

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Filogeografia a partir de DNA de cloroplasto da orquídea neotropical
Epidendrum orchidiflorum (Orchidaceae: Laeliinae) no Brasil**

Adriana Marcela Robles Pachón

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2016**

Adriana Marcela Robles Pachón
Engenheira Agrônoma

Filogeografia a partir de DNA de cloroplasto da orquídea neotropical *Epidendrum orchidiflorum* (Orchidaceae: Laeliinae) no Brasil

Orientador:
Profa. Dra. **ELIZABETH ANN VEASEY**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Robles Pachón, Adriana Marcela

Filogeografia a partir de DNA de cloroplasto da orquídea neotropical *Epidendrum orchidiflorum* (Orchidaceae: Laeliinae) no Brasil / Adriana Marcela Robles Pachón. - - Piracicaba, 2016.

61 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Diversidade genética 2. Estrutura populacional 3. História evolutiva 4. Modelagem de nicho ecológico I. Título

CDD 635.93415
R666f

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico

A mi mamá Flor Pachón pues si tu ayuda nada de esto hubiera pasado, me siento orgullosa de ser tu hija, gracias por darme todo tu apoyo sin medir esfuerzos, te amo mamá!

Ao meu companheiro Bruno Festa e meu filho Thiago por me dar sempre muito apoio e carinho nesta caminhada.

A meu irmão Hernando, meu pai Luis e toda minha família colombiana e brasileira por confiar em mim, obrigada sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a Deus por conduzir minha vida sempre a lugares e experiências maravilhosas;

Agradeço a Universidade de São Paulo, por meio da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado;

A Dra Elizabeth Ann Veasey, minha orientadora, agradeço profundamente a Deus por ter sido sua orientada, você me ensinou muito mais coisas do que poderia imaginar, grata pela confiança, pela oportunidade, pelos esclarecimentos e por nunca medir esforços na realização do meu projeto, mas também grata pelas conversas e por me mostrar que precisamos de mais pesquisadores com coração, agradeço muito por todo o carinho;

Agradeço ao professor Cássio van den Berg, pelos esforços na realização este projeto e pelas disposição para as coletas no projeto. Admiro muito seu trabalho;

A Jucelene Rodriguez, obrigada pelos esforços, sempre tentando me ajudar para dar o mais certo possível, por me ensinar tudo o que hoje sei no laboratório e agradeço também sua amabilidade e companherismo.

A meus amigos da “Salinha” Gabriel, Tati, Thais, Shanti, Melina, Sueme, Alessandro e Maísa, sempre muito inspiradores e prestativos, grata pela paciência e pela amizade;

A minhas queridas Bangs, Kpota, Iskitou e Inter, levo vocês sempre no coração, junto a meus amigos da Republica Ataq, vocês foram minha família aqui, gratidão por tantos momentos alegres. A Raulzito, Doretinha e a Juditi, vocês são jóias raras.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivos.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Família Orchidaceae	17
2.2 Filogeografia	20
2.3 Marcadores moleculares; DNA cloroplastidial (cpDNA).....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Material vegetal	27
3.2 Extrações de DNA	28
3.3 Amplificação dos marcadores cpDNA	29
3.4 Análises de seqüências de cpDNA	30
3.5 Análises estatísticas	30
3.5.1 Análise de diversidade genética	30
3.5.2 Análises da estruturação genética.....	30
3.5.3 Análise de isolamento por distância	31
3.5.4 Estimativas de tamanho efetivo populacional e taxas de migração.....	31
3.5.5. Modelo de Nichos Ecológicos	35
4 RESULTADOS	37
4.1 Diversidade genética em <i>E. orchidiflorum</i>	37
4.2 Estrutura genética em <i>E. orchidiflorum</i>	38
4.3 Análises de Modelagem de Nicho Ecológico.....	44
5 DISCUSSÃO	47
5.1 Diversidade genética entre as populações amostradas de <i>E. orchidiflorum</i>	47
5.2 Estrutura genética e processos demográficos que podem ter influenciado na distribuição atual das populações de <i>E. orchidiflorum</i>	48
5.3 Distribuição de <i>E. orchidiflorum</i> durante as oscilações climáticas do Quaternário Tardio, segundo a distribuição atual da espécie	50
6 CONCLUSÕES	53
REFERENCIAS	55

RESUMO

Filogeografia a partir de DNA de cloroplasto da orquídea neotropical *Epidendrum orchidiflorum* (Orchidaceae: Laellinae) no Brasil

A filogeografia é o campo de estudo que pode revelar a história evolutiva das espécies, sua diversidade e a estrutura genética atual das populações. Neste estudo, foi avaliada a diversidade genética de 13 populações de *Epidendrum orchidiflorum* (Orchidaceae) utilizando uma abordagem filogeográfica, na tentativa de reconstruir a história evolutiva desta espécie ao longo da Chapada Diamantina e suas serras próximas, do litoral de Bahia e litoral do Rio de Janeiro. Foram usados como marcadores moleculares regiões de DNA de cloroplasto - cpDNA, as quais por serem de herança materna, natureza não recombinante e se encontrarem abundantemente nas plantas, são ideais para este tipo de estudos. Com os dados obtidos do sequenciamento de duas regiões de cpDNA (*rps16-trnK* e *rpl32-trnL*), foram calculados os índices de diversidade para as 13 localidades amostradas, sendo que o número total de haplótipos foi 12. A diversidade haplotípica (Hd) variou de 0 para a população do Litoral da Bahia, Restinga (RE) a 0,889 para a população de Seabra (SE), próxima da Chapada Diamantina. O haplótipo mais freqüente foi o H2 apresentando-se em nove populações. A população RE só apresentou um haplótipo (H2), enquanto que a população de maior diversidade (SE) apresentou seis haplótipos. Além disso, em três populações (SE, Morro do Chapéu e Arraial do Cabo) foram encontrados haplótipos únicos. A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que a diferenciação genética encontrada entre populações ($F_{ST} = 47,5\%$) é elevada, mostrando que existem diferenças entre populações para esta espécie. No entanto, a proporção de variabilidade de haplótipos encontrados dentro das populações (52,5%, $P < 0,001$) foi maior do que entre as populações. As análises geradas para diferentes agrupamentos testados nas AMOVAS e no programa Migrate-n, sugerem que o melhor modelo que explicaria a conectividade entre as populações seria o modelo de uma grande população panmítica que reúne as populações das serras (JA, PD, RU, MC, CD, SA, LE, CF, MU, PI e SE) com migração para as populações do litoral da Bahia (RE) e a população do Rio de Janeiro (AC). Estas análises são suportadas pelas análises geradas da Modelagem de Nicho Ecológico (EEM), indicando que as populações próximas a Chapada Diamantina se encontram conectadas desde a interglaciação e a última glaciação, porém a população do Rio de Janeiro foi separada durante a última glaciação, permanecendo isolada, divergindo ao longo do tempo devido à deriva genética e à mutação.

Palavras-chave: Diversidade genética; Estrutura populacional; História evolutiva; Modelagem de nicho ecológico

ABSTRACT

Phylogeography from chloroplast DNA of the Neotropical orchid *Epidendrum orchidiflorum* (Orchidaceae: Laellinae) in Brazil

Phylogeography is the field of study that may reveal the evolutionary history of the species, their diversity and the current genetic structure of populations. In this study, we evaluated the genetic diversity of 13 populations of *Epidendrum orchidiflorum* (Orchidaceae) using a phylogeographic approach in an attempt to reconstruct the evolutionary history of this species along the Chapada Diamantina and its nearby sierras, the Bahia coastline and the Rio de Janeiro coastline. We used as molecular markers chloroplast DNA regions - cpDNA, which are maternally inherited, non-recombinant and found abundantly in plants, and for these reasons are ideal for this type of studies. With the data obtained from the sequencing of two regions of cpDNA (*rps16-trnK* and *rpl32-trnL*), the diversity index for the 13 sampled locations were calculated, and the total number of haplotypes was 12. The haplotype diversity (H_d) ranged from 0.0 for the Coastal population of Bahia, Restinga (RE) to 0.889 for the population of Seabra (SE), near the Chapada Diamantina. The most common haplotype was the H2 found in nine populations. The RE population showed only one haplotype (H2), while the population of greater diversity (SE) showed six haplotypes. Moreover, in three populations (SE, Morro do Chapéu and Arraial do Cabo) unique haplotypes were found. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the genetic difference found between populations ($F_{ST} = 47.5\%$) is high, showing that there are differences between populations for this species. However, the proportion of haplotypes variability found within populations (52.5%, $P < 0.001$) was higher than among populations. The analyses generated for different groups tested in AMOVAS and in the Migrate-n program suggest that the best model to explain the connectivity between populations would be the model of a large panmitic population that brings together the populations of the Sierras (JA, PD, RU, MC, CD, SA, LE, CF, MU, PI and SE) with migration towards the populations of the coast of Bahia (RE) and the population of Rio de Janeiro (AC). These analyses are supported by the analyses generated by the Ecological Niche Modeling (EEM), indicating that the populations near the Chapada Diamantina are connected since the interglacial and the last glaciation, but the population of Rio de Janeiro was separated during the last glaciation, remaining isolated and diverged over time due to genetic drift and mutations.

Keywords: Genetic diversity; Population structure; Evolutionary history; Ecological niche modeling

1 INTRODUÇÃO

A filogeografia é definida como “o campo de estudo dos princípios e processos que regulam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente aqueles entre e dentro de espécies intimamente relacionadas” (AVISE, 2000). Entender como eventos históricos geográficos ajudaram a moldar a distribuição de alelos, populações e espécies são, portanto, o principal objetivo da filogeografia (FREELAND; KIRK; PETERSEN, 2011). Sabe-se que a distribuição atual das populações de plantas ao longo dos territórios foi influenciada por uma distribuição diferencial depois de acontecimentos demográficos históricos, sendo o mais marcante a Última Grande Glaciação - UGG (SAIA et al., 2008). Este evento determinou a criação de locais fragmentados chamados refúgios durante períodos mais frios (secos) e se expandindo e condensando de novo durante períodos mais quentes (úmidos), fragmentando as populações e limitando a troca de genes entre as espécies (ANTONIELLI; SANMARTIN, 2011). Os efeitos do UGG tiveram diferentes impactos sobre as comunidades florestais e paisagens de plantas (PINHEIRO et al., 2011). Segundo Turchetto-Zolet et al. (2013), as oscilações climáticas durante os ciclos glaciais mostraram intervalos geográficos reduzidos para ambientes florestais, mas em ambientes de áreas de vegetação aberta as respostas foram variáveis, sugerindo um mosaico complexo de padrões filogeográficos na América do Sul.

É importante determinar quais são estas áreas de refúgio, pois a destruição destes habitats poderia causar uma perda grande de biodiversidade, apagando a assinatura de processos históricos que moldaram a atual diversidade genética e de espécies (CARNAVAL et al., 2009). De modo que o desenho de estratégias adequadas para a conservação das espécies requer a compreensão de sua história evolutiva e de seus padrões geográficos de estruturação genética, a fim de identificar unidades demográficas relevantes para ações de manejo *in-situ* e *ex-situ* (FRANKHAM et al., 2008; PROVAN; BENNETT, 2008). Deste modo, uma das regiões com maior riqueza de espécies na América do Sul é a região do neotrópico, seja por fatores bióticos (interação com o solo, com polinizadores, herbívoros, etc.) e abióticos (precipitação, temperatura, influência da paisagem e hidrologia, etc.), sendo esta uma região que abriga muitas famílias de plantas (ANTONELLI; SANMARTÍN, 2011). O neotrópico se estende desde o centro do México até o sul do Brasil, incluindo, portanto, a Mata Atlântica Brasileira, que é considerada uma região altamente biodiversa (~20.000 espécies), sendo considerada prioridade de conservação (MYERS, 2000).

Com o intuito de caracterizar estes padrões e inferir sobre suas causas subjacentes,

uma série de estudos têm sido realizados nos últimos anos com enfoque na filogeografia, empregando principalmente seqüências de DNA cloroplastidial - cpDNA e genotipagem de regiões de microssatélites (FRANKHAM et al., 2008). Deste modo, inferências a partir de tais estudos regionais têm ajudado a informar as prioridades de conservação, identificando e delimitando as áreas com histórias evolucionárias singulares co-distribuídas, a fim de priorizar unidades geográficas para a conservação biológica (HICKERSON et al., 2010). Porém, estudos para o neotrópico sobre conservação da biodiversidade são freqüentemente limitados pela escassez de organismos modelos que podem ser usados para responder questões sobre os processos de evolução, diversificação e fragmentação das espécies do neotrópico (PINHEIRO; COZZOLINO, 2013).

A família Orchidaceae apresenta grande riqueza de espécies dentre as angiospermas (COZZOLINO; WIDMER, 2005), e seu potencial para pesquisa de processos evolutivos já tinha sido reconhecido por Darwin (1862), sendo consideradas plantas modelo, com as quais os estudos em evolução poderiam explicar como acontecimentos climáticos históricos podem determinar a distribuição atual das espécies de plantas e quais serão as projeções para o futuro (PINHEIRO; COZZOLINO, 2013). Segundo Antonelli e Sanmartin (2011), o esfriamento climático após o Mioceno-Médio pode ter aumentado a extensão de savanas rochosas no Cerrado e, portanto, ter expandido e diversificado um grupo de orquídeas. Também, de acordo com Peakall (2007), as orquídeas apresentam um grau de especiação alto, o que faz desta família um grupo ideal nos estudos de evolução e diversidade genética de espécies.

Nesse contexto, o gênero *Epidendrum* mostra um significante grau de variação morfológica, diversidade no número de cromossomos e interações ecológicas, que pode ajudar a desvendar interrogações sobre barreiras reprodutivas e de seleção de habitat (PINHEIRO et al., 2009a). Segundo Pinheiro e Cozzolino (2013), várias questões podem ser abordadas com este gênero modelo, explicando como as mudanças climáticas e processos demográficos históricos têm moldado os atuais padrões de diversidade genética e de espécies em diferentes biomas e paisagens.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo aumentar o conhecimento filogeográfico dentro de *Epidendrum*, e em particular da espécie *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. exLindl., já que dentro da subtribo Laeliinae, estudos filogeográficos já foram iniciados em *Epidendrum* (PINHEIRO et al., 2011, 2013, 2014, 2015), nos quais foi demonstrado o potencial dessa abordagem para levantar informações sobre a taxonomia e processos evolutivos no grupo. Esta espécie foi selecionada pela distribuição geográfica interessante e disponibilidade de ferramentas que provavelmente podem ser facilmente

transferidas das espécies já estudadas. A espécie se encontra amplamente distribuída na Chapada Diamantina, em inselbergs do Planalto da Borborema e, possivelmente, na vegetação de campinas amazônicas.

Com base na bibliografia apresentada neste projeto, se espera que as análises genéticas e filogeográficas sejam consistentes com outros estudos (PINHEIRO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2013; PINHEIRO; COZZOLINO, 2013; PINHEIRO et al., 2014), mostrando a importância de determinar as assinaturas históricas e os sinais de fragmentação e isolamento que *E. orchidiflorum* apresenta. Assim podem ser consideradas as seguintes questões: a) Existe diversidade entre as populações amostradas?; b) Como é a estrutura genética das populações e que processos demográficos podem ter influenciado na distribuição atual das populações de *E. orchidiflorum* ?; c) Como teria sido a distribuição de *E. orchidiflorum* durante as oscilações climáticas do Quaternário Tardio, com relação à distribuição atual?

Este estudo encontra-se inserido dentro do projeto aprovado pelo Edital Universal do CNPq (MCTI/CNPq Edital 14/2013), intitulado: “Sistemática, filogenia e variabilidade de Laellinae (Orchidaceae): estudos integrados III”, coordenado pelo Dr. Cássio Van Den Berg, da Universidade Federal de Feira de Santana.

1.1 Objetivos:

Objetivo geral:

- Integrar estudos de filogeografia e genética de populações para estudar os padrões evolutivos da espécie *Epidendrum orchidiflorum*, da subtribo Laeliinae, com ocorrência centrada no leste do Brasil.

Objetivos específicos:

- Determinar a diversidade genética entre e dentro das populações amostradas de *E. orchidiflorum*.
- Avaliar a estrutura genética das populações e determinar que processos demográficos podem ter influenciado na distribuição atual das populações de *E. orchidiflorum*.
- Entender a distribuição de *E. orchidiflorum* durante as oscilações climáticas do Quaternário Tardio, segundo a distribuição atual da espécie.

2 REVISAO BIBLIOGRAFICA

2.1 Família Orchidaceae

A família Orchidaceae é considerada como uma das maiores famílias de plantas Angiospermas e uma das mais diversificadas (>24.000 espécies) (WORLD CHECKLIST OF MONOCOTYLEDONS, 2014). Encontra-se distribuída por todas as regiões de vegetação do planeta (com exceção dos pólos e regiões desérticas), predominantemente nos trópicos e subtropicais (BARROS, 1990), e possui uma ampla frequência encontrada na região do neotrópico. No Brasil são encontradas mais de 2400 espécies de orquídeas, destacando-se como um dos países mais ricos em diversidade de orquídeas (BARROS, 2014). Ecologicamente, as orquídeas possuem ampla variação de habitats, o que favorece a sua ampla distribuição, sendo que algumas são epífitas, encontrando-se em ramas de árvores, outras são rupícolas, ocorrendo sobre pedras, e outras terrestres, encontrando-se no solo (MURGUÍA; LEE, 2007). As orquídeas possuem grande variação quanto ao hábito de crescimento e ao habitat de ocorrência, possuem porte herbáceo e a maioria possui as folhas dísticas, com nervura paralela. Em muitas espécies existe apenas uma folha presa ao pseudobulbo, que armazena água, auxiliando na manutenção do balanço hídrico da planta (MILLER et al., 2006).

Devido à ampla diversidade de habitats e ampla variabilidade morfológica, as orquídeas foram estudadas por Darwin (1862), que observou o amplo potencial dessas espécies para estudos e compreensão dos processos evolutivos na natureza. Em seu livro “A origem das espécies de orquídeas” ele explica que a diversidade pode ser impulsionada por altos níveis de variabilidade e complexidade, criando situações que geram níveis de especiação cada vez maiores como pode acontecer nas orquídeas. Por esta razão, as orquídeas têm ganhado cada vez mais o interesse de biólogos, devido à variedade de histórias e estratégias de vida, morfologia floral e diferentes tipos de polinização. Porém, segundo Fay e Chase (2009), as grandes incertezas em quanto à filogenia da família e o fato de ser uma família tão grande, foi um inibidor para desenvolver projetos de pesquisa ao se desconhecer suas hipóteses evolutivas. Com o desenvolvimento de ferramentas moleculares para a genômica e o maior conhecimento da filogenia, que começou com os estudos de Chase (2004), a verdadeira complexidade das orquídeas está sendo demonstrada, indicando que ainda temos várias hipóteses a testar e muito conhecimento sobre processos evolutivos que se podem desvendar (FAY; CHASE, 2009).

A subtribo Laeliinae ocorre no neotrópico e compreende cerca de 50 gêneros, entre os quais estão os gêneros *Cattleya*, *Guarianthe* e *Rhyncholaelia*, de grande valor hortícola, e outros comuns do neotrópico como *Encyclia*, *Epidendrum* e *Prosthechea* (VAN DEN BERG et al., 2009). O gênero *Epidendrum*, classificado dentro da subtribo Laeliinae, é o maior dentro desta família, contando com cerca de 1500 espécies. É também o gênero de mais ampla distribuição geográfica (desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina) dentre as espécies neotropicais (HÁGSATER; SOTO ARENAS, 2005). No Brasil, encontram-se cerca de 140 espécies, das quais 50 são encontradas no nordeste do país (BARROS et al., 2014).

Este gênero apresenta ampla diversidade de condições onde são encontradas as espécies, desde litófilas ou terrestres nos anticlíneos mais secos a epífitas em escarpas úmidas. O gênero apresenta como características a inflorescência, a qual é apical e às vezes única, a maioria é paniculada e quase sempre atraente, e o sistema radicular que é extenso e bem desenvolvido (MILLER et al., 2006). Apresenta também caules longos, eretos e finos não espessados em pseudobulbos, folhas geralmente dísticas e com as margens ventrais do ginostêmio coalescentes como o unguículo do labelo, e o rostelo fendido e mais ou menos paralelo ao eixo do ginostêmio (STANCIK; GOLDENBERG; BARROS, 2009). O gênero ocupa uma posição ancestral no subgênero *Amphiglottium* (PINHEIRO et al., 2009a; PESSOA et al., 2012), sendo uma espécie interessante por ter morfologia vegetativa consistente com o grupo, e morfologia floral bastante divergente, ocorrência de alopatria/simpatria e distribuição geográfica ampla que oferecem possibilidades interessantes para estudar os limites das espécies, isolamento reprodutivo e filogeografia dentro deste grupo. Também é conhecido por suas incertezas quanto à delimitação entre complexos de espécies, pois muitas apresentam ampla variação morfológica (PESSOA et al., 2012).

A espécie *Epidendrum orchidiflorum* (Figura 1) se encontra distribuída nos domínios filogeográficos da Amazônia (Amazonas, Pará, Roraima), Caatinga (Alagoas, Bahia, Sergipe), Cerrado (Bahia) e Mata Atlântica (Rio de Janeiro) (HÁGSATER; SOTO, 2005; BASTOS; VAN DEN BERG, 2012) e existe pouca informação publicada em artigos sobre esta planta. Provavelmente existe um sinônimo de *E. orchidiflorum* que é *E. huebneri* Schltr., que ocorre em solos arenosos na campina Amazônica (OLIVIEIRA; VAN DER BERG, 2007; BOCAUYUVA; CAMPOSTRINI, 2007; BARROS et al., 2014). Trata-se de uma espécie rupícola, com crescimento simpodial, caule tipo cauloma, folhas com nervação paralela, dísticas, ovadas, lanceoladas e coriáceas, inflorescência apical, e flores monoclinas, sépalas eretas, ovadas e glabras, e lanceoladas (BASTOS; VAN DEN BERG, 2012).



Figura 1 - Diversidade morfológica da flor de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm exLindl. (Viera, 2013)
(Database de George Gardner botanical collections from Brazil)

Alguns estudos atuais em *Epidendrum* tem visado a compreensão dos processos de especiação abordando o tema das zonas de hibridação, como o artigo publicado por PINHEIRO et al. (2015), onde foram estudados os mecanismos de isolamento reprodutivo de duas espécies, *Epidendrum denticulatum* e *E. fulgens* no neotrópico. O estudo teve uma abordagem multidisciplinar, utilizando análises moleculares, citogenéticas e morfológicas, cruzamentos experimentais e MNE (Modelagem de Nicho Ecológico) com os quais avaliaram a força do isolamento reprodutivo e analisaram os mecanismos que impedem o colapso das espécies quando ocorre a hibridação das espécies. Os resultados sugeriram fortes barreiras pós-zigóticas, pois foram encontrados híbridos estéreis os quais foram constatados por análises meióticas e cruzamentos experimentais. Estudos como este nos ajudam a entender como se dão os processos de especiação em orquídeas, sendo que no caso, as análises permitiram compreender como se mantêm integradas estas espécies e como o isolamento reprodutivo é importante nas primeiras etapas de especiação.

Outros estudos multidisciplinares em *Epidendrum*, como o de Vega e Marques (2015), pretenderam entender e compreender a fisiologia da flor de três espécies de *Epidendrum* (*E. calanthum*, *E. cochilidium* e *E. schistochilum*). O estudo analisou a relação entre a longevidade da flor e a atividade da polinização. Em geral a longevidade da flor está relacionada à baixa atividade de polinizadores, o que pode ser ocasionado por fatores abióticos como precipitação e umidade. Porém, neste estudo a longevidade da flor foi maior

nos períodos de maior atividade dos polinizadores, demonstrando que a atividade de polinizadores não é a única explicação para a longevidade das flores. Como resultado foi concluído que uma longevidade maior da flor pode aumentar as chances de reprodução da espécie, levando em conta que fatores abióticos como precipitação podem limitá-la.

2.2 Filogeografia

No estudo das espécies neotropicais, a filogeografia tem demonstrado ser uma ferramenta bastante útil e capaz de relevar o papel que eventos geológicos, influências ambientais, fatores geográficos que interagem com aspectos da ecologia de uma espécie e eventos históricos complexos possuem sobre a distribuição da diversidade e estrutura genética das espécies (FRANKHAM et al., 2008). O conceito de filogeografia foi introduzido por Avise et al. (1987), como o campo de estudo concernente com os princípios e procedimentos que dirigem a distribuição geográfica da variação genética, especialmente entre e dentro de espécies relacionadas (FREELAND; KIRK; PETERSEN, 2011). O estudo dos processos históricos responsáveis por padrões intra-específicos (ou padrões entre as espécies estreitamente relacionadas) da distribuição geográfica na diversidade de linhagens genéticas (PADIAL et al., 2010), é caracterizado como uma ferramenta útil na identificação de espécies, de eventos de hibridação históricos, zonas híbridas, eventos de introgressão e barreiras geográficas importantes para o isolamento e a especiação (HICKERSON et al., 2010).

O maior evento que moldou a distribuição de espécies de flora e fauna do presente foi a última glaciação ocorrida (23.000-18.000 anos antes do presente, no Pleistoceno), com a expansão e contração de gelo, onde muitas espécies sobreviviam recuando-se em refúgios (PROVAN; BENNET, 2008). O conceito de refúgio é enfocado nas mudanças de distribuição e abundância de uma espécie em resposta as mudanças climáticas no quaternário (PROVAN; BENNET, 2008) e a filogeografia tenta explicar e determinar onde possivelmente se encontraram estes refúgios, e em termos de predição de uma próxima glaciação como se daria a distribuição e sobrevivência das espécies (KNOWLES, 2009). Portanto, a filogeografia é usada para entender a história das populações e com amostras adequadas é possível testar hipóteses biogeográficas que descrevam a evolução e isolamento reprodutivo de unidades populacionais, inferir processos de origem, distribuição e manutenção da biodiversidade (BEHEREGARAY, 2008).

Epidendrum orchidiflorum é uma espécie rupícola que se encontra nas serras da Chapada Diamantina, comumente chamadas de inselbergs, outra palavra para “Island Mountain”. Os inselbergs são afloramentos rochosos (rocha exposta) que se encontram

isolados e por esta razão são comparados com ilhas oceânicas, por apresentar condições edáficas e climáticas marcantes rodeadas de campo rupestre (POREMBSKI; BARTHLOTT, 2000). Além da flora destes inselbergs ser submetido a condições climáticas extremas (escassez de solo, deficiência de nutrientes, altas oscilações diárias de temperatura, irradiação intensa) (CONCEICAO; PIRANI; TADEU, 2007), estes se encontram em contínuo perigo de destruição antrópica, pelo pastoreio intensivo e pela extração de rochas para pavimentação pública (FRANCA; MELO; DOS SANTOS, 1997).

Afloramentos rochosos têm sido nomeados em algumas pesquisas como possíveis locais de refúgio para espécies xerófilas ou adaptadas ao frio (PINHIERO et al., 2014). Os estudos de filogeografia em afloramentos rochosos podem ajudar a entender melhor desde processos evolutivos até diversificação de linhagens e espécies (PINHEIRO et al., 2013). Se observarmos estes afloramentos rochosos como ilhas biogeográficas, a partir do enfoque de MacArthur (1967), é de se esperar reduzido fluxo gênico, alta deriva genética e altos níveis de divergência populacional.

O estudo de filogeografia na região do neotrópico tem mostrado a importância da preservação da biodiversidade nesta área. Por exemplo, com a finalidade de identificar a distribuição da biodiversidade dentro do hotspot da Mata Atlântica Brasileira, Carnaval et al. (2009) realizaram um teste de modelagem da distribuição de espécies sob o paleoclima, utilizando as espécies endêmicas de rãs (*Hypsiboas albomarginatus*, *H. semilineatus* e *H. faber*). O método utilizado foi cruzar as distribuições das espécies nas condições atuais com os extremos climáticos do Quaternário tardio (6000 anos antes do presente) com a finalidade de determinar áreas de estabilidade e áreas instáveis. Segundo 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”). Assim, os resultados demonstraram que a região central trabalha como um hotspot dentro do hotspot da Mata Atlântica Brasileira - MAB, atuando como refúgio para a biodiversidade durante os extremos climáticos do Pleistoceno Tardio, e também apresentam maior estabilidade com relação ao sul. O artigo mostra a importância de se determinar as áreas de conservação, pois segundo vários estudos moleculares, a conservação tem sido inclinada para o sul e sudeste do Brasil, sendo subestimados outros refúgios da biodiversidade em outras partes do país, como o caso do refúgio central (“Refúgio Bahia”), e com isto pode-se evitar a destruição de habitats que podem terminar por apagar a assinatura de processos históricos que levaram a ele.

Com o intuito de entender como as oscilações climáticas promoveram a expansão do gênero de orquídeas da América do Sul, *Hoffmannseggella* (Epidendroideae: Laeliinae), cujas espécies se encontravam presentes só em campos rupestres, e como estas evoluíram e passaram a ocupar formações rochosas do leste do Brasil, Antonelli et al. (2010) determinaram quando e onde o grupo se diversificou no tempo. Para os dados foram utilizados os métodos estatísticos Análise de Máxima Parcimônia, métodos bayesianos e análises de dispersão Fitch para interferir relações filogenéticas entre 40 espécies deste gênero. Os resultados sugeriram que a tribo Laeliinae é originária da América Central e posteriormente colonizou a América do Sul, no entanto adverte que pode ser um erro de amostragem, pois não foram tomadas áreas do sudeste do Brasil. O estado de Minas Gerais se mostra como o lugar de surgimento da espécie mais recente do gênero *Hoffmannseggella*, e o sul deste estado como a área mais importante em expansão/dispersão do gênero, chegando ao Norte de Minas, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Bahia. Também se determinou a possível existência de corredores de migração no Mioceno tardio entre os refúgios isolados de campos rupestres de vegetação e também por causa desta dispersão como um ganho lento de novas áreas, a especiação alopátrica não desempenhou um papel importante nos processos de especiação. A conexão entre essas áreas de refúgio seriam determinantes para a expansão do gênero e com isto a hibridação e poliploidia encontradas entre as espécies, já que no momento em que as populações se separam estas podem gerar novos arranjos cromossômicos, e no momento em que se encontrem de novo, nos cruzamentos podem deixar híbridos estéreis ou indivíduos com genoma duplicado (poliploidia). Os resultados fornecem evidências de que o esfriamento do clima após o Mioceno tardio levou a grandes mudanças na vegetação e causou um aumento na dominância de habitats abertos sobre habitat fechados.

Num estudo feito sobre o complexo *Petunia integrifolia* (Solanaceae) no sul do Brasil por Longo et al. (2014) utilizando a filogeografia, foi avaliada a diversidade genética de espécies para entender melhor o processo de diversificação e a taxonomia das espécies deste complexo. Foram contrastados cinco grupos morfológicos e foram geradas árvores filogenéticas e redes de haplótipos que explicam as posições dentro do grupo. Foram amostrados 59 indivíduos de 47 locais, utilizando espaçadores intergênicos de plastídios *trnH-psbA*, *trnS-trnG* e espaçador interno transcrito (ITS) de seqüências do DNA ribossomal nuclear - nrDNA. A análise da rede de marcadores de plastídio dividiu o complexo de *P. integrifolia* em três distintas linhagens alopátricas, todas delimitadas geograficamente com exceção de *P. inflata*. Os resultados também sugerem que provavelmente existiu um aumento da população, seguido de uma redução do tamanho, obtendo como resultado a criação de duas

áreas distintas e alopátricas ao mesmo tempo. Os resultados sugeriram também que a taxonomia baseada em morfologia não reflete a história evolutiva do grupo, demonstrando que é preciso estudos que incluam diversidade genética e a filogeografia para desvendar a evolução que tem sofrido as espécies atuais.

Outro estudo em *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), feito por Palma-Silva et al. (2009), com a finalidade de entender melhor a diversidade genética de uma planta endêmica da Mata Atlântica, combinou dados de microssatélites nucleares e marcadores de DNA de cloroplasto (cpDNA), sendo coletadas 429 plantas de 13 populações. Os resultados indicaram uma correlação negativa entre a diversidade genética e a latitude, mostrada pela rede de haplótipos gerada com o cpDNA, localizada principalmente entre os estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Portanto, os autores refletem isto ao isolamento das populações em mais de um refugio glacial durante as mudanças climáticas do Pleistoceno. Também a análise fluxo de pólen/semente foi de 3:1 o que indica que os animais exerceram um papel importante na polinização e na formação da estrutura genética destas espécies, concluindo que as oscilações climáticas do Pleistoceno recaem na ligação entre os padrões de diversidade genética, sendo moldadas pelos mesmos processos biogeográficos.

Em um estudo feito por Pinheiro e Cozzolino (2013), sobre *Epidendrum fulgens*, foram avaliadas diferentes populações tomadas de dunas de areias costeiras e afloramentos graníticos, com o objetivo de identificar as divergências genéticas ou disjunções em uma ampla gama de espécies e também pesquisar as assinaturas genéticas explicativas da histórica da espécie através do tempo e espaço. No estudo foram utilizadas populações ao longo da MAB, que foram avaliadas utilizando nove microssatélites nucleares (PINHEIRO et al., 2008a) e quatro microssatélites de plastídio (PINHEIRO et al., 2009b) para 424 indivíduos de 16 populações, estimando-se a diversidade genética e a diferenciação populacional, gerando-se uma rede de haplótipos de plastídio e uma análise bayesiana, utilizando também a teoria de coalescência na explicação dos resultados. Foi observada uma disjunção entre as populações do norte e do sul, apresentando maior diversidade nas populações do sul, que coincide com as populações coletadas perto do “Portal de torres” (limite sul da MAB), o qual demarca os limites das comunidades de pastagens de plantas subtropicais e os limites do sul da MAB, e que se encontra localizado em afloramentos graníticos, o qual revela a importância destes estudos de filogeografia, pois a UGG teve diferentes impactos sobre as comunidades florestais e de pastagens de plantas. Também foi encontrada uma falha de estrutura filogeográfica entre as populações analisadas da MAB e foram encontradas reduções demográficas recentes entre as populações do norte da Mata Atlântica Brasileira (PINHEIRO; COZZOLINO, 2013).

Em outro estudo filogeográfico com a espécie *Epidendrum denticulatum* (PINHEIRO et al., 2013b), foram investigados os estágios iniciais de especiação por isolamento pós-acasalamento entre 13 populações de diferentes biomas da América do Sul (Cerrado e Mata Atlântica). Foram utilizados marcadores microssatélites nucleares e microssatélites plastidiais, estimando-se a diversidade e estrutura genética, utilizando rede de haplótipos, diferenciação genética e análise bayesiana. Os resultados indicaram que *E. denticulatum* persistiu em vários refúgios durante os períodos interglaciais, sendo que as populações dos biomas Mata Atlântica e Cerrado compartilham semelhanças genéticas, sugerindo conexões florísticas. A estrutura filogeográfica dos marcadores plastidiais geraram mais informação que os marcadores nucleares, sugerindo que o fluxo gênico via pólen é maior que o de sementes (PINHEIRO et al., 2013b). Outros estudos na área utilizando microssatélites nuclear e regiões de cpDNA em outras orquídeas neotropicais de Costa Rica como *Epidendrum firmum*, indicam também que a estrutura genética pode variar entre e dentro de cadeias de montanhas onde a importância do fluxo gênico é alta e determinada em grande parte pelo fluxo de pólen devido a polinizadores (KARTZINEL; SHEFFERSON; TRAPNELL; 2013).

Pinheiro et al. (2014) avaliaram também as espécies *Epidendrum cinnabarinum* e *E. secundum* em inselbergs ou afloramentos rochosos no nordeste do Brasil (MAB, Chapada Diamantina e Caatinga), onde foi evidenciada a natureza antiga e isolada destas populações. Observou-se alta diferenciação genética entre as espécies (*E. cinnabarinum*, F_{ST} : 0,644 e *E. secundum*, F_{ST} : 0,636), porém, a rede de haplótipos revelou que não existe uma estrutura filogeográfica, sugerindo um fluxo gênico restrito e deriva genética que podem influenciar a diversificação destas populações em inselbergs. Em *E. cinnabarinum*, a AMOVA não apoiou uma divisão entre as populações da Caatinga e da MAB, portanto, não foram detectados isolamentos por distância, enquanto que para *E. secundum* foi detectada uma única hipótese de diferenciação entre populações da Chapada Diamantina. A partir da análise de Modelagem de Nicho Ecológico -MNE foi detectado também que as populações de *E. cinnabarinum* se encontram em expansão ao litoral, sendo que no passado no UGG e InterGlaciação, a espécie se encontrava com maior frequência no interior do continente na Chapada Diamantina, enquanto que *E. secundum* apresentou uma diminuição da distribuição no interior mas também não apresenta expansão futura clara. Nenhuma das populações mostrou gargalos genéticos, mas a força predominante que rege as frequências alélicas é a deriva genética em ambas as populações.

2.3 Marcadores moleculares; DNA cloroplastidial (cpDNA)

A ativa interação entre as espécies em diferentes ambientes tem gerado um número grande de genótipos adaptados a diferentes condições locais, o que tem ampliado a diversidade genética, incluindo processos de especiação (BECERRA; PAREDES, 2000). Com o avanço das técnicas moleculares os estudos de diversidade genética se tornaram fontes de informação importantes, de tal modo que marcadores moleculares (Restriction fragment length polymorphism- RFLP; Random amplified polymorphic DNA - RAPD; Amplified fragment length polymorphism - AFLP; Minisatélites; Microsatélites - SSR; DN, cpDNA; Single nucleotide polymorphisms -SNPs), possuem maior precisão e maior sensibilidade para detectar diversidade entre genótipos, situação que tem permitido grandes avanços neste tipo de estudos (BECERRA; PAREDES, 2000).

O DNA de organelas (cpDNA) tornou-se uma ferramenta muito útil no estudo da ecologia e evolução das plantas (PROVAN et al., 2001). Segundo Pinheiro et al. (2009b) marcadores de cloroplasto podem gerar uma importante fonte de dados para os estudos de filogeografia em *Epidendrum*, na contribuição ao conhecimento na diversificação de processos e nas estratégias de conservação das orquídeas na América do Sul. A importância da utilização deste tipo de DNA está nas suas características, pois pela sua natureza não recombinante, herança uniparental e abundância na célula (PROVAN et al., 2001; PROVAN, 2008), são potenciais marcadores para os estudos de estrutura genética de populações, permitindo obter informações sobre a história da população de uma espécie, através de análises combinadas entre marcadores moleculares nucleares e de organelas (HAIDER, 2011). Além disso, esta técnica atua em tempo e custo eficientes na estratégia de achar polimorfismo de cloroplasto dentro de uma espécie, já que exigem quantidades mínimas de tecido, e tem sido usada com êxito para detectar polimorfismo entre espécies (PROVAN et al., 2001).

No caso do DNA cloroplastidial, as seqüências não-codificadoras do genoma de plastídios são uma importante fonte de dados para estudos de filogeografia (SHAW et al., 2005, 2007), e comumente utilizadas em estudos filogeográficos com espaçadores intergênicos e íntrons (SHAW et al., 2005, 2007), pelo fato do cloroplasto ser transmitido uniparentalmente, e por apresentar haploidia. Embora às vezes ocorra recombinação, os cloroplastos são a parte estrutural mais estável, e a maior variação de tamanho que é produzida é atribuída a diferenças do comprimento das seqüências repetidas, oposto ao rearranjo dos genes e duplicação que são encontrados no DNA de mitocôndrias (mtDNA)

(FREELAND et al., 2011) e é particularmente usado para detectar processos históricos demográficos, como variação de contrações, expansões e fragmentação de áreas vegetais (COZZOLINO; WIDMER, 2005).

As seqüências de cpDNA têm proporcionado uma fonte de dados para estudos de sistemática e evolução de plantas, e existem regiões não-codificadoras que dominaram o campo, como *trnL-trnF* e *trnK-matK*, porém existem outras regiões que apresentam maior variabilidade dentro de espécies fornecendo maiores níveis de variação para análises filogenéticas (SHAW et al., 2007). As muitas regiões disponíveis para pesquisadores oferecem níveis mais elevados de variação do que as regiões comumente empregadas em sistemática molecular de plantas (ie, *trnL-trnL-trnF*, *trnK-matK-trnK*, *rps16 intron*, e *rpl16 intron*) (SHAW et al., 2007). Diversos estudos têm utilizado diferentes tipos de regiões para seqüenciamento, para diversas espécies, como a espécie neotropical *Petunia integrifolia*, onde foram utilizados os espaçadores intergênicos *trnH-psbA* e *trnS-trnG* (LONGO et al., 2014), a espécie *Plathymenia reticulata* (Leguminosae) (LAGE et al., 2010), onde foram utilizados o intron *trnL* e os espaçadores intergênicos *trnL-trnF* e *trnS-trnG*, os gêneros de monocotiledôneas como *Oryza* e *Zea* onde se tem utilizado as regiões: *trnT-trnL*, *trnLintron*, *trnL-trnF*, *trnH-trnK*, *trnKintron*, *trnC-trnD*, *trnD-trnT*, *psbC-trnS*, *trnS-trnfM*, *psaA-trnS*, *trnS-trnT*, *trnM-rbcL*, *trnK-trnQ*, *trnQ-trnR*, *rpoC1-trnC*, *trnT-psbC* e *trnF-trnV* (PROVAN; POWELL; HOLLINGSWORTH, 2001).

Estudos na família Orchidaceae com *Epidendrum cinnabarinum*, *E. denticulatum*, *E. fulgens* e *E. puniceoluteum* utilizaram as regiões *trnHGUG-psbA*, *3'rps16-5'trnK UUU*, *trS UGA-trnfM CAU*, *rpS4R2-trnTUGUR*, *trnTUGUA-trnLUAAB*, *trnTUGU-trnLUAAB* e *trnLUAAC-trnFGAAF*, a partir dos quais foram desenvolvidos marcadores de microssatélites de cloroplasto (PINHEIRO et al., 2009b). O uso de marcadores de cpDNA em estudos de genética de populações tem aumentado nos últimos anos após a descoberta de regiões microssatélites altamente variáveis dentro do genoma do cloroplasto. As repetições de A/T são as mais encontradas no genoma dos cloroplastos. A natureza repetitiva de microssatélites muitas vezes resulta em uma relativamente alta taxa de mutação (FREELAND, KIRK, PETERSEN et al., 2011).

3 MATERIAL E METODOS

3.1 Material vegetal

No presente estudo foi utilizada a espécie *Epidendrum orchidiflorum* (Figura 1). Foram realizadas coletas em 13 localidades incluindo a restinga da Bahia, as que ocorrem no interior do continente, como a Serra de Jacobina (Pindobaçu, Jacobina), Serra do Orobó (Ruy Barbosa), Serra do Tombador (Morro do Chapéu, Cachoeira do Ferro Doido), Serra do Sincorá (Utinga, Mucugê, Lençóis, Cachoeira da Fumaça), as serras ao Oeste: Serra de Santana (Piatã) e Mata dos Mendes (Seabra); e o Estado do Rio de Janeiro (Arraial do Cabo) (Tabela 1, Figura 2). As distâncias geográficas vão desde 16 km (Lençóis, LE – Cachoeira da Fumaça, CF) até 1.380,6 km (Pindobaçu, PD – Arraial do Cabo, AC).

Na coleta foram utilizadas uma ou duas folhas jovens de cada indivíduo. Ao serem coletadas, as folhas foram armazenadas e transportadas em gel de CTAB, 2% NaCl 35% (Cassio Van den Berg, comunicação pessoal) e ficaram armazenadas em geladeira a 4°C por no mínimo sete dias.

Tabela 1 - Localidades onde foram coletadas amostras de *Epidendrum orchidiflorum*, para este estudo

População	Localidades	Coordenadas	
		Latitude	Longitude
LE	Lençóis (BA)	12° 27, 866'S	41° 25, 150'O
JA	Jacobina (BA)	11° 10, 420'S	40° 30, 816'O
PD	Pindobaçu (BA)	10° 39, 953'S	40° 21, 830'O
MC	Morrão, Morro Chapéu (BA)	11° 35, 716'S	41° 12, 443'O
CD	Cachoeira do Ferro Doido (BA)	11° 37, 522'S	41° 00, 063'O
SA	Serra de Atalaia, Utinga (BA)	12° 01, 077'S	41° 05, 832'O
CF	Cachoeira da Fumaça (BA)	12° 36, 111'S	41° 27, 587'O
SE	Seabra (BA)	12° 25, 255'S	41° 59, 775'O
PI	Piatã (BA)	13° 09, 080'S	41° 45, 768'O
MU	Mucugê (BA)	13° 00, 432'S	41° 24, 217'O
RU	Ruy Barbosa (BA)	12° 18, 442'S	40° 29, 063'O
RE	Restinga (BA)	12° 26, 603'S	37° 56, 252'O
AC	Arraial do Cabo (RJ)	22° 57, 966'S	42° 01, 668' O

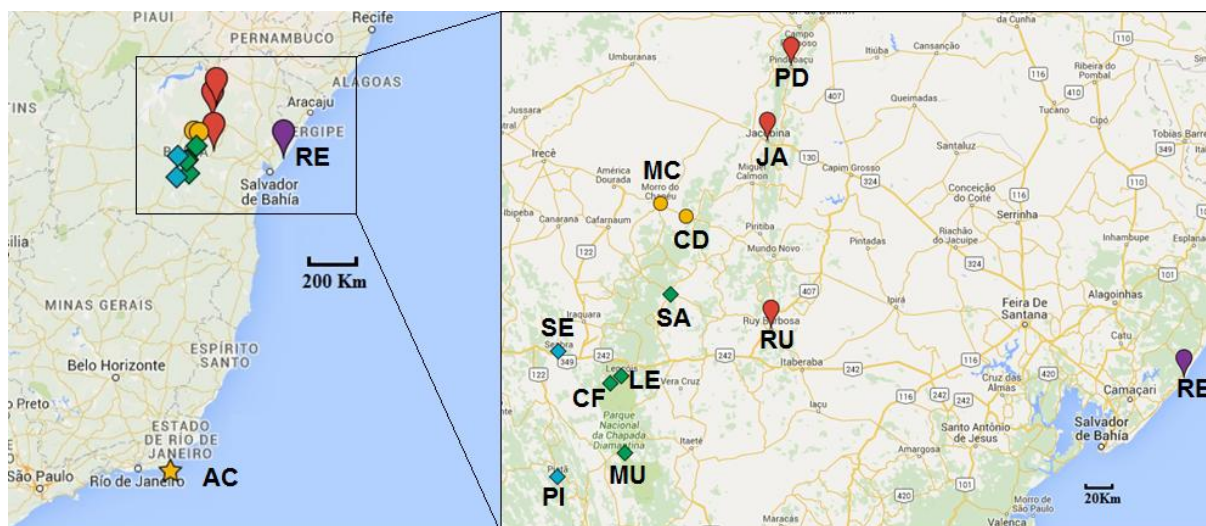


Figura 2 - Localização geográfica das localidades de ocorrência das populações amostradas de *Epidendrum orchidiflorum* [Jacobina (JA), Pindobaçu (PD), Morro do Chapéu (MC), Cachoeira do Ferro Doido (CD), Serra de Atalaia (AS), Ruy Barbosa (RU), Lençóis (LE), Cachoeira da Fumaça (CF), Seabra (SE), Mucugê (MU), Piatã (PI), Restinga (RE) e Arraial do Cabo (AC)]

3.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA, foi utilizado o protocolo modificado de Doyle e Doyle (1987), sendo que após a retirada do excesso do gel, as folhas foram submetidas à maceração com 1mL de tampão STE [0,13 mg de Sacarose; 45 μ L de Tris – HCL (1M); 150 μ L de EDTA (0.5M)] gelado. O produto da maceração foi transferido a um tubo de 1,5mL e centrifugado a cinco mil rpm durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e foi adicionado ao sobrenadante 1mL de CTAB 2% + PVP 1% (Polivinilpirrolidona) e 8 μ L de B-Mercaptoetanol, sendo misturado no Vortex e em seguida deixado no banho-seco a 60°C por 1 hora. Posteriormente, foram adicionados 500 μ L da solução 24 Clorofórmio: 1 Álcool Isoamílico gelado, sendo homogenizados no Vortex e centrifugados a 13,2 mil rpm por 5 min (este passo foi repetido mais uma vez). Depois da centrifugação, foi adicionado ao sobrenadante 500 μ L de isopropanol e 30 μ L de Acetato de Sódio 3M. Depois deste procedimento as amostras foram deixadas no freezer por três dias, começando a centrifugação a velocidade máxima por 30 min., e em seguida descartando o sobrenadante e lavando três vezes com etanol 70%, deixando os tubos secando a temperatura ambiente até que o etanol tenha evaporado completamente. Por último, se adicionou 40 μ L de TE 0,1 M EDTA e o DNA foi ressuscitado a 60°C por 15 minutos ou a temperatura ambiente até o dia seguinte.

A concentração de DNA da solução estoque de cada indivíduo foi estimada através da corrida das amostras em gel de agarose 1%, sendo que para a visualização das bandas foi utilizado o corante Brometo de etídeo inicialmente, mas mudando-se para GelRedTM posteriormente. Para a quantificação das amostras de DNA foram utilizadas soluções padrões

(5, 20, 40, 80 e 160 ng). A corrida eletroforética foi realizada em cuba contendo tampão TBE 10% a uma voltagem de 3,75 V/cm por 1 hora.

3.3 Amplificação dos marcadores cpDNA

Foram testadas sete regiões plastidiais, das quais duas foram escolhidas para sequenciamento (Tabela 2), estas regiões apresentaram maior polimorfismo e já foram identificadas como polimórficas em trabalhos com *Cattleya* (VAN DEN BERG et al., 2009).

Tabela 2 - Sequências de *primers* de cpDNA usados para teste de amplificação de PCR e sequenciamento em *Epidendrum orchidiflorum*

Região	Nome do <i>primer</i> e sequência (5'-3')
3'rps16-5'trnK *	rpS16x2F2: AAA GTG GGT TTT TAT GAT CC trnK ^(UUU) x1: TTA AAA GCC GAG TAC TCT ACC
rpl32-trnL *	trnL(UAG): CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT rpL32-F: CAG TTC CAA AA A AAC GTA CTT C

Fonte: Shaw et al. (2005, 2007) e Taberlet et al. (1991)

Foram sequenciados um total de 116 indivíduos, provenientes de 13 populações (Tabela 1). As otimizações das reações de PCR incluíram a utilização de um mix de 50 µL, contendo 5 µL de 10X *Taq* Buffer com (NH₄)₂SO₄ da (ThermoScientific), 10µL de MgCl₂ (25mM) (ThermoScientific), 1,8µL de dNTP(Sinapse), 2µL do *primer* F (10 pmol) e 2 µL do *primer* R (10 pmol) (Integrated DNS Technologies) para cada região de cloroplasto da Tabela 2, 0,4 µL de *Taq* DNA polimerase (Sinapse), 2 µL de DNA (5-30ng/µL) e 26,8 µL de água MilliQ.

As reações foram realizadas no termociclador Multigene Thermal Cyclor (Labnet International, Inc), seguindo as seguintes condições de amplificação da Tabela 3. Os produtos resultantes da reação de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, onde cada amostra foi corada com gelRedTM e comparadas com a concentração 1 µL de marcador de 100bp DNA Ladder (InvitrogenTM). Posteriormente, o gel de agarose foi fotografado sobre uma fonte de luz ultravioleta com auxílio do sistema de fotodocumentação Syngene (Synoptics Ltda.).

Tabela 3 - Protocolo das reações de amplificação de DNA para as regiões: *rps16-trnK*, *rpl32-trnL* (SHAW et al., 2007)

	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	
1	80°C	5 min	Desnaturação inicial
2	95°C	1 min	Desnaturação
3	52°C	1 min	Anelamento
4	65°C	5 min	Extensão
5	65°C	5min	Extensão final

*As etapas 2, 3 e 4 foram repetidas 35 vezes.

O volume final das reações de amplificação foi de 50 µL, sendo que produtos foram enviados para seqüenciamento na empresa MacroGen Corporation, Coréia do Sul - MACROGEN.

3.4 Análises de seqüências de cpDNA

As seqüências de DNA foram editadas com ajuda do programa Pregap4, sendo em seguida pareadas com suas seqüências complementares com o programa Gap4, ambos fazendo parte do Staden Package (STADEN; BEAL; BONFIELD, 2000). O alinhamento das seqüências foi realizado a partir do programa MEGA v.6 (TAMURA et al., 2013) implementado no programa Mesquite v. 2.75 (MADDISON; MADDISON, 2011).

3.5 Análises estatísticas

As regiões seqüenciadas de cpDNA: *rps16-trnK* e *rpl32-trnL*, resultaram num alinhamento de 963 pares de bases (bp), sendo que *rps16-trnK* vai do 1 até o 315bp e *rpl32-trnL* vai do 316 até o 963pb.

3.5.1 Análise de diversidade genética

As análises de diversidade genética foram feitas no programa DNAsp v.5.10.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009) e Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), onde foram obtidos os seguintes parâmetros: número de posições polimórficas (V), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π).

3.5.2 Análises da estruturação genética

Foram também construídas redes de haplótipos, utilizando as redes médias (median-

joining network, com o software Network 5.0 (BANDELT; FORSTER; ROHL, 1999, Fluxus Engineering). Também foi utilizado o programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) para estimar a estrutura hierárquica da variação nas seqüências de DNA através da Análise de Variância Molecular - AMOVA (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992) com valores de significância gerados a partir de 20.000 permutações. Assim foram realizadas AMOVAs para detectar a variação entre e dentro de grupos, sendo definidos os seguintes grupos: I) Populações da Bahia (LE, PD, JA, MC, CD CF, PI, SE, SA, MU, RU e RE) e a população do Rio de Janeiro (AC); II) Serras (LE, PD, JA, MC, CD CF, PI, SE, SA, MU e RU), litoral da Bahia (RE) elitoral do Rio de Janeiro (AC); III) Serras (LE, PD, JA, MC, CD CF, PI, SE, SA, MU), população de Ruy Barbosa (RU), litoral da Bahia (RE) e litoral do Rio de Janeiro (AC); IV) Grupos definidos de acordo sua subdivisão geológica: Serra da Jacobina (JA, PD e RU), Serra do Tombador (MC e CD), Serra do Sincorá (SA, LE, CF e MU), Serras ao Oeste (PI e SE), litoral da Bahia (RE) e litoral do Rio de Janeiro (AC).

3.5.3 Análise de isolamento por distância

A existência de isolamento por distância foi investigada com o teste de Mantel (1967). Foi testada a correlação entre matrizes de distância geográfica (em quilômetros) entre os pares de populações e a divergência genética estimada pelo F_{st} linearizado de Slatkin (1995). As análises foram realizadas com o programa Arlequin (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) e a significância da correlação foi testada com 20000 permutações.

3.5.4 Estimativas de tamanho efetivo populacional e taxas de migração

Para comparação de diferentes modelos de demografia e conectividade entre as populações foi utilizado o software Migrate-N 3.6.11 (BEERLI, 2004). Inicialmente utilizamos o software jModeltest2 (DARRIBA et al., 2012) para cálculo das frequências de bases e taxa de transição/transversão ponderadas por 80 modelos de evolução molecular. Esses valores foram inseridos no Migrate, que só permite o uso de um modelo similar ao F84 (FELSENSTEIN, 1984). Os valores utilizados foram: $f_A=0,3086$, $f_C=0,1278$, $f_G=0,1238$, $f_T=0,4397$ e $t_i/t_v=0,38469$.

Foram testados 13 modelos visando determinar se as populações se encontram em panmixia ou se estas se mostram estruturadas e se há indicio de isolamento por distância, sendo utilizados os seguintes modelos: I) Modelo panmítico geral, onde todas as populações são fundidas em uma única população panmítica; II) Modelo considerando duas populações panmíticas, sendo as populações da Bahia (LE, PD, JA, MC, CD CF, PI, SE, SA, MU, RU e

RE) e a população do Rio de Janeiro (AC); III) Modelo considerando três populações panmíticas, sendo uma delas o conjunto das populações das serras próximas a Chapada Diamantina (LE, PD, JA, MC, CD, CF, PI, SE, SA, MU e RU), a população da restinga da Bahia (RE) e a população do Rio de Janeiro (AC); IV) Modelo considerando quatro populações panmíticas, sendo as populações das serras próximas a Chapada Diamantina (LE, PD, JA, MC, CD, CF, PI, SE, SA e MU), a população de Ruy Barbosa (RU), da Serra do Orobó, a população da Restinga da Bahia (RE) e a do Rio de Janeiro (AC); V) Modelo considerando a subdivisão geológica com os seguintes grupos: Serra da Jacobina (JA, PD e RU), Serra do Tombador (MC e CD), Serra do Sincorá (SA, LE, CF e MU), Serras ao Oeste (PI e SE), litoral da Bahia (RE) e litoral do Rio de Janeiro (AC); VI) Modelo considerando mais uma subdivisão por serras de cada população, considerando cada uma panmítica: Serra da Jacobina (PD e JA), Serra do Orobó (RU), Serra do tombador (MC e CD), Serra do Sincorá (LE, CF e MU), Serra da Atalaia (SA), Serra de Santana (PI) e Mata dos Mendes (SE), litoral da Bahia (RE) e litoral do Rio de Janeiro (AC); VII) Modelo considerando outra subdivisão por serras e proximidade das populações, considerando cada grupo em panmixia: Serra da Jacobina (PD e JA), Serra do Tombador (MC e CD), Serra da Atalaia (SA), Serra do Orobó (RU) e populações próximas a Chapada Diamantina (SE, LE, CF, PI e MU), litoral da Bahia (RE) e litoral do Rio de Janeiro (AC); VIII) Modelo *fullmigration*, onde todas as populações são independentes com taxas de migração diferentes em ambos sentidos; IX) Modelo *fullmigration* com isolamento por distância (IBD), onde todas as populações são independentes com taxas de migração diferentes em ambos sentidos e com IBD, ou seja, com probabilidade de migração inversamente proporcional às distâncias; X) Modelo de populações separadas, porém interrompendo a migração, similar ao modelo III, onde não há migração entre as populações do litoral da Bahia (RE) e litoral do Rio de Janeiro (AC); XI) Modelo igual ao modelo anterior, porém com IBD; XII) Modelo Kimura Bidimensional; e XIII) Modelo Kimura Bidimensional com IBD. Todos os modelos se encontram na Figura 3.

Para realização das corridas, foram feitas quatro cadeias com diferentes temperaturas (1,00; 1,50; 3,0 e 100000), conforme o manual de instruções do software. As corridas tiveram 100.000 passos de burnin e 2.000.000 de passos, amostrando um passo a cada 100, portanto 20.000 passos amostrados. Ao término de cada corrida a estimativa da área sob a curva de verossimilhança de todas as amostras foi feita por integração termodinâmica usando uma aproximação de curva de Bezier, que permite uma melhor aproximação com um pequeno número de cadeias aquecidas (da forma sugerida por BEERLI; PALCZEWSKI, 2010). Como distribuições anteriores dos thetas foram utilizados mínimo 0, máximo 0,30 e delta 0,03. Para

anteriores de m foram utilizados 0, 100.000 e 10.000. Estes valores foram utilizados antes da comparação de modelos, tomando como base o modelo *full-migration*, e posteriormente mantidos iguais entre todos os outros modelos para permitir a comparação. Embora para o cálculo de θ e m para cada modelo individual seria necessária nova otimização, BeerliePalczewski (2010) sugerem que isso não influencia o cálculo da integração termodinâmica, e os modelos somente podem ser comparados com anteriores idênticas. O valor de m ou taxa de mutação utilizada foi a inferida a partir da taxa de mutação para orquídeas da subtribo de orquídeas Laeliinae (TOMÉ, 2016), sendo que o tempo geracional de *Epidendrum* foi calculado como sendo de cinco anos (VAN DEN BERG, Comunicação pessoal).

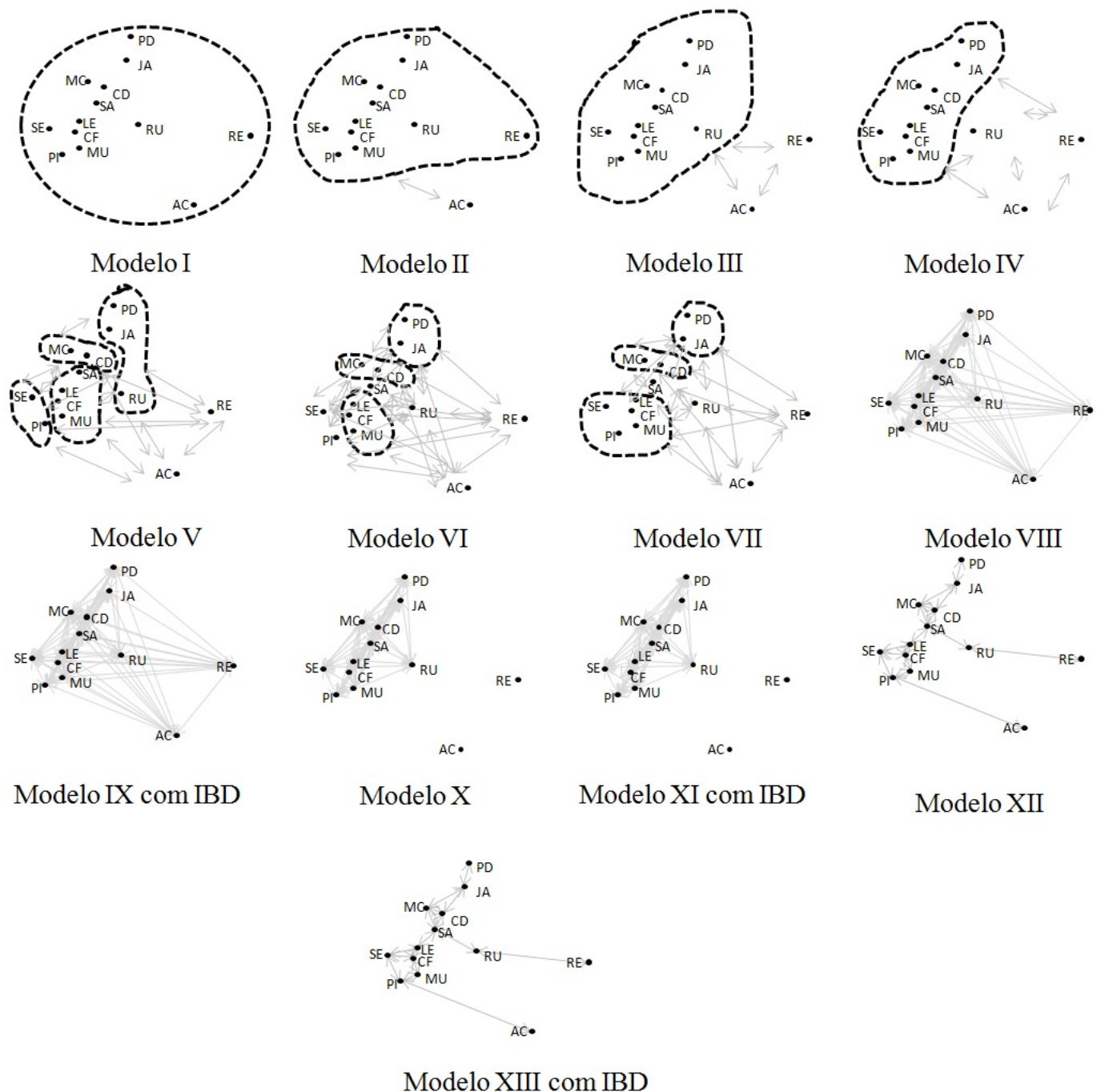


Figura 3 - Esquemas dos modelos de migração. Treze modelos biogeográficos foram utilizados para testes de modelo no Migrate-n. As populações abreviadas significam: PD: Pindobaçu, JA: Jacobina, MC: Morro do Chapéu, CD: Cachoeira do Ferro Doido, SA: Utinga, LE: Lençóis, CF: Cachoeira da Fumaça, SE: Seabra, MU: Mucugê, PI: Piatã, RU: Ruy Barbosa, RE: Restinga (Litoral da Bahia) e AC: Arraial do Cabo (Litoral do Rio de Janeiro). A linha pontuada significa os grupos em panmixia e as setas representam o fluxo gênico

A tabela de comparação das verossimilhanças para decisão utilizando fatores de Bayes foi montada conforme sugere o manual do programa (BEERLI, 2012). Neste caso, os diferentes cenários dos modelos são somados e depois os modelos são proporcionalizados a

essa soma para comparação. Os responsáveis pela melhor proporção de verossimilhança são os mais prováveis.

Para o cálculo do tamanho efetivo da população (N_e) foram utilizados os dados de Θ (theta, valor estimado pelo programa), sendo considerados os valores da mediana (calculados pelo programa) e a taxa de mutação m de $3,29E-9$, e aplicando a equação (1):

$$N_e = \frac{\theta}{2m} \quad (1)$$

Para o cálculo do número de indivíduos migrantes (N_m) foram utilizados uma vez mais os valores de Θ e os valores da mediana, aplicando a seguinte equação, sendo que o i se refere ao Θ do receptor, aplicando a equação (2).

$$Nm = \frac{\theta_i \times m}{2} \quad (2)$$

3.5.5. Modelo de nichos ecológicos

Para compreender a dinâmica da distribuição e testar hipóteses de áreas que foram refúgio através de ciclos climáticos no final do Quaternário, foram projetados MNEs, partindo da situação atual. Os pontos de georreferenciamento de ocorrência das espécies obtidos nas bases de dados e a partir dos dados de coletas obtidos neste projeto foram individualmente conferidos e os pontos de ocorrência duvidosos, ou mal anotados pelas bases de dados foram descartados das análises. Os pontos de georreferenciamento de ocorrência das espécies foram obtidos nas bases de dados do SpeciesLink (<http://splink.cria.org.br>) (66 observações), Global Biodiversity Information Facility (GBIF; www.gbif.com) (135 observações), e a partir dos dados de coletas obtidos neste projeto (13 observações).

Os mapas de distribuição das espécies foram desenvolvidos tendo por base as 19 variáveis bioclimáticas do banco de dados WorldClim (HIJMANS et al., 2005). As camadas climáticas utilizadas estão apresentadas na Tabela 4.

As projeções foram calculadas utilizando o algoritmo de máxima entropia implementado no programa Maxent v.3.3.3e (PHILLIPS; DUDIK; SCHAPIRE; 2004, 2006) e visualizadas com auxílio do software DIVA-GIS (HIJMANS et al., 2001). Foram considerados dois cenários: a última Interglaciação (~120.000-140.000 AP), baseado em Otto-Bliesner et al. (2006) e a UGG (~21.000 AP) baseado no Paleoclimate Modelling Intercomparison Project Phase II (BRACONNOT et al., 2007), considerando o modelo CCSM4 (GENT et al., 2011). Para as projeções de ocorrência do presente, UGG e Interglaciação, foram utilizados mapas com resolução de 30 arco-segundos, onde cada pixel

corresponde a 1 km². Foram realizadas cinco repetições modelo para cada método de presença, com 75% de ocorrências usadas para calibração e subconjuntos diferentes (25%) utilizadas para validação. A AUC média utilizada para avaliar o desempenho foi de 1 para máxima predição e 0.5 que sugere previsão aleatória.

Tabela 4 -Camadas ambientais e climáticas disponibilizadas pelo WorldClim em 2,5 minutos e 30 segundos utilizadas para a modelagem de nicho ecológico

CAMADAS	VARIÁVEL AMBIENTAL
BIO1	Temperatura média anual
BIO2	Amplitude média diurna [Média mensal (temp. máxima – temp. mínima)]
BIO3	Isotermalismo (P2/P7) (* 100)
BIO4	Sazonalidade de temperatura (desvio padrão *100)
BIO5	Temperatura máxima do mês mais quente
BIO6	Temperatura mínima do mês mais frio
BIO7	Amplitude da temperatura anual (P5-P6)
BIO8	Temperatura média do quartil mais úmido
BIO9	Temperatura média do quartil mais seco
BIO10	Temperatura média do quartil mais quente
BIO11	Temperatura média do quartil mais frio
BIO12	Precipitação pluviométrica anual
BIO13	Precipitação pluviométrica do mês mais úmido
BIO14	Precipitação pluviométrica do mês mais seco
BIO15	Sazonalidade da precipitação pluviométrica (coeficiente de variação)
BIO16	Precipitação pluviométrica no quartil mais úmido
BIO17	Precipitação pluviométrica do quartil mais seco
BIO18	Precipitação pluviométrica do quartil mais quente
BIO19	Precipitação pluviométrica do quartil mais frio

4 RESULTADOS

4.1 Diversidade genética em *E. orchidiflorum*

Foram calculados os índices de diversidade para as 13 populações amostradas, sendo que o número total de haplótipos foi 12 (Tabela 5). O número de sítios polimórficos variou de 0 a 10, sendo os maiores valores obtidos para a população de Seabra (SE) com dez, seguidos de Piatã (PI) e Cachoeira da Fumaça (CF) com seis, uma taxa baixa de números informativos, mas comum em seqüências de cpDNA (MUSE, 2000).

Tabela 5 -Estimativas de diversidade genética baseadas nas regiões de cloroplasto (*rps16-trnK*, *rpl32-trnL*) para 13 populações de *Epidendrum orchidiflorum*. ID: Identificação da população, N: Número de indivíduos, V: Número de sítios polimórficos, h: Número de haplótipos, Hd:diversidade haplotípica, e π : diversidade nucleotídica

População	ID	N	V	H	Hd	π	Haplótipos
Serra da Jacobina							
Jacobina	JA	10	2	3	0,5111	0,0006	H1, H3, H4
Pindobaçu	PD	9	1	2	0,2222	0,0002	H1, H3
Ruy Barbosa	RU	8	2	3	0,7143	0,0010	H1, H2, H3
Serra do Tombador							
Morro do Chapéu	MC	9	3	4	0,7778	0,0012	H1, H3, H4, H5
C. Ferro Doido	CD	8	3	3	0,7500	0,0016	H1, H2, H4
Serra do Sincorá							
Utinga	SA	9	2	3	0,6389	0,0007	H1, H3, H4
Lençóis	LE	6	2	2	0,3333	0,0007	H1, H2
C. Fumaça	CF	7	6	3	0,6667	0,0030	H2, H6, H7
Mucugê	MU	8	4	2	0,2500	0,0010	H2, H7
Serras ao Oeste							
Piatã	PI	11	6	3	0,5818	0,0020	H1, H2, H7
Seabra	SE	10	10	6	0,8889	0,0050	H2, H6, H7, H8, H9, H10
Litoral da Bahia							
Restinga	RE	9	0	1	0,0000	0,0000	H2
Litoral do Rio de Janeiro							
Arraial do Cabo	AC	12	2	3	0,4394	0,0007	H2, H11, H12
Média	-	8,9	3,3	2,9	0,5211	0,0014	-

A diversidade haplotípica (H_d) variou de 0,0 para a população da Restinga (RE) a 0,889 para a população de Seabra (SE), com valores médios de 0,5211. Além de Seabra, se destacaram as populações da Serra do Tombador: 0,778% para Morro do Chapéu (MC) e 0,750 para a Cachoeira do Ferro Doido (CD). Entre as populações da Chapada Diamantina ou Serra do Sincorá (LE, CF e MU), se destacou a população da Cachoeira da Fumaça (CF), com 0,667 de diversidade haplotípica (H_d) e na Serra da Jacobina se destacou a população de Ruy Barbosa (0,714).

A diversidade nucleotídica por sua vez foi maior nas populações SE ($\pi=0,005$), CF ($\pi=0,003$) e Piatã (PI) ($\pi=0,002$). E as populações que apresentaram menor diversidade nucleotídica foram (RE) ($\pi=0,00$) e Pindobaçu (PD) ($\pi=0,0002$).

4.2 Estrutura genética de *E. orchidiflorum*

De acordo com a Figura 4 e a Tabela 5, as análises das duas regiões de cloroplasto, *rps16-trnK* e *rpl32-trnL*, resultaram em um número de 12 haplótipos para as 13 populações amostradas. O haplótipo mais freqüente foi H2 apresentando-se em 39 indivíduos e em nove populações (RU, CD, LE, CF, MU, PI, SE, RE e AC). O segundo haplótipo mais freqüente foi H1, ocorrendo em 34 indivíduos e presente em oito populações (JA, PD, RU, MC, CD, SA, LE, PI). A população da Restinga, da Bahia, apresentou apenas um haplótipo (H2). O haplótipo H3 ocorreu em populações que se encontram mais ao norte do estado da Bahia, pertencentes a Serra da Jacobina (JA, PD, RU), Serra do Tombador (MC) e Serra do Sincorá (SA) (Figuras 2 e 4). Já o haplótipo H4 foi compartilhado por quatro populações relativamente próximas nas Serras do Tombador (MC e CD), Serra do Sincorá (SA) e Serra da Jacobina (JA). Por sua vez, o haplótipo H7 ocorreu em populações mais ao sul do estado da Bahia, pertencentes a Serra do Sincorá (CF e MU) e às Serras do Oeste (PI e SE). Haplótipos únicos foram encontrados nas populações MC (H5), SE (H8, H9, H10) e em Arraial do Cabo (AC) (H11 e H12). Por sua vez, Seabra apresentou a maior quantidade de haplótipos, resultando na maior diversidade de haplótipos ($H_d=0,889$).

De acordo com a rede de haplótipos e o mapa de distribuição geográfica (Figura 4), podemos observar o compartilhamento dos haplótipos mais comuns (H1 e H2) entre a maioria das populações. Na população do litoral de Rio de Janeiro foi encontrado o haplótipo H2, em pequena proporção, e mais dois haplótipos exclusivos.

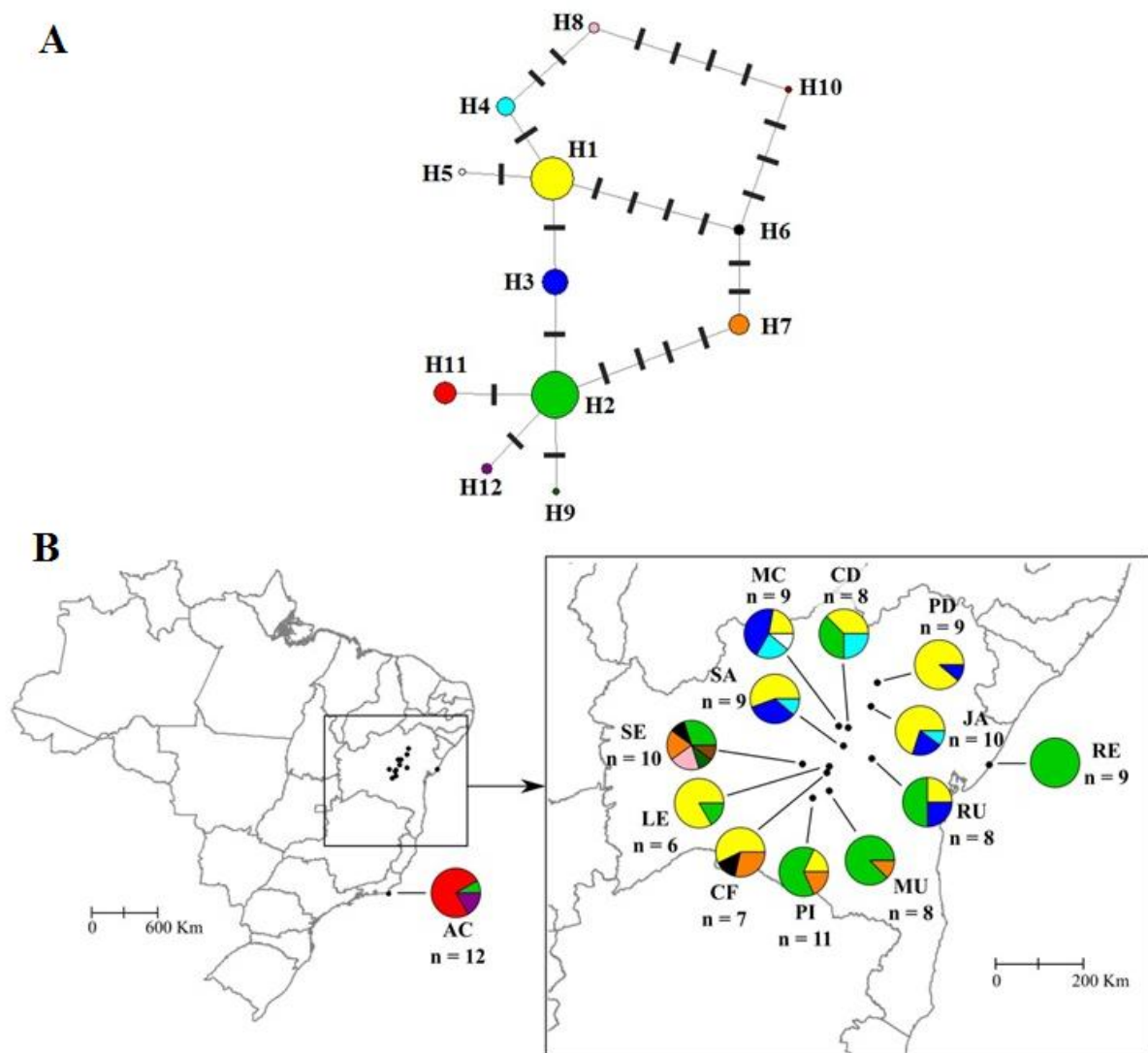


Figura 4 - A. Rede de haplótipos de regiões sequenciadas de *E. orchidiflorum*, onde os tamanhos dos círculos são proporcionais às frequências de cada haplótipo. O número de mutações entre os haplótipos é indicado por linhas perpendiculares entre as conexões dos haplótipos. B. Mapa da distribuição geográfica dos haplótipos nas populações amostradas. As cores dos haplótipos correspondem às representadas na rede de haplótipos. A descrição das populações encontra-se na Tabela 1

A análise de variância molecular (Tabela 6) entre e dentro das populações, indicou que a maior proporção de variação foi encontrada dentro das populações (52,5%, $P < 0,001$). Entretanto, existe significativa diferenciação genética entre as populações ($F_{ST} = 47,5\%$). O contrário foi observado em estudos realizados com *Epidendrum cinnabarinum*, onde foi encontrada alta diferenciação genética entre as populações (64,4%), com 35,6% da variação dentro das populações (PINHEIRO et al., 2014). O mesmo foi observado em *E. secundum*, para a qual foi encontrado diferenciação genética similar, com 63,6% de variação entre populações e 36,4% de variação dentro das populações (PINHEIRO et al., 2014).

Tabela 6 - AMOVA de regiões de cloroplasto entre e dentro de populações de *Epidendrum orchidiflorum*

Fonte de variação	GL	Porcentagem de variação total	Índice de fixação	Valor de P
Entre populações	12	47,5%	F_{ST} : 0,475	0,000
Dentro das populações	103	52,5%		
Total	115			

Também foram realizadas AMOVAs para diferentes agrupamentos das populações (Tabela 7). Entre os agrupamentos, descritos no item 3.5.2, o maior valor de F_{CT} (0,143) foi encontrado entre as populações da serra, RE e AC, mesmo assim o valor P indica que não é significativo. Isto sugeriria que as populações do interior do continente são geneticamente mais relacionadas entre elas do que com as populações do litoral. Mesmo assim, em todas as AMOVAs realizadas pode-se observar que a maior variação se encontra entre as populações dentro dos grupos, e que a variação é ainda maior dentro das populações.

Tabela 7 - AMOVA de regiões de cloroplasto de populações de *Epidendrum orchidiiflorum*, usando diferentes modelos de agrupamento

Fonte de variação	GL	Percentagem da variação total	Índices de fixação	Valor de P
I) Entre as populações das serras (JA, PD, RU, MC, CD, SA, LE, CF, MU, PI e SE) e a população do litoral da Bahia (RE) e o litoral do Rio de Janeiro (AC)				
Entre grupos	2	7,88%	F _{CT} : 0,143	0,0514
Entre populações dentro de grupos	10	21,10%	F _{SC} : 0,525	0,0000
Dentro das populações	103	26,23%	F _{ST} : 0,525	0,0000
Total	115			
II) Entre as serras (LE, PD, JA, MC, CD, CF, PI, SE, SA, MU), a população de Ruy Barbosa (RU), o litoral da Bahia (RE) e o litoral do Rio de Janeiro (AC)				
Entre grupos	3	4,75%	F _{CT} : 0,090	0,1322
Entre populações dentro dos grupos	9	21,63%	F _{SC} : 0,452	0,0000
Dentro das populações	103	26,22%	F _{ST} : 0,501	0,0000
Total	115			
III) Entre grupos de acordo sua subdivisão geológica, com os seguintes grupos: Serra da Jacobina (JA, PD e RU), Serra do Tombador (MC e CD), Serra do Sincorá (SA, LE, CF e MU), Serras ao Oeste (PI e SE), litoral da Bahia (RE) e litoral do Rio de Janeiro (AC)				
Entre grupos	5	2,07%	F _{CT} : 0,041	0,1258
Entre populações dentro dos grupos	7	21,96%	F _{SC} : 0,456	0,000
Dentro das populações	103	26,23%	F _{ST} : 0,478	0,000
Total	115			

Dentro das populações amostradas é importante distinguir que o habitat onde foram encontradas as populações foi variável, chegando a ser encontradas tanto em afloramentos rochosos, nas populações JA, PD, RU, MC, CD, LE, CF, PI e SE; como em dunas arenosas nas populações SA, MU, RE e AC. Portanto, foi realizada outra AMOVA considerando estes grupos de populações (Tabela 8), onde foi observada pouca variação genética entre esses dois grupos, sugerindo que não existem diferenças genéticas significativas para o DNA cloroplastidial das populações de habitats de afloramentos rochosos ou de dunas arenosas.

Tabela 8 -AMOVA de regiões de cloroplasto de populações de *Epidendrum orchidiflorum*, entre e dentro de populações comparando as populações provenientes de afloramentos rochosos e as de dunas arenosas

Fonte de variação	GL	Percentagem da variação total	Índices de fixação	Valor de P
Entre grupos	1	0,81%	F_{CT} : 0,016	0,0702
Entre populações dentro de grupos	11	23,39%	F_{SC} : 0,471	0,0000
Dentro das populações	103	26,23%	F_{ST} : 0,479	0,0000
Total	115			

De acordo com as AMOVAs, foi detectada grande variação entre as populações, ao qual se decidiu determinar o coeficiente de correlação da matriz de distância geográfica das populações e as matrizes de distância genética linearizada (F_{ST}), por médio do Teste de Mantel (1967). Os dados mostraram que a distância genética não está correlacionada com a distância geográfica ($R^2 = 0,0178$; $P > 0,05$), não se encontrando isolamento por distância (Figura 5).

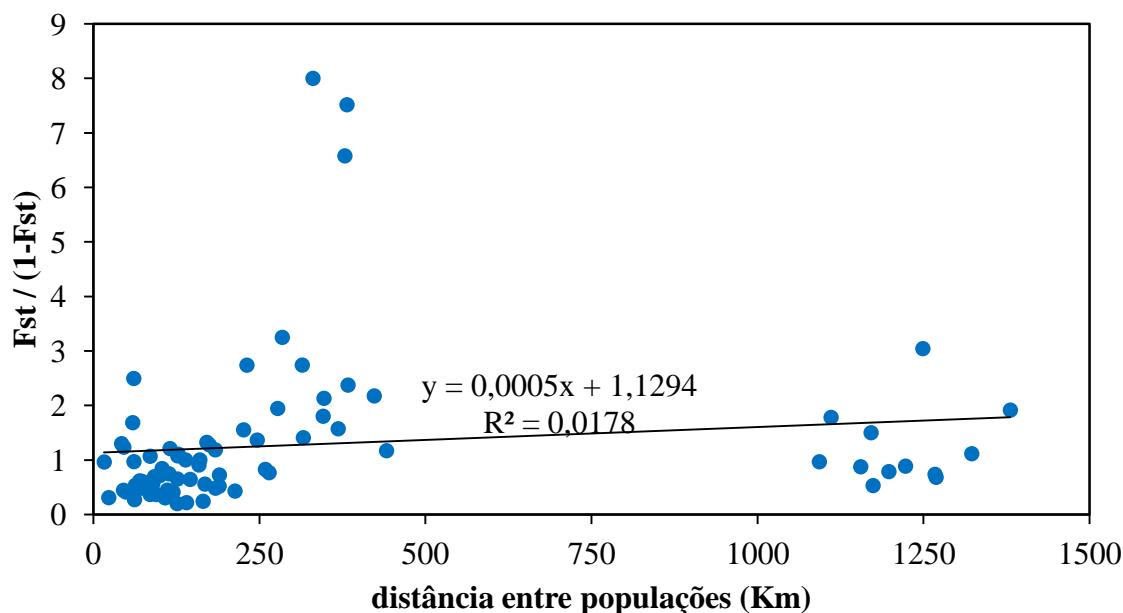


Figura 5 -Comparações de correlação da matriz de distância geográfica das populações e a matriz de distâncias genéticas linearizada (F_{ST}), entre 13 populações de *Epidendrum orchidiflorum*

A comparação dos modelos para determinar se existem grupos panmíticos ou se trata de populações estruturadas (*Full migration*), deu como melhor resultado o modelo de três grupos panmíticos: o conjunto das populações das serras próximas a Chapada Diamantina

(LE, PD, JA, MC, CD, CF, PI, SE, SA, MU e RU), a população da restinga da Bahia (RE) e a população do Rio de Janeiro (AC) (Tabela 9), ocorrendo então panmixia entre as populações próximas a Chapada Diamantina, isto é, mostrando que existem cruzamentos ao acaso entre indivíduos deste grande grupo.

Tabela 9 - Comparação de 13 modelos visando determinar se as populações se encontram em panmixia ou se estas se mostram estruturadas e se há indicio de isolamento por distância usando Bayes Factor (BF) e probabilidade marginal. Os modelos são os mesmos da Figura 3

	Modelos	Bezier (lmL)	Diferença	Expoente	Probabilidade do modelo	Ordem de probabilidade do melhor modelo
I	Única população panmítica	-1318,23	-33,60	2,5E-15	1,43E-15	11
II	Dois grupos panmíticos	-1293,80	-9,17	1,0E-4	5,83E-5	6
III	Três grupos panmíticos	-1284,63	0,00	1,0	5,62E-1	1
IV	Quatro grupos panmíticos	-1285,14	-0,51	6,0E-1	3,37E-1	2
V	Seis grupos panmíticos	-1288,86	-4,23	1,5E-2	8,19E-3	4
VI	Nove grupos panmíticos	-1302,15	-17,52	2,5E-8	1,38E-8	8
VII	Sete grupos panmíticos	-1301,28	-16,65	5,9E-8	3,30E-8	7
VIII	<i>Full migration</i>	-1308,35	-23,72	5,0E-11	2,82E-11	9
IX	<i>Full migration</i> com IBD	-1314,35	-29,72	1,2E-13	6,92E-14	10
X	<i>Full migration</i> para três grupos	-1286,44	-1,81	1,6E-1	9,18E-2	3
XI	<i>Full migration</i> para três grupos com IBD	-1333,75	-49,12	4,6E-22	2,60E-22	12
XII	Kimura Bidimensional	-1291,49	-6,86	1,1E-3	5,92E-4	5
XIII	Kimura Bidimensional com IBD	-1412,19	-127,56	4,0E-56	2,25E-56	13
Menor valor		-1284,63		Soma:	1	

O tamanho efetivo populacional (N_e) calculado, variando de 516.717,33 até 45.927.051,67, mostrou que o maior seria a da população do Litoral da Bahia (RE). (Tabela 10). Por outro lado, o número de indivíduos migrantes (N_m) para os agrupamentos mostrou

que é a maior migração ocorre entre as populações da Chapada Diamantina para o Litoral da Bahia, seguida da migração de indivíduos que ocorre da população do Rio de Janeiro para o Litoral da Bahia (Tabela 11). Assim mesmo, foi interessante ver que existe maior migração no sentido Litoral do Rio de Janeiro para Litoral da Bahia do que do Litoral da Bahia para o Litoral do Rio de Janeiro. Observou-se também que a menor migração ocorre entre o Litoral do Rio de Janeiro e a Chapada Diamantina.

Tabela 10 - Tamanho efetivo populacional (N_e) para agrupamentos de *Epidendrum orchidiflorum* com base no melhor modelo do Migrate-n, para as regiões concatenadas de cpDNA (*rps16-trnK*, *rpl32-trnL*)

Agrupamentos	N_e
Chapada Diamantina (LE, PD, JA, MC, CD, CF, PI, SE, SA, MU e RU)	820668,69
Litoral da Bahia (RE)	45927051,67
Litoral do Rio de Janeiro (AC)	516717,33

Tabela 11 - Número de indivíduos migrantes (N_m) entre agrupamentos de *Epidendrum orchidiflorum* com base no melhor modelo do Migrate-n, para as regiões concatenadas de cpDNA (*rps16-trnK*, *rpl32-trnL*). O agrupamento da Chapada Diamantina inclui as populações LE, PD, JA, MC, CD, CF, PI, SE, SA, MU e RU

Agrupamentos	N_m
Chapada Diamantina para Litoral Bahia	3926,08
Litoral Rio de Janeiro para Litoral Bahia	2107,85
Litoral Bahia para Litoral Rio de Janeiro	52,05
Chapada Diamantina para Litoral Rio de Janeiro	36,24
Litoral Bahia para Chapada Diamantina	21,83
Litoral Rio de Janeiro para Chapada Diamantina	5,44

4.3 Análises de Modelagem de Nicho Ecológico

A análise de Modelagem de Nicho Ecológico (MNE) teve um bom desempenho, segundo a Área sob a curva - AUC, para UGG – 0,991 e InterGlaciação - 0,949. O parâmetro AUC pode apresentar valores entre 0,5 e 1, sendo que 0,5 é indicativo que o modelo obtido não é melhor que um modelo aleatório, valores entre 0,5 e 0,7 são considerados modelos de baixa precisão e modelos com valores superiores a 0,7 correspondem a modelos com alta precisão e discriminação. Os valores de AUC obtidos para a espécie *E. orchidiflorum* demonstram que os modelos desenvolvidos neste estudo são de alta precisão e discriminação.

Segundo o mapa da análise MNE (Figura 6), as comparações das projeções climáticas com a ocorrência potencial da espécie nos cenários: distribuição atual, última grande

glaciação (UGG) e última interglaciação (UI) sugerem que as populações da Chapada Diamantina e regiões adjacentes estavam conectadas, possivelmente estando distribuídas ao longo da região da Mata Atlântica em direção ao sul do Brasil (Figura 6A). Porém, esta continuidade pode ter sido afetada pelas temperaturas baixas e clima seco da Última Grande Glaciação (~21.000 AP-Antes do Presente) (Figura 6B). Este cenário pode ter favorecido ambientes mais secos ao longo do litoral da Bahia, resultando na diminuição de habitats disponíveis e perda da conectividade com as populações ao sul, onde hoje se encontra a população do litoral de Rio de Janeiro (AC). Além disso, a MNE com base na distribuição atual sugere que desde a última glaciação as populações de *E. orchidiflorum* pertencentes às serras podem estar conectadas, sendo que as populações do litoral estão tornando-se cada vez mais fragmentadas (Figura 6C).

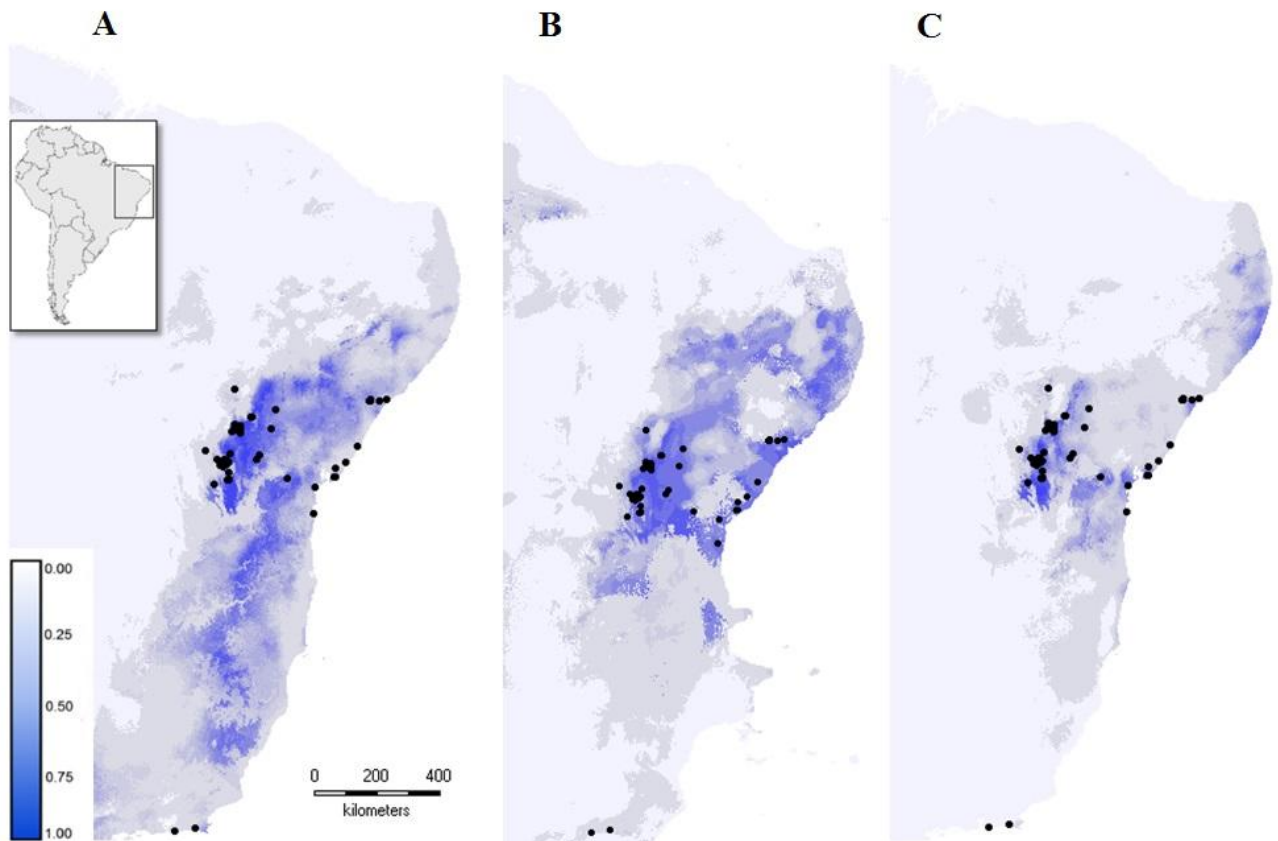


Figura 6 - Resultados do Environmental Envelope Models (EMMs) ou Modelagem de Nicho Ecológico, com base na distribuição atual (C) e dois cenários passados, a Última Grande Glaciação (B) e a última Inter-Glaciação (A). Os pontos pretos indicam as localidades que foram utilizadas para a análise. As cores mais escuras mostram as áreas com as condições previstas mais adequadas

5 DISCUSSÃO

5.1 Diversidade genética entre as populações amostradas de *E. orchidiflorum*

Estudos sobre história evolutiva podem ampliar o conhecimento para fins de conservação das espécies, sendo possível determinar efeitos combinados de deriva genética e fluxo gênico restrito em evolução, e diversificação em populações divergentes (TEMPLETON, 2011). Para entender a história evolutiva de *Epidendrum orchidiflorum*, realizamos este estudo compreendendo a utilização de duas regiões de cloroplasto (*rps16-trnK*, *rpl32-trnL*). A natureza não codificante e uniparental de regiões de cloroplasto (cpDNA) são recursos valiosos para detectar processos demográficos históricos, tais como contrações, expansões e fragmentações (COZZOLINO et al., 2003; PINHEIRO et al., 2014).

Foram encontradas neste estudo populações de *E. orchidiflorum* com alta diversidade haplótípica (Hd), exceto para a população da Restinga onde foi encontrado um único haplótipo. Encontrou-se também compartilhamento de haplótipos entre as serras do interior do continente e do litoral. Adicionalmente, foram encontrados haplótipos exclusivos nas populações do Morro do Chapéu (MC), Seabra (SE) e Arraial do Cabo (AC), indicando alta diferenciação genética entre as populações, confirmada pelas AMOVAs (Tabela 6), com diferenciação entre populações de 47,5%. Este resultado foi inferior ao estudo em *Epidendrum secundum* e *E.cinnabarinum*, onde a diferenciação genética entre populações foi de 63,6% e 64,4% respectivamente (PINHEIRO et al., 2014).

A diversidade haplótípica variou de 0,000 a 0,8889 e a diversidade nucleotídica de 0,000 a 0,005 entre as populações. Resultados similares se encontram na literatura, como o caso da orquídea *Malaxis monophyllos* na sua distribuição na Eurásia (JERMAKOWICZ et al., 2015), onde a diversidade de haplótipos variou de 0,0 a 1,0 considerada alta, e a diversidade nucleotídica de 0,000 a 0,002. Da mesma forma, os estudos de filogeografia em *Camellia taliensis*, pertencente à família Thaeceae, demonstraram diversidade genética alta (Hd= 0,836, $\pi=0,00417$) para a região de cpDNA *rpl32-trnL* (LIU et al., 2012).

Estudos filogeográficos de espécies que se encontram em inselbergs ou afloramentos rochosos já forneceram informação de que estes podem atuar como ‘ilhas’ no sentido de que processos evolutivos dentro destas podem aumentar a diversificação com relação a populações provenientes de outros afloramentos rochosos (BARBOSA et al., 2012; PINHEIRO et al., 2014, PALMA-SILVA et al., 2011). Conseqüentemente, vários estudos apoiam a visão de inselbergs como centros de diversidade e endemismo de espécies

(POREMBSKI, 2007; PINHEIRO et al., 2014), sendo que espécies que ocorrem em fragmentos isolados podem experimentar reduzido fluxo gênico, deriva genética significativa e altos níveis de divergência populacional (MacARTHUR, 1967).

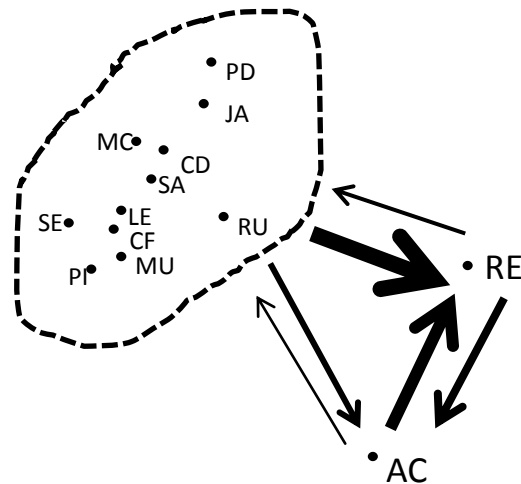
5.2 Estrutura genética das populações e processos demográficos que podem ter influenciado na distribuição atual das populações de *E. orchidiflorum*

Ao realizar a AMOVA com todas as populações se observou um F_{ST} de 0,475, indicando alta diferenciação entre as populações, sendo que esta variação é explicada em 52,45% por sua variação dentro das populações. Uma razão desta variação pode ser que esta espécie apresenta reprodução por alogamia e uma ampla distribuição geográfica, fatores que podem influenciar numa maior diversidade dentro das populações (HAMRICK et al., 1991).

Além disso, a AMOVA realizada para diferentes agrupamentos revelou um F_{CT} baixo e com valor de P não significativo ($P < 0,005$), sendo que o melhor agrupamento observado foi entre as populações das serras (JA, PD, RU, MC, CD, SA, LE, CF, MU, PI e SE) e a população do litoral da Bahia (RE) e o litoral do Rio de Janeiro (AC), com um $F_{CT} = 0,143$, mostrando mesmo assim baixa diferença entre os grupos.

Não foi encontrada correlação entre a diferenciação genética entre as populações com a distância geográfica, sugerindo que a deriva genética pode ser um fator importante que influencia na diversificação das populações em inselbergs, como já descrito por Pinheiro et al. (2014) para *E. secundum* e *E. cinnabarinum*.

Complementando estas análises, foram realizadas as análises de estimativas de tamanho efetivo e de número de indivíduos migrantes. Estas análises sugeriram que o melhor modelo que explicaria a conectividade entre as populações seria o modelo de uma grande população panmítica que reúne as populações das serras (JA, PD, RU, MC, CD, SA, LE, CF, MU, PI e SE) com migração entre as populações do litoral da Bahia (RE) e com a população do Rio de Janeiro (AC) (Figura 7).



Modelo de migração

Figura 7 - Modelo de migração com melhor probabilidade. Sendo uma grande população panmítica (JA, PD, RU, MC, CD, SA, LE, CF, MU, PI e SE) com migração entre as populações do litoral da Bahia (RE) e com a população do Rio de Janeiro (AC). A espessura das setas é proporcional ao número de indivíduos migrantes, segundo a Tabela 11

Segundo este modelo, ocorre uma alta migração de indivíduos da grande população em panmixia para a população do litoral da Bahia, sendo que a segunda migração mais importante é da população do Rio de Janeiro para a do litoral da Bahia. Esta última pode ser pouco precisa, pois foram amostradas poucas populações no litoral. O conjunto de AMOVAS realizadas e os modelos de migração determinaram baixa estrutura genética, já que as populações parecem apresentar alta capacidade de dispersão. Isto pode ser corroborado pelo fato de que as sementes de orquídea estão entre as menores de todas as plantas com flores (ARDITTI; GHANI, 2000; JERSÁKOVA, MALINOVÁ, 2007), permitindo o potencial de ser dispersas em distâncias longas (NATHAN et al., 2011). Estes resultados demonstram que pela hipótese proposta por Van den Berg et al. (2000), que sugere que espécies ancestrais do gênero *Epidendrum* podem ter se originado na América Central e posteriormente colonizado regiões de América do Sul, pode ter grande validade, demonstrando que *E. orchidiflorum* é uma espécie com alto poder de dispersão e colonização.

Além disto, pode-se especular de um efeito fundador na população de Arraial do Cabo (AC), pois esta compartilha um haplótipo H2, mas também possui dois haplótipos únicos (Figura 4). Nesse caso, pode não ter sido dispersão pelo vento, indicando que pode ter ocorrido gradualmente através de corredores bióticos ligando as áreas, como o relatado por Antonelli et al. (2010) para a orquídea *Hoffmannseggella*. Porém, seria preciso amostrar mais populações no litoral e nas serras próximas que conectam a região da Chapada Diamantina ao Rio de Janeiro.

5.3 Distribuição de *E. orchidiflorum* durante as oscilações climáticas do Quaternário Tardio, segundo a distribuição atual da espécie.

Os resultados da MNE sugerem a presença a longo prazo entre as populações dentro do continente, demonstrado pelos altos níveis de diversidade genética observada, indicando também que estas continuam conectadas no tempo até o presente (Figura 6). Os resultados da análise MNE também mostram a descontinuidade de fluxo gênico para a população do Rio de Janeiro a partir do último período glacial. O compartilhamento de haplótipos nas populações do continente e litoral da Bahia pode ser devido à maior área de ocorrência no passado de habitats propícios a populações de *E. orchidiflorum*.

No caso do litoral Rio de Janeiro, observamos que esta população pode ter sido fragmentada a partir da última inter-glaciação (~120.000 anos). O isolamento genético também implica que as populações fragmentadas comportam-se quase como espécies distintas, mas como a barreira ao fluxo gênico sendo apenas geográfica neste caso (TEMPLETON, 2011) e não necessariamente barreiras do tipo reprodutivo.

Os resultados mostraram compartilhamento de haplótipos entre populações devido ao fluxo gênico e contínuos eventos de dispersão no passado. Mesmo assim, as populações apresentam altos níveis de diferenciação genética. Portanto, a utilização em conjunto das análises de diversidade e estrutura genética, análise de migração e MNE conseguiu explicar as diferenças genéticas apresentadas pela população de Arraial do Cabo, RJ, demonstrando a importância deste tipo de estudos para o entendimento da filogeografia das espécies.

Os estudos de conectividade são de grande importância já que a análise conjunta pode ajudar a desvendar processos de dinâmicas populacionais, evolução e respostas da comunidade às mudanças climáticas (KOOL et al., 2013). Além disto, reforçar a conectividade de uma espécie pode influenciar na criação de um habitat para outra, aumentando potencialmente os benefícios nos ecossistemas (DONALD; EVANS, 2006).

Também foram encontrados haplótipos compartilhados entre as populações provenientes de afloramentos rochosos e as de vegetação de dunas de areia. Isto já foi relatado em estudos anteriores com *Epidendrum secundum* e *E. cinnabarinum* (PINHEIRO et al., 2014). Isto se deve ao fato de que os *inselbergs* formam sítios de crescimento com microclima e edafologia secas, podendo fornecer condições adequadas para espécies tolerantes (POREMBSKI, 2007). Pela mesma razão, podem ser considerados lugares de refúgio de espécies adaptadas às condições climáticas mais secas, como já foi observado em estudos com *Epidendrum* (PINHEIRO et al., 2014).

A destruição de ecossistemas naturais, causando perda da biodiversidade se deve sem duvida em grande medida as pressões infligidas pelos seres humanos sobre outros organismos vivos resultando na perda e fragmentação de habitats (FOLEY et al., 2005). A teoria prevê que tanto a perda e fragmentação do habitat podem contribuir para a extinção de espécies (BAGUETTE, 2012). Assim, os eventos da Ultima Grande Glaciação podem ter determinado a criação de refúgios para *E. orchidiflorum* nas serras próximas da Chapada Diamantina, sendo que foi encontrada bastante diversidade entre estas populações. Em outros estudos já foram observados altos níveis de endemismo e biodiversidade na Chapada Diamantina (CONCEIÇÃO, PIRANI, TADEU, 2007; SANTOS, CONCEIÇÃO, 2007; PINHEIRO et al., 2014), a qual está de acordo com a teoria de refúgios, que prevê diversidade genética alta e linhagens antigas presentes em um clima estável (PROVAN; BENNETT, 2008). Pela mesma razão, é de grande importância reconhecer a diversidade existente na população de Rio de Janeiro, incluindo o fato de que a mesma está dentro das áreas prioritárias de conservação, pois a destruição destes habitats pode causar grande perda de biodiversidade e apagar assinaturas de processos que moldaram a distribuição atual da espécie *E. orchidiflorum*.

6 CONCLUSÕES

Foi encontrada diversidade genética alta, tanto entre como dentro das populações de *Epidendrum orchidiflorum*, porém não foi encontrada uma estrutura filogeográfica consistente. Na sua distribuição ao interior do continente, *E. orchidiflorum* apresenta uma história evolutiva com grande conectividade entre inselbergs, talvez devido a sua semente pequena com grande poder de dispersão e colonização dos espaços. As análises indicaram que as populações das serras, próximas a Chapada Diamantina, podem ser consideradas como uma grande população em panmixia. Esta por sua vez apresenta indivíduos migrando para a população do litoral da Bahia e estas duas apresentam indivíduos migrando também para a população do Rio de Janeiro.

REFERENCIAS

- ANTONELLI, A.; SANMARTÍN, I. Why are there so many plant species in the Neotropics? **Taxon**, Bratislava, v.60, p. 403-414, 2011.
- ANTONELLI, A.; VEROLA, C.; PARISOD, C.; LOVISA, A.; GUSTAFSSON, S. Climate cooling promoted the expansion and radiation of a threatened group of South American orchids (Epidendroideae: Laeliinae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v.100, p.597-607, 2010.
- ARDITTI, J.; GHANI, A.K.A. Tansley review No. 110. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. **New Phytologist**, New Jersey, v. 145, p. 367-421, 2000.
- AVISE, J.C. Phylogeography: **The History and Formation of Species**. Cambridge: Cambridge Harvard University Press. 2000. 447p.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, JR.R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REED, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, 1987.
- BAGUETTE, M.; BLANCHET, S.; LEGRAND, D.; STEVENS, V.; TURLURE, C. Individual dispersal, landscape connectivity and ecological networks. **Biological reviews**, Cambridge, v. 12000, p. 1-17, 2012.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; ROHL, A.M. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 16, p. 37, 1999.
- BARBOSA, A.R.; FIORINI, C.F.; SILVA-PEREIRA, V.; MELLO-SILVA, R.; BORBA, E. L. Geographical genetic structuring and phenotypic variation in the *Vellozia hirsute* (Velloziaceae) ochlopecies complex. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 99, p. 1477-1488, 2012.
- BARROS, F. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das Orchidaceae brasileiras. **Acta Botânica Brasileira**, Belo Horizonte, v. 4, n.1, p. 177 – 187, 1990.
- BARROS, F. DE; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.; BARBERENA, F.; FRAGA, C.; PESSOA, E.; FORSTER, W.; MENINI M. **Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 04 fev. 2014
- BASTOS, C.; VAN DEN BERG, C. A família Orchidaceae no município de Morro do Chapéu, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v.63, n.4, p. 883- 927, 2012.
- BECERRA, V.; PAREDES, M. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares em estudos de diversidade genética. **Agricultura Técnica**, Chillán, v. 60, n.3, p. 6, 2000.
- BEERLI, P. Effect of unsampled populations on the estimation of population sizes and migration rates between sampled populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 827-836, 2004.

BEERLI, P. **MIGRATE documentation** (version 3.2.1).2012.Technical Report. Disponível em: <http://popgen.sc.fsu.edu/Migrate/Migrate-n.html>. Acesso em: 20 jun. 2016.

BEERLI, P.; PALCZEWSKI, M. United framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. **Genetics**, Bethesda, v. 185, p. 313-326. 2010.

BEHEREGARAY, L. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**, Oxford, v.17, p.3754-3774, 2008.

BOCAYUVA, M.; CAMPOSTRINI, R. Orchidaceae no Parque Natural Municipal da Prainha, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, Belo Horizonte, v. 21, n.2, p.383-400, 2007.

BRACONNOT, P.; OTTO-BLIESNER, B.; HARRISON, S.; JOUSSAUME, S.; PETERCHMITT, J.-Y.; ABE-OUCHI, A.; CRUCIFIX, M.; DRIESSCHAERT, E.; FICHEFET, T.; HEWITT, C. D.; KAGEYAMA, M.; KITO, A.; LOUTRE, M. F.; MARTI, O.; MERKEL, U.; RAMSTEIN, G.; VALDES, P.; WEBER, L.; YU, Y.; ZHAO, Y. Results of PMIP2 coupled simulations of the Mid-Holocene and Last Glacial Maximum – Part 2: feedbacks with emphasis on the location of the ITCZ and mid- and high latitudes heat budget, **Climate of the Past**, Munich, v. 3, p. 279–296, 2007.

CARNAVAL, A.; HICKERSON, M.; HADDAD, C.; RODRIGUES, M.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, New York, v. 323, n.5915, p. 785-789, 2009.

CHASE, M. Monocot relationships: an overview. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 91, n. 10, p. 1645-1655, 2004.

CONCEIÇÃO, A.; PIRANI, J.; TADEU, S. Floristics, structure and soil of insular vegetation in four quartzite-sandstone outcrops of “Chapada Diamantina”, Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 641-656. 2007.

COZZOLINO, S.; WIDMER, A. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception?. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v.20, p. 487-494, 2005.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, New York, v. 9, p. 772, 2012.

DONALD, P.; EVANS, A. Habitat connectivity and matrix restoration: the wider implications of agri-environment schemes. **Journal of Applied Ecology**, London, v. 43, p. 209-218. 2006.

DOYLE, J.; DOYLE, J. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, London, v.19, p.11-15, 1987.

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**, Oxford, v.10, p. 564-7, 2010.

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**, Bethesda, v. 131, p. 479-91, 1992.

FAY, M., CHASE, W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, p. 359-364. 2009.

FOLEY, J. A.; DEFRIES, R.; ASNER, G. P.; BARFORD, C.; BONAN, G.; CARPENTER, S. R.; CHAPIN, F. S.; COE, M. T.; DAILY, G. C.; GIBBS, H. K.; HELKOWSKI, J. H.; HOLLOWAY, T.; HOWARD, E. A.; KUCHARIK, C. J.; MONFREDA, C.; PATZ, J. A.; PRENTICE, I. C.; RAMANKUTTY, N.; SNYDER, P. K. Global consequences of land use. **Science**, Washington, v. 309, p. 570-574, 2005.

FRANCA, F.; MELO, E.; CORREIA DOS SANTOS, C. Flora de inselbergs da região de Milagres, Bahia, Brasil: I. Caracterização da vegetação e lista de espécies de dois inselbergs. **Sitientibus**, Feira de Santana, v. 17, p. 163-184. 1997.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.; BRISCOE, D. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Editora Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 280p

FREELAND, J.; KIRK, H.; PETERSEN, S. **Molecular ecology**. 2nd ed. Chichester .United Kindom, Wiley & Sons. 2011. 464 p.

GENT, P.; DANABASOGLU, G.; DONNER, L.; HOLLAND, M.; HUNKE, E.; JAYNE, S. R.; LAWRENCE, D.; NEALE, R. B.; RASCH, P.; VERTENSTEIN, M.; WORLEY, P.; YANG, Z.; ZHANG, M. The community Climate System Model Version 4. **Journal of Climate**, Boston, v. 24, p. 4973 – 1991. 2011.

HÁGSATER, E.; SOTO, M. *Epidendrum* L. In: PRIDGEON, A.; CRIBB, P.; CHASE, M.; RASMUSSEN, F. Genera Orchidacearum. Oxford, Oxford University Press, 2005, v. 4, chap. 4, p. 236-251.

HAIDER, N. Chloroplast-specific universal primers and their uses in plant studies. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v.55, n.2, p. 225-236, 2011.

HAMRICK, J.L, GODT, M.J.W.; MURAWSKI, D.A.; LOVELESS, M.D. Correlations between species traits and allozyme diversity: in implications for conservation biology. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (Eds.). **Genetic and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991. p. 75-86,

HICKERSON, M.; CARSTENS, B.; CAVENDER-BARES, J.; CRANDALL, K.; GRAHAM, C.; JOHNSON, J.; RISSLER, L.; VICTORIANO, P.; YODER, A. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 54, p. 291-301, 2010.

HIJMANS, R.J.; CAMERON, S.E.; PARRA, J.L.; JONES, P.G.; JARVIS, A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global landareas. **International Journal of Climatology**, Boston, v. 25, p. 1965-1978, 2005.

HIJMANS, R.; GUARINO, L.; CRUZ, M.; ROJAS, E. Computer tools for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA-GIS. **Plant Genetic Resources Newsletter**, Roma, v. 127, p. 15-19, 2001.

JERMAKOWICZ, E.; WRÓBLEWSKA, A.; BRZOSKO, E.; MIRSKI, P.; HIRSE, T. Phylogeographical structure of the boreal-montane orchid *Malaxis monophyllos* as a result of multi-directional gene flow. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 178, p. 138-154, 2015.

JERSAKOVA, J.; MALINOVA, T. Spatial aspects of seed dispersal and seedling recruitment in orchids. **New Phytologist**, Lancaster, v. 176, p. 237-241, 2007.

KARTZINEL, T.; SHEFFERSON, R.; TRAPNELL, D. Relative importance of pollen and seed dispersal across a Neotropical mountain landscape for an epiphytic orchid. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 22, p. 6048- 6059.

KNOWLES, L. Statistical Phylogeography. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 40, n.1, p. 593–612, 2009.

KOOL, J. T.; PARIS, C. B.; BARBER, P. H.; COWEN, R. Connectivity and the development of population genetic structure in Indo-West Pacific coral reef communities. **Global Ecology and Biogeography**, Malden, v. 20, p. 695-706, 2011.

LAGE, R.; LEMOS, J.; RIBEIRO, R.; LOVATO, M. Phylogeography of *Plathymenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 985-998, 2010.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LONGO, D.; LORENZ-LEMKE, A.; MADER, G.; BONATTO, S.; FREITAS, L. Phylogeography of the *Petunia integrifolia* complex in southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 174, p. 199-213, 2014.

MacARTHUR, R.; E. WILSON. **The theory of island biogeography**. Princeton: Princeton: University Press. 1967. P. 224

MADDISON, W. P.; MADDISON, D.R. **Mesquite, D.R.A modular system for evolutionary analysis**. Version 2.75.2011. Disponível em: <<http://mesquiteproject.org>>. Acesso em: 5 jun. 2015.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 27, p. 209-220. 1967.

MILLER, D.; WARREN, R.; MOURA, I.; SEEHAWER, H. **Serra dos órgãos, sua historia e suas orquídeas**. Nova Friburgo: Editora Scart, 2006. 572 p.

MURGUÍA, G.; LEE, E. **Manual de producción de orquídeas**. Xalapa: Universidad Veracruzana, 2007, p. 75.

MUSE, S. Examining rates and patterns of nucleotide substitution in plants. **Plant Molecular Biology**, Berlin, v. 42, p. 25-43, 2000.

NATHAN, R.; KATUL, G.; BOHRER, G.; KUPARINEN, A.; SOONS, M.; THOMPSON, S.; TRAKHTENBROT, A.; HORN, H. Mechanistic models of seed dispersal by wind. **Theoretical Ecology**, Dordrecht, v. 4, p. 113-132. 2011.

OLIVIEIRA, C.; VAN DER BERG, C. A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. **Hoehnea**, São Paulo, v.34, n.1, p. 1-47, 2007.

PADIAL, J.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology**, London, v.7 p. 1-16, 2010.

PALMA-SILVA, C.; LEXER, C.; PAGGI, G.; BABARÁ, T.; BERED, F.; BODANESE-ZANETTINI, M. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bomeliaceae), a neotropical forest species. **Heredity**, London, v.103, p.503-512, 2009.

PEAKALL, R. Speciation in the orchidaceae: confronting the challenges. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 2834-2837, 2007.

PESSOA, M.; ALVES, M.; ALVES-ARAÚJO, A.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO, F. Integrating different tools to disentangle species complexes: A case study in *Epidendrum* (Orchidaceae). **Taxon**, Bratislava, v.61, n.4, p. 721-734, 2012.

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**, Oxford, v.38, p. 1923–1935, 2011.

PINHEIRO, F.; PALMA-SILVA, C.; BARROS, F.; FÉLIX, L.; LEXER, C.; COZZOLINO, S.; FAY, M. Chloroplast microsatellite markers for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*, and cross-amplification in other Laeliinae species (Orchidaceae). **Conservation Genetics Resources**, Dordrecht, v. 1, p. 505–511, 2009b.

PINHEIRO, F.; SANTOS, M.; BARROS, F.; MEYER, D.; SALATINO, A.; SOUZA, A.; COZZOLINO, S. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Brazilian orchid *Epidendrum fulgens*. **Conservation Genetics**, New York, v. 9, p. 1661–1663, 2008a.

PINHEIRO, F.; CARDOSO-GUSTAVSON, P.; MAMORU, R.; ABRAO, M.; GUIMARAES, L.; DRAPER, D.; MORAES, A. Strong postzygotic isolation prevents introgression between two hybridizing Neotropical orchids, *Epidendrum denticulatum* and *E. fulgens*. **Evolutionary Ecology**, New York, v.29, p. 229-248. 2015.

PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S. *Epidendrum* (Orchidaceae) as a model system for ecological and evolutionary studies in the Neotropics. **Taxon**, Bratislava, v.62, n.1, p. 77–88, 2013.

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**, Malden, v. 67, n.7, p. 2024- 2039, 2013b.

- PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S.; MUNT, D.D.; BARROS, F.; FÉLIX, L.P.; FAY, M. F.; PALMA-SILVA, C. Rock outcrop orchids reveal the genetic connectivity and diversity of inselbergs of northeastern Brazil. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, p. 49, 2014.
- PINHEIRO, F.; KOEHLER, S.; CORRÊA, A.; SALATINO, M.; SALATINO, A.; BARROS, F. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 283, p. 165–177, 2009a.
- PHILLIPS, S.; DUDIK, M.; SCHAPIRE, R. Maximum entropy modelling of species geographic distributions. **Ecological Modelling**, Amsterdão, v. 190, p. 231-259, 2006.
- POREMBSKI, S. Tropical inselbergs: habitat types, adaptive strategies and diversity patterns. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 579-586, 2007.
- POREMBSKI, S.; BARTHLOTT, W. **Inselbergs. Biotic diversity of isolated rock outcrops in tropical and temperate regions**. Berlin, Ecological Studies, 2000, p. 514.
- PROVAN, J.; BENNETT, K. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 23, p. 564–571, 2008
- PROVAN, J.; POWELL, W.; HOLLINGSWORTH, P. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v.16, 142–147, 2001
- SAIA, S.; PESSENDA, L.; GOUVEIA, S.; ARAVENA, R.; BENDASSOLLI, J. Last glacial maximum (LGM) vegetation changes in the Atlantic Forest, southeastern Brazil. **Quaternary International**, Amsterdam, v. 184, p. 195-201, 2008.
- SANTOS, S.; CONCEIÇÃO, A. Vegetação em afloramentos rochosos na Serra do Sincorá, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus**, Série Ciências Biológicas, Feira de Santana, v. 7, p. 36-45, 2007.
- SHAW, J.; LICKY, E.; BECK, J.; FARMER, S.; LIU, W.; MILLER, J.; SIRIPUN, K.; WINDER, C.; SCHILLING, E.; SMALL, R. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 92, p.142–166, 2005.
- SHAW, J., LICKY, E., SCHILLING, E.; SMALL, R. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose non-coding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 94, p.275–288, 2007.
- SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Bethesda, v. 139, p. 457-462. 1995.
- STADEN, R.; BEAL, K.; BONFIELD, J. “The Staden Package, 1998”. **Methods in Molecular Biology**, Hertfordshire, v. 132, p. 115-130.2000
- STANCIK, J.; GOLDENBERG, R.; BARROS, F. O gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 23, n.3, p. 864-880, 2009.

TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, New York, v. 17, p. 1105-1109, 1991.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. Mega6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TEMPLETON, A. **Genética de populações e teorias microevolutivas**. Tradução de Reinaldo Alves de Brito. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2011, p. 705.

TOMÉ, T.M. **Filogeografia de *Cattleya loddigesii* Lindl. e *Cattleya harrisoniana* (exLindl.) Bateman (Orchaceae)**. 2016. 119 p. Dissertação, (Genética e Melhoramento de Plantas) – Departamento de Genética, Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

TURCHETTO-ZOLET, A.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C. Phylogeographical pattern shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology**, Oxford, v.22, p.1193-1213, 2013.

VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W. E.; DRESSLER, R. L.; WHITTEN, W. M.; ARENAS, M. A. S.; CULHAM, A.; CHASE, M. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Lindleyana**, Coral Glabes, v.15, p.96–114, 2000.

VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W.; DRESSLER, R.; WHITTEN, W.; SOTO-ARENAS, M.; CHASE, M. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, Oxford, v. 104, n. 3, p. 417-430, 2009.

VEGA, Y., M. ARQUES I. Both biotic and abiotic factors influence floral longevity in three species of *Epidendrum* (Orchidaceae). **Plant Species Biology**, Malden, v. 30, p. 184-192. 2015.

VIEIRA, T. **Orchidaceae no município de Jacobina, Bahia, Brasil**. 2013. 45 p. Tese (Ciencias Biológicas) – Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2013.

WORLD CHECKLIST OF MONOCOTYLEDONS. **World Checklist of Monocotyledons. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew**, 2011. Disponível em: <<http://apps.kew.org/wcsp/wcsp/>>. Acesso em: 20 jul. 2014.