial in 12 Mya, (mean 10.1438 and sd=1.394) in the crown node of *Cattleya* [32]. The run consisted of two chains with 300×10^6 generations sampling one tree every 1,000, and 25% of burn-in (75 thousand trees). The convergence between chains and performance were assessed

with Tracer [50] so that the estimated sample size (ESS) of each parameter was >200. After burn-in, the remaining trees of both runs were pooled processed with TreeAnnotator, part of BEAST 1.10 and the maximum credibility tree (MCC) were visualized in Figtree 1.4.2 [51], and then exported and edited in Inkscape 0.91.

The connectivity between populations was assessed through model-based Bayesian inference of migration parameters, as implemented in MIGRATE-N 3.6.11 [52], that allows the comparison of genetic demographic models with different numbers of parameters of migration (Nm) and effective population size (N_e), by running MCMC simulations with each model, and calculating a global likelihood of each model with thermodynamic integration. Later these likelihoods can be compared using Bayes Factors [53]. Due to the fact that we used only two loci (plastid and nuclear) we refrain from using the large number of Nm and N_e parameter results due to lack of robustness, but focus only in the overall model comparison. For *Cattleya forbesii* we designed 12 models, comparing structure (separated populations, geographically pooled populations, and panmictic), inclusion or not of Isolation-by-Distance (IBD) parameters, or different combinations of bidirectional and unidirectional migration parameters (Figure S1-3, Table S2-3). In *intermedia* we tested 22 different migration models, considering different clusters of blocks of populations, bi- and unidirectional migration parameters and Isolation by Distance (Figure S1-3, Table S2-3). All runs of migrate-N were performed with the sequence data pooled into two blocks (nuclear and plastid) and HKY model with two different transition:transversion rates (2.7564 and 0.4855 respectively, inferred in Modeltest), and base frequencies inferred from the data, and inheritance scalars 1.0 and 0.25. We used as priors for theta 0 to 0.2, and migration 0 to 3,000, optimized using pilot runs. For the final runs, we used four chains with different temperatures (1.00; 1.50; 3.0 e 1,000,000), and 10 replicates of 40,000 burn-in and 40,000 recording states, every 20 trees (total of 800,000 burn-in generations followed by 800,000 generations). The recorded samples of all 10 runs were pooled together. All the replicates were performed in parallel using multiple core processors in the CIPRES platform [54].

To infer the lineage dispersion process among the sampled locations and simultaneously the evolutionary history through time, we used the discrete diffusion method of Lemey et al. [55]. In this analysis we performed two separate analysis, for *C. forbesii* and *C. intermedia*, due to the large number of populations. Initially we used BEAST 1.10, with the combined sequence data (plastid and nuclear), using as calibration the individual clock rates inferred, being 2.1602×10^{-3} and standard deviation (sd) of

6.8553×10^{-4} for ITS and 8.2003×10^{-4} and sd of 1.8196×10^{-4} for cpDNA limiting root height with an uniform distribution [0, 9.5 mya, based on the haplotype dating analyses in the present study]. To polarize the haplotypes temporally, we included as outgroup one *C. harrisoniana* haplotype that was later manually pruned from the Maximum Credibility Tree (MCC) before running SPREAD. We selected the discrete discretized spatial diffusion model, applying the Bayesian Stochastic Search Variable Selection (BSSVS) to obtain statistical efficiency. The run consisted of 10×10^6 generations and convergence and stabilization were assessed with Tracer 1.6 [51]. The MCC was then generated with TreeAnnotator and used with Spread3 [56]. In this program we inferred the diffusion using the coordinates and the results were exported as a kml file for visualization with Google Earth software.

To assess the temporal evolution of population size (N_e) over time for the whole species, we used two separate analyses of Extended Bayesian Skyline Plots (EBSP) as provided in Beast 2 [57]. For such, all samples of each species were included, and we the models HKY+I and GTR+I were used for ITS and cpDNA, respectively (inferred with Modeltest). The calibration was performed with the same evolutionary rates used for the SPREAD analysis. The run consisted of 10×10^6 generations, after which the trees were inspected in Tracer 1.7 to check for stabilization and ESS>200 for all parameters. Following that, we analyzed and produced the population growth graph using the R script provided by Heled [58].

To identify probable biogeographic limits or areas with larger genetic discontinuities between population pairs we used BARRIER 2.2 [59], that implements the Monmonier's algorithm based on the pairwise *Fst* matrix.

RESULTS

Sampling

As a whole we sampled eight populations of *C. forbesii* (61 individuals), and 2,248 bp of aligned sequences, of which 629 bp correspond to ITS and 1,619 of cpDNA after concatenation of the two spacers. For *C. intermedia* we sampled 18 (139 individuals), and 2,268 bp of aligned sequences (635 bp of ITS and 1,633 bp of cpDNA). In the present study we generated 182 sequences of the Internal Transcribed Spacer of rDNA (nrITS) and the plastid spacers *atpI-atpH* e *rpl32-trnL*. One of the *C. intermedia*

populations from Arraial do Cabo, Rio de Janeiro (AH) displayed morphological clues of introgression with *C. guttata*, which was also abundant in the collection site. Due to the possibility of introgression we sampled ten individuals of *C. guttata* and ten of *C. tigrina*, respectively sympatric to the AH and CR populations of *C. intermedia*. However, after checking the possibility of introgression by comparison of their haplotypes with our target populations and not finding any evidence, they were not included in any subsequent analyses.

Genetic diversity and haplotype distribution

Genetic diversity indexes were calculated separately for ITS and cpDNA (Table 2). For nuclear data, the number of haplotypes was the same in both species, but in *C. forbesii* haplotype diversity (Hd) was higher considering the smaller sample size in relation to *C. intermedia*. For plastid data, *C. intermedia* presented slightly higher number of haplotypes (21 vs. 19), but again haplotype diversity was lower in relation to *C. forbesii* due to sample sizes.

Considering the individual populations, the indexes were displayed together to show haplotypes shared between species (Table 3). In this case we obtained 24 haplotypes for ITS and 28 for cpDNA. Haplotype diversity in populations for ITS ranged from 0 to 0.89, while nucleotide diversity ranged from 0 to 0.0049. For the cpDNA data, haplotype diversity ranged from 0 to 0.78 and nucleotide diversity from 0 to 0.0020.

Few haplotypes are shared between the species (four in ITS and three in cpDNA). Among them, Hap_1 of ITS was the most common, found in 23 of the 26 populations. In the cpDNA, Hap_1 was the most frequent, but is mainly found in *C. intermedia*, and only in the Fartura (FA) population of *C. forbesii*. Hap_12 was the most commonly found in *C. forbesii*, absent only in the Ilha Comprida (IC) population. In general, the populations of *C. forbesii* were more polymorphic in both nuclear and plastid data. In the case of *C. intermedia*, despite presenting the largest number of monomorphic populations (ITS: AR, AH, MA, UB, AS, SI, CS, TU, TA; cpDNA: AR, BE, TO, CS, PS, CR, CA, TU), it also has the most diverse populations based on haplotype diversity (São Francisco do Sul (SF) with 0.89 in ITS, and Siriú (SI), with 0.78 in cpDNA. Among the *C. forbesii* populations, AN, FA and IH presented the largest number of haplotypes in ITS (four) and FA, IC for cpDNA (four), while in *C. intermedia* the largest number of haplotypes was observed in SF for ITS (five haplotypes) and MA, BC, CR and Ci for cpDNA (four haplotypes).

Table 2 - Genetic and haplotype diversity in 26 populations of *Cattleya forbesii* and *C. intermedia* based on nuclear (ITS) and cpDNA (concatenated *atpI-atpH* and *rpl32-trnL* spacers) sequence data.

<i>Cattleya forbesii</i>	ITS	cpDNA
Sample size (N)	61	61
Aligned length (pb)	629	1.614
Number of polymorphic sites (S)	10	22
Number of haplotypes (h)	13	19
Haplotype diversity (Hd)	0.76885	0.81257
Nucleotide diversity (π)	0.00301	0.00215
Tajima's D	0.49175	-0.11899
Fu's FS	5.07244	7.79530
<i>Cattleya intermedia</i>	ITS	cpDNA
Sample size (N)	139	139
Aligned length (pb)	635	1.633
Number of polymorphic sites (S)	11	20
Number of haplotypes (h)	13	21
Haplotype diversity (Hd)	0.42533	0.77124
Nucleotide diversity (π)	0.00174	0.00161
Tajima's D	0.19276	-0.30648
Fu's FS	1.56657	4.38719

The haplotype networks were also prepared jointly for the species and are presented in Figure 2-3. In a brief inspection of the haplotype network patterns, we should highlight the populations of *C. forbesii* from inland plateau of São Paulo State (CN and FA) that present a distinct haplotype composition in relation to the remaining populations, as well as Cordovil (CO).

In the inspection of the ITS haplotype network (Figure 2) we do not observe well defined clusters that we could recognize as haplogroups. However, in the cpDNA network (Figure 3) we have less exclusive alleles and a better separation of the groups between the two species, without a mixture or connections between haplotypes of each species, unlike in ITS. However there are few shared haplotypes.

In relation to the distribution of ITS haplotypes in different regions and populations (Table 3) we point out the *C. forbesii* in the plateau (Conchas, CN and Fartura, FA) that present a distinct haplotype composition with only a single shared with the coastal populations, and the northernmost population Cordovil (CO) that presented clear differentiation. In the *C. intermedia* populations Hap_1 is the most frequent, being absent only in the Torres (TO) population. In the cpDNA haplotypes, Hap_12 is the most

common in *C. forbesii*, being present in all populations except Ilha Comprida (IC), and it appeared also in the São Francisco do Sul (SF) population of *C. intermedia*. In the latter species, the most common haplotype was Hap_1 that predominates in all southern populations in Rio Grande do Sul except Palmares do Sul (PS), which was monomorphic for Hap_3. This same Hap_1 is present in the northernmost populations. In the Santa Catarina there were multiple haplotypes from different lineages in all populations.

Table 3 - Genetic diversity in 26 populations of *C. forbesii* e *C. intermedia* based on ITS and cpDNA (concatenated *atpI-atpH* and *rpl32-trnL* spacers), indicating the number of samples per population (N), haplotype presence, haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity (π).

Species	Pop. code	n	ITS				cpDNA			
			Number of haplotypes	Haplotypes	Hd	π	Number of haplotypes	Haplotypes	Hd	π
<i>C. forbesii</i>	CO	8	3	6,7,8	0.60714	0.00486	3	11,12,13	0.67857	0.00148
	AN	10	4	1,6,7,14	0.73333	0.00298	2	12,20	0.46667	0.00042
	CN	6	2	16,17	0.33333	0.00072	1	12	0	0
	FA	7	4	1,18,19,20	0.71429	0.00370	4	1,12,21,22	0.71429	0.00197
	IC	8	2	1,21	0.28571	0.00062	4	23,24,25,26	0.64286	0.00067
	PA	6	3	1,2,22	0.73333	0.00490	3	12,27,28	0.60000	0.00150
	IH	8	4	1,2,10,23	0.82143	0.00262	2	12,19	0.25000	0.00022
	JO	8	2	1,24	0.53571	0.00231	1	12	0	0
<i>C. intermedia</i>	AR	7	1	1	0	0	1	1	0	0
	AH	8	1	1	0	0	2	1,2	0.25000	0.00067
	MA	9	1	1	0	0	4	1,3,4,5	0.75000	0.00115
	UB	6	1	1	0	0	2	4,6	0.33333	0.00030
	BE	8	3	1,2,3	0.67857	0.00301	1	7	0	0
	SF	8	5	1,5,6,12,13	0.89286	0.00417	3	2,12,19	0.67857	0.00138
	BC	9	2	1,4	0.22222	0.00096	4	1,2,3,8	0.69444	0.00180
	CE	8	3	1,2,5	0.60714	0.00285	4	1,2,9,10	0.75000	0.00209
	SA	6	1	1	0	0	2	1,2	0.33333	0.00090
	SI	8	1	1	0	0	4	3,4,17,18	0.78571	0.00112
	LA	6	4	1,2,6,11	0.80000	0.00259	3	9,15,16	0.46429	0.00067
	TO	6	2	9,15	0.60000	0.00130	1	1	0	0
	CS	8	1	1	0	0	1	1	0	0
	PS	8	2	1,9	0.25000	0.00162	1	3	0	0
	CR	8	3	1,2,9	0.60714	0.00285	1	1	0	0
	CA	8	4	1,2,9,10	0.82143	0.00324	1	1	0	0
	TU	8	1	1	0	0	1	1	0	0
	TA	8	1	1	0	0	2	1,14	0.57143	0.00051

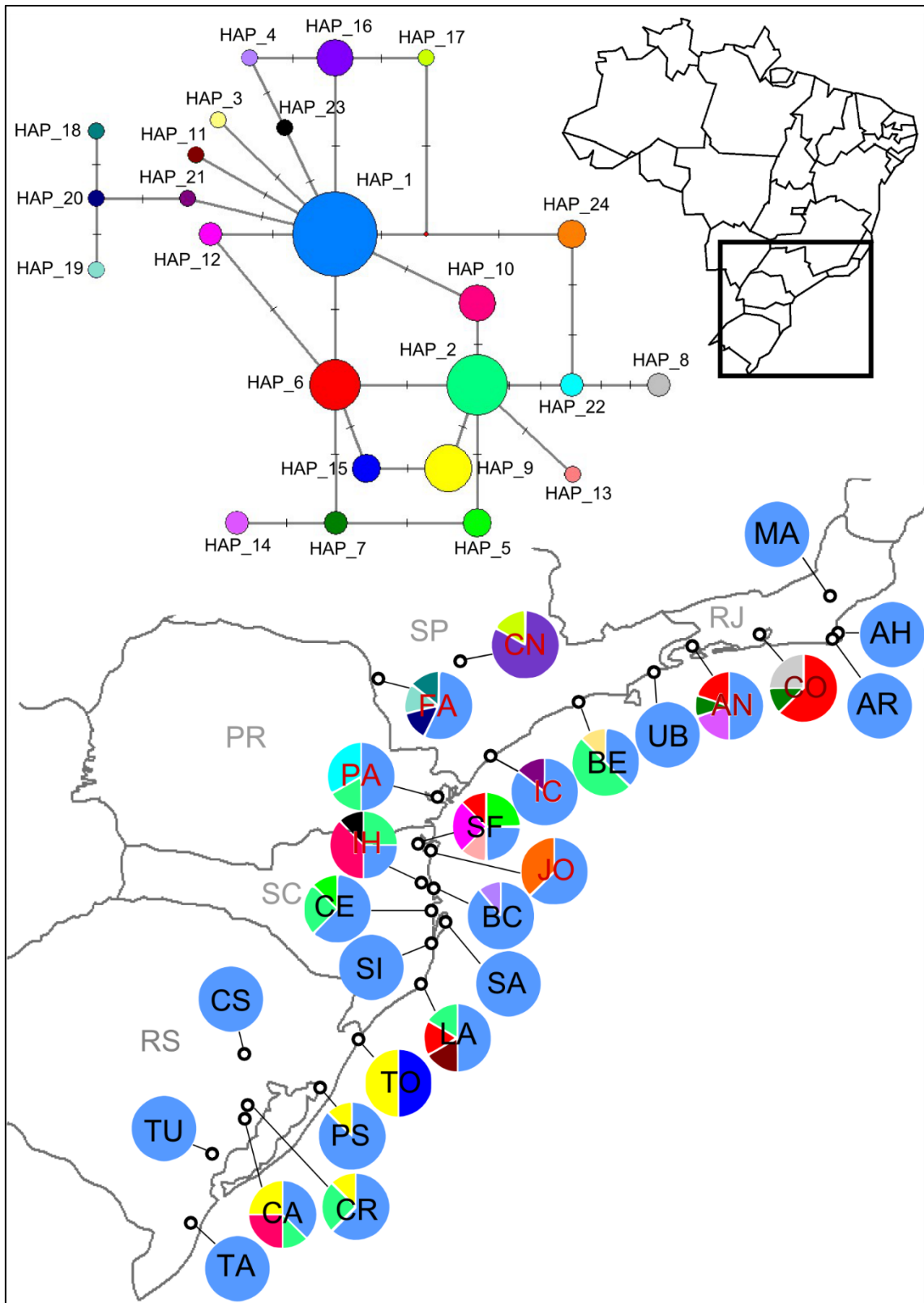


Figure 2 - Haplotype network and geographical distribution of haplotypes of the nuclear ribosomal Internal Transcribed Spacer (nrITS) sequences in 26 populations of *Cattleya forbesii* and *C. intermedia*. Population codes in red font correspond to *C. forbesii* and populations codes in black font are *C. intermedia*.

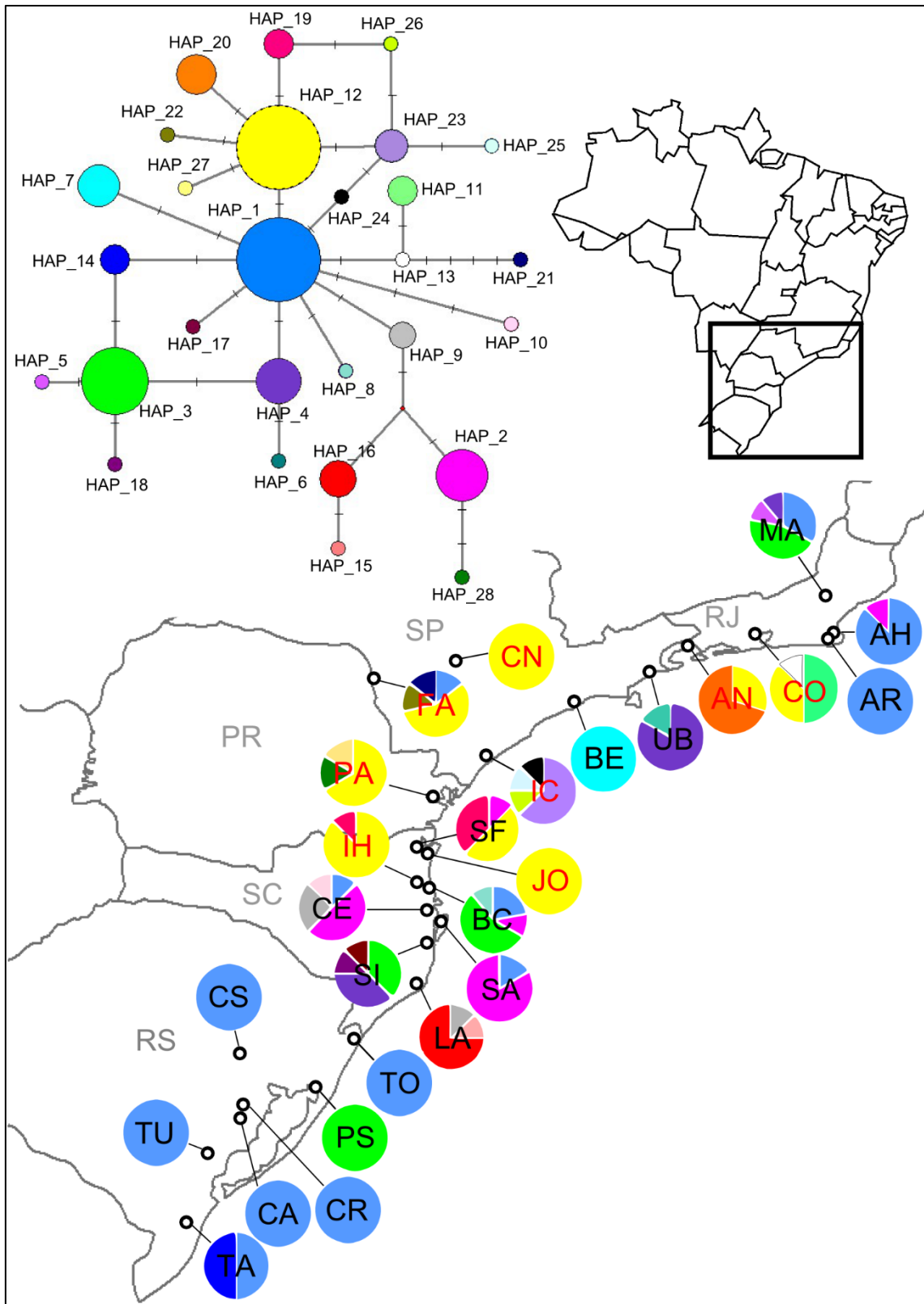


Figure 3 - Haplotype network and geographical distribution of haplotypes of cpDNA sequences (*atpI-atpF* and *rpl32-trnL* intergenic spacers) in 26 populations of *Cattleya forbesii* and *C. intermedia*. Population codes in red font correspond to *C. forbesii* and populations codes in black font are *C. intermedia*.

Demographic history and population structure

Based on the individual neutrality tests for each population (Table S2), in general the FS of Fu was not significant for any population, not even pooling all individuals of a single species. For the Tajima D, we found two populations with negative values in ITS (BC and PS), suggesting a possible population expansion. For the cpDNA, four populations presented significant values (IH, AH, UB, SA).

The AMOVAs for each species indicated similar, moderate population structure in ITS, with PhiST of 0.14 (85% within populations) in *C. forbesii* and PhiST of 0.17 in *C. intermedia*. In cpDNA, the values were much higher (0.49 and 0.75) and *C. intermedia* was more notably structured than *C. forbesii* (Table 4).

The results of the AMOVA partition the variation in the three hierarchical levels in ITS as follows: the main part of the variation is within populations for both species (*C. forbesii* 85%= ϕ_{st} 0.14; *C. intermedia* 84%= ϕ_{st} 0.16, Table 4), and then the variation between populations within the blocks (*C. forbesii* 12%= ϕ_{sc} 0.12; *C. intermedia* 17.6%= ϕ_{sc} 0.17). In the cpDNA the values indicate higher population structure, especially in *C. intermedia*, where a significant portion of the variation corresponds to the disjunct blocks (27.73%), but not in *C. forbesii* (1.52%). In the case of *C. forbesii* there is a high population structure (51%= ϕ_{st} 0.49) but it is not due to the blocks, but diffuse among all populations. In *C. intermedia* we find not only high structure among blocks, but also high structure among populations that is not due to the blocks. (51.44%= ϕ_{sc} 0.71).

Table 4 - Molecular Variance Analysis (AMOVA) for ITS and cpDNA regions considering all *C. forbesii* and *C. intermedia* variables.

Source of Variation	Df	ITS			cpDNA		
		Total Variation (%)	Fixation Indices	Valor P	Total Variation (%)	Fixation Indices	Valor P
<i>Cattleya forbesii</i>							
Among Blocks	2	2.75	ϕ_{CT} 0.027	0.01385	1.52	ϕ_{CT} 0.015	0.01340
Among Populations within Blocks	5	11.93	ϕ_{SC} 0.12	0.00231	47.51	ϕ_{SC} 0.48	0.00000
Within Populations	53	85.32	ϕ_{ST} 0.14		50.97	ϕ_{ST} 0.49	
Total	60						
<i>Cattleya intermedia</i>							
Among Blocks	2	-1.53	ϕ_{CT} -0.015	0.01445	27.73	ϕ_{CT} 0.277	0.00485
Among Populations within Blocks	15	17.65	ϕ_{SC} 0.17	0.00000	51.44	ϕ_{SC} 0.71	0.00000
Within Populations	121	83.87	ϕ_{ST} 0.16		20.83	ϕ_{ST} 0.79	
Total	138						

Molecular divergence of the Haplotypes

The molecular dating of the haplotypes was performed for both species together and is presented in Figure 4-5. The divergence of the ITS haplotypes of *C. forbesii* and *C. intermedia* is about 3.5my before present (mybp). In general, the haplotypes of *C. forbesii* belong to older lineages. The earlier haplotype of *C. forbesii* is in population IC (Hap_21). In *C. intermedia* the earlier haplotypes are Hap_12 (population LA) and Hap_11 (population SF), with diversification between 1.5-2.5 mybp. Among the haplotypes shared between species the earlier seems to be Hap_10 (populations IH and CA), which diversified about 1.5mybp. For the cpDNA, the divergence appears much older, with the divergence between species starting about 7mybp. The earlier haplotype is Hap_10 (in the CE population of *C. intermedia*), which diversified ca. 5.0-5.5 mybp. The earlier haplotype in *C. forbesii* is Hap_21 (FA population), appearing 2.0-2.5 mybp. Among the shared haplotypes, Hap_12 and Hap_19 were the earliest, about 1.5 mybp.

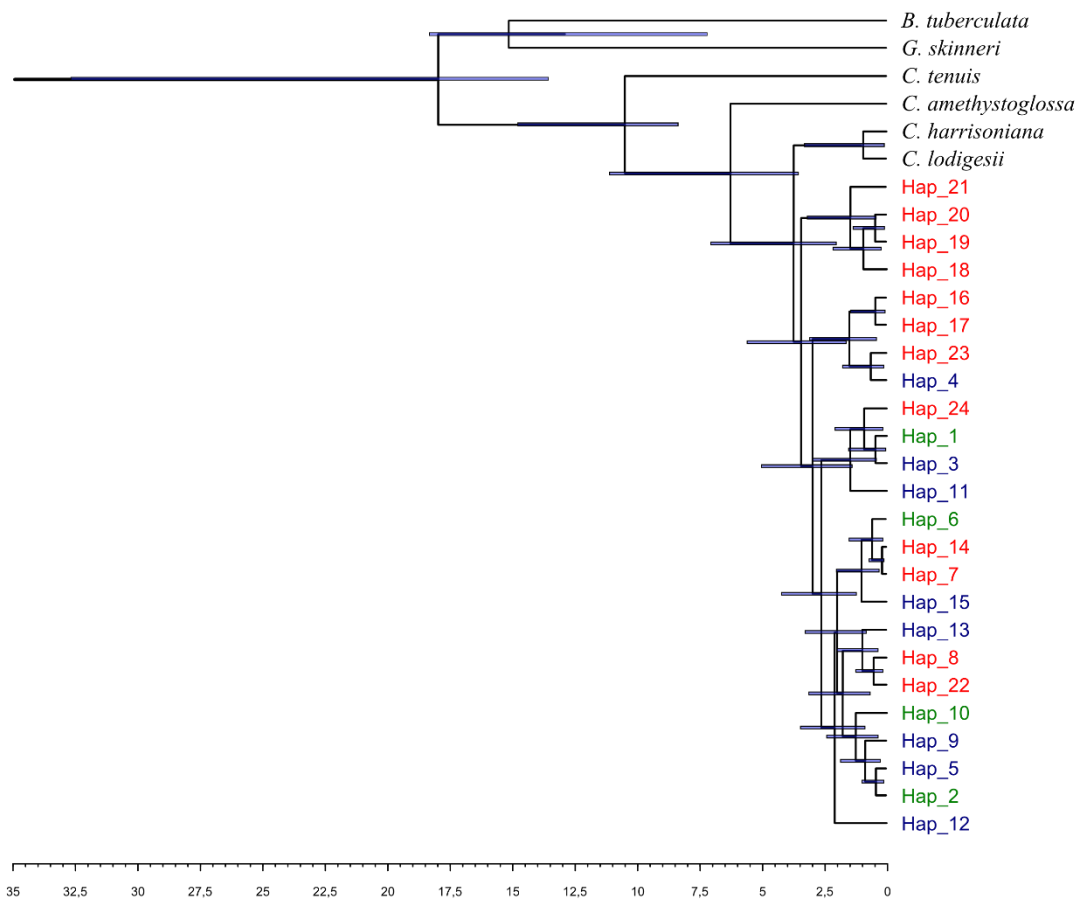


Figure 4 - Molecular dating of ITS haplotypes of *Cattleya forbesii* and *C. intermedia* and selected outgroups. The lower bar indicates time in million of years before present, and the blue bars correspond to confidence limits at 0.95. Haplotypes in red font are exclusive to *C. forbesii*, haplotypes in blue font are exclusive to *C. intermedia* and haplotype in green font are shared between both species. The X axis indicates millions of years before present.

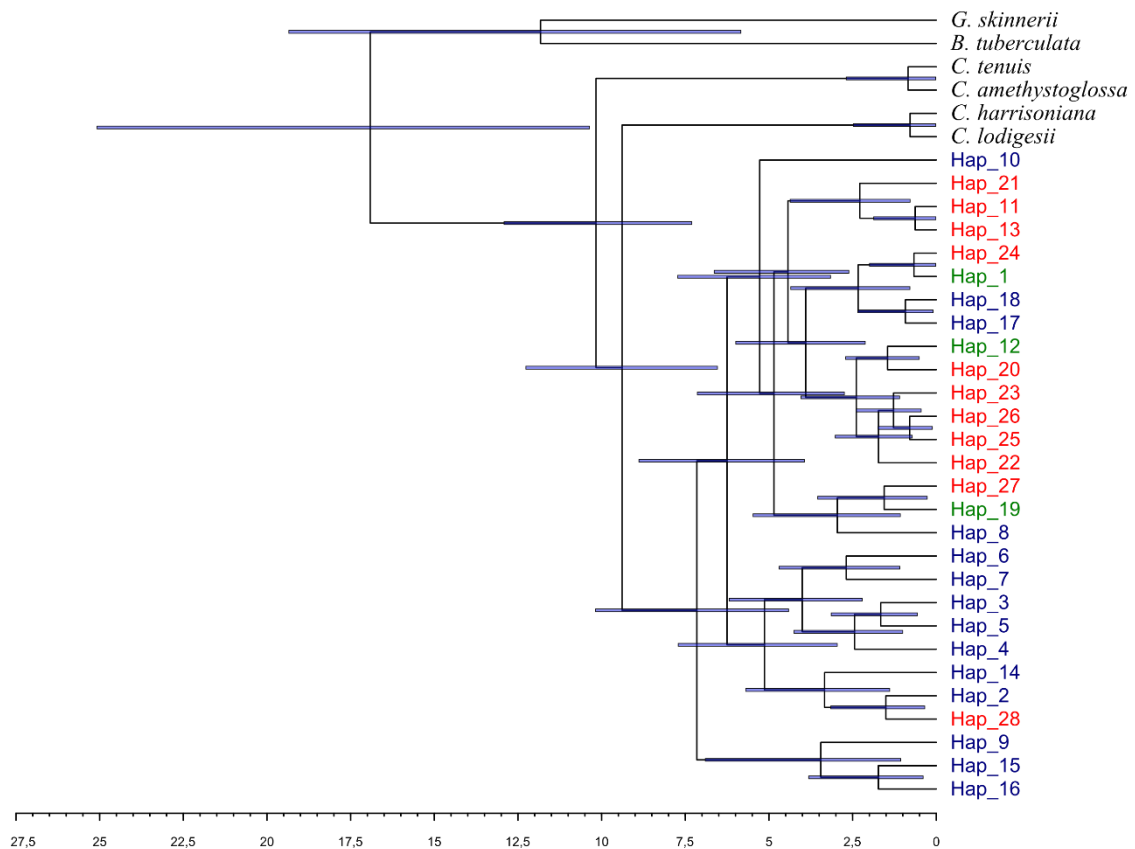


Figure 5 - Molecular dating of cpDNA haplotypes (concatenated *atpF-atpI* and *rpl32-trnL* spacers) of *Cattleya forbesii* and *C. intermedia* and selected outgroups. The lower bar indicates time in million of years before present, and the blue bars correspond to confidence limits at 0.95. Haplotypes in red font are exclusive to *C. forbesii*, haplotypes in blue font are exclusive to *C. intermedia* and haplotype in green font are shared between both species. The X axis indicates millions of years before present.

Genetic demographic model comparison.

The results obtained comparing different models with migrate-N allow assessment based simultaneously on ITS and cpDNA data. In *C. forbesii* (Table S3) the best model was model XII, which is basically a stepping-stone model with bidirectional migration between neighboring populations, and allowing only north to south migration from CO to AN. This model was favored in relation to a similar stepping-stone model bidirectional between all pairs (model IV). The results for *C. intermedia* (Table S4) selected model XIX which is a stepping stone model with bidirectional migration between neighboring populations. We tried to improve model XIX by pooling the very close Arraial do Cabo (AH+AR, model XXII) but this lead to a decrease of likelihood.

Spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics (SPREAD)

The phylogeographic reconstruction based on discrete diffusion was performed separately for both species, assuming an early divergence, and separate history of populations between them. For *C. forbesii* the analysis indicated Fartura (FA) as the geographical origin for all populations sampled in our study, with the dispersion happening from the upper São Paulo plateau to the coastal areas (Figure 6). From Fartura were inferred four dispersion events, two of which reached the northern block of populations Cordovil (CO) e Angra dos Reis (AN), and the other the southern block starting from Paranaguá (PA) and the southernmost population of Ilhota (IL). The northern colonization would have started earlier, from about 4.48 Mya and the southern dispersions around 3.30 Mya, both before the Pleistocene. Ilhota (IL) is reached about 2.17 Mybp, and from this point the migration flow and dispersion happens in shorter intervals with at least four dispersion events. Conchas (CN), despite being located in the same plateau of Fartura (FA), is the latest population to be colonized, maybe reflecting its isolated position in a region where only *C. loddigesii* normally occur. In the case of *C. intermedia*, the coastal slope forests area of Balneário Camboriú (BC) was inferred as the origin, from which the dispersion process would have started about 3.58 Mybp, before the Pleistocene, and from there colonizing populations towards the north and the south of the FA (Figure 7). Around 2 Mybp there is an intensification of the dispersion events, reaching the northernmost areas in Rio de Janeiro only around 1.5 Mybp. Posterior comparison of our results from the Monmonier's algorithm in Barrier 2.2 identified geographical barriers associated with the genetic detaching such as the Conchas (CO) population in *C. forbesii*, the latest to be reached in the diffusion analysis. For *C. intermedia* the isolation occurred first separating the populations of Rio Grande do Sul state except Palmares do Sul (PS) and Torres (TO), and a later isolation of the populations in Rio de Janeiro, again corroborating the results of the diffusion analysis in SPREAD that indicates the populations of Rio de Janeiro being colonized much later.

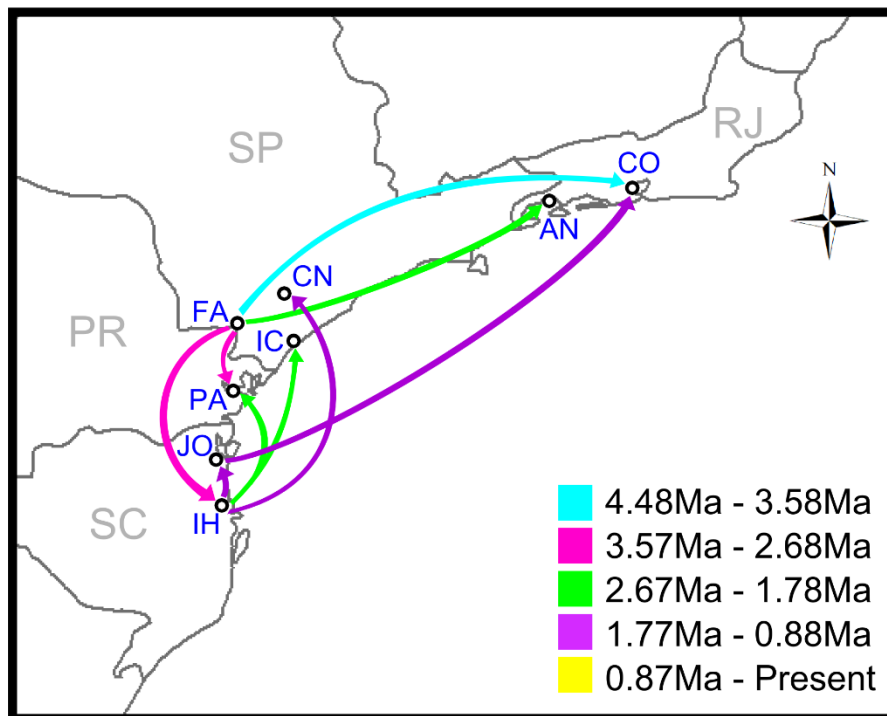


Figure 6 - Spatial phylogeographic reconstruction map of the discrete diffusion analysis obtained from ITS and cpDNA data for *Cattleya forbesii*, simulating dispersion over the last 4.48 million years before present. For populations codes see Table 1.

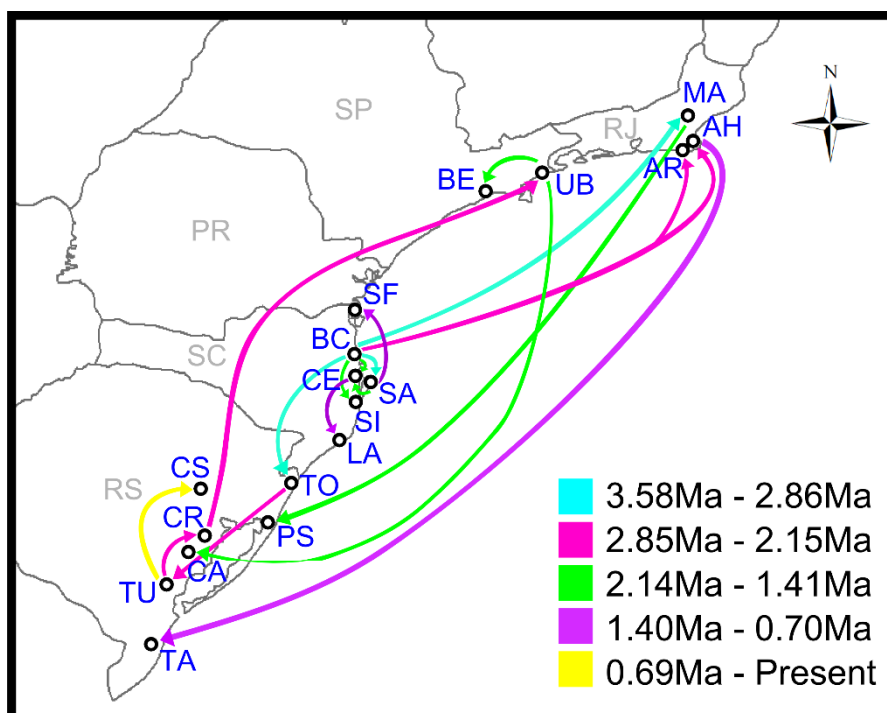


Figure 7 - Spatial phylogeographic reconstruction map of the discrete diffusion analysis obtained from ITS and cpDNA data for *Cattleya intermedia*, simulating dispersion over the last 3.58 million years before present. For populations codes see Table 1.

DISCUSSION

The influence of climatic oscillations and geological events on the biodiversity of the BAF in the Quaternary have been widely discussed in studies based on genetic diversity of species endemic to this biome. In this way, we intend to contribute with the phylogeographical data of the sister species *C. forbesii* and *C. intermedia* which occur in the southern Atlantic coast of Brazil, as epiphytes in forest habitats and more rarely in strand vegetation on sandy areas.

Genetic structure in nuclear and cpDNA data

We found a moderate to high geographical structure in nuclear and plastid haplotypes. Comparing those with the disjunct blocks in the species (three in *C. intermedia* and two in *C. forbesii*), it is possible to see a correspondence of some haplotype groups. In the ITS, as expected, the structure is much less intense than in cpDNA due to the diploid nature of this partition [60,61], and we find only a moderate structure, with some exclusive haplotypes in some of the blocks, such as Hap_9 only in the southern block of *C. intermedia* and Hap_7 only in the northern block of *C. forbesii*. The structure in cpDNA is more evident among disjunct blocks of the species, but in *C. Intermedia* the extreme south and north of the distribution presented a low haplotype diversity, likely a signal of recente expansion of these populations. On the other hand, the Santa Catarina region (northern half of the south block of *C. Intermedia*) presents high level of haplotype diversity which indicate either stable conditions for their permanence or several refugia which later became admixed. For *C. forbesii* the structuring between different blocks is less visible, but there is some exclusive haplotypes between blocks. The comparison of migration models in Migrate-N also reinforce a limitation of dispersion that reinforce the structure within species. The best migration model selected indicates migration only between adjacent populations, what over evolutionary time would produce structure along the north-south gradient. If dispersion at long distance would be significant, we would expect lower structure and either a full migration model or panmixis. If the models of adjacent migration are removed from the comparison, the next models with high probability are the ones dividing the species in larger population blocks and each block being considered a metapopulation, again giving suport to the the structure found.

The AMOVA analyses also indicated high structure for cpDNA for both species (moderate in ITS, Table 4). The overall pattern indicates similar structure among populations but the blocks correspond to structure only in *C. intermedia*, which is also more structured than *C. forbesii*. Other studies with organisms in BAF also find high levels of structure, even higher than in our case, e.g. in *Caesalpinia echinata* (ϕ_{ST} 0.91, Lira et al., [62]), based on microsatellites and cpDNA data, and *Dalbergia nigra* (cpDNA, ϕ_{ST} 0.62, Ribeiro et al., [63]). In our study, *C. intermedia* is even more structured, considering both blocks and among population variation. This pattern can be also linked to the overall higher haplotype diversity and their distribution in different blocks, since *C. forbesii* had an overall higher genetic diversity (from eight populations only two are monomorphic). In *C. intermedia*, the lower genetic diversity (eight monomorphic populations from 18) and higher differentiation (ϕ_{ST} 0.79 vs ϕ_{ST} 0.49) indicates lower gene flow, which has also impact on the blocks. This type of genetic structure in the south of the FA is also observed in other studies with plants [10,60,63], amphibia [15], and birds [64,65]. However, in orchid species growing on sand in the same area of our study, Pinheiro et al. [23] found a lack of genetic structure that is in agreement with paleovegetation reconstructions [22,66], and suggested a non-fragmented distribution during the LGM. One possible explanation is that in our case of epiphytic species from mature forests the patterns are more similar to forest tree species.

Within the population blocks it is possible to notice some breaks in diversity, especially in the cpDNA data, that are probably related to processes of population expansion and retraction. In *C. intermedia* there is a conspicuous break to the south of the Torres population, and southern of this, all the populations in Rio Grande do Sul State present a low haplotype diversity that could indicate a recent expansion. To the north of this point into Santa Catarina State, populations in the same block display the higher haplotype diversity found in the species, that seems to indicate the existence of multiple refugia that could have maintained different haplotype lineages originated in the Pliocene and that survived the Pleistocene. Our data also are in clear disagreement with the refuges suggested in the Carnaval & Moritz model [4], but in agreement with the high diversity levels found in the northern portion of Santa Catarina state by Goetze et al. [67], in a study with bromeliads in the genus *Aechmea*. It is quite likely that the recent glaciations of the Pleistocene eliminated most if not all populations in Rio Grande do Sul due to excessive cold and the retraction reach the Torres region. This is a known biogeographical pattern observed in many plant and animal groups, and this regions has been recognized

as an important phylogeographical limit called “Portal de Torres”, Torres Portal [23,68,69]. This same type of diversity break has also been observed in the Rio de Janeiro populations, with low haplotype diversity also indicating a recent expansion. In this case, we cannot invoke directly any major Pleistocene event, however these localities are northernmost, peripheral and distant from the main diversity area, suggesting an active, recent frontier of recent expansion of the species.

Based on the molecular dating of the haplotypes, we found considerable difference in the different partitions. The cpDNA haplotypes began their diversification much earlier than the ITS, with lineages diverging in the Pliocene, whereas ITS haplotypes appeared in the Pleistocene, as in other studies. Considering the difference in biparental inheritance in ITS, other factors could cause this discrepancy. Usually the explanation invoked for this discrepancy between nuclear and plastid partitions is either by the maintenance of ancestral polymorphism (that is, incomplete lineage sorting) [70], or hybridization and/or introgression with related species [71]. In our case, the second explanation is more relevant considering the recent separation and some shared haplotypes in more than one lineage, that could indicated recurring gene flow. It is also possible the existence of introgression of other sympatric species in the group (there is extensive hybridization in subgenus *Intermediae* as reported by van den Berg [72]). However, we sequence same samples of *C. tigrina* (sympatric and syntopic with *C. intermedia* in the CG population) and *C. guttata* (sympatric and syntopic with *C. intermedia* in the AH population) and found no evidence of cpDNA haplotypes of these species in the corresponding populations.

Much older coalescence in cpDNA compared to ITS

The deep coalescence in cpDNA haplotypes is a very uncommon pattern compared to other phylogeographical studies in FA species. Most studies with plant species found a more recent coalescence time within the Pleistocene [10,19,23,58], whereas in our species there are multiple lineages originating the in Pliocene, but other studies have found even deeper coalescence dates [14]. Peres et al. [73] in a study with Atlantic Forest Opiliones (Arachnidae) also found a deep coalescence in the mtDNA haplotypes, coupled with a strong population structure among the species. Similarly to our data, the nuclear partition also presented visible structure, but much smaller in relation to the haploid partitions used.

A recent study with *Cattleya harrisoniana* and *C. loddigesii*, a pair of sister species which is sister to the pair (*C. forbesii*+*C. intermedia*), using the same DNA regions of our study, found a much more recent coalescence for cpDNA haplotypes (~2.5 vs ~7 mya) [32]. Other probable explanation for the persistence of these species could be related to the epiphyte habitat in slope forests (as we found in some of the populations) that could have allowed their permanence in refugia during marine transgressions. In general, the Bayesian skylines for both species (Figure S5-6) indicate a steady population growth during all the Pleistocene, again corroborating the persistence of populations without any evidence of population bottlenecks in the species taken as a whole.

There is the possibility that these species suffer introgression from other species not included in the study, due to habitat sharing. *C. intermedia* shares habitat with *C. tigrina* A.Rich. in several habitats in Rio Grande do Sul (including populations CR and PS) and with *C. guttata* in Rio de Janeiro (including AH and AR). *C. forbesii* shares habitat with *C. harrisoniana* in Rio de Janeiro (population CO) and with *C. loddigesii* in Conchas (CN). The fact we found no evident haplotypes of these other species in the populations we sequenced for checking (*C. guttata* in AH and *C. tigrina* in CR), we cannot discard the permutation of basal alleles in deeper evolutionary times [74].

Gradual separation and speciation of *C. intermedia* and *C. forbesii*

Based on the phylogeographic reconstruction and temporal dynamics of the populations over time, the population of Fartura (FA), in the São Paulo plateau, presented the older haplotypes from which *C. Forbesii* would initiate its dispersion about 4.48 Mya. This time coincides with registers (4.9 to 3.4 mya) of an elevation of the relative sea level, that could have inviabilized the permanence of populations in the lowland, sea level swamp forests where this species typically grows near the shore in São Paulo State [75,76]. Later, with a lowering in sea level, from 3.4 a 2.7 Ma, Ybert et al. [75] indicated that many areas flooded by sea water became dry and allowed the reestablishment of forest elements. This area coincided with the Rio Grande do Sul colonization around 2.17 Mya, when these areas had the forests reestablished and the Rio de Janeiro was colonized later around 1.2 Mya.

The most recent colonization of the north is also observed on the inferred genetic barriers by the Barrier 2.2 software, that first indicate the separation of the populations in Rio de Janeiro (Cordovil and Angra dos Reis) and the Conchas population (in the São Paulo Plateau), this latter population being isolated from the others and reflecting a most

recent dispersion. *C. intermedia* began its diversification later, about 3.58 Ma with its center of origin in the central and northern Santa Catarina, near the Balneário Camboriú population. Unlike the *C. forbesii* populations observed in this region, *C. intermedia* often grows on slopes of hills that can reach 500-700m, which could have allowed their persistence even with sea level elevation, which was the case in this population. These conditions could have, therefore, offered some stable conditions to explain the persistence of the multiple haplotype lineages in forest refuges [21,77]. According to Hesp et al. [77] this type of areas could have been related to barriers in the Pleistocene that protected the vegetation during sea level oscillations. From this area the diversification process in the different lineages was intense, but without a clear pattern, expanding to the south and north in the FA and probably readmixing the lineages from different refuges. These patterns of expansion are probably related to the reestablishment of warm and humid climate along the narrow shore lowlands [76]. Similarly to *C. forbesii*, the northernmost populations of *C. intermedia* seem to be a more recent event, even though the Barrier analyses indicate an initial barrier separating part of the Rio Grande do Sul populations on the same point where we observe the break in diversity patterns. Maybe another explanation of these retarded expansion to the north is the model proposed by Milne et al. [78], that indicated that the marine regression happened much more slowly in Rio de Janeiro because of the higher elevation (around 4 m higher than current levels), that surely would have completely covered the dunes where we sampled the Arraial do Cabo populations (AR and AH).

The sharing of some haplotypes indicates possible introgression between the species, which occurs in more than one lineage. Nevertheless we did not find extensive evidence of introgression like in *C. loddigesii* and *C. harrisoniana* [32]. The similar habitats could promote moderate levels of introgression, especially in the region where both species are sympatric (northern portion of Santa Catarina), and where some of the shared haplotypes were found. The introgression may be recurrent in these areas, and even bring some adaptive advantages, like reported by Pinheiro et al. [79]. This author found recurring gene flow between *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* adapted to variable habitats on dry and swampy areas associated to sandy dunes, respectively, and the introgressed plants were adapted to both conditions.

The results also indicate that *C. forbesii* began to diversify earlier than *C. intermedia* (4.48 Ma vs. 3.58 Ma, Figure 6-7), a fact not corroborated by some old haplotypes in both datasets for this species (Hap_12 for ITS and Hap_10 for cpDNA). It

is quite likely that *C. forbesii* and *C. intermedia* speciated allopatrically in during geographical distribution changes, isolation and bottlenecks during the Quaternary [80,81]. After divergence, *C. forbesii* has a more restricted distribution in relation to *C. Intermedia*, and the latter has evident signs of population expansion, reflected in the broader distribution and higher diversity, as observed in the EBSP skylines (EBSP). In them we observe a continuous population expansion over the Pleistocene that could help to understand the permanence of diverse haplotype lineages. Considering the F of F_u and Tajima D , both species seem to be in expansion from a lower effective population period, presenting high haplotype diversity and low nucleotide diversity (π) [82]. At the same time, *C. intermedia* reaches more localities in a shorter period of time, and their ecological similarity could be due to shared ancestry coupled with phylogenetic niche conservatism, as found in many other taxonomic groups [83].

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank for help in obtaining samples: Alexandre Medeiros (B.Camboriú, Ilhota, Gov. Celso Ramos and São Francisco do Sul), Cláudia Pegoraro, Vladimir Zenker (Cerro Grande do Sul, Camaquã and Turuçu), Celso Perez dos Santos e Solange (Bertioga), Alan Júnior (Macaé), Roldinelli Paim Pimentel (Cabo Frio), Ênio Schneider (Cruzeiro do Sul), Aldomar Sander (Palmares do Sul), Eng. Amilcar Seus Ferreira e Gildo de Carvalho Silveira (Florestal S.A., Arroio do Silva), Pedro Nascimento (Garopaba), Guilherme Andrighetto (Florianópolis), Cezar Neubert Gonçalves and Peterson Padilha (Rio Grande do Sul and Santa Catarina), the ICMBio (Estação Ecológica do Taim), the Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). Samples were collected under the permit 43485 (SISBIO-ICMBio). This work was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ grant 484980/2013-0), Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPGBot-UEFS). EMM received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Finance code 001, and CvdB a productivity grant from CNPq (PQ-1A).

REFERENCES

1. Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G.; Fonseca, G.A.B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **2000**, 403, 853-858.
2. Morellato, L.P.C.; Haddad, C.F.B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* **2000**, 32, 786-792.
3. Galindo-Leal, C.; Câmara, I.G. Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese. In Galindo-Leal, C.; Câmara, I.G (eds) Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas. *Fundação SOS Mata Atlântica Belo Horizonte, Conservação Internacional* **2005**, 472, 3-11.
4. Carnaval, A.C.; Moritz, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Biogeography* **2008**, 35, 1187-1201.
5. Haffer, J. "Speciation in Amazonian forest birds". *Science* **1969**, 165, 131-37.
6. Thomé, A.M.T.; Sousa, R.S.; Carmo, L.F.R.R.S. The impact of sales and operations planning practices on manufacturing operational performance. *International Journal of Production Research* **2014**, 52, 2108-2121.
7. Cabanne, G.S.; d'Horta, F.M.; Sari, E.H.R.; Santos, F.R.; Miyaki, C.Y. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2008**, 49, 760-773.
8. Carnaval, A.C.; Hickerson, M.J.; Haddad, C.F.B.; Rodrigues, M.T.; Moritz, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* **2009**, 323, 785-789.
9. Martins, F.M.; Templeton, A.R.; Pavan, A.C.O; Kohlbach, B.C.; Morgante, J.S. Phylogeography of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*): marked population structure, Neotropical Pleistocene vicariance and incongruence between nuclear and mtDNA markers. *BMC Evol. Biol.* **2009**, 9, 294.
10. Palma-Silva, C.; Lexer, C.; Paggi, G.M.; Barbara, T.; Bered, F.; Bodanese-Zanettini, M.H. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species. *Heredity* **2009**, 103, 503-512.

11. Ribeiro, R.A.; Lemos-Filho, J.P.; Ramos, A.C.S.; Lovato, M.B. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* **2010**, 106, 46-57.
12. D'Horta, F.G.S.; Cabanne, D.; Meyer, C.Y. Miyaki. The genetic effects of Late Quaternary climatic changes over a tropical latitudinal gradient: diversification of an Atlantic forest passerine. *Mol. Ecol.* **2011**, 20, 1932-1935.
13. Brunes, T.O.; Thomé, M.T.C.; Alexandrino, J.; Haddad, C.F.B.; Sequeira, F. Ancient divergence and recent population expansion in a leaf frog endemic to the Southern Brazilian Atlantic forest. *Org. Divers. Evol.* **2015**, 15, 695-710.
14. Fitzpatrick, S.W.; Brasileiro, C.A.; Haddad, C.F.; Zamudio, K.R. Geographical variation in genetic structure of an Atlantic coastal forest frog reveals regional differences in habitat stability. *Mol. Ecol.* **2009**, 18, 2877-2896.
15. Thomé, M.T.C.; Zamudio, K.R.; Giovanelli, J.G.R.; Haddad, C.F.B.; Baldissera, F.A.; Jr.; Alexandrino, J. Phylogeography of endemic toads and post-Pliocene persistence of the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2010**, 55, 1018-1031.
16. Álvarez-Presas, M.; Mateos, E.; Tudó, À.; Jones, H.; Riutort, M. Diversity of introduced terrestrial flatworms in the Iberian Peninsula: a cautionary tale. *PeerJ* **2014**, 2, 430.
17. Batalha-Filho, H.; Cabanne, G.S.; Miyaki, C.Y. Phylogeography of an Atlantic forest passerine reveals demographic stability through the last glacial maximum. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2012**, 65, 892-902.
18. Bünger, M.O.; Mazine, F.F.; Forest, F.; Bueno, M.L.; Stehmann, J.R.; Lucas, E.J. The evolutionary history of *Eugenia* sect. *Phyllocalyx* (Myrtaceae) corroborates historically stable areas in the southern Atlantic forests. *Annals of Botany* **2016**, 118, 1209-1223.
19. Aguiar-Melo, C.; Zanella, C.M.; Goetze, M.; Palma-Silva, C.; Hirsch, L.D.; Neves, B.; Costa, A.F.; Bered, F. Ecological niche modeling and a lack of phylogeographic structure in *Vriesea incurvata* suggest historically stable areas in the southern Atlantic Forest. *American Journal of Botany* **2019**, 0, 1-13.
20. Leite, Y.L.R.; Costa, L.P.; Loss, A.C.; Rocha, R.G.; Batalha-Filho, H.; Bastos, A.C.; Quaresma, V.S.; Fagundes, V.; Paresque, R.; Passamani, M.; Pardini, R. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **2016**, 113, 1008-1013.

21. Seeliger, U. Coastal foredunes of southern Brazil: physiography, habitats, and vegetation. In: SEELIGER, U. (Ed.) Coastal plant communities of Latin America. *Academic Press* **1992**, 367-381.
22. Behling, H. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **2002**, 177, 19-27.
23. Pinheiro, F.; Barros, F.; Palma-Silva, C.; Fay, M.; Lexer, C.; Cozzolino, S. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: A Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography* **2011**, 38, 1923-1935.
24. Chase, M.W.; Cameron, K.M.; Freudenstein, J.V.; Pridgeon, A.M.; Salazar, G.; van den Berg, C.; Schuiteman, A. An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2015**, 177, 151-174.
25. Cozzolino, S.; Widmer, A. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution* **2005**, 20, 487-494.
26. van der Pijl, L.; Dodson, C.H. Orchid flowers: their pollination and evolution. University of Miami Press, *Coral Gables* **1966**.
27. van den Berg, C.; Higgins, W.E.; Dressler, R.L.; Whitten, W.M.; Soto Arenas, M.A.; Culham, A.; Chase, M.W. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **2000**, 15, 96-114.
28. Santos, T.M. Eventos antigos de especiação híbrida no grupo bifoliado do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) inferidos a partir de uma filogenia baseada em 16 regiões de DNA nuclear e plastidial. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana. *M. Sc. Thesis* **2011**, 66.
29. van den Berg, C. Estudo da variabilidade intra e interespecífica em populações de espécies brasileiras de *Cattleya* (Orchidaceae-Laeliinae). Universidade Estadual de Campinas. Campinas. *Dissertação de Mestrado* **1996**.
30. Rogstad, S.H. Saturated NaCl-CTAB Solution as a Means of Field Preservation of Leaves for DNA Analyses. *Taxon* **1992**, 41, 701-708.
31. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America* **1987**, 19, 11-15.

32. Tomé, T.M. Filogeografia de *Cattleya loddigesii* Lindl. e *Cattleya harrisoniana* (ex Lindl.) Bateman (Orchidaceae). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. *Dissertação de Mestrado* **2016**, 121.
33. Pinheiro, F.; Cozzolino, S.; Barros, F.; Gouveia, T.; Suzuki, R.; Fay, M.; Palma-Silva, C. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. *Evolution* **2013**, 67, 2024-2039.
34. Pinheiro, F.; Cozzolino, S.; Draper, D.; Barros, F.; Félix, L.; Fay, M.; Palma-Silva, C. Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. *BMC Evolutionary Biology, London* **2014**, 14, 1-15.
35. Rodrigues, J.F.; Van Den Berg, C.; Abreu, A.G.; Novello, M.; Veasey, E.A.; Oliveira, G.C.X.; Koehler, S. Species delimitation of *Cattleya coccinea* and *C. mantiqueirae* (Orchidaceae): insights from phylogenetic and population genetics analyses. *Plant Systematics and Evolution* **2015**, 301, 1345-1359.
36. Samarakoon, T.; Wang, S.Y.; Alford, M. Enhancing PCR Amplification of DNA from recalcitrant plant specimens using a trehalose-based additive application in plant sciences. *Botanical Society of America* **2013**, 1, 795-804.
37. Parveen, S.; Sahoo, S.K. Long circulating chitosan/PEG blended PLGA nanoparticle for tumor drug delivery. *Eur. J. Pharmacol* **2011**, 670, 372-383.
38. Staden, K.R.; Beal, K.F.; Bonfield, J.K. The Staden package. - In: Misener S. & Krawetz S. A. (eds), *Computer methods in molecular biology*, Humana Press Inc **1998**, 132, 115-130.
39. Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Resources* **2004**, 32, 1792-1797.
40. Excoffier, L.; Lischer, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **2010**, 10, 564-567.
41. Librado, P.; Rozas, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **2009**, 25, 1541-1542.
42. Bandelt, H.J.; Forster, P.; Röhl, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **1999**, 37-48.
43. Tsai, Y.H.E. PhyloGeoViz: a web-based program that visualizes genetic data on maps. *Molecular Ecology Resources* **2011**, 11, 557-561.

44. Fu, Y-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **1997**, 147, 915-925.
45. Tajima, F. Statistical Method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **1989**, 123, 584-595.
46. Excoffier, L.; Smouse, P.E.; Quattro, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **1992**, 18, 479-491.
47. Drummond, A.J.; Rambaut, A.; Shapiro, B.; Pybus, O.G. Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Molecular Biology and Evolution* **2005**, 22, 1185-1192.
48. Suchard, M.A.; Lemey P.; Baele, G.; Ayres, D.L.; Drummond, A.J.; Rambaut A. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution* **2018**, 4, 16.
49. Nylander, J.A. MrModeltest v.2 Program distributed by the authot. *Evolutionary Biology Centre* **2004**.
50. Rambaut A.; Suchard M.A.; Xie W.; Drummond A. J. *Tracer v.1.6.0: MCMC Trace Analysis Tool* **2013**.
51. Rambaut, A. *FigTree v.1.4.2: tree figure drawing tool* **2012**.
52. Beerli, P.; Palczewski, M. Unified Framework to Evaluate Panmixia and Migration Direction Among Multiple Sampling Locations. *Genetics* **2010**, 185, 313-326.
53. Kass, R.E.; Raftery, A.E. Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association* **1995**, 90: 773-795.
54. Miller, A.; Chen, J.; Takasuka, T.E.; Jacobi, J.L.; Kaufman, P.D.; Irudayaraj, J.M.K.; Kirchmaier, A.L. Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Is Required for Cell Cycle-regulated Silent Chromatin on Replicated and Nonreplicated Genes. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, 35142-35154.
55. Lemey, P.; Rambaut, A.; Drummond, A.J.; Suchard, M.A. Bayesian Phylogeography Finds Its Roots. *PLoS Computational Biology* **2009**, 5, 1000520.
56. Bielejec, F.; Baele, G.; Vrancken, B.; Suchard, M.A.; Rambaut, A.; Lemey, P. SpreaD3: Interactive Visualization of Spatiotemporal History and Trait Evolutionary Processes. *Mol Biol Evol* **2016**, 33, 2167-2169.
57. Bouckaert, R.; Heled, J.; Kühnert, D.; Vaughan, T.; Wu, C-H.; Xie, D.; Suchard, M.A.; Rambaut, A.; Drummond, A.J. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput Biol.* **2014**, 10, e1003537.

58. Heled, J. Extended Bayesian Skyline Plot tutorial for BEAST 2. Online tutorial at <https://www.beast2.org/files/2016/01/ebst2-tut.zip>, **2015**.
59. Manni, F.; Guérard, E.; Heyer, E. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Hum. Biol.* **2004**, 76: 173-190.
60. Turchetto-Zolet, A.C.; Cruz, F.; Vendramin, G.G.; Simon, M.F.; Salgueiro, F.; Margis-Pinheiro, M.; Margis, R. Large-scale phylogeography of the disjunct Neotropical tree species *Schizolobium parahyba* (Fabaceae-Caesalpinioideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2012**, 65, 174-182.
61. Longo, D.; Lorenz-Lemke, A.P.; Mäder, G.; Bonatto, S.L.; Freitas, L.B. Phylogeography of the *Petunia integrifolia* complex in southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* **2013**, 174, 199-213.
62. Lira, C.F.; Cardoso, S.R.S.; Ferreira, P.C.G.; Cardoso, M.A.; Provan, H. Long-term population isolation in the endangered tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. revealed by chloroplast microsatellites. *Mol Ecol* **2003**, 12, 3219-3225.
63. Ribeiro, R.A.; Lemos-Filho, J.P.; Ramos, A.C.S.; Lovato, M.B. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* **2011**, 106, 46-57.
64. Batalha-Filho, H.; Miyaki, C.Y. Late Pleistocene divergence and postglacial expansion in the Brazilian Atlantic Forest: Multilocus phylogeography of *Rhopias gularis* (Aves: Passeriformes). *J. Zoo. Syst. Evol. Res.* **2016**, 54, 137-147.
65. Cabanne, G.S.; Sari, E.H.R.; Meyer, D.; Santos, F.R.; Miyaki, C.Y. Matrilineal evidence for demographic expansion, low diversity and lack of phylogeographic structure in the Atlantic forest endemic Greenish Schiffornis *Schiffornis virescens* (Aves: Tityridae). *Journal of Ornithology* **2013**, 154, 371-384.
66. Behling, H.; Negrelle, R.R.B. Tropical rain forest and climate dynamics of the Atlantic lowland, southern Brazil, during the Late Quaternary. *Quaternary Research* **2001**, 56, 383-389.
67. Goetze, M.; Zanella, C.M.; Palma-Silva, C.; Buttow, M.V.; Bered. F. Incomplete lineage sorting and hybridization in the evolutionary history of closely related, endemic yellow-flowered *Aechmea* species of subgenus *Ortgiesia* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany* **2017**, 104, 1073-1087.
68. Rambo, B.A. Porta de Torres. *Anais Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues* **1950**, 2, 125-136.

69. Gonçalves, E.T.; Souza, A.F. Floristic variation in ecotonal areas: Patterns, determinants and biogeographic origins of subtropical forests in South America. *Austral Ecology* **2013**, *39*, 122-134.
70. Comes, H.P.; Abbott, R.J. Molecular phylogeography, reticulation, and lineage sorting in Mediterranean *Senecio* sect. *Senecio* (Asteraceae). *Evolution* **2001**, *55*, 1943-1962.
71. Rieseberg, L.H.; Soltis, D.E. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evol Trends Plant* **1991**, *5*, 65-84.
72. van den Berg, C. Importance of hybridization for the evolution of *Cattleya. Renziana* **2014**, *4*, 74-79.
73. Peres, E.A.; Benedetti, A.R.; Hiruma, S.T.; Sobral-Souza, T.; Pinto-da-Rocha, R. Phylogeography of Sodreaninae harvestmen (Arachnida: Opiliones: Gonyleptidae): insights into the biogeography of the southern Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **2019**, *138*, 1-16.
74. Baack, E.J.; Rieseberg, L.H. A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2007**, *17*, 513-518.
75. Ybert, J.P.; Bissa, W.M.; Catharino, E.L.M.; Kutner, M. Environmental and sea-level variations on the southeastern Brazilian coast during the Late Holocene with comments on prehistoric human occupation. *Palaeoclimatology, Palaeoecology* **2003**, *189*, 11-24.
76. Oliveira, P.E.; Garcia, M.J.; Medeiros, V.B.; Pessenda, L.C.R.; Sallun, A.E.M.; Suguio, K.; Santos, R.A.; Siqueira, E.; Fernandes, R.S. Paleoclimas e Paleovegetação do Quaternário no Estado de São Paulo, Brasil In: *Paleontologia: Cenários de Vida*. 5 ed. Rio de Janeiro : Editora Interciência, **2014**, *5*, 457-470.
77. Hesp, P.A.; Giannini, P.C.F.; Martinho, C.T.; Silva, G.M.; Neto, N.E.A. The Holocene barrier systems of the Santa Catarina coast, southern Brazil. Geology and geomorphology of Holocene coastal barriers of Brazil (ed. by Dillenburg, S.R.; Hesp, P.A.), *Springer-Verlag, Berlin* **2009**, 94-133.
78. Milne, G.; Long, A.; Bassett, E. Modeling Holocene relative sea-level observations from the Caribbean and South America. *Quat Scie Rev* **2005**, *24*, 1183-1202.
79. Pinheiro, F.; Palma-Silva, C.; Barros, F.; Félix, L.P.; Lexer, C.; Cozzolino, S.; Fay, M.F. Chloroplast microsatellite markers for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*, and cross-amplification in other Laeliinae species (Orchidaceae). *Conservation Genetics Resources* **2009**, *1*, 505-511.

80. Comes, H.P.; Kadereit, J.W. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* **1998**, 11, 432-438.
81. Ley, A.C.; Heuertz, M.; Hardy, O.J. The evolutionary history of central African rain forest plants: phylogeographical insights from sister species in the climber genus *Haumania* (Marantaceae). *Journal of Biogeography* **2016**, 1-14.
82. Grant, W.S.; Bowen, B.W. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from Sardines and Anchovies and lessons for conservation. *The Journal of Heredity* **1998**, 85, 415-426.
83. Anacker, B.L.; Strauss, S.Y. The geography and ecology of plant speciation: range overlap and niche divergence in sister species. *Proc. R. Soc. B.* **2014**, 281, 20132980.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

FIGURES

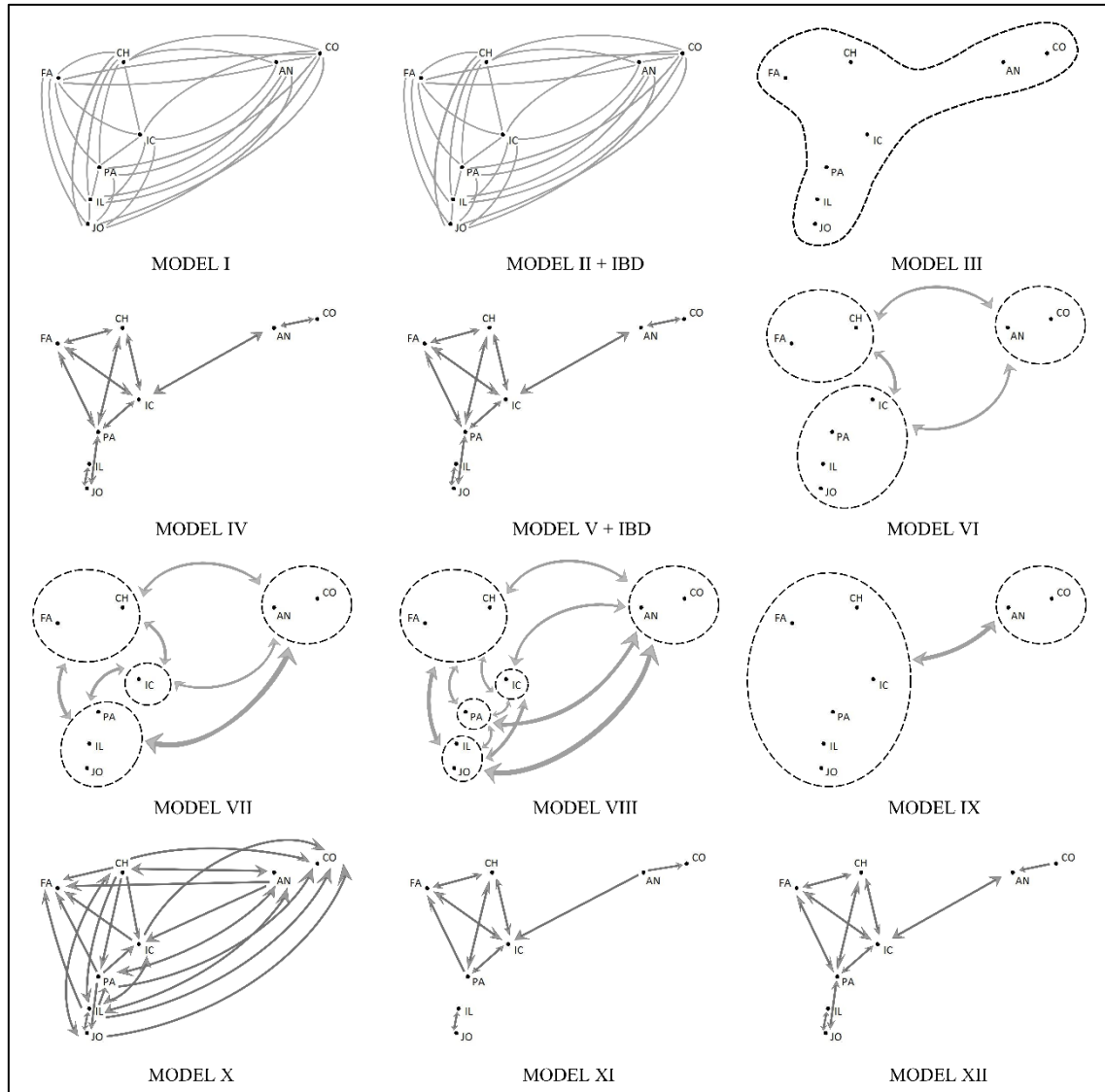


Figure S1 - Demographic and parameter models tested for eight populations of the orchid species *C. forbesii* based on internal transcribed spacer (ITS) and cpDNA (*atpF-atpI+rpl32-trnL* spacers) sequence data with the software Migrate-N.

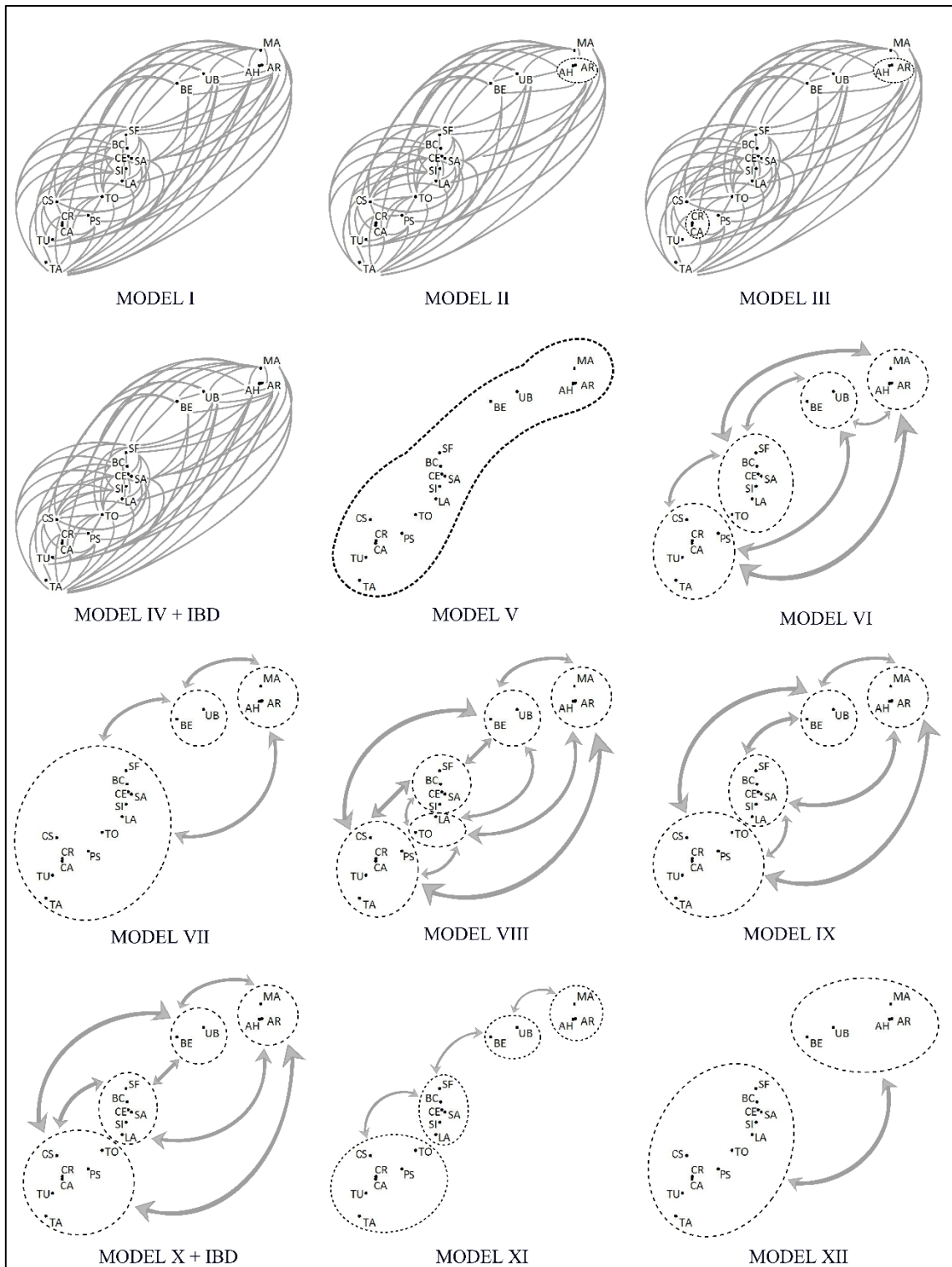


Figure S2 - First part of 22 demographic and parameter models (models I-XII) tested for eighteen populations of the orchid species *C. intermedia* based on internal transcribed spacer (ITS) and cpDNA (*atpF-atpI+rpl32-trnL* spacers) sequence data with the software Migrate-N

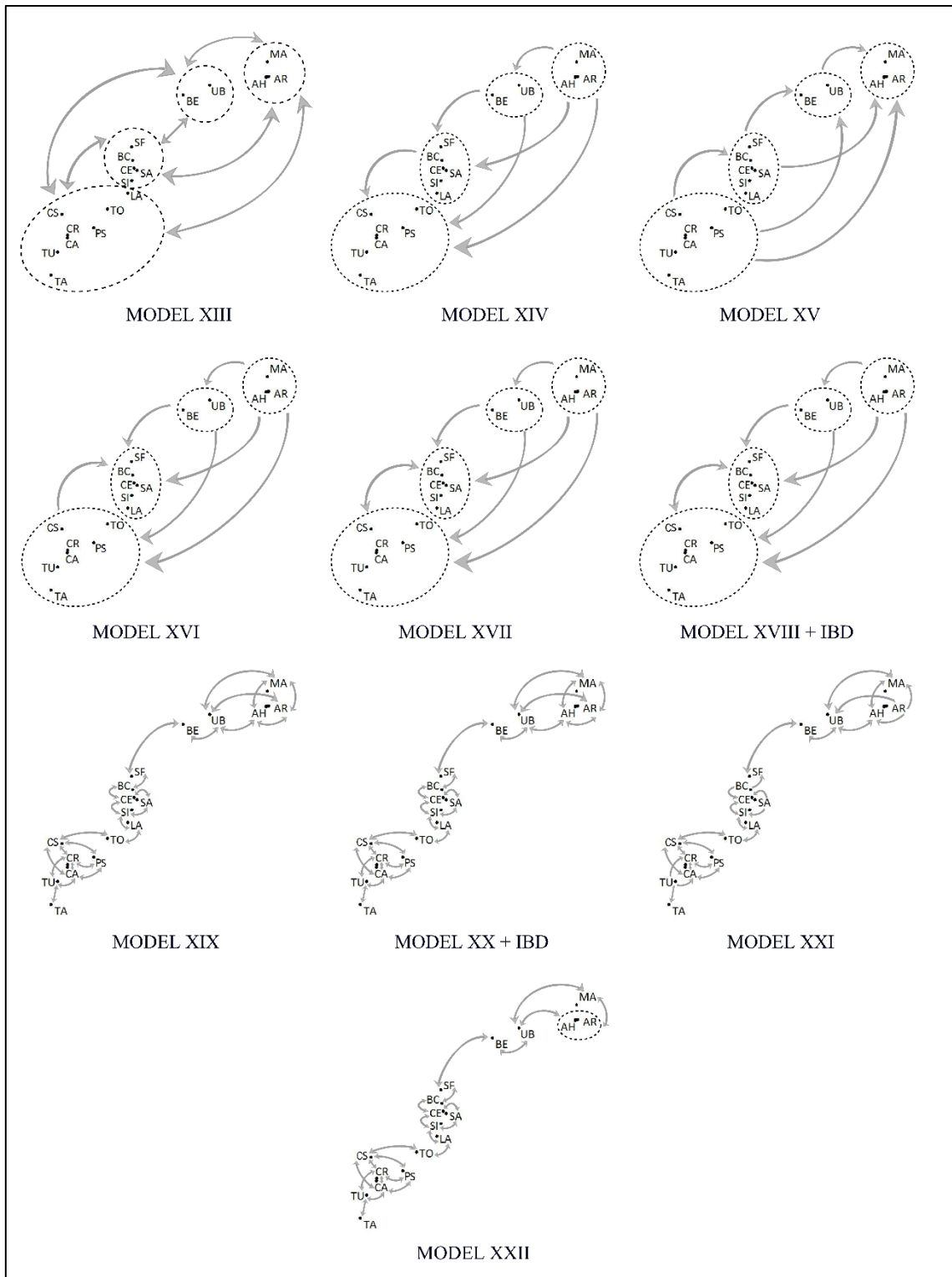


Figure S3 - Second part of 22 demographic and parameter models (models XIII-XXII) tested for eighteen populations of the orchid species *C.intermedia* based on internal transcribed spacer (ITS) and cpDNA (*atpF-atpI+rpl32-trnL* spacers) sequence data with the software Migrate-N.

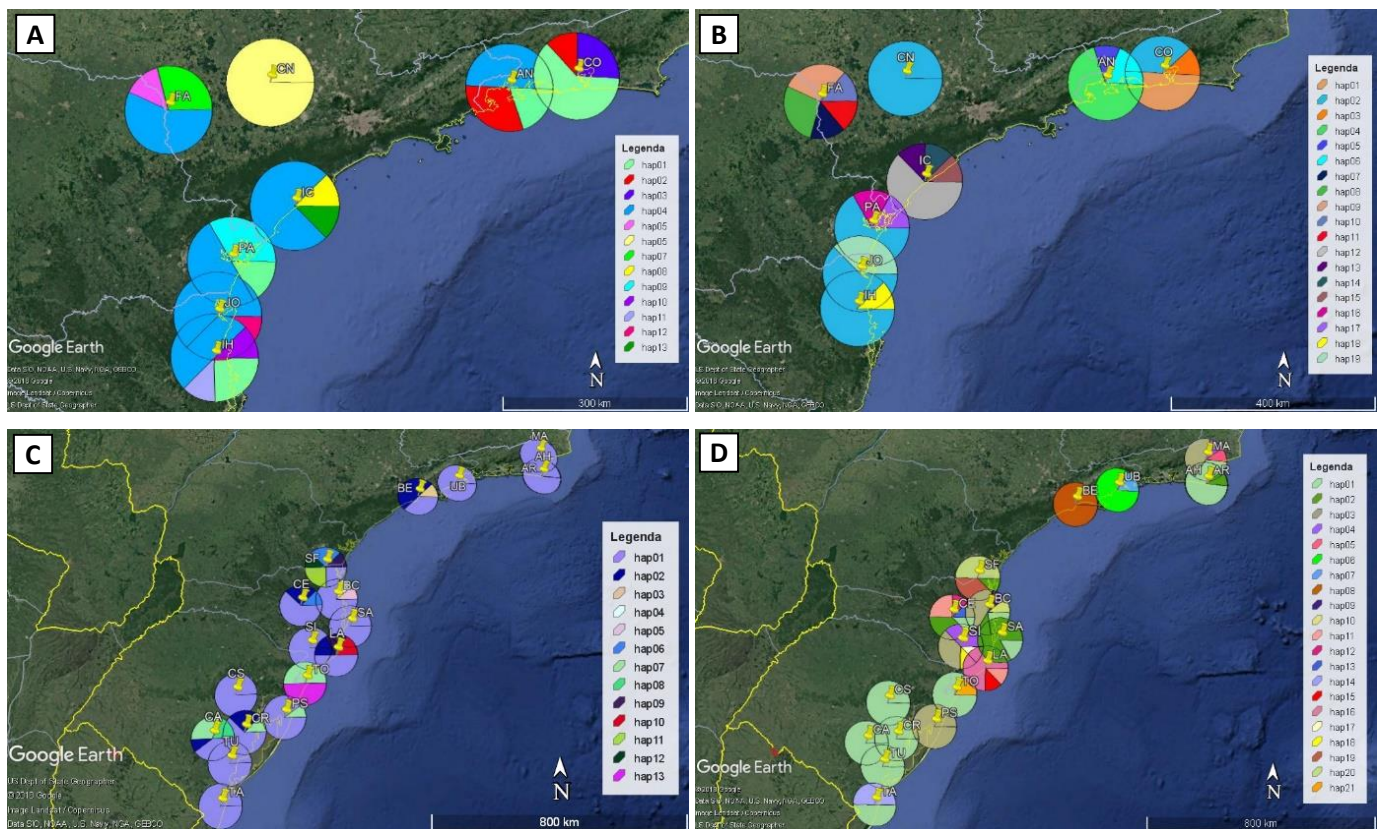


Figure S4 - Haplotype distribution for internal transcribed spacer (ITS) and cpDNA (c) sequence data in two epiphytic orchids in the Brazilian Atlantic Forest. *Cattleya forbesii*: (A) ITS; (B) cpDNA; *Cattleya intermedia*: (C) ITS; (D) cpDNA.

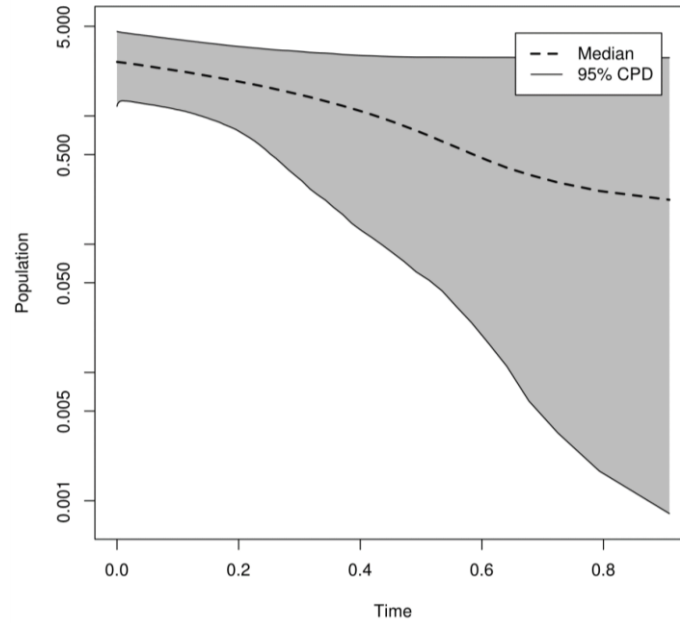


Figura S5 - Bayesian Extended Skyline Plot (EBSP) based on combined internal transcribed spacer (ITS) and cpDNA (*atpF-atpI+rpl32-trnL* spacers) sequences in the orchid *Cattleya forbesii*. The X axis corresponds to the coalescence time in million of years before present, and the Y axis to population size (N_e) in a logarithmic scale. The dashed line indicates the median N_e and the gray area the confidence interval at 0.95 of probability.

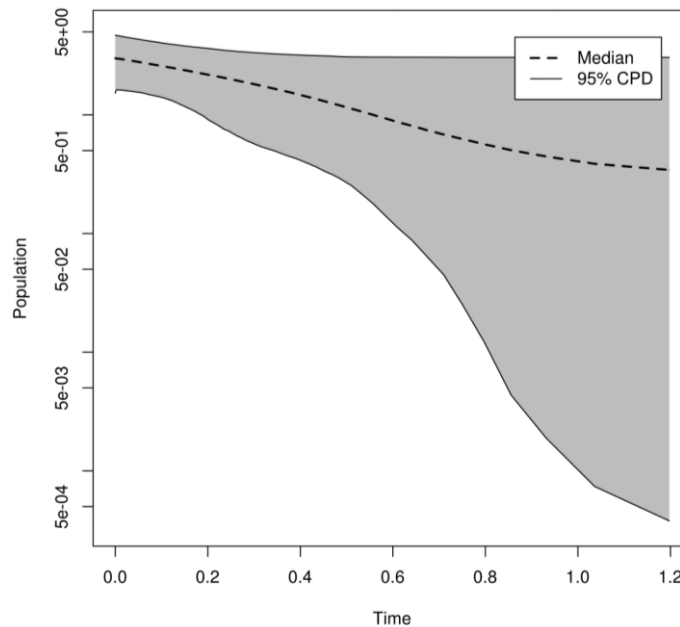


Figure S6 - Bayesian Extended Skyline Plot (EBSP) based on combined internal transcribed spacer (ITS) and cpDNA (*atpF-atpI+rpl32-trnL* spacers) sequences in the orchid *Cattleya intermedia*. The X axis corresponds to the coalescence time in million of years before present, and the Y axis to population size (N_e) in a logarithmic scale. The dashed line indicates the median N_e and the gray area the confidence interval at 0.95 of probability.

TABLES

Table S1 - Primer sequences and PCR conditions for *Cattleya forbesii* and *C. intermedia* in the present study.

Primers	Sequence	Reference	Desnat.	Amplification	Cycles	Extension
<i>atpI</i>	TAT TTA CAA GYG GTA TTC AAG CT	Shaw et al. (2007)	80°C (5min)	95°C (1min)	30	65°C (5min)
<i>atpH</i>	AYC CAG CAG CAA TAA C			+		
<i>rpl32</i>	CAG TTC CAA AA A AAC GTA CTT C			52°C (1min)		
<i>trnL^(UAG)</i>	CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT			+		
				65°C (4min)		
<i>ITS17SE</i>	ACG AAT TCA TGG TCC GGT GAA GTG TTC G	Sun et al. (1994)	94°C (3min)	94°C (1min)	28	72°C (7min)
<i>ITS26SE</i>	TAG AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA C			+ 54°C (1min) + 72°C (1m 30s)		

References

- Shaw, J.; Lickey, E.B.; Schilling, E.E.; Small, R.L. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am J Bot* **2007**, *94*, 275-288.
- Sun, Y.; Skinner, D.Z.; Liang, G.H.; Hulbert, S.H. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theor Appl Genet* **1994**, *89*, 26-32.

Table S2 - Population expansion statistics based on the Tajima *D* and Fu *F_s* indexes, for each population of the species in the current study, calculated with the concatenated ITS and cpDNA data.

Population	Tajima <i>D</i> (<i>D</i> p-value)	=Fu <i>F_s</i> (<i>F_s</i> p-value)
CO	1.45372 (0.93700)	-0.26013 (0.38690)
AN	1.16896 (0.87460)	-2.04872 (0.04350)
CN	0.00000 (1.00000)	0.00000 (N.A.)
FA	-0.55037 (0.32560)	-1.07343 (0.19050)
IC	-1.59524 (0.03080)	-4.00260 (0.00070)
PA	-0.50439 (0.36430)	-1.41795 (0.09970)
IH	-1.28011 (0.12790)	-1.54309 (0.07270)
JO	1.44880 (0.95660)	-1.09554 (0.08390)
AR	0.00000 (1.00000)	0.00000 (N.A.)
AH	-1.44751 (0.06240)	1.41490 (0.69700)
MA	0.60210 (0.74740)	-0.53650 (0.22470)
UB	-1.13197 (0.14100)	0.95213 (0.61250)
BE	0.83870 (0.79680)	0.82524 (0.66620)
SF	-0.00958 (0.49340)	-5.09848 (0.00170)
BC	-1.08713 (0.15880)	-1.07610 (0.21090)
CE	0.04635 (0.53880)	-2.52918 (0.04430)
SA	-1.23311 (0.10690)	1.60944 (0.72640)
SI	-0.82582 (0.29090)	-2.26299 (0.02370)
LA	0.33065 (0.63920)	-0.78544 (0.17380)
TO	0.31063 (0.64950)	-0.30414 (0.22730)
CS	0.00000 (1.00000)	0.00000 (N.A.)
PS	-1.44751 (0.06380)	1.41490 (0.70250)
CR	0.58467 (0.76090)	0.72323 (0.62780)
CA	1.34674 (0.90950)	-0.37466 (0.27980)
TU	0.00000 (1.00000)	0.00000 (N.A.)
TA	1.44416 (0.96410)	0.96644 (0.61420)

Table S3 - Bayes factors comparison of genetic demographic model probabilities calculated by thermodynamic integration in the software migrate-N, based on ITS and cpDNA (*atpI-atpF* and *rpl32-trnL*) sequence data obtained from eight populations of *Cattleya forbesii*. For model specification refer to Figure S1.

Model	Bezier (lnL)	Difference	Exponent	Model Probability	Ranking
Model I - full migration	-3803,45	-38,56	1,8e-17	1,8e-17	
Model II - full migration + IBD	-3818,54	-53,65	5e-24	5e-24	
Model III - panmictic	-3821,89	-57	1,8e-25	1,8e-25	
Model IV	-3770,8	-5,91	0,00271	0,0027	2°
Model V + IBD	-3835,74	-70,85	1,7e-31	1,7e-31	
Model VI	-3787,47	-22,58	1,6e-10	1,6e-10	3°
Model VII	-3803,06	-38,17	2,6e-17	2,6e-17	
Model VIII	-3800,87	-35,98	2,4e-16	2,4e-16	
Model IX	-3806,2	-41,31	1,1e-18	1,1e-18	
Model X	-3791,61	-26,72	2,5e-12	2,5e-12	4°
Model XI	-3821,4	-56,51	2,9e-25	2,9e-25	
Model XII	-3764,89	0	1	0,9973	1°
Best Model	-3764,89	SUM	1,00271		

Table S4 - Bayes factors comparison of genetic demographic model probabilities calculated by thermodynamic integration in the software migrate-N, based on ITS and cpDNA (*atpI-atpF* and *rpl32-trnL*) sequence data obtained from eight populations of *Cattleya intermedia*. For model specification refer to Figures S2-3.

Model	Bezier (lnL)	Difference	Exponent	Model Probability	Ranking
Model I - full migration	-4720,88	-36,87	9,7e-17	9,4e-17	3°
Model II - full migration	-4705,91	-21,9	3,1e-10	3e-10	
Model III - full migration	-4737,96	-53,95	3,7e-24	3,6e-24	
Model IV - full migration + IBD	-4730,9	-46,89	4,3e-21	4,2e-21	
Model V - panmictic	-4763,82	-79,81	2,2e-35	2,1e-35	4°
Model VI	-4728,28	-44,27	5,9e-20	5,8e-20	
Model VII	-4730,94	-46,93	4,2e-21	4e-21	
Model VIII	-4728,15	-44,14	6,8e-20	6,6e-20	
Model IX	-4715,37	-31,36	2,4e-14	2,3e-14	
model X + IBD	-4824,87	-140,86	6,7e-62	6,5e-62	
Model XI	-4718,8	-34,79	7,8e-16	7,6e-16	
Model XII	-4750,6	-66,59	1,2e-29	1,2e-29	
Model XIII	-4732,37	-48,36	9,9e-22	9,7e-22	
Model XIV	-4715,85	-31,84	1,5e-14	1,4e-14	
Model XV	-4725,09	-41,08	1,4e-18	1,4e-18	
Model XVI	-4715,2	-31,19	2,8e-14	2,8e-14	
Model XVII	-4713,4	-29,39	1,7e-13	1,7e-13	
Model XVIII + IBD	-4824,54	-140,53	9,3e-62	9e-62	
Model XIX	-4684,01	0	1	0,97097	1°
Model XX + IBD	-4857,29	-173,28	5,6e-76	5,4e-76	2°
Model XXI	-4963,28	-279,27	5e-122	5e-122	
Model XXII	-4687,52	-3,51	0,0299	0,02903	
Best Model	-4684,01	SUM	1,0299		

Capítulo 2

Título: Assimetria Flutuante em flores de *Cattleya forbesii* Lindl.
(Orchidaceae) associada a dados de diversidade genética

Evelynne Marques Marreira¹, Gabriela Barros Siqueira¹ & Cássio van den Berg¹

¹Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana,
Av. Transnordestina s.n., 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

Assimetria Flutuante em flores de *Cattleya forbesii* Lindl. (Orchidaceae) associada a dados de diversidade genética

Evellyne Marques Marreira¹, Gabriela Barros Siqueira¹ & Cássio van den Berg¹

¹ Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Estadual de Feira de Santana, Av. Transnordestina s.n., 44036-900, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

RESUMO

A Assimetria Flutuante (AF) representa pequenas variações aleatórias em caracteres presumidamente com simetria bilateral e é amplamente utilizada como uma medida de instabilidade no desenvolvimento de plantas e de animais. Essa instabilidade no desenvolvimento pode estar relacionada a alterações ambientais e genéticas, embora haja alguns conflitos sobre a base genética da AF. Nesse estudo usamos a morfometria geométrica para comparar a Assimetria Flutuante com dados de diversidade genética entre populações de *C. forbesii*, assim como identificar entre os órgãos florais quais apresentariam um maior nível de AF. Foram amostradas sete populações ao longo da distribuição da espécie, variando de 7 a 15 indivíduos coletados, cujas flores foram montadas e digitalizadas no programa TPSDig2, gerando dados para as demais análises estatísticas. Para os dados genéticos foram usados marcadores plastidiais (*rpl32-trnL*, *atpI-atpH*) e nuclear (ITS). A Assimetria Flutuante está presente em todos os órgãos analisados, sendo o disco e os lóbulos laterais do labelo (DLL) os órgãos que apresentaram maior porcentagem de AF, com base na ANOVA procustre. Para a relação entre os níveis de AF dos órgãos florais com a diversidade genética das populações nossos dados não identificaram um padrão. Portanto, usar a AF para mensurar diversidade genética ainda é impreciso, necessitando de maiores investigações.

PALAVRAS-CHAVE: Assimetria Flutuante, Diversidade Genética, Morfometria Geométrica, Orchidaceae, *Cattleya*, Flor.

INTRODUÇÃO

Desvios aleatórios em relação à simetria perfeita de uma estrutura bilateral são chamados de assimetria flutuante (AF), e podem estar relacionados a alterações ambientais e genéticas (Møller e Swaddle, 1997; Waldmann, 2002). Ao longo da distribuição geográfica de uma espécie uma diversidade de clima e ambientes que produzem diferentes níveis de estresse e pressões seletivas, que iram refletir nos traços genéticos e fenotípicos, gerando descontinuidades ao longo da distribuição (Hoffmann e Shirriffs, 2002). Fatores estressantes podem levar a uma instabilidade de desenvolvimento (ID), que se expressa em nível de fenótipo como resposta aos estressores internos ou externos que perturbam o desenvolvimento de estruturas ao longo de seu caminho normal de desenvolvimento em um determinado ambiente e produzem “ruído” no desenvolvimento (Zakharov, 1992). Entendendo que estruturas simétricas estão sob o controle das mesmas vias genéticas durante o desenvolvimento, pode-se esperar que qualquer desvio da simetria possa ser produto de distúrbios locais que desestabilizam o desenvolvimento (Hosken et al., 2000; Breuker et al., 2006). Com isso a AF é a medida de ID mais aceita, pois trata-se de variações das diferenças nos lados esquerdo-menos-direito de caráter bilateral. Em geral, existem três tipos principais de assimetria bilateral: assimetria flutuante, assimetria direcional e antissimetria (Palmer e Strobeck, 2003; Palmer, 1994). A assimetria direcional é bastante comum e ocorre quando um lado difere consistentemente do outro, enquanto a antissimetria é mais rara e é caracterizada por uma mistura de indivíduos com tendência à esquerda e à direita, mas não central (Palmer e Strobeck, 1986, 2003). Embora haja alguns conflitos sobre a base genética da AF (Fenster e Galloway 1997), assim como a relação entre a AF e os mecanismos que causam estresse (Hoffmann et al., 2005; Vangestel e Lens, 2011), AF tem sido considerada um bom indicador de ID e, portanto, atua como um biomarcador para o ambiente (Lazić et al., 2013; Lezcano et al., 2015).

A dinâmica populacional de uma espécie tende a não ser de forma uniforme, variando entre as populações periféricas e as centrais (Brown et al., 1996; Lens et al., 1999). Essas variações morfológicas podem ser decorrentes da fragmentação nestes ambientes, na qual estudos têm encontrado relações entre a fragmentação e o aumento dos níveis de assimetria flutuante em diversas populações de pequenos mamíferos terrestres (Badyaev et al., 2000). Populações isoladas tendem a reduzir sua variabilidade

genética e, consequentemente, sua capacidade de se adaptar à variação ambiental, restringindo assim suas opções evolutivas (Meffe e Carroll, 1994).

Traçar um paralelo da assimetria flutuante com os dados de diversidade genética pode trazer questionamentos interessantes sobre a dinâmica dessas populações, uma vez que uma alta diversidade genética pode aumentar a possibilidade de ID e consequentemente influencie AF, portanto, seria esperado encontrar AF em todas as populações amostradas e, também, um nível mais alto de AF em populações que apresentarem um maior nível de diversidade. Grande parte dos trabalhos que relacionam a AF com a diversidade genética, discutem a questões de consanguinidade ou heterozigosidade, mas poucos encontram uma significância entre essa relação (Siikamaki e Lammi, 1998).

A importância da forma floral deriva do seu impacto duplo na atração de polinizadores e do encaixe funcional entre o polinizador e a flor (Kaczorowski et al., 2012), já que os traços florais são ornamentos sexuais responsáveis pela atração de polinizadores que irão determinar seu sucesso reprodutivo (Moller e Eriksson, 1994). Portanto, seria de esperar uma forte seleção direcional na morfometria das flores. Diante disso, as análises morfométricas da forma floral precisam identificar os padrões de variação simétrica e assimetria e quantificá-las (Savriama et al., 2012).

Para esse estudo usamos as flores de *Cattleya forbesii* Lindley, espécie da família Orchidaceae, pertencente a subfamília Epidendroideae (Chase et al., 2003, van den Berg, 2008, van den Berg et al., 2009), inserida no subgênero *Intermediae*, que é composto por cerca de 23 espécies, formando um grupo monofilético. De modo geral, apesar do monofiletismo do subgênero, as espécies não são morfologicamente homogêneas, e por isso já foram alvo de vários questionamentos taxonômicos em suas relações internas (Santos, 2011, van den Berg, 2014). Contudo, *C. forbesii* juntamente com sua espécie irmã, *C. intermedia* Graham ex Hooker, apontadas com ocorrência restrita na planície costeira brasileira, não apresentam problemas de separação taxonômica entre elas (van den Berg 1996). *C. forbesii* ocorre na costa leste do Brasil, presente desde o estado do Rio de Janeiro até Santa Catarina. É relatada como típica de ambientes florestais, ocorrendo como epífita em florestas mais desenvolvidas sobre pântanos e margens de rios ao longo da costa, sobretudo em locais onde existem vales de baixa altitude, embora haja registro de sua ocorrência no Planalto Paulista em altitudes mais elevadas (800-1000m) (van den Berg, 1996).

Em geral, nas flores de *Cattleya* o labelo se destaca dos demais órgãos florais apresentando uma morfologia bem distinta, além de um importante papel na interação com o polinizador. Sua morfologia apresenta três lobos, sendo os lobos laterais recurvados sobre a coluna formando um tubo alongado e estreito na qual os demais órgãos florais se encaixam.

Dessa forma o presente estudo busca comparar entre as populações amostradas a Assimetria Flutuante presente nos órgãos florais de *C. forbesii*, com dados de diversidade genética, avaliando o quanto estes dados se relacionam com base na morfologia dessas flores. E ainda comparar a quantidade relativa de AF entre os diferentes órgãos no contexto evolutivo de maior ou menor seleção natural em função da diferenciação dos órgãos florais, entendendo que a morfologia distinta para o encaixe do polinizador são diferenciais apenas do labelo, seria o nível de Assimetria Flutuante desse órgão maior que nos demais?

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

As flores foram coletadas em diferentes indivíduos de *C. forbesii* provenientes de sete populações no Sul da Floresta Atlântica (Tabela 1). As amostras foram cultivadas por um mínimo de 10 anos no Orquidário Paulo Sodero Martins (ESALQ/USP), de maneira que as variações entre os indivíduos tenham maximizado a variação genotípica das amostras em relação a possíveis mudanças causadas apenas pelo ambiente de origem. Os órgãos do perianto (labelo, pétalas, sépalas) foram separados entre si para a montagem de fichas que foram escaneadas após o processo de montagem (Figura 1). A partir das fichas florais escaneadas, foram digitalizados *landmarks* e *semilandmarks* em cada órgão da flor, usando o software TPSDig2 (Rohlf, 2010). Foram digitalizados, respectivamente, 3 *landmarks* e 32 *semilandmarks* na pétala lateral (PL), sépala dorsal (SD) e sépala lateral (SL). O labelo foi dividido em duas partes: na parte maior (disco e lobos laterais) foram tomados 3 *landmarks* e 67 *semilandmarks* (DLL); além de 2 e 25 no lobo mediano, que foi separado do restante do labelo (LML) (Figura 2). Essa separação do labelo foi necessária para digitalização porque o lobo mediano do labelo apresentou sobreposição com o restante, o que impedia a digitalização conjunta. O processo de digitalização foi feito em duplicata, com intervalo de 30 dias, para ser utilizado na estimativa do erro decorrente do processo.

Tabela 1. Populações utilizadas nas análises de morfometria geométrica.

População	Siglas Pop.	Nº de Indiv.	Voucher	
			Coletor	Coleção
Cordovil, RJ	CO	8	Brieger Coll .16028	ESA
Angra dos Reis, RJ	AN	7	Brieger Coll .32070	ESA
Conchas, SP	CN	15	Brieger Coll .2455	ESA
Fartura, SP	FA	15	Brieger Coll .9947	ESA
Ilha Comprida, SP	IC	11	Brieger Coll .9633	ESA
Paranaguá, PR	PA	7	Brieger Coll .5358	ESA
Santa Catarina, SC	SC	8	Van den Berg 2564	HUEFS

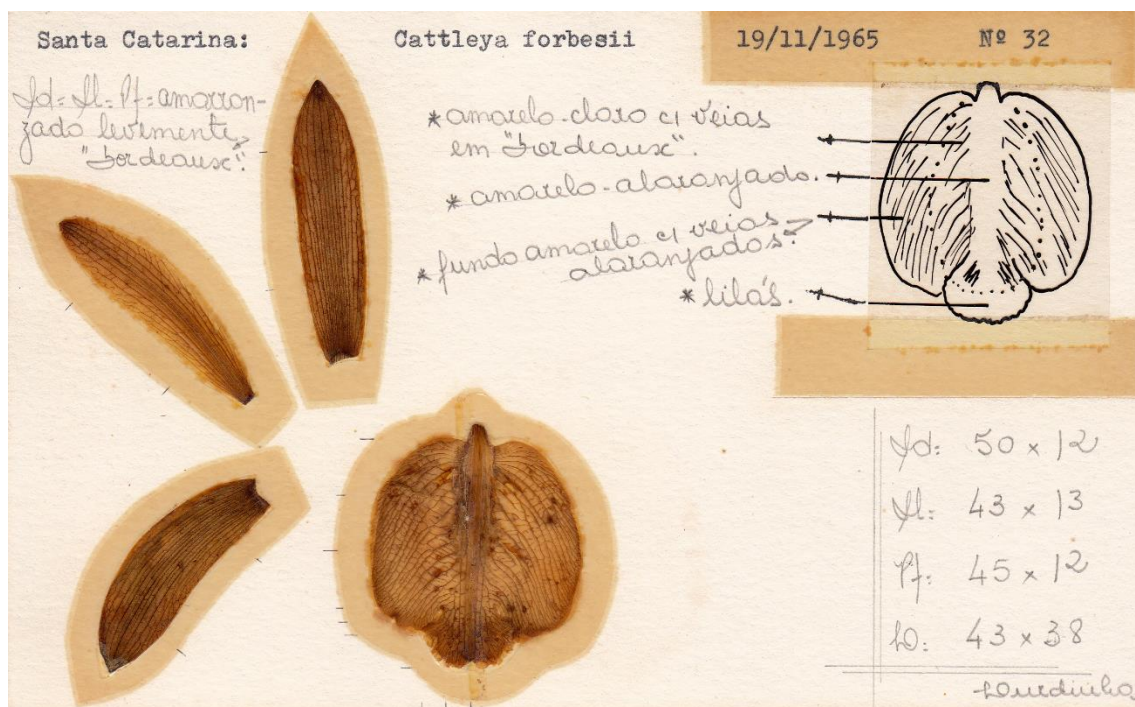


Figura 1. Modelo da ficha floral montada para escaneamento e digitalização dos *landmarks* e *semilandmarks*.

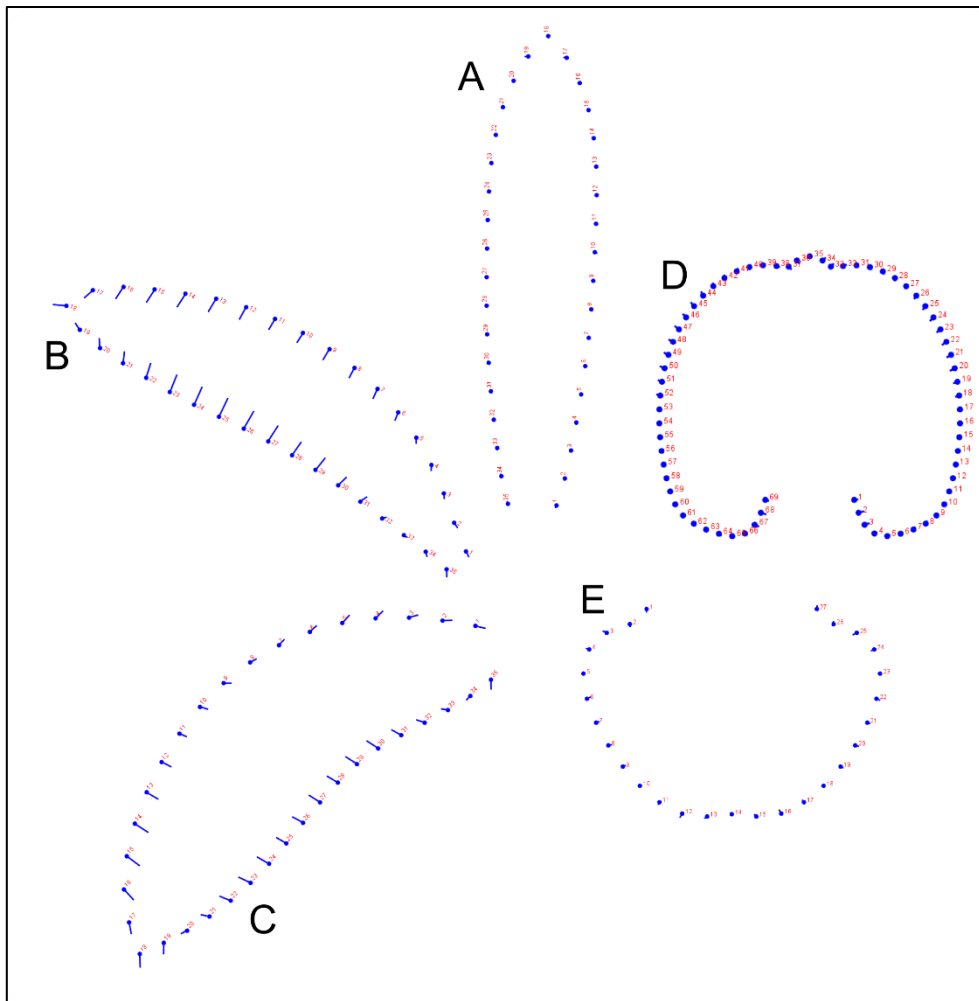


Figura 1. Modelo da digitalização dos órgãos florais. Sépalo dorsal (A), pétala lateral (B), sépalo lateral (C), labelo sem o lobo médio (D) e lobo médio do labelo (E).

Análises Estatísticas

Para realizar essas análises foram utilizados os softwares MorphoJ, Versão 1.05c (Klingenberg, 2011), e a linguagem R versão 3.3.1 (R Development Core Team, 2013), utilizando os pacotes Geomorph versão 3.0.5, e vegan versão 2.4-6 (Adams et al., 2018; Oksanen et al., 2018; Schlager, 2017). A análise de PCA e a opção outlier do software MorphoJ foram utilizados para a identificação de outliers dentro das populações (Klingenberg, 2011). Os documentos de slider, utilizados na superimposição de Procrustes para indicar os semilandmarks, e o sliding dos órgãos laterais que necessitaram ser invertidas para empregar a matching simetria, foram preparados com o software TPSRelw (Rohlf, 2010).

Para a análise das variáveis, inicialmente foi realizada a superimposição de Procrustes com a função *gpagen* (Geomorph), onde foi feita a superimposição dos

indivíduos, proporcionalização, e rotação, para excluir os efeitos de posição, tamanho e orientação, respectivamente, sendo o tamanho e forma usados como variáveis independentes, e os lados dos órgãos como efeito fixo bem como os indivíduos como efeito aleatório (Klingenberg e McIntyre, 1998). Os componentes simétricos e assimétricos de shape foram obtidos a partir da função *bilat.symmetry* (Geomorph), que também gerou a ANOVA (Análise de Variância) de Procrustes em nível de populações, para detectar a presença de assimetria direcional ou flutuante representada pela interação indivíduo $\times$ lado. As SD, DLL e LML são bilateralmente simétricos em torno de seus respectivos eixos centrais e no caso dos órgãos laterais que não são simétricas foi realizado apenas uma ANOVA. Para identificar variações no morfoespaço, uma análise de principais componentes (Principal Component Analysis - PCA) foi realizada determinando a porcentagem de explicação de cada componente principal (PC) da variância total, realizada usando a função *plotTangentSpace* (Geomorph). Usando a função CVA do pacote Morpho, realizamos uma análise das variáveis canônicas (Canonical Variate Analysis - CVA) para avaliar as variações de forma das sete populações. Essa análise busca maximizar as diferenças entre os centróides dos grupos em relação à variação dentro dos grupos, sendo o método mais eficiente para detectar a separação de grupos (Klingenberg et al., 2012; Zelditch et al., 2012). A partir das matrizes de distância de Mahalanobis obtidas da CVA foram feitas ainda análises de agrupamento (UPGMA) das populações. A CVA também foi empregada em uma análise geral, que assim como na CVA anterior, tomou como variável categórica as populações e como dados uma matriz composta com os escores dos três primeiros PCs do componente simétrico de cada órgão, e ainda os tamanhos de centróide de cada órgão.

Obtenção de Sequências

Foram coletados de 6-20 indivíduos por população, sendo utilizadas sequências de 6 a 10 indivíduos das 7 populações, totalizando 52 sequências para a região ITS, e para as regiões plastidiais *atpI-atpH* e *rpl32-trnL* (Tabela 2).

A escolha dos marcadores foi baseada em trabalhos anteriores e a amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da UEFS (LAMOL), pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Tabela 2. Populações utilizadas nas análises moleculares.

População	Sigla Pop.	Nº de Indiv.	Voucher	
			Coletor	Coleção
Cordovil, RJ	CO	8	<i>Brieger Coll .16028</i>	ESA
Angra dos Reis, RJ	AN	10	<i>Brieger Coll .32070</i>	ESA
Conchas, SP	CN	6	<i>Brieger Coll .2455</i>	ESA
Fartura, SP	FA	6	<i>Brieger Coll .9947</i>	ESA
Ilha Comprida, SP	IC	8	<i>Brieger Coll .9633</i>	ESA
Paranaguá, PR	PA	6	<i>Brieger Coll .5358</i>	ESA
Santa Catarina, SC	SC	8	<i>Van den Berg 2564</i>	HUEFS

Para as amplificações das regiões de cpDNA (*rpl32-trnL*, *atpI-atpH*) foi usado o protocolo com 0,1 µL de Taq polymerase (Phoenix) além de 1,5 µL de buffer (100 mM Tris-HCl), 1,2 µL MgCl₂ a 50 mM, 0,3 µL dNTP a 10 mM, 14 µL de H₂O Milli-Q, 3 pmol de cada marcador *forward* *reverse*, 0,3 µL de aditivo baseado em trealose – TBT (Samarakoon et al., 2013) e 1 µL de DNA a 20 ng/µL, totalizando 19 µL. Para a região ITS além de 1 µL de DNA a 20 ng/µL, foram utilizados 0,3 µL de Taq polymerase (Phoenix), 1,5 µL de buffer (100 mM Tris-HCl), 0,75 µL MgCl₂ a 50 mM, 0,3 µL dNTP a 10 mM, 7,65 µL de H₂O Milli-Q, 3 pmol de cada marcador *forward* *reverse*, e os aditivos: 0,3 µL de TBT, 0,3 µL de DMSO 2% e 1M de Betaína, num total de 16 µL (Tabela 3).

Os produtos das PCR foram quantificados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, em uma proporção de 3:1 de azul de bromofenol (0,25% azul de bromofenol e 40% de sacarose) para verificar quanto à amplificação e depois limpos em precipitação com polietilenoglicol (PEG 8000 10% de NaCl 2,5 M) e ressuspensos com água ultrapura no mesmo volume de PCR ou a metade dessa quantidade dependendo da concentração da PCR, e em sequência quantificadas por espectrofotometria no aparelho NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Walthamcity, MA, USA).

Tabela 3. Regiões plastidiais e nuclear usadas para obtenção de sequências de DNA nas populações de *Cattleya forbesii*.

Primers	Sequência	Referência	Desnat.	Amplificação	Ciclos	Extensão
<i>atpI</i>	TAT TTA CAA GYG GTA TTC AAG CT	Shaw et al. (2007)	80°C (5min)	95°C (1min)	30	65°C (5min)
<i>atpH</i>	AYC CAG CAG CAA TAA C			+		
<i>rpl32</i>	CAG TTC CAA AA A AAC GTA CTT C			52°C (1min)		
<i>trnL^(UAG)</i>	CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT			+		
				65°C (4min)		
<i>ITS17SE</i>	ACG AAT TCA TGG TCC GGT GAA GTG TTC G	Sun et al. (1994)	94°C (3min)	94°C (1min)	28	72°C (7min)
<i>ITS26SE</i>	TAG AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA C			+ 54°C (1min) + 72°C (1m 30s)		

Os produtos das PCR foram sequenciados para um volume final de 10 µL, com 1,75 µL de buffer 5×, 0,5 µL do Kit Big Dye 3.1 (AppliedBiosystems), 0,2 µL de primer a 3 pmol e 0,5-1,5 µL de DNA, aproximadamente correspondente a 5-10ng, completando o volume total com a quantidade necessária de água ultrapura. No termociclador, o programa de aquecimento inicial foi de 96° C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 96° C durante 15 segundos para a desnaturação das fitas, 50° C durante 10 segundos para o anelamento do primer e 64° C durante 4 minutos para a extensão e finalizando a 4° C durante 1 minuto para extensão final. Para o marcador nuclear, apenas o número de ciclos foi reduzido para 25. Depois de sequenciadas, as amostras foram submetidas à limpeza com Isopropanol 80%, descansando no escuro por 15 minutos, em seguida centrifugadas e lavadas com Etanol 70% por duas vezes. Por fim as amostras foram sequenciadas em ambos os sentidos no sequenciador automático 3130xl DNA Analyzer (AppliedBiosystems).

As sequências de DNA plastidiais e nuclear foram editadas com o auxílio do *software* Staden 2.0 (Staden et al., 2003) para a exclusão das extremidades e realização do consenso *forward* e *reverse* de cada amostra. O alinhamento das sequências foi feito a partir do *software* Muscle (Edgar, 2004).

Análises Moleculares

No *software* DNAsp (Librado e Rozas, 2009) foram geradas as informações sobre as medidas de diversidade genética, as análises de polimorfismo de DNA, tais como número de haplótipos (h), tamanho da sequência (pb), número de sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π). Foi utilizado o teste de Fs (Fu,

1997), com 10.000 permutações, para avaliar se a neutralidade se mantém, uma vez que a variação desses valores pode significar um desvio do equilíbrio neutro sob a influência das mutações nas populações realizado no programa Arlequin 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010).

RESULTADOS

A ANOVA de Procrustes foi realizada para cada órgão floral e para cada população por órgão floral, na qual a ANOVA difere da PCA na medida em que separa a assimetria direcional da assimétrica flutuante, mas é em todos os outros aspectos amplamente consistente com as análises de PCA.

Para todos os órgãos a maior variância foi concentrada entre os indivíduos (Tabela 4), indicando que a variação simétrica é responsável pela maior parte da variância total. A sépala dorsal (SD) e a parte maior do Labelo (DLL) apresentaram as maiores percentagens de variância, 82% e 85% respectivamente, sendo a segunda maior variância concentrada na interação indivíduo:lado para todas as partes. Foi maior para SD e DLL, com 13% e 14%, respectivamente, indicando um valor considerável de assimetria flutuante. Para os órgãos não simétricos a interação que representa a AF foi bem menor que a encontrada nos órgãos simétricos.

O CVA do componente simétrico demonstrou a separação de algumas populações, onde no eixo CV1 (37,4%) a separação se dá em dois grupos, um com as populações Angra, Cordovil e Conchas o outro com as demais populações (Figura 3). No eixo CV2 que corresponde a 30% de explicação, também é possível observar a separação de Angra e Ilha Comprida das demais. Já o CVA dos componentes de assimetria mostrou que a variação assimétrica teve uma tendência para separar no eixo CV1 (57,12%) as populações de Angra e Cordovil e uma parcial separação de Conchas (Figura 4). No eixo CV2 (20%) apenas Cordovil aparece segregada das demais populações.

Na comparação dos dados genéticos com as AF dos órgãos por população (Tabela 5), dentre todos os órgãos a população de Fartura e Santa Catarina apresentaram os maiores valores de AF, e na sequência quem apresenta os maiores valores de AF é a população de Ilha Comprida. Fartura e Santa Catarina são as populações com maiores valores de diversidade haplotípica, sendo Fartura diversa para ambos os marcadores e em Santa Catarina apenas para os dados nucleares. Assim como essa última, Ilha Comprida apresenta uma alta diversidade para apenas um dos marcadores (cpDNA) assim como,

dentre todas as populações é a que apresenta valor mais significativo para o teste de neutralidade (F_s de F_u) sendo um indicativo de expansão populacional. Angra dos Reis apesar de considerável nível de diversidade genética (similar a Santa Catarina pelo número de haplótipos) e significativo valor de expansão demográfica, foi a população que apresentou os menores valores de AF para todos os órgãos.

Analisando os órgãos individualmente os maiores níveis de AF foram encontrados para o lóbulo médio do labelo (LML) foi referente a população de Fartura., seguido de Santa Catarina. O disco e lóbulos laterais do labelo (DLL) também apresentou maior nível de assimetria flutuante em Fartura, seguido mais uma vez por Santa Catarina e tecnicamente empatada com Ilha Comprida. As sépalas dorsais (SD) apresentaram maior valor de AF na população de Santa Catarina, embora dentre os demais órgãos, tenha apresentado uma variação menor dentre as populações.

A partir dos dendrogramas UPGMA gerados com as análises de agrupamento, empregando as distâncias de Mahalanobis das CVA's dos cinco primeiros escores das PCA's gerais (Figuras 3-4), com dados derivados de ambos os componentes de simetria somados aos tamanhos dos centroides, observamos diferenças significativas entre os componentes simétricos e assimétricos. Analisando os escores dos componentes simétricos mais os tamanhos de centroides as populações de Angra e Cordovil se diferenciam das demais que se dividem ainda em dois grupos, o primeiro agrupando as populações do interior (Conchas e Fartura) e o outro grupo com as demais populações mais ao sul (Ilha Comprida, Paranaguá e Santa Catarina). Para os escores dos componentes assimétricos primeiramente ocorre uma separação em dois grupos onde mais uma vez Angra e Cordovil se agrupam. Entre as demais se observa uma relação relacionada a distribuição geográfica das populações.

Tabela 4. Resultados da ANOVA Procrustes calculado para componentes de forma dos órgãos florais de *C. forbesii*. Siglas: PL-Pétala Lateral; SL-Sépala Lateral; SD-Sépala Dorsal; DLL-Disco e Lóbulos Laterais do Labelo; LML-Lóbulo Médio do Labelo; Ind. = Indivíduos; Ind: Lado = interação Indivíduos x Lado; Pop=População; Replicate:Pop=interação replica x População ; Df = graus de liberdade; SS = Soma dos quadrados; MS = Quadrados médios; F = valores F; Pr (> F) = p-valor; %Va = percentual de variação explicado pelo modelo.

	FATOR	Df	SS	MS	Rsq	F	Pr(>F)	%Va
PL	Replicate	1	0.000122	0.0001220	0.000456	0.0796	0.9959	0.045
	Pop	6	0.070426	0.0117376	0.263205	7.6549	9.999e-05	26.32
	Replicate:Pop	6	0.000753	0.0001255	0.002813	0.0818	1	0.281
	Residual	128	0.196269	0.00155334				73.35
SL	Replicate	1	0.000055	0.0000547	0.000197	0.0353	1	0.02
	Pop	6	0.079112	0.0131853	0.284734	8.5010	9.999e-05	28.47
	Replicate:Pop	6	0.000145	0.0000242	0.000523	0.0156	1	0.052
	Residual	128	0.198533	0.0015510				71.45
SD	Ind	70	0.122332	0.00174760	0.85270	6.2872	0.7585	85.27
	Side	1	0.000446	0.00044642	0.00311	1.6061	0.1752	0.31
	Ind:side	70	0.019457	0.00027796	0.13562	32.1201	9.999e-05	13.56
	Residual	142	0.001229	0.00000865	0.00857			0.86
DLL	Ind	70	0.166250	0.00237500	0.82962	5.6590	0.76702	82.96
	Side	1	0.000875	0.00087502	0.00437	2.0849	0.05259	0.44
	Ind:side	70	0.029378	0.00041969	0.14660	15.3177	9.999e-05	14.66
	Residual	142	0.003891	0.00002740	0.01941			1.94
LML	Ind	70	0.50037	0.0071481	0.81919	6.6034	0.1711	81.92
	Side	1	0.00958	0.0095841	0.01569	8.8537	9.999e-05	1.57
	Ind:side	70	0.07577	0.0010825	0.12406	6.1278	9.999e-05	12.40
	Residual	142	0.02508	0.0001767	0.04107			4.10

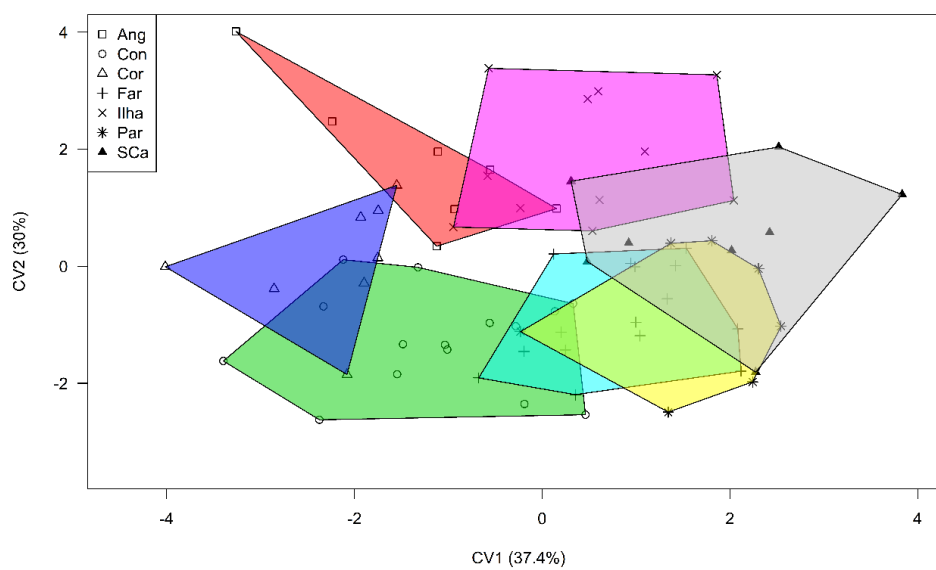


Figura 3. Análise de Variáveis Canônicas (CVA) dos componentes simétricos de diferentes órgãos (SD, DLL e LML) de sete populações de *Cattleya forbesii*.

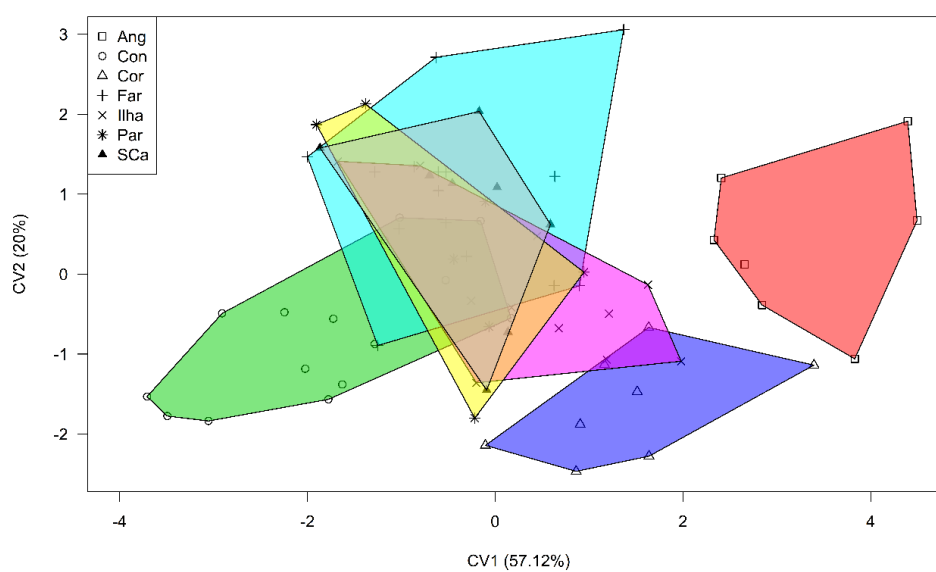


Figura 4. Análise de Variáveis Canônicas (CVA) dos componentes assimétricos de diferentes órgãos (SD, DLL e LML) de sete populações de *Cattleya forbesii*.

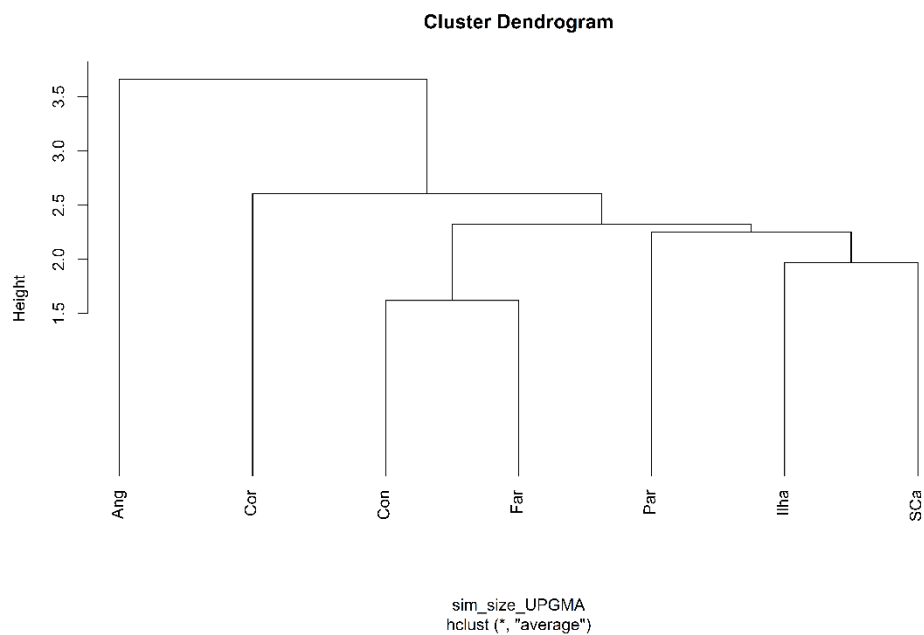


Figura 5. Análise de UPGMA dos componentes simétricos das sete populações de *Cattleya forbesii*.

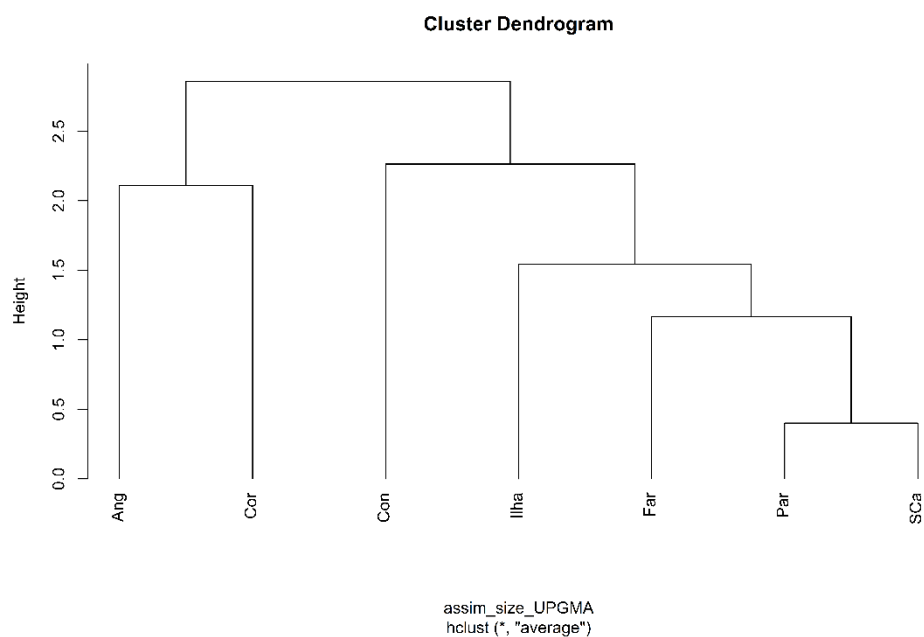


Figura 6. Análise de UPGMA dos componentes assimétricos das sete populações de *Cattleya forbesii*.

Tabela 5. Nível de AF por população para cada órgão floral, relacionado a diversidade haplotípica das populações por conjunto de dado (ITS e cpDNA) e com valor do teste de Fs de Fu. Siglas: SD-sépala dorsal; DLL-disco e lóbulos laterais do labelo; LML-lóbulo médio do labelo; AF (SS)-Flutuação Assimétrica com base no valor da soma dos quadrados.

População	Órgãos	AF (SS)	Diversidade Haplotípica				Fs de Fu (P-valor)
			<i>n</i>	ITS	<i>n</i>	cpDNA	
Cordovil	SD	14.80% (0.0023003)	3	0.60714	3	0.67857	-0.26013 (0.38690)
	DLL	14.05% (0.0029851)					
	LML	14.08% (0.0071920)					
Angra dos Reis	SD	13.89% (0.0014470)	4	0.73333	2	0.46667	-2.04872 (0.04350)
	DLL	9.83% (0.0023696)					
	LML	8.26% (0.0053870)					
Conchas	SD	13.45% (0.003308)	2	0.33333	1	0	0.00000 (N.A.)
	DLL	16.06% (0.007229)					
	LML	16.47% (0.009860)					
Fartura	SD	19.77% (0.0041016)	4	0.71429	4	0.71429	-1.07343 (0.19050)
	DLL	18.91% (0.0056700)					
	LML	22.77% (0.0176710)					
Ilha Comprida	SD	18.26% (0.0034521)	2	0.28571	4	0.64286	-4.00260 (0.00070)
	DLL	17.21% (0.0042182)					
	LML	14.13% (0.0119930)					
Paranaguá	SD	16.80% (0.0012079)	3	0.73333	3	0.60000	-1.41795 (0.09970)
	DLL	9.68% (0.0012730)					
	LML	7.88% (0.0059060)					
Santa Catarina	SD	29.55% (0.0015806)	4	0.82143	2	0.25000	-1.54309 (0.07270)
	DLL	17.55% (0.0026456)					
	LML	22.68% (0.0094322)					

DISCUSSÃO

Os níveis de variância dos resultados da ANOVA de Procrustes demonstram que entre os órgãos há uma quantidade considerável de Assimetria Flutuante (AF), principalmente no Disco e Lóbulos Laterais do Labelo (DLL), o que é esperado uma vez que dentre as órgãos analisados o DLL é o que sofre a maior influência da seleção natural

devido sua morfologia ser diretamente relacionada a interação com o polinizador, portanto sob uma forte seleção natural. Estruturas que sofrem forte pressão ambiental tendem a apresentar altos níveis de assimetria flutuante, como demonstrou Palmer e Strobeck (1986) no estudo com várias populações de peixes sob forte pressão ambiental. Alguns trabalhos tem abordado a relação da assimetria flutuante com espécies de insetos herbívoros e polinizadores que a usam a AF para guiarem as suas escolhas durante a busca por recurso, tanto para as folhas (Lempa et al., 2000, Cornelissen e Stiling, 2005) quanto em flores (Moller, 1995, Giurfa et al., 1996) e com isso aumentam a pressão seletiva dessas estruturas. Imaginando nesse caso, que dentre as partes do labelo, o lóbulo médio do labelo (LML) serviria como uma plataforma de pouso para esse polinizador, e o disco mais os lóbulos laterais (DLL) seriam partes que deveriam se adequar ao tamanho do inseto polinizador para o seu encaixe ideal. Portanto, espera-se que DLL esteja sobre uma maior pressão da seleção natural que LML, devendo exibir maiores níveis de AF, embora não tenha sido o encontrado. Padrões às vezes inesperados ou contraditórios de diferenças nos níveis de AF entre populações sujeitas ou não a vários estressores genéticos ou ambientais ou entre indivíduos, podem estar relacionados a arquitetura genética da AF, sugerindo comportamentos genéticos complexos, como dominância e epistasia da característica (Leamy e Klingenberg, 2005). Leamy et al. (2002) estudando camundongos encontraram uma abundância de interações de loci de características quantitativas (QTL) afetando AF no tamanho da mandíbula, assim como em Leamy et al. (2015), na qual se demonstrou que a arquitetura genética da AF é dominada pela epistasia, o que pode ser um caso a ser investigado para o Labelo.

A separação constatada nos eixos da CVA referentes aos componentes simétricos demonstrou que as populações de Cordovil, Angra e Conchas tendem a se separar das demais. Segundo análises de reconstrução filogeográfica realizadas no Capítulo 1, essas populações compartilham uma origem mais recente em relação as demais populações. Klingenberg et al. (2012) aponta que a variação dos componentes simétricos encontrados dentro dos grupos é influenciada tanto pela diversidade genética como pela plasticidade fenotípica e, portanto, a separação dessas populações pode estar relacionada ao efeito fundador, uma vez que somente uma pequena fração da variação genética total pode ter originado essas populações. Para as análises feitas utilizando apenas os componentes assimétricos, o eixo CV1 foi responsável por mais da metade da informação (57,12%) e novamente as mesmas populações de Cordovil, Angra e Conchas tendem a separação, porém com Cordovil e Angra mais destacadas e Conchas

de forma mais sutil do que no CVA simétrico, reforçando o padrão de que essas populações não somente diferem do ponto de vista simétrico, mas que também há um considerável nível de instabilidade do desenvolvimento nas flores dessas populações. A partir das distâncias de Mahalanobis geradas dessas CVAs, o dendrograma de UPGMA também corrobora essa separação para ambos componentes simétrico e assimétrico, sendo que para os componentes assimétricos a separação em dois blocos é bem similar à distribuição geográfica dessas populações.

As relações entre assimetria flutuante e a diversidade haplotípica ou o teste de neutralidade foram inconsistentes com as medidas de AF. A falta de correlação nessas relações pode ser devido à falta de poder estatístico dos dados coletados, uma vez que estudos com amostras pequenas e um número pequeno de populações replicadas sofrem com a falta de poder estatístico (Gilligan et al., 2000).

Das populações amostradas, Fartura exibe os maiores valores de diversidade haplotípica para ambos marcadores, mas dentre os níveis de AF nas diferentes partes seus valores são inferiores a outras populações com uma menor diversidade de AF em diferentes órgãos, como por exemplo em Santa Catarina, esta última com alta diversidade haplotípica apenas nos dados nucleares. Essas populações se localizam em áreas apontadas como supostos refúgios nos períodos de oscilações climáticas do quaternário (Capítulo 1), portanto devem abrigar uma maior variação genética que embora de maneira incerta, está refletida nos níveis de AF. A população de Conchas, por sua vez, apresenta os menores valores de diversidade genética embora concentre níveis consideráveis de AF entre as diferentes partes, e as duas partes do Labelo (DLL e LML) as porcentagens de AF são superiores a populações com maiores níveis de diversidade genética, como em Angra e Paranaguá. Portanto, diferentemente das flores de *Lychnis viscaria* L. (Caryophyllaceae), cujos autores encontraram em populações naturais níveis de AF claramente correlacionados com o nível de heterozigosidade (Siikamaki e Lammi 1998), em nossas análises essa comparação não foi conclusiva, embora seja possível que a AF possa estar relacionada à consanguinidade ou heterozigosidade para alguns caracteres, mas para outros não (Gilligan et al., 2000).

Nossos resultados confirmaram as afirmações de Waldmann (2002), que sugeriu que as conclusões que se podem tiradas sobre da maioria dos estudos sobre a confiabilidade da AF como um indicador de variação genética são limitadas e devem ser usadas apenas como diretrizes aproximadas. Portanto, parece que a AF não é um bom preditor do nível geral de variação genética de populações específicas, e se o objetivo é

conservar altos níveis de variação genética, a AF parece ser uma ferramenta imprecisa que certamente deve ser usada com cautela.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, D.C., Collyer, M.L., Kaliontzopoulou, A. (2018). Geomorph: Software for geometric morphometric analyses. R package version 3.0.6. <https://cran.rproject.org/package=geomorph>.
- Badyaev, A.V., Foresman K.R., Fernandes, M.V. (2000). Stress and developmental stability: vegetation removal causes increased fluctuating asymmetry in shrews. *Ecology* 81: 336-45
- Breuker, C.J., Patterson, J.S., Klingenberg, C.P. (2006). A single basis for developmental buffering of *Drosophila* wing shape. *PloS one* 1, e7.
- Brown, J.H., Stevens, G.C., Kaufman, D.M., (1996). The geographic range: size, shape, boundaries, and internal structure. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 27: 597-623.
- 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
- Cornelissen T., Stiling P. (2005). Perfect is best: low leaf fluctuating asymmetry reduces herbivory by leaf miners. *Oecologia* 142: 46-56.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Resources*, Oxford, 32(5): 1792-1797.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, Oxford, 10: 564-567.
- Fenster, C.B., Galloway, L.P. (1997). Developmental homeostasis and floral form: evolutionary consequences and genetic basis. *Int J Plant Sci* 158: S121-S130.

- Gilligan, D.M., Woodworth, L.M., Montgomery, M.E., Nurthen, R.K., Briscoe, D.A., Frankham, R. (2000). Can fluctuating asymmetry be used to detect inbreeding and loss of genetic diversity in endangered populations? *Anim. Conserv* 3: 97-104.
- Giurfa, M., Eichmann, B., Menzel, R. (1996). Symmetry perception in an insect. *Nature* 382: 458-461
- Hoffmann, A.A., Shirriffs, J. (2002). Geographic variation for wing shape in *Drosophila serrata*. *Evolution* 50: 1068-1073.
- Hoffmann, A.A., Woods, R.E., Collins, E., Wallin, K., White, A., McKenzie, J.A., (2005). Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insects. *Aust. J. Entomol.* 44: 233-243.
- Hosken, D.J., Blanckenhorn, W.U., Ward, P.I., (2000). Developmental stability in yellowdung flies (*Scathophaga stercoraria*): fluctuating asymmetry, heterozygosity and environmental stress. *J. Evol. Biol.* 13: 919-926.
- Kaczorowski, R.L., Seliger, A.R., Gaskett, A.C., Wigsten, S.K., Raguso, R.A. (2012). Corolla shape vs. size in flower choice by a nocturnal hawkmoth pollinator. *Functional Ecology* 26: 577- 587.
- Klingenberg, C.P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric.
- Klingenberg, C.P., Duttke, S., Whelan, S., Kim, M. (2012). Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: a multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. *Journal of evolutionary biology* 25(1): 115-129.
- Klingenberg, C.P., McIntyre G.S. (1998). Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution* 52(5): 1363-1375.
- Lazić, M.M., Kaliontzopoulou, A., Carretero, M.A., Crnobrnja-Isailović, J., (2013). Lizards from urban areas are more asymmetric: using fluctuating asymmetry to evaluate environmental disturbance. *PloS one* 8, e84190.
- Leamy, L.J.; Klingenberg, C.P. (2005). The genetics and evolution of fluctuating asymmetry. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36: 1-21.

- Leamy, L., Klingenberg, C., Sherratt, E., Wolf, J., Cheverud, J. (2015). The Genetic Architecture of Fluctuating Asymmetry of Mandible Size and Shape in a Population of Mice: Another Look. *Symmetry*, 7(1), 146-163.
- Leamy, L.J.; Routman, E.J.; Cheverud, J.M. (2002). An epistatic genetic basis for fluctuating asymmetry of mandible size in mice. *Evolution* 56: 642-653.
- Lempa K., Martel J., Koricheva J., Haukioja E., Ossipov V., Ossipova S., Pihlaja K. (2000). Covariation of fluctuating asymmetry, herbivory and chemistry during birch leaf expansion. *Oecologia*, 122: 354-360
- Lens, L., Dongen, S., Wilder, C.M., Brooks, T.M., Matthysen, E., (1999). Fluctuating asymmetry increases with habitat disturbance in seven bird species of a fragmented subtropical forest. *Proc. R. Soc. Ser. B* 266: 1241-1246.
- Lezcano, A.H., Quiroga, M.L.R., Liberoff, A.L., Van der Molen, S., (2015). Marine pollution effects on the southern surf crab *Ovalipes trimaculatus* (Crustacea: Brachyura:Polybiidae) in Patagonia Argentina. *Mar. Pollut. Bull.* 91: 524-529.
- Librado, P., Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, Oxford, 25: 1541-1542.
- Meffe, G.K., Carroll, R. (1994). Genetics: Conservation of diversity within species. In: Sinauer Associates (ed) *Principles of Conservation Biology*. Sunderland, MA, pp 143-178.
- Møller, A.P. (1995). Leaf-mining insects and fluctuating asymmetry in elm *Ulmus glabra* leaves. *Journal of Animal Ecology*, 64 (6): 697-707.
- Møller, A.P., Eriksson, M. (1994). Patterns of fluctuating asymmetry in flowers: implication for sexual selection in plants. *J Evol Biol* 7: 97-113.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R; O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H. (2018). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.4 6. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.

- Palmer, A.R. (1994). Fluctuating asymmetry analyses: a primer. In *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*, ed. TA Markow, pp. 335-64. Dordrecht: Kluwer
- Palmer, A.R., Strobeck, C. (1986). Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 17: 391-421
- Palmer, A.R., Strobeck, C. (2003). Fluctuating asymmetry analyses revisited, in *Developmental Instability: Causes and Consequences*, Polak, M., Ed., Oxford: Oxford Univ. Press, pp. 279-319.
- R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>
- Rohlf, F.J. (2010). tpsDIG, Suny Stony Brook. Available: Accessed, 9.
- Samarakoon, T., Wang, S.Y., Alford, M. (2013). Enhancing PCR Amplification of DNA from recalcitrant plant specimens using a trehalose-based additive application in plant sciences. *Botanical Society of America, London*, 1(1): 795-804.
- Santos, T.M. (2011). *Eventos antigos de especiação híbrida no grupo bifoliado do gênero Cattleya Linl. (Orchidaceae) inferidos a partir de uma filogenia baseada em 16 regiões de DNA nuclear e plastidial*. Tese de Mestrado, UEFS, 66p.
- Savriama, Y., Gómez, M.J., Perfectti, F., Klingenberg, C.P. (2012). Geometric morphometrics of corolla shape: dissecting components of symmetric and asymmetric variation in *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae). *New Phytologist* 196(3): 945-954.
- Schlager, S. (2017). "Morpho and Rvcg - Shape Analysis in R." In Zheng G, Li S and Székely G (eds.), *Statistical Shape and Deformation Analysis*, pp. 217-256.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., Small, R.L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am J Bot* 94: 275-288.
- Siikamäki, P., Lammi, A. (1998). Fluctuating asymmetry in central and marginal populations of *Lychnis viscaria* in relation to genetic and environmental factors. *Evolution* 52:1285-1292.

- Staden, K.R., Beal, K.F., Bonfield, J.K. (1998). The Staden package. - In: Misener S. & Krawetz S. A. (eds), *Computer methods in molecular biology*, Humana Press Inc 132: 115-130.
- Sun, Y., Skinner, D.Z., Liang, G.H., Hulbert, S.H. (1994). Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theor Appl Genet* 89: 26-32.
- van den Berg, C. (1996). *Estudo da variabilidade intra e interespecífica em populações de espécies brasileiras de Cattleya (Orchidaceae-Laeliinae)*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 154 p.
- van den Berg, C. (2008). New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). *Neodiversity* 3: 3-12.
- van den Berg, C. (2014). Importance of hybridization for the evolution of *Cattleya*. *Renziana* 4: 74-79.
- van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Soto-Arenas, M.A., Chase, M.W. (2009). A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. *Ann. Bot.* 104(3): 417-430.
- Vangestel, C., Lens, L., (2011). Does fluctuating asymmetry constitute a sensitive biomarker of nutritional stress in house sparrows (*Passer domesticus*)? *Ecol. Indic.* 11: 389-394.
- Waldmann, P. (2002). Fluctuating Asymmetry in *Scabiosa canescens* and *Scabiosa columbaria*: Association with Genetic Variation and Population Size. *International Journal of Plant Sciences*, 163(2): 329-334.
- Zakharov, V.M., Graham, J.H. (eds.) (1992). Developmental stability in natural populations. *Acta zoologica Fennica* 191: 1-200.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D. (2012). Geometric morphometrics for biologists: a primer. Academic Press. Second edition 475.

CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos estudos realizados nesse trabalho buscamos ampliar o conhecimento sobre os padrões históricos na porção sul da Floresta Atlântica Brasileira através do estudo filogeográfico das espécies *C. forbesii* e *C. intermedia*. Em nossas análises filogeográficas foi encontrada uma forte estrutura genética, presente principalmente nos dados de cpDNA, evidenciando a persistência dessas espécies cujo várias linhagens de haplótipos datam desde antes do Pleistoceno. Possíveis refúgios foram encontrados ao norte de Santa Catarina para *C. intermedia* e o platô no interior de São Paulo para *C. forbesii*. Possivelmente pelo fato das espécies apresentarem similaridade ecológica e ancestralidade compartilhada foi perceptível ainda um certo grau de introgressão entre elas, embora sutil e recorrente ao longo do tempo. Com isso podemos compreender um pouco mais sobre essas espécies de orquídeas cientes que ainda há questões a serem elucidadas a partir dos conhecimentos gerados nesse trabalho, como a investigação sobre gradientes de latitude sobre a diversidade dessas espécies visto o comportamento da distribuição dos haplótipos. Agregar estudos sobre os efeitos da dispersão diferencial entre pólen e sementes, além de um estudo de modelagem de nicho podem trazer ainda mais clareza sobre os modelos de migração e modelos de distribuição potencial para essas espécies.

Para os dados de morfometria em *C. forbesii*, nossas análises demonstraram que a Assimetria Flutuante está presente em todos os órgãos florais, embora na comparação com os dados de diversidade genética das populações os dados não identificaram um padrão. Limitações de amostragem, assim como, da metodologia empregada, podem ter influenciado as análises, embora outros trabalhos já apontem que, só usar a AF para mensurar diversidade genética ainda é impreciso, necessitando investigações mais profundas sobre a arquitetura genética envolvida.