

JOÃO RODRIGO SANTOS DA SILVA

VARIABILIDADE POPULACIONAL DE *CATTLEYA PFISTERI* (PABST & SENGHAS) VAN DEN BERG (ORCHIDACEAE)

FEIRA DE SANTANA – BAHIA

2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA



VARIABILIDADE POPULACIONAL DE *CATTLEYA PFISTERI* (PABST & SENGHAS) VAN DEN BERG (ORCHIDACEAE)

JOÃO RODRIGO SANTOS DA SILVA

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

ORIENTADOR: PROF. DR. CÁSSIO VAN DEN BERG (UEFS)

FEIRA DE SANTANA – BA
2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Luís Rodrigues de Moraes

Prof(a). Dr(a). Marines Marli Gniech Karasawa

Prof. Dr. Cássio van den Berg

Orientador e Presidente da Banca

Feira de Santana – BA

2008

*A meus pais,
Nilza e Antônio,
por tudo.*

"Hoje, a única coisa constante é a mudança"

Heráclito de Éfeso, 350 A.C.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pela força e pela proteção durante toda jornada.

A meus pais, Nilza e Antônio, a quem dedico este trabalho, e à minha irmã por terem me apoiado sempre nessa jornada. Agradeço a meus tios, tias, primos e primas que sempre apoiaram mesmo distantes.

A alguns amigos em especial porque estiveram sempre do meu lado, Ana Paula, uma irmã com quem sempre pude contar na saúde e na doença, além das alegrias e tristezas. À Milene, pelo apoio sempre e pela motivação que me serviu de inspiração, além da sua amizade. A Júnior e Márcio pelo apoio e pelos momentos divertidos porque todo mundo merece. A Ivana, Juan, Rodrigo P. e Teresa Bahia, pelo enorme apoio e pela amizade acima de tudo. À minha mãe, que me apoiou e que sem a qual não teria conseguido. Aos meus amigos da graduação (Ciências Biológicas na UEFS) e do Colegial (CEFET) que me apoiaram mesmo de longe, pois apoio moral vale nesta hora, além da compreensão pela minha falta de tempo.

Ao prof. Cássio pela orientação, paciência, confiança e pelos ensinamentos que muito me foram úteis para realização deste trabalho.

À Sabrina que foi uma co-orientadora, fundamental para a realização deste trabalho, sem ela estaria perdido nos programas. Ao Felipe por ter me ajudado com programas e protocolos. À Andréa pela força e orientações iniciais. Ao Paulo Ricardo pelo auxílio nos usos dos programas. À Patrícia Luz na ajuda do artigo para a revista.

Aos meus amigos Aigara, Alana, Alessandra, Alice, Aline, Ana Paula, Bruna, Carla, Carol, Cimille, Dani, Dionísio, Emerson, Erivaldo Jr., Fabiana, Fabrício, Fernanda, Hosana, Ivã, Ivana, Jaqueline, Jaílson, Jamile, Jefferson, Juan, July, Léo, Luca, Magdalena, Mara, Marcelo, Márcio, Marcos, Mariana, Marla, Milene, Murilo, Patrícia Crys, Patrícia, Paulo Ricardo, Ricardo, Rodrigo F., Rodrigo P., Roni, Sabrina, Saymon, Simone, Taiana, Teo, Teresa Bahia, Teresa Buril, Valéria, Vivi e Yuri pela força e apoio mesmo que distantes ou bastante próximos.

A todos no LAMOL, Andréa Karla, Cecília, Daiane, Elisa, Felipe, Marcos, Patrícia Crys, Patrícia Luz, Paulo Ricardo, Ricardo, Sabrina, Silvana, Simone e Tarciso, que me deram apoio e tornaram as idas ao laboratório algo mais sociável.

À Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Botânica pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado a qual permitiu uma maior e melhor dedicação no desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram com o desenvolvimento desse trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO GERAL.....	5
CAPÍTULO I. VARIABILIDADE GENÉTICA DE <i>CATTLEYA PFISTERI</i> (PABST & SENGHAS) VAN DEN BERG (ORCHIDACEAE) – CHAPADA DIAMANTINA, BAHIA, BRASIL.....	15
CAPÍTULO II. ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE <i>CATTLEYA PFISTERI</i> (PABST & SENGHAS) VAN DEN BERG (ORCHIDACEAE) E ESPÉCIES RELACIONADAS....	45
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

RESUMO

Cattleya é um gênero Neotropical com aproximadamente 112 espécies, a maioria ocorrendo no Brasil. A espécie *Cattleya pfisteri* apresenta uma distribuição restrita à Chapada Diamantina, sendo pouco conhecida e analisada. Estudos de variabilidade genética e morfométrica foram utilizados para avaliar os padrões de variabilidade genética desta espécie, bem como relacioná-la com suas espécies próximas, além de verificar uma possível hibridação/introgressão existente em uma das populações. Para isto, foram amostrados 155 indivíduos em nove populações naturais nos estados da Bahia (municípios de Mucugê, Barra da Estiva, Caetité, Ibicoara e Ituaçu) e de Minas Gerais (municípios de Tiradentes, Carrancas e Ibirité) agrupadas em cinco táxons, *C. pfisteri*, *C. aff. pfisteri*, *C. caulescens*, *C. pabstii* e *C. sincorana*. Para delimitação de *C. pfisteri* foram incluídas *C. pabstii* e *C. caulescens*, espécies próximas da mesma seção. *Cattleya aff. pfisteri* é uma população morfologicamente similar a *C. pfisteri*, porém de ocorrência fora da Chapada Diamantina e floração mais precoce. *C. sincorana* pertence a outra seção, e foi incluída devido à provável ocorrência de hibridação com *C. pfisteri*. Os estudos de variabilidade genética foram realizados utilizando sete primers de marcadores dominantes de ISSR que revelaram 122 locos. Foram detectados baixos valores de variabilidade genética em comparação com outros trabalhos utilizando ISSR. Os menores valores de variabilidade genética são encontrados nas populações de *C. pfisteri* de Ibicoara e Ituaçu enquanto a população mais variável é *C. pfisteri* de Mucugê. Uma análise de Coordenadas Principais (PCO) mostra separação de todos os cinco táxons analisados bem como entre as populações de *C. pfisteri*. Em relação à hibridação foram detectados 10 locos compartilhados apenas entre uma das populações de *C. pfisteri* (Mucugê) e *C. sincorana*, que ocorrem simpátrica e sintopicamente, indicando a existência de introgressão de *C. sincorana* nesta população. Existem ainda 18 locos compartilhados entre todas as populações de *C. pfisteri* que permitem delimitar esta espécie claramente em relação aos outros quatro táxons. Análises de distância genética baseadas na distância de Nei (1978) e F_{ST} par a par também agrupam as populações de *C. pfisteri*, com exceção da supostamente introgredida, porém não esclarece qual seria realmente a espécie próxima das populações de *C. pfisteri* devido ao baixo suporte estatístico. Uma análise bayesiana utilizando o programa STRUCTURE 2.2 também detectou a existência de introgressão e separou todos os

outros táxons como *pools* gênicos independentes, indicando também a diferenciação de *C. aff. pfisteri* (Caetité) das demais populações analisadas, e sugerindo ser esta uma espécie nova. Foram também analisados 38 caracteres quantitativos contínuos de labelo, pétala, sépala lateral e dorsal, coluna, estigma, ovário, pseudobulbo e folha, por análise morfométrica. Neste trabalho foram amostrados 78 indivíduos de seis populações naturais distribuídas nos estados da Bahia (municípios de Mucugê, Barra da Estiva, Caetité, Ibicoara e Ituaçu) e de Minas Gerais (município de Tiradentes) agrupadas em três táxons, *C. pfisteri*, *C. aff. pfisteri* e *C. pabstii*. As flores foram dissecadas e montadas em fichas florais, de onde foram medidos utilizando régua e paquímetro. Inicialmente foi realizada uma Análise Discriminante Canônica (DCA), tomando como variável categórica as populações. Foram realizadas análises de agrupamento através do algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method of Averages*) com as distâncias de Mahalanobis provenientes da DCA. Os resultados do DCA indicam que as populações de *C. pfisteri* de Mucugê e a *C. pabstii* de Tiradentes são separadas no primeiro eixo, que explica 67,62% da variância. O segundo eixo separa a população de *C. aff. pfisteri* de Caetité das populações de *C. pfisteri* de Ituaçu, Ibicoara e Barra da Estiva. Os resultados da análise de agrupamento são similares aos resultados de DCA, repetindo alguns agrupamentos como, por exemplo, o agrupamento das *C. pfisteri* dos municípios de Barra da Estiva, Ibicoara e Ituaçu. De acordo com dados morfométricos, *C. aff. pfisteri* é mais próxima de *C. pfisteri* do que *C. pabstii*, diferentemente dos dados moleculares. Já a grande diferenciação encontrada em uma das populações de *C. pfisteri* (Mucugê), pode estar relacionada com a introgressão genética, detectada através de dados moleculares do estudo anterior.

Palavras-Chave: *Cattleya pfisteri*, variabilidade genética, populações, introgressão, Orchidaceae, Variabilidade morfométrica.

ABSTRACT

Cattleya is a Neotropical genus with ca. 112 species, most of which occur in Brazil. *Cattleya pfisteri* presents a restricted distribution in the Chapada Diamantina, and is little known and analyzed. Studies of genetic variation and morphometric studies were used to assess the patterns of genetic variability of this species, and relate it to their closely species, in addition to check a possible hybridization/introgression existing in one of the populations. For this, we sampled 155 individuals in nine natural populations in the Brazilian States of Bahia (municipalities of Mucugê, Barra da Estiva, Caetité, Ibicoara and Ituaçu) and Minas Gerais (municipalities of Tiradentes, Carrancas and Ibirité) grouped into five taxa, *C. pfisteri*, *C. aff. pfisteri*, *C. caulescens*, *C. pabstii* and *C. sincorana*. For delimitation of *C. pfisteri* we included *C. pabstii* and *C. caulescens*, species closely related belonging to the same section. *Cattleya* aff. *pfisteri* is a population morphologically similar to *C. pfisteri* but occurring outside the Chapada Diamantina with earlier flowering. *C. sincorana* belongs to a different section, and was included because of the likely occurrence of hybridization with *C. pfisteri*, based on field observations. We collected data from ISSR dominant markers, using seven primers which generated 122 loci. We detected low values of genetic variation in comparison with other studies using ISSR. The lowest values of genetic variation are found in the Ibicoara and Ituaçu populations of *C. pfisteri* while the most variable population is *C. pfisteri* of Mucugê. An analysis of Principal Coordinates (PCO) shows separation of all five taxa analyzed and between the populations of *C. pfisteri*. As evidence of hybridization we found 10 loci shared only between one of the populations of *C. pfisteri* (Mucugê) and *C. sincorana*. These two populations occur sympatrically, indicating the existence of introgression of the latter in the former. There are still 18 loci shared among all populations of *C. pfisteri* which allow a clear circumscription of this species from the other four taxa. Analyses of genetic distance based on distance of Nei (1978) and paired F_{ST} values have also grouped the populations of *C. pfisteri*, except for the population of Mucugê, but did haven't clarified what would be the next group of *C. pfisteri* due to the low statistical support. A Bayesian analysis using the software STRUCTURE 2.2 also found evidence of introgression and separated all other taxa as independent gene pools, indicating also the differentiation of *C. aff. pfisteri* (Caetité) among all populations analyzed, suggesting this population would constitute a new species. We also

analyzed 38 characters of continuous quantitative measures from flowers and vegetative organs for morphometric analysis. In this work we sampled 78 individuals from six natural populations distributed in the States of Bahia (municipalities Mucugê, Barra da Estiva, Caetité, Ibicoara and Ituaçu) and Minas Gerais in the city of Tiradentes grouped into three taxa, *C. pfisteri*, *C. aff. pfisteri* and *C. pabstii*. The flowers were dissected and mounted on floral sheets, which were measured using ruler. Initially a Canonical Discriminant Analysis (DCA, also called Canonical Variates) was performed followed, taking the populations as a categorical variable. We performed also Cluster Analysis through the algorithm UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Averages) with the distances of Mahalanobis from the DCA. The results of the DCA indicate that the populations of *C. pfisteri* of Mucugê and *C. pabstii* of Tiradentes are separated in the first axis, which explains 67.62% of the variance. The second axis separates the population of *C. aff. pfisteri* of Caetité of the populations of *C. pfisteri* of Ituaçu, Ibicoara and Barra da Estiva. The results of the Cluster Analysis are similar to the results of DCA, repeating some groups, such as the grouping of *C. pfisteri* of the municipalities of Barra da Estiva, Ibicoara and Ituaçu. According to morphometric data, *C. aff. pfisteri* is closer to *C. pfisteri* than *C. pabstii*, differently molecular results. The great differentiation found in one of the populations of *C. pfisteri* (Mucugê), seems to be related to introgression, detected by molecular data in the former study.

Keywords: *Cattleya pfisteri*, genetic variability, populations, introgression, Orchidaceae, morphometric variability.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Orchidaceae é a maior família de plantas com cerca de 25000 espécies (Dressler 1993). Esta família apresenta uma grande diversidade morfológica tanto vegetativa quanto reprodutiva, ao mesmo tempo em que apresenta algumas características conservadas que permitem a sua fácil identificação como, por exemplo, flores de simetria bilateral, com uma das pétalas modificadas, conhecida como labelo. Geralmente apresenta um único estame fundido com estiletes e estigma, formando o que se conhece como coluna ou ginostêmio. O Brasil apresenta aproximadamente 2500 espécies de Orchidaceae (Pabst & Dungs 1975, 1977), sendo encontradas cerca de 300 no estado da Bahia (van den Berg & Azevedo 2005).

Cattleya é um gênero neotropical, com a maioria das espécies registradas no Brasil. É provavelmente um dos gêneros mais vistosos e populares entre os colecionadores de orquídeas, com inúmeros híbridos naturais quanto artificiais (Withner 1988). O gênero recebeu esse nome em homenagem a William Cattley que floresceu a primeira *Cattleya* na Europa por volta de 1818. Essa planta, importada do Brasil, descrita como *Cattleya labiata* Lindl. por John Lindley (van den Berg 1996). Pertencente a subtribo neotropical Laeliinae (tribo Epidendreae), o gênero *Cattleya* tem chamado a atenção de taxonomistas e colecionadores por conter diversos gêneros de flores grandes, fácil cultivo e interesse ornamental (van den Berg & Chase 2004), cujo único estudo molecular foi realizado com o intuito de resolver aspectos filogenéticos (van den Berg *et al.* 2000).

No conceito original de Lindley, a principal diferença de *Laelia* em relação à *Cattleya* seria a presença de oito polínias na primeira e quatro na última (van den Berg & Chase 2004). Entretanto, através de estudos moleculares, foram propostas grandes alterações dentro da subtribo Laeliinae (van den Berg *et al.* 2000). As espécies brasileiras de *Laelia* foram, na sua totalidade, transferidas para o gênero *Sophronitis*, descrito por Lindley em 1828, e as combinações nomenclaturais publicadas por van den Berg & Chase (2000). De fato, todas as espécies originalmente incluídas em *Sophronitis* apresentam características morfológicas similares a *Laelia*, como oito polínias, e geralmente apenas uma folha. As principais diferenças, tais como o tamanho das plantas e flores e coloração vermelha das flores de *Sophronitis sensu stricto* são provavelmente resultantes de adaptações para polinização por beija flores (Chiron *et al.* (2003); van den Berg & Chase 2004) Van

den Berg *et al.* (2000) com base em caracteres morfológicos e moleculares (ITS) propôs mudanças nos táxons das *Laelias* brasileiras transferindo-as para *Sophronitis*. Um novo estudo realizado por van den Berg (2008), baseado em caracteres moleculares, oito regiões plastidiais além de utilizar os dados de ITS, reclassificou essas *Sophronitis*, as espécies brasileiras de *Laelia* (van den Berg & Chase 2000), incluindo todas em *Cattleya*, que passou a cerca de 112 espécies.

Cattleya pfisteri (Pabst & Senghas) Van den Berg apresenta flores púrpura, pequenas. Esta espécie está inclusa no subgênero *Parviflorae* (Lindley) Whitner, que apresenta 40-50 espécies de difícil separação. Foi descrita em 1975, sendo endêmica da Chapada Diamantina – BA, Brasil. É próxima de um grupo de espécies mineiras, especialmente *C. caulescens* (Lindl.) Van den Berg e *C. pabstii* (F.E.L.Miranda & K.G. Lacerda) Van den Berg. Estas três ainda se aproximam de um grupo de espécies de flores amarelas e alaranjadas, incluindo *C. crispata* (Thunb.) Van den Berg, *C. cinnabarina* (Batem.) Van den Berg, *C. endsfeldzii* (Pabst) Van den Berg, *C. flavafulina* (F.E.L.Miranda & K.G.Lacerda) Van den Berg. As relações entre estas espécies são incertas, mesmo porque no estudo filogenético de van den Berg *et al.* (2000), não foi encontrada variabilidade nas seqüências de ITS dentro deste grupo. Castro & Marçal (2006) nomearam uma população de *C. pfisteri*, localizada no distrito de Guiné, Mucugê-BA, como um novo táxon, *Hoffmannseggella diamantinensis* V.P.Castro & Marçal, devido às diferenças morfológicas encontradas em relação às demais *C. pfisteri*. Silva-Pereira *et al.* (2007) estudaram esta mesma população, que é simpátrica com *C. sincorana* (Schltr.) Van den Berg, espécie pertencente ao subgênero *Hadrolaelia* (Schlechter) Withner. Estes autores encontraram incompatibilidade reprodutiva unidirecional em que cruzamentos em que *C. sincorana* foi o progenitor feminino apresentam baixa fertilidade.

A Chapada Diamantina é um grande centro de diversidade de orquídeas, por apresentar diversos tipos de formações vegetais, e especialmente formações de campo rupestre, onde a família é bastante representativa (Toscano de Brito 1998; van den Berg & Azevedo 2005). Os campos rupestres são formações encontradas em Minas Gerais e na Bahia. Na Bahia estes estão predominantemente cercados por Caatinga e em Minas Gerais esse tipo de vegetação está inserido no cerrado, podendo também ser encontrada em outras localidades da porção sudoeste do Distrito Federal, de Goiás como ilhas florísticas isoladas (Giulietti *et al.* 2000; Romero 2002).

Os campos rupestres apresentam uma elevada diversidade florística e um elevado número de espécies raras e com distribuição restrita, fazendo com que cada região possua uma flora diferenciada com espécies exclusivas (Harley & Simmons 1986; Azevedo & van den Berg 2007a). A flora do campo rupeste vem sendo descrita e detalhada (Harley & Simmons 1986; Giulietti *et al.* 1987; Stannard 1995; Conceição & Pirani 2005; Conceição & Pirani 2007) indicando seu alto índice de diversidade e presença de habitats diferenciados, além do alto grau de endemismo. Dentre alguns trabalhos em campo rupeste destacam-se alguns estudos realizados com a família Orchidaceae (Toscano de Brito 1998; Ribeiro *et al.* 2005; Azevedo & van den Berg 2007b), tendo também estudos relacionados com variabilidade genética dentro desta família (Borba *et al.* 2001; Ribeiro 2006; Borba *et al.* 2007a; Cruz 2007) e com registros de formação de híbridos (Borba & Semir 1998; Ribeiro *et al.* 2005; Azevedo *et al.* 2006), todos registrados na Chapada Diamantina.

Estrutura populacional de plantas, bem como a sua distribuição, esforço reprodutivo, além do sucesso evolutivo e conservação trazem importantes implicações para estudos em sistemática (Tremblay 2006). Segundo Martins (1987), a estrutura populacional de uma espécie, ou seja, o conjunto de suas características genéticas e demográficas é um resultado da ação e das interações de uma série de mecanismos evolutivos e ecológicos. Na caracterização da estrutura populacional do ponto de vista ecológico, procura-se determinar a densidade populacional, a natureza das relações entre os indivíduos e os diversos fatores ambientais, e as interações existentes entre os indivíduos e as populações locais. Pritchard & Rosenberg (1999), por outro lado, indicam que uma abordagem genética e evolutiva procura quantificar a variabilidade genética e quantitativa existente entre os indivíduos, seu comportamento reprodutivo, os padrões de fluxo gênico, e as estratégias adaptativas aos ambientes locais. Além disto, sendo a estrutura populacional de uma espécie composta por número variado de populações locais, pode ser caracterizada não somente em termos da estrutura de cada população, mas também em relação às diferenças existentes entre essas populações, aos padrões de distribuição espacial, à dinâmica populacional (colonização/extinção), e às relações mútuas de natureza genética e ecológica existentes entre elas, como observado no trabalho de Tremblay *et al.* (2006).

Esses componentes estruturais da população e seus principais parâmetros que são utilizados para expressá-los podem ser definidos como: sistema de reprodução

(envolvendo o grau de sexualidade, proporção de sexos, taxa de cruzamento), o fluxo gênico intra e interespecífico (relacionando as suas taxas bem como as taxas de hibridação natural e o grau de introgressão), a variação cariotípica (relatando o número de cromossomos, a homologia, as variações numéricas e estruturais) a variabilidade genética (relatando o número de alelos/locos, porcentagem de heterozigose, freqüências genotípicas), padrão de distribuição geográfica (mostrando os tipos e variedades de habitats e comunidades), dispersão local (com padrões de distribuição espacial, densidade, freqüência, tamanho e persistência da população), componentes da história vital (conhecidos como taxas reprodutivas, taxas de mortalidade, duração de ciclo vital, esforço reprodutivo), heterogeneidade ambiental (se tratando da variação no tempo e no espaço) e plasticidade fenotípica, correlacionando as variáveis genéticas com as não genéticas (Martins 1987). Estas variáveis se inter-relacionam em diferentes graus, levando à grande diversidade de estruturas populacionais, e consequentemente às diferentes estratégias de adaptação que podem ser observadas em populações que vivem em ambientes heterogêneos (Jain & Martins 1979).

A variabilidade genética, biodiversidade molecular, além de ser importante para a evolução, pode ser usada como ferramenta de investigação por ecólogos e sistematas em diversos ramos da Ciência como, por exemplo, para verificar as afinidades e limites entre as espécies, para detectar modos de reprodução e estrutura familiar, para estimar níveis de dispersão nas populações, entre outros (Avise 1994). Os dados básicos para esse tipo de estudo são os chamados marcadores moleculares, que são biomoléculas relacionadas a algum traço genético e que apresentam alguma variabilidade relacionada ao problema a ser estudado. Essa variabilidade nos permite comparar indivíduos, populações ou até mesmo espécies diferentes (Sunnucks 2000). Os marcadores podem ser utilizados tanto para filogenias quanto para estudos populacionais, além de estudos envolvendo biologia evolutiva (Bussell *et al.* 2005).

Os marcadores moleculares podem ser proteínas (antígenos ou isoenzimas) e DNA (genes conhecidos ou fragmentos de seqüência de função desconhecida). A escolha do marcador a ser utilizado depende do problema que se quer resolver. Durante os últimos anos diferentes técnicas têm sido usadas para detectar a variação genética inter e intra-populacional através do acesso direto ao DNA, tais como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), microssatélites

(SSR – Single Sequence Repeats) e ISSR (Inter Single Sequence Repeats). Todas essas técnicas têm sido amplamente usadas em plantas vasculares e em menor grau nas briófitas (Hassel & Gunnarsson 2003).

O marcador molecular ISSR está relacionado com o SSR e a sua principal diferença está relacionada ao *primer* utilizado de forma a amplificar fragmentos entre dois microssatélites similares. A abundância de fragmentos encontrados (locos) é devida a um padrão conhecido de agrupamentos de regiões de microssatélites nos genomas. ISSR é um marcador dominante como RAPD (marcador que usa a presença ou ausência de Banda de um loco), mas com uma variabilidade extremamente elevada. Estas características indicam o ISSR como um dos melhores marcadores moleculares dispostos a investigar a variação genética entre indivíduos muito estreitamente relacionados (Djé *et al.* 2006). ISSR enfatiza diferenças entre populações estreitamente relacionadas, estimando variabilidade genética dentro da população (Nybom 2004). O marcador ISSR é baseado na amplificação de regiões entre 100-3000 pb (Guasmi *et al.* 2006). Os *primers* usados em uma reação de ISSR consistem em seqüências brevemente repetidas, di, tri ou tetranucleotídeos (ou microssatélites), com qualquer um pequeno suporte 5' ou 3' (Wolfe *et al.* 1998). Uma vantagem do ISSRs é que nenhum conhecimento da seqüência prévia é necessário, porque os *primers* são baseados em elementos repetitivos no DNA. Zietkiewicz *et al.* (1994) foram os primeiros a empregar marcadores de ISSR em seus estudos. Sendo um marcador apropriado para o estudo da variabilidade e da diversidade genética de populações bastante utilizado (Esselman *et al.* 1999; Deshpande *et al.* 2001; Kumar *et al.* 2001; Hao *et al.* 2002; Smith *et al.* 2002; Smissen *et al.* 2003; Jian *et al.* 2004; Ge *et al.* 2005 a e b; McRoberts *et al.* 2005; Sheng *et al.* 2005; Sica *et al.* 2005; Djé *et al.* 2006; Lu *et al.* 2006; Slotta & Porter 2006), em estudos relacionados com plantas cultivadas (Raina *et al.* 2001; Galván *et al.* 2003; González *et al.* 2005; Lin *et al.* 2005; Sicard *et al.* 2005; Bao *et al.* 2006), testando também a utilidade do método em populações naturais (Wolfe *et al.* 1998; Wolfe & Randle 2001), bem como em estudos envolvendo híbridos e outros processos evolutivos (Scarano *et al.* 2002; Baumel *et al.* 2003; Ruas *et al.* 2003; Abbott *et al.* 2005; Carvalho *et al.* 2005; Nkongolo *et al.* 2005; Archibald *et al.* 2006; Conceição 2006). Os marcadores ISSR têm mostrado bastante utilidade para responder questões relacionadas com hibridação e introgressão em populações naturais (Wu *et al.* 1999; García-Maroto *et al.* 2003; Masumbuko & Bryngelsson 2006).

Os híbridos são indivíduos que apresentam como parentais espécies distintas (Hartl 2000). A hibridação depende de uma série de eventos como a possibilidade de polinização cruzada, as plantas precisam estar relativamente próximas, as espécies têm que ser compatíveis para que o pólen possa germinar e os embriões resultantes devem se desenvolver em sementes viáveis (Rieseberg & Ellstrand 1993). A hibridação natural entre espécies ocorre freqüentemente em habitats perturbados e pode ser considerada como uma ameaça para espécies raras e para espécies em vias de extinção. O fluxo gênico interespecífico é considerado perigoso na conservação genética, especialmente quando as espécies vivem em simpatria, favorecendo o desaparecimento das espécies puras pela hibridação, sendo crítico em espécies raras (Cozzolino *et al.* 2006). A hibridação pode igualmente resultar de táxons alopátricos ou até simpátricos que não sejam espécies raras ou em vias de extinção, abrindo a possibilidade para uma recombinação gênica que possibilite a ocupação de outros ambientes, ou evoluir de forma diferenciada dos parentais (Rieseberg 1995). Em contrapartida, a hibridação natural pode ser considerada como fator determinante para a conservação da biodiversidade, visto que ela pode provocar a extinção de determinadas populações (Rhymer & Simberloff 1996), sendo considerada, dentre outros fatores evolutivos, como passo fundamental para uma possível especiação (Arnold *et al.* 2001). Dentre algumas formas de hibridação natural, a alloploidia é a forma mais rápida para especiação, em que há um isolamento reprodutivo devido à duplicação do genoma (Rieseberg 2000), outra forma de especiação é a homoploidia, em que não há uma mudança no número cromossômico (Arnold 1993).

A hibridação é comum em diversos grupos de plantas (Rieseberg 1995), sendo considerada de grande importância evolutiva, especialmente quando relacionada a uma modalidade rápida da evolução (Arnold 1994) ou uma maneira para aumentar rapidamente a variabilidade na espécie parental com a introgressão (Grant 1981). Os fatores principais que impedem a hibridação na família Orchidaceae são os mecanismos da pré-polinização tais como a especificidade do polinizador e barreiras fenológicas ou mecânicas, enquanto que barreiras genéticas (pós-polinização) relacionadas a espécies próximas são geralmente fracas ou ausentes (Dressler 1981). Dentre os estudos de indivíduos híbridos, a família Orchidaceae vem se destacando por alguns registros (Borba & Semir 1998; Goldman *et al.* 2004a; Azevedo *et al.* 2006; Cozzolino *et al.* 2006; Lacerda 2006).

Nem sempre a hibridação se baseia em discrepâncias topológicas entre as árvores construídas com os marcadores nucleares e plastidiais. Um táxon híbrido-derivado relativamente recente é improvável de ter alelos originais, e para marcadores parentalmente herdados os testes padrões seriam provavelmente uma combinação aditiva dos seus parentais (Goldman *et al.* 2004a). Quando táxons híbridos são identificados como férteis, espera-se que o táxon híbrido combine com seus parentais, processo conhecido como introgessão, incorporação de alelo de um táxon em outro (Abbott *et al.* 2003). Contudo, este novo indivíduo gerado proporciona uma variação na espécie parental podendo resultar em uma evolução convergente (Rieseberg 1995). Em vista desses questionamentos, os marcadores moleculares podem ser extremamente úteis em determinar se está ocorrendo uma hibridação entre duas espécies ou se está passando por um processo de introgessão com os genes de uma ou mais espécies (Abbott *et al.* 2003).

O uso de marcadores moleculares para estudos populacionais pode fornecer subsídios para a conservação (Jin *et al.* 2003), bem como detectar existência de híbridos entre espécies. Através desse tipo de análise, pode-se estimar a conservação de uma espécie, possibilitando desenvolver estratégias de conservação de áreas com populações heterogêneas nos dados moleculares, ou em áreas específicas, caso as populações sejam homogêneas (Solé-Cava 2004). Para conservar a diversidade biológica é necessário conhecer a dinâmica populacional, fazendo um amplo estudo biológico da espécie, a manutenção da diversidade genética em espécies ameaçadas tem auxiliado no manejo e planejamento de conservação (Fawk & Holsinger 1991). A avaliação da variabilidade genética e a identificação de populações isoladas de uma espécie representam uma informação importante para planejar estratégias da conservação com base em dados genéticos (Meloni *et al.* 2006).

Além de estudos moleculares, a utilização de dados morfológicos pode auxiliar na reconstrução filogenética juntamente com métodos de análise genética (Scotland *et al.* 2003). Assim, estudos morfométricos tem sido outra fonte de dados para análises populacionais. A morfometria é definida como descrição, análise e interpretação quantitativas da forma e da variação da estrutura biológica (Rohlf 1990; Monteiro & Reis 1999). As medidas de diversidade morfológica auxiliam e confirmam resultados de estudos genéticos e ecológicos, e as variáveis são tradicionalmente utilizadas em análises morfométricas. As análises são realizadas por métodos de estatística multivariada, estudo em que múltiplas medidas são analisadas

por cada indivíduo (Hair *et al.* 2005). Segundo Rencher (2002), análise multivariada consiste em uma coleção dos métodos que podem ser usados quando diversas medidas são feitas em cada indivíduo ou objeto em uma ou várias amostras, ou seja, a análise multivariada de uma forma geral refere-se a todos os métodos estatísticos que analisam simultaneamente múltiplas medidas em cada indivíduo ou objeto sob investigação (Johnson & Wichern 1998).

Assim, os estudos morfométricos utilizam variáveis contínuas e comparam populações em níveis intra e interespecíficos (van den Berg 1996), possibilitando também estudos relacionados com evolução e hibridação, aliando os dados de morfometria e outros estudos biossistêmáticos (Goldman e Orzell 2000). Contudo, apenas recentemente esses métodos começaram a ser utilizados como ferramenta, tendo destaque para alguns estudos realizados dentro da família Orchidaceae (Cardim *et al.* 2001; Carlini-Garcia *et al.* 2002; Borba *et al.* 2002; Goldman *et al.* 2004b; Ribeiro 2006; Borba *et al.* 2007a; Cruz 2007).

Visando-se analisar a variabilidade genética e morfométrica de *Cattleya pfisteri* verificando seu posicionamento taxonômico, faz-se necessário uma abordagem populacional, para se estabelecer as relações entre as populações da espécie. Além disso, na população localizada em Mucugê de *C. pfisteri*, foram encontrados recentemente supostos híbridos e indivíduos supostamente introgredidos com uma espécie de outro subgênero, *C. sincorana* (Schltr.) van den Berg, visto que muitos indivíduos de *C. pfisteri* que, à primeira vista, parecem sofrer introgressão com *C. sincorana*. Além disto, outra população localizada em Caetité, região distante geograficamente (Figura 1), apresentou características morfológicas semelhantes, com período de floração e tamanho de órgãos florais diferenciados (Figura 2), sendo necessário um estudo para verificar a hipótese desta população representar um táxon novo.

Assim, a presente dissertação é um estudo de variabilidade populacional de *Cattleya pfisteri* que fornecerá dados relevantes para o manejo e conservação da espécie, servindo como fonte de estudos comparativos sobre variabilidade genética e morfométrica, e melhorando a compreensão de aspectos taxonômicos sobre esta espécie.

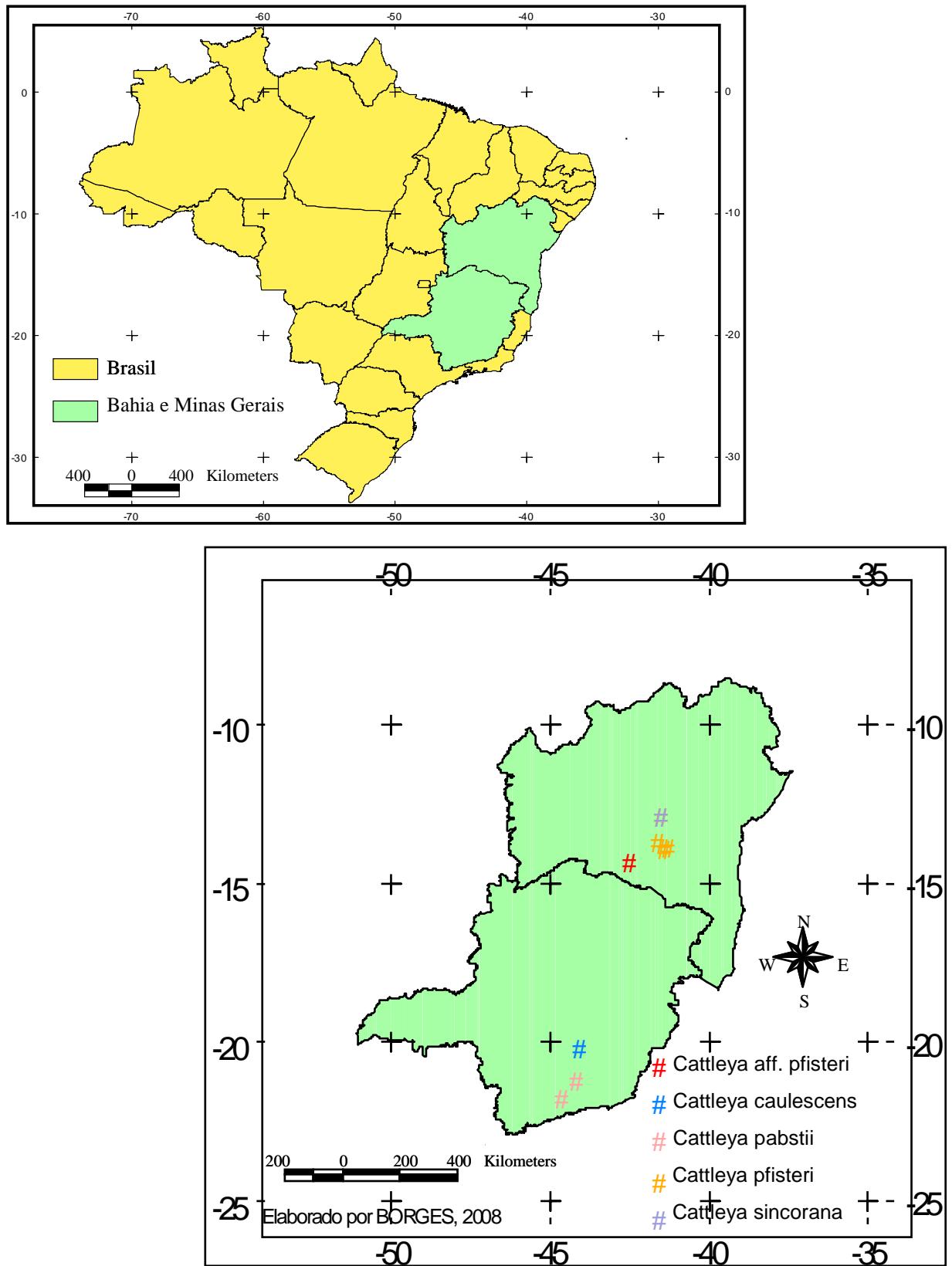


Figura 1. Mapa de distribuição das duas espécies baianas do gênero *Cattleya* relacionadas no estudo da variabilidade populacional de *Cattleya pfisteri* (Pabst & Senghas) Van Den Berg. As regiões evidenciadas são áreas de campo rupestre com altitude superior a 1000 metros.

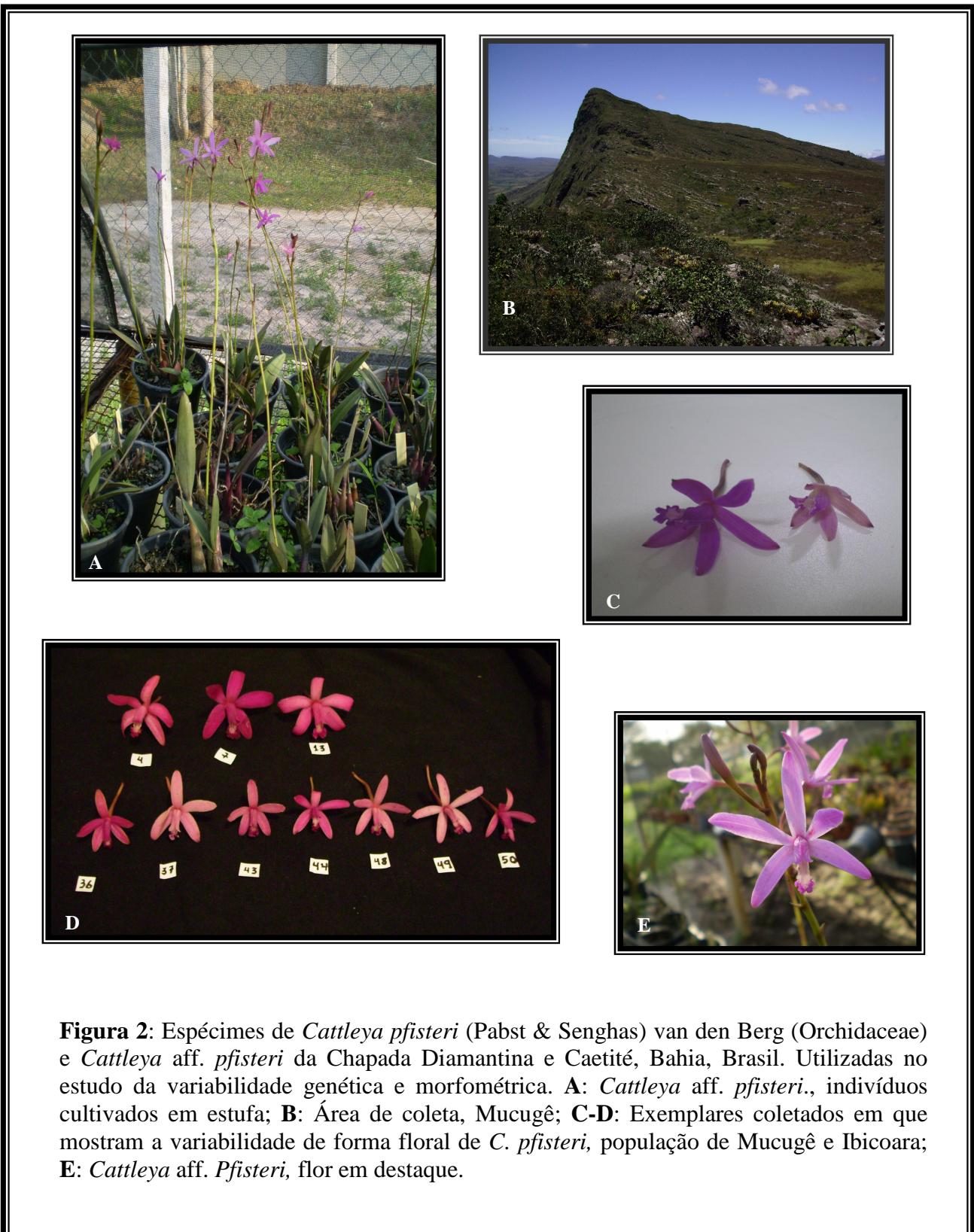


Figura 2: Espécimes de *Cattleya pfisteri* (Pabst & Senghas) van den Berg (Orchidaceae) e *Cattleya* aff. *pfisteri* da Chapada Diamantina e Caetité, Bahia, Brasil. Utilizadas no estudo da variabilidade genética e morfométrica. **A:** *Cattleya* aff. *pfisteri*., indivíduos cultivados em estufa; **B:** Área de coleta, Mucugê; **C-D:** Exemplares coletados em que mostram a variabilidade de forma floral de *C. pfisteri*, população de Mucugê e Ibicoara; **E:** *Cattleya* aff. *Pfisteri*, flor em destaque.

CAPITULO I: GENETIC VARIABILITY OF *CATTLEYA PFISTERI* (PABST & SENGHAS) VAN DEN BERG (ORCHIDACEAE) – CHAPADA DIAMANTINA, BAHIA, BRAZIL¹

J. R. Santos da Silva², C. van den Berg²

²Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil.

Abstract: *Cattleya* is a Neotropical genus with most species native to Brazil. In this study, we sampled 155 individuals in nine natural populations in the Brazilian States of Bahia, municipalities of Mucugê, Barra da Estiva, Caetité, Ibicoara and Ituaçu, and Minas Gerais, municipalities of Tiradentes, Carrancas and Ibirité, grouped into five taxa, *C. pfisteri*, *C. aff. pfisteri*, *C. caulescens*, *C. pabstii* and *C. sincorana*. The data matrix consisted of 122 dominant loci obtained from seven ISSR primers. We found low values of genetic variation in relation to a previous study with a species of orchid in a similar geographical range and ISSR studies in other plants species with similar sampling. As evidence of hybridization we found 10 *loci* shared only between one of the populations of *C. pfisteri* (Mucugê) and *C. sincorana*. These two populations occur sympatrically, indicating the existence of introgression of the latter into *C. pfisteri*. There are still 18 *loci* shared among all populations of *C. pfisteri* which allow a clear circumscription of this species in relation to the other four taxa. Bayesian analysis using the software STRUCTURE was also able to detect introgression and suggests that all *C. pfisteri* behave as a single intercrossing population. In this analysis, all other taxa emerged as independent gene pools, what also supports the description of *C. aff. pfisteri* (Caetité) as a distinctive species.

Keywords: *Cattleya pfisteri*, genetic variability, populations, introgression, Orchidaceae.

Resumo: *Cattleya* é um gênero neotropical no qual a maior parte das espécies ocorrem no Brasil. Neste estudo, foram amostrados 155 indivíduos em nove populações naturais nos estados brasileiros da Bahia, nos municípios de Mucugê,

¹A ser submetido para publicação á revista Plant Systematics and Evolution

Barra da Estiva, Caetité, Ibicoara e Ituaçu, e de Minas Gerais, municípios de Tiradentes, Carrancas e Ibirité, agrupados em cinco táxons, *C. pfisteri*, *C. aff. pfisteri*, *C. caulescens*, *C. pabstii* e *C. sincorana*. Foram coletados dados de ISSR, marcador dominante, utilizando sete *primers* que geraram 122 locos. Foram detectados baixos valores de variação genética em comparação com outros estudos utilizando ISSR. Como evidencia de hibridação, foram encontrados 10 locos compartilhados somente entre as populações de *C. pfisteri* (Mucugê) e *C. sincorana*. Estas duas populações ocorrem simpaticamente, indicando a existência de introgressão de *C. sincorana* em *C. pfisteri*. Foram detectados ainda 18 locos compartilhados entre todas as populações de *C. pfisteri* que permitem uma clara delimitação desta espécie em relação aos outros quatro táxons. Uma análise Bayesiana usando o software STRUCTURE 2.2 também detectou a existência de introgressão e separou todos os outros táxons como conjuntos gênicos independentes, indicando também a diferenciação de *C. aff. pfisteri* (Caetité) das demais populações analisadas, e sugerindo ser esta uma espécie nova.

Palavras-Chave: *Cattleya pfisteri*, variabilidade genética, populações, introgressão, Orchidaceae.

Introdução

A Chapada Diamantina é um grande centro de diversidade de orquídeas com 10 espécies exclusivas por apresentar diversos tipos de formações vegetais, e especialmente formações de campo rupestre onde a família é bastante representativa (van den Berg & Azevedo 2005; Azevedo & van den Berg 2007a). O conjunto de serras que compõe a Chapada Diamantina sugere uma descontinuidade da vegetação o que promove o endemismo, a especiação e a formação de populações disjuntas (Giulietti & Pirani 1988).

Os campos rupestres compõem a vegetação mais característica da Chapada Diamantina, caracterizada principalmente por ervas e arbustos distribuídos em mosaicos, com habitats diferenciados (Conceição & Pirani 2005). Sua formação é caracterizada por uma vegetação aberta, herbácea, solo rochoso, com muitas plantas fixadas sobre as rochas e arbustos em regiões onde o solo é rico em quartzito e gnaisse (Borba & Semir 1998; Giulietti & Pirani 1988; Borba *et al.* 2001).

Recentemente, a flora do campo rupestre vem sendo descrita e detalhada (Harley & Simmons 1986; Giulietti 1987; Stannard 1995; Conceição & Pirani 2005) mostrando seu alto índice de diversidade. Merecem destaque alguns estudos realizados em campos rupestres com a família Orchidaceae (Ribeiro *et al.* 2005; Azevedo & van den Berg 2007b), tendo também estudos relacionados com variabilidade genética dentro desta família (Borba *et al.* 2001; Ribeiro 2006; Borba *et al.* 2007; Cruz 2007) e com registros de formação de híbridos (Borba & Semir 1998; Ribeiro *et al.* 2005; Azevedo *et al.* 2006), na Chapada Diamantina.

Cattleya é um gênero Neotropical com ca. 112 espécies, a maioria ocorrendo no Brasil. É um gênero vistoso e popular de orquídeas, com inúmeros híbridos tanto naturais quanto artificiais (Withner 1988). *Cattleya* pertence à subtribo Laeliinae (tribo Epidendreae) e já foi estudado do ponto de vista molecular para resolução de aspectos filogenéticos (van den Berg *et al.* 2000; van den Berg & Chase 2004).

Cattleya pfisteri (Pabst & Senghas) van den Berg apresenta flores púrpuras, variando de 2,1 a 5,7 centímetros de diâmetro. Esta espécie está inclusa no subgênero *Parviflorae* Lindley, que apresenta de 40-50 espécies de difícil separação. Esta espécie foi descrita em 1975, como endêmica da Chapada Diamantina – BA, Brasil. É próxima de um grupo de espécies mineiras, especialmente *C. caulescens* (Lindl.) Van den Berg e *C. pabstii* (Lindl.) Van den Berg. Este grupo de espécies apresenta dentro da seção relações muito incertas, fato destacado em estudo filogenético sobre a variabilidade nas seqüências de ITS (van den Berg *et al.* 2000) e oito regiões plastidiais (van den Berg 2008).

Estudos de variabilidade genética representam um instrumento importante para a compreensão dos padrões de distribuição de espécies bem como para análise de processos evolutivos além de poderem ser usados como ferramenta de investigação por ecólogos e sistematas em diversos ramos da Ciência (Avise 1994; Borba *et al.* 2001). Para esse tipo de estudo são comumente utilizados os chamados marcadores moleculares, que são biomoléculas relacionadas a algum traço genético e que apresentam alguma variabilidade relacionada ao problema a ser estudado. Essa variabilidade nos permite comparar indivíduos, populações ou até mesmo espécies diferentes (Sunnucks 2000).

Os marcadores moleculares podem ser proteínas, DNA ou RNA. Dentre os marcadores moleculares o ISSR (Inter Single Sequence Repeats) está relacionado com o SSR (Single Sequence Repeats), cuja sua principal diferença está relacionada

ao *primer* utilizado que amplifica fragmentos entre dois microssatélites similares. ISSR destaca-se por mostrar diferenças entre populações estreitamente relacionadas (Nyblom 2004). Esse marcador é apropriado para o estudo da variabilidade genética de populações naturais devido a sua alta variabilidade no padrão de bandas (polimorfismo) a capacidade para avaliar a diversidade em populações pequenas, bem como em trabalhos já realizados para estimar a diversidade genética das populações (Deshpande *et al.* 2001; Kumar *et al.* 2001; Hao *et al.* 2002; Smith *et al.* 2002; Smissen *et al.* 2003; Jian *et al.* 2004; Sheng *et al.* 2005; Ge *et al.* 2005 a e b; McRoberts *et al.* 2005; Sica *et al.* 2005; Djé *et al.* 2006; Lu *et al.* 2006), além de estudos relacionados com plantas cultivadas (Raina *et al.* 2001; Galván *et al.* 2003; Lin *et al.* 2005; Bao *et al.* 2006) bem como em estudos envolvendo híbridos e outros processos evolutivos (Scarano *et al.* 2002; García-Maroto *et al.* 2003; Ruas *et al.* 2003; Baumel *et al.* 2003; Nkongolo *et al.* 2005; Abbott *et al.* 2005; Archibald *et al.* 2006; Conceição 2006).

A hibridação é comum em diversos grupos de plantas (Rieseberg 1995). Os híbridos são indivíduos gerados a partir de espécies distintas (Hartl 2000). A hibridação depende de uma variedade de eventos como a possibilidade de polinização cruzada, as plantas precisam estar relativamente próximas, as espécies devem apresentar uma total ou parcialmente compatibilidade, para que o pólen possa germinar e os embriões resultantes devem se desenvolver em sementes viáveis e capazes de germinar (Rieseberg & Ellstrand 1993). A hibridação natural pode ser considerada, dentre outros fatores evolutivos, como um dos passos possíveis para uma especiação (Arnold *et al.* 2001) bem como para a extinção de táxons raros ou populações (Cozzolino *et al.* 2006). Dentre os estudos de indivíduos híbridos, a família Orchidaceae merece destaque pelos diversos registros realizados (Borba & Semir 1998; Goldman *et al.* 2004; Azevedo *et al.* 2006; Cozzolino *et al.* 2006; Lacerda 2006). A hibridação pode ser considerada de grande importância evolutiva, especialmente relacionada como uma modalidade rápida da evolução (Arnold 1994) ou como uma maneira para aumentar rapidamente a variabilidade na espécie parental com a introgessão (Grant 1981, Azevedo *et al.* 2006). Introgessão pode ser interpretada como o fluxo gênico entre populações de indivíduos híbridos com uma ou ambas as espécies parentais (Rhymer & Simberloff 1996).

Assim tendo em vista a necessidade de analisar a variabilidade genética de *C. pfitzneri*, verificando também sua relação com as espécies próximas e com uma

população de *C. aff. pfisteri* do município de Caetité, morfologicamente semelhante com *C. pfisteri*, faz-se necessário uma abordagem populacional, para se estabelecer as relações intra e interpopulacionais. Além disso, em uma população de *C. pfisteri* da Chapada Diamantina, foram encontrados recentemente indivíduos morfologicamente diferenciados, considerados como prováveis híbridos ou introgredidos com *C. sincorana* (Schltr.) Van den Berg população que vive em simpatria. Nesta população é necessário um estudo para verificar o grau de introgressão nas populações naturais e verificar a hipótese alternativa de que as populações pertencentes a *C. pfisteri* da localidade de Mucugê, seja um táxon novo.

Materiais e Métodos

Área de estudo

A Chapada Diamantina ocupa aproximadamente 15% do território da Bahia e corresponde à parte baiana da Cadeia do Espinhaço, entre a bacia do Rio São Francisco e os rios Paraguaçu e Rio de Contas (Jesus *et al.* 1985). A Chapada Diamantina tem sido considerada uma região de extrema importância biológica, sendo delimitadas três unidades de conservação, destacando-se o Parque Estadual de Morro do Chapéu, a Área de Proteção Ambiental (APA) Marimbus - Iraquara e o Parque Nacional da Chapada Diamantina (Rocha *et al.* 2005).

Os campos rupestres compõem a vegetação mais característica da Chapada Diamantina (Conceição & Pirani 2005). Eles são circundados por caatinga e por cerrado, muitas vezes com estágios transicionais ou ecótonos (Conceição *et al.* 2005). São considerados importantes centros de diversidade da flora brasileira, destacando-se por apresentarem grande número de espécies endêmicas. (Harley & Simmons 1986; Giulietti & Pirani 1988). Na Bahia os campos rupestres estão predominantemente cercados por caatinga (Harley & Simmons 1986).

Algumas espécies de orquídeas são endêmicas de campo rupestre (van den Berg & Azevedo 2005; Azevedo & van den Berg 2007b), como é o caso da *Cattleya pfisteri*. Atualmente, poucos registros podem ser catalogados dentro dessa espécie, apesar de se apresentar distribuída nas proximidades de Mucugê e Rio de Contas, região cercada de serras (serra do Sincorá, a Serra do Rio de Contas e o Pico das Almas), além de alguns registros antigos nas proximidades de Palmeiras e Barra de Estiva.

As populações das espécies *Cattleya pfisteri* foram encontradas nos municípios de Mucugê, Barra da Estiva, Ibicoara, Ituaçu. Em todos os municípios coletados a vegetação característica encontrada foi o campo rupestre. No município de Mucugê além do Parque Municipal de Mucugê, está localizada a 50km da saída sul da cidade, conhecido com o Morro do Guiné, onde se pode encontrar a *C. sincorana* vivendo em simpatria com a *C. pfisteri*. O material “tipo” da espécie foi originalmente coletado em Barra da Estiva, no “Morro da Antena” onde a área já está bastante degradada. As demais localidades onde se encontraram as espécies foram estradas próximas às cidades onde a vegetação de campo rupestre ainda se mostrava bastante característica. As espécies de Minas Gerais, *C. pabstii* e *C. caulescens* ocorrem em regiões de campos rupestres quartzíticos na formação São João Del Rey (*C. pabstii*), ou sobre canga de minério de Ferro, na região do Quadrilátero Ferrífero (*C. caulescens*).

Populações amostradas

Foram coletados 155 indivíduos de nove populações naturais distribuídas nos estados da Bahia, municípios de Mucugê, Barra da Estiva, Caetité, Ibicoara e Ituaçu, e de Minas Gerais, municípios de Tiradentes, Carrancas e Ibirité, agrupadas inicialmente em cinco táxons: *Cattleya pfisteri*, *C. pabstii*, *C. caulescens*, *C. sincorana* e *C. aff. pfisteri* (Tabela 1). Sendo que a *C. sincorana*, mesmo pertencendo à seção *Hadrolaelia*, foi incluída no estudo devido à provável ocorrência de hibridação com *C. pfisteri*. *C. aff. pfisteri* apresenta semelhanças morfológicas com a *C. pfisteri*, contudo por estar distante geograficamente e apresentar um padrão de tamanho diferenciado, faz-se necessário a inclusão desta população neste estudo para melhor definição taxonômica. Foram retirados indivíduos distantes entre si para evitar clones, coletados em diferentes moitas, ramos vegetativos, pois essas plantas formam grandes grupos e possuem vida longa. Desta forma, um único indivíduo pode formar um grande *genet* constituído por vários *ramets* sobre a rocha.

Foram amostrados, em média, 17 indivíduos de cada população, com amostras de 12 e outras de 34 indivíduos. Das populações de *C. pfisteri* foi coletado um material testemunho (*voucher*) que foi depositado no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) para a identificação de cada amostra. As espécies mineiras foram coletadas fora do período de floração.

ISSR

Pedaços da folha ou partes florais foram coletados em gel de CTAB (35% NaCl e 3% CTAB) para a extração do DNA utilizando o protocolo CTAB de Doyle & Doyle (1987). O DNA extraído foi quantificado através de eletroforese em gel de agarose a 1% com tampão borato de sódio (SB) (Brody & Kern 2004) corado com brometo de etídio na presença do marcador *Lambda Hind III* e posteriormente fotografado e quantificado com o sistema da Kodak EDAS 1D 3.6.

O DNA genômico total foi utilizado para a amplificação através da reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) seguindo o protocolo modificado de Wolfe *et al.* (1998). A amplificação de todos os fragmentos foi realizada em um volume total de 19 µl contendo, 1,9µl de solução tampão 10x, 3mM de MgCl₂, 0,2mM de DNTPs, 0,4mM de *primer*, 0,38mM de *taq* DNA polymerase (PhNeutria), 1,0µl de DNA genômico (diluído 1:10) e 12,084µl de água destilada para os *primers* (Tabela 2) UBC 898, UBC 899, JOHN, MAO, MANNY e OMAR, já o *primer* AW3 teve a amplificação de todos os fragmentos foi feita em um volume total de 19µl contendo 1,9µl de solução tampão 10x, 2mM de MgCl₂, 0,2mM de DNTPs, 0,4mM de *primer*, 0,38mM de *taq* DNA polymerase (Phoneutria, Belo Horizonte), 1,0µl de DNA genômico (diluído 1:10) e 12,424µl de água destilada. As amplificações foram realizadas em termociclador Perkin Elmer GeneAmp 9700.

Foram testados 20 *primers* diferentes para verificar a amplificação do ISSR por PCR sendo que sete destes (UBC 898, UBC 899, JOHN, MAO, MANNY, OMAR e AW3) obtiveram bons padrões eletroforéticos para a análise. A amplificação dos fragmentos iniciou com um ciclo de desnaturação de inicial de 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de amplificação com desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 45°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos, após os ciclos tem mais duas variações acrescentadas à primeira de 94°C e a segunda de 44°C ambas por 45 segundos, seguidas de uma extensão final a 72°C por 7 minutos, realizando assim a amplificação dos 155 indivíduos do estudo. Os produtos da reação de PCR foram separados e visualizados através de um gel de agarose 1,5% em tampão SB 1x, utilizando 6µl de brometo de etídio na presença do marcador *ladder* de 100 pares de bases, as bandas foram visualizadas em transluminador UV (Spectroline) e documentadas em Kodak 1D 3.6 (Figura 3).

O tamanho dos fragmentos (bandas) foi utilizado para designar os locos em cada *primer*. Os locos foram tratados como dialélicos (1 = banda presente; 0 = banda ausente). Foi criada uma matriz binária a partir dos dados obtidos em cada loco. A variação genética dentro e entre populações foi analisada através dos estimadores dos parâmetros: número médio de alelos (Na), número de alelos exclusivos, percentual de locos polimórficos (P), diversidade gênica de Nei (1973) - Heterozigosidade dentro da população (Hs), diversidade entre populações (G_{ST}), mensurando a diferenciação das populações (Culley *et al.* 2002) a estruturação genética, (F_{ST}), para fins de análise populacional genética e sua conservação (Pearse & Crandall 2004), sendo os dois últimos de grande importância para avaliar a estrutura populacional, o modelo de ilhas (Takahata & Nei 1984), utilizando o GENALEX 6 (Peakall & Smouse, 2006)..

O fluxo gênico (Nm) e Distância genética de Nei (1978) foram estimados através do software POPGENE (Yeh & Boyle 1997) e o GENALEX 6 (Peakall & Smouse, 2006), sendo o G_{ST} estimado somente pelo POPGENE (Yeh & Boyle 1997). Esse fluxo gênico foi corrigido indiretamente através da fórmula $Nm = 0.5 (1 - G_{ST}) / G_{ST}$ (McDermott & McDonald, 1993 *apud* Brandão 2008), pelo fato de que o ISSR é um marcador dominante. A Distância genética de Nei (1978) e a estruturação genética, (F_{ST}), par a par foram estimadas através do AFLP-SURV 1.0 (Vekemans *et al.* 2002). O software AFLP-SURV é indicado para estimar a diversidade e a estrutura genética de populações para marcadores moleculares e calcular a matriz de distância genética entre populações. O programa começa por estimar freqüências alélicas em cada marcador para cada loco admitindo ser dominante e ter apenas dois alelos (um alelo dominante marcador codifica para a presença de uma banda em uma determinada posição, e um alelo recessivo nulo codifica para a ausência da banda) (Vekemans *et al.* 2002). Além disso, o programa permite utilizar o método Bayesiano que calcula a distribuição de freqüências do alelo com base na variação ao longo das freqüências de fragmentos na amostra, para isto admite-se que as populações estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quando se trata de diversas populações, a distribuição do alelo e freqüências é calculada separadamente para cada população. Este método é o mais genérico sendo um processo computacionalmente bastante intenso, de modo que o seu uso em testes ou permutação adicionado a índices de suporte, *bootstraps*, possibilita uma precisão dos resultados (Vekemans *et al.* 2002). A partir das distâncias obtidas, foram realizadas

análises de agrupamentos pelos algoritmos UPGMA e Neighbor-Joining, utilizando os softwares NEIGHBOR e CONSENSE do pacote PHYLIP (Felsenstein 2007).

Além disso, foram realizadas uma Análise de Coordenadas Principais (PCO) e uma Análise Molecular de Variância (AMOVA) conduzida através do GENALEX 6 (Peakall & Smouse, 2006). Para todas as análises foram conduzidos quatro tipos de delineamentos amostrais, sendo o primeiro com todas as populações do estudo, o segundo sem as populações que possivelmente sofrem introgessão, pois as amostras que estão em possível introgessão (*C. pfisteri* e *C. sincorana*) e podem alterar as relações entre as espécies, o terceiro somente com as populações de *C. pfisteri* e *C. sincorana*, para verificar justamente o grau de introgessão e sua existência, e o quarto tipo somente com as populações de *C. pfisteri*. A Análise Molecular de Variância (AMOVA) produz estimativas análogas às estatísticas F, que refletem a correlação de diversidade de haplótipos nos diferentes níveis de subdivisão hierárquicos. O método é flexível e suficiente para acomodar a entrada de matrizes em diversas alternativas, correspondendo a diferentes tipos de dados moleculares e pressupostos evolutivos, sem modificar a estrutura básica da análise (Excoffier *et al.* 1992). Além da Análise Molecular de Variância (AMOVA) o GENALEX 6 (Peakall & Smouse 2006) permite verificar o compartilhamento de locos entre pares de populações, e foi utilizada para quantificar o número de locos compartilhados entre a população de *C. pfisteri* (PF-MU) e *C. sincorana*, que ocorrem em simpatria.

Além disso, foi utilizado o software STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000) para verificar a relação entre as populações obtendo a representação da estrutura genética das populações amostradas. Além disso, este software avalia o número real de populações através da homogeneidade destas (cálculo do Delta K) com a finalidade de identificar os grupos populacionais e as relações entre as populações. O STRUCTURE 2.2 permite diferenciar tais grupos populacionais de forma independente (Evanno *et al.* 2005). O resultado da análise é fornecido na forma de gráfico representado por cores onde cada cor marca a estruturação genética da população e define as suas relações com as demais populações.

Resultados

Os sete *primers* utilizados geraram 122 locos com boa resolução (Tabela 2), bandas com pouca intensidade e de difícil identificação foram excluídas da análise. O tamanho dos fragmentos variou de 150 a 1600 pares de bases (pb), aproximadamente. O número de bandas geradas por *primer* variou de 15 a 20 com uma média de 17,4 bandas por *primer* (Figura 3).

Nenhuma das populações de *C. pfisteri* apresentou bandas exclusivas, enquanto que as demais populações apresentaram pelo menos uma. A população que apresentou o maior número de bandas exclusivas foi a população de *C. caulescens*, que apresentou 3 bandas exclusivas. A proporção de locos polimórficos variou de 27,05% (PF-IB) a 59,84% (PF-MU), ambas as populações de *C. pfisteri*. A população de Carrancas de *C. pabstii* apresentou o maior média de heterozigosidade esperada (0,215) seguido pela população de *C. pfisteri* (PF-MU) com 0,201, sendo que a menor média encontrada na população de *C. pfisteri* (PF-IB) (0,093) (Tabela 3).

Na análise de coordenadas principais (PCO), em uma primeira análise com todas as populações do estudo obtiveram-se os três primeiros eixos correspondendo a 77,4% da variância observada, sendo que o primeiro eixo explica 37,87% dessa variância separando a *C. pfisteri* e *C. sincorana* das demais espécies. O segundo eixo explica 24,56% da variância separando a *C. pfisteri* da *C. sincorana*, além de separar as *Cattleya* aff. *pfisteri* e *C. pabstii* de *C. caulescens* (Figura 4B). O segundo tipo de análise foi realizado entre sete populações das espécies de *C. pfisteri*, *Cattleya* aff. *pfisteri*, *C. caulescens* e *C. pabstii*, retirando, como mencionado, as populações de *C. sincorana* e *C. pfisteri* (PF-MU), populações com possível introgressão. Nesta análise os três primeiros eixos corresponderam a 80,22% de variância, sendo que o primeiro eixo explica 41,6% dessa variância separando *C. pfisteri* das demais espécies, o segundo eixo explica 25,16% da variância separando as *Cattleya* aff. *pfisteri* e *C. pabstii* de *C. caulescens*. No terceiro tipo de análise foram incluídas somente cinco populações de *C. pfisteri* e *C. sincorana* cujos três primeiros eixos corresponderam a 94,49% da variância observada, onde o primeiro eixo explica 62,94% desta variância separando a *C. pfisteri* da *C. sincorana*, e o segundo eixo explica 18,86% separando dentro de *Cattleya pfisteri* as populações de Ituaçu (PF-IT) e Ibicoara (PF-IB) das populações de Mucugê (PF-MU) e Barra da Estiva (PF-BR), mostrando também a

população de Mucugê (PF-MU) como a mais próxima das populações de *C. pfisteri* da população de *C. sincorana*, com a qual vive simpatricamente (Figura 4A).

Na análise de agrupamento usando o algoritmo de UPGMA, realizados com a distância genética de Nei (1978) com todas as populações em estudo, as populações de *C. pfisteri* encontram-se agrupados com 100% de suporte sendo que dentro deste as populações das localidades de Mucugê(PF-MU) e Barra da Estiva(PF-BR) apresentaram 84% de suporte, considerando-se populações próximas. Outro grupo foi formado com *C. aff. pfisteri*, *C. caulescens* e *C. pabstii* com 71% de suporte sendo *C. aff. Pfisteri*(PF-CA) mais próxima de *C. pabstii* com 52% de suporte (Figura 5B). Os resultados encontrados na análise de agrupamento usando o algoritmo de UPGMA gerados pelo *Fst* par a par, para todas as populações em estudo, foram semelhantes ao resultado obtido na Distância genética de Nei (1978) mudando *C. caulescens* (CA-IB) que apresenta maior proximidade com as populações de *C. pabstii*, porém com 45% de suporte adicionado a *C. aff. pfisteri* com 70% de suporte. Um destaque para as populações de *C. pfisteri* agrupados com 99% de suporte sendo que dentro deste as populações das localidades de Mucugê(PF-MU) e Barra da Estiva(PF-BR) apresentaram 91% de suporte, considerando-se populações próximas.(Figura 5A), separando mais uma vez as populações de *C. pfisteri* das demais populações em estudo.

O STRUCTURE 2.2 (Figura 6) detectou através do cálculo do Delta K que o número de populações geneticamente estruturadas é igual a sete, sendo sete *pools* gênicos diferenciados, ao invés de nove, indicando uma estruturação gênica similar de algumas populações, especialmente todas as *C. pfisteri* representadas pelos números 1 a 4 no gráfico, localidades de Mucugê (PF-MU), Barra da Estiva (PF-BR), Ibicoara (PF-IB) e Ituaçu (PF-IT), que foram representadas pela mesma coloração. A população de número 1, *C. pfisteri* de Mucugê (PF-MU) apesar de apresentar um padrão de coloração misto, apresentando influencia de outras populações em especial a *C. sincorana* (SI-MU), população 5 no gráfico, indicando uma introgressão entre essas duas espécies nessa localidade de Mucugê. As demais populações amostradas, *C. aff. pfisteri* (PF-CA), população 6, *C. pabstii* das localidades de Tiradentes (PA-TI) e Carrancas (PA-CA) populações 7 e 8, respectivamente e *C. caulescens* (CA-IB), população 9, apresentaram uma estruturação gênica específica, independente, com padrão de coloração diferenciados.

O primeiro tipo de Análise Molecular de Variância (AMOVA) realizado envolve todas as nove populações do estudo dentro de suas espécies. Neste estudo foi encontrado uma variação entre as espécies de 41%, dentro das populações de 39% e entre as populações por espécies de 20%. O valor da estruturação genética (G_{ST}) calculada pelo POPGENE foi de 0,5852 enquanto que o fluxo gênico (Nm) estimado a partir dessa estruturação foi de 0,3544. Em uma segunda análise, somente com as sete populações de *C. pfisteri*, *C. aff. pfisteri*, *C. caulescens* e *C. pabstii*, retirando aquelas que vivem em simpatria na localidade de Mucugê, a *C. pfisteri* e *C. sincorana*, a variação encontrada entre as espécies foi de 39%, dentro das populações de 36% e entre as populações por espécies de 25%. Neste, O valor da estruturação genética (G_{ST}) calculada pelo POPGENE foi de 0,5272 enquanto que o fluxo gênico (Nm) estimado a partir dessa estruturação foi de 0,4484. No terceiro tipo de análise foram utilizadas somente as populações de *C. pfisteri*, e *C. sincorana*, a variação encontrada entre as espécies foi de 40%, sendo 41% dentro das populações e 19% entre as populações por espécies. O valor da estruturação genética (G_{ST}) calculada pelo POPGENE foi de 0,393 enquanto que o fluxo gênico (Nm) estimado a partir dessa estruturação foi de 0,7721. Fazendo uma análise somente das populações de *C. pfisteri*, a variação encontrada entre essas populações foi de 32%, sendo que 68% estavam dentro das populações. O valor da estruturação genética (G_{ST}) calculada pelo POPGENE foi de 0,3256 enquanto que o fluxo gênico (Nm) estimado a partir dessa estruturação foi de 1,0355. Resultados na Tabela 4.

Analisando os locos compartilhados de cada população pode-se verificar uma relação de hibridação e/ou introgressão entre uma população de *C. pfisteri* (PF-MU) e a população de *C. sincorana* (SI-MU), populações que ocorrem em simpatria, apresentando 10 locos compartilhados entre elas. Verificaram-se também nesses resultados que existem 18 locos compartilhados somente entre as populações de *C. pfisteri*.

Discussão

Pode-se considerar que o estudo é um dos poucos a abordar a variabilidade genética de populações nativas de Orchidaceae sendo um dos primeiros a estudar a variabilidade de uma espécie endêmica e de distribuição restrita na Chapada

Diamantina. As populações de *Cattleya pfisteri* apresentaram um percentual de locos polimórfico mais baixo que o resultado obtido em estudo semelhante realizado com *C. elongata* Barb.Rodr. (Cruz 2007). Os valores encontrados por Cruz (2007) variavam entre 35% a 62% enquanto os resultados do presente estudo com *C. pfisteri* variam de 27% a 59%. Os dois trabalhos foram realizados em uma mesma região, sendo que *C. elongata* tem uma ampla distribuição na Chapada Diamantina, em regiões próximas e com um tamanho amostral bastante amplo, justificando o fluxo gênico mais alto encontrado (1,2 aproximadamente). As populações de *C. pfisteri* apresentam uma distribuição mais restrita e disjunta além de um número reduzido de indivíduos nas populações. Essa diferença explica os resultados encontrados na repartição da variabilidade genética estimada através da Análise Molecular de Variância (AMOVA), em que *C. elongata* apresentou uma variância de 82% dentro das populações e 18% entre as populações enquanto a variação das populações de *C. pfisteri* foi de 68% dentro das populações contra 32% entre as populações. Isto pode ser explicado pela ausência de bandas exclusivas em cada população, sendo as populações de *C. pfisteri* mais estruturadas geneticamente que *C. elongata*. Em ambos os trabalhos realizados a estruturação gênica G_{ST} pode ser considerada alta e os valores próximos, sendo 0,32 o resultado obtido neste estudo e 0,29 para *C. elongata*. O resultado da AMOVA obtido também foi inferior ao resultado detectado com *Tipularia discolor* (Pursh) Nutt. (Smith *et al.* 2002), um dos trabalhos pioneiros com a família Orchidaceae analisando a variabilidade com ISSR.

O índice de bandas polimórficas nas populações de *C. pfisteri* (média de 36%) se enquadra como moderado (média de locos polimórficos entre 30% a 40%) quando comparado a outros resultados com ISSR. Sendo ele inferior ao resultado detectado com Asparagaceae (48%) (Sica *et al.* 2005) e Sterculiaceae (46%) (Jian *et al.* 2004), superior ao encontrado na família Taxaceae (21%) (Ge *et al.* 2005b) e em Amaranthaceae (22%) (Sheng *et al.* 2005).

Os menores índices de variabilidade genética foram registrados para as populações de *C. pfisteri* de Ibicoara (PF-IB) e Ituaçu (PF-IT) e a população que apresentou maiores índices de variabilidade genética foi de *C. pfisteri* de Mucugê (PF-MU). As populações de Ituaçu, Ibicoara e Barra da Estiva foram encontradas próximas a estradas de terra, em áreas degradadas e de fácil exploração, fator que pode ter reduzido a variabilidade genética, facilitando a atuação de uma deriva genética devido a uma possível redução no tamanho populacional (Tremblay &

Ackerman 2001; Ribeiro 2006; Cruz 2007). Entretanto, é válido ressaltar que *C. pfisteri* está distribuída em populações disjuntas devido à descontinuidade dos afloramentos rochosos na Chapada Diamantina, resultado que confronta o alto fluxo gênico detectado (Tabela 4). Contudo, fazendo uma observação à representação gráfica da estruturação genética (Figura 6) que mostra as populações de *C. pfisteri* apresentam um único conjunto gênico, indicando um *pool* gênico semelhante, ressaltando a possibilidade de uma colonização recente, e, neste caso, tendo uma baixa diversidade genética devido a seus fundadores (efeito fundador). Não pode ser descartada também a possibilidade de endogamia nessas populações. A possibilidade de endogamia, processo de cruzamento entre plantas com certo grau de parentesco é aceitável quando se adiciona a ela o efeito do fundador. Isto é bem plausível, considerando que as populações de *C. pfisteri* das localidades de Ibicoara, Ituaçu e Barra da Estiva consistiram de populações bem pequenas (foram amostrados todos os indivíduos que se puderam localizar nestes locais).

A população de *C. pfisteri* de Mucugê apresentou o maior percentual de locos polimórficos encontrada dentre as populações de *C. pfisteri*. Esta população apresentava uma ampla distribuição numa área conservada e de difícil acesso o que possivelmente pode ter possibilitado esse alto índice de variabilidade encontrado, além de se apresentar distante geograficamente das demais *C. pfisteri*. Outro fator que podem ter provocado essa alta diversidade está relacionado com a hibridação da espécie *C. pfisteri* com a *C. sincorana*. Neste estudo pode-se verificar a presença de 10 locos compartilhados entre essas populações, valendo ressaltar que *C. sincorana*, apesar de ser do mesmo gênero, está classificada em outra secção (*Hadrolaelia*). Silva-Pereira *et al.* (2007) encontraram o mesmo polinizador para *C. pfisteri* e *C. sincorana*. Entretanto, existe, segundo os autores, uma incompatibilidade reprodutiva unilateral e diferenças morfológicas no tamanho das partes florais, que dificultariam uma polinização natural entre as duas espécies. Os resultados obtidos através de ISSR demonstraram que há um fluxo gênico entre essas espécies, evidenciado pela presença desses 10 locos compartilhados somente entre essas espécies. A população de Mucugê de *C. pfisteri* foi descrita como uma nova espécie, *Hoffmannseggella diamantinensis* V.P.Castro & Marçal (2006), com base no maior tamanho dos seus órgãos florais em relação às demais populações de *C. pfisteri*. Apesar desta diferença, a população de Mucugê apresenta 18 locos compartilhados com todas as outras populações de *C. pfisteri*, resultado que pode ser simbolizado pelo alto fluxo

gênico. Esse padrão também foi observado nesse estudo através da Análise de Coordenadas Principais (PCO), que agrupa todas as populações de *C. pfisteri* (Figura 4A) e na análise do STRUCTURE (Figura 7). Nesta última, foi detectado um único conjunto gênico para *C. pfisteri* (populações 1 a 4 no gráfico), porém alguns indivíduos da população 1 apresentam visível introgressão de *C. sincorana* (população 5 do gráfico). Os marcadores de ISSR tem sido uma ótima ferramenta para detecção de introgressão, como em alguns trabalhos em diversas famílias como Rubiaceae (Ruas *et al.* 2003), Pinaceae (Nkongolo *et al.* 2005) e Asteraceae (Abbott *et al.* 2003), dentre outros, e foram eficientes em detectar com grande precisão o fenômeno nas populações em estudo no presente trabalho.

Analizando as populações de *C. pfisteri* com as espécies próximas *C. caulescens*, *C. aff. pfisteri* e *C. pabstii* obteve uma variação entre as espécies de 39%, uma variação dentro das populações de 36% e uma variação entre as populações por espécies de 25%. Isso pode ser explicado pelo fato dessas espécies, apesar de apresentarem uma semelhança morfológica, proximidade genética. Esse evento pode estar acontecendo com a população de *C. aff. pfisteri* (PF-CA) que geneticamente apresenta-se diferenciada das *C. pfisteri* ora agrupada com as populações de *C. pabstii* (Figura 5B), resultado obtido através da Distância genética de Nei (1978), ora agrupada com as espécies de Minas Gerais, *C. caulescens* e *C. pabstii*, (Figura 5A), resultado obtido através do índice de F_{ST} par a par, estando sempre relacionada com as espécies mineiras. Isto indica que essa população de Caetité, por se localizar distante geograficamente de todas essas outras espécies, pode estar passando por um processo de especiação, e uma consequente formação de espécie nova. Essa diferenciação pode ser causada pelo *pool* gênico dos seus fundadores e pela deriva genética aleatória em função do tamanho populacional (Tremblay & Ackerman 2001).

Quando se compara os resultados obtidos na análise envolvendo todas as populações amostradas no estudo com os dados obtidos através da análise das sete populações de *C. pfisteri*, *C. aff. pfisteri*, *C. caulescens* e *C. pabstii*, retirando aquelas que vivem em simpatria na localidade de Mucugê, a *C. pfisteri* e *C. sincorana*, verificou-se que ao reduzir o número de espécies a variação entre as populações por espécies ampliou de 20% para 25%, comprovando o quanto as populações que viviam em simpatria influenciaram no resultado, devido a diferenciação elevada de *C. sincorana*. Comparando o resultado obtido com o

trabalho realizado por Meloni *et al.* (2006) realizado com *Juniperus phoenicea* pode-se verificar uma grande variação dentro das populações, 76%, e uma reduzida variação entre as populações, 7%. Segundo os autores essa maior variabilidade dentro das populações é decorrente das barreiras geográficas, diferente do realizado neste trabalho em que a variação dentro das populações é próxima da variação encontrada entre as espécies. Tomando como base somente as populações de *C. pfisteri*, e *C. sincorana* a variação encontrada entre as espécies foi de 40%, uma variação dentro das populações de 41% e uma variação entre as populações por espécies de 19%. Este resultado indica que a população de *C. sincorana* influenciou muito nos resultados visto que ela pertence a outra secção. Visto que quando se analisa somente as *C. pfisteri* a variação dentro das populações torna-se muito mais elevada que entre as populações.

Os dados apóiam a descrição de *C. aff. pfisteri* como uma nova espécie, com base nos dados genéticos, especialmente no PCO e Analise gerada pelo STRUCTURE. Dados do campo também mostram que esta população floresce cerca de um mês antes das populações de *C. pfisteri*, e este padrão foi mantido sob cultivo nas mesmas condições que as populações de *C. pfisteri*. Isso indica um mecanismo de isolamento reprodutivo temporal adicional. A posição geográfica dessa população, município de Caetité, mais estreitamente relacionada com as espécies de Minas Gerais, também pode proporcionar uma melhor compreensão dos padrões biogeográficos de populações de orquídeas e plantas nos campos rupestres da cadeia do Espinhaço. Uma clara divisão entre as duas partes da Cadeia do Espinhaço (Bahia e Minas Gerais) surgiram a partir de vários trabalhos utilizando dados genéticos (com orquídeas, Borba *et al.* 2001 e Ribeiro *et al.* 2008), e até mesmo de análise florística de espécies de orquídeas em diferentes áreas (Azevedo e van den Berg 2007a). Estes trabalhos, no entanto, não se analisaram as populações das cadeias montanhosas no sudoeste da Bahia, ao sul de Caetité, local de coleta de *C. aff. pfisteri*. Nossos dados genéticos sugerem uma relação mais estreita desta área com as áreas em Minas Gerais do que a Chapada Diamantina, na Bahia.

A introgessão de *C. sincorana* encontrada na população de Mucugê de *C. pfisteri* deve ser analisada com mais cuidado, visto que esta hibridação causou uma diferenciação genética, e no futuro poderia se transformar em uma variedade ou até uma espécie nova. Assim, faz-se necessário a conservação de uma das populações de *C. pfisteri*, dentre as de Ibicoara, Ituaçu e Barra da Estiva, visto que elas apresentam

uma composição genética semelhante. Por ser uma região de vilas e distritos, seria melhor a conservação de amostras em jardins botânicos e a criação de um banco de sementes para que possa ser preservado esse conjunto gênico.

Referências Bibliográficas

- Abbott R.A., James J.K., Milne R.I., Gillies A.C.M. (2003) Plant introductions, hybridization and gene flow. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1123–1132.
- Abbott R.J., Ireland H.E., Joseph L., Davies M.S., Rogers H.J. (2005) Recent plant speciation in Britain and Ireland: origins, establishment and evolution of four new hybrid species. *Biol. and Envir.* 105b:173-183.
- Archibald J.K., Mort M.E., Crawford D.J., Santos-Guerra A. (2006) Evolutionary relationships within recently radiated taxa: comments on methodology and analysis of inter-simple sequence repeat data and other hypervariable, dominant markers. *Taxon* 55: 747–756.
- Arnold M.L. (1994) Natural hybridization and Louisiana irises: defining a major factor in plant evolution. *BioScience* 44:141-147
- Arnold M.L., Kentner E.K., Johnston J.A., Cornman S., Bouck A.C. (2001) Natural hybridization and fitness. *Taxon* 50:281-292.
- Avise J.C. (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution. London: Chapman & Hall. pp. 511.
- Azevedo C.O., Borba E.L., van den Berg C. (2006) Evidence of natural hybridization and introgression in *Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & Barros and *B. weddellii* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil, by using allozyme markers. *Rev. Brasil. Bot.* 29: 415-421.
- Azevedo C.O., van den Berg C. (2007a) Análise comparativa de áreas do campo rupestre da cadeia do Espinhaço (Bahia e Minas Gerais, Brasil) baseadas em espécies de orchidaceae. *Sitientibus ser. Ciênc. Biol.* 7: 199-210.
- Azevedo C.O., van den Berg C. (2007b) A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. *Hoehnea* 34: 1-47.
- Bao J., Corke H., Sun M. (2006) Analysis of genetic diversity and relationships in waxy rice (*Oryza sativa* L.) using AFLP and ISSR markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 53: 323–330.

- Baumel A., Ainouche M.L., Misset M.T., Gourret J-P., Bayer R.J. (2003) Genetic evidence for hybridization between the native *Spartina maritima* and the introduced *Spartina alterniflora* (Poaceae) in South-West France: *Spartina x neyrautii* re-examined. *Plant Syst. Evol.* 237: 87-97.
- Borba E.L., Semir J. (1998) *Bulbophyllum x cipoense* (Orchidaceae), a new natural hybrid from the Brazilian “campos rupestres”: description and biology. *Lindleyana* 13: 113-120.
- Borba E.L., Felix J.M., Solberini V.N., Semir J. (2001) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *Amer. J. Bot.* 88: 419-428.
- Borba E.L., Funch R.R., Ribeiro P.L., Smidt E.C., Silva-Pereira V. (2007) Demografia, variabilidade genética e morfológica e conservação de *Cattleya tenuis* (Orchidaceae), espécie ameaçada de extinção da Chapada Diamantina. *Sitientibus Ser. Ciênc. Biol.* 7: 211-222.
- Brandão, M.M. (2008) Diversidade Genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistemas corredor-fragmento semideciduais no sul de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado pela Universidade Federal de Lavras – UFLA 88p.
- Brody J.R., Kern S.E. (2004) Sodium boric acid: a tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36: 2-4.
- Castro V.P., Marçal S. (2006) *Hoffmannseggella diamantinensis* Castro & Marçal, une espèce nouvelle. *Richardiana*. 6: 113-117.
- Conceição A.A., Pirani J.R. (2005) Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: substratos, composição florística e aspectos estruturais. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 23: 85-111.
- Conceição A.A., Rapini A., Pirani J.R., Giulietti, A.M., Harley R.M., Silva T.R.S., Santos A.K.A., Correia C., Andrade I.M., Costa J.A.S., Souza L.R.S., Andrade M.J.G., Funch R.P., Freitas T.A., Freitas A.M.M., Oliveira A.A. (2005) Campos Rupestres In: Juncá F.A., Funch L., & Rocha W. (org.) *Biodiversidade e conservação da Chapada Diamantina*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. Cap. 06. 153-180.
- Conceição A.S. (2006) Filogenia do gênero *Chamaecrista* (Leguminosae-Cesalpinioidae) e taxonomia do grupo *Baseophyllum*. Tese de doutorado pela Universidade Estadual de Feira de Santana. pp 204.

- Cozzolino S., Nardella A.M., Impagliazzo S., Wildmer A., Lexer C. (2006) Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: Should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biol. Cons.* 129: 14-23.
- Cruz D.T. (2007) Variabilidade genética e morfológica de populações de *Cattleya elongata* Barb.Rodr. (Orchidaceae) na Chapada Diamantina, Bahia. Universidade Estadual de Feira de Santana, M.Sc. Disertação. pp.61.
- Culley T.M., Wallace L.E., Gengler-Nowak K.M., Crawford D.J. (2002) A comparison of two methods of calculating *Gst*, a genetic measure of population differentiation. *Amer. J. Bot.* 89: 460–465.
- Deshpande A.U., Apte G.S., Bahulikar R.A., Lagu M.D., Kulkarni B.G., Suresh H.S., Singh N.P., Rao M.K.V., Gupta V.S., Pant A., Ranjekar P.K. (2001) Genetic diversity across natural populations of three montane plant species from the Western Ghats, India revealed by intersimple sequence repeats. *Mol. Ecol.* 10:2397–2408.
- Djé Y., Tahi G.C., Zoro Bi I.A., Malice M., Boudoin J.P., Bertin P. (2006) Optimization of ISSR marker for African edible-seeded *Cucurbitaceae* species' genetic diversity analysis. *African J. of Biotechnology* 5 : 83-87.
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.* 19: 11-15.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611–2620.
- Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Felsenstein J. (2007) PHYLIP: Phylogeny Inference Package. Version 3.67. http://www.umamitoba.ca/afs/plant_science/psgndb/doc/Phylip/main.html. Dowloadade in 2008-04-23.
- Galván M.Z., Bornet B., Balatti P..A., Branchard M. (2003) Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*. 132: 297–301.

- García-Maroto F., Garrido-Cárdenas J.A., Gómez-Mercado F., Guil-Guerrero J.L., Alons D.L. (2003) Natural hybridisation and phylogenetic position of *Saxifraga trabutiana* (Saxifragaceae) inferred from ISSR markers and ITS sequences. Ann. Bot. Fennici 40:5-13.
- Ge X-J., Yu Y., Yuan Y-M., Huang H-W., Yang C. (2005a) Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert regions of northwest China as revealed by ISSR analysis. Ann. Bot. 95: 843–851.
- Ge X-J., Zhou X-L., Li Z-C., Hsu T-W., Schaal B.A., Chiang T-Y. (2005b) Low genetic diversity and significant population structuring in the relict *Amentotaxus argotaenia* complex (Taxaceae) based on ISSR fingerprinting. J. Plant Res. 118:415–422.
- Giulietti A.M., Menezes N.L., Pirani J.R., Meguro M., Wanderley M.G.L. (1987) Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. Bol. Bot. Univ. São Paulo 9: 1-151.
- Giulietti A.M., Pirani J.R. (1988) Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range Minas Gerais and Bahia, Brazil, In: Vanzolini P.E., Heyer W.R. (eds.) Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp. 39-68.
- Goldman D.H., Jansen R.K., van den Berg C., Leitch I.J., Fay M.F., Chase M.W. (2004a) Molecular and cytological examination of *Calopogon* (Orchidaceae, Pidandroideae): circumscription, phylogeny, polyploidy, and possible hybrid speciation. Amer. J. Bot. 91: 707–723.
- Grant V. (1981) Plant speciation, 2^a ed. Columbia University Press, New York.
- Hao G., Lee D-H., Lee J.S., Lee N.S. (2002) A study of taxonomical relationships among species of Korean *Allium* sect. *Sacculiferum* (Alliaceae) and related species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Bot. Bull. Acad. Sin. 43: 63-68.
- Harley R.M., Simmons N.A. (1986) Florula of Mucugê: Chapada Diamantina – Bahia, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew
- Hartl D.L. (2000) A primer of population genetics 3^a ed. Sinauer Associates, Massachusetts, U.S.A. 221p.

- Jesus E.F., Falk F.H., Marques T.M. (1985) Caracterização geográfica e aspectos geológicos da Chapada Diamantina, Bahia. Centro Editorial e Didático da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.
- Jian S., Tang T., Yang Zhong Y., Shi S. (2004) Variation in inter-simple sequence repeat (ISSR) in mangrove and non-mangrove populations of *Heritiera littoralis* (Sterculiaceae) from China and Australia. Aquatic Bot. 79:75–86.
- Kumar L.D., Kathirvel M., Rao G.V., Nagaraju J. (2001) DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays. For. Sci. Int. 116 : 63-68.
- Lacerda K.G. (2006) Deux nouveaux hybrides naturels de *Hoffmannseggella* (Orchidaceae). Richardiana. 6: 62-72.
- Lin W.X., He H.Q., Chen X.X., Xiong J., Song B.Q., Liang Y.Y., Liang K.J. (2005) Use of ISSR molecular marker approach to estimate genetic diversity in rice and barley allelopathy. Fourth World Congress in Allelopathy held at Charles Sturt University (CSU), Wagga Wagga, NSW Australia 21-26.
- Lu Z., Wang Y., Peng Y., Korpelainem H., Li C. (2006) Genetic diversity of *Populus cathayana* Rehd populations in southwestern China revealed by ISSR markers. Plant Sci. 170: 407-412.
- McDermott J..M.; McDonald B.A. (1993) Gene flow in plant pathosystems. Annual Review Phytopathology, Palo Alto, 31:353-373. appud Brandão, M. M. (2008) Diversidade Genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistemas corredor-fragmento semideciduais no sul de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado pela Universidade Federal de Lavras – UFLA 88p.
- McRoberts N., Sinclair W., Mcpherson A., Franke A.C., Saharan R.P., Malik R.K., Singh S., Marshall G. (2005) An assessemnt of genetic diversity within and between populations of *Phalaris minor* using ISSR markers. Weed res. 45:431-439.
- Meloni M., Perini D., Filligheddu R., Binelli G. (2006) Genetic variation in five mediterranean populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Ann. Bot. 97: 299–304.
- Nei M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3321-3323.

- Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nkongolo K.K., Michael P., Demers T. (2005) Application of ISSR, RAPD, and cytological markers to the certification of *Picea mariana*, *P. glauca*, and *P. engelmannii* trees, and their putative hybrids. *Genome* 48: 302–311.
- Nybom H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 13:1143–1155.
- Peakall R., Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288-295.
- Pearse D.E., Crandall K.A. (2004) Beyond F_{ST} : Analysis of population genetic data for conservation. *Cons. Genet.* 5: 585–602.
- Pritchard J.K., Sterhens P., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Raina S.N., Rani V., Kojima T., Ogihara Y., Singh K.P., Devarumath R.M. (2001) RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* 44: 763–772.
- Rhymer J.M., Simberloff D. (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 27: 83-109.
- Ribeiro P.L., Borba E.L., Toscano-de-Brito A.L.V. (2005) O gênero *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Ver. Bras. Bot.* 28: 423-439.
- Ribeiro P.L. (2006) Variabilidade genética e morfológica intra e interpopulacional no complexo *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) ocorrente nos campos rupestres: implicações taxonômicas e biogeográficas. Universidade Estadual de Feira de Santana, MSc. Dissertação.
- Ribeiro P.L., Borba E.L., Smidt E.C., Lambert S.M., Schnadelbach A.S., van den Berg C. (2008) Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Pl. Syst. Evol.* 270: 109-137.
- Rieseberg L.H., Ellstrand N.C. (1993) What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Crit. Rev. Pl. Sci.* 12: 213-241.
- Rieseberg L.H. (1995) The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *Amer. J. Bot.* 82: 944-953.

- Rocha W.J.S., Juncá F.A., Chaves J.M., Funch L.V. (2005) Considerações finais e recomendações para conservação. In: Juncá F.A., Funch L.V., Rocha W. (org.) Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp. 409-435.
- Ruas P.M., Ruas C.F., Rampim L., Carvalho V.P., Ruas E.A., Sera T. (2003) Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) markers. Genet. Mol. Biol. 26: 319-327.
- Scarano M.T., Abbate L., Ferrante S., Lucretti S., Tusa N. (2002). ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. Plant Cell Rep. 20: 1162-1166.
- Sheng Y., Zheng W., Pei K., Ma K. (2005) Genetic variation within and among populations of a Dominant Desert Tree *Haloxylon ammodendron* (Amaranthaceae) in China. Ann. Bot. 96: 245-252.
- Sica M., Gamba G., Montieri S., Gaudio L., Aceto S. (2005) ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. BMC Genetics 6:17.
- Silva-Pereira V., Smidt E.C., Borba E.L. (2007) Isolation mechanisms between two sympatric *Sophronitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. Plant Syst. Evol. 269: 171–182.
- Smissen R.D., Breitwieser I., Ward J.M., Mclenachan P.A., Lockhart P.J. (2003) Use of ISSR profiles and ITS-sequences to study the biogeography of alpine cushion plants in the genus *Raoulia* (Asteraceae). Plant. Syst. Evol. 239: 79–94.
- Smith J.L., Hunter K.L., Hunter R.B. (2002) Genetic variation in the terrestrial orchid *Tipularia discolor*. Southeastern Nat. 1: 17-26.
- Stannard B.L. (ed.) (1995). Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina – Bahia, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Sunnucks P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. Tree 15: 199-202.
- Takahata N., Nei M. (1984) F_{ST} and G_{ST} statistics in the finite island model. Genetics 107: 501-504.
- Tremblay R.L., Ackerman J.D. (2001) Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. Biol. J. Linn. Soc. 72: 47-62.

- van den Berg C., Higgins W.E., Dressler R.L., Whitten W.M., Soto Arenas M.A., Culham A., Chase M.W. (2000) A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from Internal Transcribed Spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana*. 15: 96-114.
- van den Berg C., Chase M.W. (2004) A reappraisal of Laeliinae: taxonomic history, phylogeny and new generic alliances. *Orchid Dig.* 68: 221-226.
- van den Berg C., Azevedo C.O. (2005) Orquídeas. In: Juncá F.A., Funch L., Rocha W. (org.) *Biodiversidade e conservação da Chapada Diamantina*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp. 195-208.
- van den Berg C. (2008) New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). *Neodiversity* 3: 3-12.
- Vekemans X., Beauwens T., Lemaire M., Roldan-Ruiz I. (2002) Data from Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Mol. Ecol.* 11: 139-151.
- Withner C.L. (1988) The Cattleyas and their relatives. Vol. I. The Cattleyas. Timber Press, Portland, pp. 153.
- Wolfe A.D., Xiang Q.Y., Kephart S.R. (1998) Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) bands. *Mol. Ecol.* 7: 1107-1125.
- Yeh F.C., Boyle T.J.B. (1997) Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belg J Bot* 129:157.

Tabela 1. Identificação, localização geográfica, a localidade e o município, além do número de indivíduos utilizados na análise genética através do marcador ISSR nas nove populações de *Cattleya pfisteri*, *C. pabstii*, *C. caulescens*, *C. sincorana* e *C. aff. pfisteri*. Os *vouchers* foram depositados no acervo do Herbário da Universidade Estadual de Feria de Santana (HUEFS).

População	Município	Localidade	Localização	Número de indivíduos	Voucher
<i>Cattleya pfisteri</i>					
PF-MU	Mucugê - BA	Distrito do Guiné, 1350 metros.	12°45'15"S, 41°30'27"W	34	J.R. Santos Silva 03
PF-BR	Barra da Estiva - BA	Morro da Antena, 1232 metros.	13°41'39"S, 41°19'02"W	15	J.R. Santos Silva 37
PF-IB	Ibicoara - BA	8km de Ibicoara, nas margens da estrada em direção para Cascavel, 1096 metros.	13°34'14"S, 41°36'35"W	16	J.R. Santos Silva 64
PF-IT	Ituaçu - BA	17km de Ituaçu, em direção ao povoado de Açude, 1059 metros.	13°47'28"S, 41°25'27"W	15	J.R. Santos Silva 74
<i>Cattleya pabstii</i>					
PA-TI	Tiradentes - MG	Serra São José, 1090 metros	21°06'24"S, 44°11'50"W	20	J.R. Santos Silva 113
PA-CA	Carrancas – MG	Pedreira do Guilherme, 1164 metros	21°30'08"S e 44°36'33"W	12	
<i>Cattleya caulescens</i>					
CA-IB	Ibirité – MG	Arredores do Parque Estadual do Rola Moça, 1377 metros	20°03'39" S, 44°02'06"W	13	
<i>Cattleya sincorana</i>					
SI-MU	Mucugê – BA	Distrito do Guiné, 1350 metros	12°45'15"S, 41°30'27"W	13	Smidt 294
<i>Cattleya aff. pfisteri</i>					
PF-CA	Caetité – BA	Estrada de Caetité para Brejinho das Ametistas, 5km, 1173 metros.	14°10'66"S, 42°29'10"W	17	J.R. Santos Silva 92

Tabela 2. Identificação do *primer*, seqüência, número de bandas analisadas e variação no tamanho (em pares de bases – pb) destas bandas analisadas dos respectivos *primers* na análise de variabilidade genética em padrões de ISSR nas 9 populações de *C. pfisteri*, *C. aff. pfisteri*, *C. caulescens*, *C. pabstii* e *C. sincorana*.

PRIMER	SEQUÊNCIA	Nº. de bandas	Tamanho das bandas
		analisadas	(pb)
AW3	(GT) ₆ RG	16	300 - 1500
JOHN	(AG) ₇ YC	19	200 - 1500
MANNY	(CAC) ₄ RC	20	200 – 1500
MAO	(CTC) ₄ RC	16	300 - 1600
OMAR	(GAG) ₄ RC	15	150 – 1300
UBC 898	(CA) ₆ RY	17	200 - 1400
UBC 899	(CA) ₆ RG	19	300 - 1600

Tabela 3. Variabilidade genética encontrada em 122 locos de ISSR em nove populações de *C. pfisteri*, *C. aff. pfisteri*, *C. caulescens*, *C. pabstii* e *C. sincorana*. Os nomes das populações estão apresentados na Tabela 1 com sua referida espécie. Número médio de alelos (*Na*): Total de fragmentos encontrados em cada população; Nº de alelos exclusivos: Total de fragmentos encontrados em uma única população; percentual de locos polimórficos (*P*). Heterozigosidade dentro da população (*Hs*) - diversidade gênica de Nei (1973).

População	Nº médio de alelos (<i>Na</i>)	Nº de alelos exclusivas	Percentual de locos polimórfico (<i>P</i>)	Heterozigosidade dentro da população (<i>Hs</i>)
PF-MU	99	0	59,84%	0,201
PF-BR	84	0	30,33%	0,117
PF-IB	83	0	27,05%	0,093
PF-IT	73	0	27,87%	0,103
SI-MU	90	2	44,26%	0,172
PF-CA	86	1	36,07%	0,147
PA-TI	77	1	39,34%	0,151
PA-CR	84	1	52,46%	0,215
CA-BI	74	3	37,70%	0,148

Tabela 4. Tabela da Análise Molecular de Variância (AMOVA) envolvendo as populações em estudo em diferentes combinações. O G_{ST} e o N_m dentro dessas combinações com as populações.

Análise Molecular de Variância	4 populações de <i>C. pfisteri</i>	5 populações de <i>C. pfisteri</i> e <i>C. sincorana</i>	7 populações do estudo retirando apenas <i>C. pfisteri</i> (Mucugê) e <i>C. sincorana</i>	Todas as 9 populações em estudo
Entre as populações	32%	40%	38%	41%
Entre as populações por espécies	--	19%	25%	20%
Dentro das populações	68%	41%	36%	39%
* G_{ST}/N_m	0.3256/1.0355	0.3930/0.7721	0.5252/0.4484	0.5852/0.3544

* G_{ST} gerado pelo software POPGENE.

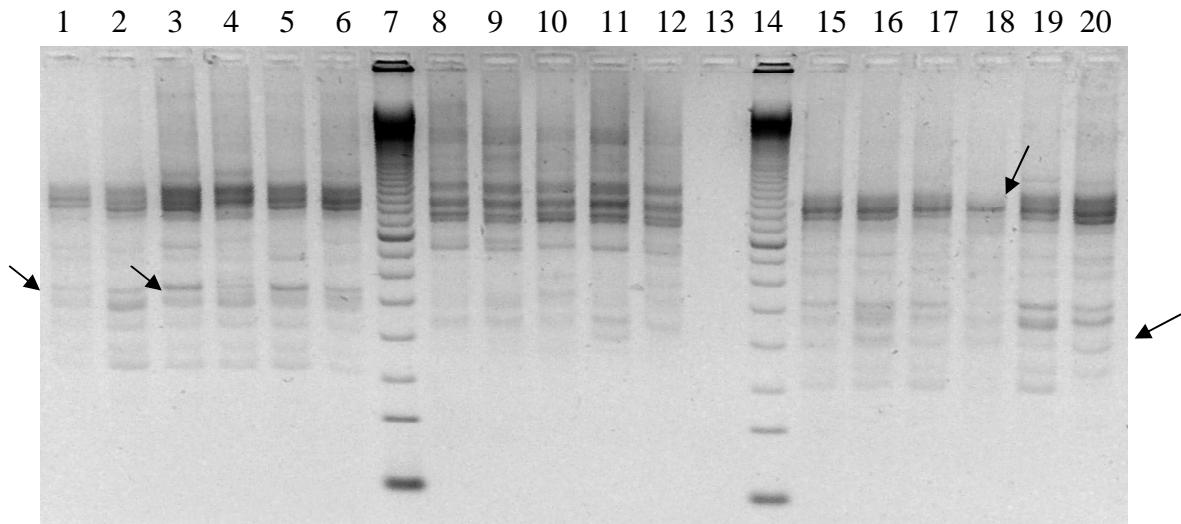


Figura 3. Gel de agarose corado com Brometo de Etídio mostrando o padrão eletroforético de ISSR pela amplificação do primer UBC899 em populações de *Cattleya pfisteri* e *C. sincorana*. Da esquerda para direita: Aplicações de 1-6, população de *C. pfisteri* de Mucugê; Aplicações de 8-12, população de *C. sincorana* de Mucugê; Aplicação 13 controle; Aplicações de 15-20, população de *C. pfisteri* de Barra da Estiva; Aplicações 7 e 14 marcador de 100 pares de bases (pb) Ladder. Os tipos de bandas utilizadas para a análise estão indicados com setas.

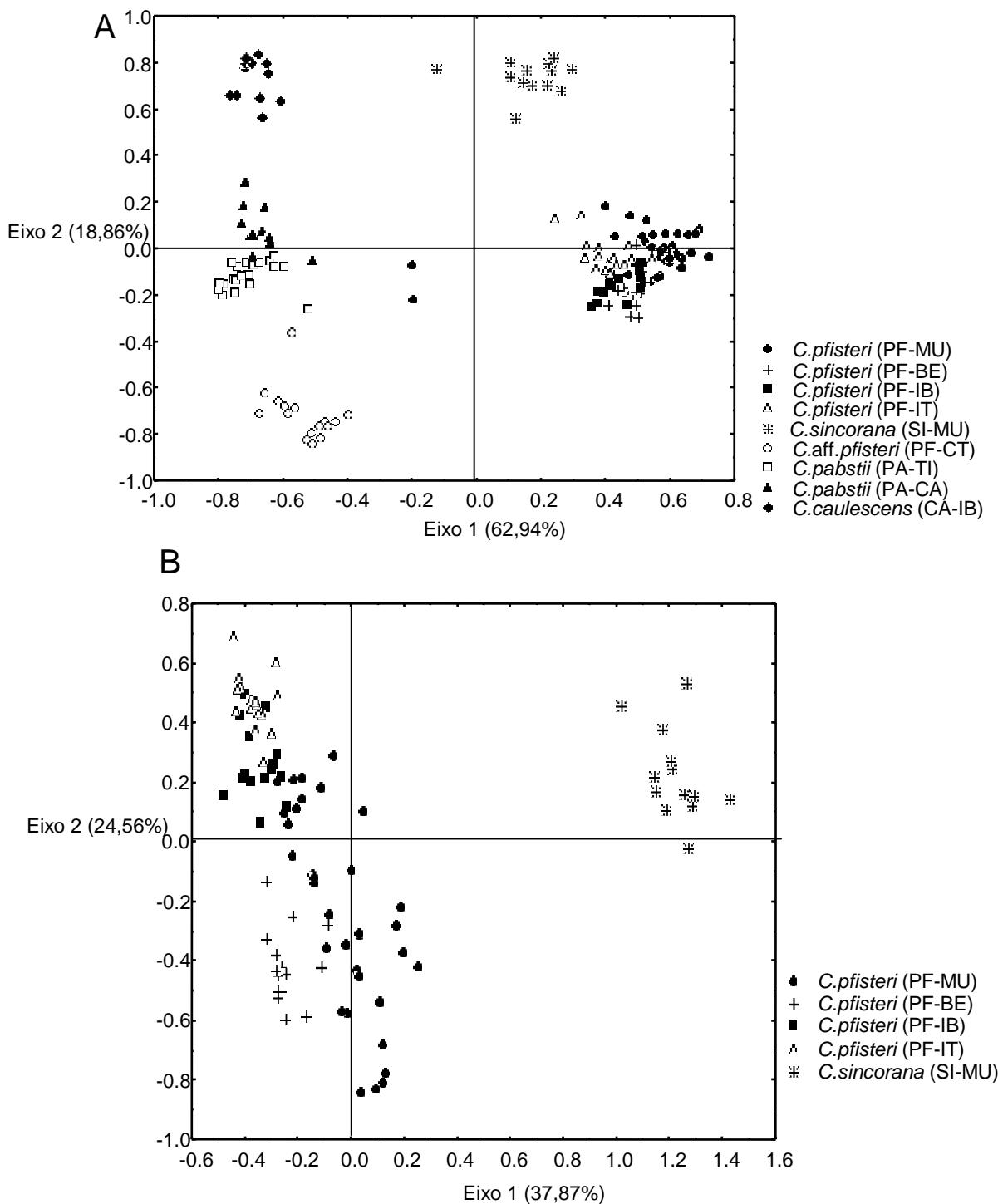


Figura 4. Análises de Coordenadas Principais (PCO) baseadas em 122 loci de ISSR. O nome das populações estão apresentados na Tabela 1. **A.** Análise com as nove populações das espécies *Cattleya pfisteri*, *C. sincorana*, *C. aff. pfisteri*, *C. caulescens* e *C. pabstii*. **B.** Análise com cinco populações das espécies *C. pfisteri* e *C. sincorana*.

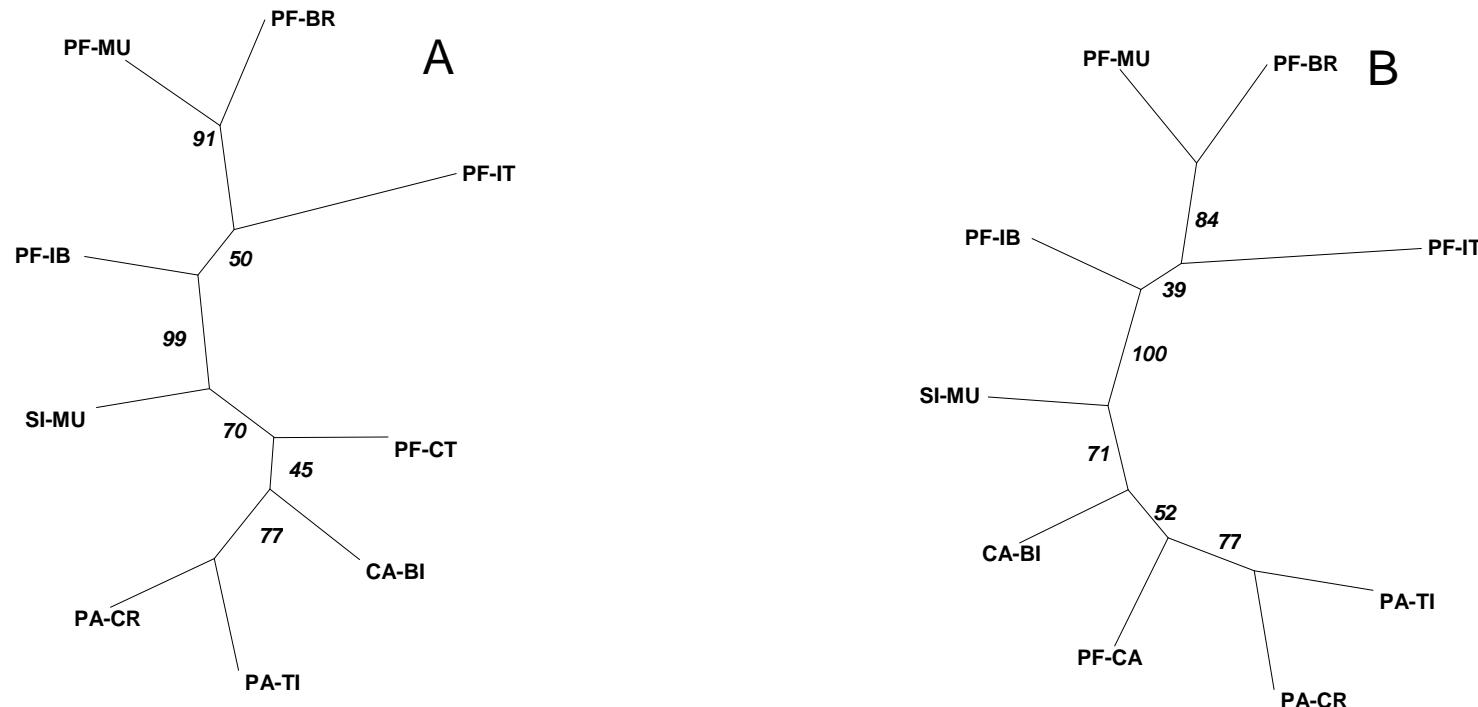


Figura 5. Dendrograma mostrando as relações entre as nove populações de *Cattleya pfisteri* (PF-MU, PF-BR, PF-IT, PF-IB), *C. sincorana* (SI-MU), *C. aff. Pfisteri* (PF-CA), *C. caulescens* (CA-BI) e *C. pabstii* (PA-TI, PA-CR), utilizando o UPGMA como algoritmo de agrupamento baseado nos 122 locos de ISSR. Os números são os resultados de *Bootstrap* acima de 50. **A.** Dendrograma gerado a partir do *Fst* par a par. **B.** Dendrograma gerado a partir da distância genética de Nei (1978). Ver código das populações na Tabela 1.

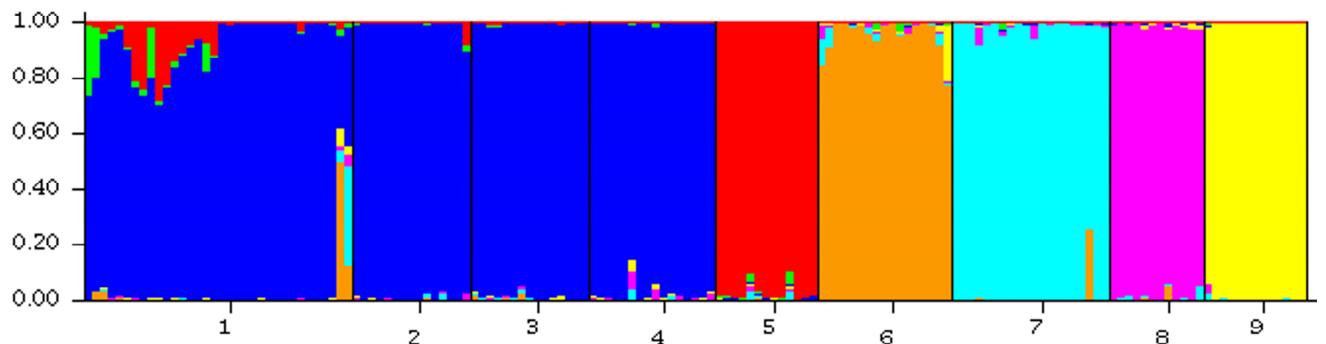


Figura 6. Representação da estrutura genética encontrada entre as nove populações de *Cattleya pfisteri*, *C. sincorana*, *C. aff. pfisteri*, *C. caulescens* e *C. pabstii*. 1 a 4 populações de *C. pfisteri*, localidades de Mucugê, Barra da Estiva, Ibicoara e Ituaçu, respectivamente. 5 população de *C. sincorana*, da localidade de Mucugê. 6 população de *C. aff. pfisteri* de Caetité. 7 e 8 populações de *C. pabstii* das localidades de Tiradentes e Carrancas. 9 população de *C. caulescens* localizada em Ibirité.

CAPITULO II: ANÁLISE MORFOMÉTRICA DE *CATTLEYA PFISTERI* (PABST & SENHAS) VAN DEN BERG (ORCHIDACEAE) E ESPÉCIES RELACIONADAS

Resumo:

(Análise morfométrica de *Cattleya pfisteri* (Pabst & Senghas) Van den Berg (ORCHIDACEAE) e espécies relacionadas). *Cattleya* é um Gênero Neotropical sendo a maioria das espécies encontrada no Brasil. Neste trabalho foram amostrados 78 indivíduos de seis populações pertencentes a três táxons, *Cattleya pfisteri*, *C. aff. pfisteri* e *C. pabstii* distribuídas nos estados da Bahia, municípios de Mucugê, Barra da Estiva, Caetité, Ibicoara e Ituaçu, e de Minas Gerais no município de Tiradentes. As flores foram dissecadas e montadas em fichas florais, de onde foram medidos 38 caracteres quantitativos contínuos de labelo, pétala, sépala lateral e dorsal, coluna, estigma, ovário, pseudobulbo e folha, utilizando régua e paquímetro. Inicialmente foi realizada uma Análise Discriminante Canônica (DCA), tomando como variável categórica as populações. Foram realizadas análises de agrupamento através do algoritmo UPGMA (*unweighted pair-group method of averages*) com as distâncias de Mahalanobis provenientes da DCA. Os resultados da DCA indicam que as populações de *C. pfisteri* de Mucugê e a *Cattleya pabstii* de Tiradentes são separadas no primeiro eixo, que explica 67,62% da variância. O segundo eixo separa a população de *Cattleya aff. pfisteri* de Caetité das populações de *C. pfisteri* de Ituaçu, Ibicoara e Barra da Estiva. Os resultados da análise de agrupamento são similares aos resultados de DCA, repetindo alguns agrupamentos como, por exemplo, as *C. pfisteri* dos municípios de Barra da Estiva, Ibicoara e Ituaçu. De acordo com dados morfométricos, *Cattleya aff. pfisteri* é mais próxima de *C. pfisteri* do que *C. pabstii*, que foi a outra espécie do mesmo grupo incluída neste estudo. Já a grande diferenciação encontrada em uma das populações de *C. pfisteri* (Mucugê) pode estar relacionada com a introgessão genética, detectada através de dados moleculares em outro estudo.

Palavras-chave: Orchidaceae, *Cattleya*, Morfometria, Variabilidade populacional.

Abstract:

(Morphometric Analysis of *Cattleya pfisteri* (Pabst & Senghas) Van den Berg - ORCHIDACEAE). *Cattleya* is a Neotropical genus with ca. 112 species, most species occur in Brazil. We analyzed 38 characters of continuous quantitative measures from flowers and vegetative organs for morphometric analysis. In this work we sampled 78 individuals from six natural populations distributed in the States of Bahia, municipalities of Mucugê, Barra da Estiva, Caetité, Ibicoara and Ituaçu, and Minas Gerais in the city of Tiradentes grouped into three taxa, *C. pfisteri*, *C. aff. pfisteri* and *C. pabstii*. The flowers were dissected and mounted on floral sheets, which were measured using ruler and caliper. Initially we was performed a Canonical Discriminant Analysis (DCA, also called Canonical Variates), taking as a categorical variable the populations. We performed also Cluster Analysis through the algorithm UPGMA (unweighted pair-group method of averages) with the distances of Mahalanobis from the DCA. The results of the DCA indicate that the populations of *C. pfisteri* of Mucugê and *C. pabstii* of Tiradentes are separated in the first axis, which explains 67.62% of the variance. The second axis separates the population of *C. aff. pfisteri* of Caetité from populations of *C. pfisteri* of Ituaçu, Ibicoara and Barra da Estiva. The results of the Cluster Analysis are similar to the results of DCA, repeating some groups, such as the grouping of *C. pfisteri* of the municipalities of Barra da Estiva, Ibicoara and Ituaçu. According to morphometric data, *C. aff. pfisteri* is closer to *C. pfisteri* than to *C. pabstii*, differently of molecular results. The great differentiation found in one of the populations of *C. pfisteri* (Mucugê) could be related to introgression, detected by molecular data in the former study.

Keywords: Orchidaceae, *Cattleya*, Morphometric Analysis, Population Variability.

Introdução

O gênero *Cattleya* é um gênero Neotropical sendo a maioria das espécies encontrada no Brasil. É largamente utilizado como ornamental sendo bastante popular dentre as orquídeas (Withner 1988). *Cattleya* pertence à subtribo Laeliinae (tribo Epidendreae) e já foi estudado do ponto de vista molecular para resolução de aspectos filogenéticos (van den Berg *et al.* 2000). Laeliinae é uma subtribo neotropical que tem chamado a atenção de taxonomistas e colecionadores por conter diversos gêneros de flores grandes, fácil cultivo e interesse ornamental (van den Berg & Chase 2004).

Cattleya pfisteri (Pabst & Senghas) Van den Berg apresenta geralmente apenas uma folha. Suas flores são púrpuras, pequenas. Esta espécie está inclusa no subgênero *Parviflorae*, que apresenta de 40-50 espécies de difícil separação. Esta espécie foi descrita em 1975, sendo endêmica da Chapada Diamantina – BA, Brasil. É próxima de um grupo de espécies mineiras, especialmente *C. caulescens* (Lindl.) Van den Berg e *C. pabstii* (Lindl.) Van den Berg. As relações entre estas espécies são incertas, mesmo porque no estudo filogenético de van den Berg *et al.* (2000), não foi encontrada variabilidade nas seqüências de ITS dentro deste grupo.

A Chapada Diamantina apresenta um grande centro de diversidade de orquídeas (Azevedo & van den Berg 2007a), em função de apresentar diversos tipos de formações vegetais, e especialmente formações de campo rupestre onde a família é bastante representativa (van den Berg & Azevedo 2005). Os campos rupestres compõem a vegetação mais característica da Chapada Diamantina, caracterizada principalmente por ervas e arbustos distribuídos em mosaicos, com habitats diferenciados (Conceição & Pirani 2005). O campo rupestre é um tipo de vegetação que ocorre nas regiões sudeste e nordeste do Brasil, nos estados de Minas Gerais e Bahia. Sua formação é caracterizada por uma vegetação aberta, herbácea solo rochoso, com muitas plantas fixadas sobre as rochas e arbustos em regiões onde o solo é rico em quartzito e gnaisse (Giulietti. & Pirani 1988; Borba & Semir 1998; Borba *et al.* 2001).

O conjunto de serras que compõem a Chapada Diamantina indica uma descontinuidade da vegetação o que promove o endemismo, a especiação e a formação de populações disjuntas (Giulietti. & Pirani 1988). Estudos sobre a família Orchidaceae realizados na Chapada Diamantina têm ampliado a identificação do

endemismo da área (van den Berg & Azevedo 2005; Azevedo & van den Berg 2007a; Borba *et al.* 2007a; Azevedo & van den Berg 2007b). Outros recentes estudos realizados através de análise de dados morfológicos têm corroborado a caracterização e diferenciações intra e interespecíficas de algumas populações de Orchidaceae (van den Berg & Martins 1998; Borba *et al.* 2000; Cardim *et al.* 2001; Carlini-Garcia *et al.* 2002; Borba *et al.* 2002; Goldman *et al.* 2004; Ribeiro 2006; Borba *et al.* 2007a; Cruz 2007; Ribeiro *et. al.* 2007) poucos destes com *Cattleya*, bem como em outras famílias (Rossi *et al* 2005).

As medidas de diversidade morfológica, que podem estar relacionadas à morfometria, são essenciais em estudos genéticos e ecológicos, e as variáveis são tradicionalmente utilizadas em análises morfométricas. A morfometria é definida como descrição, análise e interpretação quantitativa da forma e da variação da estrutura biológica (Monteiro & Reis 1999). As análises são realizadas por métodos de estatística multivariada, estudo em que múltiplas medidas são analisadas sobre cada indivíduo. Assim, a análise multivariada inclui as técnicas de múltiplas variáveis (Hair *et al.* 2005). Segundo Rencher (2002), análise multivariada consiste em uma coleção dos métodos que podem ser usados quando diversas medidas são feitas em cada indivíduo ou objeto em uma ou várias amostras. As medidas são vistas como variáveis e os indivíduos ou os objetos como unidades (unidades de pesquisa, unidades de amostragem, ou unidades experimentais) ou observações. Essas variáveis são medidas em cada unidade de amostragem. Tipicamente, estas variáveis são correlacionadas. A análise multivariada de uma forma geral refere-se a todos os métodos estatísticos que analisam simultaneamente múltiplas medidas em cada indivíduo ou objeto sob investigação (Johnson & Wichern 1998). Existem alguns métodos e técnicas utilizadas em dados estatísticos, como a análise das variáveis canônicas que é uma abordagem estatística bastante utilizada para identificar os caracteres que contribuem para correlacionar as variáveis e os eixos canônicos, bem como explorar a separação dos grupos por esses eixos. Outra técnica utilizada é a análise de agrupamento que é uma técnica analítica utilizada para estimar subgrupos através da similaridade entre as unidades analisadas (Hair *et al.* 2005). Estudos morfométricos utilizam variáveis contínuas e comparam populações em níveis intraespecíficos e interespecíficos (van den Berg 1996), possibilitando também estudos relacionados com evolução e hibridação, aliando os dados de morfometria e outros estudos biossistêmáticos (Goldman & Orzell 2000).

Visando analisar a variabilidade morfométrica de *Cattleya pfisteri*, faz-se necessário uma abordagem populacional para se estabelecer as relações intra e interpopulacionais. Assim, o presente estudo visa diagnosticar morfologicamente o quanto as populações são variáveis entre si e com as espécies próximas, visto que há uma semelhança dos indivíduos analisados, além de verificar a variação morfológica perceptível da população de Mucugê, de *C pfisteri*, que sofre introgessão com a *C sincorana*, populações que vivem em simpatria, resultado obtido através de dados moleculares (cap.1).

Materiais e Métodos

Área de estudo

A Chapada Diamantina ocupa aproximadamente 15% do território da Bahia e corresponde à parte baiana da Cadeia do Espinhaço, entre a bacia do Rio São Francisco e os rios Paraguaçu e Rio de Contas (Jesus *et al.* 1985). A Chapada Diamantina tem sido considerada uma região de extrema importância biológica, sendo delimitadas três unidades de conservação, destacando-se o Parque Estadual de Morro do Chapéu, a Área de Proteção Ambiental (APA) Marimbus - Iraquara e o Parque Nacional da Chapada Diamantina (Rocha *et al.* 2005).

Os campos rupestres são circundados por caatinga e por cerrado, muitas vezes com estágios transicionais ou ecótonos (Conceição *et al.* 2005). São considerados importantes centros de diversidade da flora brasileira, destacando-se por apresentarem grande número de espécies endêmicas. (Harley & Simmons 1986; Giulietti & Pirani 1988). Na Bahia os campos rupestres estão predominantemente cercados por caatinga (Harley & Simmons 1986).

Algumas espécies são endêmicas de campo rupeste, como é o caso da *Cattleya pfisteri*, encontrada em altitudes em torno de 1000-1500m (van den Berg & Azevedo 2005; Azevedo & van den Berg 2007a). Existe pouco registro da *C. pfisteri* atualmente, apesar de se apresentar distribuída nas proximidades de Mucugê e Rio de Contas, região cercada de serras, Serra do Sincorá, a Serra do Rio de Contas e o Pico das Almas, além de alguns registros antigos nas proximidades de Palmeiras e Barra de Estiva.

As populações de *Cattleya pfisteri* foram encontradas nos municípios de Mucugê, Barra da Estiva, Ibicoara, Ituaçu (Figura 1). Em todos os municípios

coletados a vegetação característica encontrada foi o campo rupestre. No município de Mucugê está localizada a 50km da saída sul da cidade o Morro do Guiné, onde encontra-se a *C. sincorana* vivendo em simpatria com a *C. pfisteri*. O material-tipo da espécie foi coletado em Barra da Estiva, no “Morro da Antena” onde a área já está bastante degradada. As demais localidades onde se encontraram as populações das espécies foram estradas próximas as cidades onde a vegetação de campo rupestre ainda se mostrava bastante característica.

Populações amostradas

Foram amostrados quatro indivíduos de *C. pabstii* localizada no estado de Minas Gerais no município de Tiradentes; 62 indivíduos de quatro populações de *Cattleya pfisteri* localizadas nos municípios de Mucugê, Barra da Estiva, Ibicoara e Ituaçu e 12 indivíduos de *C. aff. pfisteri* no município de Caetité ambas do estado da Bahia (Tabela 5). As amostras foram coletadas distantes entre si para evitar clones, visto que as Orchidaceae se reproduzem vegetativamente e possuem vida longa. Desta forma, muitas grandes e mesmo indivíduos próximos podem representar o mesmo genótipo.

Foram coletados, em média, 13 indivíduos de cada população, com populações de 12 a 19 indivíduos. De cada população de *C. pfisteri* foi coletado um material testemunho (*voucher*), e todos foram depositados no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) para identificação de cada amostra.

Analise morfométrica multivariada

As peças florais foram cuidadosamente separadas e secas em estufa para posterior montagem de fichas florais em cartolina. Foram analisados 27 caracteres morfológicos florais e 11 vegetativos de todos os indivíduos amostrados, sendo 38 caracteres quantitativos contínuos: Sépala dorsal (Comprimento; Largura $\frac{1}{4}$; Largura $\frac{1}{2}$; Largura $\frac{3}{4}$), Sépala lateral (Comprimento; Largura $\frac{1}{4}$; Largura $\frac{1}{2}$; Largura $\frac{3}{4}$), Pétala (Comprimento; Largura $\frac{1}{4}$; Largura $\frac{1}{2}$; Largura $\frac{3}{4}$), Labelo (Comprimento total; Comprimento da base até o inicio da reentrância; Largura do centro até a margem a 1/3 do lobo lateral; Largura do centro até a margem a 2/3 do lobo lateral; Comprimento do lobo terminal; Largura do lobo terminal; Largura do istmo; Comprimento do istmo; Comprimento da base até o final do lobo lateral), Coluna

(Comprimento; Largura (Max); Largura ½), Estigma (Comprimento; Largura (Max)), Ovário (comprimento), Folha (Comprimento; Largura ¼; Largura ½; Largura ¾), Bulbo (Número de entrenós; Comprimento; Largura ¼; Largura ½; Largura ¾; Distância entre o 1º e o 2º entrenó; Distância entre o 2º e o 3º entrenó). Essas medidas foram retiradas através de régua e paquímetro (Figura 7). No caso das partes simétricas (pétila e sépala lateral), foi utilizado apenas o lado esquerdo da flor.

Os padrões de similaridade e diferenças morfológicas foram analisados por métodos estatísticos multivariados. Inicialmente foi realizada uma Análise de Variáveis Canônicas (CVA), seguida de Análise Discriminante Canônica (DCA) como variável categórica das populações, bem como foram realizadas análises de agrupamento através do algoritmo UPGMA (*unweighted pair-group method of averages*) com as distâncias de Mahalanobis, medida de dissimilaridade entre as populações.

Resultados

As médias e o desvio padrão dos valores encontrados nos caracteres utilizados na análise morfométrica de *Cattleya pfisteri*, *C. aff. pfisteri* e *C. pabstii* nas populações em diferentes localidades, bem como os intervalos, mínimo e máximo, encontram-se na Tabela 6, sendo possível verificar através dos dados que a população do Guiné, Mucugê, apresenta médias superiores às demais em quase todas as variáveis.

Na análise de agrupamento dos centróides das populações, utilizando a distância de Mahalanobis e UPGMA, as seis populações formaram dois grupos: um com as populações de *C. pfisteri* localizada no Beco, Mucugê, Bahia, e *C. pabstii* localizado em Tiradentes, Minas Gerais, e o outro grupo composto pelas populações de *C. pfisteri* de Ibicoara, Barra da Estiva e Ituaçu e *C. aff. pfisteri* localizada em Caetité (Figura 8).

Na Análise de Variáveis Canônicas (CVA) (figura 9A e B) os quatro primeiros eixos representam 97,7% da variância, considerando os eixos com mais de 5% de significância, onde o primeiro acumulou 67,62%, e é relacionado com as variáveis # 3, 4, 22 e 28, que apresentaram um maior coeficiente estandardizado

encontrado através da análise da contribuição de cada variável canônica (tabela 7). Cada variável representa um grupo de características, as variáveis # 3 e 28 que correspondem respectivamente a $\frac{1}{2}$ da largura da sépala dorsal e ao comprimento da folha, valores estandardizados para mais. As variáveis # 4 e 22, respectivamente, $\frac{3}{4}$ da largura da sépala dorsal e o comprimento da coluna, valores estandardizados para menos. A sépala dorsal apresentou uma maior variabilidade neste eixo com base na Análise de Variáveis Canônicas. O segundo eixo acumulou 14,23%, relacionados diretamente com as variáveis # 2, 3, 21 e 29, que apresentaram um maior coeficiente estandardizado encontrado através da análise da contribuição de cada variável canônica (tabela 7), e correspondem a $\frac{1}{4}$ da largura da sépala dorsal, $\frac{1}{2}$ da largura da sépala dorsal, o comprimento da base até o final do lobo lateral do labelo e $\frac{1}{4}$ da largura da folha, todas apresentando valores estandardizados para menos. Destaque para a sépala dorsal neste segundo eixo, com maior variabilidade. O terceiro eixo acumulou 10,65%, relacionados diretamente com as variáveis # 13, 29 e 30, que apresentaram um maior coeficiente estandardizado encontrado através da análise da contribuição de cada variável canônica (tabela 7). As variáveis # 13 e 30 correspondem ao comprimento total do labelo e $\frac{1}{2}$ da largura da folha respectivamente, valores estandardizados para menos e a $\frac{1}{4}$ da largura da folha apresentou valores estandardizados para mais. A folha obteve um maior destaque neste eixo. E o quarto eixo acumulou 5,23% relacionados diretamente com as variáveis # 9, 12, 13, 15 e 16, que apresentaram um maior coeficiente estandardizado encontrado através da análise da contribuição de cada variável canônica (tabela 7). As variáveis # 9, 12 e 16 correspondem ao comprimento da pétala, $\frac{3}{4}$ da largura da pétala e a largura do centro até a margem a $\frac{2}{3}$ do lobo lateral do labelo, respectivamente, valores estandardizados para menos. As variáveis # 13 e 15 relacionada com o comprimento total do labelo e a largura do centro até a margem a $\frac{1}{3}$ do lobo lateral do labelo respectivamente apresentou valores estandardizados para mais. O labelo e a pétala os principais norteadores do quarto eixo.

Na análise das variáveis canônicas, dos eixos mais representativos pode-se dizer que apenas os três primeiros apresentaram uma separação de alguma população. No eixo um, a população de *C. pfisteri* de Mucugê, Bahia e a *C. pabstii* de Tiradentes, Minas Gerais da *C. aff. pfisteri* e as demais *C. pfisteri*, sendo que as populações de *C. pfisteri* de Mucugê, Bahia e a *C. pabstii* de Tiradentes, Minas Gerais estão separadas pelo segundo eixo (Figura 9A). O segundo eixo separa

também a população de *C. aff. pfisteri* de Caetité das *C. pfisteri* populações de Ibicoara, Ituaçu e Barra da Estiva. O terceiro separa a população de Ituaçu da *C. pfisteri* das populações de *C. pfisteri* de Barra da Estiva e Ibicoara (Figura 9B). Apenas um indivíduo de *C. pfisteri* foi classificado incorretamente na análise de discriminantes, este indivíduo da população de Ituaçu foi classificado como sendo de Barra da Estiva (Tabela 8).

Discussão

As análises mostraram populações bastante coesas com alto índice de variabilidade, facilitando assim a classificação e a separação dos grupos de forma diferente do trabalho de Cruz (2007) e do trabalho de Ribeiro *et al.* (2007). Resultado que pode ser observado com os dois primeiros eixos somados representando 81% desta variabilidade. Somente as populações de Barra da Estiva e Ibicoara de *C. pfisteri* se mostraram bastante próximas. E somente um indivíduo da população de Ituaçu que mostrou uma classificação incorreta, mostrando que este indivíduo apresenta um padrão morfométrico típico da população de Barra da Estiva.

Em alguns trabalhos realizados com variabilidade morfométrica de Orchidaceae o labelo apresentou-se como órgão com maior variabilidade (Ribeiro *et al.* 2007; Cruz 2007). Neste trabalho, o órgão que apresentou um maior índice de variabilidade foi a sépala dorsal, seguido pela folha, órgão vegetativo, semelhante ao trabalho de Goldman *et al.* (2004), em que a folha e a sépala dorsal apresentaram um maior índice de variabilidade. Alguns órgãos como sépala lateral, estigma e ovário e o pseudobulbo, apresentaram uma baixa variabilidade quando comparado com os outros órgãos. Esse resultado encontrado reforça a idéia do uso de órgãos vegetativos em análises morfométricas, sendo assim, variáveis indispensáveis em uma análise morfométrica, podendo até ser utilizado somente órgãos vegetativos para verificação da variabilidade (Plotze *et al.* 2004).

Comparando os agrupamentos através do UPGMA formados através da Distância de Mahalanobis e a análise de discriminantes pode-se verificar uma congruência de dados, visto que ambos os resultados evidenciam o mesmo padrão. Destaca-se a similaridade encontrada entre as populações de *C. pfisteri* dos municípios de Ituaçu, Barra da Estiva e Ibicoara, fato possivelmente explicado pela

sua proximidade geográfica. A semelhança morfológica apresentada pela população de *C. aff. pfisteri* de Caetité com as demais populações de *C. pfisteri* sugere a ocorrência eventual de hibridação entre esses táxons ou um parentesco muito próximo, havendo a possibilidade deste grupo ser o táxon mais próximo das *C. pfisteri*, baseando-se somente em caracteres morfométricos, contudo em estudos baseados em dados moleculares (Cap.1), pode-se observar que esta população de *C. aff. pfisteri* de Caetité não apresentou a mesma similaridade dos resultados morfométricos, aproximando-se até de outros táxons, (*C. pabstii* e *C. caulescens*), caracterizando-a como uma nova espécie.

A população de *C. pfisteri* de Mucugê, Bahia, apresentou um padrão morfométrico diferenciado das outras populações de *C. pfisteri*, o que pode ter levado a Castro & Marçal (2006) a descreverem esta população como uma espécie nova devido a essa diferenciação morfológica. Entretanto, os dados moleculares (Cap.1) indicam que a população de *C. pfisteri* de Mucugê está geneticamente relacionada com as demais *C. pfisteri* das outras localidades, resultado que se difere neste capítulo, onde a diferenciação morfológica encontrada pode ser explicada através da hibridação e da consequente introgessão dessa espécie com a *C. sincorana*, evento já registrado com outras espécies que apresentaram um padrão morfológico diferenciado (Borba *et al* 2007b; Venhuis *et al* 2007; Zha *et al* 2008).

Este estudo estimou os padrões de variabilidade morfométrica das populações de *C. pfisteri* e a população de *C. aff. pfisteri* fornecendo subsídios importantes para propor ações de conservação e aperfeiçoar a proteção da biodiversidade e manejo ambiental, principalmente de áreas como a Chapada Diamantina que têm sofrido com as constantes degradações.

Referências Bibliográficas

- Azevedo C.O., van den Berg C. (2007a) Análise comparativa de áreas do campo rupestre da cadeia do Espinhaço (Bahia e Minas Gerais, Brasil) baseadas em espécies de orchidaceae. *Sitientibus ser. Ciên. Biol.* 7: 199-210.

- Azevedo C.O., van den Berg C. (2007b) A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. *Hoehnea* 34: 1-47.
- Borba E.L., Semir J. (1998) *Bulbophyllum x cipoense* (Orchidaceae), a new natural hybrid from the Brazilian “campos rupestres”: description and biology. *Lindleyana* 13: 113-120.
- Borba E.L., Felix J.M., Solferini V.N., Semir J. (2000) *Pleurothallis fabiobarrosii*, a new brazillian species: morphological and genetic data with notes on the taxonomy of brazillian rupiculous *Pleurothallis*. *Lindleyana* 15(1): 2-9.
- Borba E.L., Felix J.M., Solberini V.N., Semir J. (2001) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *Amer. J. Bot.* 88: 419-428.
- Borba E.L., Sheperd G.J., Van Den Berg C., Semir J. (2002) Floral and vegetative morphometrics in five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: Correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. *Ann. Bot.* 90: 219-230.
- Borba E.L., Funch R.R., Ribeiro P.L., Smidt E.C., Silva-Pereira V. (2007a) Demografia, variabilidade genética e morfológica e conservação de *Cattleya tenuis* (Orchidaceae), espécie ameaçada de extinção da Chapada Diamantina. *Sitientibus Ser. Ciên. Biol.* 7: 211-222.
- Borba EL., Funch RR., Ribeiro PL., Smidt EC., Silva-Pereira V. (2007b) Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophronitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. *Pl. Syst. Evol.* 267: 129–146
- Cardim D.C., Carlini-Garcia L.A., Mondin M., Martins M., Veasey E.A., Ando A. (2001) Variabilidade intra-específica em cinco populações de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae-Oncidiinae) em Minas Gerais Bras. *Bot.* 24 : 553-560.
- Carlini-Garcia L.A., van den Berg C., Martins P.S. (2002) A morphometric analysis of floral characters in *Miltonia spectabilis* and *Miltonia spectabilis* var. *moreliana* (Maxillarieae: Oncidiinae). *Lindleyana* 17: 122-129.
- Castro V.P., Marçal S. (2006) *Hoffmannseggella diamantinensis* Castro & Marçal, une espèce nouvelle. *Richardiana*. 6: 113-117.

- Conceição A.A., Pirani J.R. (2005) Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: substratos, composição florísticas e aspectos estruturais. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 23: 85-111.
- Conceição A.A., Rapini A., Pirani J.R., Giulietti, A.M., Harley R.M., Silva T.R.S., Santos A.K.A., Correia C., Andrade I.M., Costa J.A.S., Souza L.R.S., Andrade M.J.G., Funch R.P., Freitas T.A., Freitas A.M.M., Oliveira A.A. (2005) Campos Rupestres *In:* Juncá F.A., Funch L., & Rocha W. (org.) *Biodiversidade e conservação da Chapada Diamantina*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. Cap. 06. 153-180.
- Cruz D.T. (2007) Variabilidade genética e morfológica de populações de *Cattleya elongata* Barb.Rodr. (Orchidaceae) na Chapada Diamantina, Bahia. Universidade Estadual de Feira de Santana, M.Sc. Dissertação. pp.61.
- Giulietti A.M., Pirani J.R. (1988) Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range Minas Gerais and Bahia, Brazil, In: Vanzolini P.E., Heyer W.R. (eds.) *Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp. 39-68.
- Goldman D.H., Orzell S.L. (2000) Morphological, geographical, and ecological re-evaluation of *Calopogon multiflorus* (Orchidaceae). *Lindleyana* 15: 237-251.
- Goldman D.H., van den Berg C., Griffith M.P. (2004b) Morphometric circumscription of species and infraspecific taxa in *Calopogon* R.Br. (Orchidaceae) *Plant Syst. Evol.* 247: 37–60.
- Hair J.F., Anderson R.E., Tatham R.L., Black W.C. (2005) *Análise Multivariada de Dados*. 5^a ed. Bookman 2005. 593p.
- Harley R.M., Simmons N.A. (1986) *Florula of Mucugê: Chapada Diamantina – Bahia, Brazil*. Royal Botanic Gardens, Kew
- Jesus E.F., Falk F.H., Marques T.M. (1985) Caracterização geográfica e aspectos geológicos da Chapada Diamantina, Bahia. Centro Editorial e Didático da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.
- Johnson R.A., Wichern D.W. (1998) *Applied multivariate statistical analysis*. 4^a ed. Prentice-Hall. New Jersey, USA. 816p.
- Monteiro L.R., Reis S.F. (1999) *Princípios de morfometria geométrica*. Holos, Ribeirão Preto, 188p.
- Plotze R.O., Falvo M., Pádua J.G., Vieira M.L.C., Oliveira G.C.X., Bruno O.M. (2004) Análise biométrica de órgãos foliares de *Passiflora*. Universidade Federal

- de Uberlândia – Faculdade de Matemática – Uberlândia, MG *in:* 49^a Reunião da RBRAS. .pp.104-109.
- Rencher A.C. (2002) Methods of multivariate analysis 2^a ed. John wiley & sons, Canadá 732p.
- Ribeiro P.L. (2006) Variabilidade genética e morfológica intra e interpopulacional no complexo *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) ocorrente nos campos rupestres: implicações taxonômicas e biogeográficas. Universidade Estadual de Feira de Santana, MSc. Dissertação. 67p.
- Ribeiro P.L., Borba E.L., Smidt, E.C., Lambert S.M., Schnadelbach A.S., van den Berg C. (2007) Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. Plants Systematics and Evolutions. 270(1-2): 109-137.
- Rocha W.J.S., Juncá F.A., Chaves J.M., Funch L. (2005) Considerações Finais e Recomendações para Conservação. *In:* Juncá F.A., Funch L. & Rocha W. (org.) Biodiversidade e Conservação da Chapada Diamantina. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. Pág 409 – 435.
- Rossi A.A.B., Oliveira LO., Vieira M.F. (2005) Distly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). Rev. Bras. Bot. 28 (2) : 285-294.
- Van den Berg C. (1996) Estudo da variabilidade intra e interespecifica em populações de espécies brasileiras de *Cattleya* (Orchidaceae-Laeliinae). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 164 p.
- Van den Berg C., Martins P.S. (1998) Biogeography of Brazilian *Cattleyas*: geographic describution, morphological variability, evolutionary and taxonomic consequences. *In:* Pereira CEB. Proceedings of the 15th World Orchid Conference (Rio de Janeiro, 1996). Naturalia Publications, Turriers, France, pp.315-320.
- van den Berg C., Higgins W.E., Dressler R.L., Whitten W.M., Soto Arenas M.A., Culham A., Chase M.W. (2000) A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from Internal Transcribed Spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. Lindleyana. 15: 96-114.
- van den Berg C., Chase M.W. (2004) A reappraisal of Laeliinae: taxonomic history, phylogeny and new generic alliances. Orchid Dig. 68: 221-226.

- van den Berg C., Azevedo C.O. (2005) Orquídeas. In: Juncá F.A., Funch L., Rocha W. (org.) Biodiversidade e conservação da Chapada Diamantina. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp. 195-208.
- Vanhuis C., Vanhuis P., Oostermeijer J.G.B., Van Tienderen P.H. (2007) Morphological systematics of *Serapias* L. (Orchidaceae) in Southwest Europe. Pl. Syst. Evol. 265: 165–177.
- Withner C.L. (1988) The Cattleyas and their relatives. Vol. I. The Cattleyas. Timber Press, Portland, pp. 153.
- Zha H.G., Milne R.I., Sun H. (2008) Morphological and molecular evidence of natural hybridization between two distantly related *Rhododendron* species from the Sino-Himalaya. Bot. J. Linn. Soc. 156:119–129.

Tabela 5. Identificação, Município, localidade e localização geográfica, além do número de indivíduos utilizados na análise morfométrica dentro das populações das seis populações de *Cattleya pfisteri*, *C. aff. pfisteri*. e *C. pabstii*. Os Vouchers foram depositados no acervo do herbário da Universidade Estadual de Feria de Santana (HUEFS).

População	Município	Localidade	Localização	Número de indivíduos	Voucher
<i>Cattleya pfisteri</i>					
PF-MU	Mucugê - BA	Distrito do Guiné, 1350 metros	12°45'15"S, 41°30'27"W	19	J.R. Santos Silva 03
PF-BR	Barra da Estiva - BA	Morro da Antena, 1232 metros.	13°41'39"S, 41°19'02"W	14	J.R. Santos Silva 37
PF-IB	Ibicoara - BA	8km de Ibicoara, nas margens da estrada em direção para Cascavel, 1096 metros	13°34'14"S, 41°36'35"W	16	J.R. Santos Silva 64
PF-IT	Ituaçu - BA	17km de Ituaçu, em direção ao povoado de Açude, 1059 metros.	13°47'28"S, 41°25'27"W	13	J.R. Santos Silva 74
<i>Cattleya pabstii</i>					
PA-TI	Tiradentes - MG	Serra São José, 1090 metros	21°06'24"S, 44°11'50"W	4	J.R. Santos Silva 113
<i>Cattleya aff. pfisteri</i>					
PF-CA	Caetité - BA	Estrada de Caetité para Brejinho das Ametistas, 5km, 1173 metros.	14°10'66"S, 42°29'10"W	12	J.R. Santos Silva 92

Tabela 6. Caracteres morfológicos utilizados na análise morfométrica das seis populações de *Cattleya pfisteri*, *C. aff. pfisteri* e *C. pabstii*. Valores apresentados pelas populações: média ± desvio padrão, além dos valores de (mínimo - máximo). Medidas apresentadas em centímetros. Ver na tabela 1 o nome das populações.

Caracter	PF-MU	PF-IB	PF-BR	PF-IT	PF-CA	PA-TI
Sépala dorsal						
1-Comprimento	2,35±0,28 (1,8-2,8)	1,64±0,2 (1,2-2)	1,66±0,2 (1,3-2)	1,81±0,21 (1,5-2,3)	1,87±0,27 (1,5-2,4)	2,25±0,33 (1,9-2,7)
2-Largura ¼	0,55±0,09 (0,41-0,7)	0,36±0,04 (0,3-0,46)	0,34±0,05 (0,28-0,46)	0,39±0,04 (0,36-0,51)	0,34±0,07 (0,28-0,5)	0,45±0,19 (0,37-0,78)
3-Largura ½	0,62±0,07 (0,5-0,77)	0,38±0,04 (0,35-0,5)	0,36±0,05 (0,3-0,45)	0,44±0,07 (0,35-0,56)	0,38±0,09 (0,25-0,53)	0,55±0,22 (0,42-0,89)
4-Largura ¾	0,55±0,07 (0,44-0,67)	0,33±0,04 (0,29-0,44)	0,31±0,04 (0,27-0,4)	0,39±0,05 (0,33-0,49)	0,34±0,07 (0,25-0,46)	0,55±0,18 (0,44-0,84)
Sépala lateral						
5-Comprimento	2,09±0,18 (1,8-2,4)	1,51±0,18 (1,1-1,8)	1,51±0,19 (1,1-1,9)	1,64±0,15 (1,3-2)	1,78±0,16 (1,6-2,1)	1,95±0,37 (1,5-2,4)
6-Largura ¼	0,52±0,07 (0,44-0,67)	0,33±0,03 (0,28-0,4)	0,32±0,03 (0,29-0,41)	0,39±0,05 (0,29-0,45)	0,37±0,03 (0,35-0,44)	0,48±0,16 (0,34-0,69)
7-Largura ½	0,65±0,06 (0,56-0,77)	0,41±0,04 (0,37-0,49)	0,38±0,03 (0,35-0,46)	0,49±0,05 (0,38-0,55)	0,44±0,04 (0,4-0,54)	0,58±0,19 (0,45-0,87)
8-Largura ¾	0,61±0,07 (0,52-0,79)	0,35±0,05 (0,31-0,47)	0,32±0,04 (0,29-0,43)	0,44±0,05 (0,37-0,54)	0,41±0,05 (0,34-0,5)	0,60±0,16 (0,52-0,86)
Pétala						
9-Comprimento	2,38±0,33 (1,8-2,9)	1,72±0,23 (1,2-2,1)	1,70±0,22 (1,2-2)	1,97±0,17 (1,6-2,3)	2,02±0,31 (1,6-2,6)	2,13±0,42 (1,7-2,7)
10-Largura ¼	0,61±0,09 (0,48-0,78)	0,35±0,05 (0,29-0,46)	0,33±0,05 (0,27-0,44)	0,42±0,06 (0,32-0,5)	0,38±0,07 (0,33-0,54)	0,53±0,25 (0,36-0,9)
11-Largura ½	0,66±0,1 (0,5-0,83)	0,38±0,05 (0,32-0,5)	0,34±0,05 (0,25-0,44)	0,47±0,06 (0,38-0,56)	0,42±0,09 (0,34-0,6)	0,55±0,25 (0,4-0,94)
12-Largura ¾	0,50±0,1 (0,34-0,74)	0,26±0,04 (0,25-0,39)	0,22±0,05 (0,19-0,35)	0,38±0,06 (0,3-0,47)	0,30±0,07 (0,23-0,48)	0,40±0,16 (0,33-0,69)
Labelo						
13-Comprimento	1,99±0,17 (1,7-2,3)	1,38±0,16 (1,1-1,8)	1,30±0,14 (1-1,5)	1,35±0,16 (1,1-1,6)	1,53±0,11 (1,4-1,7)	1,60±0,18 (1,4-1,8)
total						

Tabela 6. Continuação.

Caracter	PF-MU	PF-IB	PF-BR	PF-IT	PF-CA	PA-TI
Labelo						
14-						
Comprimento da base até.						
início da reentrância	1,16±0,11 (0,97-1,46)	0,82±0,08 (0,67-0,97)	0,79±0,06 (0,75-0,93)	0,74±0,09 (0,65-1,01)	0,83±0,06 (0,78-0,98)	0,90±0,11 (0,76-1,02)
15-Largura do centro até a margem a 1/3 do lobo lateral	0,60±0,06 (0,49-0,74)	0,38±0,03 (0,35-0,49)	0,30±0,05 (0,26-0,42)	0,36±0,07 (0,32-0,56)	0,41±0,07 (0,35-0,55)	0,48±0,04 (0,46-0,55)
16-Largura do centro até a margem a 2/3 do lobo lateral	0,53±0,05 (0,47-0,65)	0,31±0,03 (0,29-0,4)	0,23±0,04 (0,22-0,36)	0,39±0,06 (0,28-0,48)	0,38±0,07 (0,3-0,52)	0,38±0,08 (0,36-0,54)
17-						
Comprimento do lobo terminal	0,53±0,08 (0,38-0,69)	0,36±0,05 (0,25-0,45)	0,34±0,05 (0,26-0,46)	0,36±0,07 (0,3-0,6)	0,43±0,08 (0,34-0,58)	0,45±0,05 (0,42-0,54)
18-Largura do lobo terminal	0,71±0,1 (0,51-0,85)	0,43±0,07 (0,27-0,52)	0,38±0,06 (0,27-0,48)	0,40±0,1 (0,32-0,66)	0,46±0,07 (0,35-0,56)	0,58±0,07 (0,48-0,64)
19-Largura do istmo	0,27±0,05 (0,19-0,35)	0,14±0,03 (0,11-0,24)	0,16±0,03 (0,11-0,22)	0,15±0,03 (0,13-0,22)	0,18±0,03 (0,16-0,24)	0,23±0,09 (0,16-0,33)
20-						
Comprimento do istmo	0,29±0,05 (0,21-0,39)	0,21±0,06 (0,12-0,34)	0,19±0,05 (0,08-0,27)	0,21±0,08 (0,14-0,43)	0,27±0,06 (0,21-0,36)	0,25±0,03 (0,21-0,27)
21-						
Comprimento da base até o final do lobo lateral	1,58±0,13 (1,32-1,85)	1,04±0,13 (0,82-1,34)	0,98±0,11 (0,83-1,2)	1,15±0,15 (0,91-1,4)	1,15±0,1 (0,98-1,35)	1,13±0,05 (1,06-1,18)

Tabela 6. Continuação.

Caracter	PF-MU	PF-IB	PF-BR	PF-IT	PF-CA	PA-TI
Coluna						
22-Comprimento	1,28±0,1 (1,09-1,53)	0,79±0,07 (0,68-0,95)	0,75±0,06 (0,68-0,87)	0,84±0,09 (0,71-1,03)	0,86±0,07 (0,79-1,01)	0,98±0,09 (0,86-1,08)
23-Largura (max)	0,59±0,09 (0,51-0,85)	0,40±0,05 (0,31-0,52)	0,35±0,04 (0,28-0,45)	0,41±0,05 (0,34-0,51)	0,44±0,06 (0,37-0,58)	0,50±0,11 (0,38-0,61)
24-Largura ½	0,56±0,08 (0,45-0,74)	0,38±0,05 (0,25-0,48)	0,33±0,03 (0,28-0,38)	0,39±0,04 (0,32-0,46)	0,38±0,06 (0,33-0,52)	0,45±0,07 (0,38-0,54)
Estigma						
25-Comprimento	0,39±0,05 (0,35-0,53)	0,27±0,04 (0,22-0,35)	0,26±0,04 (0,23-0,35)	0,31±0,03 (0,29-0,39)	0,34±0,03 (0,3-0,41)	0,38±0,07 (0,28-0,44)
26-Largura	0,36±0,05 (0,27-0,48)	0,22±0,03 (0,19-0,29)	0,21±0,04 (0,19-0,3)	0,24±0,03 (0,23-0,34)	0,28±0,03 (0,25-0,35)	0,35±0,08 (0,25-0,42)
Ovário						
27-Comprimento	0,15±0,02 (0,11-0,17)	0,10±0,01 (0,08-0,13)	0,10±0,02 (0,07-0,13)	0,10±0,02 (0,07-0,12)	0,18±0,02 (0,1-0,17)	0,10±0,01 (0,1-0,12)
Folha						
28-Comprimento	7,67±2,43 (4,1-12,7)	10,62±2,07 (7,4-15)	12,73±3,37 (8,5-19,5)	13,44±3,59 (7,6-21,2)	9,03±2,4 (5,4-13,1)	6,45±1,32 (4,9-7,6)
29-Largura ¼	2,06±0,54 (1,1-2,8)	1,87±0,33 (1,5-2,4)	2,16±0,47 (1,3-2,9)	2,27±0,39 (1,5-2,8)	1,68±0,32 (1,1-2,2)	1,75±0,29 (1,4-1,8)
30-Largura ½	2,48±0,56 (1,3-3,4)	2,37±0,4 (1,7-3)	2,60±0,55 (1,6-3,5)	2,60±0,74 (0,5-3,4)	2,06±0,41 (1,2-2,6)	2,18±0,39 (1,8-2,7)
31-Largura ¾	2,34±0,6 (1,2-3,6)	2,26±0,41 (1,5-2,9)	2,51±0,59 (1,4-3,6)	2,58±0,44 (1,8-3,3)	2,02±0,40 (1,3-2,6)	2,10±0,39 (1,7-2,6)
Bulbo						
32-Número de entrenós	4,53±1,43 (3-8)	4,00±0,97 (2-6)	5,07±1,82 (3-8)	4,71±1,14 (3-7)	3,67±0,78 (3-5)	3,25±0,50 (3-4)
33-Comprimento	4,75±1,72 (2,5-8,5)	7,59±1,84 (2,4-10,5)	8,66±3,59 (4,3-14)	11,04±4,67 (5,5-21)	5,90±1,49 (3,3-8,4)	4,60±1,19 (3,1-6)
34-Largura ¼	1,07±0,29 (0,61-1,74)	1,05±0,23 (0,68-1,51)	1,06±0,27 (0,62-1,55)	1,03±0,26 (0,62-1,48)	1,04±0,18 (0,83-1,36)	1,20±0,33 (0,72-1,46)
35-Largura ½	1,31±0,36 (0,65-1,98)	1,43±0,26 (0,96-1,88)	1,46±0,29 (0,68-1,89)	1,36±0,21 (0,96-1,73)	1,44±0,32 (0,95-2,11)	1,50±0,42 (0,91-1,86)

Tabela 6. Continuação.

Caracter	PF-MU	PF-IB	PF-BR	PF-IT	PF-CA	PA-TI
Bulbo						
36-Largura ¾	1,27±0,3 (0,89-1,86)	1,56±0,35 (0,83-2,11)	1,53±0,35 (0,81-2,08)	1,60±0,36 (0,93-2,21)	1,44±0,32 (0,93-2,02)	1,50±0,35 (1,03-1,88)
37-Distância entre o 1º e o 2º entrenó	0,71±0,28 (0,27-1,26)	0,79±0,25 (0,42-1,36)	0,67±0,25 (0,33-1,09)	0,75±0,32 (0,29-1,28)	0,58±0,21 (0,29-0,87)	0,50±0,14 (0,36-0,68)
38-Distância entre o 2º e o 3º entrenó	0,76±0,22 (0,52-1,36)	1,01±0,35 (0,54-1,96)	0,81±0,31 (0,32-1,34)	1,06±0,49 (0,46-2,38)	0,88±0,34 (0,46-1,41)	0,80±0,20 (0,59-1,06)

Tabela 7. Coeficientes estandardizados dos eixos canônicos dos indivíduos das populações de *C. pfisteri*, *C. aff. pfisteri* e *C. pabstii*, expressando a contribuição de cada variável aos eixos. Valores obtidos através de Análise de Variáveis Canônicas (CVA).

Variável	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3	Eixo 4	Eixo 5
Sépala dorsal					
1-Comprimento	-0,24264	0,83054	0,85687	0,54099	-0,23777
2-Largura ¼	0,90570	-1,04683	-0,41134	-0,61207	0,36594
3-Largura ½	1,40856	-1,01504	0,47897	-0,29940	-1,72396
4-Largura ¾	-1,86976	0,85845	0,82128	0,75844	0,51618
Sépala lateral					
5-Comprimento	-0,68127	0,67984	-0,12304	0,41729	0,62242
6-Largura ¼	-0,39457	0,41298	-0,00495	0,05246	0,16220
7-Largura ½	0,31308	-0,27374	-0,21973	0,03598	-0,16299
8-Largura ¾	-0,48918	0,40057	0,52127	0,11552	0,85045
Pétala					
9-Comprimento	0,67783	0,73203	-0,17401	-1,37210	0,19227
10-Largura ¼	0,40613	-0,12111	0,02003	0,65598	0,07862
11-Largura ½	-0,04268	-0,95235	-0,28438	0,81045	-0,42008
12-Largura ¾	-0,06067	0,87984	-0,24033	-1,44605	0,34317

Tabela 7. Continuação.

Variável	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3	Eixo 4	Eixo 5
Labelo					
13-Comprimento total	-0,02312	-0,42557	-0,99695	1,45805	-1,15836
14-Comprimento da base até a reentrância	0,11722	-0,16644	-0,62556	-0,65927	1,26890
15-Largura do centro até a margem a 1/3 do lobo lateral	-0,69209	0,12581	-0,12901	1,15279	-0,62705
16-Largura do centro até a margem a 2/3 do lobo lateral	-0,04299	-0,07118	0,43378	-1,11547	-0,13433
17-Comprimento do lobo terminal	-0,13467	0,27660	0,20505	-0,81368	0,22711
18-Largura do lobo terminal	0,21068	0,30399	0,04048	0,36080	0,84303
19-Largura do istmo	-0,42471	-0,40565	-0,12457	-0,22561	0,12346
20-Comprimento do istmo	0,38949	0,44554	-0,37144	-0,93318	0,69961
21-Comprimento da base até o final do lobo lateral	0,70215	-1,77255	0,70844	-0,84878	-0,63755
Coluna					
22-Comprimento	-1,39502	0,27514	0,15313	0,16633	-0,24922
23-Largura (max)	0,86930	-0,75196	-0,80515	0,19792	0,12452
24-Largura ½	-0,54513	0,38231	0,50088	-0,01374	-0,49905
Estigma					
25-Comprimento	-0,44494	0,07602	-0,08557	-0,56030	0,32136
26-Largura	0,04515	0,18509	0,37472	0,69858	-0,46776
Ovário					
27-Comprimento	0,20858	0,69704	-0,64633	-0,21315	-0,04274
Folha					
28-Comprimento	1,19990	-0,81513	0,05297	-0,25136	0,63568

Tabela 7. Continuação

Variável	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3	Eixo 4	Eixo 5
Folha					
29-Largura ¼	0,26733	-1,05850	1,24565	0,40858	0,27203
30-Largura ½	-0,35754	0,82195	-1,25351	-0,20315	0,08252
31-Largura ¾	-0,17396	0,11706	-0,24309	0,20401	-0,61972
Bulbo					
32-Número de entrenós	-0,16559	-0,39283	0,20998	0,00963	0,95172
33-Comprimento	-0,20830	0,27356	0,45407	-0,08979	-0,80592
34-Largura ¼	0,28817	-0,26367	0,59640	0,05797	0,26983
35-Largura ½	-0,00924	0,39116	-0,64198	0,27390	-0,05079
36-Largura ¾	-0,14095	0,03892	0,42305	0,36503	-0,52374
37-Distância entre o 1º e o 2º entrenó	-0,01024	-0,85355	0,11827	0,32697	-0,15390
38-Distância entre o 2º e o 3º entrenó	-0,13917	0,30850	0,33514	-0,12722	0,08565

Tabela 8. Classificação dos indivíduos da análise de discriminantes das quatro populações de *Cattleya pfisteri*, da população de *C. aff. pfisteri* e a população de *C. pabstii*. Veja a Tabela 1 com o nome das populações.

Populações	Percentual correto	PF-MU	PF-IB	PF-BR	PF-IT	PF-CA	PA-TI
PF-MU	100,00	19	0	0	0	0	0
PF-IB	100,00	0	16	0	0	0	0
PF-BR	100,00	0	0	14	0	0	0
PF-IT	92,86	0	0	1	13	0	0
PF-CA	100,00	0	0	0	0	12	0
PA-TI	100,00	0	0	0	0	0	4
Total	98,73	19	16	15	13	12	4

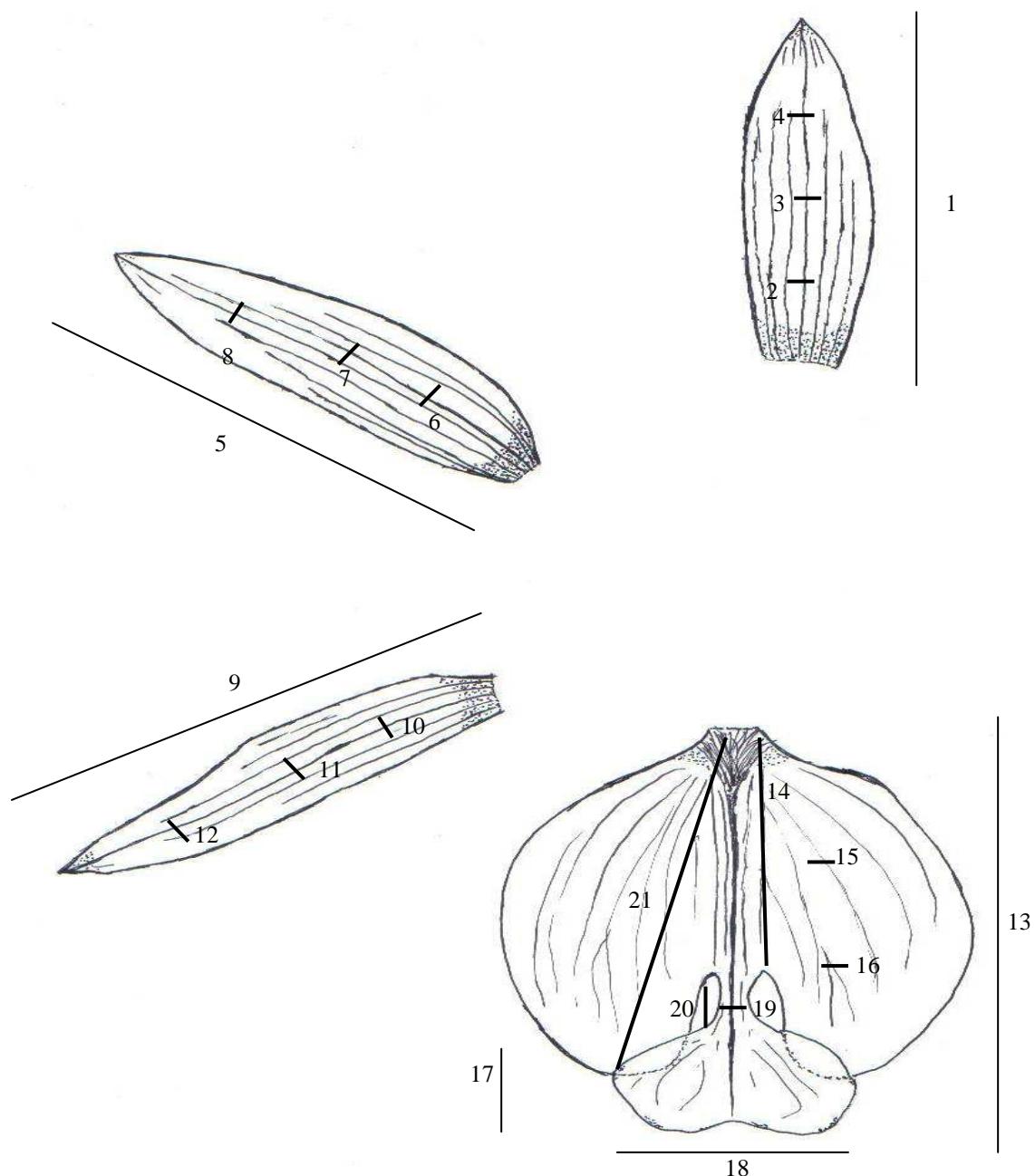


Figura 7. Caracteres morfológicos florais contínuos usados na análise morfométrica das seis populações de *Cattleya pfisteri*, *C. aff. pfisteri*. e *C. pabstii*. 1,5,9,13 – Comprimento; 2,6,10 - Largura $\frac{1}{4}$; 3,7,11 - Largura $\frac{1}{2}$; 4,8,12 - Largura $\frac{3}{4}$; 14 - Comprimento da base até início da reentrância; 15 - Largura do centro até a margem a $\frac{1}{3}$ do lobo lateral; 16 - Largura do centro até a margem a $\frac{2}{3}$ do lobo lateral; 17 - Comprimento do lobo terminal; 18 - Largura do lobo terminal; 19 - Largura do istmo; 20 - Comprimento do istmo; 21 - Comprimento da base até o final do lobo lateral.

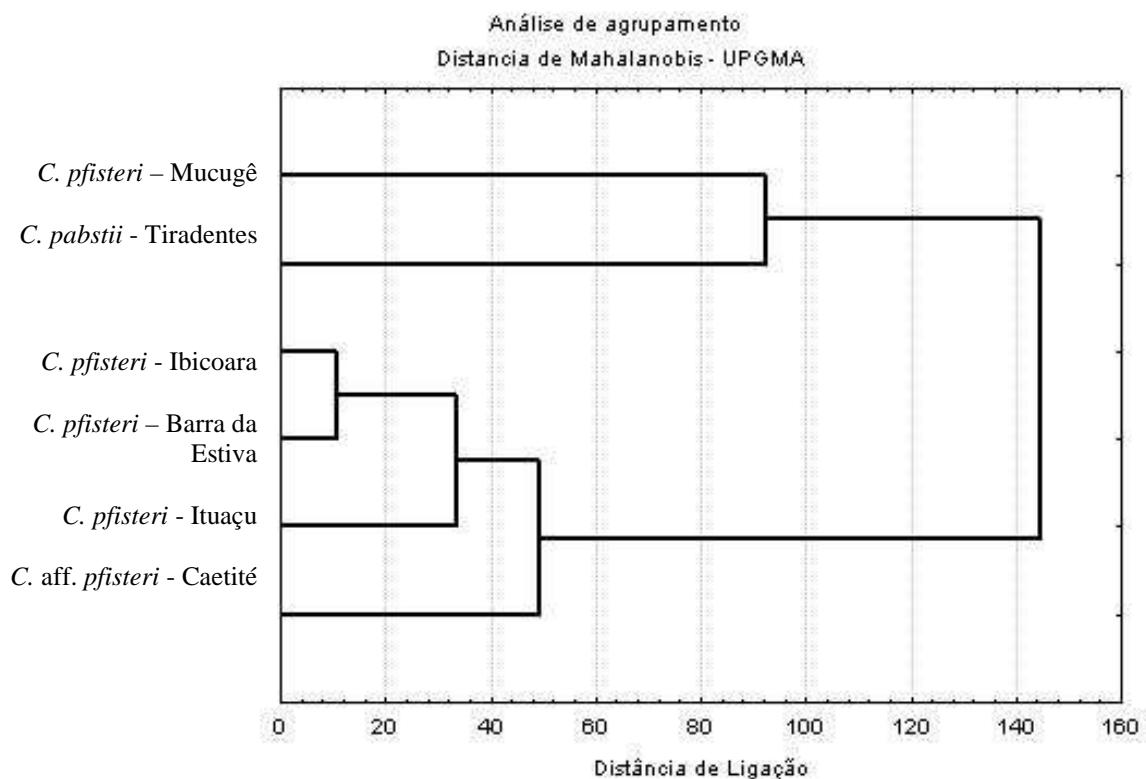


Figura 8. Dendrograma mostrando as relações entre as populações de *Cattleya pfisteri*, *C. aff. pfisteri* e *C. pabstii* utilizando UPGMA como algoritmo de agrupamento através da distância de Mahalanobis.

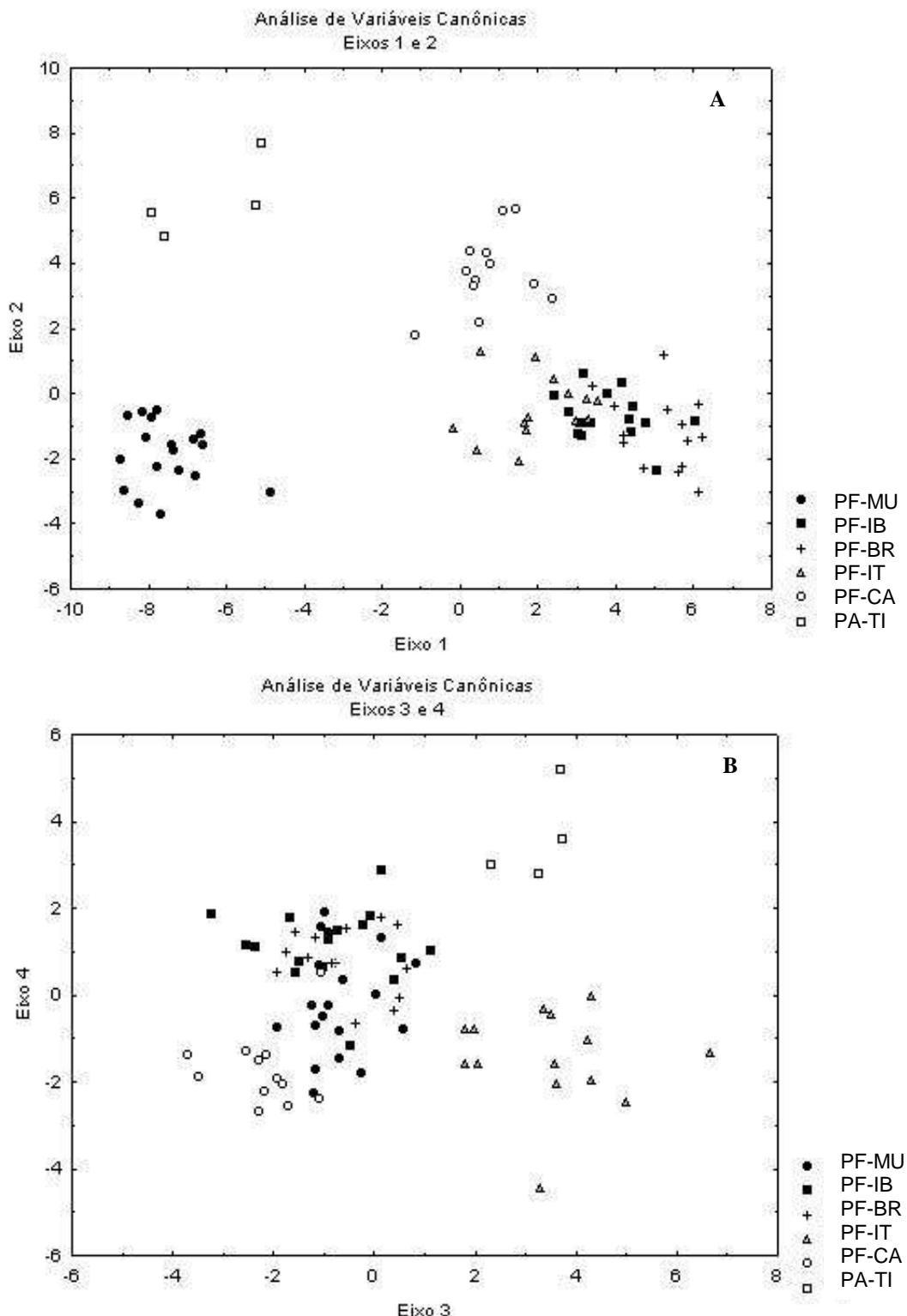


Figura 9. Representação gráfica dos escores dos indivíduos das populações de *C. pfisteri*, *C. aff. pfisteri* e *C. pabstii* nos quatro primeiros eixos mais significativos da análise de variáveis canônicas baseadas em 38 caracteres. Ver código na tabela 1. Percentual da variação de cada eixo: **A**- eixo 1 - 67,62%, eixo 2 - 14,23%, **B**- eixo 3 - 10,65% e eixo 4 - 5,23%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conhecer a diversidade populacional e a distribuição de um táxon é importante para o estabelecimento de estratégias de conservação efetivas. Quando se trata de uma espécie com uma distribuição restrita e endêmica de uma região, a conservação de uma área com maior índice de diversidade genética pode ser fundamental para a manutenção desta espécie. O uso de marcadores moleculares tem sido útil para a resolução dos problemas relacionados com a conservação ambiental, e, juntamente com a morfometria, podem estabelecer as relações entre as populações.

Ficou constatado que as populações de *Cattleya pfisteri* de Ituaçu, Ibicoara e Barra da Estiva apresentaram o mesmo *pool* gênico, e os dados morfológicos comprovaram essa relação coesa entre essas três populações. A população de Mucugê apresentou um padrão morfológico diferenciado decorrente de introgessão encontrada entre esta população de *C. pfisteri* e *C. sincorana*. Apesar da diferenciação morfológica, os dados genéticos indicam que esta população de Mucugê está bastante próxima das demais populações de *C. pfisteri*, em que todas as diferenças são decorrentes do processo de introgessão. Este resultado pode ser explicado pelo padrão de auto-incompatibilidade encontrado por Silva-Pereira *et al.* (2007) que encontrou barreiras unilaterais ao fluxo gênico. Ainda se tratando da população de Mucugê de *C. pfisteri* deve-se atender a possibilidade dessa população se isolar reprodutivamente e, decorrente dessa introgessão estabelecer-se como um táxon novo. Em estudo realizado com a população de *C. sincorana* do mesmo local, Borba *et al.* (2007b) verificou alguma diferenciação no padrão molecular e morfométrico desta população e justificou a variação desta população pela deriva genética, baseado no trabalho de Silva-Pereira *et al.* (2007) que verificou a compatibilidade entre esta população e a *C. pfisteri*. Nossos dados sugerem que talvez esta diferenciação possa ser causada por introgessão de *C. pfisteri* em *C. sincorana*, porém estudos de ISSR com outras populações de *C. sincorana* precisam ser feitos para verificar esta possibilidade.

Os dados moleculares e morfométricos apresentaram padrões distintos nos dendrogramas. Scotland *et al.* (2003) compararam alguns resultados encontrados através de caracteres morfológicos e estudos moleculares e observaram que nem sempre os dendrogramas encontrados foram congruentes nos diferentes dados, como observado nos trabalhos de Baker *et al.* (1998) e Patterson *et al.* (1993). Neste estudo

somente os resultados para as populações de Ituaçu, Ibicoara e Barra da Estiva de *C. pfisteri* apresentaram uma congruência nos dados morfológicos e genéticos.

A população de *C. aff. pfisteri* em Caetité apresentou um padrão morfológico próximo ao das *C. pfisteri*. Entretanto, essa população mostrou uma diferenciação alélica que a colocou em posição distante de *C. pfisteri*, e tão bem diferenciada como as outras espécies de *Cattleya* incluídas no estudo. Devido à diferenciação molecular da população *C. aff. pfisteri* em Caetité podemos considerá-la como uma espécie nova com *pool* gênico diferente, com florescimento mais precoce, um mecanismo de isolamento reprodutivo temporal. Assim, torna-se necessário estabelecer estratégias para conservação desta população bem como a preservação do seu habitat, além do esclarecimento aos habitantes das comunidades locais.

Um trabalho envolvendo tanto dados morfométricos como moleculares como este é fundamental para definir os padrões de variabilidade de populações dentro de uma espécie, bem como os padrões envolvendo espécies próximas, permitindo esclarecimentos específicos sobre cada espécie apresentada neste trabalho, como já desenvolvido com outras espécies de Orchidaceae (Borba *et al.* 2002; Ribeiro 2006; Borba *et al.* 2007a; Borba *et al.* 2007b; Cruz 2007)

A conservação de táxons através de dados populacionais tem que estar relacionada diretamente com estudos ecológicos e evolutivos. É de impescindível importância a preservação de áreas para espécies com distribuição restrita, e conhecendo a diversidade genética da espécie pode-se inferir uma melhor área para preservação deste patrimônio gênico, através da implementação de programas de preservação ambiental e de esclarecimento dos habitantes das comunidades locais.

Para se estabelecer a proteção e manejo de uma espécie é necessário ter uma compreensão da sua história natural e quando se conhece a variabilidade genética e morfométrica das populações e seu parentesco é estabelecido pode-se então criar estratégias de conservação, como a preservação do ambiente natural, retirada de amostras populacionais para um Jardim Botânico e/ou criação de um banco de sementes. A preservação das populações em seu habitat natural é sempre o ideal visto que as espécies poderão dar continuidade a processos adaptativos e evolutivos dentro de um ambiente natural (Primack & Rodrigues 2001). Os resultados indicam que a montagem de um banco de sementes e a conservação de uma das populações de *C. pfisteri* (Ibicoara, Ituaçu e Barra da Estiva) é suficiente para manutenção dessa espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott R.A., James J.K., Milne R.I., Gillies A.C.M. (2003) Plant introductions, hybridization and gene flow. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1123–1132.
- Abbott R.J., Ireland H.E., Joseph L., Davies M.S., Rogers H.J. (2005) Recent plant speciation in Britain and Ireland: origins, establishment and evolution of four new hybrid species. *Biol. and Envir.* 105b:173-183.
- Archibald J.K., Mort M.E., Crawford D.J., Santos-Guerra A. (2006) Evolutionary relationships within recently radiated taxa: comments on methodology and analysis of inter-simple sequence repeat data and other hypervariable, dominant markers. *Taxon* 55: 747–756.
- Arnold M.L. (1993) *Iris Nelsonii* (Iridaceae): Origin and genetic composition of homoploid hybrid species. *Amer. J. Bot.* 80 : 577-583.
- Arnold M.L. (1994) Natural hybridization and Louisiana irises: defining a major factor in plant evolution. *BioScience* 44:141-147
- Arnold M.L., Kentner E.K., Johnston J.A., Cornman S., Bouck A.C. (2001) Natural hybridization and fitness. *Taxon* 50:281-292.
- Avise J.C. (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution. London: Chapman & Hall. pp. 511.
- Azevedo C.O., Borba E.L., van den Berg C. (2006) Evidence of natural hybridization and introgression in *Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & Barros and *B. weddellii* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil, by using allozyme markers. *Rev. Brasil. Bot.* 29: 415-421.
- Azevedo C.O., van den Berg C. (2007a) Análise comparativa de áreas do campo rupestre da cadeia do Espinhaço (Bahia e Minas Gerais, Brasil) baseadas em espécies de orchidaceae. *Sitientibus ser. Ciênc. Biol.* 7: 199-210.
- Azevedo C.O., van den Berg C. (2007b) A família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. *Hoehnea* 34: 1-47.
- Baker R.H., Xiaobo Y., Desalle R. (1998) Assessing the relative contribution of molecular and morphological characters in simultaneous analysis trees. *M. Phylogenetic Evol.* 9:427–436.
- Bao J., Corke H., Sun M. (2006) Analysis of genetic diversity and relationships in waxy rice (*Oryza sativa* L.) using AFLP and ISSR markers. *Genet. Res. Crop Evol.* 53: 323–330.

- Baumel A., Ainouche M.L., Misset M.T., Gourret J-P., Bayer R.J. (2003) Genetic evidence for hybridization between the native *Spartina maritima* and the introduced *Spartina alterniflora* (Poaceae) in South-West France: *Spartina x neyrautii* re-examined. *Plant Syst. Evol.* 237: 87-97.
- Borba E.L., Semir J. (1998) *Bulbophyllum x cipoense* (Orchidaceae), a new natural hybrid from the Brazilian “campos rupestres”: description and biology. *Lindleyana* 13: 113-120.
- Borba E.L., Felix J.M., Solberini V.N., Semir J. (2001) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *Amer. J. Bot.* 88: 419-428.
- Borba E.L., Sheperd G.J., Van Den Berg C., Semir J. (2002) Floral and vegetative morphometrics in five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: Correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. *Ann. Bot.* 90: 219-230.
- Borba E.L., Funch R.R., Ribeiro P.L., Smidt E.C., Silva-Pereira V. (2007a) Demografia, variabilidade genética e morfológica e conservação de *Cattleya tenuis* (Orchidaceae), espécie ameaçada de extinção da Chapada Diamantina. *Sitientibus Ser. Ciênc. Biol.* 7: 211-222.
- Borba E.L., Funch R.R., Ribeiro P.L., Smidt E.C., Silva-Pereira V. (2007b) Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophronitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. *Pl. Syst. Evol.* 267: 129–146.
- Bussell J.D., Waycott M., Chappill J.A. (2005) Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. *Perspectives in Plant. Ecol., Evo. and Syst.* 7: 3–26.
- Cardim D.C., Carlini-Garcia L.A., Mondin M., Martins M., Veasey E.A., Ando A. (2001) Variabilidade intra-específica em cinco populações de *Oncidium varicosum* Lindl. (Orchidaceae-Oncidiinae) em Minas Gerais Bras. *Bot.* 24 : 553-560.
- Carlini-Garcia L.A., van den Berg C., Martins P.S. (2002) A morphometric analysis of floral characters in *Miltonia spectabilis* and *Miltonia spectabilis* var. *moreliana* (Maxillarieae: Oncidiinae). *Lindleyana* 17: 122-129.

- Carvalho A., Matos M., Lima-Brito J., Guedes-Pinto H., Benito C. (2005) DNA fingerprint of F1 interspecific hybrids from the *Triticeae* tribe using ISSRs. *Euphytica*. 143: 93–99.
- Castro V.P., Marçal S. (2006) *Hoffmannseggella diamantinensis* Castro & Marçal, une espèce nouvelle. *Richardiana*. 6: 113-117.
- Chiron G.R., Castro Neto V.P., Guiard J. (2003) Sur la phylogénie du genre *Hadrolaelia* (Orchidaceae). *Richardiana* 3: 74-89.
- Conceição A.A., Pirani J.R. (2005) Delimitação de habitats em campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia: substratos, composição florísticas e aspectos estruturais. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 23: 85-111.
- Conceição A.A., Pirani J.R. (2007) Diversidade em quatro áreas de campos rupestres na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: Espécies distintas, mas riquezas similares. *Rodriguésia* 58 : 193-206.
- Conceição A.S. (2006) Filogenia do gênero *Chamaecrista* (Leguminosae-Cesalpinioidae) e taxonomia do grupo *Baseophyllum*. Tese de doutorado pela Universidade Estadual de Feira de Santana. pp 204.
- Cozzolino S., Nardella A.M., Impagliazzo S., Wildmer A., Lexer C. (2006) Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: Should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biol. Cons.* 129: 14-23.
- Cruz D.T. (2007) Variabilidade genética e morfológica de populações de *Cattleya elongata* Barb.Rodr. (Orchidaceae) na Chapada Diamantina, Bahia. Universidade Estadual de Feira de Santana, M.Sc. Dissertação. pp.61.
- Deshpande A.U., Apte G.S., Bahulikar R.A., Lagu M.D., Kulkarni B.G., Suresh H.S., Singh N.P., Rao M.K.V., Gupta V.S., Pant A., Ranjekar P.K. (2001) Genetic diversity across natural populations of three montane plant species from the Western Ghats, India revealed by intersimple sequence repeats. *Mol. Ecol.* 10:2397–2408.
- Djé Y., Tahi G.C., Zoro Bi I.A., Malice M., Boudoin J.P., Bertin P. (2006) Optimization of ISSR marker for African edible-seeded *Cucurbitaceae* species' genetic diversity analysis. *African J. of Biotechnology* 5 : 83-87.
- Dressler R.L. (1981) The orchids: natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler R.L. (1993) Phylogeny and Classification of the orchid family, Dioscorides Press, Portland, Oregon. 314p.

- Esselman E.J., Jianqiang L., Crawford D.J., Winduss J.L., Wolfe A.D. (1999) Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol. Ecol.* 8: 443–451.
- Fawk D.A., Holsinger K.E. (1991) Genetics and conservation of rare plants. New York. Oxford University Press.
- Galván M.Z., Bornet B., Balatti P..A., Branchard M. (2003) Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica*. 132: 297–301.
- García-Maroto F., Garrido-Cárdenas J.A., Gómez-Mercado F., Guil-Guerrero J.L., Alons D.L. (2003) Natural hybridisation and phylogenetic position of *Saxifraga trabutiana* (Saxifragaceae) inferred from ISSR markers and ITS sequences. *Ann. Bot. Fennici* 40:5-13.
- Ge X-J., Yu Y., Yuan Y-M., Huang H-W., Yang C. (2005a) Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert regions of northwest China as revealed by ISSR analysis. *Ann. Bot.* 95: 843–851.
- Ge X-J., Zhou X-L., Li Z-C., Hsu T-W., Schaal B.A., Chiang T-Y. (2005b) Low genetic diversity and significant population structuring in the relict *Amentotaxus argotaenia* complex (Taxaceae) based on ISSR fingerprinting. *J. Plant Res.* 118:415–422.
- Giulietti A.M., Menezes N.L., Pirani J.R., Meguro M., Wanderley M.G.L. (1987) Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 9: 1-151.
- Giulietti A.M., Harley R.M., Wanderley M.G.L., Pirani J.R. (2000) Caracterização e endemismos nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. In: Cavalcanti, T.B. , Walter, J.L. (eds.) Tópicos Atuais de Botânica. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos. 311-318.
- Goldman D.H., Orzell S.L. (2000) Morphological, geographical, and ecological re-evaluation of *Calopogon multiflorus* (Orchidaceae). *Lindleyana* 15: 237-251.
- Goldman D.H., Jansen R.K., van den Berg C., Leitch I.J., Fay M.F., Chase M.W. (2004a) Molecular and cytological examination of *Calopogon* (Orchidaceae,

- Pidendroideae): circumscription, phylogeny, polyploidy, and possible hybrid speciation. Amer. J. Bot. 91: 707–723.
- Goldman D.H., van den Berg C., Griffith M.P. (2004b) Morphometric circumscription of species and infraspecific taxa in *Calopogon* R.Br. (Orchidaceae) Plant Syst. Evol. 247: 37–60.
- González A., Wong A., Delgado-Salinas A., Papa R., Gepts P. (2005) Assessment of Inter Simple Sequence Repeat Markers to Differentiate Sympatric Wild and Domesticated Populations of Common Bean. Crop Science 45:606-615.
- Grant V. (1981) Plant speciation, 2^a ed. Columbia University Press, New York.
- Guasmi F., Ferchichi A., Farés K., Touil L. (2006) Identification and differentiation of *Ficus carica* L. cultivars using inter simple sequence repeat markers. African J. Biotech. 5 : 1370-1374.
- Hair JF., Anderson RE., Tatham RL., Black WC. (2005) Análise Multivariada de Dados. 5^a ed. Porto Alegre: Bookman. 593p.
- Hao G., Lee D-H., Lee J.S., Lee N.S. (2002) A study of taxonomical relationships among species of Korean *Allium* sect. *Sacculiferum* (Alliaceae) and related species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Bot. Bull. Acad. Sin. 43: 63-68.
- Harley R.M., Simmons N.A. (1986) Florula of Mucugê: Chapada Diamantina – Bahia, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew
- Hartl D.L. (2000) A primer of population genetics 3^a ed. Sinauer Associates, Massachusetts, U.S.A. 221p.
- Hassel K., Gunnarsson U. (2003) The use of inter simple sequence repeats (ISSR) in bryophyte population studies. Linbergia 28: 152-157.
- Jain S.K., Martins P.S. (1979) Ecological genetics of the colonizing ability of rose clover (*Trifolium histun* Alb.). Amer. J. Bot. 66: 361-366.
- Jian S., Tang T., Yang Zhong Y., Shi S. (2004) Variation in inter-simple sequence repeat (ISSR) in mangrove and non-mangrove populations of *Heritiera littoralis* (Sterculiaceae) from China and Australia. Aquatic Bot. 79:75–86.
- Jin Y., He T., Lu B-R. (2003) Fine scale genetic structure in a wild soybean (*Glycine soja*) population and the implications for conservation. New Phytologist 159: 513–519.
- Johnson R.A., Wichern D.W. (1998) Applied Multivariate Statistical Analysis. 4^a ed. Editora Prentice-Hall. New Jersey, USA. 816p.

- Kumar L.D., Kathirvel M., Rao G.V., Nagaraju J. (2001) DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays. *For. Sci. Int.* 116 : 63-68.
- Lacerda K.G. (2006) Deux nouveaux hybrides naturels de *Hoffmannseggella* (Orchidaceae). *Richardiana*. 6: 62-72.
- Lin W.X., He H.Q., Chen X.X., Xiong J., Song B.Q., Liang Y.Y., Liang K.J. (2005) Use of ISSR molecular marker approach to estimate genetic diversity in rice and barley allelopathy. Fourth World Congress in Allelopathy held at Charles Sturt University (CSU), Wagga Wagga, NSW Australia 21-26.
- Lu Z., Wang Y., Peng Y., Korpelainem H., Li C. (2006) Genetic diversity of *Populus cathayana* Rehd populations in southwestern China revealed by ISSR markers. *Plant Sci.* 170: 407-412.
- Martins P.S., (1987) Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação "in situ" IPEF 35 :71-78.
- Masumbuko L.I., Bryngelsson T. (2006) Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of diploid coffee species and cultivated *Coffea arabica* L. from Tanzania. *Gen. Res. and Crop Evol.* 53: 357–366.
- McRoberts N., Sinclair W., Mcpherson A., Franke A.C., Saharan R.P., Malik R.K., Singh S., Marshall G. (2005) An assessemnt of genetic diversity within and between populations of *Phalaris minor* using ISSR markers. *Weed res.* 45:431-439.
- Meloni M., Perini D., Filligheddu R., Binelli G. (2006) Genetic variation in five mediterranean populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *Ann. Bot.* 97: 299–304.
- Monteiro Lr., Reis Sf. (1999) Princípios de morfometria geométrica. Holos, Ribeirão Preto, 188p.
- Nkongolo K.K., Michael P., Demers T. (2005) Application of ISSR, RAPD, and cytological markers to the certification of *Picea mariana*, *P. glauca*, and *P. engelmannii* trees, and their putative hybrids. *Genome* 48: 302–311.
- Nybom H. (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 13:1143–1155.
- Pabst G.F.J., Dungs F. (1975) Orchidaceae Brasiliensis Vol. 1. Brucke-Verlag Kurt Schmersow, Hildesheim, Alemanha.

- Pabst G.F.J., Dungs F. (1977) Orchidaceae Brasiliensis Vol. 2. Brucke-Verlag Kurt Schmersow, Hildesheim, Alemanha.
- Patterson C., Williams D.M., Humphries C.J. (1993) Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24:153–188.
- Primack R.B., Rodrigues E. (2001) Biologia da Conservação Londrina. p. 328.
- Pritchard JK., Rosenberg NA. (1999) Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 220–228.
- Raina S.N., Rani V., Kojima T., Ogiwara Y., Singh K.P., Devarumath R.M. (2001) RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* 44: 763–772.
- Rencher A.C. (2002) Methods of multivariate analysis 2^a ed. John wiley , sons, Canadá 732p.
- Rhymer J.M., Simberloff D. (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 27: 83-109.
- Ribeiro P.L., Borba E.L., Toscano-de-Brito A.L.V. (2005) O gênero *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Ver. Bras. Bot.* 28: 423-439.
- Ribeiro P.L. (2006) Variabilidade genética e morfológica intra e interpopulacional no complexo *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) ocorrente nos campos rupestres: implicações taxonômicas e biogeográficas. Universidade Estadual de Feira de Santana, MSc. Dissertação. 67p.
- Rieseberg L.H., Ellstrand N.C. (1993) What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Crit. Rev. Pl. Sci.* 12: 213-241.
- Rieseberg L.H. (1995) The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *Amer. J. Bot.* 82: 944-953.
- Rieseberg L.H. (2000) Crossing relationships among ancient and experimental sunflower hybrid lineages. *Evolution*. 54 : 859-865.
- Rohlf F. (1990) Morphometrics. *Ann. Rev. Ecol. and Syst.* 21: 299 – 316.
- Romero R. (2002) Diversidade da flora de campos rupestres de Goiás, sudoeste e sul de Minas Gerais. In: Araújo EL., Moura AN., Sampaio EVSB., Gestinari LMS., Carneiro JMT. (eds.) Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco.

- Ruas P.M., Ruas C.F., Rampim L., Carvalho V.P., Ruas E.A., Sera T. (2003) Genetic relationship in *Coffea* species and parentage determination of interspecific hybrids using ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) markers. *Genet. Mol. Biol.* 26: 319-327.
- Scarano M.T., Abbate L., Ferrante S., Lucretti S., Tusa N. (2002). ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin. *Plant Cell Rep.* 20: 1162-1166.
- Scotland R.W., Olmstead R.G., Bennett J.R. (2003) Phylogeny reconstruction: The role of Morphology. *Syst. Biol.* 52 : 539-548.
- Sheng Y., Zheng W., Pei K., Ma K. (2005) Genetic variation within and among populations of a Dominant Desert Tree *Haloxylon ammodendron* (Amaranthaceae) in China. *Ann. Bot.* 96: 245-252.
- Sica M., Gamba G., Montieri S., Gaudio L., Aceto S. (2005) ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. *BMC Genetics* 6:17.
- Sicard D., Nanni L., Porfiri O., Bulfon D., Papa R. (2005) Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. *Plant Breeding* 124: 464-472.
- Silva-Pereira V., Smidt E.C., Borba E.L. (2007) Isolation mechanisms between two sympatric *Sophronitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. *Plant Syst. Evol.* 269: 171–182.
- Slotta T.A.B., Porter D.M. (2006) Genetic variation within and between *Iliamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation. *Botanical J. of the Linn. Soc.* 151: 345–354.
- Smissen R.D., Breitwieser I., Ward J.M., Mclenachan P.A., Lockhart P.J. (2003) Use of ISSR profiles and ITS-sequences to study the biogeography of alpine cushion plants in the genus *Raoulia* (Asteraceae). *Plant. Syst. Evol.* 239: 79–94.
- Smith J.L., Hunter K.L., Hunter R.B. (2002) Genetic variation in the terrestrial orchid *Tipularia discolor*. *Southeastern Nat.* 1: 17-26.
- Solé-Cava A.M. (2004) Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli SR. (ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos. p. 172-192.
- Stannard B.L. (ed.) (1995). Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina – Bahia, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew.

- Sunnucks P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Tree* 15: 199-202.
- ToscanodeBrito A.L.V. (1998) *Orchidaceae* In: Guedes M.L.S., Orge M.D. (eds.) Checklist das espécies vasculares do Morro do Pai Inácio (Palmeiras) e Serra da Chapadinha (Lençóis), Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. Salvador: UFBA
- Tremblay R.L., Ackerman E.M., Kapan D. (2006) Do epiphytic orchids behave as metapopulations? Evidence from Colonization, extinction rates and asynchronous population dynamics. *Biol. Cons.* 129: 70-81.
- Tremblay RL. (2006) The effect of population structure, plant size, herbivory and reproductive potential on effective population size in the temperate epiphytic orchid, *Sarcochilus australis*. *Cunninghamia* 9(4): 529–535.
- Van den Berg C. (1996) Estudo da variabilidade intra e interespecífica em populações de espécies brasileiras de *Cattleya* (Orchidaceae-Laeliinae). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 164 p.
- van den Berg C., Higgins W.E., Dressler R.L., Whitten W.M., Soto Arenas M.A., Culham A., Chase M.W. (2000) A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from Internal Transcribed Spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana*. 15: 96-114.
- Van den Berg C., Chase MW. (2000) Nomenclatural notes on Laeliinae—I. *Lindleyana* 15(2): 115–119.
- van den Berg C., Chase M.W. (2004) A reappraisal of Laeliinae: taxonomic history, phylogeny and new generic alliances. *Orchid Dig.* 68: 221-226.
- van den Berg C., Azevedo C.O. (2005) Orquídeas. In: Juncá F.A., Funch L., Rocha W. (org.) Biodiversidade e conservação da Chapada Diamantina. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp. 195-208.
- van den Berg C. (2008) New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). *Neodiversity* 3: 3-12.
- Withner C.L. (1988) The Cattleyas and their relatives. Vol. I. The Cattleyas. Timber Press, Portland, pp. 153.
- Wolfe A.D., Xiang Q.Y., Kephart S.R. (1998) Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) bands. *Mol. Ecol.* 7: 1107-1125.

- Wolfe A.D., Randle C.P. (2001) Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. *Syst. Bot.* 26 : 120–130.
- Wu H., Pratley J., Lemerle D., Haig T. (1999). Crop Cultivars with Allelopathy Capability. *Weed Research.* 39:171-180.
- Zhivotovsky LA. (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Mol. Ecol.*, 8: 907-913.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda, D.1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.