

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRÍCIA CRISTINA LEMOS GOMES

**VARIABILIDADE GENÉTICA HISTÓRICA E ATUAL DE *Cattleya lobata* Lindl. E
Cattleya xanthina (Lindl.) van den Berg (ORCHIDACEAE), ESPÉCIES
MICROENDÊMICAS DA MATA ATLÂNTICA**

CURITIBA

2013

PATRICIA CRISTINA LEMOS GOMES

**VARIABILIDADE GENÉTICA HISTÓRICA E ATUAL DE *Cattleya lobata* Lindl. E
Cattleya xanthina (Lindl.) van den Berg (ORCHIDACEAE), ESPÉCIES
MICROENDÊMICAS DA MATA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica, no Curso de Pós-Graduação Botânica, Área de Concentração em Taxonomia e Diversidade (Fanerógamas e Pteridófitas), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dra. Viviane da Silva Pereira

Co-orientador: Dr. Eric de Camargo Smidt

CURITIBA

2013



270^a.
2013

Ata de Julgamento da Dissertação de Mestrado da pós-graduanda **PATRÍCIA CRISTINA LEMOS GOMES**. Aos vinte e cinco de março de dois mil e treze, às treze horas e trinta minutos na Sala 421, no Bloco da Botânica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, na presença da Comissão Examinadora, composta pelos Professores Doutores Viviane da Silva Pereira (UFPR) presidente e orientadora, Cássio van den Berg (UEFS) e Miriam Kaehler (UFPR) como titulares, foi aberta a sessão de julgamento da Dissertação intitulada: **“VARIABILIDADE GENÉTICA HISTÓRICA E ATUAL DE *Cattleya lobata* Lindl. E *Cattleya xanthina* Lindl. (ORCHIDACEAE), ESPÉCIES MICROENDÊMICAS DA MATA ATLÂNTICA”**. Após a apresentação, perguntas e esclarecimentos acerca da Dissertação, a Comissão Examinadora **APROVA O TRABALHO DE CONCLUSÃO DA ALUNA PATRÍCIA CRISTINA LEMOS GOMES**. Nada mais havendo a tratar, encerrou-se a sessão da qual foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos componentes da Comissão Examinadora.

Prof^a Dr^a Viviane da Silva Pereira (UFPR)

Prof Dr Cássio van den Berg (UEFS)

Prof^a Dr^a Miriam Kaehler (UFPR)



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BOTÂNICA



Título: Mestre em Ciências Biológicas - Área de Botânica.

Dissertação: “VARIABILIDADE GENÉTICA HISTÓRICA E ATUAL DE *Cattleya lobata* Lindl. E *Cattleya xanthina* Lindl. (ORCHIDACEAE), ESPÉCIES MICROENDÊMICAS DA MATA ATLÂNTICA”

Candidata: PATRÍCIA CRISTINA LEMOS GOMES

Titulares: Prof^a Dr^a Viviane da Silva Pereira (UFPR)- PRESIDENTE
Prof Dr Cássio van den Berg (UEFS)
Prof^a Dr^a Miriam Kaehler (UFPR)

Suplente: Prof^a Dr^a Mayara Krasinski Caddah (UNICAMP)

Parecer: A Comissão Examinadora, reunida nesta data, nas dependências do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, analisando o conteúdo, a forma, a apresentação e a defesa da Dissertação, APROVA O TRABALHO DE CONCLUSÃO DO ALUNO PATRÍCIA CRISTINA LEMOS GOMES. É de parecer que constitui um trabalho científico e recomenda a sua publicação, após as correções sugeridas.

A candidata tem 60 (sessenta) dias para as correções propostas pela Comissão, para que se possa dar continuidade ao processo.

OBS.: O grau de Mestre fica condicionado à comprovação de ter submetido pelo menos um artigo para publicação em revista técnico-científica com corpo editorial, bem como a entrega da versão definitiva da Dissertação, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, a contar desta data.

Curitiba, 25 de março de 2013

Prof^a Dr^a Viviane da Silva Pereira (UFPR)

Prof Dr Cássio van den Berg (UEFS)

Prof^a Dr^a Miriam Kaehler (UFPR)

Ciente Candidata



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BOTÂNICA



**“VARIABILIDADE GENÉTICA HISTÓRICA E ATUAL DE
Cattleya lobata Lindl. E Cattleya xanthina Lindl.
(ORCHIDACEAE), ESPÉCIES MICROENDÊMICAS DA
MATA ATLÂNTICA”**

por

PATRÍCIA CRISTINA LEMOS GOMES

Dissertação aprovada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre no Programa
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão
formada pelos Professores

Profª Drª Viviane da Silva Pereira (UFPR)- PRESIDENTE

Prof Dr Cássio van den Berg (UEFS)

Profª Drª Miriam Kaehler (UFPR)

Curitiba, 25 de março de 2013.

*Dedico este trabalho a meus pais, João e Ana, pelo amor,
força e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho:

À Professora Doutora Viviane da Silva Pereira pelos conhecimentos transmitidos, pela confiança e bons conselhos dados ao longo desses anos de trabalho em conjunto.

Ao Professor Doutor Eric de Camargo Smidt pela excelente co-orientação, pela força e pelas oportunidades proporcionadas a minha formação.

Aos meus orientadores, o meu agradecimento, por acreditarem em mim, compreenderem minhas dificuldades e me incentivarem diante das dificuldades.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Paraná.

Ao pesquisador Cláudio Nicoletti de Fraga pela oportunidade de trabalhar com espécies de orquídeas tão maravilhosas e pelas valiosas informações necessárias ao desenvolvimento desta pesquisa.

A toda a equipe de coleta do Projeto CORES.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e ao CNPq pela ajuda financeira do projeto.

Ao grande amigo e pesquisador Doutor Antônio Luiz Vieira Toscano de Brito que me acolheu com imenso carinho no Marie Selby Botanical Gardens (Flórida), por todos os ensinamentos pessoais e profissionais, pela paciência e as boas gargalhadas.

À queridíssima Mônica Bolson, pelo companheirismo e carinho, pela paciência de me aturar por dois meses na Flórida. Muito obrigada por me ouvir nos momentos difíceis da minha vida!!!

À Elaine L. P. Nunes pelo treinamento no laboratório, pelo aprendizado e pela companhia.

Às companheiras do Laboratório de Filogenia e Genética da Conservação de Plantas, Carolina Rosa, Giovanna, Anna Vitória, Duane e Ana Paula pelas ajudas no dia-a-dia e pelas boas gargalhadas.

Aos colegas de mestrado pelos momentos de descontração.

Ao Felipe Castro pelos conselhos e pela grande ajuda na tradução do resumo.

Aos meus pais, João Martins Gomes e Ana Maria Lemos Gomes, que com tanto amor e carinho me acolheram novamente e me deram tanta força para continuar a lutar pelos meus sonhos. Vocês são meus eternos HERÓIS!!!

Ao meu amado irmão Rodrigo Lemos Gomes e sua família que sempre apoiaram minhas decisões e acreditaram em mim.

A Deus por ser meu guia.

A todos, o meu muito obrigada!

RESUMO GERAL

A Floresta Atlântica tem sido um ambiente altamente devastado ao longo dos últimos cinco séculos devido a atividades rurais, industriais e à urbanização. Tal destruição tem afetado diretamente espécies de orquídeas endêmicas como *Cattleya lobata* e *Cattleya xanthina*, ambas em risco de extinção. A primeira é uma espécie rupícola, microendêmica dos *inselbergs* graníticos do estado do Rio de Janeiro. *C. xanthina* é epífita e encontrada na região sudeste do Brasil. Informações sobre variabilidade e estrutura genética das populações relictuais foram acessadas através de marcadores moleculares dominantes (ISSR - *Inter Simple Sequence Repeat*), com o objetivo de definir o *status* de conservação genética das duas espécies. Além disso, informações históricas e evolutivas sobre *C. xanthina* foram acessadas através de sequenciamento de DNA plastidial. Foram amostrados todos os 84 indivíduos encontrados nas cinco populações conhecidas (13 a 25 indivíduos por população) de *C. lobata*, localizadas nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói, abrangendo toda a distribuição geográfica da espécie. Para *C. xanthina* foram utilizados 77 indivíduos de cinco populações amostradas (12 a 44 indivíduos por população), no Estado do Espírito Santo, abrangendo quase toda a distribuição geográfica da espécie. De 25 *primers* ISSR testados, sete apresentaram boa amplificação e polimorfismo para cada espécie. Esses *primers* geraram 119 fragmentos para *C. lobata* e 91 para *C. xanthina*. As duas espécies tiveram o mesmo padrão de moderada a alta variabilidade genética, com baixa estruturação genética significativa e alta similaridade entre as populações. As análises de coordenadas principais indicaram uma discreta estruturação em ambas as espécies. Através das análises Bayesianas as cinco populações amostradas para cada espécie pertencem ao mesmo *pool* gênico, caracterizando um único contingente populacional para *C. lobata* e outro para *C. xanthina*. Para a primeira espécie, consideramos que tal coesão genética seja, provavelmente, resultante de variação genética histórica compartilhada entre relictos populacionais atualmente isolados, e que pode estar sendo mantida ao longo das últimas gerações por fluxo gênico recente e recorrente, mediado principalmente por dispersão de sementes entre as populações. Em eventuais planos de manejo em que seja prevista a reintrodução ou transferência de material genético (através de indivíduos, pólen ou sementes), este pode ser oriundo de qualquer uma das populações analisadas, pois fazem parte de um mesmo *pool* gênico. Para *C. xanthina*, a coesão genética encontrada indica que provavelmente a fragmentação atual ocasionada pela urbanização e agricultura é um processo recente em relação ao tempo evolutivo necessário ao isolamento genético entre estas subpopulações. Portanto, verifica-se que os remanescentes populacionais preservam variação genética próxima da total encontrada para a espécie, conforme revela o marcador molecular ISSR, adequado à investigação neste nível geográfico e temporal. Para as análises filogeográficas de *C. xanthina*, foram utilizadas as regiões intergênicas *psbD-trnT* e *rpl32-trnL*, nas quais ocorreram 14 sítios polimórficos revelando 10 haplótipos nas cinco populações amostradas, com moderada a alta diversidade genética ($h = 0,738$) e baixa estruturação interpopulacional ($\Phi_{ST} = 0,044$). A rede de haplótipos apresentou duas linhagens genéticas altamente divergentes separadas por um grande número de passos mutacionais, onde cada uma das linhagens apresenta um haplótipo central mais freqüente e uma série de haplótipos derivados menos freqüentes. Essas duas linhagens estão amplamente distribuídas entre as cinco populações amostradas,

não sendo encontrada subdivisão geográfica de grupos haplotípicos. O padrão de variação genética destas duas linhagens discretas e não geográficas sugere a ocorrência de processos antigos de hibridização e introgressão, com a incorporação e dispersão de haplótipos de outra espécie ao longo das populações de *C. xanthina*.

GENERAL ABSTRACT

The Atlantic Rainforest has been an ecosystem highly devastated over the last five centuries due the effects of urbanization, and rural and industrial activities. Such destruction has directly affected endemic species of orchids such as *Cattleya lobata* and *Cattleya xanthina*, both endangered. The first is a rupicolous species, microendemic to granitic *inselbergs* Rio de Janeiro state. *C. xanthina* is epiphytic and is found in Southeastern Brazil. Variability and genetic structure of relictual populations were accessed through dominant molecular markers (*ISSR - Inter Simple Sequence Repeat*) aiming to define the genetic conservation status in both species. Moreover, evolutionary and historical information about *C. xanthina* were accessed through plastid DNA sequencing. We sampled all 84 individuals found in the five known populations (13 to 25 individuals per population) of *C. lobata*. We also georeferenced location in the cities of Rio de Janeiro and Niterói, covering the entire distribution range. For *C. xanthina* we sampled 102 individuals sampled from five populations (12 to 44 individuals per population) in Espírito Santo state, covering almost all range distribution of the species. From the 25 ISSR primers tested, seven showed better amplification resolution and polymorphism for both species. These primers generated 119 fragments for *C. lobata* and 91 for *C. xanthina*. The two species had the same pattern of moderate to high genetic variability, with significative low genetic structure and high similarity between the populations. The principal coordinate analysis indicates discrete structure in both species. The Bayesian analysis indicated that the five populations sampled for each species belong to the same gene pool, which features a single population contingent to *C. lobata* and one for *C. xanthina*. For the first species we consider that such gene cohesion is probably the result of a common historical genetic variation among relictuals populations which are currently isolated, and may have been maintained over the last generations by recent and recurrent gene flow mediated primarily by seed dispersal between populations. Any future management plan in which there may occure reintroduction or transference of genetic material (through individuals, pollen or seeds) could be originated from any of the analyzed populations, since these populations are part of a common gene pool. The genetic cohesion found in *C. xanthina* probably indicates that the current fragmentation caused by urbanization and agriculture is a recent process in relation to evolutionary time needed for genetic isolation between these subpopulations. Therefore it is apparent that the remaining populations preserve genetic variation close to the total found for the species as show by the ISSR molecular markers, suitable for research in this geographical and temporal level. For the phylogeographic analysis of *C. xanthina*, we used the intergenic regions *psbD-trnT* and *rpl32-trnL*, in which there were 14 polymorphic sites revealing 10 haplotypes in the five sampled populations with moderate to high genetic diversity ($h = 0.738$) and low interpopulation structure ($\Phi_{ST} = 0.044$). The network of haplotypes presented two highly divergent genetic lineages separated by a large number of mutational steps, where each of the lineages presents a more common central haplotype and a series of haplotype derived less frequent. These two lineages are widely distributed among the five populations sampled, no geographical subdivision of haplotypics groups was found. The pattern of genetic variation of these two discrete lineages and non-geographical dispersal suggests the occurrence of an old process of hybridization and introgression, with the

incorporation and dispersion of haplotypes of other species throughout the populations of *C. xanthina*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	11
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO I: VARIABILIDADE E COESÃO GENÉTICA EM POPULAÇÕES RELICTUAIS DE <i>CATTLEYA LOBATA</i> LINDL. (ORCHIDACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA DA MATA ATLÂNTICA	23
Resumo	24
Introdução	24
Material e Métodos	27
Amostragem	27
Extração de DNA e amplificação de ISSR	28
Análise de dados	29
Resultados	30
Discussão	32
Variabilidade genética	32
Estruturação populacional	34
Referências Bibliográficas	43
CAPÍTULO II: SINAIS DE INTROGRESSÃO GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE <i>CATTLEYA XANTHINA</i> (LINDL.) VAN DEN BERG (ORCHIDACEAE), ESPÉCIE ENDÊMICA DA MATA ATLÂNTICA	50
Resumo	51
Introdução	51
Material e Métodos	55
Amostragem	55
Extração de DNA e amplificação de ISSR	56
Filogeografia a partir do sequenciamento de fragmentos do cpDNA	58
Resultados	59
Variabilidade genética de <i>C. xanthina</i> a partir de marcadores ISSR	59
Filogeografia a partir do sequenciamento de fragmentos do cpDNA	61
Discussão	63
Variabilidade genética a partir de marcadores ISSR	63
Estruturação populacional	65
Filogeografia a partir do sequenciamento de fragmentos do cpDNA	67
Referências Bibliográficas	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS	97

INTRODUÇÃO GERAL

No passado, a Mata Atlântica cobria mais de 150 milhões de hectares do território brasileiro (Ribeiro *et al.*, 2009), sendo a segunda maior floresta pluvial tropical das Américas (Tabarelli *et al.*, 2005). Este bioma está distribuído pelo Brasil, Argentina e Paraguai (Galindo-Leal e Câmara, 2005). No Brasil, a Mata Atlântica concentra-se na costa leste do país estendendo-se do Rio Grande do Sul ao Rio Grande do Norte (Fundação SOS Mata Atlântica, 2011; Stehmann *et al.*, 2009).

Estima-se que o Brasil possua de 15 a 20% do total de espécies do planeta (Myers *et al.*, 2000), portanto é considerado um dos países com maior biodiversidade do mundo. E, somente a Mata Atlântica é detentora de 1 a 8% da biodiversidade mundial (da Silva e Casteleti, 2005). A Mata Atlântica é considerada um dos 34 *hotspots* identificados por Mittermeier *et al.* (2004), já que abriga grande biodiversidade, elevado número de espécies endêmicas e possui extensa perda de habitat (Myers *et al.*, 2000). Através de estudos paleoclimáticos, foi evidenciada que esta alta diversidade e o endemismo da Mata Atlântica é consequência das flutuações climáticas durante o Holoceno e o Pleistoceno (Carnaval e Moritz, 2008). Além disso, outros fatores como a sua extensão latitudinal (Pinto e Brito, 2005), características geográficas e a variação altitudinal (Ribeiro *et al.*, 2009), também contribuem para a alta diversidade e o grande endemismo na Mata Atlântica.

Após cinco séculos de ocupação desordenada, sabe-se que extensas áreas da Mata Atlântica foram reduzidas com perda significativa da diversidade biológica em grande escala. Essa ocupação foi iniciada com o extrativismo do pau-brasil durante o período colonial, estendido posteriormente para outras espécies de importância comercial. Além da devastação para a exploração de ouro e para culturas como da cana-de-açúcar e do café. E, no último século, o avanço das fronteiras urbanas, agrícolas, pecuárias e industriais (Fonseca, 1992; Dean, 1996; Câmara, 2005) contribuíram para o desflorestamento da Mata Atlântica.

Embora os diferentes dados sobre a superfície total remanescente da Mata Atlântica sejam divergentes, recentemente foi estimado que esse valor compreenda entre 11,4 a 16% da cobertura original deste bioma (Ribeiro *et al.*, 2009), incluindo florestas secundárias intermediárias e fragmentos pequenos (com menos de 100 hectares). A forte redução das áreas nativas provoca a fragmentação de populações

de espécies vegetais, além de extinções locais com o desaparecimento de muitas populações desconhecidas. Assim, com a diminuição e fragmentação dessas populações, uma das consequências é perda definitiva de estoques de variabilidade genética de muitas espécies nativas deste bioma (Brown e Brown, 1992; Murcia, 1996).

Embora estes valores alarmantes indiquem que este bioma hoje se restrinja a resíduos florestais (pequenos fragmentos disjuntos e floristicamente empobrecidos, com poucas áreas contínuas de maior extensão) a Mata Atlântica ainda apresenta uma riquíssima biodiversidade (Camargo *et al.*, 2002) e é uma importante área de distribuição de espécies endêmicas, como observado na família Orchidaceae (Peixoto *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2010; Stehmann *et al.*, 2009).

Desde os estudos originais de *hotspots* (Myers, 1988), a necessidade de se definir prioridades para a conservação dos organismos tem norteado diferentes projetos onde a meta final é identificar as áreas mais importantes para a conservação e fazer isso em uma escala apropriada para programar ações conservacionistas. Para tanto, a maioria dos estudos nesta área tem utilizado uma mesma abordagem, lançando mão de mapas de distribuição de espécies para identificar um conjunto de localidades que contenham um maior número de espécies em uma menor área geográfica (Vane-Wright *et al.*, 1991). Entretanto, tais estratégias não contemplam adequadamente o reconhecimento de outros fatores biológicos e geográficos extremamente relevantes para definição do *status* de conservação das diferentes espécies ao longo da sua distribuição (Galindo-Leal *et al.*, 2005).

O intenso debate e a busca por estratégias para a conservação da biodiversidade do planeta ao longo das últimas décadas têm trazido alternativas passíveis de serem adotadas por instituições de pesquisa no Brasil. Para que sejam determinadas ações práticas de conservação e manejo com a finalidade de assegurar a preservação de espécies, é importante que se tenham estimativas do tamanho efetivo e da variabilidade genética das populações, que são fundamentais para avaliação da situação atual das populações e detecção de casos onde a sua manutenção pode estar comprometida (Beardmore, 1983). Portanto, é fundamental que se compreenda a estrutura e história destas populações, investigando a existência de partições demográficas através de sua distribuição (Moritz, 1995) e caracterizando a distribuição hierárquica da diversidade genética (Excoffier *et al.*,

1992). Em plantas, empregando um marcador de DNA altamente variável e que pode ser transmitido por fluxo polínico, pode-se estimar o nível de endogamia e de variabilidade genética das populações, bem como a partição desta variabilidade, fornecendo assim um conjunto de dados amplo para diagnosticar o *status* da espécie na natureza (Nybom, 2004).

Ao longo dos últimos anos estudos com espécies de plantas no Brasil utilizando esta abordagem têm aumentado (Alcântara *et al.*, 2006; Smidt *et al.*, 2006; Borba *et al.*, 2007a; Borba *et al.*, 2007b; Silva-Pereira *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008; Silva e van den Berg, 2008; Almeida *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, dados não publicados), especialmente aquelas fortemente pressionadas pela exploração comercial ao longo de muitas décadas. Esse é o caso das orquídeas *Cattleya* da Mata Atlântica que possuem alto apelo comercial pelo atrativo ornamental (Pinheiro *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, dados não publicados). Tais estudos têm demonstrado grande importância de se conhecer o nível de variabilidade genética (Alcântara *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008; Silva e van den Berg, 2008; Cruz *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 2012), especialmente para a conservação de espécies endêmicas de distribuição restrita e ameaçadas de extinção (Smidt *et al.*, 2006; Borba *et al.*, 2007a; Borba *et al.*, 2007b; Silva-Pereira *et al.*, 2007; Almeida *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, dados não publicados), além de possibilitar a compreensão da extensão dos impactos causados pelo uso e devastação descontrolados de populações naturais de plantas.

A Filogeografia permite compreender a evolução de populações e espécies através de inferências sobre processos demográficos e históricos (Avise, 2000), tais como a extensão de eventos de expansão e fragmentação das populações, *bottlenecks*, fluxo gênico, rotas migratórias e refúgios (Templeton, 1992; Templeton *et al.*, 1995; Newton *et al.*, 1999; Avise, 2000). Essas inferências são realizadas a partir da distribuição da variabilidade genética ao longo das populações estudadas (Pannel e Dorken, 2006) e podem ser obtidas através do sequenciamento de regiões de DNA do cloroplasto (cpDNA) (King e Ferris, 1998). Além de investigar a ocorrência antiga ou contemporânea de hibridizações (Rieseberg *et al.*, 1996), a análise destas regiões contribuem para a reconstrução de eventos históricos, como expansão e contração populacional e migrações (Ennos *et al.*, 1999). Regiões de cpDNA têm sido utilizadas nas investigações filogeográficas, pois o DNA de cloroplasto é mais conservativo, ou seja, possui taxa de mutação mais lenta quando

comparado ao genoma nuclear e mitocondrial (Soltis *et al.*, 1992). Além disso, este genoma tem herança materna e é transferido através da dispersão de sementes na maioria das Angiospermas (Ennos *et al.*, 1999; Petit *et al.*, 2005), o que proporciona uma facilidade na investigação dos processos históricos populacionais, uma vez que é haplóide e não sofre recombinação (Ennos *et al.*, 1999).

No Brasil, a maior parte dos estudos filogeográficos tem sido feita com espécies arbóreas (Salgueiro *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2007, 2009; Collevatti *et al.*, 2009; Feres *et al.*, 2009; Lage-Novaes *et al.*, 2010; Collevatti *et al.*, 2012). Dentre as monocotiledôneas, há estudos nesta área com Bromeliaceae (Palma-Silva *et al.*, 2009), Velloziaceae (Barbosa *et al.*, 2012) e Orchidaceae (Pinheiro *et al.*, 2011). Verificou-se que fatores como as oscilações climáticas do Pleistoceno influenciaram na diversidade genética e na distribuição de várias dessas espécies (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; Collevatti *et al.*, 2009; Palma-Silva *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2011). Além disso, esses estudos auxiliam a compreensão da biogeografia das formações vegetacionais e, conseqüentemente a conservação de espécies.

Entre os anos de 2007 e 2008 uma equipe coordenada pelo pesquisador Claudio Nicoletti de Fraga (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro), através do projeto CORES – Conservação de Orquídeas Ameaçadas de Extinção (Petrobrás – Cenpes) trabalhou intensamente na busca de populações naturais remanescentes de espécies de Orchidaceae em risco de extinção, segundo a lista de espécies em extinção da flora brasileira publicada pelo IBAMA em 1992. Tal projeto objetivou definir a área de distribuição atual e resgatar informações sobre coleta e manutenção de exemplares em coleções amadoras, tendo reunido um importante conjunto de dados sobre distribuição geográfica, tamanho das populações relictuais, estrutura demográfica, estratégias de polinização e reprodutiva de algumas das oito espécies mais criticamente ameaçadas de *Cattleya* (*C. grandis* (Lindl. & Paxton) A.A.Chadwick, *C. jongheana* (Rchb.f.) van den Berg, *C. lobata* Lindl., *C. perrinii* Lindl., *C. schilleriana* Rchb.f., *C. tenebrosa* (Rolfe) A.A.Chadwick, *C. virens* (Lindl.) van den Berg, *C. xanthina* (Lindl.) van den Berg) (Fraga, dados não publicados).

Para este trabalho, foram escolhidas duas dessas espécies de orquídeas, *Cattleya lobata* e *Cattleya xanthina*, para investigar o panorama genético atual e histórico. As informações sobre aspectos biológicos e de exploração dessas

espécies tratadas pelo Projeto Cores, aliado ao conhecimento detalhado da amplitude de distribuição das populações, nos possibilitou questionar: (1) Qual é o nível de variabilidade e estruturação genética intra e inter-populacional apresentado por estas espécies? (2) Quantos contingentes populacionais podem ser detectados para cada espécie e qual o nível de estruturação genética dos contingentes atuais? (3) As populações naturais isoladas e fragmentadas estão depauperadas geneticamente? (4) Quais as relações evolutivas históricas entre os fragmentos populacionais remanescentes?

Através da utilização de marcadores de DNA altamente variáveis, transmitidos por fluxo polínico, como os *ISSRs*, este estudo objetivou estimar a variabilidade genética das populações de *Cattleya lobata* e *C. xanthina* e suas possíveis partições.

Fragmentos de sequências de DNA plastidial de herança materna com variabilidade suficiente para estudos filogeográficos nesta escala foram utilizados para inferir os processos evolutivos e as relações históricas entre as populações das espécies estudadas. Uma vez que foram encontrados fragmentos úteis apenas para *C. xanthina*, o estudo filogeográfico foi realizado para este táxon, aplicando as regiões *psbD-trnT* e *rpl32-trnL*. Infelizmente, mesmo após o sequenciamento de 71 indivíduos para estas duas regiões, não foram encontrados sítios polimórficos em *C. lobata* inviabilizando a realização das análises filogeográficas do táxon.

Assim, este trabalho está dividido em dois capítulos redigidos em forma de artigos:

I – Variabilidade e coesão genética em populações relictuais de *Cattleya lobata* Lindl. (Orchidaceae), espécie endêmica da Mata Atlântica.

II – Sinais de introgressão genética em populações de *Cattleya xanthina* (Lindl.) van den Berg (Orchidaceae), espécie endêmica da Mata Atlântica.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, S.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V.N. Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the Atlantic Rainforest of South-eastern Brazil. **Annals of Botany** v. 98,p. 1207-1213, 2006.
- ALMEIDA, P. R. M.; GÓES-NETO A.; VAN DEN BERG, C. Variabilidade genética em populações de *Encyclia dichroma* (Lindl.) Schltr. e *E. ghillanyi* Pabst (Laeliinae, Orchidaceae). In: Anais do 55º Congresso Brasileiro de Genética. **Sociedade Brasileira de Genética**, p. 220, 2009.
- AVISE, J. C. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA, 2000.
- BARBOSA, A. R.; FIORINI, C. F.; SILVA-PEREIRA, V.; MELLO-SILVA, R.; BORBA, E. L. Geographical genetic structuring and tangled morpho-anatomical variation in the *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) ochlopecies complex. **Annals of Botany** v. 99, n. 9, p. 1-13, 2012.
- BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N. Orchidaceae In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>, acessado em 25/04/2011.
- BEARDMORE, J. A. Extinction, survival and genetic variation. In: SCHOENWALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, L. (eds.) Genetics and Conservation, Benjamin-Cummings, Menlo Park, Calif, 1983.
- BORBA, E. L.; FUNCH, R. R.; RIBEIRO, P. L.; SMIDT, E. C.; SILVA-PEREIRA, V. Demografia, variabilidade genética e morfológica e conservação de *Cattleya tenuis* (Orchidaceae), espécie ameaçada de extinção da Chapada Diamantina. **Scientibus Série Ciências Biológicas** v. 7, n. 3, p. 211-222, 2007a.
- BORBA, E. L.; FUNCH, R. R.; RIBEIRO, P. L.; SMIDT, E. C.; SILVA-PEREIRA, V. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophronitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. **Plant Systematics and Evolution** v. 267, p. 129-146, 2007b.
- BROWN, K. S. J. e BROWN, G. G. Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In: WHITMORE, T. C.; SAYER, J. A. (Eds.). **Tropical deforestation and species extinction**, Chapman and Hall, London, England, pp. 119-142, 1992.

- CÂMARA, I. G. Brief history of conservation in the Atlantic Forest. In: GALINDO-LEAL, C. e CÂMARA, I. G. (Eds.) **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook**. CABS and Island Press, Washington, p. 31–42, 2005.
- CAMARGO, A.; CAPOBIANCO, J. P. R.; OLIVEIRA, J. A. P. **Meio ambiente Brasil: avanços e obstáculos pós-Rio-92**. São Paulo Instituto Socioambiental; Rio de Janeiro Fundação Getúlio Vargas, 2002.
- CARNAVAL, A. C. e MORITZ, C. M. Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. **Journal of Biogeography** v. 35, p. 1187–1201, 2008.
- COLLEVATTI, R. G.; RABELO, S. G.; VIEIRA, R. F. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. **Annals of Botany** v. 104, p. 655-664, 2009.
- COLLEVATI, R. G.; TERRIBILE, L. C.; LIMA-RIBEIRO, M. S.; NABOUT, J. C.; de OLIVEIRA, G.; RANGEL, T. F.; RABELO, S. G.; DINIZ-FILHO, J. A. F. A coupled phylogeographical and species distribution modeling approach recovers the demographical history of a Neotropical seasonally dry forest tree species. **Molecular Ecology** v. 21, n. 23, p. 5845-5863, 2012.
- CRUZ, D. T.; SCHNADELBACH, A. S., LAMBERT, S. M.; RIBEIRO, P. L.; BORBA, E. L. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. **Plant Systematic and Evolution** v. 294, n. 1-2, p. 87-98, 2011.
- DEAN, W. **With Broadax and Firebrand: The Destruction of the Brazilian Atlantic Forest**. University of California Press, Berkeley, 1997.
- ENNOS, R. A.; SINCLAIR, W. T.; HU, X. S.; LANGDON, A. Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: HOLLINGSWORTH, P. M.; BATEMAN, R. M.; GORNALL, R. J. (ed). **Molecular systematics and plant evolution**. London: Taylor and Francis Ltd. p. 1–19, 1999.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** v. 131, p. 479–491, 1992.

- FERES, F.; ZUCCHI, M. I.; SOUZA, A. P.; AMARAL, M. C. E.; BITTRICH, D. V. Phylogeographic studies of Brazilian “campo-rupestre” species: *Wunderlichia mirabilis* Riedel ex Baker (Asteraceae). **Biotemas** v. 22, p. 17 – 26, 2009.
- FRAGA, C.N.; FONTANA, A.P.; SADDI, E.M.; SAN MARTIN-GAJARDO, I.C.; SIMONELLI, M.; BOCAYUVA, M.F.; CONSTANTINO, P.A.L.; BORGES, R.A.X.; MACHADO, S.L.; MURRIETA, R.; MONNERAT, M.; PAES, J.E. 2009. **Plano de ação para as orquídeas em risco de extinção**. Relatório Final, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A. M. de Mello – CENPES/Petrobras. 522p.
- FONSECA, G. A. B. Biodiversity. In: **Ecology in Brazil: myths and realities**. Rio de Janeiro: Editora Jornal do Brasil, 1992.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas os Remanescentes Florestais da Mata Atlântica – Período 2008-2010**. São Paulo. pp. 1-119, 2011.
- GALINDO-LEAL, C. e CÂMARA, I. G. Atlantic Forest hotspot status: an overview. In: GALINDO-LEAL, C. e CÂMARA, I. G. (eds.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats and outlook**. Island Press, Washington, p. 3–11, 2005.
- GALINDO-LEAL, C.; JACOBSEN, T. R.; LANGHAMMER, P. F.; OLIVIERI, S. Hotspots status: the dynamics of biodiversity loss. In: GALINDO-LEAL, C. e CÂMARA, I. G. (eds.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats and outlook**. Island Press, Washington, p. 12–23, 2005.
- KING, R. A.; FERRIS, C. Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. **Molecular Ecology** v. 7, n. 9, p.1151-1161, 1998.
- LAGE-NOVAES, R. M.; de LEMOS-FILHO, J. P.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Phylogeography of *Plathymentia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. **Molecular Ecology** v. 19, n. 5, p. 985-998, 2010.
- LORENZ-LEMKE, A. P.; MUSCHNER, V. C.; BONATTO, S. L.; CERVI, A. C.; SOLZANO, F. M.; FREITAS, L. B. Phylogeographic inferences concerning

evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. **Annals of Botany** n. 95, p. 799-806, 2003.

- MITTERMEIER, R. A.; GIL, P. R.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.; BROOKS, J.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOURUX, J.; FONSECA, G. A. B. **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Washington, DC: Cemex, 2004.
- MORITZ, C. Uses of molecular phylogenies for conservation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences** v. 349, p. 113–118, 1995.
- MURCIA, C. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. In: SCHELLAS, J.; GREENBERG, R. (ed). **Forest patches in tropical landscapes**. Island Press, Washington, 1996.
- MYERS, N. Threatened biotas: "Hotspots" in tropical forests. **The Environmentalist** v. 8, p. 1–20, 1988.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** v. 403, p. 853-858, 2000.
- NEWTON, A. C.; ALLNUTT, T. R.; GILLIES, A. C. M.; LOWE, A. J.; ENNOS, R. A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology & Evolution** 14: 140-145, 1999.
- NYBOM, H. Comparasion of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology** v. 13, p. 1143-1155, 2004.
- PALMA-SILVA, C.; LEXER, C.; PAGGI, G. M.; BARBARÁ, T.; BERED, F.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae) a neotropical forest species. **Heredity** v. 103, p. 503-512, 2009.
- PANNEL, J. R.; DORKEN, M. E. Colonisation as a common denominator in plant metapopulations and range expansions: effects on genetic diversity and sexual systems. **Landscape Ecology** v. 21, p. 837-848, 2006.
- PEREIRA, K. F. R.; MALAFAIA, C. B., SILVA, T. D.; ALMEIDA, C. M. A.; SILVA, A.

G. Diversidade Genética em uma população de *Epidendrum cinnabarium* Salzm. Ex Lindl. (Orchidaceae) provenientes de *Inselbergs* utilizando marcador molecular. In: **Anais do 59º Congresso Nacional de Botânica**, Natal. Sociedade Botânica do Brasil, p. 31, 2008.

PEIXOTO, A. L.; ROSA, M. M. T.; SILVA, I. M. Caracterização da Mata Atlântica. In: **Manual Metodológico para estudos botânicos na Mata Atlântica**. Ed: Seropédica, RJ, 2002.

PETIT, R. J.; DUMINIL, J.; FINESCHI, S.; HAMPE, A.; SALVINI, D.; VENDRAMI, G. G. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* v. 14, p. 689-701, 2005.

PINHEIRO, F.; de BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; FAY, M. F.; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Phylogeographical and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. **Journal of Biogeography** v. 38, p. 1923-1935, 2011.

PINHEIRO, L. R.; RABBANI, A. R. C.; da SILVA, A. V. C.; LÉDO, A. S.; PEIREIRA, K. L. G.; DINIZ, L. E. C. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. **Plant Systematic and Evolution** 298: 1815-1825, 2012.

PINTO, L. P. e BRITO, M. C. W. Dynamics of biodiversity loss in the Brazilian Atlantic Forest: an introduction. In: GALINDO-LEAL, C. e CÂMARA, I. G. (eds.). **The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats and outlook**. Island Press, Washington, p. 27–30, 2005.

RAMOS, A. C. S.; LEMOS-FILHO, J. P.; RIBEIRO, R. A.; SANTOS, F. R.; LOVATO, M. B. Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian cerrado. **Annals of Botany** v. 100, p. 1219 – 1228, 2007.

RAMOS, A. C. S.; de LEMOS-FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Phylogeographical structure of the neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from cerrado. **The Journal of Heredity** v. 100, p. 206 – 216, 2009.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Antlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation** 142, p. 1141-1153, 2009.

- RIBEIRO, P. L.; BORBA, E. L.; SMIDT, E. C.; LAMBERT, S. M.; SCHNADELBACH, A. S.; VAN DEN BERG, C. Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. **Plant Systematic and Evolution** 270: 109-137, 2008.
- RIESEBERG, L. H. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. **Molecular Ecology** v. 5, n. 1, p. 99–105, 1996.
- SALGUEIRO, F.; FELIX, D.; CALDAS, J. F.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. **Diversity & Distributions** v. 10, p. 201 – 210, 2004.
- da SILVA, J. M. C. e CASTELETI, C. H. M. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: GALINDO-LEAL, C. e CÂMARA, I.G. (Eds.), **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook**. CABS and Island Press, Washington, p. 43–59, 2005.
- SILVA, J. R. S. S.; VAN DEN BERG, C. Variabilidade populacional de *Cattleya pfisteri* (Pabst & Senghas) van der Berg (Orchidaceae), Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. In: **Anais do 59º Congresso Nacional de Botânica**, Natal. Sociedade Botânica do Brasil, p. 64, 2008.
- SILVA-PEREIRA, V.; SMIDT, E. C.; BORBA, E. L. Isolation mechanisms between two sympatric *Sophranitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution** 269: 171-182, 2007.
- SMIDT, E. C.; SILVA-PEREIRA, V.; BORBA, E. L. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to North-eastern Brazil. **Plant Species Biology** 21: 85-91, 2006.
- SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; MILLIGAN, B. G. Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. In: SOLTIS, P. M.; SOLTIS, D. E.; DOYLE, J. J. *Molecular Systematics of Plants*. Springer, 434 p. 1992
- STEHMANN, J. R.; FORZZA, R. C.; SALINO, A.; SOBRAL, M.; COSTA, D. P.; KAMINO, L. H. Y. **Plantas da Floresta Atlântica**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 516 p., 2009.

- TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade** v. 1, n. 1, p. 132-138, 2005.
- TEMPLETON, A. R. The Meaning of species and speciation: A genetic perspective. In: ERESHEFSKY, M. **The units of Evolution**. MIT Press, 1992.
- TEMPLETON, A. R.; ROUTMAN, E.; PHILLIPS, C. A. Separating populations structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Genetics** v. 140, p. 767-782, 1995.
- VANE-WRIGHT, R. I.; HUMPHRIES, C. J.; WILLIAMS, P. H. What to protect? Systematics and the agony of choice. **Biological Conservations** v. 55, n. 3, 235-254, 1991.

**CAPÍTULO I: VARIABILIDADE E COESÃO GENÉTICA EM POPULAÇÕES
RELICTUAIS DE *CATTLEYA LOBATA* LINDL. (ORCHIDACEAE), ESPÉCIE
ENDÊMICA DA MATA ATLÂNTICA**

(Artigo segundo normas da revista *Plant Systematics and Evolution* -
<http://www.springer.com/life+sciences/plant+sciences/journal/606>)

Variabilidade e coesão genética em populações relictuais de *Cattleya lobata* Lindl. (Orchidaceae), espécie endêmica da Mata Atlântica

P. C. L. Gomes¹, E. C. Smidt¹; C. N. Fraga² e V. Silva-Pereira¹

¹ Laboratório de Filogenia e Genética da Conservação de Plantas, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Curitiba, Paraná, 81531-990, Brasil;

² Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Diretoria de Pesquisa Científica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

Autor para correspondência: patriciaclgomes@yahoo.com.br

RESUMO

C. lobata é uma espécie rupícola e microendêmica dos *inselbergs* graníticos do estado do Rio de Janeiro e está em risco de extinção. Informações sobre variabilidade e estrutura genética das populações relictuais foram acessadas através de marcadores moleculares dominantes (ISSR), com o objetivo de definir o *status* de conservação genética da espécie. Foram amostrados todos os 84 indivíduos encontrados nas cinco populações conhecidas (13 a 25 indivíduos por população), nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói, abrangendo toda a distribuição geográfica da espécie. Dos 25 *primers* testados, sete apresentaram boa amplificação e polimorfismo. Esses *primers* geraram 119 fragmentos, destes, 95,8% são locos polimórficos no nível específico, e 72,27% a 86,55% no nível populacional. Foi detectada alta variabilidade genética para a espécie ($H_e = 0,309$; $I = 0,463$) e alta similaridade entre as populações, com distância genética de Nei par a par variando entre 0,024 a 0,094. Análises de AMOVA indicaram que a maior parte da variabilidade está representada dentro das populações (93%), configurando baixa estruturação genética significativa com $\Phi_{ST} = 0,074$ ($P > 0,001$). Através das análises de coordenadas principais, foi apontada uma discreta estruturação genética entre a população de Niterói e as demais populações. As análises Bayesianas indicaram que as cinco populações amostradas pertencem ao mesmo *pool* gênico, caracterizando um único contingente populacional. Consideramos que tal coesão genética seja, provavelmente, resultante de variação genética histórica compartilhada entre relictos populacionais atualmente isolados, e que pode estar sendo mantida ao longo das últimas gerações por fluxo gênico recente e recorrente, mediado principalmente por dispersão de sementes entre as populações. Futuros planos de manejo poderão prever a reintrodução ou transferência de material genético (através de indivíduos, pólen ou sementes) oriundo de qualquer uma das populações analisadas, já que fazem parte de um mesmo *pool* gênico.

Palavras-chave: orquídeas, conservação genética, marcadores moleculares ISSR

Introdução

A Mata Atlântica é considerada um dos 34 *hotspots* identificados por Mittermeier et al. (2004), abrigando grande biodiversidade (da Silva e Casteleti 2003), elevado número de espécies endêmicas e possui extensa perda de habitat (Myers et al. 2000). Embora os diferentes dados sobre a superfície total remanescente da Mata Atlântica sejam divergentes, recentemente foi estimado que esse valor compreende entre 11,4 a 16% da cobertura original deste bioma (Ribeiro et al. 2009), incluindo florestas secundárias intermediárias e fragmentos

pequenos (com menos de 100 hectares). Sendo esses resíduos florestais disjuntos e floristicamente empobrecidos. Essa redução de áreas nativas pode levar à perda de estoques de variabilidade genética para as diversas espécies, através da fragmentação de populações e extinções locais (Brown e Brown 1992, Murcia 1996).

Mesmo após a devastação causada ao longo de cinco séculos de ocupação, a Mata Atlântica continua apresentando uma riquíssima biodiversidade (Camargo et al. 2002) e sendo importante área de distribuição de uma série de espécies endêmicas, notadamente na família Orchidaceae (Peixoto et al. 2002, Stehmann et al. 2009, Barros et al. 2010). Dentre as mais famosas e ornamentais orquídeas da Mata Atlântica, destaca-se a *Cattleya lobata* Lindl. (Fig. 1a). Descrita em 1848, esta espécie é considerada em risco de extinção desde 1992, quando foi publicada pelo IBAMA a lista de espécies em extinção da flora brasileira. *C. lobata* vem sendo extraída da natureza por colecionadores e comerciantes sem qualquer critério, regulamentação ou preocupação com o risco de desaparecerem definitivamente da natureza, estando incluída no CITES Apêndice I (Constantino e Fraga 2005, CITES 2010).

O apelo comercial desta espécie se deve às suas características extremamente ornamentais de suas flores com coloração rosa púrpura predominante nas pétalas (que medem 4,5 x 7,3cm) e sépalas (medindo 2 x 7,5cm). O labelo possui coloração púrpura mais intensa, com a porção interna do labelo branca ou esverdeada. A planta mede de 60 a 70 cm de altura e produz mais de cinco flores por haste floral, cada uma com até 15 cm de diâmetro (Withner 1988). Sua distribuição geográfica original se restringe a costa sul do estado do Rio de Janeiro, sendo considerada microendêmica da Mata Atlântica, habitando paredões verticais de morros denominados pães de açúcar, ou *inselbergs* (Fig. 1b e 1c), ocorrentes de Niterói à Baía de Guanabara. Portanto, as plantas permanecem expostas a ventos constantes e altas intensidades luminosas (Coutto dados não publicados). No contato da mata com os *inselbergs* são encontrados alguns indivíduos vivendo à sombra e como epífitos (Saddi 2008).

Para que programas de conservação de espécies endêmicas e ameaçadas possam ser conduzidos, a biologia, a variabilidade genética e a dinâmica populacional da espécie devem ser estudadas (Falk e Holsinger 1991). Igualmente importante, é verificar a existência de partições demográficas ao longo da distribuição geográfica da espécie a partir de estimativas da variabilidade e estrutura genética das populações analisadas (Moritz 1995).

Ao longo dos anos, estudos com espécies de plantas no Brasil utilizando esta abordagem têm aumentado, especialmente os ligados a espécies com forte pressão comercial ao longo de muitas décadas, como é o caso das *Cattleya* de Mata Atlântica. Tais estudos têm demonstrado a importância de se conhecer o nível de variabilidade genética (e.g., Alcântara et al. 2006, Smidt et al. 2006, Borba et al. 2007a, Borba et al. 2007b, Silva-Pereira et al. 2007, Pereira et al. 2008, Ribeiro et al. 2008, Silva e van den Berg 2008, Almeida et al. 2009, Cruz et al. 2011, Pinheiro et al. 2012, Gomes et al., dados não publicados), especialmente para a conservação de espécies endêmicas de distribuição restrita e ameaçadas de extinção. Assim, estes estudos demonstram a extensão dos impactos causados pelo uso e devastação descontrolados de populações naturais de plantas.

A caracterização da variabilidade genética pode ser feita a partir de medidas de diversidade genética intrapopulacional e interpopulacional, estimadas a partir da porcentagem de locos polimórficos, do índice de fixação e da heterozigosidade esperada (Berg e Hamrick 1997). Estas estimativas são obtidas a partir de marcadores moleculares dominantes como o ISSR. Em Orchidaceae os marcadores ISSR tem sido utilizados para a análise de aspectos evolutivos e ecológicos (Smith et al. 2002, Shen et al. 2006, Xiaohong et al. 2007, Pereira et al. 2008, Silva e van den Berg 2008, Almeida et al. 2009, Cruz et al. 2011, Barbosa et al., dados não publicados; Fraga et al., dados não publicados; Gomes et al., cap. 2) cuja variação permite discutir tanto aspectos populacionais quanto aspectos relacionados a complexos de espécies.

Os objetivos deste trabalho foram investigar a variabilidade genética e o nível de estruturação genética das populações de *Cattleya lobata* ao longo de toda a sua distribuição geográfica. Com estas estimativas, foi possível avaliar se a redução do tamanho das populações naturais está forçando as populações a cruzamentos endogâmicos e, conseqüentemente, alterando a variabilidade genética da espécie. A partir disso, foram descritos os níveis de variabilidade genética intra e interpopulacional e testada a subestruturação genética entre populações para definir quais devem ser apontadas como prioritárias para os projetos de manejo conservação.

Materiais e métodos

Amostragem

Foram amostrados fragmentos foliares de 84 indivíduos de *C. lobata*, para não comprometer a integridade dos indivíduos em campo, uma vez que são espécies raras e fortemente ameaçadas de extinção. Estes indivíduos foram amostrados em cinco diferentes *inselbergs* nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói, abrangendo toda a distribuição da espécie, com número amostral variando de 11 a 24 indivíduos por população (Tabela 1 e Fig. 2). Estas populações estão situadas no alto de montanhas de origem granítica, com altitudes entre 220 a 650 metros. As coordenadas geográficas as populações não foram mostradas aqui, com o intuito de preservar os remanescentes populacionais, uma vez que a espécie continua sendo procurada por comerciantes e colecionadores, e extraída ilegalmente da natureza.

Das populações amostradas, quatro estão localizadas em áreas de intenso turismo, sendo três no Complexo da Gávea (Pico dos Quatro, Pedra Bonita, Agulhinha da Gávea) e uma no Pão de Açúcar. As populações do Complexo da Gávea e de Niterói (Alto Mourão) encontram-se em Unidades de Conservação (Parque Nacional da Tijuca e Parque Estadual da

Serra da Tiririca, respectivamente). Os Vouchers das populações estão depositados no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB).

Extração de DNA e amplificação de ISSR

As amostras de DNA foram obtidas a partir do método proposto por Novaes et al. (2009). Alíquotas de DNA total foram armazenadas em freezer -20°C para manipulação cotidiana e o restante do material estocado em ultrafreezer (-80°C) e tombado no banco de DNA total da Universidade Federal do Paraná (DNA-UPCB).

Foi testada a aplicabilidade de 25 *primers* ISSR (Wolff e Liston 1998), dos quais sete amplificaram e apresentaram polimorfismo para as populações de *C. lobata* (Tabela 2). As amostras do DNA genômico foram amplificadas através da PCR para um volume final de 20 µL contendo: tampão 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 mM de *primer*, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e cerca de 15 a 150 ng de DNA genômico. Para cada um dos *primers* escolhidos a temperatura de anelamento foi ajustada a fim de melhorar a resolução de leitura no gel. A amplificação foi feita em termociclador Axygen através do programa que inclui etapas de desnaturação inicial a 94°C por 1,5 min, seguido de 37 ciclos de amplificação (94°C por 40 s para a desnaturação; intervalos de 47° a 50°C por 45 s para o anelamento; 72°C por 1,5 min para a extensão) e uma extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TAE 0,5X, correndo em voltagem de 120 V por aproximadamente 2 h. Os géis foram corados em solução 0,5 mg/ml de brometo de etídio, fotodocumentados e o tamanho dos fragmentos foi estimado utilizando Ladder de 100 bp.

Análise dos dados

Os perfis eletroforéticos obtidos nas ampliações com os *primers* ISSR foram codificados como presença (1) ou ausência (0) de uma banda e uma matriz de fenótipos de ISSR foi construída. Locos que apresentaram baixa resolução foram excluídos da análise. Foram consideradas homólogas todas as bandas de igual tamanho molecular em um mesmo *primer* (Williams et al. 1993, Thormann et al. 1994, Rieseberg 1996). Foram avaliados parâmetros iniciais de variabilidade genética como porcentagem de locos polimórficos (P) e exclusivos, índice de Shannon (I) e heterozigosidade média esperada (H_e) para as populações e para a espécie, a partir do programa GenAlEx 6.3b para Excel® (Peakall e Smouse 2012). Ainda com este programa, a partir da matriz de fenótipos ISSR foi construída uma matriz de distância euclidiana quadrada e realizada a análise de variância molecular (AMOVA). Com a AMOVA foi possível quantificar a proporção da diversidade genética intraespecífica atribuída à diferenciação interpopulacional. A análise da estrutura genética, ou seja, da perda de diversidade causada pela subdivisão populacional foi feita através do Φ_{ST} (Wright 1978).

Para demonstrar a ordenação dos pares de indivíduos das populações, foi realizada uma Análise de Coordenadas Principais (PCO) através do programa Past 2.17c (Hammer et al. 2001), a partir de uma matriz de similaridade de Jaccard (Sneath e Sokal 1973). Para inferir o número de grupos genéticos nas populações amostradas foi conduzida análise Bayesiana através do pacote GENELAND 4.0.3 (Guillot e Santos 2010), disponível no programa R (<http://www.cran.r-project.org/>). Para avaliar a estrutura populacional procedemos a simulações de Monte Carlo e Cadeia de Markov (MCMC), utilizando os genótipos multilocus dos indivíduos amostrados para detecção de grupos genéticos prováveis (K) e assumindo o modelo de populações mistas. Nesta abordagem foi possível acessar as probabilidades posteriores de populações estruturadas e probabilidade de cada indivíduo pertencer à população amostrada ou apresentar origem externa (Holsinger et al. 2002,

Holsinger e Wallace 2004, Larson et al. 2004). O número de populações estabelecidas (K) foi de K = 1 a K = 5 com 10 execuções independentes para cada valor de K. Cada corrida teve 200.000 iterações de Monte Carlo e Cadeia de Markov (MCMC), com 50.000 iterações descartadas (*burn-in*).

Para as análises Bayesianas uma nova AMOVA foi realizada com o programa GenAlEx 6.3b. Com os valores de Φ_{ST} entre todos os pares de grupos formados pelas análises Bayesianas, foi gerada uma matriz através do programa AFLP-SURV 1.0 (Vekemans 2002). Através desta matriz, foi construída uma árvore utilizando *neighbor-joining* através do programa PHYLIP (Felsenstein 1993), com suporte estatístico *Bootstrap* calculado pelo pacote Consense, do mesmo programa. O dendrograma resultante foi visualizado através do TREEVIEW (Page 1996).

Resultados

Os sete *primers* utilizados em *C. lobata* resultaram em 119 *loci* com sucesso de amplificação e boa resolução de leitura (Tabela 2). Os *primers* MANNY e UBC 880 resultaram em 22 fragmentos cada um, enquanto que UBC889 e UBC886 resultaram em 14 e 13 fragmentos, respectivamente. Os *primers* MAO, DAT e UBC898 resultaram cada um em 16 *loci*. Esses fragmentos variaram de 100 a 1800 bp.

Cinco fragmentos foram exclusivos, sendo três na população PQ (Pico dos Quatro), um na população PA (Pão de Açúcar) e outro na população AM (Alto Mourão). Na população PQ, um *locus* estava presente em dois indivíduos e os outros dois estavam presentes em apenas um indivíduo cada. Na população PA, o *locus* exclusivo esteve presente em três indivíduos. E na população AM, o único *locus* exclusivo estava presente em apenas dois indivíduos.

No nível populacional o polimorfismo variou de 72,27% (populações PB e PA) a 86,55% (população PQ) (Tabela 3). A heterozigosidade esperada para a espécie e o índice de Shannon foram 0,309 e 0,463 respectivamente. As populações mostraram alta variabilidade, com médias de H_e e I igual a 0,271 e 0,392 respectivamente. A população PB teve o menor nível de diversidade ($H_e = 0,245$, $I = 0,354$) e a população PQ teve o maior nível de diversidade ($H_e = 0,288$, $I = 0,424$) (Tabela 3).

As populações do Complexo da Gávea estão distribuídas em três picos diferentes – Pico dos Quatro, Pedra Bonita e Agulhinha da Gávea. A distância entre essas populações é menor do que entre as populações do Pão de Açúcar e do Alto Mourão (Niterói). A menor distância está entre as populações PB e AG (0,833km) e a maior entre as populações AM e PQ (27,663km) (Tabela 4). Quando comparadas par a par, as populações apresentaram alta similaridade entre si. A maior identidade genética ocorreu entre as populações PQ e AG, com distância genética de 0,024 e a menor identidade entre as populações PB e AM, com distância genética foi de 0,094. Esta última população está localizada no município de Niterói, sendo a população mais distante do Complexo da Gávea. (Tabela 4). Na análise de coordenadas principais (PCO), houve uma estruturação discreta entre a população do município de Niterói e as demais populações (Fig. 3), o que coincide com a distância geográfica entre estas populações. Houve também a sobreposição dos indivíduos das populações do Complexo da Gávea e do Pão de Açúcar, condizendo com a proximidade genética entre elas.

As análises de agrupamento utilizando o algoritmo *neighbor-joining* com a distância genética de Nei (1978) entre as populações não formou agrupamentos com suporte estatístico significativo (Fig. 4).

A partir das análises de variância molecular (AMOVA) foi verificada a alta variabilidade genética dentro das populações, abrangendo 93% de toda a variabilidade encontrada para a espécie. Houve estruturação genética significativa com $\Phi_{ST} = 0,074$

($P < 0,001$) (Tabela 5) entre as populações de *C. lobata*. Através da análise Bayesiana foi possível encontrar apenas um contingente populacional.

Discussão

Variabilidade genética

A coleta indiscriminada de exemplares de *Cattleya lobata* somado a intensa degradação da vegetação rupícola nas formações rochosas inseridas nas áreas urbanas do Rio de Janeiro, contribuíram para a grande redução no número de indivíduos desta espécie em seu ambiente natural (Constantino e Fraga 2005, Fraga et al. 2009). Diante deste panorama, onde o microendemismo está associado à presença de apenas populações relictuais, seria esperado encontrarmos uma baixa variabilidade genética (Falk e Holsinger 1991, Nybom e Bartish 2000). Porém, a partir dos padrões de polimorfismo encontrados via ISSR foi observada uma variabilidade genética relativamente alta na espécie estudada quando comparada com espécies que compartilham tais características populacionais e geográficas, bem como ausência de estruturação genética interpopulacional (Alcântara et al. 2006, Ávila-Díaz e Oyama 2007, Azevedo et al. 2007, Borba et al. 2007, Almeida et al. 2009, Barbosa et al. dados não publicados, Gomes et al. cap. 2).

Para *C. lobata*, os *primers* de ISSR revelaram de moderados a altos níveis de polimorfismo nas populações ($P > 69\%$). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos de outras orquídeas como *Pleurothallis spp* (Borba et al. 2001), *Dendrobium officinale* (Shen 2006), *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz e Oyama 2007), *Cattleya tenuis* (Borba et al. 2007a), *C. elongata* (Cruz 2011), *Cymbidium goeringii* (Xiaohong 2007), *Octomeria crassifolia* (Barbosa et al., dados não publicados), *Octomeria grandiflora* (Barbosa et al., dados não publicados), *Cattleya perrinii* (Fraga et al., dados não publicados), *C. virens*

(Gomes et al., dados não publicados), *C. xanthina* (Gomes et al., cap. 2) e, também, com outras monocotiledôneas como *Vellozia hirsuta* (Barbosa 2011) e *Vellozia gigantea* (Lousada et al. 2011).

Foram encontrados moderados a altos níveis de heterozigosidade esperada e índice de Shannon, indicando alta diversidade genética da espécie. Esse perfil de variação está acima dos resultados obtidos com marcadores dominantes RAPD em trabalhos revisados por Nybom e Bartish (2000), quando comparados os níveis médios encontrados para espécies endêmicas, perenes e que compartilham características reprodutivas semelhantes.

Baixos níveis de variabilidade genética são comumente encontrados em espécies endêmicas ou que apresentam populações de distribuição disjunta, ocupando habitats fragmentados ou isolados, como por exemplo, *C. pfisteri* (Silva e van den Berg 2008). Tais populações, muitas vezes com tamanhos reduzidos, estão mais susceptíveis a perdas da variabilidade genética devido aos efeitos de endogamia e deriva genética (Falk e Holsinger 1991). Porém, algumas espécies de orquídeas rupícolas de campos rupestres na Serra do Espinhaço com características geográficas similares apresentam de moderados a altos níveis de variabilidade genética e baixa estruturação. Para muitos dos casos esses padrões tem sido interpretados como resultado de estratégias reprodutivas que aumentam as chances de reprodução cruzada, associadas ao mecanismo de dispersão das sementes pelo vento, principal fator responsável por migrações a longas distâncias em orquídeas (Dressler 1981, Borba et al. 2001, Azevedo et al. 2007, Borba et al. 2007b, Ribeiro et al. 2008).

Com base nas observações de Fraga et al. (2009) e nas semelhanças quanto à biologia floral e aspectos reprodutivos de outras espécies de Orchidaceae anteriormente estudadas (e.g. Borba e Braga 2003, Smidt et al. 2006, Silva-Pereira et al. 2007, Freire e Fraga 2010, Fraga et al., dados não publicados), é esperado que *C. lobata* também apresente polinização por engodo. Esse tipo de polinização, onde a flor apresenta todas as características de uma flor

tipicamente melitófila e não disponibiliza o recurso, reduz a taxa de geitonogamia (Dressler 1981). Uma vez enganado, o vetor visita poucas flores na mesma população e promove o fluxo de pólen a longas distâncias, favorecendo a fecundação cruzada e aumentando a variabilidade genética (Borba et al. 2007a, 2007b, Cruz 2011). Outro fator que pode atuar na manutenção de uma alta variabilidade genética nas populações de *C. lobata* é a marcada reprodução clonal por brotamento, associada ao longo tempo de vida dos indivíduos, o que pode garantir que um mesmo genótipo permaneça na população por várias gerações (Azevedo et al. 2007).

Estruturação populacional

Os resultados da AMOVA indicam que a maior parte da variação genética de *C. lobata* está concentrada dentro das populações e não de forma hierarquizada, em grupos genéticos distintos. Resultados semelhantes em espécies também com distribuição disjunta em afloramentos rochosos foram encontrados em *Pterostylis gibbosa* (Sharma et al. 2000), *Cattleya elongata* (Cruz 2011), *C. pfisteri* (Silva e van den Berg 2008), *Encyclia dichroma* e *E. ghillanyi* (Almeida et al. 2009) e *Octomeria crassifolia* (Barbosa et al., dados não publicados) sugerindo que o perfil genético encontrado neste estudo parece ser comum na família Orchidaceae.

Baixos níveis de estruturação genética também foram encontrados em estudos com outras orquídeas como *Laelia rubescens* (Trapnell et al. 2004), *Oncidium hookeri* (Alcântara et al. 2006), *Laelia speciosa* (Ávila-Díaz e Oyama 2007), *Sophronitis sincorana* (Borba et al. 2007b), *Cattleya elongata* (Cruz 2011), *Octomeria crassifolia* (Barbosa et al., dados não publicados), *C. xanthina* (Gomes et al., dados não publicados). Neste sentido, tem sido considerado consenso que as sementes de orquídeas dispersas pelo vento podem atuar como um fator importante no fluxo gênico, mantendo a coesão genética entre populações distantes.

O resultado de Φ_{ST} (0,074) indica que há uma baixa diferenciação genética significativa entre as populações de *C. lobata*, o que indica pouca estruturação genética ao longo da distribuição geográfica da espécie. As análises PCO são indicadas para testar a presença de estruturação em conjuntos de dados com resultados de Φ_{ST} próximos ou inferiores a 0,05 (Reeves e Richards 2009). Assim, com estas análises foi possível detectar uma discreta estruturação, separando os indivíduos da população do município de Niterói das demais populações que estão no município do Rio de Janeiro, corroborando a significância da baixa diferenciação encontrada na AMOVA. Essa estruturação pode estar relacionada à distância geográfica maior que separa a população de Niterói das outras.

Em estudos de simulação de dispersão pelo vento, Coutto et al. (dados não publicados) demonstram que as sementes de *C. lobata* tendem a percorrer longas distâncias. Tais resultados talvez expliquem o padrão de alta similaridade genética encontrada entre todas as populações estudadas indicando que a dispersão de sementes nesta espécie poderia garantir o fluxo gênico entre as populações nos diferentes *inselbergs*. Alguns estudos demonstram que plantas herbáceas e perenes têm baixa diferenciação possivelmente devido à dispersão das sementes pelo vento (Hamrick e Godt 1996).

A presença de alguns indivíduos epífitos no encontro da mata com os *inselbergs* (Saddi 2008) pode indicar, que num passado recente antes da urbanização e das intensas coletas, esta espécie também ocorria em maiores extensões ao longo da floresta. Neste cenário, as populações que observamos hoje nestes *inselbergs*, com indivíduos rupícolas isolados nos paredões de rochas expostas, sejam apenas uma amostra que restou apenas indivíduos inacessíveis de populações amplas e talvez conectadas. Neste caso, nossos resultados indicariam que todas as populações seriam parte de um único *pool* gênico com alta variabilidade genética. Assim, por se tratar de uma espécie de plantas perenes e de vida longa, a fragmentação de populações não é antiga o suficiente para promover o isolamento genético,

ou seja, o fluxo gênico ainda é um processo recente nestas populações (Andrianoelina et al. 2009).

Apesar da alta variabilidade genética e a baixa estruturação entre as populações, *C. lobata* corre grandes riscos de extinção devido ao número reduzido de indivíduos por população, o grande impacto que o turismo exerce nas áreas de ocorrência da espécie e a continuidade da coleta ilegal de exemplares naturais. Assim, as informações genéticas apresentadas neste estudo permitem apontar que é possível a reintrodução ou transferência de material genético (indivíduos, pólen ou sementes) oriundos de qualquer uma das populações, que compreendem um estoque único e homogêneo de variação genética de *C. lobata*.

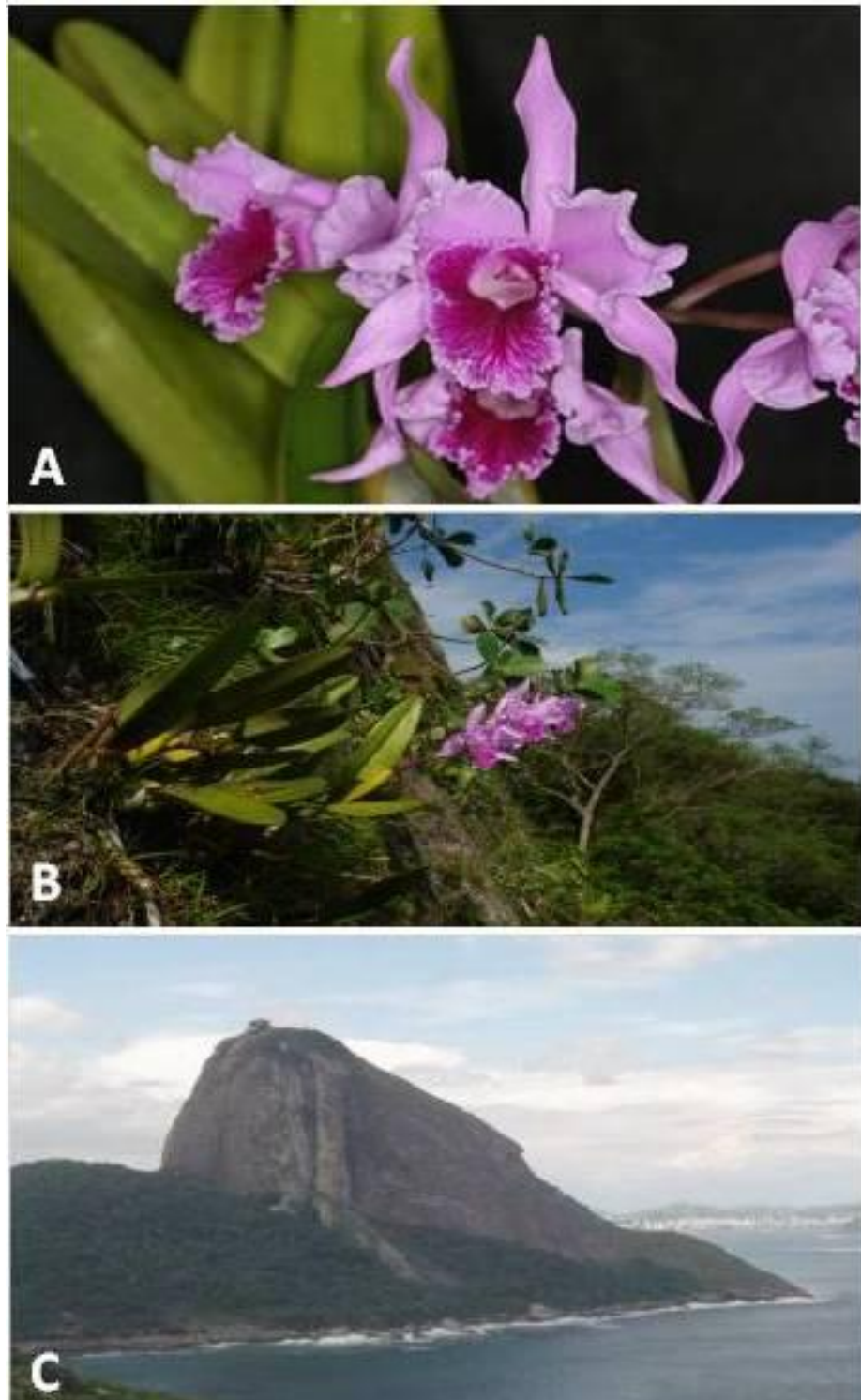


Fig. 1. A. Detalhe floral de *Cattleya lobata* Lindl. (Foto: E. C. Smidt). B. Indivíduo de *Cattleya lobata* na população do Pico dos Quatro, Rio de Janeiro (Foto: C. N. Fraga). C. Habitat típico de *C. lobata* em *inselberg* na cidade do Rio de Janeiro – Pão de Açúcar (Foto: E. Saddi 2008).



Fig. 2. Abrangência da distribuição geográfica e populações de *Cattleya lobata* analisadas neste estudo (Rio de Janeiro, sudeste do Brasil). Mapa gerado no Google Earth (<http://www.google.com/earth/index.html>). Siglas: PQ – Pico dos Quatro, PB – Pedra Bonita, AG – Agulhinha da Gávea, PA – Pão de Açúcar, AM – Alto Mourão.

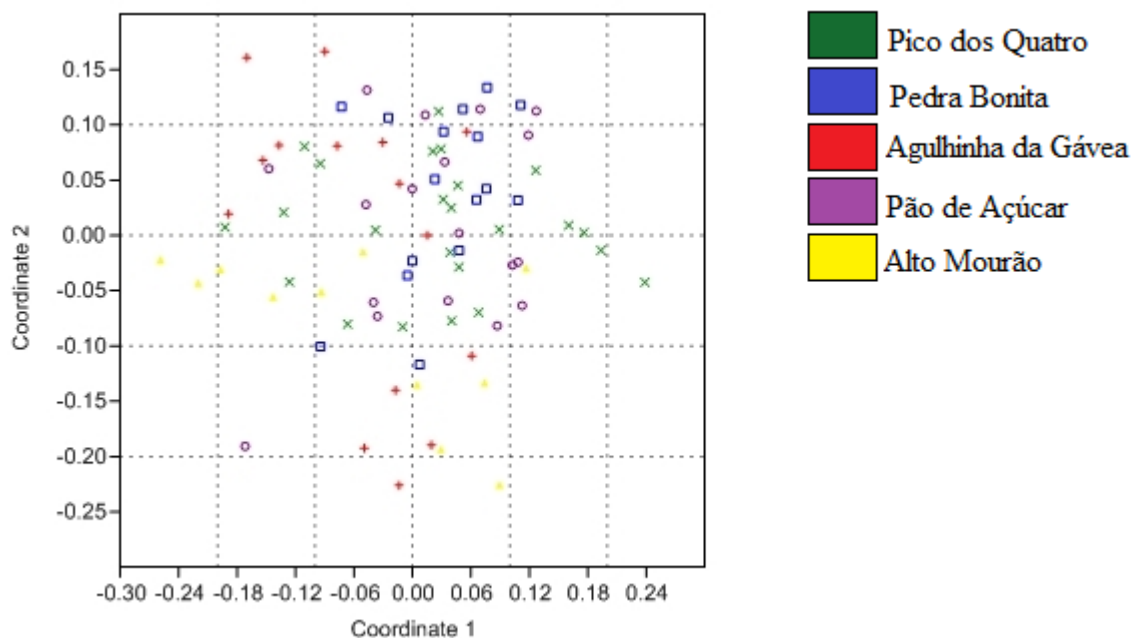


Fig. 3. Análise de coordenadas principais (PCO) de 5 populações de *Cattleya lobata*, ocorrentes no Estado do Rio de Janeiro, baseada em 119 *loci* de ISSR.

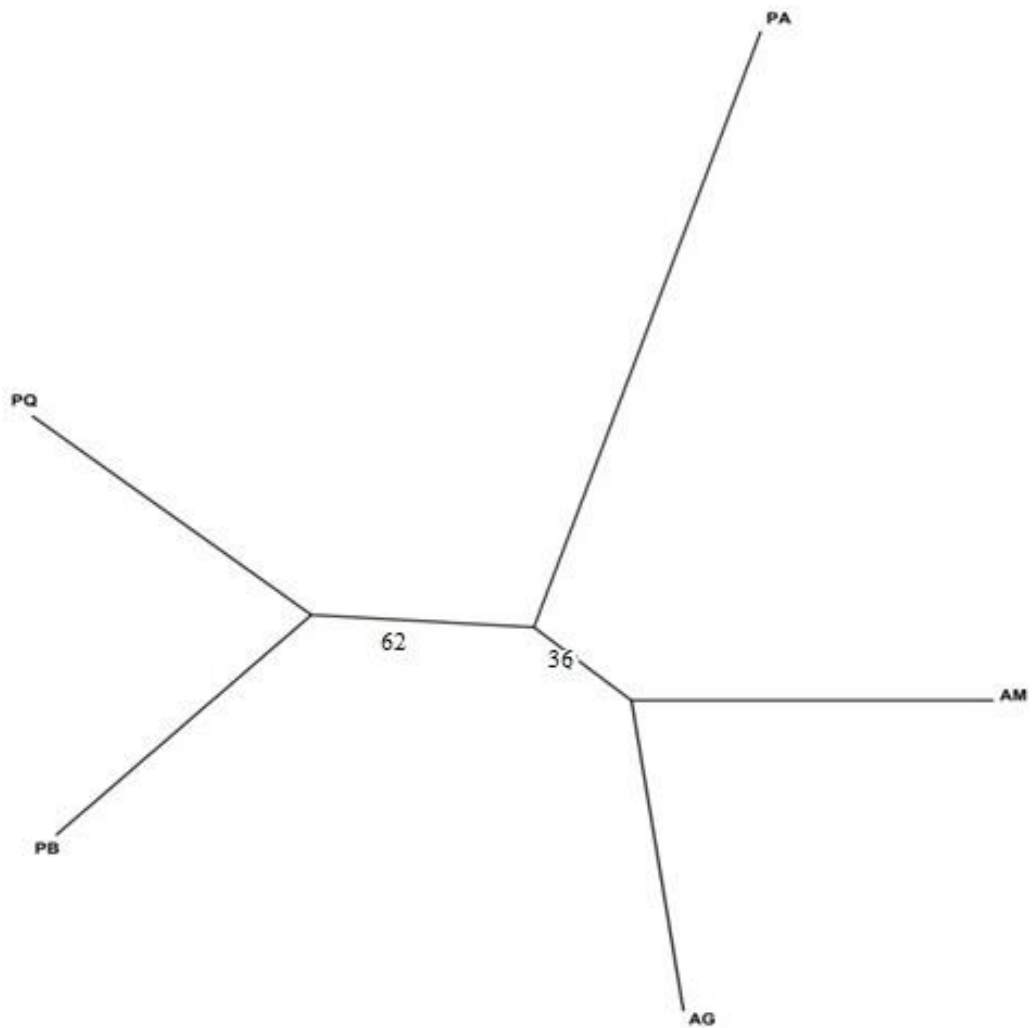


Fig. 4. Árvore de *neighbor-joining* construída a partir da Distância Genética de Nei (1978) estimada entre as populações de *Cattleya lobata* ocorrentes em *inselbergs* dos municípios do Rio de Janeiro e Niterói. *Bootstrap* dado em porcentagem. Siglas: PQ – Pico dos Quatro, PB – Pedra Bonita, AG – Agulhinha da Gávea, PA – Pão de Açúcar, AM – Alto Mourão.

Tabela 1. Localização das populações amostradas de *Cattleya lobata* ao longo da sua distribuição na costa do Rio de Janeiro, código utilizado para as populações, altitude (Alt) e número de indivíduos coletados (N).

Localização	Código	Alt	N
RJ – Rio de Janeiro - Complexo Pedra da Gávea, Pico dos Quatro	PQ	224	24
RJ – Rio de Janeiro - Complexo Pedra da Gávea, Pedra Bonita	PB	649	16
RJ – Rio de Janeiro - Complexo Pedra da Gávea, Agulhinha da Gávea	AG	505	15
RJ – Rio de Janeiro - Pão de Açúcar	PA	307	18
RJ – Niterói - Alto Mourão	AM	414	11

Tabela 2. Primers de ISSR utilizados e suas sequências, temperatura de anelamento (T °C), número de fragmentos polimórficos (NF) e porcentagem de fragmentos polimórficos (FP) em *Cattleya lobata*.

Nome do primer	Sequência do primer*	T °C	NF (FP%)
MANNY	(CAC) ₄ RC	50	22 (92,73)
MAO	(CTC) ₄ RC	50	16 (68,75)
DAT	(GA) ₇ RG	50	16 (82,50)
UBC898	(CA) ₆ -RY	47	16 (73,75)
UBC899	(CA) ₆ RG	50	14 (77,14)
UBC880	GGAGAGGAGAGGAGA	50	22 (60,91)
UBC886	VDVCTCTCTCTCTCTCT	50	13 (87,69)
Total	-	-	119 (77,14)

*Y = C ou T; R = A ou G; V = G, C ou A; D = G, A ou T.

Tabela 3. Diversidade genética das populações de *Cattleya lobata* ocorrentes em *inselbergs* dos municípios do Rio de Janeiro e Niterói, baseada em 119 *loci* polimórficos de ISSR. *P* = porcentagem de *loci* polimórficos; *I* = Índice de diversidade de Shannon; *UH_e* = heterozigidade esperada. Erro padrão em parênteses. Siglas: PQ – Pico dos Quatro, PB – Pedra Bonita, AG – Agulhinha da Gávea, PA – Pão de Açúcar, AM – Alto Mourão.

População	<i>P</i> (%)	<i>I</i> (± EP)	<i>UH_e</i> (±DP)
PQ	86,55%	0,424 (±0,023)	0,288 (±0,017)
PB	69,75%	0,354 (±0,035)	0,245 (±0,019)
AG	74,79%	0,391 (±0,025)	0,272 (±0,019)
PA	72,27%	0,398 (±0,025)	0,276 (±0,018)
AM	76,47%	0,392 (±0,025)	0,275 (±0,019)
Média	75,97%	0,392 (±0,011)	0,271 (±0,008)
Nível de espécie	95,8%	0,463 (±0,02)	0,309 (±0,016)

Tabela 4. Matriz de distância genética média (“Unbiased Genetic Distance”, Nei 1978) (diagonal abaixo) e de distância geográfica (diagonal acima) em quilômetros entre as populações de *Cattleya lobata* ocorrentes em *inselbergs* dos municípios do Rio de Janeiro (PQ, PB, AG e PA) e Niterói (AM). Siglas: PQ – Pico dos Quatro, PB – Pedra Bonita, AG – Agulhinha da Gávea, PA – Pão de Açúcar, AM – Alto Mourão.

População	PQ	PB	AG	PA	AM
PQ	0,000	1,952	2,550	13,624	27,663
PB	0,036	0,000	0,833	12,477	27,006
AG	0,024	0,054	0,000	11,648	26,225
PA	0,035	0,043	0,026	0,000	15,267
AM	0,057	0,094	0,067	0,061	0,000

Tabela 5. Análise de Variância Molecular (AMOVA) em populações de *Cattleya lobata* ocorrentes em *inselbergs* dos municípios do Rio de Janeiro e Niterói.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componente de variação	% variação total	<i>P</i>
Entre populações	4	159,394	39,849	7%	<0.000
Dentro das populações	79	1353,439	17,132	93%	<0.000
Total	83	1512,833		100%	

Referências

- Alcântara S, Semir J, Solferini VN (2006) Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the Atlantic Rainforest of South-eastern Brazil. *Ann Bot* 98: 1207-1213.
- Almeida PRM, Góes-Neto A, van den Berg C (2009) Variabilidade genética em populações de *Encyclia dichroma* (Lindl.) Schltr. e *E. ghillanyi* Pabst (Laeliinae, Orchidaceae). In: Anais do 55º Congresso Brasileiro de Genética. Sociedade Brasileira de Genética, p. 220.
- Andrianoelina O, Favreau B, Ramamonjisoa L, Bouvet JM (2009) Small effect of fragmentation on the genetic diversity of *Dalbergia monticola*, an endangered tree species of the eastern forest of Madagascar, detected by chloroplast and nuclear microsatellites. *Ann Bot* 104: 1231-1242.
- Ávila-Díaz I, Oyama K (2007) Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Am J Bot* 94(2): 184-193.
- Azevedo MTA, Borba EL, Semir J, Solferini VN (2007) Very high genetic variability in Neotropical myophilous orchids. *Bot J Linn Soc* 153: 33-40.
- Barbosa AR (2011) Biosistemática do complexo *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) baseada em análise filogeográfica e genética de populações. 85p. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN (2010) Orchidaceae In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000179>, acessado em 20/12/2011.
- Berg EE, Hamrick JL (1997) Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Can J Forest Res* 27(3): 415-424.

- Borba EL, Braga PIS (2003) Biologia reprodutiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. *Rev Bras Bot* 26(4): 541-549.
- Borba EL, Felix JM, Solferini VN, Semir J (2001) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *Am J Bot* 88: 419-428.
- Borba, EL, Funch RR, Ribeiro PL, Smidt EC, Silva-Pereira V (2007a) Demografia, variabilidade genética e morfológica e conservação de *Cattleya tenuis* (Orchidaceae), espécie ameaçada de extinção da Chapada Diamantina. *Sitientibus Ser Cienc Biol* 7(3): 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. *Plant Syst Evol* 267: 129-146.
- Brown KSJ, Brown GG (1992) Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In: Whitmore TC, Sayer JA (eds) *Tropical deforestation and species extinction*. Chapman and Hall, London, England, pp. 119-142.
- Camargo A, Capobianco JPR, Oliveira JAP (2002) *Meio ambiente Brasil: avanços e obstáculos pós-Rio-92*. Editora Estação Liberdade, São Paulo.
- CITES. 2010. Convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora Appendices I, II and III. Disponível em: <http://www.cites.org>, acessado em 01/ 2011.
- Constantino P, Fraga CN (2005) Conservation strategy for *Laelia lobata* (Lindl.) H.J. Veitch: the most endangered orchid of Rio de Janeiro. *Selbyana* 26(12): 85-88.
- Cruz DT, Schnadelbach AS, Lambert SM, Ribeiro PL, Borba EL (2011) Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. *Plant Syst Evol* 294(1-2): 87-98.

- Dressler RL (1981) *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge.
- Falk DA, Holsinger KE (1991) *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York.
- Felsenstein J (1993) PHYLIP (Phylogeny inference package) version 3.5c. University of Washington, Seattle.
- Fraga, CN, Fontana AP, Saddi EM, San Martin-Gajardo IC, Simonelli M, Bocayuva MF, Constantino PAL, Borges RAX, Machado SL, Murrieta R, Monnerat M, Paes JE (2009) Plano de ação para as orquídeas em risco de extinção. Relatório Final, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A.M. de Mello – CENPES/Petrobras. 522p.
- Freire LSR, Fraga CN (2010) Ecologia reprodutiva de *Cattleya perrinii* Lindl. (Orchidaceae: Laelinae), como ferramenta para conservação da espécie. In: Anais do 61º Congresso Nacional de Botânica, Manaus. Sociedade Botânica do Brasil, CD-ROM.
- Guillot G, Santos F (2010) Using AFLP markers and the Geneland program for the inference of population genetic structure. *Mol Ecol Resour* 10(6): 1082-1084.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontol electron* 4(1): 9.
- Hamrick JL, Godt MJW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philos T R Soc B* 351: 1291–1298.
- Holsinger KE, Lewis PO, Dey DK (2002) A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Mol Ecol* 11: 1157–1164.
- Holsinger KE, Wallace LE (2004) Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: an example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *Mol Ecol* 13: 887-894.

- Larson SR, Jones TA, Jensen K. B (2004) Population structure in *Pseudoroegneria spicata* (Poaceae: Triticeae) modeled by Bayesian clustering of AFLP genotypes. *Am J Bot* 91(11): 1789–1801.
- Lousada JM, Borba EL, Ribeiro KT, Ribeiro LC, Lovato MB (2011) Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with landscape in Espinhaço Range, southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica* 139: 431-440.
- Mittermeier RA, Gil PR, Hoffmann M, Pilgrim J, Brooks J, Mittermeier CG, Lamourux J, Fonseca GAB (2004) Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. DC: Cemex, Washington.
- Moritz C (1995) Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philos T R Soc B* 349: 113–118.
- Murcia C (1996) Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. In: Schellas J, Greenberg R (eds.) *Forest patches in tropical landscapes*. Island Press, Washington.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89(3): 583-590.
- Novaes RML, Rodrigues JG, Lovato MB (2009) An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. *Genet Mol Resour* 8(1): 86-96.
- Nybom H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspect Plant Ecol* 3: 93-144.
- Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12(4): 357–358.

- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlex 6.5: genetic in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatic* 29(19): 2537-2639.
- Peixoto AL, Rosa MMT, Silva IM (2002) Caracterização da Mata Atlântica. In: Manual Metodológico para estudos botânicos na Mata Atlântica. Ed: Seropédica, Rio de Janeiro.
- Pereira KFR, Malafaia CB, Silva TD, Almeida CMA, Silva AG (2008) Diversidade Genética em uma população de *Epidendrum cinnabarium* Salzm. Ex Lindl. (Orchidaceae) provenientes de *Inselbergs* utilizando marcador molecular. In: Anais do 59º Congresso Nacional de Botânica, Natal. Sociedade Botânica do Brasil, p. 31.
- Pinheiro LR, Rabbani ARC, da Silva AVC, Léo AS, Pereira KLG, Diniz LEC (2012) Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. *Plant Syst Evol* 298: 1815-1825.
- Reeves PA, Richards CM (2009) Accurate inference of subtle population structure (and other genetic discontinuities) using principal coordinates. *Plos One* 4(1): e4269.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol Conserv* 142: 1141-1153.
- Ribeiro PL, Borba EL, Smidt EC, Lambert SM, Schnadelbach AS, 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. *Plant Syst Evol* 270: 109-137.
- Rieseberg LH (1996) Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol Ecol* 5 (1): 99–105.
- Saddi EM (2008) Orchidaceae dos Afloramentos Rochosos da Pedra da Gávea, Parque Nacional da Tijuca, Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Botânica), Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

- Sharma IK, Clements MA, Jones DL (2000) Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae). *Biochem Syst Ecol* 28(7): 651-663.
- Shen J, Ding X, Liu D, Ding G, He J, Li X, Tang F, Chu B (2006) Intersimple Sequence Repeats (ISSR) Molecular Fingerprinting Markers for Authenticating Populations of *Dendrobium officinale* KIMURA et MIGO. *Biol Pharm Bull* 29 (3): 420-4222.
- da Silva JMC, Casteleti CHM (2003) Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: Galindo-Leal C, Câmara IG (eds.) *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook*. CABS and Island Press, Washington, p. 43–59.
- Silva JRSS, van den Berg C (2008) Variabilidade populacional de *Cattleya pfisteri* (Pabst & Senghas) van der Berg (Orchidaceae), Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. In: *Anais do 59º Congresso Nacional de Botânica, Natal*. Sociedade Botânica do Brasil, p. 64.
- Silva-Pereira V, Smidt EC, Borba EL (2007) Isolation mechanisms between two sympatric *Sophronitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. *Plant Syst Evol* 269: 171-182.
- Smidt EC, Silva-Pereira V, Borba EL (2006) Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to North-eastern Brazil. *Plant Spec Biol* 21: 85-91.
- Smith JL, Hunter KL, Hunter RB (2002) Genetic variation in the terrestrial orchid *Tripularia discolor*. *Southeast Nat* 1 (1): 17-26.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. WH Freeman, San Francisco.
- Stehmann JR, Forzza RC, Salino A, Sobral M, Costa DP, Kamino LHY (2009) *Plantas da Floresta Atlântica*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 516p.
- Trapnell DW, Hamrick JL, Nason JD (2004) Three-dimensional fine-scale genetic structure of

- the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Mol Ecol* 13: 1111-1118.
- Thormann W, Molteni S, Caslavská J, Schumtz A. 1994. Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 15(1): 3–12.
- Vekemans X (2002) AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Xiaohong Y, Li G, Bo Y (2007) Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on Inter-simple sequence repeats analysis. *Front Biol in China* 2 (4): 419-424.
- Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Method Enzymol* 218: 704–740.
- Withner CL (1988) The Cattleyas. In: Withner CL The Cattleyas and their relatives. Portland: Timber Press.
- Wolfe AD, Liston A (1998) Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ. *Plant Molecular Systematics II*. Kluwer, Boston. pp. 43-86.
- Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Populations. Variability within and among natural populations*. Vol 4. The University of Chicago Press, Chicago.

**CAPÍTULO II: SINAIS DE INTROGRESSÃO GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE
CATTLEYA XANTHINA (LINDL.) VAN DEN BERG (ORCHIDACEAE), ESPÉCIE
ENDÊMICA DA MATA ATLÂNTICA**

Sinais de introgressão genética em populações de *Cattleya xanthina* (Lindl.) van den Berg (Orchidaceae), espécie endêmica da Mata Atlântica

P. C. L. Gomes¹; E. C. Smidt¹; C. N. Fraga² & V. Silva-Pereira¹

¹ Laboratório de Filogenia e Genética da Conservação de Plantas, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Curitiba, Paraná, 81531-990, Brasil;

² Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Diretoria de Pesquisa Científica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil;

Autor para correspondência: patriciaclgomes@yahoo.com.br

RESUMO

Cattleya xanthina é uma orquídea endêmica da Mata Atlântica, da região sudeste do Brasil e está em risco de extinção. Informações sobre variabilidade e estrutura genética das populações relictuais foram obtidas através de marcadores moleculares dominantes (ISSR - *Inter Simple Sequence Repeat*), com o objetivo de definir o *status* de conservação genética da espécie. Além disso, informações históricas e evolutivas foram obtidas através de sequenciamento de DNA plastidial. Sete primers ISSR e dois primers cpDNA (*psbD-trnT* e *rpl32-trnL*) foram utilizados em 77 indivíduos das cinco populações conhecidas (12 a 44 indivíduos por população), no Estado do Espírito Santo, abrangendo quase toda a distribuição geográfica da espécie. Em ambos os conjuntos de dados foram detectadas alta variabilidade genética e baixa estruturação significativa. Os marcadores moleculares utilizados se mostram adequados à investigação de processos históricos e atuais. Através dos marcadores nucleares foi inferido que as cinco populações amostradas pertencem a um único contingente populacional. Esta coesão genética indica que provavelmente a fragmentação atual ocasionada pela urbanização e agricultura é um processo recente em relação ao tempo evolutivo necessário ao isolamento genético entre estas subpopulações. Portanto, verifica-se que os remanescentes populacionais preservam variação genética próxima da total encontrada para a espécie. Para as análises filogeográficas, a rede de haplótipos apresentou duas linhagens genéticas altamente divergentes separadas por um grande número de passos mutacionais, onde cada uma das linhagens apresenta um haplótipo central mais frequente e uma série de haplótipos derivados menos frequentes. Essas duas linhagens estão amplamente distribuídas entre as cinco populações amostradas, não sendo encontrada subdivisão geográfica de grupos haplotípicos. O padrão de variação genética destas duas linhagens discretas e não geográficas sugere a ocorrência de processos antigos de hibridização e introgressão, com a incorporação e dispersão de haplótipos de outra espécie ao longo das populações de *C. xanthina*.

Introdução

Devido a sua coloração amarela, *Cattleya xanthina* (Lindl.) van den Berg (Fig. 1. A) é uma espécie de orquídea muito procurada por cultivadores para produzir híbridos artificiais amarelos ou verdes. É uma planta preferencialmente epífita (Fraga et al. 2009) (Fig. 1. B), crescendo cerca de 30 cm de altura. Suas inflorescências apresentam de 1-8 flores, as quais

apresentam sépalas e pétalas amarelo claro. Os lobos laterais do labelo, que envolvem a coluna, possuem a coloração amarela mais vivo no interior do tubo, com poucas veias púrpura, enquanto no lobo mediano se destacam veias púrpura da base até as margens do labelo formando as guias de néctar, que variam de muitas a apenas uma ou nenhuma (Withner 1988). Não há evidências de osmóforos nas peças florais de *Cattleya xanthina*, da mesma forma, não foi constatada a presença de néctar na câmara floral, sugerindo que a polinização ocorra por engodo (Fraga et al. 2009).

Esta espécie é provavelmente endêmica da região montanhosa central do Espírito Santo (Miranda 1998, Ruschi 1986). De acordo com Hoehne (1953), a distribuição geográfica da espécie é a mesma das espécies *Cattleya tenebrosa* e *Cattleya grandis*, ocorrendo desde o sul da Bahia até o estado do Rio de Janeiro.

Considerada como um dos 34 *hotspots* (Mittermeier et al. 2004), a Mata Atlântica abriga grande biodiversidade (da Silva e Casteleti 2003). Estudos paleoclimáticos evidenciaram que a alta diversidade e o endemismo da Mata Atlântica seja consequência das flutuações climáticas durante o Holoceno e o Pleistoceno para alguns organismos (Carnaval e Moritz 2008, Carnaval et al. 2009). Além disso, fatores como a extensão latitudinal (Pinto e Brito 2003), características geográficas e a variação altitudinal (Ribeiro et al. 2009), contribuem para a alta diversidade e endemismo na Mata Atlântica.

Estima-se que a superfície total remanescente deste bioma compreenda entre 11,4 a 16% da sua cobertura original (Ribeiro et al. 2009). Uma das consequências da fragmentação de populações vegetais e extinções locais é perda definitiva de estoques de variabilidade genética (Brown e Brown 1992, Murcia 1996). Apesar desses fatores, a Mata Atlântica continua apresentando rica biodiversidade (Camargo et al. 2002) e sendo importante área de distribuição de espécies endêmicas, notadamente na família Orchidaceae (Peixoto et al. 2002, Stehmann et al. 2009, Barros et al. 2010).

A biologia, a variabilidade genética e a dinâmica populacional devem ser áreas chave de estudo em programas de conservação de espécies endêmicas e ameaçadas (Falk e Holsinger 1991). Também é importante verificar a existência de partições demográficas ao longo da distribuição geográfica da espécie a partir de estimativas da variabilidade e estrutura genética das populações analisadas (Moritz 1995, Frankham et al. 2002). No Brasil, estudos utilizando esta abordagem têm aumentado especialmente para espécies pressionadas pela exploração comercial, como no caso das orquídeas *Cattleya* da Mata Atlântica, que tem alto apelo comercial pelo atrativo ornamental. Tais estudos têm demonstrado importância de se conhecer o nível de variabilidade genética (e.g., Alcântara et al. 2006, Smidt et al. 2006, Borba et al. 2007a, Borba et al. 2007b, Silva-Pereira et al. 2007, Pereira et al. 2008, Ribeiro et al. 2008, Silva e van den Berg 2008, Almeida et al. 2009, Cruz et al. 2011, Pinheiro et al. 2012, Gomes et al., dados não publicados), especialmente na aplicação para a conservação de espécies endêmicas de distribuição restrita e ameaçadas de extinção.

Em Orchidaceae, marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) tem sido utilizados para a análise de aspectos evolutivos e ecológicos (Smith et al. 2002, Shen et al. 2006, Xiaohong et al. 2007, Pereira et al. 2008, Silva e van den Berg 2008, Almeida et al. 2009, Cruz et al. 2011, Barbosa et al., dados não publicados, Fraga et al., dados não publicados, Gomes et al., cap.1). Estes marcadores apresentaram polimorfismos que permitem discutir tanto aspectos populacionais, quanto em complexos de espécies. Por se tratar de marcadores nucleares, altamente polimórficos e com herança biparental, variações recentes nos sistemas de reprodução e níveis de endogamia modelam a distribuição dos genótipos entre indivíduos proximamente aparentados, refletindo os padrões de dispersão gênica nas últimas gerações (Zietkiewicz et al. 1994).

A filogeografia permite compreender a evolução de populações e espécies através de inferências sobre processos demográficos e históricos (Templeton et al. 1995, Avise 2000).

Essas inferências são realizadas a partir da distribuição da variabilidade genética ao longo das populações estudadas (Pannell e Dorken 2006). Informações filogeográficas obtidas através do sequenciamento de regiões de DNA do cloroplasto (cpDNA), permite descrever os padrões filogeográficos de espécies (King e Ferris 1998). Devido ao genoma plastidial ter herança materna na maioria das Angiospermas (Birky 1995) e possuir taxa de mutação menor se comparado ao genoma nuclear e mitocondrial (Soltis et al. 1992), sendo ideal para a investigação de processos evolutivos antigos (Ennos et al. 1999). Dentre esses processos estão expansão ou contração populacional, migração e dispersão (Ennos et al. 1999), além de demonstrar a ocorrência antiga ou contemporânea de hibridizações (Rieseberg et al. 1996, Gross et al. 2003).

A maior parte dos estudos filogeográficos brasileiros têm sido com espécies arbóreas (Salgueiro et al. 2004, Ramos et al. 2007, 2009, Collevatti et al. 2009, Feres et al. 2009, Lage-Novaes et al. 2010, Collevatti et al. 2012). Dentre as monocotiledôneas, há estudos nesta área com Bromeliaceae (Palma-Silva et al. 2009), Velloziaceae (Barbosa et al. 2012) e Orchidaceae (Pinheiro et al. 2011). Esses estudos têm demonstrado grande valor na compreensão da biogeografia das formações vegetacionais e, também, na conservação de espécies. Fatores como as oscilações climáticas do Pleistoceno têm influenciado na diversidade genética e na distribuição de várias dessas espécies (Lorenz-Lemke et al. 2005, Collevatti et al. 2009, Palma-Silva et al. 2009, Ramos et al. 2009, Pinheiro et al. 2011). Nota-se que esta influência tem resultado em padrões recorrentes de maior variabilidade em espécies que se encontram geograficamente em locais de refúgios florestais no Pleistoceno e, também, de um aparente gradiente norte-sul de diversidade genética.

Estima-se que de 5-25% das espécies vegetais apresentam eventos de hibridização e introgressão entre espécies relacionadas (Ellstrand et al. 1996). Hibridização em espécies de Orchidaceae são comuns (Tremblay et al. 2005), sendo esta família bastante conhecida na

literatura pela alta capacidade de reprodução interespecífica. Em termos gerais, é esperado que oscilações climáticas e de expansão/retração de habitats no Pleistoceno tenham, possivelmente, exposto diversas espécies à simpatria criando oportunidades para falhas em barreiras reprodutivas e surgimento de linhagens híbridas em diferentes grupos vegetais (Swenson e Howard 2005). Em muitos casos específicos, é possível detectar as espécies parentais e as zonas híbridas ao longo da distribuição de táxons que atualmente podem apresentar poucas áreas de sobreposição ou distribuição parapátrica (Ellstrand et al. 1996).

Neste trabalho investigamos o nível de coesão genética em *Cattleya xanthina* quantificando a variabilidade e o nível de estruturação genética das populações atuais. Além disso, foi testada a subestruturação genética entre populações a fim de definir quais devem ser apontadas como prioritárias para os projetos de manejo conservação. Para compreender a influência de eventos históricos na diversificação e ocupação geográfica de linhagens procedemos a estudos filogeográficos, aplicando o sequenciamento de regiões do cpDNA.

Materiais e métodos

Amostragem

Foram amostrados fragmentos foliares de 77 indivíduos de *C. xanthina*. Estes indivíduos foram amostrados em cinco diferentes localizações nas cidades de Santa Teresa, Cariacica, Domingos Martins e Santa Maria de Jetibá, no Estado do Espírito Santo (Tabela 1 e Fig. 2).

Essa amostragem abrange quase toda a distribuição da espécie (Barros et al. 2010), com número amostral variando de 11 a 24 por população. Estas populações estão situadas em locais sombreados e úmidos, com altitudes entre 526 a 736 metros. Devido ao risco de extinção da espécie estudada, as coordenadas geográficas das populações não foram mostradas aqui, pois se trata de uma espécie procurada por comerciantes e colecionadores.

Das populações amostradas, apenas uma encontra-se em uma Área de Proteção Ambiental (Estação Biológica de Santa Lúcia, município de Santa Teresa). As demais populações estão situadas em propriedades particulares. Os Vouchers das populações estão depositados no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB).

Extração de DNA e amplificação de ISSR

Os fragmentos foliares foram armazenados a 4°C por no máximo dois dias até serem processadas. Os fragmentos foliares foram submetidos à extração de DNA através do método proposto por Novaes et al. (2009). Todas as amostras de DNA genômico foram incorporadas no banco de DNA total da Universidade Federal do Paraná (DNAUPCB).

Foi testada a aplicabilidade de 25 *primers* ISSR (Wolff e Liston 1998), dos quais sete apresentaram resolução de amplificação e polimorfismo para *C. xanthina* (Tabela 2). As amostras do DNA genômico foram usadas para amplificação através da PCR seguindo o protocolo básico para um volume final de 20 µL contendo: tampão 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 mM de *primer*, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e cerca de 15 a 150 ng de DNA genômico. Para cada um dos *primers* escolhidos a temperatura de anelamento foi ajustada a fim de melhorar a resolução de leitura no gel (Tabela 2). A amplificação foi feita em termociclador Axygen através do programa que inclui etapas de desnaturação inicial a 94°C por 1,5 min, seguido de 36 ciclos de amplificação (94°C por 40 s para a desnaturação; intervalos de 47° a 50°C por 45 s para o anelamento; 72°C por 1,5 min para a extensão) e uma extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos de PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão TAE 0,5X, correndo em voltagem de 120 V por aproximadamente 2 h. Os géis foram posteriormente corados em solução 0,5 mg/ml de brometo de etídio e fotodocumentados.

Os perfis eletroforéticos obtidos nas ampliações com os *primers* ISSR foram codificados como presença (1) ou ausência (0) de uma banda e uma matriz de fenótipos de ISSR foi construída. Locos que apresentaram baixa resolução foram excluídos da análise. Foram consideradas homólogas todas as bandas de igual tamanho molecular em um mesmo *primer* (Williams et al. 1993, Thormann et al. 1994, Rieseberg 1996).

Foram avaliados parâmetros iniciais de variabilidade genética como porcentagem de locos polimórficos (P) e exclusivos, índice de Shannon (I) e heterozigosidade média esperada (H_e) para as populações e para a espécie, a partir do programa GenAlEx 6.3b para Excel® (Peakall e Smouse 2012). Ainda com este programa, a partir da matriz de fenótipos ISSR foi construída uma matriz de distância euclidiana quadrada e realizada a análise de variância molecular (AMOVA). Com a AMOVA foi possível quantificar a proporção da diversidade genética intraespecífica atribuída à diferenciação interpopulacional. A análise da estrutura genética, ou seja, da perda de diversidade causada pela subdivisão populacional foi feita através do Φ_{ST} (Wright 1978).

Para demonstrar a ordenação dos pares de indivíduos das populações, foi realizada uma Análise de Coordenadas Principais (PCO) através do programa Past 2.17c (Hammer et al. 2001), a partir de uma matriz de similaridade de Jaccard (Sneath e Sokal 1973). Para inferir o número de grupos genéticos nas populações amostradas foi conduzida análise Bayesiana através do pacote GENELAND 4.0.3 (Guillot e Santos 2010), disponível no programa R (<http://www.cran.r-project.org/>). Para avaliar a estrutura populacional procedemos a simulações de Monte Carlo e Cadeia de Markov (MCMC), utilizando os genótipos multilocus dos indivíduos amostrados para detecção de grupos genéticos prováveis (K) e assumindo o modelo de populações mistas. Nesta abordagem foi possível acessar as probabilidades posteriores de populações estruturadas e probabilidade de cada indivíduo pertencer à população amostrada ou apresentar origem externa (Holsinger et al. 2002,

Holsinger e Wallace 2004, Larson et al. 2004). O número de populações estabelecidas (K) foi de K = 1 a K = 5 com 10 execuções independentes para cada valor de K. Cada corrida teve 200.000 iterações de Monte Carlo e Cadeia de Markov (MCMC), com 50.000 iterações descartadas (*burn-in*).

Para as análises Bayesianas uma nova AMOVA foi realizada com o programa GenAlEx 6.3b. Com os valores de Φ_{ST} entre todos os pares de grupos formados pelas análises Bayesianas, foi gerada uma matriz através do programa AFLP-SURV 1.0 (Vekemans 2002). Através desta matriz, foi construída uma árvore utilizando *neighbor-joining* através do programa PHYLIP (Felsenstein 1993), com suporte estatístico *Bootstrap* calculado pelo pacote Consense, do mesmo programa. O dendrograma resultante foi visualizado através do TREEVIEW (Page 1996).

Filogeografia através do sequenciamento de fragmentos do cpDNA

Para a busca de marcadores moleculares potencialmente úteis para os estudos filogeográficos em *Cattleya xanthina* foram exploradas características qualitativas e quantitativas da variabilidade genética de cinco regiões específicas do DNA plastidial, a partir de pares de *primers* descritos como regiões de evolução rápida (Shaw et al. 2007) (Tabela 3).

As amplificações de PCR foram realizadas em reações de 20 μ l constituídas de tampão 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 mM de cada *primer*, 10 ng de BSA, 2 unidades de *Taq* DNA polimerase e 20-50 ng de DNA genômico. As amplificações seguiram o programa de 1 min de aquecimento a 94 °C e 40 ciclos (30 s de desnaturação a 94 °C, 40 s de anelamento a 49-55 °C e 40 s de extensão a 72 °C) seguido de uma extensão final a 72 °C por 5 min. As reações foram realizadas no termociclador Axygen e as condições de amplificação foram adequadas de acordo com as necessidades do material e de cada *primer* utilizado.

Os produtos de PCR foram purificados com PEG 20%, verificados em eletroforese horizontal em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático Applied Biosystems 3130 através da empresa Macrogen Inc. (Seul, Coréia). As sequências de consenso foram geradas a partir do pacote STADEN (Staden et al. 2003) e serão depositadas no Genebank.

Todas as sequências foram alinhadas utilizando o programa MUSCLE (Edgar 2004) e manualmente corrigidas com auxílio de MEGA 5 (Kumar et al. 2004). Todos os eventos de inserção e deleção foram tratados como eventos mutacionais, independente do tamanho.

Os índices de diversidade e de neutralidade de Tajima D (Tajima 1989) e Fu & Li (Fu e Li 1993), foram calculados com o programa DNASP 5.10 (Rozas et al. 2003). A distribuição da diversidade genética entre e dentro das populações foi avaliada por AMOVA (Excoffier et al. 1992) com o GenAlEx 6.3 do Excel® (Peakall e Smouse 2006). As relações filogenéticas entre haplótipos foram inferidas por *reduced-median network* (RMN) usando o programa NETWORK 4.6.1.1 (Fluxus Technology Ltd.) (Bandelt et al. 1999). A distribuição das diferenças genéticas entre os haplótipos encontrados foi representada pelo *Mismatch distribution* através do programa DNASP 5.10. A distribuição espacial dos haplótipos foi visualizada através do software PhyloGeoViz 2.4.4 (Tsai 2011).

Resultados

Variabilidade genética a partir de marcadores ISSRs

Os sete *primers* usados neste estudo resultaram 91 *loci* com boa resolução (Tabela 2). O *primer* MAO gerou 18 fragmentos polimórficos, enquanto que os *primers* JOHN, MANNY e UBC899 resultaram em 13 *loci* cada um. Os *primers* UBC899 e UBC880 geraram 14 e 11

fragmentos polimórficos, respectivamente. O *primer* que resultou em um menor número de fragmentos polimórficos confiáveis (09) foi TERRY. Os *primers* utilizados para *C. xanthina* tiveram fragmentos variando de 100 a 1800 bp.

Não houve a ocorrência de *locus* exclusivo para as populações analisadas. No nível populacional o polimorfismo variou de 57,14% (populações SJ) a 81,32% (população SL) (Tabela 4).

A heterozigosidade esperada para a espécie e o índice de Shannon foram 0,275 e 0,414 respectivamente. As populações de *C. xanthina* mostraram moderada variabilidade com médias de H_e e I igual a 0,228 e 0,332 respectivamente. A população DM teve o menor nível de diversidade ($H_e = 0,191$, $I = 0,279$) e a população SL teve o maior nível de diversidade ($H_e = 0,268$, $I = 0,397$) (Tabela 4).

As populações de *C. xanthina* possuíram alta similaridade entre si quando comparadas par a par. A menor identidade ocorreu entre as populações ST e SJ, com distância genética de 0,067 (Tabela 5). A maior identidade genética ocorreu entre as populações ST e DM e CA, em que a distância genética foi de 0,015, embora estas populações possuam a maior distância geográfica (ST/DM - 51,08km; ST/CA - 44,86km). Na análise de coordenadas principais (PCO), houve uma estruturação discreta entre os indivíduos da população de Santa Lúcia e as demais populações (Fig. 3). Houve também a sobreposição dos indivíduos das outras quatro populações, condizendo com a proximidade genética entre elas.

A árvore de *Neighbor-joining* montada a partir das distâncias genéticas das populações (Fig. 4) mostrou que, as populações SL e SJ (geograficamente mais próximas) aparecem mais relacionadas entre si apesar de apresentarem maior distância genética. Também há uma relação entre ST e DM, sendo a distância genética entre estas populações uma das menores.

A partir das análises de variância molecular (AMOVA) foi verificada a alta variabilidade genética dentro das populações, abrangendo 94% de toda a variabilidade encontrada para a espécie (Tabela 6), havendo estruturação genética significativa ($\Phi_{ST} = 0,058$, $P < 0,0000$) entre as populações de *C. xanthina*.

Através das análises Bayesianas, foi possível encontrar um único contingente populacional genético, corroborando o padrão encontrado nas análises de coordenadas principais.

Filogeografia a partir do sequenciamento de regiões do cpDNA

Foram selecionadas duas regiões intergênicas (*psbD-trnT* e *rpL32-trnT*) a partir de testes de amplificação com os *primers* descritos na literatura (Tabela 3). Tais regiões foram sequenciadas para uma amostra de 64 indivíduos de *C. xanthina*. Os fragmentos obtidos variaram de 933 a 1032 pb na região *psbD-trnT* e de 886 a 1041 pb na região *rpL32-trnL*. Após a exclusão das extremidades das duas matrizes alinhadas, foi avaliado um total de 1624 sítios na matriz conjunta. O sequenciamento combinado das regiões forneceu 19 sítios polimórficos, dos quais 5 não foram considerados na análise, pois na maioria dos casos, se constituíam de regiões de repetição nucleotídica (poli A e poli T) cuja relação de origem não pode ser interpretada com confiabilidade, podendo gerar elevado número de homoplasias (Tabela 7). Dos 14 sítios variáveis considerados, 3 pertencem a região *psbD-trnT* e 11 a região *rpL32-trnL*. Tais regiões produziram apenas um alelo por sítio polimórfico. Todos esses sítios são substituições, dos quais cinco são transições e nove transversões. Das 5 transições, 3 são C-T e 2 G-A e das 9 transversões, 5 são G-T e 4 C-A. Duas transições e apenas uma transversão foram encontradas na região *psbD-trnT*. Na região *rpL32-trnL* foram encontradas 3 transições e 8 transversões (Tabela 7).

Da combinação das duas regiões resultaram 10 haplótipos, com diversidade haplotípica (h) de 0,738 e diversidade nucleotídica (π) de 0,00239. Os testes de neutralidade de Tajima (0,82986) e de Fu & Li (0,5189) não apresentaram valores significativos ($P > 0,10$), o que aponta um equilíbrio entre inserção/deleção (Tabela 8). A população SL apresentou maior diversidade haplotípica (0,86029) e a população DM apresentou a maior diversidade nucleotídica (0,00339). Os menores valores de diversidades haplotípica (0,18182) e nucleotídica (0,00114) estão na população CA (Tabela 9).

A partir das análises de variância molecular (AMOVA), foi verificada uma baixa estruturação genética entre as populações de *C. xanthina* ($\Phi = 0,044$, $P < 0,000$). A maior parte da variabilidade genética apresentada está contida dentro das populações (96%) (Tabela 10).

O haplótipo mais frequente é o H8, ocorrendo em 45,31% dos indivíduos e presente em todas as populações, seguido do H6, presente em mais de 18,75% das amostras (Tabela 7) distribuídos em quatro das cinco populações, exceto na população CA. Cinco dos 10 haplótipos foram encontrados em um único indivíduo. Em cada uma das populações amostradas há um desses haplótipos representados por um único indivíduo (SL – H2, ST – H10, CA – H3, DM – H4 e SJ – H5).

A partir do algoritmo *reduced-median network* usado para inferir as relações haplotípicas, foi encontrada uma única rede (Fig. 5) com duas opções de árvores. Nesta rede é possível verificar a presença de duas linhagens genéticas que acumulam as divergências combinadas dos vários sítios encontrados em ambas as regiões e que não apresentaram independência no seu padrão de polimorfismo. Este resultado foi confirmado pelas análises das diferenças genéticas entre os pares de indivíduos (*mismatch distribution*) (Fig. 6).

A primeira linhagem (A) apresentada no *network* contém os haplótipos H1, H2, H3, H4 e H5 e a outra linhagem (B) com os haplótipos H6, H7, H8, H9 e H10. Na linhagem B, os haplótipos H6 e H7 apareceram com pequena diferenciação do haplótipo mais frequente (H8),

sendo separados com apenas uma mutação cada. Os haplótipos H9 e H10 estão distantes dois e três passos mutacionais, respectivamente. O haplótipo H1, pertencente à outra linhagem (A) e que aparece em quatro das cinco populações, possui nove mutações se comparado ao haplótipo mais frequente e 10 mutações se comparado ao segundo haplótipo mais frequente (H6). A maior diferenciação ocorre entre os haplótipos H10 de H3 e entre o haplótipo H10 e H5, sendo que são haplótipos encontrados em um único indivíduo cada e que estão nas populações ST, CA e SJ, respectivamente.

Todas as populações apresentaram de dois a seis haplótipos. As populações centrais (SL e SJ) apresentaram a maior riqueza de haplótipos, abrigando seis dos 10 haplótipos identificados para a espécie, enquanto a população de menor riqueza (CA) se encontra mais próximo a um dos extremos da amostragem da distribuição geográfica, com dois dos haplótipos (Fig. 7). A população ST possui quatro haplótipos (Fig. 7), sendo três deles concentrados na linhagem (B) da rede. O quarto haplótipo (H1) encontrado nesta população, presente na linhagem A, está restrito a apenas um indivíduo. A população CA possui um padrão semelhante à população ST, já que possui apenas um haplótipo restrito a um único indivíduo separado na linhagem A.

Discussão

Variabilidade genética de *C. xanthina* a partir de marcadores ISSRs

Os *primers* de ISSR revelaram moderados a altos níveis de polimorfismo nas populações de *Cattleya xanthina* ($P > 66\%$) e no seu nível específico ($P > 87\%$). Adicionalmente foram encontrados moderados níveis de heterozigosidade esperada e índice de Shannon, indicando alta diversidade genética da espécie. Esse perfil de variação está acima dos resultados obtidos

com marcadores RAPD em trabalhos revisados por Nybom e Bartish (2000) e de acordo com Falk e Holsinger (1991), quando comparados os níveis médios encontrados para espécies endêmicas, perenes e que compartilham características reprodutivas semelhantes.

Altos níveis de variabilidade genética tem sido encontrados em estudos com outras orquídeas (Alcântara et al. 2006, Shen 2006, Cruz et al. 2011, Borba et al. 2007a, Ávila-Díaz e Oyama 2007, Xiaohong 2007, Pinheiro et al. 2012, Gomes et al. cap. 1, Barbosa et al. dados não publicados) e, também, em outras monocotiledôneas como *Vellozia* (Barbosa 2011, Lousada et al. 2011).

Plantas epífitas como *C. xanthina* podem ter vantagens com relação a plantas terrestres, no que diz respeito à atração de polinizadores, bem como o melhor aproveitamento do vento para a dispersão de sementes (Dressler 1981). Assim, esses fatores também podem auxiliar indiretamente no aumento da variabilidade genética de uma espécie. Os padrões de diversidade genética encontrado neste trabalho corroboram os resultados de outros estudos com orquídeas epífitas (Trapnell et al. 2004, Alcântara et al. 2006, Shen et al. 2006, Ávila-Díaz e Oyama 2007, Pinheiro et al. 2012).

Os altos níveis de variabilidade genética encontrada em *C. xanthina* podem estar associados a uma variabilidade acumulada de populações com distribuição mais contínua no passado. A variabilidade genética alta está sendo mantida até o momento, provavelmente devido à relativa recente fragmentação antropogênica do ambiente, já que este fator parece não causar impacto imediato na diversidade genética (Andrianoelina et al. 2009). Além disso, a variabilidade genética pode estar sendo mantida por se tratar de plantas perenes e de vida longa e que possuem propagação clonal (Azevedo et al. 2007).

É esperado que *C. xanthina* seja polinizada pelo processo de engodo. Isso pode ser afirmado pelas observações de Fraga et al. (2009), além das semelhanças quanto à biologia floral e aspectos reprodutivos de outras espécies de Orchidaceae anteriormente estudadas,

como a ausência de nectários florais (e.g. Borba e Braga 2003, Smidt et al. 2006, Silva-Pereira et al. 2007, Freire e Fraga 2010). Assim, neste tipo de polinização, o vetor visita poucas flores por população, promovendo o fluxo de pólen a longas distâncias, o que irá favorecer a fecundação cruzada, aumentando a variabilidade genética (Cruz et al. 2011, Borba et al. 2007a, 2007b). Estudos apontam para polinização desta espécie por *Fidena* (Tabanidae, Diptera) (Fraga et al. dados não publicados). Além de inesperado, pois só existe conhecimento deste grupo como polinizador de Orchidaceae para a África do Sul (Johnson e Steiner 1995), tal processo parece ser inédito para espécies neotropicais. Espécies polinizadas por Diptera demonstraram alta variabilidade genética devido a sistemas de auto-incompatibilidade, já que insetos pertencentes a esta ordem têm o hábito de permanecer por longos períodos de tempo forrageando as flores de uma mesma planta (Borba et al. 2001, Azevedo et al. 2007, Ribeiro et al. 2008). Foi observado um grande número de abortos de frutos nessas condições em testes de autopolinização com *C. xanthina*, (Fraga et al. 2009). Isto pode indicar que o abortamento de frutos pode ser uma barreira à autopolinização, possivelmente com mecanismos de auto-incompatibilidade determinando este padrão reprodutivo.

Estruturação populacional

Através dos resultados da AMOVA, observa-se que a maior parte da variação genética de *C. xanthina* está concentrada dentro das populações e não de forma hierarquizada, em grupos genéticos distintos. Resultados semelhantes em espécies de orquídeas têm sido encontrados (Sharma et al. 2000, Cruz et al. 2011, Almeida et al. 2009, Phillips et al. 2012). A baixa estruturação genética significativa em populações de *C. xanthina* ($\Phi_{ST} = 0,058$; $P > 0,000$) indica baixa diferenciação genética entre as populações, o que pode ser esperado para plantas de longa vida e com fertilização cruzada (Nybom 2004), porém os índices encontrados neste

estudo são menores do que os reportados na literatura. O perfil genético encontrado para *C. xanthina* (baixa diferenciação genética entre as populações) parece ser característico na família Orchidaceae, como sugerido por Phillips et al. (2012). A baixa estruturação genética é comum em plantas com longo tempo de geração (Austerlitz et al. 2000), o que também pode levar a alta variabilidade genética (Azevedo et al. 2007). Espécies comuns de orquídeas com distribuição geográfica mais ampla tendem a possuir valores de Φ_{ST} relativamente maiores (Phillips et al. 2012).

O resultado de Φ_{ST} encontrado corrobora a pouca distância genética entre as cinco populações de *C. xanthina* estudadas, além disso, nas análises de coordenadas principais (PCO) também houve grande sobreposição dos indivíduos das populações o que indica a proximidade genética entre elas. Porém, apesar disso, a população de Santa Lúcia apresenta-se estruturada das demais populações. Isto é indicado pela PCO, cuja análise é referida na literatura para detectar a presença de estruturação em conjuntos de dados com resultados de Φ_{ST} próximos ou inferiores a 0,05 (Reeves e Richards 2009).

As cinco populações amostradas de *C. xanthina* estão em áreas relativamente próximas entre si, distanciando no máximo cerca de 51 km (DM/ST). Estudos demonstram que em amostragens de até 250 km de distância entre populações, o fluxo gênico pode ocorrer intensamente (Phillips et al. 2012). Portanto, a coesão genética e a pouca estruturação genética encontrada nas populações de *C. xanthina* podem estar ocorrendo através do fluxo gênico entre as populações pela dispersão de sementes, assim como ocorre com outras orquídeas (Cozzolino et al. 2003, Nordström e Hedrén 2009). Adicionalmente, a dispersão de polínias parece ser limitada, já que é realizada por *Fidena* (Tabanidae, Diptera) (Fraga et al. 2009), animais que podem manter uma área restrita de voo como outros dípteros polinizadores de orquídeas (Borba et al. 2001, Azevedo et al. 2007, Ribeiro et al. 2008).

Através das informações genéticas, pode-se apontar que é possível a reintrodução ou transferência de material genético (indivíduos, pólen ou sementes) oriundos de qualquer uma das populações, já que compreendem um estoque único e homogêneo de variação genética de *C. xanthina*. O padrão de distribuição difusa dos indivíduos ao longo dos eixos das análises de coordenadas principal também é indicativo de um único contingente populacional (Reeves e Richards 2009). O local mais recomendado para utilizar como “estoque” são os indivíduos localizados na Estação Biológica de Santa Lúcia, por se tratar da maior população e, também, a que abriga parte significativa de toda a variação genética da espécie. As demais populações demandam atenção pelo fato alta vulnerabilidade que se encontram e por que também são responsáveis por abrigar parte da variação menos frequente na espécie.

Filogeografia de *C. xanthina*

As duas regiões utilizadas neste estudo foram escolhidas devido ao alto polimorfismo encontrado através dos testes realizados, sendo regiões indicadas para estudos moleculares no nível taxonômico trabalhado (Shaw et al. 2007). A região *rpL32-trnL* foi a região mais variável, seguindo o mesmo padrão de alto polimorfismo intraespecífico em diferentes grupos de plantas, especialmente monocotiledôneas (Barbosa et al. 2011, Fiorini et al. dados não publicados). Até então, estas plantas são consideradas de difícil detecção de polimorfismo em sequências nucleotídicas neste nível taxonômico (Shaw et al. 2007).

Com base nos padrões de variação genética, pode-se considerar como moderada a diversidade genética encontrada para *C. xanthina*, se comparada com outras espécies (Ramos et al. 2007, 2009, Collevatti et al. 2009, Pinheiro et al. 2011, Barbosa et al. 2012). Ainda têm sido poucos os trabalhos de filogeografia com orquídeas neotropicais (*Epidendrum fulgens* - Pinheiro et al. 2011), sendo que a maioria dos estudos têm abordado espécies paleotropicais, seja na Ásia ou Europa (Squirrel et al. 2001, Cozzolino et al. 2003, Bateman et al. 2008,

Yamaji et al. 2007, Nordström e Hedrén 2009, Pfeifer et al. 2009, Volz e Renner 2009, Wang et al. 2010, Tranchida-Lombardo et al. 2011, Zitari et al. 2011).

A alta diversidade atual encontrada em *C. xanthina* pode ser atribuída à localização em que suas populações se encontram. Estudos de modelagem climática do Pleistoceno (Carnaval e Moritz 2008) indicam que algumas regiões da Mata Atlântica, denominadas refúgios florestais, como as regiões do Estado de São Paulo e sul da Bahia, possivelmente tenham estado isolados durante os períodos glaciais, configurando a alta diversidade e endemismos locais. Para a região central da Mata Atlântica, onde se encontra o Estado do Espírito Santo, alguns estudos têm demonstrado as relações filogeográficas de acordo com as principais áreas de refúgios referidos para a Mata Atlântica (Cabanne et al. 2008, Palma-Silva et al. 2009, Ramos et al. 2009, Ribeiro et al. 2011). Assim, acreditamos que as populações ancestrais de *C. xanthina* podem ter ficado restritas aos topos de montanhas durante os períodos de seca do Pleistoceno.

Não foi encontrada estruturação geográfica para a distribuição dos haplótipos, o que pode sugerir que as populações ancestrais desta espécie não tenham passado por fragmentação durante o Pleistoceno, como ocorreu com *Epidendrum fulgens* em áreas próximas à costa, submetidas a intensas variações de cobertura vegetal neste período (Pinheiro et al. 2011). Neste contexto, as populações de *C. xanthina*, podem estar se mantendo estáveis demograficamente mesmo diante das alterações climáticas históricas. O padrão multimodal encontrado na análise de *Mismatch Distribution* (Fig. 8) é esperado para populações que se encontram em equilíbrio demográfico, não tendo passado por um processo de expansão recente (Rogers e Harpending 1992). Devido à proximidade entre as populações amostradas e ao fato dos haplótipos estarem bem difundidos entre elas, provavelmente não houve isolamento por distância, sugerindo fluxo gênico frequente.

Nestes períodos de expansão/retração florestal, é possível que processos de hibridização e introgressão tenham ocorrido entre *C. xanthina* e outras espécies de orquídea como *C. pumila* Hook. e *C. praestans* (Rchb.f.) van den Berg. Esta hipótese deriva do padrão de estrutura da rede haplotípica, em que há duas linhagens, separadas por grande número de passos mutacionais, sem nenhuma correlação com a estrutura geográfica das populações atuais de *C. xanthina*. Esse padrão é sugerido para espécies com alto fluxo gênico e que ocorrem em zonas de contato entre táxons com algum grau de intercompatibilidade (Avice 2000), como tem sido mostrado em estudos em que processos de hibridização determinam os padrões reticulados de variação genética populacional e origens híbridas de algumas espécies (Gross et al. 2003, Ramos et al. 2009, Lei e Hardy 2010). A presença de haplótipos derivados em cada linhagem pode ser outro fator indicativo de introgressão. De acordo com a distribuição da frequência dos haplótipos entre as populações, combinada com os resultados de estruturação genética não é possível levantar a hipótese de que haja alguma divergência entre as linhagens resultante de isolamento geográfico para espécie.

Espécies próximas filogeneticamente de *C. xanthina* como, por exemplo, *C. grandis*, *C. tenebrosa* ou *C. purpurata* (van den Berg 2000) atualmente encontram-se em parapatria com as populações conhecida de *C. xanthina* (Barros et.al 2010). Estas espécies poderiam ter hibridizado com *C. xanthina* no passado, mas é pouco provável que este processo tenha ocorrido, já que são espécies que ocupam habitats distintos (Pellegrino et al. 2008), tendo baixa possibilidade de terem expandido seus limites de distribuição até áreas montanhosas com maiores altitudes.

Foram relatadas as ocorrências de híbridos da espécie deste estudo com *C. praestans* (Rchb.f.) van den Berg (Lacerda e Castro 2005), denominada *Cattleya neocalimaniarium* van den Berg (van den Berg 2010), e com *C. pumila* Hook. (Ruschi 1970), denominada *C. wetmorei* (Ruschi) Fraga & A.P. Fontana (Fraga et al. 2008). Ambas as espécies possuem

distribuição pelos Estados da região sudeste do Brasil (Barros et al. 2010). Porém, estas espécies pertencem a uma seção taxonômica diferente de *C. xanthina*. Assim, é possível que nas populações desta espécie tenha ocorrido hibridização no passado com alguma das espécies descritas acima ou outras espécies pertencentes a outras seções taxonômicas. Após diversos retrocruzamentos desses híbridos com indivíduos de *C. xanthina*, haplótipos da outra espécie parental pode ter introgridido e diversificado em haplótipos derivados.

Hibridização em orquídeas é relativamente comum entre espécies que ocorrem em simpatria (Chung et al. 2005, Bateman et al. 2008, Pellegrino et al. 2008). Cozzolino et al. (2003) demonstrou inclusive que o processo de hibridização é natural para orquídeas com polinização por engodo na região do Mediterrâneo, não oferecendo riscos a sua sobrevivência, já que em espécies raras pode levar à perda da sua diversidade genética (Rieseberg 1991).

Diante da possibilidade de hibridização e introgressão com *C. xanthina*, estes processos podem ter ocorrido sob dois cenários. Primeiramente, pode ter ocorrido um único evento de hibridização/introgressão e posterior diversificação dos haplótipos em uma linhagem secundária, que se dispersou amplamente ao longo das populações. Mas, neste cenário seria provável que a rede de haplótipos fosse mais homogênea (Gross et al. 2003), ou seja, com uma distribuição mais uniforme dos haplótipos ao longo da distribuição geográfica e sem haplótipos derivados.

Outra possibilidade, mais provável, é que durante as flutuações climáticas, populações de outras espécies de orquídeas, possivelmente do gênero *Cattleya*, podem ter sido expostas à simpatria com *C. xanthina*. Esse contato entre as espécies poderia ter composto uma zona híbrida, gerando um cenário favorável à mistura genômica entre elas. Após processos de hibridização recorrentes e vários eventos de introgressão ao longo do tempo, possivelmente tenham permanecido assinaturas genéticas (Welch e Rieseberg 2002) de outras espécies em *C. xanthina*, mesmo que elas apresentem hoje uma menor área de sobreposição nos limites de

distribuição ou estajam em parapatría (Barros et al. 2010), num gradiente geográfico da Mata Atlântica entre o Sul da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro.



Fig. 1. A. *Cattleya xanthina* Lindl. Foto: Mauro Rosim. B. Hábito de *Cattleya xanthina* Lindl. na população de Santa Lúcia, Espírito Santo (Foto: C. N. Fraga).

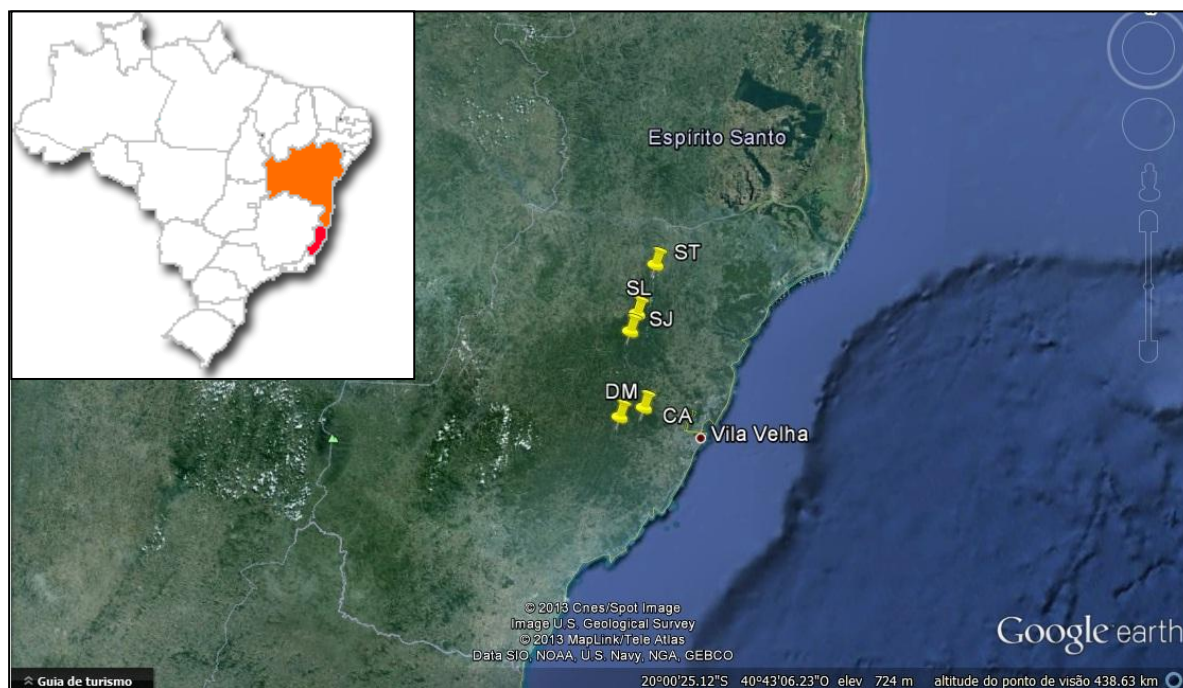


Fig. 2. Abrangência da distribuição geográfica e populações de *Cattleya xanthina* analisadas neste estudo (Espírito Santo, sudeste do Brasil). Mapa gerado no Google Earth (<http://www.google.com/earth/index.html>). Siglas: SL –Santa Lúcia, ST – Santa Teresa, CA – Cariacica, DM – Domingos Martins, SJ – Santa Maria de Jetibá.

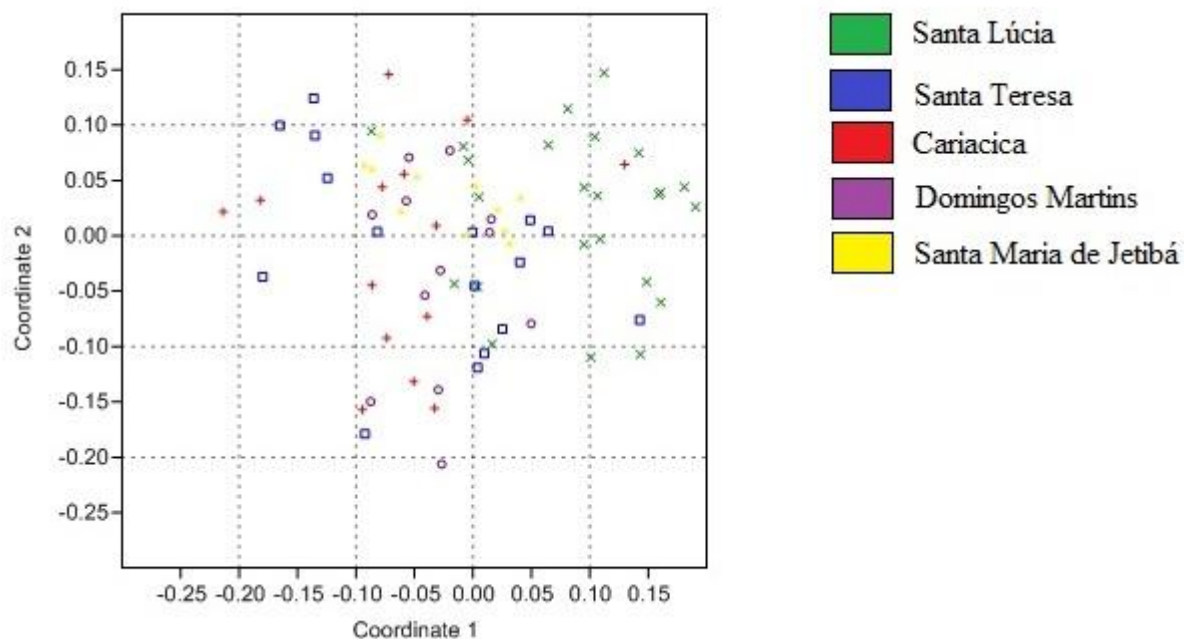


Fig. 3. Análise de coordenadas principais (PCO) de 5 populações de *Cattleya xanthina*, ocorrentes no Estado do Espírito Santo, baseada em 91 *loci* de ISSR.

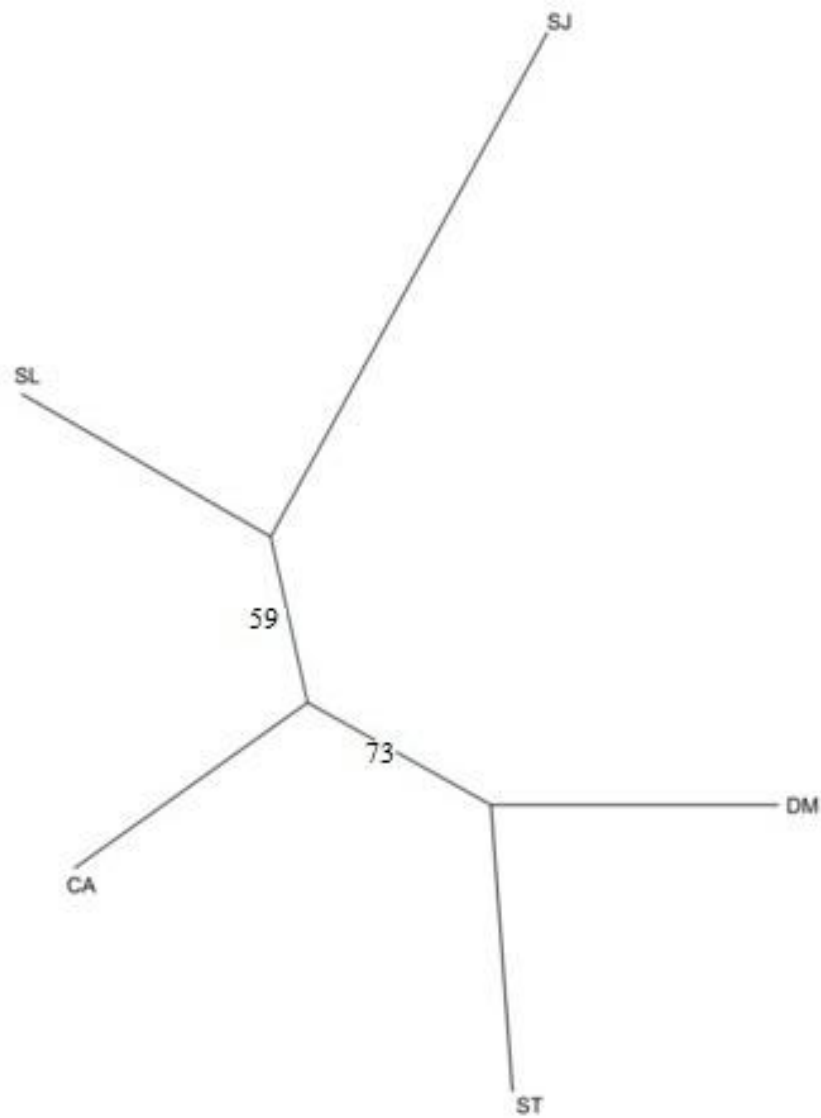


Fig. 3. Árvore de *neighbor-joining* das cinco populações de *C. xanthina* construída utilizando a matriz de distância genética de Nei, a partir das análises Bayesianas. *Bootstrap* é dado em porcentagem. Para o nome das populações, ver Tabela 2.

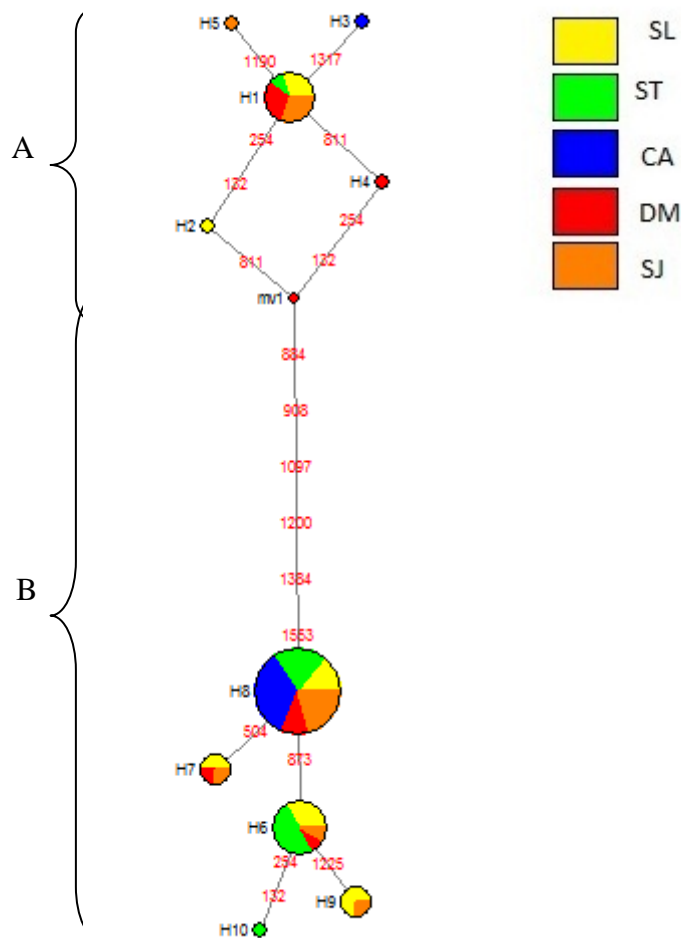


Fig. 4. *Reduced-median network* dos 10 haplótipos gerados pela combinação das regiões *psbD-trnT* e *rpL32-trnL* do cpDNA, distribuídos nas populações de *C. xanthina*. Esta rede ilustra as duas únicas possibilidades de árvores. Os diferentes tamanhos de círculos representam a frequência relativa de cada um, os códigos que cortam as linhas indicam os sítios de variação. Os números sobre os ramos indicam o sítio onde ocorreu a mutação que diferencia os haplótipos (ver Tabela 9). mv1 indica um haplótipo não amostrado ou extinto. A – linhagem principal; B – linhagem secundária.

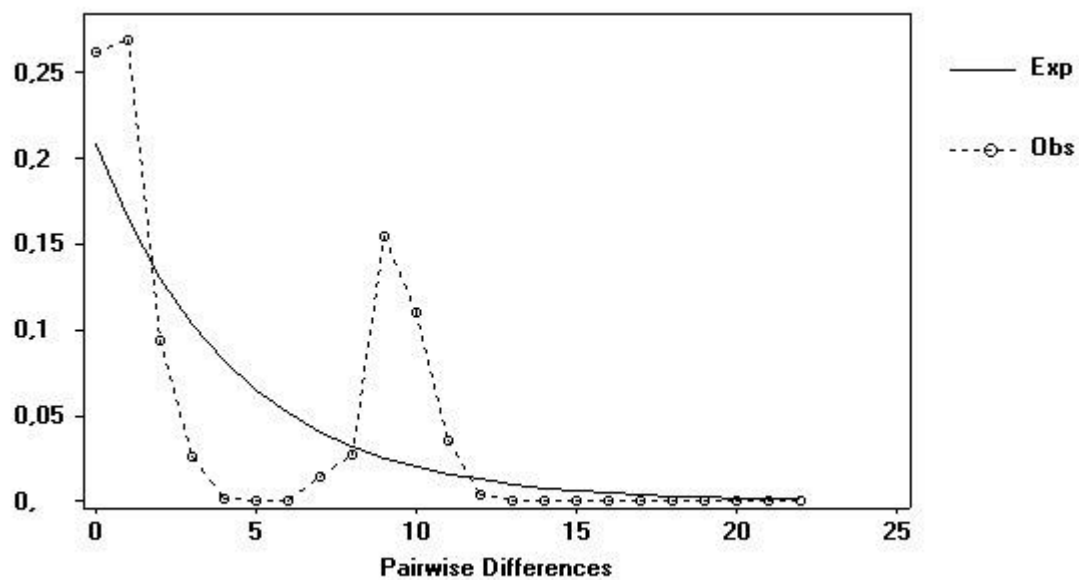


Fig. 5. Gráfico da *Mismatch Distribution* indicando as diferenças par-a-par entre as sequências de *Cattleya xanthina*, encontradas nas regiões *psbD-trnT* e *rpL32-trnL* de DNA plastidial. Eixo x: diferenças par-a-par, Eixo y: frequências.

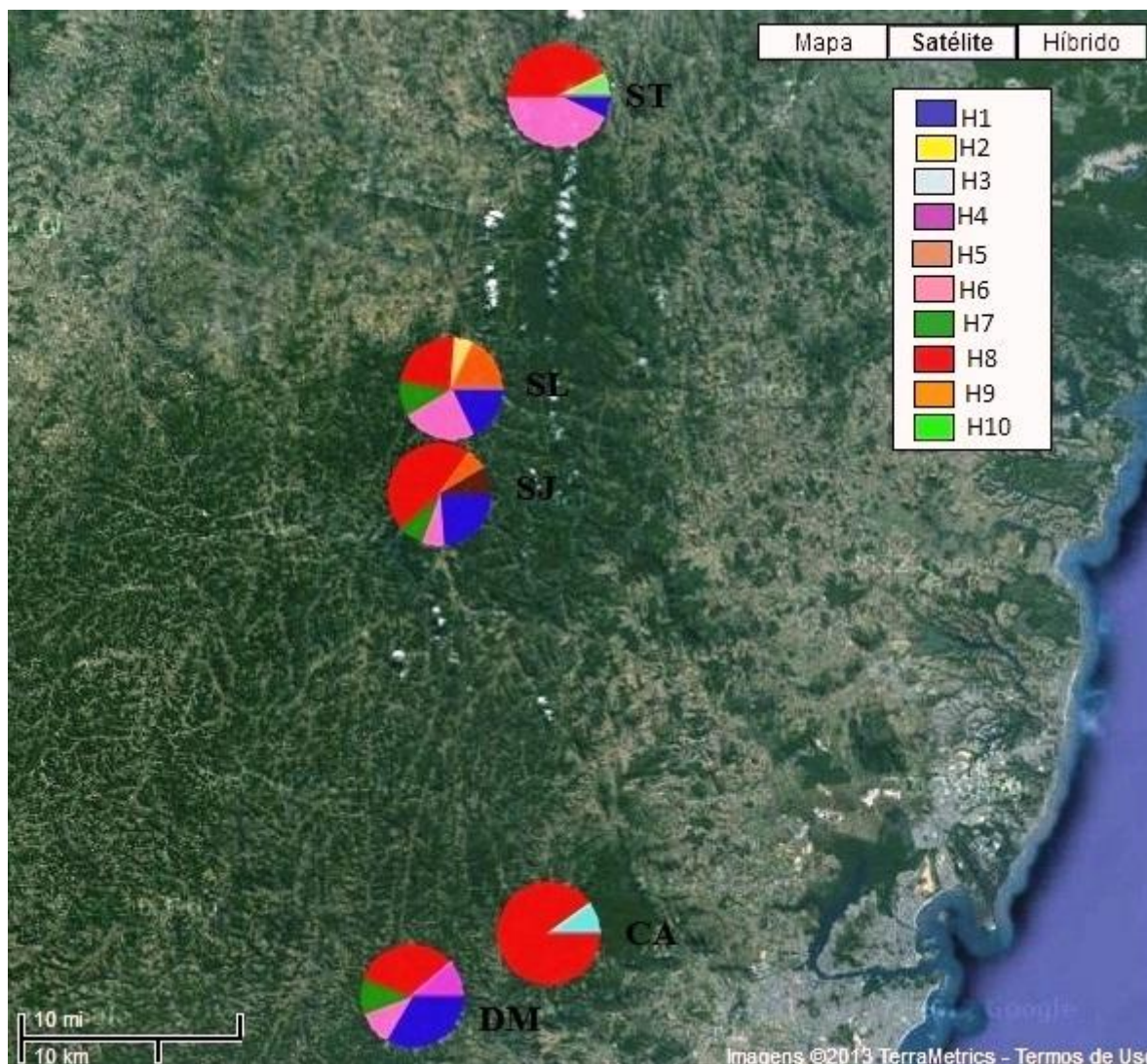


Fig. 6. Distribuição da frequência dos 10 haplótipos entre as populações de *C. xanthina*, na Mata Atlântica, no Espírito Santo. Para os nomes das populações veja Tabela 2. Mapa gerado no Google Earth (<http://www.google.com/earth/index.html>). Siglas: SL – Santa Lúcia, ST – Santa Teresa, CA – Cariacica, DM – Domingos Martins, SJ – Santa Maria de Jetibá.

Tabela 1. Populações *C. xanthina* ocorrentes no estado do Espírito Santo. *N* = número de indivíduos amostrados, Alt = altitude das populações (metros).

Localização	Código	<i>N</i>	Alt
Santa Teresa – Estação Biológica de Santa Lúcia	SL	24	678
Santa Teresa	ST	16	736
Cariacica	CA	14	526
Domingos Martins	DM	12	575
Santa Maria do Jetibá	SJ	11	727

Tabela 2. *Primers* de ISSR aplicados em *Cattleya xanthina*, sequências dos iniciadores e temperatura de anelamento (T °C). Número de fragmentos polimórficos (NF) e porcentagem de fragmentos polimórficos (FP) por *primer*.

Nome do primer	Sequência do primer*	T °C	NF (FP%)
JOHN	(AG) ₇ YC	53	13 (61,54)
MANNY	(CAC) ₄ RC	50	13 (66,15)
MAO	(CTC) ₄ RC	50	18 (58,89)
UBC898	(CA) ₆ -RY	47	13 (66,15)
UBC899	(CA) ₆ RG	50	14 (66,15)
UBC880	GGAGAGGAGAGGAGA	50	11 (74,55)
TERRY	(GTG) ₃ GGTGRC	50	9 (62,22)
Total	-	-	91 (87,91)

*Y = C ou T; R = A ou G

Tabela 3. Tamanho médio dos fragmentos e porcentagem de cada base nucleotídica nas seis regiões (Shaw et al. 2007) exploradas para *C. xanthina*.

Região	Nº pb	A(%)	C(%)	G(%)	T(%)
<i>COX</i> (mtDNA)	596	34,3	21,5	22	22,1
<i>psbD-trnT</i> (cpDNA)	852	34	16,1	16,5	33,4
<i>rpL32-trnL</i> (cpDNA)	871	33,9	12,2	13,1	40,8
<i>atpL-atpH</i> (cpDNA)	818	33,3	19,2	12,7	34,8
<i>psbJ-petA</i> (cpDNA)	1037	34,4	13,8	15,7	36
<i>psbA-trnH</i> (cpDNA)	656	29,1	17,8	20,2	33

Tabela 4. Diversidade genética das populações de *Cattleya xanthina* ocorrentes no Estado do Espírito Santo, baseada em 91 *loci* polimórficos de ISSR. *P* = porcentagem de *loci* polimórficos; *I* = Índice de diversidade de Shannon; *UH_e* = heterozigosidade esperada. Erro padrão em parênteses. Para o nome das populações ver Tabela 2.

População	<i>P</i> (%)	<i>I</i> (± EP)	<i>UH_e</i> (± DP)
SL	81,32	0,397 (± 0,027)	0,268 (± 0,02)
ST	72,53	0,354 (± 0,028)	0,241 (± 0,021)
CA	64,84	0,335 (± 0,03)	0,234 (± 0,022)
DM	58,24	0,279 (± 0,029)	0,191 (± 0,021)
SJ	57,14	0,294 (± 0,03)	0,205 (± 0,022)
Média	66,81	0,332 (± 0,013)	0,228 (± 0,01)
Nível de espécie	87,91	0,414 (± 0,025)	0,275 (± 0,019)

Tabela 5. Matriz de distância genética média (“unbiased genetic distance”, Nei, 1978) em cinco populações de *Cattleya xanthina*, a partir de dados de ISSR (diagonal abaixo) e matriz de distância geográfica (em quilômetros) entre as áreas das populações no Espírito Santo (SL, ST, CA, DM e SJ) (diagonal acima).

População	SL	ST	CA	DM	SJ
SL	0,000	22,21	40,57	44,69	8,25
ST	0,043	0,000	44,86	51,08	29,22
CA	0,047	0,015	0,000	10,53	35,68
DM	0,058	0,015	0,021	0,000	35,17
SJ	0,058	0,067	0,042	0,059	0,000

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) para as populações de *Cattleya xanthina*, no Espírito Santo.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componente de variação	% variação total	<i>P-value</i>
Entre populações	4	85,503	21,376	6%	<0.000
Dentro das populações	72	795,821	11,053	94%	<0.000
Total	76	881,325		100%	

Tabela 7. Haplótipos encontrados em populações de *Cattleya xanthina* suas respectivas frequências para as regiões intergênicas *psbD-trnT* e *rpL32-trnL* do DNA plastidial. Os pontos indicam a ausência de variação em relação ao haplótipo H1. Para os nomes das populações veja Tabela 2.

Haplótipo	<i>psbD-trnT</i>			<i>rpL32-trnL</i>											<i>N</i>	Populações
	132	254	504	811	873	884	908	1097	1190	1200	1225	1317	1384	1553		
H1	G	G	T	G	C	C	C	C	T	A	T	T	T	A	10	SL, DM, SJ
H2	T	A	1	SL
H3	G	.	.	1	CA
H4	.	.	.	T	1	DM
H5	G	1	ST
H6	T	A	.	T	A	A	A	T	.	G	.	.	C	C	12	SL, ST, DM, SJ
H7	T	A	C	T	.	A	A	T	.	G	.	.	C	C	4	SL, DM, SJ
H8	T	A	.	T	.	A	A	T	.	G	.	.	C	C	29	SL, ST, CA, DM, SJ
H9	T	A	.	T	A	A	A	T	.	G	G	.	C	C	4	SL, SJ
H10	.	.	.	T	A	A	A	T	.	G	.	.	C	C	1	ST

Tabela 8. Parâmetros de polimorfismo e testes de neutralidade das regiões intergênicas *psbD-trnT* e *rpL32-trnL* do DNA plastidial em populações de *C. xanthina*.

Parâmetros	<i>psbD-trnT/ rpL32-trnL</i>
Número de indivíduos	64
Número de haplótipos	10
Diversidade haplotípica (<i>h</i>)	0,738
Diversidade nucleotídica (π)	0,00239
Teste D de Tajima	0,82986 (P>0,10)
Teste de Fu & Li	0,5189 (P>0,10)

Tabela 9. Diversidade haplotípica (*h*) e nucleotídica (π) obtidas em populações de *C. xanthina* a partir do sequenciamento das regiões intergênicas *psbD-trnT* e *rpL32-trnL* do DNA plastidial.

População	Diversidade haplotípica (<i>h</i>)	Diversidade nucleotídica (π)
SL	0,86029	0,00273
ST	0,67033	0,0013
CA	0,18182	0,00114
DM	0,833333	0,00339
SJ	0,76923	0,00308
espécie	0,738	0,00239

Tabela 10. Análise de variância molecular (AMOVA) utilizando as regiões psbD-trnT e rpL32-trnL, para as populações de *Cattleya xanthina*, no Espírito Santo.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Componente de variação	% variação total	<i>P-value</i>
Entre populações	4	11,647	2,912	4%	<0.000
Dentro das populações	59	108,166	1,833	96%	<0.000
Total	63	119,813		100%	

Referências

- Alcântara S, Semir J, Solferini VN (2006) Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the Atlantic Rainforest of South-eastern Brazil. *Ann Bot* 98: 1207-1213.
- Almeida PRM, Góes-Neto A, van den Berg C (2009) Variabilidade genética em populações de *Encyclia dichroma* (Lindl.) Schltr. e *E. ghillanyi* Pabst (Laeliinae, Orchidaceae). In: Anais do 55º Congresso Brasileiro de Genética. Sociedade Brasileira de Genética, p. 220
- Andrianoelina O, Favreau B, Ramamonjisoa L, Bouvet JM (2009) Small effect of fragmentation on the genetic diversity of *Dalbergia monticola*, an endangered tree species of the eastern forest of Madagascar, detected by chloroplast and nuclear microsatellites. *Ann Bot* 104: 1231-1242.
- Austerlitz F, Mariette S, Machon N, Gouyon PH, Godelle B (2000) Effects of colonization processes on genetic diversity: differences between annual plants and tree species. *Genetics* 154(3): 1309-1321.
- Ávila-Díaz I, Oyama K (2007) Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Am J Bot* 94(2): 184-193.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Azevedo MTA, Borba EL, Semir J, Solferini VN (2007) Very high genetic variability in Neotropical myophilous orchids. *Bot J Linn Soc* 153: 33-40.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48.
- Barbosa AR (2011) *Biosistemática do complexo Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) baseada em análise filogeográfica e genética de populações. 85p. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- Barbosa AR, Fiorini CF, Silva-Pereira V, Mello-Silva R, Borba EL (2012) Geographical genetic structuring and tangled morpho-anatomical variation in the *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) ochlopecies complex. *Ann Bot* 99 (9): 1-13.
- Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN (2010) Orchidaceae In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000179>, acessado em 25/04/2011.
- Bateman RM, Smith RJ, Fay MF (2008) Morphometric and population genetic analyses elucidate the origin, evo-lutionary significance and conservation implications of *Orchis X x angusticruris* (*O. purpurea* x *O. simia*), a hybrid orchid new to Britain. *Bot J Linn Soc* 157: 687–711.
- Birky CW (1995) Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc Natl Acad Sci* 92: 11331-11338.
- Borba EL, Braga PIS (2003) Biologia reprodutiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. *Rev Bras Bot* 26(4): 541-549.
- Borba EL, Felix JM, Solferini VN, Semir J (2001) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *Am J Bot* 88: 419-428.
- Borba EL, Funch RR, Ribeiro PL, Smidt EC, Silva-Pereira V (2007a) Demografia, variabilidade genética e morfológica e conservação de *Cattleya tenuis* (Orchidaceae), espécie ameaçada de extinção da Chapada Diamantina. *Sitentibus Ser Cie Biol* 7(3): 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. *Plant Syst Evol* 267: 129-146.

- Brown KSJ, Brown GG (1992) Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In: Whitmore TC, Sayer JA (eds.) Tropical deforestation and species extinction, pp. 119-142. Chapman and Hall, London.
- Cabanne GS, d'Horta FM, Sari HER, Santos FR, Miyaki CY (2008) Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Mol Phylogenet Evol* 49: 760–773.
- Camargo A, Capobianco JPR, Oliveira JAP (2002) Meio ambiente Brasil: avanços e obstáculos pós-Rio-92. Editora Estação Liberdade, São Paulo.
- Carnaval AC, Hickerson MJ, Haddad CFB, Rodrigues MT, Moritz C (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science* 323: 785-789.
- Carnaval AC, Moritz CM (2008) Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest. *J Biogeogr* 35: 1187–1201.
- Chung MY, Nason JD, Chung MG (2005) Spatial genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Orchis cyclochilan* (Orchidaceae). *Plant Syst Evol* 254: 209-219.
- Collevatti RG, Rabelo SG, Vieira RF (2009) Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. *Ann Bot* 104: 655-664.
- Collevatti RG, Terribile LC, Lima-Ribeiro MS, Nabout JC, de Oliveira G, Rangel TF, Rabelo SG, Diniz-Filho JAF (2012) A coupled phylogeographical and species distribution modeling approach recovers the demographical history of a Neotropical seasonally dry forest tree species. *Mol Ecol* 21(23): 5845-5863.
- Corrêa MP (1926) Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas, v.1. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro.
- Cozzolino S, Cafasso D, Pellegrino G, Musacchio A, Widmer A (2003) Fine-scale

- phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation. *Mol Ecol* 12: 2783–2792.
- Cruz DT, Schnadelbach AS, Lambert SM, Ribeiro PL, Borba EL (2011) Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. *Plant Syst Evol* 294(1-2): 87-98.
- Dressler RL (1981) *The orchids: natural history and classification*. University Press, Cambridge, Harvard.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32(5): 1792-1797.
- Ellstrand NC, Whitkus R, Rieseberg LH (1996) Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proc Natl Acad Sci* 93: 5090–5093.
- Ennos RA, Sinclair WT, Hu XS, Langdon A (1999) Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. In: Hollingsworth PM, Bateman RM, Gornall RJ (eds). *Molecular systematics and plant evolution*. Taylor and Francis Ltd, London. p. 1–19.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Falk DA, Holsinger KE (1991) *Genetics and conservation of rare plants*. University Press, Oxford, New York.
- Felsenstein J (1993) PHYLIP (Phylogeny inference package) version 3.5c. University of Washington, Seattle.
- Feres F, Zucchi MI, Souza AP, Amaral MCE, Bittrich DV (2009) Phylogeographic studies of Brazilian “campo-rupestre” species: *Wunderlichia mirabilis* Riedel ex Baker

- (Asteraceae). *Biotemas* 22: 17 – 26.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. 617pp.
- Fraga CN, Fontana AP, Saddi EM, San Martin-Gajardo IC, Simonelli M, Bocayuva MF, Constantino PAL, Borges RAX, Machado SL, Murrieta R, Monnerat M, Paes JE (2009) Plano de ação para as orquídeas em risco de extinção. Relatório Final, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo A.M. de Mello – CENPES/Petrobras. 522p.
- Freire LSR, Fraga CN (2010) Ecologia reprodutiva de *Cattleya perrinii* Lindl. (Orchidaceae: Laelinae), como ferramenta para conservação da espécie. In: Anais do 61º Congresso Nacional de Botânica, Manaus. Sociedade Botânica do Brasil, CD-ROM.
- Fu YX, Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693–709.
- Gross BL, Schwarzbach AE, Rieseberg LH (2003) Origin (s) of the diploid hybrid species *Helianthus deserticola* (Asteraceae). *Am J Bot* 90(12): 1708–1719.
- Guillot G, Santos F (2010) Using AFLP markers and the Geneland program for the inference of population genetic structure. *Mol Ecol Resour* 10(6): 1082-1084.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontol electron* 4(1): 9.
- Hoehne FC (1953) Orchidaceas. p. 1-397. In: Hoehne FC (ed.). *Flora Brasílica* 12(7). Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo, São Paulo.
- Holsinger KE, Lewis PO, Dey DK (2002) A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Mol Ecol* 11: 1157–1164.
- Holsinger KE, Wallace LE (2004) Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: an example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *Mol Ecol* 13: 887-894.
- Johson SD, Steiner K (1995) Long-proboscid fly pollination of two orchids in the Cape

- Drakensberg Mountains, South Africa. *Plant Syst Evol* 195: 169-175.
- King RA, Ferris C (1998) Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Mol Ecol* 7(9): 1151-1161.
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) Mega3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 50-163.
- Lage-Novaes RM, de Lemos-Filho JP, Ribeiro RA, Lovato MB (2010) Phylogeography of *Plathymenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Mol Ecol* 19(5): 985-998.
- Larson SR, Jones TA, Jensen K. B (2004) Population structure in *Pseudoroegneria spicata* (Poaceae: Triticeae) modeled by Bayesian clustering of AFLP genotypes. *Am J Bot* 91(11): 1789–1801.
- Ley AC, Hardy OJ (2010) Species delimitation in the Central African herbs *Haumania* (Marantaceae) using georeferenced nuclear and chloroplastic DNA sequences. *Mol Phylogen Evol* 57(2): 859-867.
- Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Solzano FM, Freitas LB (2003) Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Ann Bot* 95: 799-806.
- Lousada JM, Borba EL, Ribeiro KT, Ribeiro LC, Lovato MB (2011) Genetic structure and variability of the endemic and vulnerable *Vellozia gigantea* (Velloziaceae) associated with landscape in Espinhaço Range, southeastern Brazil: implications for conservation. *Genetica* 139: 431-440.
- Miranda FEL (1998) Present status of Brazilian *Laelia* species. p 57-61 In: Pereira CEB. Proceedings of the 15th World Orchid Conference, Rio de Janeiro. Naturalia Publications, Turriers.

- Mittermeier RA, Gil PR, Hoffmann M, Pilgrim J, Brooks J, Mittermeier CG, Lamourux J, Fonseca GAB. (2004) Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. DC: Cemex, Washington.
- Moritz C (1995) Uses of molecular phylogenies for conservation. *Philos T R Soc B* 349: 113–118.
- Murcia C (1996) Forest fragmentation and the pollination of Neotropical plants. In: Schellas J, Greenberg R (eds). *Forest patches in tropical landscapes*. Island Press, Washington.
- Nordström S, Hedrén M (2009) Genetic diversity and differentiation of allopolyploid *Dactylorhiza* (Orchidaceae) with particular focus on the *Dactylorhiza majalis* ssp. *traunsteineri/lapponica* complex. *Biol J Linn Soc* 97(1): 52-67.
- Novaes RML, Rodrigues JG, Lovato MB (2009) An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. *Genet Mol Res* 8(1): 86-96.
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol* 13: 1143-1155.
- Nybom H, Bartish IV (2000) Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspect Plant Ecol* 3: 93-144.
- Pabst GFJ, Dungs F (1975) *Orchidaceae Brasilienses*, v. 1. Kurt Schmiersow, Hildesheim. p. 408.
- Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357–358.
- Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH (2009) Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae) a neotropical forest species. *Heredity* 103: 503-512.
- Pannell JR, Dorken ME (2006) Colonisation as a common denominator in plant metapopulations and range expansions: effects on genetic diversity and sexual systems. *Landscape Ecol* 21: 837-848.

- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlex 6.5: genetic in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatic* 29(19): 2537-2639.
- Pellegrino G, Bellusci F, Musacchio A (2008) Morphological and molecular investigation of the parentage of *Ophrys x circlarium* (*O. lutea* x *O. tarentina*), a new hybrid orchid from Italy. *Ann Bot Fenn* 45(1): 61-67.
- Pereira KFR, Malafaia CB, Silva TD, Almeida CMA, Silva AG (2008) Diversidade Genética em uma população de *Epidendrum cinnabarium* Salzm. Ex Lindl. (Orchidaceae) provenientes de *Inselbergs* utilizando marcador molecular. In: Anais do 59º Congresso Nacional de Botânica, Natal. Sociedade Botânica do Brasil, p. 31.
- Peixoto AL, Rosa MMT, Silva IM (2002) Caracterização da Mata Atlântica. In: Manual Metodológico para estudos botânicos na Mata Atlântica. Ed: Seropédica, Rio de Janeiro.
- Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Salvini D, Vendramin GG (2005) Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol Ecol* 14: 689–701.
- Pfeifer M, Schatz B, Picó FX, Passalacqua NG, Fay MF, Carey PD, Jeltsch F (2009) Phylogeography and genetic structure of the orchid *Himantoglossum hircinum* (L.) Spreng. Across its European central-marginal gradient. *J Biogeogr* 36: 2353-2365.
- Phillips RD, Dixon KW, Peakall R (2012) Low population genetic differentiation in the Orchidaceae: implications for the diversification of the family. *Mol Ecol* 21: 5208-5220.
- Pinheiro F, de Barros F, Palma-Silva C, Fay MF, Lexer C, Cozzolino S (2011) Phylogeographical and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *J Biogeogr* 38: 1923-1935.

- Pinheiro LR, Rabbani ARC, da Silva AVC, Léo AS, Pereira KLG, Diniz LEC (2012) Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. *Plant Syst Evol* 298: 1815-1825.
- Pinto LP, Brito MCW (2003) Dynamics of biodiversity loss in the Brazilian Atlantic Forest: an introduction. In: Galindo-Leal C, Câmara IG (eds.). *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats and outlook*. Island Press, Washington, p. 27–30.
- Ramos ACS, Lemos-Filho JP, Ribeiro RA, Santos FR, Lovato MB (2007) Phylogeography of the tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the influence of quaternary climate changes in the Brazilian cerrado. *Ann Bot* 100: 1219 – 1228.
- Ramos ACS, de Lemos-Filho JP, Lovato MB (2009) Phylogeographical structure of the neotropical forest tree *Hymenaea courbaril* (Leguminosae: Caesalpinioideae) and its relationship with the vicariant *Hymenaea stigonocarpa* from cerrado. *J Hered* 100: 206 – 216.
- Reeves PA, Richards CM (2009) Accurate inference of subtle population structure (and other genetic discontinuities) using principal coordinates. *Plos One* 4(1): e4269.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biol Conserv* 142: 1141-1153.
- Ribeiro PL, Borba EL, Smidt EC, Lambert SM, Schnadelbach AS, 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. *Plant Syst Evol* 270: 109-137.
- Ribeiro RA, Lemos-Filho JP, Ramos ACS, Lovato MB (2011) Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 106: 46-57.

- Rieseberg LH (1991) Hybridization in rare plants: insights from case studies in *Cercocarpus* and *Helianthus*. In: Falk DA, Holsinger KE (eds) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press, New York.
- Rieseberg LH (1996) Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mol Ecol* 5(1): 99–105.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9: 552–569.
- Rozas J, Sánchez-Delbarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Ruschi A (1986) Orquídeas de Estado do Espírito Santo. Expressão e Cultura, Rio de Janeiro.
- Salgueiro F, Felix D, Caldas JF, Margis-Pinheiro M, Margis R (2004) Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. *Divers Distrib* 10: 201 – 210.
- Sharma IK, Clements MA, Jones DL (2000) Observations of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae). *Biochem Syst Ecol* 28(7): 651-663.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III. *Am J Bot* 94(3): 275–288.
- Shen J, Ding X, Liu D, Ding G, He J, Li X, Tang F, Chu B (2006) Intersimple Sequence Repeats (ISSR) Molecular Fingerprinting Markers for Authenticating Populations of *Dendrobium officinale* KIMURA et MIGO. *Biol Pharm Bulletin* 29(3): 420-4222.
- da Silva JMC, Casteleti CHM (2003) Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: Galindo-Leal C, Câmara IG (eds.) The Atlantic Forest of South America:

- Biodiversity Status, Threats, and Outlook. CABS and Island Press, Washington. p. 43–59.
- Silva JRSS, van den Berg C (2008) Variabilidade populacional de *Cattleya pfisteri* (Pabst & Senghas) van der Berg (Orchidaceae), Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. In: Anais do 59º Congresso Nacional de Botânica, Natal. Sociedade Botânica do Brasil, p. 64.
- Silva-Pereira V, Smidt EC, Borba EL (2007) Isolation mechanisms between two sympatric *Sophronitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. *Plant Syst Evol* 269: 171-182.
- Smidt EC, Silva-Pereira V, Borba EL (2006) Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to North-eastern Brazil. *Plant Spec Biol* 21: 85-91.
- Smith JL, Hunter KL, Hunter RB (2002) Genetic variation in the terrestrial orchid *Tripularia discolor*. *Southeast Nat* 1(1): 17-26.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. WH Freeman, San Francisco.
- Soltis DE, Soltis PS, Milligan BG (1992) Intraspecific chloroplast DNA variation: systematic and phylogenetic implications. In: Soltis PM, Soltis DE, Doyle JJ (eds.) *Molecular Systematics of Plants*. Springer, 434p.
- Sprunger S, Cribb P, Toscano-de-Brito ALV (1996) *Iconographie des Orchidées du Brésil*. v. 1. Reinhardt, Basle.
- Squirrel J, Hollingsworth, PM, Bateman RM, Dickson JH, Light MHS, MacConaill M, Tebbitt MC (2001). Partitioning and diversity of nuclear and organelle markers in native and introduced populations of *Epipactis helleborine* (Orchidaceae). *Am J Bot* 88: 1409-1418.
- Staden R, Judge DP, Bonfield JK (2003) Analysing Sequences Using the Staden Package and EMBOSS. In: Krawetz SA, David D (eds.) *Womble Introduction to Bioinformatics*. A

- Theoretical and Practical Approach. Human Press Inc., Totawa.
- Stehmann JR, Forzza RC, Salino A, Sobral M, Costa DP, Kamino LHY (2009) Plantas da Floresta Atlântica. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 516p.
- Swenson NG, Howard J (2005) Clustering of contact zones, hybrid zones, and phylogeographic breaks in North America. *Am Nat* 166: 581-591.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585 – 595.
- Templeton AR, Routman E, Phillips CA (1995) Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767-782.
- Thormann W, Molteni S, Caslavská J, Schumtz A. 1994. Clinical and forensic applications of capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 15(1): 3–12.
- Tranchida-Lombardo V, Cafasso D, Cristaudo A, Cozzolino S (2011) Phylogeographic patterns, genetics affinities and morphological differentiation between *Epipactis helleborine* and related lineages in a Mediterranean glacial refugium. *Ann Bot* 107: 427-436.
- Trapnell DW, Hamrick JL, Nason JD (2004) Three-dimensional fine-scale genetics structure of the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Mol Ecol* 13: 1111-1118.
- Tremblay RL, Ackerman JD, Zimmerman JK, Calvo RN (2005) Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biol J Linn Soc* 84: 1-54.
- Tsai YHE (2011) PhyloGeoViz: a web-based program that visualizes genetic data on maps. *Mol Ecol Resour* 11(3): 557-561.
- van den Berg C, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Soto Arenas MA, Culham A, Chase MW (2000) A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data

- from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* 15(2): 96–114.
- Vekemans X (2002) AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Volz SM, Renner SS (2009) Phylogeography of the ancient Eurasian medicinal plant genus *Bryonia* (Cucurbitaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequences. *Taxon* 58: 550-560.
- Xiaohong Y, Li G, Bo Y (2007) Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on Inter-simple sequence repeats analysis. *Front Biol in China* 2(4): 419-424.
- Wang YL, Li X, Guo J, Guo ZG, Li SF, Zhao GF (2010) Chloroplast DNA phylogeography of *Clintonia udensis* Trautv. & Mey. (Liliaceae) in East Asia. *Mol Phylogen Evol* 55: 721-732.
- Welch ME, Rieseberg LH (2002) Patterns of genetic variation suggest a single, ancient origin for the diploid hybrid species *Helianthus paradoxus*. *Evol* 56(11): 2126-2137.
- Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey SV (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Method Enzymol* 218: 704–740.
- Withner CL (1988) The Cattleyas. In: Withner CL The Cattleyas and their relatives. Timber Press, Portland.
- Wolfe AD, Liston A (1998) Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ. *Plant Molecular Systematics II*. Kluwer, Boston. pp. 43-86.
- Yamaji H, Fukuda T, Yokoyama J, Pak JH, Zhou CZ, Yang CS, Kondo K, Morota T, Takeda S, Sasaki H, Maki M (2007) Reticulate evolution and phylogeography in *Asarum* sect. *Asiasarum* (Aristolochiaceae) documented in internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Mol Phylogen Evol* 44: 863-884.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. *Genomics* 20: 176–183.

Zitari A, Tranchida-Lombardo V, Cafasso D, Helal NA, Scopece G, Cozzolino S (2011) The disjointed distribution of *Anacamptis longicornu* in the West-Mediterranean: the role of vicariance versus long-distance seed dispersal. *Taxon* 60(4): 1041-1049.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados neste estudo, podemos concluir que as duas espécies, possuem moderada a alta variabilidade genética tanto a partir de marcadores moleculares ISSR quanto para marcadores cpDNA. Além disso, baixa estruturação genética significativa foi detectada entre as populações de cada espécie. Os resultados de PCO serão posteriormente submetidos à análise de agrupamento para inferir o número de *cluters* resultantes. Para *C. lobata*, a variabilidade genética pode ser devida a polinização por engodo, que promove o fluxo de pólen entre indivíduos diferentes. E, a coesão genética entre tais populações, provavelmente seja devido à variação genética histórica compartilhada entre os atuais relictos e pode estar sendo mantida por fluxo gênico recente e recorrente através de dispersão de sementes. Assim, em planos de manejo em que esteja prevista a reintrodução ou transferência de material genético (através de indivíduos, pólen ou sementes), este pode ser oriundo de qualquer uma das populações analisadas, já que as cinco populações de *C. lobata* pertencem a um mesmo pool gênico.

Após o sequenciamento de 71 indivíduos de *C. lobata* para as regiões *psbD-trnT* e *rpL32-trnL* não foram encontrados sítios polimórficos na matriz alinhada e combinada dos dois marcadores. Devido ao reduzido número de indivíduos de *C. lobata*, à proximidade entre as populações amostradas e ao custo por buscar marcadores variáveis com indícios de sucesso, optamos por não dar seguimento ao sequenciamento de outras regiões cpDNA para análises filogeográficas para esta espécie.

Para *Cattleya xanthina*, a variabilidade genética encontrada é indicada como sendo próxima aquela das populações ancestrais, o que provavelmente não tenha sido alterada pela fragmentação recente da Mata Atlântica. Através das análises filogeográficas foi possível encontrar 10 haplótipos distribuídos nas cinco populações estudadas. Estes haplótipos encontram-se divididos em duas linhagens separadas por várias mutações. Não há uma correlação dos haplótipos com a distribuição geográfica das populações, possivelmente devido ao tamanho reduzido e da

proximidade geográfica entre as populações. Este padrão encontrado de duas linhagens haplotípicas, sugere a ocorrência de introgressão de haplótipos de outra espécie que tenha hibridizado com *C. xanthina*.

Diante da possibilidade de introgressão, podemos levantar a hipótese de que *C. xanthina* pode ter hibridizado com alguma espécie de outra seção (como por exemplo. *C. praestans* ou *C. pumila*), que durante as oscilações climáticas do Pleistoceno possam ter sido expostas à simpatria. Assim, após diversos cruzamentos entre os híbridos e retrocruzamentos com os parentais, o padrão de duas linhagens encontrado nesta espécie pode ser o vestígio de haplótipos introgrididos da outra espécie parental.

Para testar esta hipótese faz-se necessário investigar a estrutura haplotípica de *C. xanthina* em uma matriz composta por múltiplas amostras das espécies acima mencionadas, acrescida de amostras dos táxons híbridos já descritos na literatura.

Devido à sobreposição geográfica parcial com *C. xanthina*, foi iniciada investigação dos padrões de sequencias nucleotídicas dos mesmos fragmentos em *C. perrinii*. Até o momento obtivemos amostras de sequencia de *psbD-trnT* e realizamos testes para padronizar as PCRs de *rpL32-trnL*. Além disso, amostras multipopulacionais de *C. grandis* e *C. tenebrosa* foram coletadas e estão em fase de teste de extração, amplificação e sequenciamento.