

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNA VICTORIA SILVERIO RIGHETTO MAUAD



ESTUDOS FILOGENÉTICOS E GENÔMICOS NO GÊNERO *Anathallis*  
(ORCHIDACEAE)

CURITIBA

2018

ANNA VICTORIA SILVERIO RIGHETTO MAUAD

ESTUDOS FILOGENÉTICOS E GENÔMICOS NO GÊNERO *Anathallis*  
(ORCHIDACEAE)

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Botânica pelo curso de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Paraná, Departamento de Botânica, Setor de Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt.

Co-orientadores: Dra. Leila do Nascimento Vieira e Dr. Antônio Luiz Vieira Toscano de Brito.

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas - CRB/9-939).

Mauad, Anna Victoria Silverio Righetto  
Estudos filogenéticos e genômicos no gênero *Anathallis* (Orchidaceae). /  
Anna Victoria Silverio Righetto Mauad. – Curitiba, 2018.  
104 f. : il. ; 30cm.

Orientador: Eric de Camargo Smidt.

Coorientadores: Leila do Nascimento Vieira e Antônio Luiz Vieira Toscano de Brito.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Orchidaceae. 2. Genoma de Planta. 3. Orquídea. 4. Plantas - Filogenia. I. Título. II. Smidt, Eric de Camargo. III. Vieira, Leila do Nascimento. IV. Brito, Antônio Luiz Vieira Toscano de. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

CDD (20. ed.) 584.15



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Botânica



**Estudos filogenéticos e genômicos no gênero *Anathallis* (Orchidaceae)**

por

**Anna Victoria Silvério Righetto Mauad**

**Dissertação aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Botânica,  
pela Comissão formada pelos doutores Eric de Camargo Smidt , Duane  
Fernandes Lima e José Floriano Barêa Pastore.**

Eric de Camargo Smidt

Duane Fernandes Lima

José Floriano Barêa Pastore

**Curitiba, 31 de outubro de 2018.**

*Em memória aos que já foram, e que deixam saudade.*

*Especialmente:*

*Ao meu bisavô Erondy Silvério, que gostava das estórias que eu inventava antes mesmo de eu aprender a ler;*

*À minha bisavó Iracy Silvério, por toda a doçura, maternidade e garra condizentes com a mulher exemplar que foi;*

*À minha amada avó Maria de Lourdes Silvério, que nos deixou cedo demais. Gostaria que estivesse presente em mais essa conquista. Saudades eternas, "Titolinho".*

## AGRADECIMENTOS

*Eu quero agradecer principalmente a quem sempre estive ao meu lado incondicionalmente: minha mãe, Andréa Maria Silvério Righetto Martino. Ela, que apesar das incontáveis rasteiras que a vida deu, sempre lutou com amor para dar a mim e às minhas irmãs o melhor. É, e pra sempre será, meu maior orgulho e um exemplo de superação pessoal. Não posso deixar de agradecer também meu companheiro de todo dia, quem experimenta o pior e evidencia o melhor de mim, me incentiva, me enaltece, me cuida: meu amor, Eduardo Olivet Villalba. São estes meus melhores amigos, que me são caros e amados!*

*Também agradeço imensamente ao meu orientador, professor Dr. Eric de Camargo Smidt, por sempre me dar apoio, confiar no meu potencial (até mesmo quando eu desconfio), e me ajudar quando eu preciso. E não menos importante, agradeço à professora Dra. Viviane da Silva-Pereira, minha orientadora “de coração”, que também sempre confiou em mim. À vocês dois minha eterna gratidão por toda a determinação e preocupação que vocês têm em garantir fundos para nossas pesquisas com esse cenário de instabilidade no qual se encontra a ciência no Brasil.*

*Essa dissertação de Mestrado também seria impossível sem os meus co-orientadores, Dr. Antonio Luiz Vieira Toscano de Brito, especialista em Pleurothallidinae, e professora Dra. Leila do Nascimento Vieira, especialista em biologia molecular, que compartilharam comigo um pouco de seu conhecimento e experiência, além de bastante tempo e paciência.*

*Sou também muito grata àqueles que estão nos bastidores do dia-a-dia me ajudando na caminhada profissional e me dando forças emocionalmente. Obrigada Marlene Pires da Silva por todo seu altruísmo e pureza de coração, Giovanni Martino por todo o incentivo e carinho, e irmãs Isabella Silvério Righetto Martino e Isadora Silvério Righetto Sounis Mauad, por serem meus amores. Agradeço aos alunos do Programa de Pós-Graduação em Botânica e à toda a equipe do LSEMP pela ajuda e companheirismo que recebi durante todos esses anos, especialmente as maravilhosas Mônica Bolson e Duane Fernandes Lima, pela amizade e por terem me capacitado com excelência para o trabalho de laboratório.*

*Por fim, mas também muito importantes para mim, gostaria de agradecer àqueles que não estão ao meu lado todos os dias. Seja pela distância, seja pela rotina. São pessoas que eu amo muito, e que foram muito importantes para a construção de quem eu sou hoje. São eles meu pai, José Pedro Sounis Mauad, minha madrinha Lorena Silvério Bernoldi e minha irmã de alma Laura Carolina Vieira. Obrigada por todo o carinho e suporte!*

*Sem vocês eu não teria conseguido! Essa conquista é de todos nós!*

## RESUMO

A subtribo Pleurothallidinae (Epidendroideae: Epidendrae) representa 20% da riqueza da família Orchidaceae com mais de 5 mil espécies, todas restritas à região neotropical. Apesar de seu monofiletismo estar bem estabelecido, a circunscrição de seus gêneros ainda é muito debatida, como ocorre com *Anathallis*. Porém, os trabalhos filogenéticos desenvolvidos até então utilizaram uma amostragem ineficiente e exploraram poucos conjuntos de dados, basicamente o sequenciamento da região nrITS, estabelecendo relações taxonômicas duvidosas entre as espécies de *Anathallis* e os demais gêneros do grupo. Além disso, não foram realizados estudos genômicos focados na subtribo, indicando uma profunda lacuna de conhecimento acerca da biologia molecular desse grupo de orquídeas. Este trabalho foi desenvolvido em dois capítulos, sendo que no primeiro foram realizadas análises filogenéticas e de datação molecular utilizando uma amostragem mais robusta do gênero *Anathallis* e valendo-se do sequenciamento de seis regiões moleculares, incluindo a nrITS. Também foram codificados caracteres morfológicos, incorporados em análises filogenéticas conjuntas e de reconstrução de caracteres morfológicos. No segundo capítulo é apresentada a sequência completa do genoma cloroplastidial de *Anathallis obovata*, espécie-tipo do gênero, que foi comparada com sequências genômicas de táxons próximos das subtribos Pleurothallidinae e Laeliinae.

**Palavras-chave:** Pleurothallidinae; genoma cloroplastidial; orquídeas neotropicais; datação molecular; filogenia de evidência total.

## ABSTRACT

The subtribe Pleurothallidinae (Epidendroideae: Epidendreae) represents 20% of the species richness of Orchidaceae with more than 5 thousand species, all restricted to the neotropical region. Although its monophyly is well established, the circumscription of its genera is still much debated, as is the case of *Anathallis*. Previous phylogenetic studies used inefficient sampling and explored few data sets, basically the sequencing of the nrITS region, establishing dubious taxonomic relationships between *Anathallis* species and the other genera of Pleurothallidinae. In addition, there are no Pleurothallidinae-focused genomic studies, indicating a lack of knowledge about the molecular biology of this orchid group. This work was developed in two chapters. In the first one, phylogenetic and molecular dating analyses were performed using a larger sample of the genus *Anathallis* and using the sequencing of six molecular regions, including the nrITS. Morphological characters were also coded, used in concatenated phylogenetic and morphological characters reconstruction analysis. In the second chapter we present the complete sequence of the chloroplast genome of *Anathallis obovata*, the type-species of the genus, which was compared with genomic sequences of closely-related taxa of the subtribe Pleurothallidinae and also of subtribe Laeliinae.

**Keywords:** Pleurothallidinae; chloroplast genome; neotropic orchids; molecular dating; total evidence phylogeny.

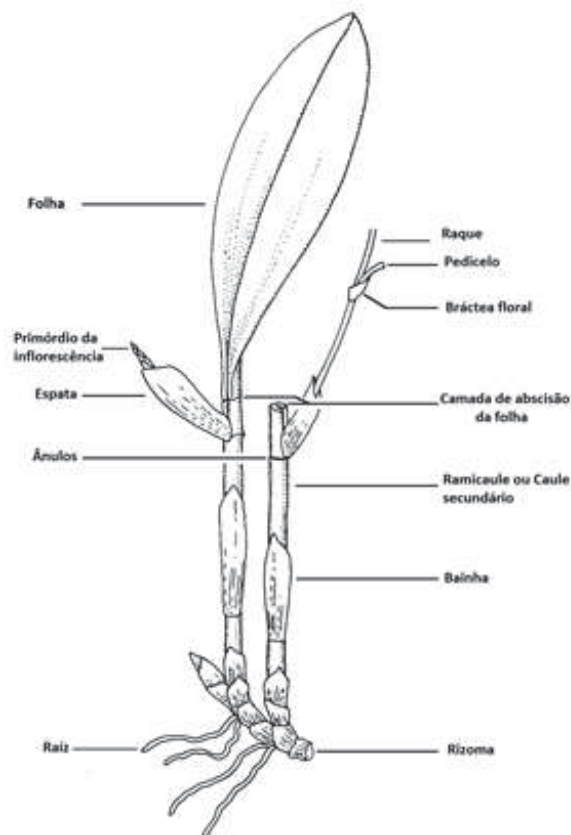
## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 1:</b> Abordagem de evidência total em <i>Anathallis</i> (Orchidaceae: Pleurothallidinae) reforça polifiletismo e indica artificialidade de grupos morfológicos .....	13
RESUMO .....	14
INTRODUÇÃO .....	15
METODOLOGIA .....	18
Amostragem dos táxons .....	18
Extração de DNA, reações de amplificação e sequenciamento .....	19
Matrizes de alinhamento .....	21
Morfologia.....	21
Análises filogenéticas .....	22
Análise de datação molecular .....	23
RESULTADOS .....	24
Reconstrução dos caracteres morfológicos .....	24
Filogenias .....	25
Datação molecular .....	28
DISCUSSÃO .....	28
Pleurothallidinae .....	28
Os gêneros <i>Anathallis</i> , <i>Lankesteriana</i> e <i>Stelis</i> s.l. ....	31
Grupos morfológicos de <i>Anathallis</i> s.s. ....	32
Idades estimadas .....	33
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	53
<b>CAPÍTULO 2:</b> <i>Complete chloroplast genome of Anathallis obovata</i> (Orchidaceae: Pleurothallidinae) .....	68
ABSTRACT .....	69
INTRODUCTION .....	70
METHODS .....	72
RESULTS .....	74
DISCUSSION.....	75
<b>CONCLUSÃO FINAL</b> .....	90
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	91

## INTRODUÇÃO GERAL

A família Orchidaceae, de acordo com a classificação mais atual (CHASE *et al.*, 2015), possui cerca de 25.000 espécies, dividindo-se em cinco subfamílias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Epidendroideae, Orchidoideae e Vanilloideae. São encontradas em todos os continentes, concentrando-se em regiões de clima tropical, onde elas exibem maior diversidade de espécies de variadas formas e cores (HOEHNE, 1940). Da subfamília Epidendroideae destaca-se a subtribo Pleurothallidinae (tribo Epidendreae), com cerca de 5 mil espécies subordinadas a 44 gêneros de distribuição exclusivamente neotropical (KARREMANS, 2016), correspondendo a aproximadamente 20% da riqueza da família Orchidaceae.

Na primeira revisão taxonômica da subtribo foi definido o esquema básico de aspectos vegetativos de Pleurothallidinae (LUER, 1986a) (Figura 1), bem como foram propostas sinapomorfias para o grupo, que consistem na ausência de pseudobulbo, caule secundário unifoliado (denominado ramicaule), e ovário articulado ao pedicelo (LUER, 1986a).



**Figura 1:** Esquema básico da morfologia vegetativa de Pleurothallidinae. Ilustração do hábito genérico de Pleurothallidinae, retirada de Luer (1986) e traduzida para o português. A figura mostra a estruturação em ramicaule, com apenas uma folha terminal, e presença de ânulo, que não ocorre em todos os gêneros.



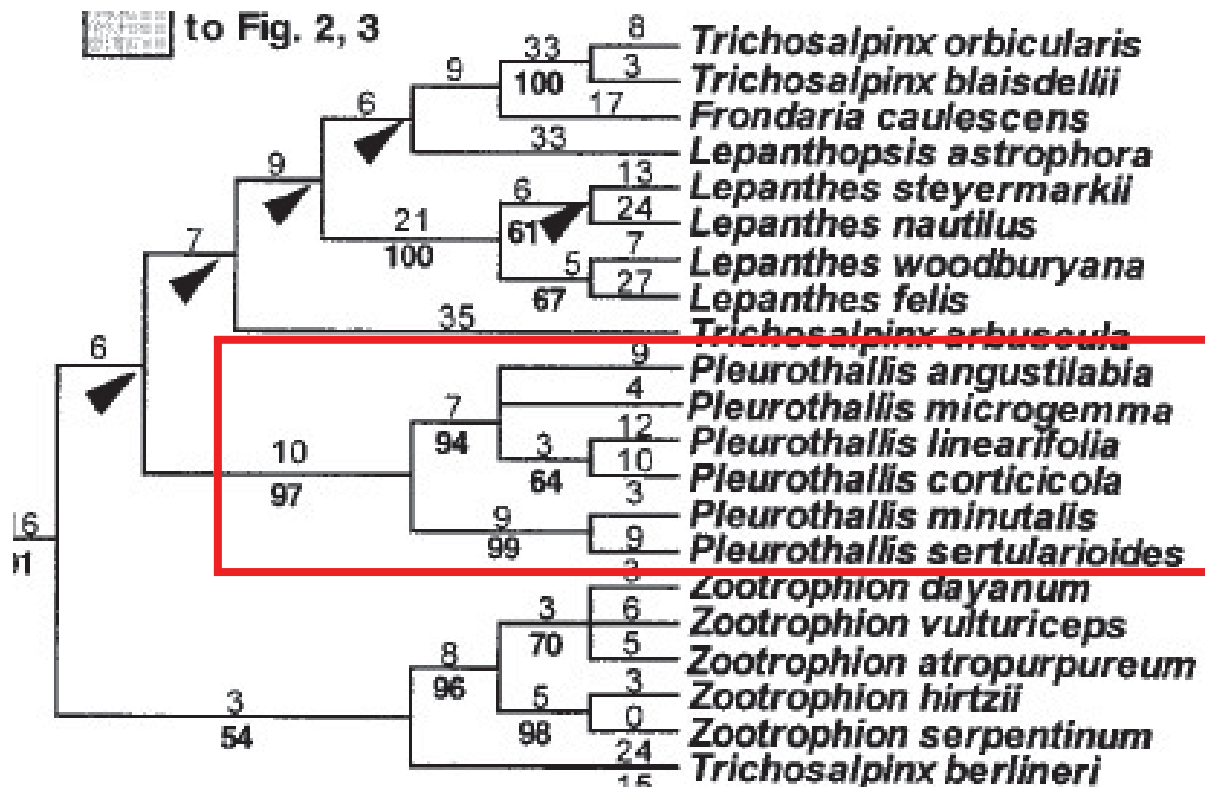
*Anathallis* Barb.Rodr. é um gênero de Pleurothallidinae que ocorre desde o sul do México até o sul do Brasil (LUER, 1999). Foi descrito em 1877 com base em duas espécies brasileiras: *A. fasciculata* (a espécie-tipo) e *A. racemosa* (BARBOSA RODRIGUES, 1877). Contudo, na mesma época em que *Anathallis* foi proposto muitas de suas espécies, incluindo a espécie-tipo, já haviam sido descritas para o gênero *Pleurothallis*, de forma que houve a sinonimização de *Anathallis* a *Pleurothallis* (COGNIAUX, 1896). Com isso, *Anathallis fasciculata*= *Pleurothallis obovata* (Lindl.) Lindl. e *Anathallis racemosa*= *Pleurothallis acuminata* (Kunth) Lindl..

No Ícones Pleurothallidarum XVIII, Luer (1999) trata *Anathallis* como sinônimo de *Pleurothallis* subgênero *Acuminatia* Lindl., caracterizando-o pelo ramicaule longo, podendo ser do mesmo tamanho ou maior do que a folha, e com ânulo, pela inflorescência lateral e pelas flores com sépalas similares entre si e livres, com pétalas pequenas de margem inteira e com o pé da coluna bem desenvolvido, se estendendo para além do limite do ovário (LUER, 1999). Esse grupo foi dividido em duas seções: *Acuminatae* Lindl., cuja espécie-tipo é *P. acuminata*, e *Alatae* Luer, com *P. obovata* (LUER, 1999). Luer apontou a existência de 50 espécies do subgênero *Acuminatia*, das quais 28 ocorrem no Brasil, sendo 23 endêmicas do país (LUER, 1999).

A seção *Acuminatae* é caracterizada por apresentar sépalas pubescentes na face abaxial, pétalas com o ápice bastante obtuso ou arredondado, coluna com asas vestigiais ou ausentes e labelo caloso ou com lobos laterais (LUER, 1999). Já as espécies da seção *Alatae* possuem sépalas glabras, pétalas com o ápice agudo, coluna com asas bem proeminentes e quase retangulares, e labelo simples com um canal raso ao longo da nervura mediana (LUER, 1999).

O gênero *Anathallis* foi restabelecido por Pridgeon (2005) com base no primeiro estudo utilizando filogenia molecular para a subtribo (Pridgeon *et al.*, 2001), devido à reunião de espécies de *Pleurothallis* subgênero *Acuminatia* seção *Alatae* e de *Pleurothallis* subgênero *Specklinia* (Lindl.) Garay seção *Muscosae* Lindl. em um clado (Figura 3). Esse agrupamento não foi aceito por Luer (2002) inicialmente, visto que no trabalho de Pridgeon e colaboradores (2001) o subgênero *Acuminatia* foi subamostrado e não foi devidamente representado (foram utilizadas apenas duas espécies da seção *Alatae*: *P.*

*linearifolia* e *P. angustilabia*). Além disso as diferenças morfológicas entre os dois grupos foram ressaltadas: em contraste com o subgênero *Acuminatia*, as espécies do subgênero *Specklinia* seção *Muscosae* possuem ramicaule congesto, sendo menor do que a folha, sépalas laterais conadas em diferentes níveis, e dois pequenos lóbulos na base do labelo (LUER, 2002).



**Figura 3:** Clado que levou ao restabelecimento de *Anathallis*, evidenciado em vermelho e com alto suporte, que reúne espécies de *Pleurothallis* subgênero *Acuminatia* seção *Alatae* e de *Pleurothallis* subgênero *Specklinia* seção *Muscosae*. Os números acima dos ramos se referem ao suporte de Bremer, os números abaixo à porcentagem de *bootstrap*, e as flechas indicam clados que não apareceram na árvore-consenso realizada pelos autores.

Fonte: Pridgeon *et al.* (2001).

Com isso, Luer (2006) criou o gênero *Panmorphia* para acomodar as espécies da antiga seção *Muscosae*, tendo *Epidendrum sertularioides* Sw. (= *Panmorphia sertularioides* (Sw.) Luer) como a espécie-tipo. O nome *Panmorphia* significa “muitas formas”, fazendo referência ao imenso espectro de variação fenotípica observado nesse gênero. Tão grande que, em 2009, Luer reconheceu ser morfológicamente possível a união entre *Panmorphia* e *Anathallis*, realizando então a sinonimização do primeiro ao segundo.

Atualmente, *Anathallis* conta com aproximadamente 150 espécies (CHASE *et al.*, 2015) encontradas desde o sul do México até o sul da Argentina

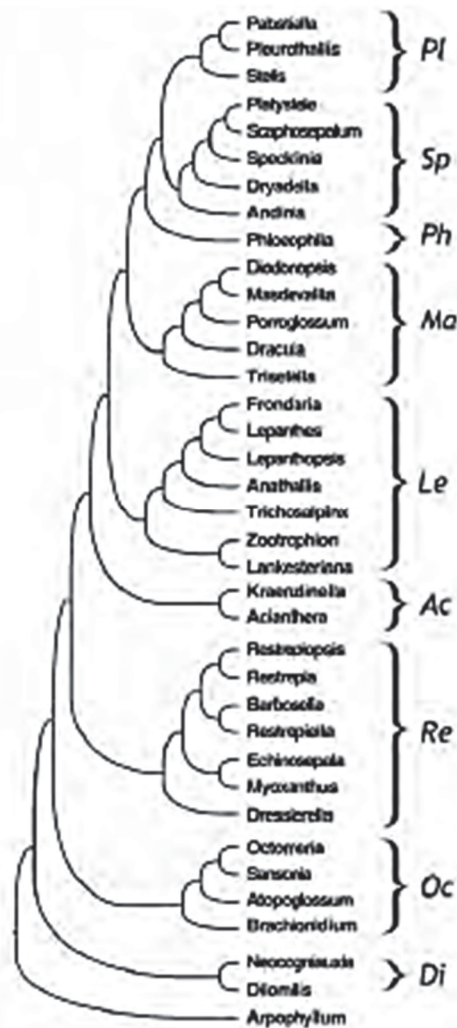
(LUER, 2006). No Brasil ocorrem 92 espécies, das quais 76 endêmicas do país (BFG – The Brazil Flora Group, 2015). O gênero possui quatro grupos morfológicos: *Acuminatae* (remete à antiga seção *Acuminatae*) *Alatae* (remete à antiga seção *Alatae*), *Margaritifera* (cuja espécie-tipo é *A. linearifolia*) e *Panmorphia* (remete ao antigo gênero *Panmorphia*). O grupo *Margaritifera* é proveniente de *Pleurothallis* seção *Margaritifera* Schltr. (PABST & DUNGS, 1975), que nunca foi formalmente proposto, porém foi citado por Luer (1986a, 2002) como sinônimo de *Anathallis*. Santos (2007) reconheceu as espécies morfológicamente afins de *Pleurothallis* seção *Margaritifera* como um grupo em *Anathallis*, composto por cinco espécies que anteriormente pertenciam à seção *Alatae* mas que de maneira singular apresentam tricomas esféricos ao longo da nervura mediana do labelo.

Outros resultados obtidos por Pridgeon e colaboradores (2001), como a inclusão dos gêneros *Dilomilis* Raf. e *Neocogniauxiana* Schltr. na base da subtribo (antes considerados mais próximos à subtribo *Laeliinae*) também foram muito discrepantes com a morfologia, o que gerou uma série de críticas ao trabalho principalmente por Luer (2002). Dentre as falhas levantadas estão, além do baixo número amostral e da pouca representatividade dos grupos taxonômicos, a identificação do material questionável pela ausência de *voucher* para muitas amostras (LUER, 2002).

Frente às críticas, Pridgeon e Chase (2003) afirmaram que no trabalho anterior (PRIDGEON *et al.*, 2001) somente os grupos monoespecíficos ou compreendendo poucas espécies de *Pleurothallidinae* não foram amostrados, e que os clados obtidos apresentaram alto suporte. Quanto às incongruências entre genoma e morfologia, a subtribo *Pleurothallidinae* é muito diversa, e portanto as características morfológicas que apresenta são em geral homoplásticas, dificultando seu uso em análises filogenéticas (PRIDGEON & CHASE, 2003). Com essas ressalvas, o trabalho de Pridgeon e colaboradores (2001) serviu de base para a classificação atual de *Pleurothallidinae* (PRIDGEON & CHASE, 2001; PRIDGEON, 2005), e demonstrou a necessidade de mais estudos, tanto moleculares quanto taxonômicos, na subtribo.

O monofiletismo de *Pleurothallidinae* foi reforçado em estudos filogenéticos posteriores (VAN DEN BERG *et al.*, 2005; CHIRON *et al.*, 2012; FREUDENSTEIN & CHASE, 2015), porém a taxonomia da subtribo a nível

genérico vem sendo constantemente reavaliada por estudos moleculares visando grupos mais específicos (e.g. *Acianthera* (CHIRON & VAN DEN BERG, 2011; KARREMANS *et al.*, 2016b), *Stelis* (KARREMANS *et al.*, 2013), *Specklinia* (KARREMANS *et al.*, 2016a), *Phloeophila* (CHIRON *et al.*, 2016) e *Andinia* (WILSON *et al.*, 2017)). As diferentes topologias resultantes de alguns desses estudos foram reunidas por Karremans (2016) para representar uma classificação atualizada dos gêneros de Pleurothallidinae. Assim, além de indicar as relações filogenéticas observadas em trabalhos anteriores, os grupos artificiais (afinidades) propostos por Luer foram atualizados: agora os gêneros da subtribo (*Dilomilis* e *Neocogniauxiana* inclusos) foram acomodados em nove grupos (Figura 4), definidos com base em dados moleculares de trabalhos anteriores (KARREMANS, 2016).



**Figura 4:** Classificação atualizada de Pleurothallidinae proposta por Karremans (2016) com base nas topologias obtidas em trabalhos filogenéticos anteriores. Os principais gêneros da subtribo foram organizados em nove grupos artificiais, denominados afinidades.

Já o monofiletismo de *Anathallis* foi contestado em alguns trabalhos filogenéticos (CHIRON *et al.*, 2012; KARREMANS *et al.*, 2013; KARREMANS, 2014), apesar de o gênero não ter sido o principal objeto de estudo de tais trabalhos, e de a amostragem realizada ser ineficiente para fornecer uma classificação definitiva para o grupo. Foram amostradas apenas 18 espécies de *Anathallis* no trabalho de Chiron e colaboradores (2012), sequenciadas somente para a região nrITS. Além disso, a árvore filogenética utilizada para discussão foi escolhida dentre as mais parcimoniosas obtidas ao invés de ter sido realizado o consenso delas. No trabalho de Karremans e colaboradores (2013) a amostragem foi ainda menor: 6 espécies de *Anathallis*, sequenciadas para a região nrITS, e destas apenas 3 foram combinadas com dados do gene *matK*.

A baixa amostragem é um problema não só dos estudos filogenéticos em *Anathallis* e em Pleurothallidinae, mas também em Orchidaceae como um todo por conta do elevado número de espécies já descritas, e que continua aumentando (FREUDENSTEIN & CHASE, 2015; GIVNISH *et al.*, 2015). Essa grande riqueza de espécies impõe dificuldade na amostragem em trabalhos filogenéticos, mas também é um objeto de estudo. Recentemente foram realizadas análises de tempo de divergência por datação molecular para a família (RAMÍREZ *et al.*, 2007; GUSTAFSSON *et al.*, 2010; CHOMICKI *et al.*, 2014; GIVNISH *et al.*, 2015), com a finalidade de compreender seus mecanismos de diversificação. Isso mostra a crescente preocupação em contextualizar grupos taxonômicos numa escala evolutiva, e de compreender a heterogeneidade na riqueza de espécies entre esses grupos.

Nesse campo de pesquisa, os obstáculos são outros que não a representatividade taxonômica: é a falta de fósseis para a calibração da idade dos ramos. Plantas que não desenvolvem crescimento secundário, como as orquídeas, não possuem tecidos rígidos o suficiente para serem preservados no sedimento durante períodos de tempo geológico. O que pode ser preservado são os grãos de pólen, graças à esporopolenina presente em sua superfície (SHAW, 1971).

Ramírez e colaboradores (2007) apresentaram uma filogenia molecular datada da família Orchidaceae utilizando a idade de um fóssil de *Meliorchis caribea*<sup>†</sup> (Orchidoideae: Cranichideae, Goodyerinae): um polinário aderido ao mesoescutelo de uma abelha já extinta sem ferrão, preservado em âmbar datado

do Mioceno. Com esse trabalho foi estimado que Orchidaceae tenha se originado no final do período Cretáceo (cerca de 80 Ma), e as principais subfamílias, Orchidoideae e Epidendroideae, no Paleoceno, a aproximadamente 65 Ma, em um período de aquecimento global (RAMÍREZ *et al.*, 2007). Pleurothallidinae não foi datada nesse trabalho.

Com a utilização de uma amostragem mais robusta tanto em representatividade de táxons quanto em marcadores moleculares, além da utilização de mais dois registros fósseis descobertos em 2009, foi realizada uma nova datação molecular para Orchidaceae (GUSTAFSSON *et al.*, 2010). A partir dessa análise a origem da família também foi estimada em aproximadamente 80 Ma, porém com diversificação mais recente do que se pensava: no Paleoceno Médio, há 60 Ma, em um período de resfriamento global. Nesse trabalho, a origem de Pleurothallidinae foi estimada em aproximadamente 25 Ma, final do Oligoceno, tendo Laeliinae como grupo-irmão.

Mais recentemente, Givnish e colaboradores (2015) realizaram outro trabalho de datação molecular para a família Orchidaceae, desta vez utilizando dados de genoma cloroplastidial e 17 fósseis para calibração dos ramos. Esses autores estimaram a origem da família Orchidaceae há cerca de 120 Ma, mais anteriormente no período Cretáceo, com diversificação há 65 Ma, corroborando com Ramírez e colaboradores (2007). A idade de Pleurothallidinae ficou estimada em aproximadamente 19 Ma, no início do Mioceno, tendo a subtribo Ponerinae como grupo-irmão (GIVNISH *et al.*, 2015).

Assim, mesmo com poucos registros fósseis de orquídeas, não tendo sido encontrados registros de Pleurothallidinae até o momento, ainda é possível datar os eventos de cladogênese que originaram os gêneros da subtribo e também suas respectivas linhagens infragenéricas. As idades obtidas desses trabalhos recentes de datação molecular realizados para a família Orchidaceae podem ser utilizados para a calibração dos ramos de filogenias de menor escala, desde que conhecida a margem de erro das estimativas (FOREST, 2009). Assim, tendo em mãos as idades estimadas para tais cladogêneses é possível inferir sobre a dinâmica evolutiva de todo um grupo, como também definir possíveis rotas de migração e hipotetizar eventos que propiciaram a diversificação de linhagens (FOREST, 2009). Esse método é conhecido como calibração secundária.

Outros exemplos de grandes trabalhos em Orchidaceae que utilizaram o método de calibração secundária são Chomicki e colaboradores (2014) e Pérez-Escobar e colaboradores (2017). No primeiro os autores estudaram a evolução do velame e sua importância na proteção de raízes contra a radiação UV na família Orchidaceae. Para tanto, empregaram o método de calibração secundária inclusive para dados fósseis. Nesse trabalho, a origem de Pleurothallidinae foi estimada entre 20,96 Ma (incluindo *Dilomilis* e *Neocogniaxiana*) e 19,75 Ma.

Pérez-Escobar e colaboradores (2017) realizaram datação molecular dos principais clados da subfamília Epidendroideae: da tribo Cymbidieae e da subtribo Pleurothallidinae. A idade estimada de Pleurothallidinae também ficou entre 19,61 Ma (incluindo *Dilomilis* e *Neocogniaxiana*) e 18,22 Ma. Eles também inferiram que a flora andina de orquídeas teve origem na Floresta Amazônica, a partir de táxons de baixas altitudes (ancestrais da tribo Cymbidieae) e de táxons já adaptados a grandes altitudes (ancestrais da subtribo Pleurothallidinae).

Além disso, a idade dos pontos de diversificação desses de Cymbidieae e Pleurothallidinae coincidem com os períodos em que os Andes sofreram maiores picos de crescimento acelerado (PÉREZ-ESCOBAR *et al.*, 2017), indicando que o soerguimento da cordilheira não atuou como uma barreira de dispersão, como para outros grupos de plantas (PIRIE *et al.*, 2006; ANTONELLI *et al.*, 2009; PENNINGTON *et al.*, 2010), e sim criou uma conexão para essas orquídeas entre a Amazônia e os Andes durante o Mioceno (PÉREZ-ESCOBAR *et al.*, 2017). Isso também foi verificado por Givnish e colaboradores (2016), que apontaram o soerguimento dos Andes como principal fator biogeográfico para o aumento vertiginoso na diversificação das orquídeas neotropicais durante o Mioceno.

Analisando os trabalhos recentes citados (GUSTAFSSON *et al.*, 2010; GIVNISH *et al.*, 2015; PÉREZ-ESCOBAR *et al.*, 2017), nota-se uma tendência de compensação da baixa representatividade taxonômica em Orchidaceae com a utilização de maior número e variedade de dados nas análises. Essa abordagem já havia sido proposta por Hennig há muito tempo, que acreditava que um único conjunto de dados, tal qual uma região do genoma, não pode ser capaz de explicar toda a complexidade envolvida no processo evolutivo dos seres vivos (WHEELER *et al.*, 2013). Portanto, quanto maior o número de

informações exploradas em análises filogenéticas melhor será a hipótese filogenética, mesmo que hajam incongruências entre os diferentes conjuntos de dados. Talvez por isso o sequenciamento de genomas cloroplastidiais se tornou bastante utilizado em estudos evolutivos com plantas, pois disponibiliza uma quantidade de dados muito maior em comparação com sequências específicas de DNA (YANG *et al.*, 2013; DANIELL *et al.*, 2016), obtidas com o método de sequenciamento Sanger (SANGER & COULSON, 1975).

O sequenciamento do genoma do cloroplasto é realizado com a finalidade de descrever sua estrutura e composição gênica para um determinado grupo taxonômico, e a partir disso encontrar regiões mais informativas para auxiliar estudos filogenéticos. Por exemplo, Luo e colaboradores (2014) sequenciaram o genoma de *Dendrobium officinale* Kimura & Migo e de *Cypripedium macranthos* Sw. e definiram os melhores marcadores para a subfamília Epidendroideae (Orchidaceae). Perini e colaboradores (2014) fizeram o mesmo para a subtribo Laeliinae a partir do genoma de *Cattleya crispata* (Thunb.) Van den Berg, enquanto que Reginato e colaboradores (2016) descreveram a estrutura geral do genoma de Melastomataceae. Wang (2017) e Menezes (2018) e colaboradores o fizeram para a subfamília Mimosoideae (Fabaceae) e para o gênero *Byrsonima* Rich. ex Kunth (Malpighiaceae), respectivamente.

Além disso, a sequência completa de genomas do cloroplasto também tem sido utilizadas em filogenias, aumentando a resolução de clados de baixo nível taxonômico (PARKS *et al.*, 2009) e apresentando variação molecular suficiente para a separação entre espécies e até entre indivíduos de uma mesma espécie (WU *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2013). Com isso, está previsto um aumento vertiginoso do uso de sequenciamento de genomas em trabalhos filogenéticos.

No cenário atual, muito trabalho nessa área precisa ser realizado na subtribo Pleurothallidinae. A partir de uma pesquisa realizada no banco de dados do GenBank por genomas já sequenciados de orquídeas foi verificado que apenas dois (Tabela 1), foram publicados para a subtribo, indicando uma profunda lacuna de conhecimento acerca da biologia molecular do grupo.

Diante do exposto, o presente trabalho visa concatenar diferentes conjuntos de dados moleculares e reuni-los com dados morfológicos para realizar a primeira filogenia de evidência total da subtribo Pleurothallidinae, com

ênfase no gênero *Anathallis*. Além disso, através de uma análise de tempo de divergência por datação molecular comparar as idades estimadas para os clados de Pleurothallidinae neste trabalho com a literatura, tendo em vista a reunião de um conjunto maior de dados moleculares. Também objetiva publicar a sequência completa do genoma cloroplastidial de *Anathallis obovata* (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase, espécie-tipo do gênero.

**Tabela 1:** Lista de genomas cloroplastidiais da família Orchidaceae disponíveis no banco de dados do GenBank. Gêneros de Pleurothallidinae estão evidenciados em vermelho.

SUBFAMÍLIA	TRIBO	SUBTRIBO	GÊNERO	QUANTIDADE
Apostasioideae	-	-	<i>Apostasia</i>	2
Cypripedioideae	Cypripedioideae	-	<i>Cypripedium</i>	3
		-	<i>Paphiopedilum</i>	3
	Phragmipedioideae	-	<i>Phragmipedium</i>	1
Epidendroideae	Arethuseae	Coelogyninae	<i>Bletilla</i>	2
			<i>Pleione</i>	1
		Sobraliinae	<i>Sobralia</i>	2
		Cymbidieae	Cymbidiinae	<i>Cymbidium</i>
	Oncidiinae		<i>Erycina</i>	1
		<i>Oncidium</i>	2	
	Dendrobideae	Dendrobiinae	<i>Dendrobium</i>	33
	Epidendrae	Collabiae	<i>Calanthe</i>	1
		Laeliinae	<i>Cattleya</i>	2
		<b>Pleurothallidinae</b>	<b><i>Masdevallia</i></b>	<b>2</b>
	Epipogieae	Epipogiinae	<i>Epipogium</i>	1
	Malaxidae	Malaxidinae	<i>Liparis</i>	1
			<i>Oberonia</i>	1
	Maxillariae	Corallorhizinae	<i>Corallorhiza</i>	6
	Neottieae	Limodorinae	<i>Aphyllorchis</i>	1
			<i>Cephalanthera</i>	2
			<i>Epipactis</i>	2
		Listerinae	<i>Listera</i>	1
	Neottinae	<i>Neottia</i>	6	
	Sobralieae	Sobraliinae	<i>Elleanthus</i>	1
Vandeae	Aeridinae	<i>Gastrochilus</i>	2	
		<i>Neofinetia</i>	2	
		<i>Pelatantheria</i>	1	
		<i>Phalaenopsis</i>	3	
		<i>Thrixspermum</i>	1	
Orchidoideae	Cranichideae	Goodyerinae	<i>Anoectochilus</i>	1
			<i>Goodyera</i>	4
			<i>Ludisia</i>	1
	Diurideae	Rhizanthellinae	<i>Rhizanthella</i>	1
Orchideae	Orchidinae	<i>Habenaria</i>	2	
Vanilloideae	Vanilleae	Vanillinae	<i>Vanilla</i>	3

Mais especificamente, este trabalho tem a finalidade de comparar os resultados obtidos das análises filogenéticas entre os diferentes conjuntos de dados e deles combinados. Bem como realizar uma reconstrução histórica dos

caracteres morfológicos utilizando o método de Máxima Parcimônia, e analisar graficamente as apomorfias e homoplasias encontradas a fim de identificar linhagens com possíveis sinapomorfias ou conjunto diagnóstico de homoplasias. Por fim, analisar a sequência genômica de *Anathallis obovata* com o intuito de descrever a composição e a organização gênica, comparando-as com genomas de táxons próximos.

Dessa forma, esta dissertação foi desenvolvida em dois capítulos:

CAPÍTULO 1: Abordagem de evidência total em *Anathallis* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) reforça polifiletismo e indica artificialidade de grupos morfológicos.

CAPÍTULO 2: *Complete chloroplast genome of Anathallis obovata* (Orchidaceae: Pleurothallidinae).

## CAPÍTULO 1

Abordagem de evidência total em *Anathallis* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) reforça polifiletismo e indica artificialidade de grupos morfológicos.

*A total evidence approach in Anathallis (Orchidaceae: Pleurothallidinae) reinforces polyphyletism and indicates artificiality of morphological groups.*

Anna Victoria S.R. Mauad<sup>a,\*</sup>, A.L.V. Toscano de Brito<sup>b</sup> e Eric C. Smidt.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Caixa Postal 19031, 81530-900, Curitiba, Paraná, Brazil;

<sup>b</sup> Marie Selby Botanical Gardens, 811 South Palm Avenue, Sarasota, Florida 34236, USA. Orchid Herbarium of Oakes Ames, Harvard University Herbaria, 22 Divinity Avenue, Cambridge, Massachusetts 20138, USA.

\*Corresponding author. E-mail address: [annavmauad@gmail.com](mailto:annavmauad@gmail.com)

Manuscrito formatado para a revista Cladistics. eISSN 1096-0031.

## Resumo

*Anathallis* é um gênero da subtribo Pleurothallidinae com cerca de 150 spp. classificadas em 4 grupos morfológicos: Acuminatae, Alatae, Margaritifera e Panmorphia. Estudos filogenéticos anteriores indicaram o polifiletismo desse gênero, porém não foi verificado até o momento se os grupos morfológicos são monofiléticos. Aqui, nós usamos abordagens de evidência total e de datação molecular com uma maior representatividade taxonômica do gênero para ajudar na compreensão sobre suas relações filogenéticas no contexto da subtribo Pleurothallidinae. Nós concatenamos 39 caracteres morfológicos e ~7 kb de dados moleculares dos genomas nuclear e cloroplastidial, abrangendo 8 dos 9 grupos de Pleurothallidinae. As árvores filogenéticas resultantes de máxima parcimônia e de inferência Bayesiana suportam a manutenção dos grupos. Nós confirmamos o polifiletismo de *Anathallis*, porém não foi possível estabelecer relações filogenéticas claras entre os grupos morfológicos. Há fortes evidências de que eles são polifiléticos, com exceção de *Margaritifera*, que compõe *Anathallis* s.s., e de *Acuminatae*, que está mais relacionada ao gênero *Stelis*. As análises de datação indicaram que *Anathallis* s.s. surgiu há ~8 Ma, no Mioceno tardio, e pela distribuição geográfica das espécies mais basais inferimos que seja originário da América Central.

## Introdução

Pleurothallidinae é uma subtribo da família Orchidaceae com mais de 5.000 espécies em 44 gêneros de distribuição neotropical (Karremans, 2016). Na última revisão taxonômica realizada para o grupo (Luer, 1986a), foram definidas as seguintes sinapomorfias: caule secundário sem pseudobulbo e unifoliado (ramicaule), e presença de uma articulação entre o ovário e o pedicelo. No mesmo ano, Luer apresentou possíveis relações entre os subgêneros de *Pleurothallis* R.Br. e os demais gêneros de Pleurothallidinae, separando-os em três grupos informais, denominados afinidades, com base principalmente na presença de ânulo e na posição da antera: *Acianthera*, *Specklinia* e *Pleurothallis* (Luer, 1986b)

Na monografia do gênero *Pleurothallis*, Luer (1986b) reconheceu 29 subgêneros e 22 seções no gênero, adotando o mesmo posicionamento de Lindley (1859) em não desmembrá-lo devido às inúmeras interrelações existentes entre os subgêneros (Luer, 1986b), porém reconhecendo que se trata de um grupo polifilético. Isso se deve à falta de caracteres diagnósticos na subtribo por conta da grande variedade morfológica das espécies, que carrega muitas homoplasias em decorrência, principalmente, da adaptação ao hábito epifítico (Pridgeon, 1982a, 1982b; Neyland e Urbatsch, 1995). Essa grande ocorrência de homoplasias é a principal razão pela qual caracteres morfológicos não foram incorporados em filogenias moleculares de Pleurothallidinae (Pridgeon e Chase, 2003).

No primeiro trabalho de filogenia molecular para a subtribo, Pridgeon *et al.* (2001) concluíram que ela é monofilética, mas que deveria incluir os gêneros *Dilomilis* Raf. e *Neocogniauxiana* Schltr. Também verificaram o polifiletismo de *Pleurothallis*, o que culminou no restabelecimento de gêneros antigos (Pridgeon e Chase, 2001; Pridgeon, 2005), alterando profundamente a sistemática de Pleurothallidinae. Dentre as mudanças

taxonômicas está o restabelecimento do gênero *Anathallis* Barb.Rodr. (Pridgeon e Chase, 2001; Pridgeon, 2005), até então reconhecido como *Pleurothallis* subgênero *Acuminatia* (Lindl.) Luer (Luer, 1999), com a reunião desse grupo com espécies de *Pleurothallis* subgênero *Specklinia* (Lindl.) Garay seção *Muscosae* Lindl. (Pridgeon *et al.*, 2001).

*Anathallis* foi descrito pela primeira vez por Barbosa Rodrigues em 1877, tendo *A. obovata* (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase como espécie-tipo, caracterizado pela presença de ânulo, pela inflorescência lateral e pelas flores com sépalas similares entre si e livres, com pétalas pequenas de margem inteira e com o pé da coluna bem desenvolvido, se estendendo para além do limite do ovário (Barbosa Rodrigues, 1877; Luer, 1999; Luer, 2006). Atualmente compreende cerca de 150 espécies (Chase *et al.*, 2015), que podem ser encontradas desde o nordeste do México até o sul da Argentina, passando por toda a América do Sul (Pridgeon e Chase, 2001). O Brasil abriga o maior número de espécies: 92 (67%), sendo 76 endêmicas do país (BFG – The Brazil Flora Group, 2015).

São reconhecidos quatro grupos morfológicos em *Anathallis*: *Acuminatae*, *Alatae*, *Margaritifera* e *Panmorphia*. As espécies de *Acuminatae* apresentam sépalas pubescentes na face abaxial, pétalas com o ápice bastante obtuso ou arredondado, coluna com asas vestigiais ou ausentes e labelo caloso ou com lobos laterais (Luer, 1999). Já as espécies de *Alatae* possuem sépalas glabras, pétalas com o ápice agudo, coluna com asas bem proeminentes e quase retangulares, e labelo simples com um canal raso ao longo da nervura mediana (Luer, 1999). O grupo *Margaritifera* é bastante semelhante morfológicamente ao grupo *Alatae*, porém de forma singular possui tricomas esféricos ao longo da nervura mediana do labelo (Santos, 2017). Por fim, o grupo *Panmorphia*, o mais variável morfológicamente, se difere dos demais pelo ramicaule congesto, sendo menor do que a folha, pelas sépalas laterais conadas em diferentes níveis, e por apresentar dois pequenos lóbulos na base do labelo (Luer, 2002, 2006)

Apesar desses grupos serem bem caracterizados morfológicamente, *Anathallis* é um gênero polifilético. Isso porque as espécies do grupo Acuminatae parecem estar mais relacionadas ao gênero *Stelis* Sw. (Chiron *et al.*, 2012; Karremans *et al.*, 2013), e algumas do grupo Panmorphia formam um gênero próprio denominado *Lankesteriana* Karremans (Karremans, 2014).

As espécies remanescentes de *Anathallis* formam um grupo monofilético nos estudos moleculares de Chiron *et al.* (2012), de Karremans (2014; *et al.*, 2013), e por isso serão tratadas aqui como *Anathallis* strictu sensu. No entanto, esses autores amostraram poucos táxons e exploraram poucos conjuntos de dados (basicamente o sequenciamento da região nrITS). Além disso, a morfologia não foi incluída nessas análises filogenéticas. Com isso, o polifiletismo de *Anathallis* não foi realmente comprovado nem amplamente aceito (Chase *et al.*, 2015), e também não foi estudado até o momento se os grupos morfológicos de *Anathallis* são monofiléticos.

Não apenas em *Anathallis*, mas a taxonomia de Pleurothallidinae a nível genérico vem sendo constantemente reavaliada por estudos moleculares visando grupos mais específicos (e.g. *Acianthera* (Chiron e Van den Berg, 2011; Karremans *et al.*, 2016b), *Stelis* (Karremans *et al.*, 2013), *Specklinia* (Karremans *et al.*, 2016a), *Phloeophila* (Chiron *et al.*, 2016) e *Andinia* (Wilson *et al.*, 2017)). Com isso, as diferentes topologias resultantes de alguns desses estudos foram reunidas por Karremans (2016) para representar uma classificação atualizada dos gêneros da subtribo. Com base nas relações filogenéticas indicadas, os grupos artificiais (afinidades) propostos por Luer foram atualizados: agora os gêneros da subtribo (*Dilomilis* e *Neocogniauxiana* inclusos) foram acomodados em nove grupos: *Acianthera*, *Dilomilis*, *Lepanthes*, *Masdevallia*, *Octomeria*, *Pleurothallis*, *Phloeophila*, *Restrepia* e *Specklinia* (Karremans, 2016). O gênero *Anathallis*, assim como

*Lankesteriana*, pertencem ao grupo *Lepanthes*, enquanto que *Stelis* compõe o grupo *Pleurothallis* (Karremans, 2016).

Neste trabalho visamos ampliar a amostragem do gênero com a inclusão de um maior número de espécies, abrangendo todos os grupos morfológicos e incluindo suas respectivas espécies-tipo, e utilizar diferentes conjuntos de dados como o sequenciamento de regiões do genoma cloroplastidial e a codificação de caracteres morfológicos. Deste modo, avaliamos: (1) a organização dos principais gêneros da subtribo nos grupos informais propostos por Karremans (2016), (2) o polifiletismo de *Anathallis*, (3) o monofiletismo de *Anathallis* s.s., (4) a afinidade do grupo *Acuminatae* com *Stelis* e (5) o monofiletismo dos grupos *Acuminatae*, *Alatae*, *Panmorphia* e *Margaritifera*. Também realizamos datação molecular para (6) comparar as idades estimadas neste estudo com as de trabalhos anteriores, tendo em vista a reunião de maior quantidade de dados moleculares, além de (7) datar a origem e diversificação de *Anathallis*.

## **Metodologia**

### *Amostragem dos táxons*

Para a identificação das espécies de *Anathallis* foram utilizadas principalmente os trabalhos de Luer (1999, 2006), de Pridgeon (2005) e de Santos (2017). A organização dos gêneros da subtribo em grupos informais proposta por Karremans (2016) balizou a escolha dos demais táxons da subtribo, de forma que todos foram representados menos *Dilomilis*.

Foram amostradas 128 espécies de *Pleurothallidinae*, das quais 54 são de *Anathallis*. Com relação aos grupos morfológicos, foram utilizadas sete espécies de *Alatae* (~54%), cinco espécies de *Acuminatae* (~28%), três espécies de *Margaritifera*

(60%) e 38 espécies de Panmorphia (~40%), incluindo suas respectivas espécies-tipo (Fig. 1).

Para o grupo externo foram utilizadas *Cattleya coccinea* Lindl., *C. forbesii* Lindl., *Epidendrum armeniacum* L. e *E. tridactylum* Lindl., da subtribo Laeliinae, e *Bletia catenulata* Ruiz & Pav., da subtribo Bletiinae, seguindo a relação entre estes grupos de acordo com a última proposta filogenética para Orchidaceae (Chase *et al.*, 2015). As informações sobre os táxons com seus respectivos *vouchers*, números de acesso do GenBank e nome do autor da espécie estão no material suplementar (Apêndice 1).

#### *Extração de DNA, reações de amplificação e sequenciamento*

O DNA foi extraído a partir de 100 mg de material foliar fresco ou armazenado em gel de CTAB (Rogstad, 1992), utilizando o protocolo de 2x CTAB de Doyle e Doyle (1987), modificado pela não adição de RNase e escalonamento para 2 mL. Todas as amostras de DNA total extraído estão armazenadas em *ultrafreezer* a -80°C no Laboratório de Sistemática e Ecologia Molecular de Plantas (LSEMP) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

As amostras de DNA total foram submetidas a reações em cadeia de polimerase (PCRs) para amplificação dos fragmentos de interesse. Foi visada a região nuclear ribossomal ITS (nrITS) do genoma nuclear com os pares de *primers* 17SE e 26SE (Sun *et al.*, 1994) e 75 e 92 (Desfeaux *et al.*, 1996), e do genoma cloroplastidial foram amplificados parte do gene *matK* com os pares de *primers* 19F e 881R (Pridgeon *et al.*, 2001) e quatro espaçadores intergênicos com os pares de *primers* psbD e trnT\_GGU\_R (Shaw *et al.*, 2007), rps16x1 e trnQ\_UUG (Shaw *et al.*, 2007), trnHf\_05 (Tate, 2002) e psbA3\_f (Sang *et al.*, 1997) e trnS\_GCU e trnG\_UUC (Shaw *et al.*, 2005).

A programação do termociclador foi de pré-aquecimento a 94°C por 1 minuto, 40 ciclos das etapas de desnaturação a 94°C por 30 segundos, de anelamento a 51°C (nrITS)

ou a 53°C (cpDNA) por 40 segundos e de extensão a 72°C por 30 segundos, finalizando com uma etapa de extensão final a 72°C por 5 minutos. As informações relacionadas aos *primers* utilizados estão no material suplementar (Apêndice 2).

As PCRs visando regiões cloroplastidiais foram desenvolvidas a partir do kit *Top Taq™ Master Mix* (Qiagen). Foi utilizado do kit o corante *CoralLoad™* a 1x, o mix *Top Taq™* a 1x e a água ultrapura sem RNase, e foram adicionados os pares de *primers* a uma concentração de 0,2 µM cada um e de 20 a 50 ng de DNA total, com volume final de 20 µL.

Já as PCRs para a região nrITS foram realizadas com o kit *Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific). Foi utilizado do kit o tampão *PCR Buffer* a 1x, MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM e 0,025 U de *Platinum® Taq DNA Polymerase*, e foram adicionados dNTPs a 0,2 mM, *primers* a 0,2 µM cada, BSA a 0,08 mg/mL, DMSO a 0,08%, betaína a 1M, de 20 a 50 ng de DNA total e água ultrapura, com volume final de 20 µL.

Para a visualização do resultado das PCRs foram realizadas eletroforeses horizontais em gel de agarose 1% com GelRed™ 1x (Crisafuli *et al.*, 2015). A fonte foi ajustada para produzir uma corrente elétrica de 400 mA por 12 minutos a uma voltagem de 200 V. Os géis foram fotodocumentados por uma câmera acoplada a um transiluminador, com zoom de 3x, 6,05 de abertura da íris e 2,5 segundos de exposição à luz UV.

As amostras pós-PCR foram purificadas com polietilenoglicol 20% e etanol 80% mantido a -20°C (Paithankar e Prasad, 1991). Depois de purificadas, as amostras foram sequenciadas a partir do método de Sanger com kit *Big Dye Terminator* versão 3.1 (Applied Biosystems, California, USA) pela empresa MacroGen Inc. (<http://dna.macrogen.com>), especializada em serviços de biotecnologia.

### *Matrizes de alinhamento*

As sequências obtidas foram tratadas no programa Geneious v.7.1.3. (Kearse *et al.*, 2012), para obtenção dos consensos. Foram descartados os consensos com qualidade (HQ) menor que 60%. Além das sequências geradas neste trabalho outras de nrITS e de *matK* foram obtidas do banco de dados GenBank para complementar a amostragem (Apêndice 1).

Foram construídas matrizes de alinhamento utilizando a ferramenta MAFFT (Katoh e Standley, 2013), pela plataforma *online* CIPRES *Science Gateway* v.3.3 (Miller *et al.*, 2010), com o algoritmo Q-INS-i (Katoh e Toh, 2008). Esse algoritmo foi escolhido por considerar estruturas secundárias (*stem-loop regions e hairpins*), que são bastante comuns em regiões intergênicas (Kelchner, 2000). Dessa forma, as sequências são alinhadas de forma mais compatível com a maneira que essas regiões do genoma evoluem (Kelchner, 2000, Giudicelli *et al.*, 2017). Os alinhamentos foram combinados e convertidos para o formato NEXUS no programa SequenceMatrix (Vaidya *et al.*, 2010).

### *Morfologia*

Trinta e nove caracteres morfológicos multiestados não ordenados (tabela 2) foram selecionados com base nos atributos diagnósticos utilizados nas descrições genéricas e específicas da literatura, principalmente Barbosa Rodrigues (1877), Cogniaux (1896) e Luer (1986a, 1986b, 1987, 1988, 1990, 1991, 1992, 1994, 1996a, 1996b, 1997, 1998a, 1998b, 1999, 2000a, 2000b, 2002, 2004, 2005, 2006, 2007, 2009, 2010). Foi usada a proposta de de Pinna (1991) para estabelecer as homologias entre os estados de caráter, codificados de acordo com Sereno (2007). A matriz dos caracteres morfológicos (Apêndice 3) foi construída no programa Mesquite v3.04 (Maddison e Maddison, 2015). A terminologia dos caracteres e dos estados de caráter seguiram Stearn (2004). As apomorfias e homoplasias dos caracteres morfológicos foram mapeadas na árvore de

evidência total de Máxima Parcimônia no programa WinClada v1.00.08 (Nixon, 2002), com otimização ACCTRAN (Swofford e Maddison, 1987) (Fig. 2).

### *Análises filogenéticas*

As análises filogenéticas tiveram como entrada as matrizes de alinhamento da região nrITS, das quatro regiões do cpDNA, das cinco regiões moleculares combinadas e de evidência total, que combinou a matriz morfológica (Apêndice 3) com os dados moleculares. Todas as árvores resultantes foram editadas no programa FigTree v.1.4.3 (Rambaut, 2009) e no pacote de programas CorelDRAW<sup>®</sup>, v.18.0.0.448 (<http://www.coreldraw.com>).

As análises de Máxima Parcimônia (MP) seguiram o método de Fitch (1971) e foram desenvolvidas no programa PAUP v.4.0.b5 (Swofford, 2001). Foram realizadas buscas heurísticas com TBR, escolhido por ser considerado o melhor algoritmo permutador de ramos (Giribet, 2007), com 10.000 replicações e retenção de até duas árvores por replicação. Foram calculados os índices de consistência (CI) e de retenção (RI), e a porcentagem de clados resolvidos (*Component Information*). A estimativa do suporte de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), foi realizada também com TBR com 1.000 replicações. Foi realizado o consenso estrito quando obtidas múltiplas árvores igualmente parcimoniosas. Na tabela 1 estão as informações das buscas heurísticas feitas e as características de cada conjunto de dados testado.

Para as Inferências Bayesianas (IB) foi considerado o modelo evolutivo de cada região molecular resultante de busca com base no critério AICc realizada pelo PartitionFinder v.2.1.1 (Lanfear *et al.*, 2016), desenvolvido com a linha de comandos do PhyML v.3.0 (Guindon *et al.*, 2010). O modelo GTR+I+ $\Gamma$  foi escolhido para todas as seis regiões moleculares. Já para a matriz morfológica (standard data) foi pressuposto o

modelo MK, com codificação variável e distribuição  $\Gamma$ , conforme o manual do MrBayes ([http://mrbayes.sourceforge.net/mb3.2\\_manual.pdf](http://mrbayes.sourceforge.net/mb3.2_manual.pdf)).

As IB foram desenvolvidas no programa MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012) através do CIPRES. Foram feitas duas corridas de MCMC (Markov Chain Monte Carlo), de 10.000.000 gerações cada (20.000.000 no total), com amostragem de árvores a cada 10.000 gerações e *burn in* de 25%. Os arquivos .log gerados foram analisados no programa Tracer v.1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) para verificar se todos os parâmetros de fato atingiram a convergência dado o número de gerações estimadas. Por isso esse número precisou ser aumentado para 30.000.000 de gerações para as matrizes das seis regiões moleculares combinadas e de evidência total e para 50.000.000 para a matriz das regiões de cpDNA. Probabilidades posteriores inferiores a 0,95 não foram mostradas nas filogenias.

#### *Análise de datação molecular*

Para a análise de tempo de divergência por datação molecular foi empregado o método do relógio molecular relaxado com distribuição lognormal (Drummond *et al.*, 2006). O arquivo de entrada foi a matriz das seis regiões moleculares combinadas, que não foi particionada devido ao modelo evolutivo GTR+I+ $\Gamma$  se aplicar à todas as regiões moleculares, de acordo com os resultados obtidos do PartitionFinder.

Todos os parâmetros foram ajustados no programa BEAUTi (Drummond *et al.*, 2012). Os pontos de calibração foram provenientes do trabalho de Chomicki *et al.* (2014). Foram utilizados para a calibração dos ramos a idade da subtribo Bletiinae (média de 25.68 Myr, 95% Highest Posterior Density interval (HPD): 19.27–32.09), a cladogênese entre as subtribos Laeliinae e Pleurothallidinae (média de 24.75 Myr, 95% HPD: 18.34–31.16) e a idade estimada de Pleurothallidinae (média de 20.96 Myr, 95% HPD: 15.04–26.88), todas com distribuição normal. Por conta da grande diferença de amostragem

dentro de Pleurothallidinae e entre ela e o grupo externo, os grupos formados pelas espécies de Pleurothallidinae e o grupo referente à Pleurothallidinae + Laeliinae foram indicados como monofiléticos. A filogenia datada partiu de uma árvore aleatória, montada seguindo o modelo de especiação de Yule (Yule, 1925; Gernhard, 2007), escolhido por se tratar de divergências a nível específico.

Para a cadeia de MCMC foram estimadas 100.000.000 gerações, com árvores amostradas a cada 10.000. A análise de datação molecular foi desenvolvida no programa BEAST v.1.8.4 (Drummond *et al.*, 2012) através do CIPRES. O arquivo .log gerado foi analisado no programa Tracer para a verificação da convergência dos parâmetros.

O conjunto final de árvores obtidas sofreu um *burn in* de 25%, e a partir das restantes foi obtida a Árvore de Máxima Credibilidade de Clados no programa TreeAnnotator (Drummond *et al.*, 2012), que também foi editada nos programas FigTree v.1.4.2 e CorelDRAW<sup>®</sup>.

## Resultados

### *Reconstrução dos caracteres morfológicos*

A reconstrução dos caracteres morfológicos (Fig. 2) indicou que as características codificadas são homoplásticas, com exceção de dezoito estados de caráter. Destes, oito representam autapomorfias de *Bletia catenulata* (caráter nº 2, estado nº 2; caráter nº 35, estado nº 5), *Epidendrum tridactylum* (caráter nº 13, estado nº 3; caráter nº 14, estado nº 4), *Cattleya coccinea* (caráter nº 2, estado nº 1), *Brachionidium valerioi* (caráter nº 21, estado nº 7), *Barbosella australis* (caráter nº 35, estado nº 4) e *Phloeophila pleurothallopsis* (caráter nº 16, estado nº 2).

Os outros dez são sinapomórficos, sendo: um da subtribo Pleurothallidinae (caráter nº 35, estado nº 1), dois do gênero *Brachionidium* (caráter nº 35, estado nº 7;

caráter nº 39, estado nº 2), um do gênero *Restrepia* (caráter nº 13, estado nº 4), um do clado dos grupss *Lepanthes*, *Masdevallia*, *Pleurothallis*, *Phloeophila* e *Specklinia* (caráter nº 5, estado nº 1), um de *Stelis* s.s. (caráter nº 32, estado nº 4), um do gênero *Zootrophion* (caráter nº 16, estado nº 3), um do gênero *Lepanthes* (caráter nº 35, estado nº 5) e um do grupo *Margaritifera* de *Anathallis* s.s (caráter nº 30, estado nº 1).

### *Filogenias*

Foram geradas 542 sequências inéditas para este trabalho, o que representa 95,4% da matriz final. As árvores de evidência total resultantes das análises de MP (Fig. 3) e de IB (Fig. 4), foram as escolhidas para a discussão deste trabalho devido à melhora na resolução das árvores filogenéticas com a inclusão dos dados morfológicos, como exposto na tabela 1. As demais árvores produzidas neste estudo estão disponíveis no material suplementar (Apêndice 4-9). Foram observadas contradições nas análises das partições individuais, porém não serão pontuadas por não apresentarem suporte estatístico.

A subtribo *Pleurothallidinae* apareceu como monofilética e com alto suporte em todas as análises, e seus grupos apresentaram resolução satisfatória exceto nas filogenias baseadas somente nos dados de DNA cloroplastidial (Apêndice 6 e 7).

- Grupo Octomeria: gêneros *Brachionidium* Lindl. e *Octomeria* R.Br., *Madisonia kerrii* e *Sansonia bradei*. Apareceu como polifilética, visto que *Brachionidium* forma um clado isolado (Porcentagem de *bootstrap* (PB)= 96; Probabilidade Posterior (PP)= 1), que de modo geral ocupa a posição mais basal na subtribo, seguido pelo agrupamento *Octomeria* + *Madisonia* + *Sansonia* (Fig. 3 e 4).

- Grupo Restrepia: gêneros *Barbosella* Schltr., *Myoxanthus* Poepp. & Endl. e *Restrepia* Kunth, *Pleurothallopsis nemorosa*, e *Restrepiella ophiocephala*. Em todas as análises em que os dados dos genomas nuclear e cloroplastidial foram combinados o grupo ficou monofilético e com bom suporte estatístico na IB (PP= 0,96) (Fig. 3 e 4).

- Grupo Acianthera: gênero *Acianthera* Scheidw. Aparece como monofilética, porém o posicionamento de *Acianthera* na subtribo teve bastante variação entre as análises. Na IB de evidência total (Fig. 4) o gênero *Acianthera* aparece como irmão do grupo *Restrepia*, e na MP de evidência total (Fig. 3) o gênero está como grupo-irmão de um grande clado formado pelos grupos *Lepanthes*, *Masdevallia*, *Pleurothallis*, *Phloeophila* e *Specklinia*.

- Grupo Specklinia: gêneros *Andinia* (Luer), *Dryadella* Luer, *Platystele* Schltr., *Scaphosepalum* Pfitzer e *Specklinia* Lindl. Manteve-se polifilético, pois o gênero *Andinia* forma um clado isolado mais relacionado ao grupo *Pleurothallis*. Esse gênero aparece na base ou como grupo-irmão do clado de *Stelis* s.l. (Fig. 3 e 4). Os demais gêneros do grupo formam um clado em todas as filogenias e aparecem como monofiléticos (PP= 1), com exceção de *Specklinia*.

- Grupo Masdevallia: gênero *Masdevallia* Ruiz & Pav. Em todas as filogenias é monofilético, mas seu posicionamento na subtribo varia muito entre as análises. IB de evidência total (Fig. 4) aparece como irmão do grupo *Specklinia*, enquanto que na MP de evidência total (Fig. 3) está como grupo-irmão do grupo *Lepanthes*.

- Grupo Phloeophila: gênero *Phloeophila* Hoehne & Schltr. É monofilético, porém com baixo suporte na IB (Fig. 4), e polifilética na análise de MP (Fig. 3). Parece estar relacionado ao grupo *Pleurothallis*, porém na MP *P. nummularia* apareceu como grupo-irmão de *Masdevallia*, no entanto sem suporte.

- Grupo Pleurothallis: gêneros *Pabstiella* Brieger & Senghas, *Pleurothallis* R.Br. e *Stelis* s.l. (gêneros *Crocodeilanthe* Rehb. f. & Warsz., *Dracontia* Salisb., *Effusiella* Luer, *Stelis* Sw. e *Uncifera* Lindl.), *Condylago rodrigoii*, *Mystacorchis mystax* e *Physothallis harlingii*. Apareceu como parafilético nas análises devido à inclusão de *Andinia* como grupo-irmão de *Stelis* s.l., mas obteve bom suporte na IB (Fig. 4) (PP= 1).

O clado *Stelis* s.l. (PP= 0,99) apresentou grande variação no nível de resolução interna e também na composição de seus subclados, mas foi possível identificar um certo padrão na topologia do grupo: (1) em todas as análises os gêneros *Dracontia* (PB= 86; PP= 0,99) e *Uncifera* (PB= 100; PP= 1) apareceram como monofiléticos, e juntamente com o gênero *Effusiella*, *Condylago rodrigo* e *Mystacorchis mystax* compuseram a base do clado. (2) O grupo Acuminatae do gênero *Anathallis* ficou incluso no clado de *Stelis* s.l. em todas as análises, formando um clado nas de evidência total (Fig. 3 e 4), porém sem suporte. (3) As espécies de *Stelis* s.s. formaram um agupamento separado das demais espécies de *Stelis* s.l., (PB= 74; PP= 1), sendo que somente na IB de nrITS+cpDNA (Apêndice 9) incluiu o gênero *Crocodeilanth*e e o grupo Acuminatae devido ao posicionamento de *Stelis aprica* e *S. papaquerensis* na base do agrupamento entre *Stelis* s.s. e estes subclados (PP= 1).

- Grupo Lepanthes: gêneros *Anathallis*, *Lankesteriana*, *Lepanthes* Sw., *Lepanthopsis* (Cogn.) Ames, *Trichosalpinx* Luer e *Zootrophion* Luer, e *Fronitaria caulescens* (Lindl.) Luer. É monofilético em todas as análises (PP= 1), bem como os gêneros *Lankesteriana* (PB= 83; PP= 1), *Lepanthes* (PB= 100; PP= 1) e *Lepanthopsis* (PB= 78; PP= 1). *Fronitaria caulescens* aparece agrupada com *Trichosalpinx montana* e com os gêneros *Lepanthes* e *Lepanthopsis* (PB= 90; PP= 1). O gênero *Zootrophion* inclui *Trichosalpinx blaisdelii* em todas as análises (PB= 91; PP= 1). Já o gênero *Anathallis* é polifilético por conta da inclusão do grupo Acuminatae em *Stelis* s.l. em todas as filogenias.

As espécies de *Anathallis* s.s. formam um clado em todas as análises (PP= 1), embora não haja resolução satisfatória de seus nós internos. *A. minutalis* e *A. sertularioides* (grupo Panmorphia) apareceram sempre na base do clado, e foram seguidos pelo agrupamento entre *A. burzlaffiana*, *A. grayumii*, *A. pachyphyta*, *A. luteola* e *A.*

*welterii* (grupo Panmorphia) e *A. gerthatschbachii* e *A. obovata* (grupo Alatae) nas análises. Os demais agrupamentos formados em *Anathallis* s.s. ficaram em politomia e também reuniram espécies do grupo Alatae e do grupo Panmorphia. Somente o grupo Margaritifera formou um clado distinto nas análises (PB= 100; PP= 1).

#### *Datação molecular*

A idade estimada de Bletiinae foi de 22,24 Ma (20,71±30,65), a de Laeliinae 6,17 Ma (3,54±10,43) e a de Pleurothallidinae 16,6 Ma (16,07±24,26) (Fig. 5). Assim, a origem e a diversificação de Pleurothallidinae ocorreram no período Mioceno (Fig. 5).

As estimativas indicaram que *Lankesteriana* surgiu há 9,04 Ma (7,76±13,37) e *Anathallis* s.s. há 9,14 Ma (8,02±13,24), durante o período Mioceno (Fig. 5), com diversificação há 4,96 Ma (4,76±7,93), no período Plioceno. O grupo *Acuminatae* também teve origem no período Plioceno, há 4,38 Ma (2,76±5,39) (Fig. 5).

## **Discussão**

### *Pleurothallidinae*

As análises resultaram em topologias semelhantes ao que foi proposto por Karremans (2016), que fez um compilado dos resultados obtidos por trabalhos filogenéticos anteriores em Pleurothallidinae (Neyle e Urbatsch, 1995; Pridgeon *et al.*, 2001; Chiron *et al.*, 2012; Karremans *et al.*, 2013; Karremans, 2014). A estruturação dos principais gêneros da subtribo nos grupos Acianthera, Lepanthes, Masdevallia, Octomeria, Phloeophila, Pleurothallis e Specklinia (Karremans, 2016) é aqui, pela primeira vez, testada através de dados nucleares, cloroplastidiais e morfológicos, e também é apresentado um suporte para alguns desses grupos. Foram encontradas incongruências, que se referem ao posicionamento do gênero *Andinia* e dos grupos Acianthera e Masdevallia, e ao polifiletismo dos grupos Octomeria e Phloeophila.

De acordo com Karremans (2016) e Wilson *et al.* (2017), o gênero *Andinia* é grupo-irmão do grupo Specklinia. Neste trabalho apareceu como grupo-irmão de *Stelis* s.l. (Fig. 3 e 4), uma topologia mais favorável a Pridgeon *et al.* (2001) e Chiron *et al.* (2012, 2016), que posicionam *Andinia* mais próximo do grupo Pleurothallis. No entanto, o baixo suporte estatístico e morfológico dessa relação filogenética nas análises de evidência total indica a necessidade de maiores estudos no grupo para a obtenção de uma topologia mais consistente. É importante ressaltar que em Wilson *et al.* (2017) o relacionamento entre *Andinia* e o grupo Specklinia só teve suporte quando o grupo Pleurothallis não foi amostrado, sugerindo que o posicionamento desse gênero na subtribo ainda está incerto.

*Acianthera* não apresentou um posicionamento filogenético bem definido, ficando como grupo-irmão do grupo Restrepia na IB (Fig. 4), assim como foi observado por Chiron *et al.* (2012). Já na MP (Fig. 3) ficou como grupo-irmão dos grupos Lepanthes, Masdevallia, Pleurothallis, Phloeophila e Specklinia, reunidos em um clado com a sinapomorfia presença de ânulo (Fig. 2), corroborando Pridgeon *et al.* (2001) e Karremans (2016). O mesmo ocorre com *Masdevallia*, que na IB (Fig. 4) é grupo-irmão do grupo Specklinia, uma topologia mais favorável à literatura (Pridgeon *et al.*, 2001; Chiron *et al.*, 2012; Karremans, 2016), mas na MP (Fig. 3) está relacionada ao grupo Lepanthes. No entanto, novamente, não foi obtido suporte estatístico suficiente nas análises para definir o posicionamento de *Acianthera* e de *Masdevallia* de maneira consistente.

*Madisonia kerrii*, até então *incertae sedis* (Luer, 2006; Luer e Toscano, 2012; Karremans, 2016), apareceu estreitamente relacionada à *Sansonia bradei* (PB= 92; PP= 1), do grupo Octomeria (Fig. 3 e 4). Apesar de possuir somente duas políneas, ao contrário dos demais representantes do grupo que possuem seis ou oito (Karremans, 2016), *Madisonia kerrii* assemelha-se com *Sansonia bradei* por apresentar rizoma reptante, flores solitárias, sépalas lanceoladas e pétalas ovadas de ápice agudo (Fig. 2). Já o gênero

*Brachionidium*, que originalmente pertence ao grupo Octomeria (Karremans, 2016), neste trabalho formou um clado distinto e ocupou a posição mais basal na subtribo (PB= 96; PP= 1), dessa forma contrariando também os resultados obtidos por Pridgeon *et al.* (2001) e Chiron *et al.* (2012), que posicionaram o gênero próximo aos gêneros *Myoxanthus* e a *Phloeophila*, respectivamente.

O gênero *Phloeophila* aparece como monofilético no trabalho de Chiron *et al.*, (2016) com base em dados de nrITS. Porém, neste trabalho, o monofiletismo desse gênero não apresenta bom suporte estatístico na IB, e não ocorre na MP (Fig. 3). Pelo contrário, o polifiletismo é reforçado estatisticamente e morfológicamente.

*Phloeophila nummularia*, a espécie-tipo do gênero, apresenta hábito reptante, ramicaule bem menor do que a folha oblonga e granulosa, flor solitária com as sépalas ciliadas e pubescentes, as laterais quase completamente conadas a partir da base, a dorsal conada às laterais na base, pétalas lanceoladas e agudas, e labelo sub-trilobado com ápice arredondado a truncado, emarginado, e de base obtusa (Luer, 2006). Já *P. pleurothallopsis* pertencia ao gênero *Ophidion* Luer, e em contraste com *P. nummularia* apresenta hábito cespitoso, ramicaule maior que a folha glabra e lanceolada, inflorescência em racemo com antese sucessiva, flores com sépalas glabras, as laterais completamente conadas em sinsépalo e a dorsal conada às laterais no ápice, pétalas obovadas e agudas, e labelo trilobado com ápice obtuso a arredondado, inteiro, de base truncada (Luer, 2004). Ante o exposto, apesar das poucas amostras do gênero utilizadas, nossos resultados indicam que o gênero *Ophidion* pode representar um grupo distinto de *Phloeophila*, e que portanto pode vir a ser restabelecido em trabalhos futuros.

O gênero *Specklinia* também não se mostrou monofilético nas nossas análises (Fig. 3 e 4). *Specklinia megalops* pertencia ao gênero *Muscarella* Luer, e ficou como grupo-irmão do subclado do grupo *Specklinia* composto pelos gêneros *Specklinia*, *Platystele* e

*Scaphosepalum* (Fig. 3 e 4). Essa topologia também foi obtida por Karremans *et al.* (2016), utilizando uma amostragem bem mais robusta do grupo, e reforça o restabelecimento do gênero *Muscarella*.

Os gêneros *Anathallis*, *Lankesteriana* e *Stelis* s.l.

O gênero *Anathallis* ficou polifilético nas análises, visto que todas as cinco espécies amostradas do grupo *Acuminatae* ficaram inseridas no clado referente a *Stelis* s.l. (Fig. 3 e 4). Esses resultados corroboram dados iniciais da literatura (Chiron *et al.*, 2012; Karremans *et al.*, 2013) que levaram em conta quatro espécies do grupo e não amostraram a espécie-tipo de *Acuminatae*, *Anathallis acuminata*.

O clado de *Stelis* s.l. reúne vários gêneros antigos menores e o grupo *Acuminatae*, que foram sinonimizados em *Stelis* por Pridgeon *et al.*, 2001, o que foi reforçado por Karremans *et al.* (2013), com base em dados moleculares das regiões nrITS e parcialmente do *matK*. Em nossos resultados, houve a formação de agrupamentos bem suportados referentes a alguns desses gêneros, que remontam à topologia obtida por Karremans *et al.* (2013), porém agora com maior suporte pela reunião de dados morfológicos e sequenciamento de mais regiões moleculares para algumas espécies.

As espécies do grupo *Acuminatae* formaram um clado porém com baixo suporte, caracterizado pela formação de mentum, pelas sépalas pubescentes, pelas pétalas com o ápice arredondado e pelo labelo obovado (Fig. 2, 3 e 4). O monofiletismo do grupo foi estabelecido pela primeira vez neste trabalho, com a amostragem inédita de *A. acuminata* e com o sequenciamento de seis regiões moleculares, além da utilização da informação contida na morfologia.

Karremans *et al.* (2013) haviam proposto a sinonimização do grupo *Acuminatae* em *Stelis* por conta da inclusão das espécies desse grupo em *Stelis* s.s., o que não ocorreu neste estudo. Com isso, nossos resultados indicam que o grupo *Acuminatae* representa

um grupo natural. Estudos filogenéticos mais aprofundados em *Stelis* s.l., com a utilização de uma amostragem mais completa, podem restabelecer alguns gêneros antigos e, talvez, elevar o grupo Acuminatae ao nível de gênero.

As demais espécies de *Anathallis* apresentam inflorescências paucifloras com antese quase sempre sucessiva ou flores solitárias, diferenciando-se também morfológicamente do grupo Acuminatae, que apresenta inflorescências multifloras com antese simultânea. Elas pertencem ao grupo Lepanthes, como constatado em nossos resultados (Fig. 3 e 4) e na literatura (Karremans, 2014, 2016).

Também no grupo Lepanthes está o gênero *Lankesteriana*, criado a partir de espécies morfológicamente distintas do grupo *Panmorphia* com base em dados de nrITS (Karremans, 2014). Inicialmente não foi amplamente aceito por não ter apresentado suporte estatístico satisfatório (Chase *et al.*, 2015). Em nossos resultados, *Lankesteriana* aparece como grupo-irmão de *Anathallis* s.s., contrariando a topologia apresentada por Karremans (2014), na qual o gênero ocupa uma posição basal no grupo Lepanthes. Tal disposição reforça a inclusão de *Lankesteriana* em *Anathallis* (Chase *et al.*, 2015). Por outro lado, obtivemos suporte estatístico e morfológico suficientes para confirmar o monofilétismo de *Lankesteriana* e sua separação de *Anathallis*, visto que apresenta sépalas laterais conadas, labelo ciliado e a nervura mediana sulcada como principais características distintivas em relação a este gênero (Fig. 2).

#### *Grupos morfológicos de Anathallis s.s.*

As espécies que compõem *Anathallis* s.s. formam um grupo monofilético em ambas as análises de evidência total (Fig. 3 e 4), porém com suporte apenas na IB (PP= 1). Entretanto, apresentam pouca variação molecular entre si, ilustrada pelo pequeno comprimento dos ramos na IB (Fig. 4). Assim, mesmo com o sequenciamento de seis regiões moleculares, incluindo nrITS e *matK* que são regiões amplamente utilizadas em

filogenias de Orchidaceae (Neubig *et al.*, 2009), e os espaçadores *rps16-trnQ*<sup>(UUG)</sup> e *trnS*<sup>(GCU)</sup>-*trnG*<sup>(UCC)</sup> que são considerados *hotspots* mutacionais para a subfamília Epidendroideae (Niu *et al.*, 2017), além da codificação de atributos morfológicos, não foi possível estabelecer relações filogenéticas claras entre as espécies do gênero.

Mesmo assim, observamos a formação de pequenos grupos nas análises de MP e IB (Fig. 3 e 4), que consolidam o agrupamento *A. minutalis* + *A. sertularioides* na base do clado e o monofiletismo do grupo Margaritifera. Além disso, os demais grupos formados são compostos ou por apenas espécies do grupo Panmorphia ou misturam espécies dos grupos Panmorphia e Alatae (Fig. 3 e 4).

Portanto, apesar de as relações filogenéticas entre as espécies de *Anathallis* s.s. não terem sido completamente elucidadas a partir dos resultados deste estudo, acreditamos que seus grupos morfológicos Alatae e Panmorphia não são monofiléticos. A mistura entre espécies desses dois grupos indica que as diferenças morfológicas utilizadas historicamente como diagnósticas para estes grupos (Luer, 1999, 2006) possivelmente são resultantes de convergência evolutiva. Já o grupo Margaritifera apareceu como monofilético, que suas espécies apresentam a sinapomorfia tricomas esféricos ao longo da nervura mediana do labelo (Fig. 2).

#### *Idades estimadas*

As idades que obtivemos para os clados Bletiinae + Laeliinae + Pleurothallidinae, Laeliinae + Pleurothallidinae e Pleurothallidinae (Fig. 5) foram mais próximas das estimativas de Givnish *et al.* (2015) do que as de Chomicki *et al.* (2014) e de Pérez-Escobar *et al.* (2017), e reforçam o surgimento da subtribo Pleurothallidinae e de seus grandes clados no início do Mioceno. Nesta época a crescente aridez do planeta causou a retração das florestas, fazendo surgir as primeiras savanas (Beerling e Osborne, 2006). Isso pode explicar a grande riqueza de espécies não só da subtribo mas de toda a

subfamília Epidendroideae, que compreende grande parte das orquídeas epífitas, visto que o epifitismo foi favorecido nesse período pelo aumento da disponibilidade de nichos ecológicos em decorrência de extinções e ocupação das savanas (Gustafsson *et al.*, 2010; Freudenstein e Chase, 2015).

Devido ao posicionamento de *Brachionidium* como clado mais basal de Pleurothallidinae, e com base na distribuição geográfica do gênero (eMonocot, <http://e-monocot.org/>), nossos resultados reforçam a ideia de que os ancestrais da subtribo sejam provenientes da América Central (Pérez-Escobar *et al.*, 2017), apesar de inferências biogeográficas fugirem do escopo deste estudo.

As idades dos MRCA (*Most Recent Common Ancestor*) do grupo Acuminatae, de *Anathallis* s.s. e de *Lankesteriana* são compatíveis com as estimativas de Pérez-Escobar *et al.* (2017), e reforçam a separação desses três grupos. Isso porque o grupo Acuminatae tem origem muito mais recente (4,38 Ma) do que as demais espécies de *Anathallis* (aproximadamente 9 Ma).

Em *Anathallis* s.s., com base na distribuição geográfica de *A. minutalis* + *A. sertularioides* (eMonocot, <http://e-monocot.org/>), que representam a linhagem mais basal (Fig. 3, 4 e 5), sugerimos que o gênero teve origem em formações florestais da América Central, com posterior dispersão para a América do Sul. Também inferimos que a origem recente desse gênero, no final do Mioceno (há aproximadamente 9 Ma), somada à sua diversificação ainda mais recente (Fig. 5), pode ser a razão da baixa variação genética observada entre suas espécies. São necessários estudos biogeográficos para tentar compreender a grande variação morfológica das espécies de *Anathallis*, bem como o significado evolutivo de Alatae e Panmorphia não formarem agrupamentos monofiléticos apesar de serem bem delimitados morfológicamente.

Foram sequenciadas duas das três regiões consideradas *hotspots* mutacionais para a subfamília Epidendroideae - *trnS-trnG* e *rps16-trnQ* (Niu *et al.*, 2017), e mesmo assim não foi possível obter uma boa resolução dos nós internos em *Anathallis*, além do baixo comprimento dos ramos observado na IB (Fig. 4). Por outro lado, a codificação de 39 caracteres morfológicos auxiliou muito na resolução das filogenias, como pode ser verificado pelo grande aumento do *component information* na análise de evidência total em relação à análise da matriz de ntITS+cpDNA (Tabela 1).

A inclusão de caracteres morfológicos em análises moleculares em Pleurothallidinae não havia sido considerada até o momento devido ao elevado número de homoplasias (Pridgeon e Chase, 2003), que também foi observado neste estudo pelo baixo IC da análise morfológica (Tabela 1) e pela reconstrução de caracteres morfológicos (Fig. 2). No entanto, a inclusão da matriz morfológica não alterou significativamente o IC e o IR da análise de evidência total em relação à filogenia das regiões moleculares combinadas e aumentou a porcentagem de clados resolvidos.

Portanto, diante do baixo sinal filogenético do sequenciamento de regiões consideradas hipervariáveis e do aumento da informatividade com a inclusão de caracteres morfológicos homoplásticos fica evidente a necessidade de estudos mais aprofundados na subtribo, tanto taxonômicos e filogenéticos quanto genômicos para que, enfim, haja uma melhor compreensão sobre a dinâmica evolutiva desse grupo tão rico e fascinante de orquídeas.

## Referências

Barbosa Rodrigues, J. 1877. Genera et Species Orchidearum Novarum I. Sebastianopolis, pp. 23.

- Beerling, D.J., Osborne, C.P. 2006. The origin of the savanna biome. *Global Change Biol* 12, 2023–2031.  
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01239.x>
- BFG – The Brazil Flora Group. 2015. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66, 1085–1113
- Chase, M.W., Cameron, K.M., Freudenstein, J.V., Pridgeon, A.M., Salazar, G., Van den Berg, C., Schuiteman, A. 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 177, 151–174.
- Chiron, G.R., Guiard, J., Van den Berg, C. 2012. Phylogenetic relationships in Brazilian *Pleurothallis sensu lato* (Pleurothallidinae, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences. *Phytotaxa* 46, 34–58.
- Chiron, G.R., Karremans, A.P., Van den Berg, C. 2016. Nomenclatural notes in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): *Phloeophila*. *Phytotaxa* 270, 56–62.  
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.270.1.6>.
- Chomicki, G., Bidel, L.P.R., Ming, F., Coiro, M., Zhang, X., Wang, Y., Baissac, Y., Jay-Allemand, C., Renner, S.S. 2014. The velamen protects photosynthetic orchid roots against UV-B damage, and a large dated phylogeny implies multiple gains e losses of this function during the Cenozoic. *New Phytol.* 205, 1330–1341.
- Cogniaux, C.A. 1896. *Pleurothallis*. In: von Martius, C.F.P., Eichler, A.W., Urban, I. *Flora Brasiliensis* 3, pp. 377–593.
- Crisafuli, F.A.P., Ramos, E.B., Rocha, M.S. 2015. Characterizing the interaction between DNA e GelRed fluorescent stain. *Eur. Biophys. J.* 44, 1–7.
- Desfeaux, C., Maurice, S., Henry, J.P., Lejeune, B., Gouyon, P.H. 1996. Evolution of reproductive system in the genus *Silene*. *Proc. Royal Soc. Lond.* 263, 409–414.

- Doyle, J., Doyle, J., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 810–815.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W, Phillips, M.J., Rambaut, A. 2006. Relaxed Phylogenetics e Dating with Confidence. *PLoS Biol.* 4, e88.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040088>.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti e the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969–1973.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach to using bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Fitch, W.M. 1971. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20, 406–416.
- Freudenstein, J.V., Chase, M.W. 2015. Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization e diversification. *Ann. Bot.* 115, 665–681.
- Gernhard, T. 2008. The conditioned reconstructed process. *J. Theor. Biol.* 253, 769–778.
- Giribert, G. 2007. Efficient tree searches with available algorithms. *Evol. Bioinform. Online* 3, 341–356.
- Giudicelli, G.C., Mäder, G., Silva-Arias, G.A., Zamberlan, P.M., Bonatto, S.L., Freitas, L.B. 2017. Secondary structure or nrDNA Internal Transcribed Spacers as a useful tool to align highly divergent species in phylogenetic studies. *Genet. Mol. Biol.* 40, 191–199.
- Givnish, T.J., Spalink, D., Ames, M., Lyon, S.P., Hunter, S.J., Zuluaga, A., Iles, W.J.D., Clements, M.A., Arroyo, M.T.K., Leebens-Mack, J., Endara, L., Kriebel, R., Neubig, K.M., Whitten, W.M., Williams, N.H., Cameron, K.M. 2015. Orchid phylogenomics

- e multiple drivers of their extraordinary diversification. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 82, 1–10.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. 2010. New algorithms e methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst. Biol. 59, 307-321.  
<http://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- Gustafsson, A.L.S., Verola, C.F., Antonelli, A. 2010. Reassessing the temporal evolution of orchids with new fossils e a Bayesian relaxed clock, with implications for the diversification of the rare South American genus *Hoffmannseggella* (Orchidaceae: Epidendroideae). BMC Evol. Biol. 10, 13 pp.
- Karremans, A.P. 2014 *Lankesteriana*, a new genus in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). Lankesteriana 13, 319–332.
- Karremans, A.P. 2016. Genera Pleurothallidinarum: An updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. Lankesteriana 16: 219–241.
- Karremans, A.P., Bakker, F.T., Pupulin, F., Solano-Gómez, R., Smulders, M.J.M. 2013. Phylogenetics of *Stelis* e closely related genera (Orchidaceae: Pleurothallidinae). Plant Syst. Evol. 299, 151–176.
- Katoh, K., Standley, D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance e usability. Mol. Biol. Evol. 30, 772–780.
- Katoh, K., Toh, H., 2008. Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT based framework. BMC Bioinformatics 9, 212.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated e extendable desktop software

- platform for the organization e analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649.
- Kelchner, S.A. 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA e its application in plasnt systematics. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 87, 482–498.
- Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T., Calcott, B. 2017. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular e morphological phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* 34, 772-773.  
<http://doi.org/10.1093/molbev/msw260>.
- Lindley, J. 1859. *Folia Orchidacea: An enumeration of the known species of orchids.* Londres.  
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.51709>.
- Luer, C.A. 1986a. *Icones Pleurothallidinarum I: Systematics of the Pleurothallidinae.* Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 15, pp. 81.
- Luer, C.A. 1986b. *Icones Pleurothallidinarum III: Systematics of Pleurothallis.* Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 20, pp. 109.
- Luer, C.A. 1987. *Icones Pleurothallidinarum IV: Systematics of Acostaea, Condylago e Porroglossum.* Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 24, pp. 91.
- Luer, C.A. 1988. *Icones Pleurothallidinarum V: Systematics of Dresslerella e Scaphosepalum.* Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 26, pp. 108.
- Luer, C.A. 1990. *Icones Pleurothallidinarum VII: Systematics of Platystele.* Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 38, pp. 134.
- Luer, C.A. 1991. *Icones Pleurothallidinarum VIII: Systematics of Lepanthopsis, Octomeria subgenus Pleurothallopsis, Restrepiella, Restrepiopsis, Salpistele e Teagueia.* Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 39, pp. 158.

- Luer, C.A. 1992. Icones Pleurothallidarum IX: Systematics of *Myoxanthus*. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 44, pp. 124.
- Luer, C.A. 1994. Icones Pleurothallidarum XI: Systematics of *Lepanthes* subgenus *Brachycladium* e *Pleurothallis* subgenus *Aenigma*, subgenus *Elongatia*, subgenus *Kraenzlinella*. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 52, pp. 137.
- Luer, C.A. 1996a. Icones Pleurothallidarum XIII: Systematics of *Restrepia*. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 59, pp. 168.
- Luer, C.A. 1996b. Icones Pleurothallidarum XIV: Systematics of *Draconanthes*, *Lepanthes* subgenus *Marsipanthes* e subgenus *Lepanthes* of Ecuador. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 61, pp. 281.
- Luer, C.A. 1997. Icones Pleurothallidarum XV: Systematics of *Trichosalpinx*. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 64, pp. 136.
- Luer, C.A. 1998a. Icones Pleurothallidarum XVI: Systematics of *Pleurothallis* subgenera *Crocodeilanthe*, *Rynchopera* e *Talpinaria*. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 65, pp. 122.
- Luer, C.A. 1998b. Icones Pleurothallidarum XVII: Systematics of subgen. *Pleurothallis* sect. *Abortivae*, sect. *Truncatae*, sect. *Pleurothallis* subsect. *Acroniae* e subsect. *Pleurothallis*, subgen. *Dracontia* e subgen. *Uncifera*. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 72, pp. 121.
- Luer, C.A. 1999. Icones Pleurothallidarum XVIII: Systematics of *Pleurothallis*: subgen. *Pleurothallis* sect. *Pleurothallis* subsect. *Antenniferae*, subsect. *Longiracemosae*, subsect. *Macrophyllae-Racemosae*, subsect. *Perplexae*. Subgen. *Pseudostelis*. Subgen. *Acuminatia* (Orchidaceae). Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 76, pp. 182.
- Luer, C.A. 2000a. Icones Pleurothallidarum XIX: Systematics of *Masdevallia* part one. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 77, pp. 263.

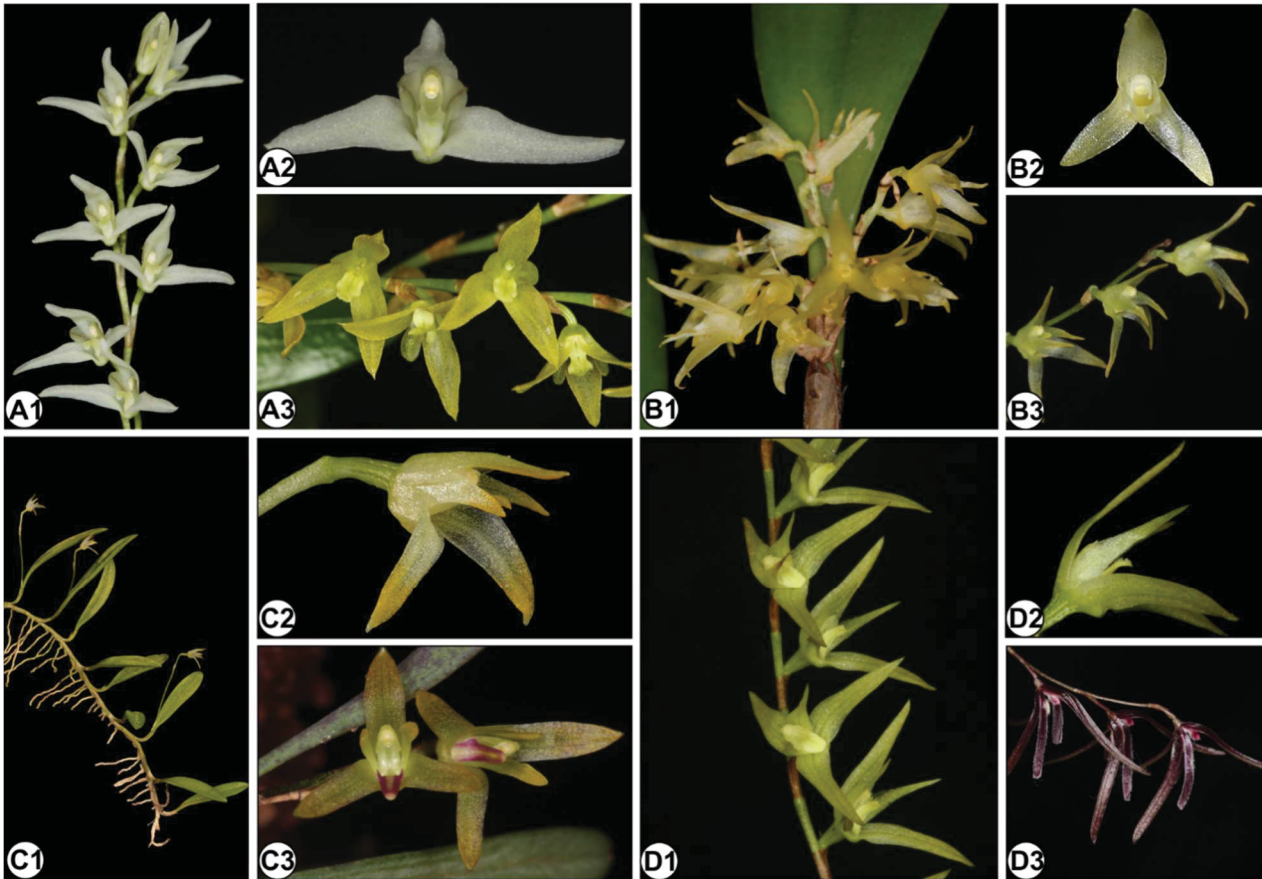
- Luer, C.A. 2000b. Icones Pleurothallidarum XX: Systematics of *Jostia*, *Andinia*, *Barbosella*, *Barbrodria* e *Pleurothallis* subgen. *Antilla*, subgen. *Effusia*, subgen. *Restrepioidea*. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 79, pp. 140.
- Luer, C.A. 2002. Icones Pleurothallidarum XXIV: A first century of new species of *Stelis* of Ecuador, part one. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 88, pp. 122.
- Luer, C.A. 2004. Icones Pleurothallidarum XXVI: *Pleurothallis* subgenus *Acianthera* e three allied subgenera; a second century of new species of *Stelis* of Ecuador; *Epibator*, *Ophidion*, e *Zootrophion*. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 95, pp. 265.
- Luer, C.A. 2005. Icones Pleurothallidarum XXVII: *Dryadella* e *Acronia* section *Macrophyllae-Fasciculatae*. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 103, pp. 311.
- Luer, C.A. 2006. Icones Pleurothallidarum XXVIII: Reconsideration of *Masdevallia*, e the systematic of *Specklinia* e vegetatively similar genera. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 105, pp. 274.
- Luer, C.A. 2007. Icones Pleurothallidarum XXIX: A third century of *Stelis* of Ecuador; systematics of *Apoda-Prorepentia*; systematics of miscellaneous small genera. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 112, pp. 130.
- Luer, C.A. 2009. Icones Pleurothallidarum XXX: *Lepanthes* of Jamaica; Systematics of *Stelis*, *Stelis* of Ecuador, part four. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 115, pp. 265.
- Luer, C.A. 2010. Icones Pleurothallidarum XXXI: *Lepanthes* of Bolivia; systematics of *Octomeria*, species North e West of Brazil. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 120, pp. 154.
- Luer, C.A., Toscano de Brito, A.L.V. 2012. Miscellaneous new species in Pleurothallidinae (Orchidaceae) from Brazil. Harvard Pap. Bot. 17, 307-315.

- Maddison, W.P., Maddison, D.R. 2015. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis, version 3.04. Available at: <http://mesquiteproject.org>.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W., Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, USA, pp. 1–8.
- Neubig, K.M., Whitten, W.M., Carlsward, B.S., Blanco, M.A., Endara, L., Williams, N.H., Morre, M. 2009. Phylogenetic utility of *ycf1* in orchids: a plastid gene more variable than *matK*. *Plant Syst. Evol.* 277, 75–84.
- Neyland, R., Urbatsch, L.E. 1995. A phylogenetic analysis of subtribe Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 117, 13–28.
- Niu, Z., Xue, Q., Zhu, S., Sun, J., Liu, W., Ding, X. 2017. The complete plastome sequences of four orchid species: insights into the evolution of the Orchidaceae e the utility of plastomic mutational hotspots. *Front. Plant Sci.* 8, 715.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00715>.
- Nixon, K.C. 2002. WinClada, version 1.00.08. Published by the author. Ithaca.
- Paithankar, K.R., Prasad, K.S. 1991. Precipitation of DNA by polyethylene glycol e ethanol. *Nucleic Acids Res.* 19, 1346.
- Pérez-Escobar, O.A., Chomicki, G., Condamine, F.L., Karremans, A.P., Bogarín, D., Matzke, N.J., Silvestro, D., Antonelli, A., 2017. Recent origin e rapid speciation of Neotropical orchids in the world’s richest plant biodiversity hotspot. *New Phytol.* 215, 891–905.
- Pinna, M.G.G. de. 1991. Concepts e tests of homology in the cladistic paradigm. *Cladistics* 7, 367–394.
- Pridgeon, A.M. 1982b. Anatomical Characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Am. J. Bot.* 69, 921-938.

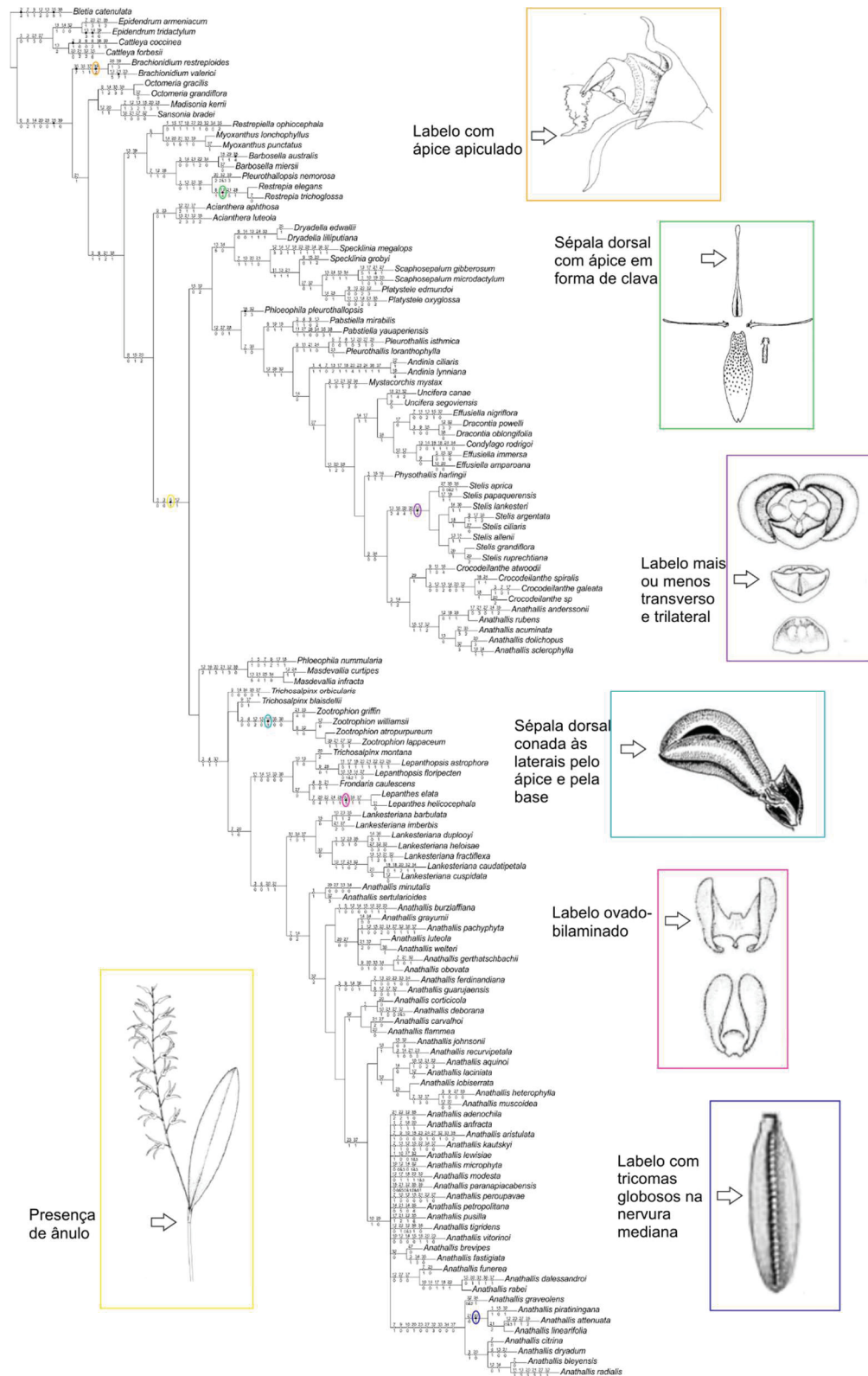
- Pridgeon, A.M. 1982a. Numerical analysis in the classification of the Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Bot. J. Linn. Soc.*, 85, 103-131.
- Pridgeon, A.M. 2005. Subtribe Pleurothallidinae. In: Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W., Rassmusen, F. N. *Genera Orchidacearum IV: Epidendroidae (Part One)*. Oxford University Press, Oxford, pp. 405-412.
- Pridgeon, A.M., Chase, M. W. 2001. Phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Lindleyana*, 16, 235-271.
- Pridgeon, A.M., Chase, M.W. 2003. Phylogenetics of the subtribe Pleurothallidinae (Epidendreae: Orchidaceae) based on combined evidence from DNA sequences. *Lankesteriana* 7, 49–50.
- Pridgeon, A.M., Solano, R., Chase, M.W. 2001. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear e plastid DNA sequences. *Am. J. Bot.* 88, 2286–2308.
- Rambaut, A. 2009. FigTree version v1.4.3 [computer program]. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtre>
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Drummond, A.J. 2014. Tracer version 1.6. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rogstad, S.H. 1992. Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses. *Taxon* 41, 701–708.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference e model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- Sang, T., Crawford, D.J., Stuessy, T.F. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution e biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* 84, 1120–1136.

- Santos, M.C. 2017. *Anathallis* Barb.Rodr. s.l. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) para o estado do Paraná e estudos florais no gênero. M.Sc. Dissertation. Universidade Federal do Paraná, PR, Brasil.
- Sereno, P.C. 2007. Logical basis for morphological characters in phylogenetics. *Cladistics* 23, 565–587.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E., Small, R.L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.* 92, 142–166.  
<http://doi.org/10.3732/ajb.92.1.142>.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The Tortoise e the hare III. *Am. J. Bot.* 94, 275–288.
- Stearn, W.T. 2004. *Botanical Latin*. Timber Press, Portland, 546 pp.
- Sun, Y., Skinner, D.Z., Liang, G.H., Hulbert, S.H. 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* e related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theor. Appl. Genet.* 89, 26–32.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parcimony e others methods, version 4.0b10. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA, USA.
- Swofford, D.L., Maddison, W. 1987. Reconstructing ancestral character states under Wagner Parsimony. *Math. Biosci.* 87, 199-229.  
[http://doi.org/10.1016/0025-5564\(87\)90074-5](http://doi.org/10.1016/0025-5564(87)90074-5).
- Tate, J.A. 2002. Systematics and evolution of *Tarasa* (Malvaceae): na enigmatic Andean polyploid genus. Ph.D. thesis. The University of Texas at Austin, TX, USA.

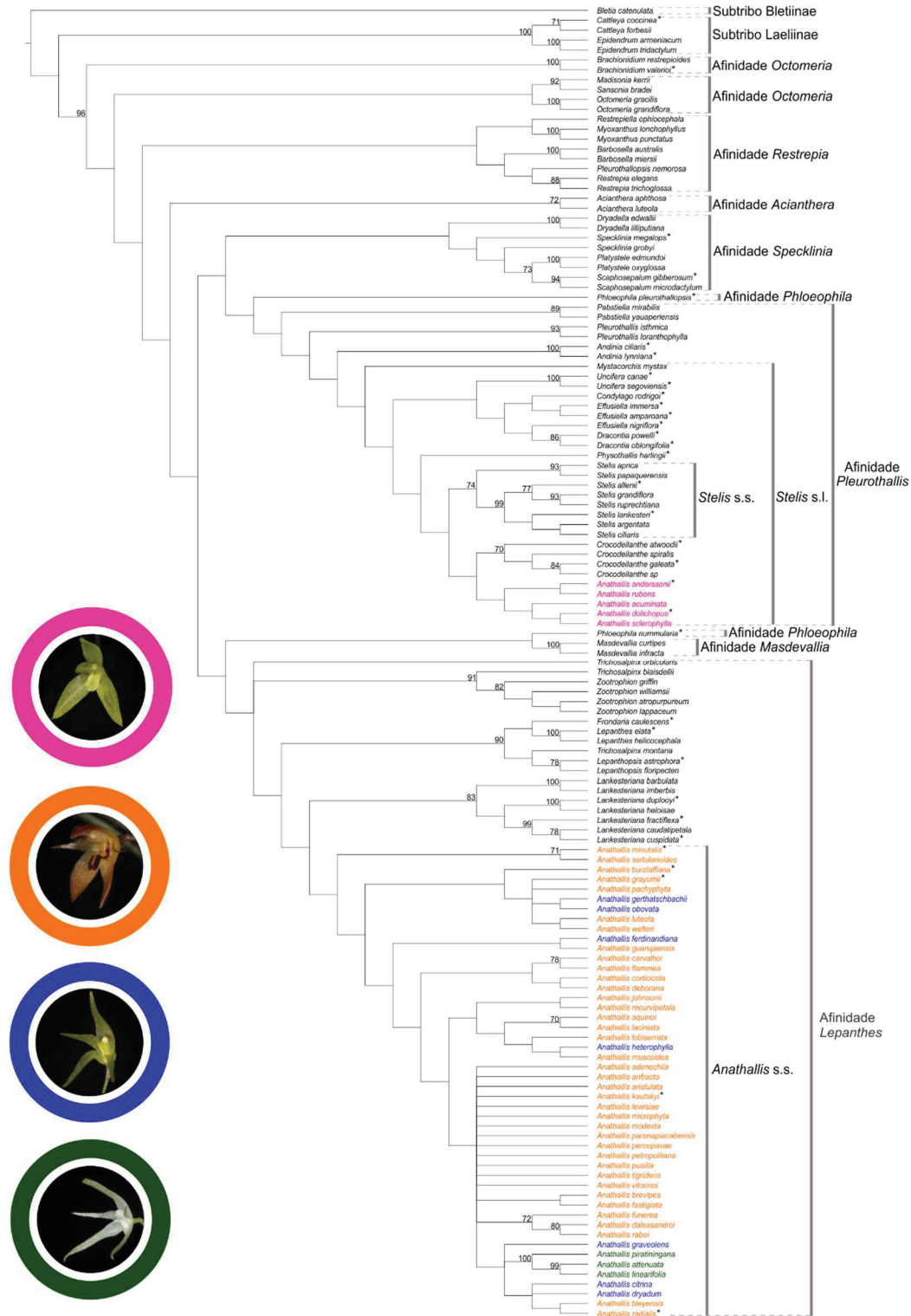
- Thiers, B. [continuously updated] Index Herbariorum: A global directory of public herbaria e associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Available at: <http://sweetgum.nybg.org/ih/> (Accessed 17 Jan 2018).
- Vaidya, G., Lohman, D.J., Meier, R. 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set e codon information. *Cladistics* 27, 171–180.
- Wilson, M., Frank, G.S., Jost, L., Pridgeon, A.M., Vieira-Urbe, S., Karremans, A.P. 2017. Phylogenetic analysis of *Andinia* (Pleurothallidinae; Orchidaceae) and a systematic re-circumscription of the genus. *Phytotaxa* 295, 101–131.
- Yule, G.U. 1925. A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. J.C. Willis, F.R.S. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sc.* 213, 21–87.



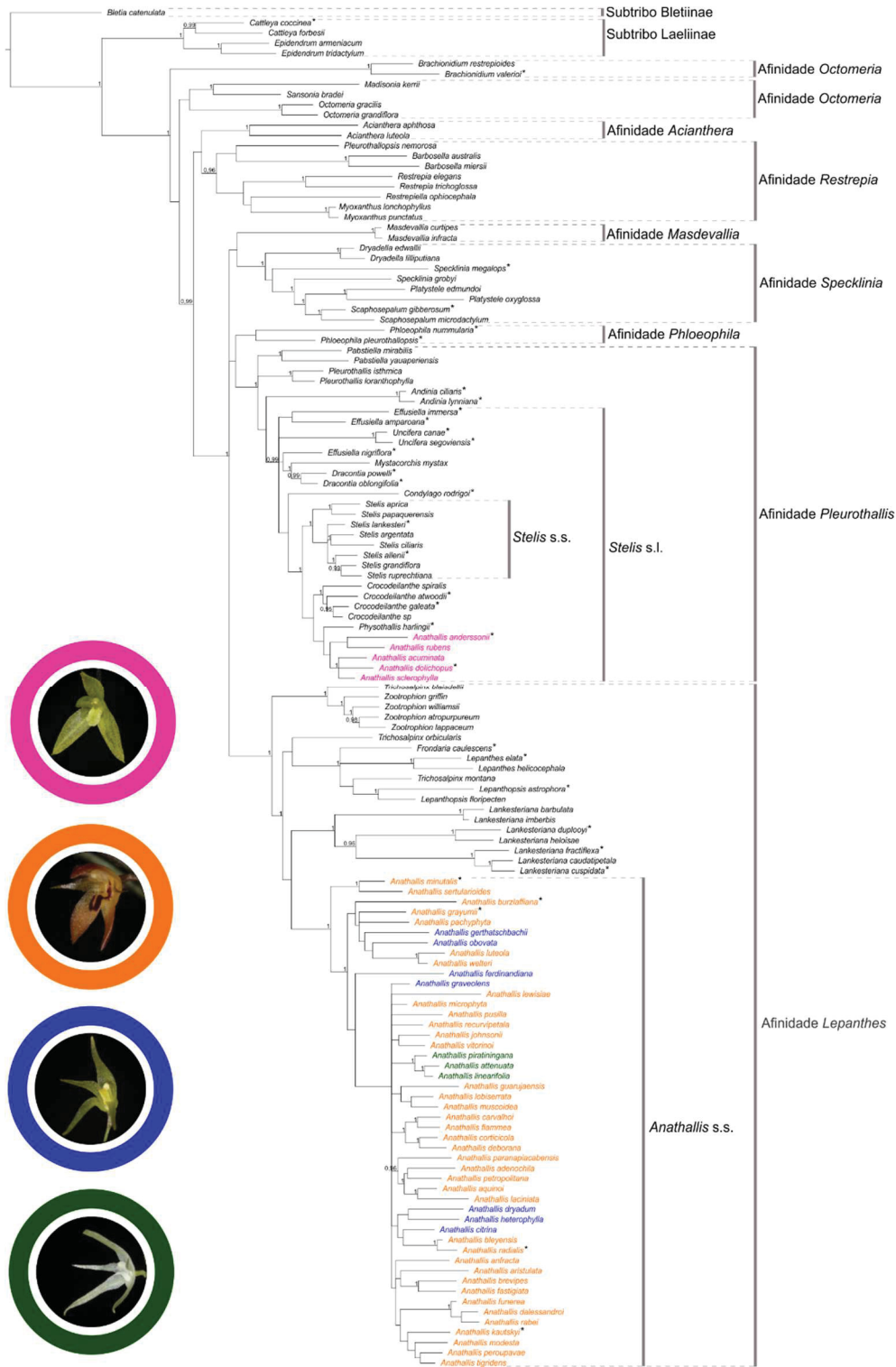
**Fig. 1:** Representantes dos grupos morfológicos de *Anathallis*. De *Acuminatae*: (A1) inflorescência de *A. acuminata*, espécie-tipo do grupo, (A2) flor de *A. acuminata* em detalhe, (A3) inflorescência de *A. rubens*. De *Alatae*: (B1) inflorescência de *A. obovata*, espécie-tipo do grupo, (B2) flor de *A. obovata* em detalhe, (B3) inflorescência de *A. dryadum*. De *Panmorphia*: (C1) hábito de *A. sertularioides*, espécie-tipo do grupo, (C2) flor de *A. sertularioides* em detalhe, (C3) inflorescência de *A. bleysensis*. De *Margaritifera*: (D1) inflorescência de *A. linearifolia*, espécie-tipo do grupo, (D2) flor de *A. linearifolia* em detalhe, (D3) inflorescência de *A. attenuata*. Fotos de Eric de Camargo Smidt, Alexandre Medeiros, Wade Collier e A.L.V. Toscano de Brito.



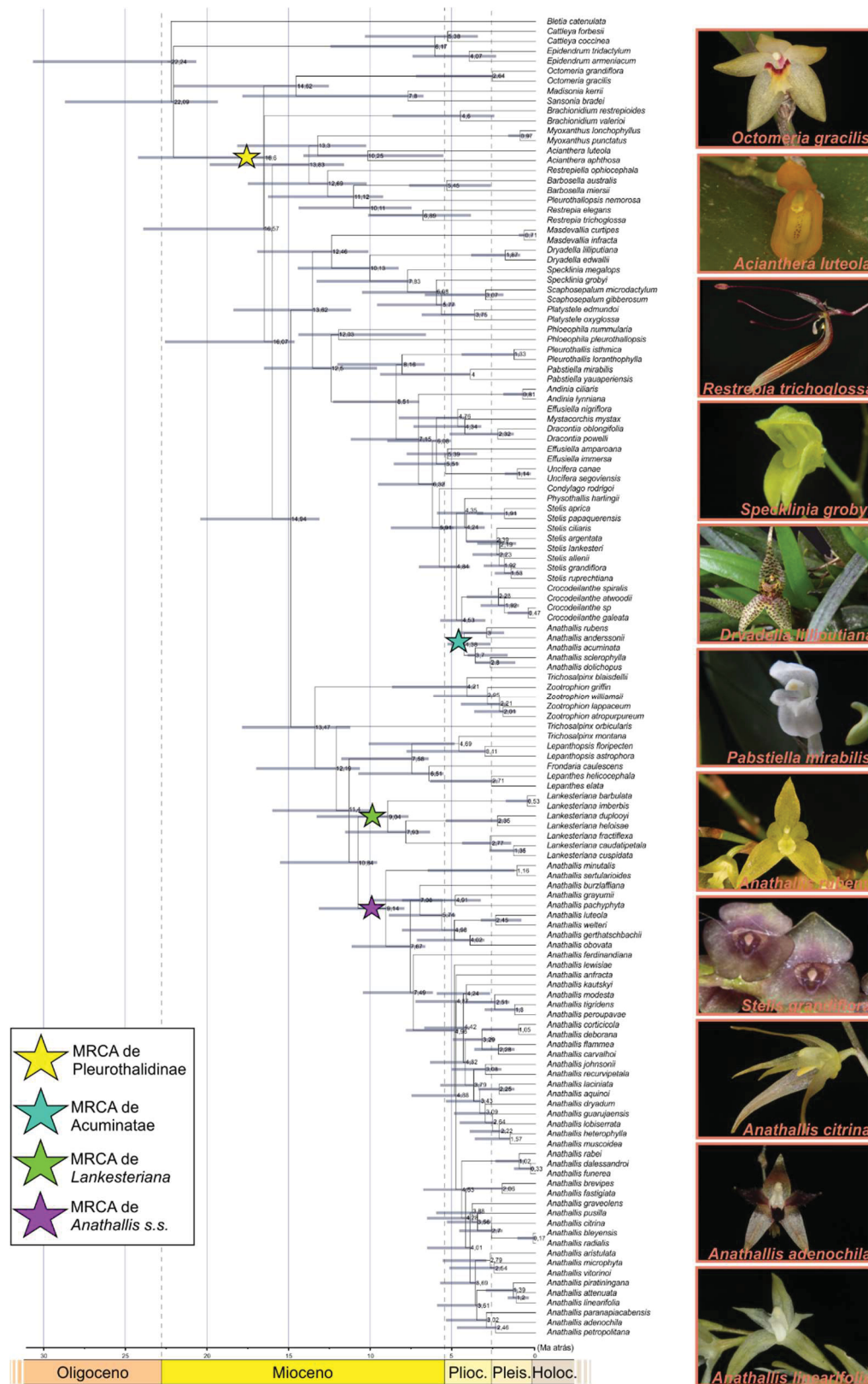
**Fig. 2:** Reconstrução de caracteres morfológicos. Círculos vazios representam homoplasias e círculos preenchidos apomorfias. Números acima dos círculos se referem ao número do caráter e os números abaixo ao estado de caráter correspondente (ver tabela 1). Algumas sinapomorfias foram destacadas e ilustradas. Imagens retiradas das obras de Luer e de Cogniaux.



**Fig. 3:** Filogenia molecular de Máxima Parcimônia com base na matriz de evidência total, consenso estrito. Acima dos nós estão os valores da porcentagem de *bootstrap*. Valores inferiores a 70 não foram mostrados. Os nomes dos táxons referentes a *Anathallis* foram coloridos de acordo com o grupo morfológico ao qual pertencem: cor-de-rosa para *Acuminatae*, azul para *Alatae*, alaranjado para *Panmorphia* e verde para *Margaritifera*. Taxons marcados com \* tiveram suas sequências genômicas obtidas do GenBank. Fotos de Eric de Camargo Smidt.



**Fig. 4:** Filogenia molecular de Inferência Bayesiana com base na matriz de evidência total. Acima dos nós estão os valores de probabilidade posterior. Valores inferiores a 0,9 não foram mostrados. Os nomes dos táxons referentes a *Anathallis* foram coloridos de acordo com o grupo morfológico ao qual pertencem: cor-de-rosa para *Acuminatae*, azul para *Alatae*, alaranjado para *Panmorphia* e verde para *Margaritifera*. Taxons marcados com \* tiveram suas seqüências genômicas obtidas do GenBank. Fotos de Eric de Camargo Smidt.



**Fig. 5:** Datação molecular de *Anathallis* com base na matriz de nrITS+cpDNA. Os valores se referem à idade média estimada para o clado, e as barras cinzas ao 95% HPD da estimativa. Os ancestrais comuns mais recentes (MRCA) de Pleurothallidinae, Acuminatae, *Lankesteriana* e *Anathallis* s.s. foram marcados com estrelas. À direita, imagens de representantes espécies amostradas neste trabalho. Fotos de Eric de Camargo Smidt e Luis Felipe Varela.

**Tabela 1:** Características de cada matriz de dados e os resultados das buscas heurísticas com seus respectivos índices.

Matriz	Nº táxons	Nº caracteres	Caracteres variáveis	Caracteres informativos	Nº árvores retidas	Nº passos das árvores retidas	Índice de consistência (IC)	Índice de retenção (IR)	<i>Component information</i>
nrITS	132	785	436 (55,5%)	349 (80,0%)	100	2411	0,33	0,71	0,63
cpDNA	120	6388	1913 (29,9%)	918 (48,0%)	80	4695	0,52	0,67	0,46
<i>matK</i>	110	1155	411 (35,6%)	202 (49,1%)	1760	907	0,56	0,84	0,48
<i>psbD-trnT</i>	99	1464	469 (32,0%)	236 (50,3%)	2600	1033	0,58	0,70	0,57
<i>rps16-trnQ</i>	86	1239	328 (26,5%)	152 (46,3%)	180	685	0,62	0,73	0,51
<i>trnH-psbA</i>	92	1372	360 (26,2%)	161 (44,7%)	10	751	0,46	0,72	0,52
<i>trnS-trnG</i>	77	1158	345 (29,8%)	167 (48,4%)	200	735	0,60	0,69	0,44
nrITS+cpDNA	133	7173	2349 (32,7%)	1267 (53,9%)	370	7261	0,45	0,68	0,66
Morfologia	133	39	39 (100%)	38 (97,4%)	10	501	0,14	0,63	0,49
Evidência total	133	7212	2489 (34,5%)	1325 (53,2%)	20	8435	0,43	0,65	0,85

**Tabela 2:** Lista dos caracteres morfológicos codificados em estados de caráter.

Caracteres: estados de caráter	
1	Hábito: (0) cespitoso; (1) reptante ou sub-reptante;
2	Caule secundário, tipo: (0) Delgado; (1) pseudobulboso; (2) cormoso;
3	Caule secundário, tamanho em relação à folha: (0) menor; (1) maior;
4	Caule secundário, bainhas, forma: (0) não-lepantiformes; (1) lepantiformes;
5	Caule secundário, ânulo: (0) ausente; (1) presente;
6	Caule secundário, número de folhas: (0) uma; (1) mais de uma;
7	Inflorescência, eixo principal, tamanho em relação à folha: (0) menor; (1) maior;
8	Inflorescência, tipo: (0) raceme; (1) fascículo; (2) flor solitária;
9	Inflorescência, flor, antése: (0) simultânea; (1) sucessiva;
10	Inflorescência do tipo racemo, raque, direção: (0) ereta a sinuosa; (1) fractiflexa;
11	Inflorescência do tipo racemo, número de flores: (0) paucifloro (2 a 10); (1) multifloro (mais de 10);
12	Flor, sépala dorsal, formato: (0) lanceolado; (1) ovado; (2) obovado; (3) linear;
13	Flor, sépala dorsal, ápice: (0) acuminado; (1) agudo; (2) obtuso; (3) apiculado; (4) clavado; (5) contraído em uma cauda;
14	Flor, sépalas laterais, conação: (0) conadas na base ou até a metade; (1) formam um sinsépalo; (2) livres ou levemente conadas na base;
15	Flor, sépalas laterais, mentum: (0) ausente; (1) presente;
16	Flor, sépala dorsal, grau de conação com as sépalas laterais: (0) livres ou levemente conadas na base; (1) formam um tubo sepalino; (2) conadas somente pelo ápice; (3) conadas pela base e pelo ápice; (4) conadas somente pela base;
17	Flor, sépalas, indumento: (0) glabro; (1) pubescente;
18	Flor, sépalas, margem: (0) glabra; (1) ciliada;
19	Flor, sépalas, calos: (0) ausentes; (1) presentes;
20	Flor, pétalas, formato: (0) lanceolado; (1) ovado; (2) obovado; (3) linear; (4) transversal;
21	Flor, pétalas, ápice: (0) acuminado; (1) agudo; (2) obtuso; (3) cordado; (4) apiculado; (5) clavado; (6) bifido; (7) contraído em uma cauda;
22	Flor, pétalas, indumento: (0) glabro; (1) pubescente; (2) piloso;
23	Flor, pétalas, margem: (0) glabra; (1) ciliada;
24	Flor, pétalas, lobos: (0) ausentes; (1) presentes;
25	Flor, pétalas, calos: (0) ausentes; (1) presentes;
26	Flor, labelo, disco, glênio: (0) ausente; (1) presente;
27	Flor, labelo, calos: (0) ausentes; (1) presentes;
28	Flor, labelo, base, encaixe com o pé da coluna: (0) articulado; (1) fixo;
29	Flor, labelo, base articulada ao pé da coluna, articulação do tipo “bola e soquete”: (0) ausente; (1) presente;
30	Flor, labelo, nervura mediana, tricomas globulares: (0) ausentes; (1) presentes;
31	Flor, labelo, nervura mediana, sulco: (0) ausente; (1) presente;

## Continuação da Tabela 2.

---

Caracteres: estados de caráter	
32	Flor, labelo, contorno: (0) lanceolado; (1) ovado; (2) obovado; (3) linear; (4) mais ou menos transverso e trilateral; (5) ovado-bilaminado;
33	Flor, labelo, base, lóbulos: (0) ausentes; (1) presentes;
34	Flor, labelo, lobos laterais: (0) ausentes; (1) presentes;
35	Flor, labelo, ápice: (0) acudo; (1) obtuso; (2) acuminado; (3) truncado; (4) bifido; (5) cordado; (6) clavado; (7) apiculado;
36	Flor, labelo, indumento: (0) glabro; (1) pubescente;
37	Flor, labelo, margem: (0) glabra; (1) cilliada;
38	Flor, coluna, prolongamentos laterais (“asas”): (0) ausentes; (1) presentes;
39	Flor, antera, polínias, número: (0) duas; (1) quatro; (2) seis; (3) oito;

---

## Material suplementar

**Apêndice 1:** Lista de táxons amostrados neste trabalho, com informações de seus respectivos *vouchers*, números de acesso do GenBank e procedência das sequências genômicas. Células marcadas com “OK” representam sequências produzidas neste estudo em fase de anotação e posterior publicação no GenBank. As abreviações dos herbários seguiram Thiers (Index Herbariorum). Continua nas próximas páginas.

Táxons	Voucher	Regiões moleculares						
		<i>nrITS</i>	<i>matK</i>	<i>psbD-trnT</i>	<i>rps16-trnQ</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>	
<i>Acianthera aphthosa</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase	V. Ariati 569 (MBM)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	-
<i>Acianthera luteola</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase	V.T. Rodrigues 509 (SP)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis acuminata</i> (Kunth) Pridgeon & M.W. Chase	A.V.S.R. Mauad 4 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis adenochila</i> (Loefgr.) F. Barros	A.L.V. Toscano de Brito 2876 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis anderssonii</i> (Luer) Pridgeon & M.W. Chase	A.P. Karremans 2957 (L)	JQ995324	-	-	-	-	-	-
<i>Anathallis anfracta</i> (Luer) Karremans	A.L.V. Toscano de Brito 2853 (MO)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis aquinoi</i> (Schltr.) Pridgeon & M.W. Chase	A.L.V. Toscano de Brito 3357 (UPCB)	OK	OK	OK	-	OK	OK	OK
<i>Anathallis aristulata</i> (Lindl.) Luer	J. Klein 70 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis attenuata</i> (Rolle) Pridgeon & M.W. Chase	M. Bolson <i>et al.</i> 642 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis bleyensis</i> (Pabst) F. Barros	A.L.V. Toscano de Brito 3669 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis brevipes</i> (H. Focke) Pridgeon & M.W. Chase	A.L.V. Toscano de Brito 3459 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis burzalfiana</i> (Luer & Sijm) Luer	A.P. Karremans 4857 (L)	KC425727	-	KC425857	-	-	-	-
<i>Anathallis carvalhoi</i> (Luer & Toscano) Luer	A.L.V. Toscano de Brito 2859 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis citrina</i> (Schltr.) Pridgeon & M.W. Chase	D.C. Imig 411 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis corticola</i> (Schltr. ex Hoehne) Pridgeon & M.W. Chase	A.L.V. Toscano de Brito 3321 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis dalessandroi</i> (Luer) Pridgeon & M.W. Chase	A.V.S.R. Mauad 6 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis deborana</i>	S. Lucas 7 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis dolichopus</i> (Schltr.) Pridgeon & M.W. Chase	D. Bogarin 3736 (JBL)	JF934776	-	-	-	-	-	-
<i>Anathallis dryadum</i> (Schltr.) F. Barros	A.L.V. Toscano de Brito 2904 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis fastigiata</i> (Luer & Toscano) Luer & Toscano	A.L.V. Toscano de Brito 3052 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis ferdinandiana</i> (Barb. Rodr.) F. Barros	A.L.V. Toscano de Brito 3097 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis flammea</i> (Barb. Rodr.) F. Barros	A.L.V. Toscano de Brito 3625 (UPCB)	-	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis funerea</i> (Barb. Rodr.) Luer	A.L.V. Toscano de Brito 3455 (UPCB)	OK	-	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis gerthatschbachii</i> (Hoehne) Pridgeon & M.W. Chase	A.L.V. Toscano de Brito 2913 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis graveolens</i> (Pabst) F. Barros	A.L.V. Toscano de Brito 3502 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

## Continuação do apêndice 1.

Táxons	Voucher	Regiões moleculares						
		<i>nrITS</i>	<i>matK</i>	<i>psbD-trnT</i>	<i>rps16-trnQ</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>	
<i>Anathallis grayumii</i> (Luer) Luer	F. Pupulin 3794 (JBL)	KC425730	KP012494	-	-	-	-	-
<i>Anathallis guarujaensis</i> (Hoehne) F. Barros	A.L.V. Toscano de Brito 2622 (HUEFS)	OK	-	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis heterophylla</i> Barb. Rodr.	A.L.V. Toscano de Brito 2855 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis johnsonii</i> Luer & Toscano	A.L.V. Toscano de Brito 3271 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis kautskyi</i> (Pabst) Pridgeon & M.W. Chase	C. Van den Berg 2051 (HUEFS)	JQ306340	-	-	-	-	-	-
<i>Anathallis laciniata</i> (Barb. Rodr.) Luer & Toscano	A.L.V. Toscano de Brito 3355 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis lewistiae</i> (Ames) Solano & Soto Arenas	A.L.V. Toscano de Brito 3400 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis linearifolia</i> (Cogn.) Pridgeon & M.W. Chase	E.C. Smidt 1012 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis lobiserrata</i> (Barb. Rodr.) Luer & Toscano	A.L.V. Toscano de Brito 3465 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis luteola</i> Toscano	A.L.V. Toscano de Brito 3458 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis microphyta</i> (Barb. Rodr.) C.O.Azevedo & Van den Berg	A.L.V. Toscano de Brito 3350 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis minimalis</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase	M. Jimenez 1044 (UNAM)	AF262922	-	-	-	-	-	-
<i>Anathallis modesta</i> (Barb. Rodr.) Pridgeon & M.W. Chase	A.L.V. Toscano de Brito 3344 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis muscoidea</i> (Lindl.) F. Barros & Barberena	A.L.V. Toscano de Brito 2575 (UPCB)	OK	-	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis obovata</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase	A.L.V. Toscano de Brito 3240 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis pachyphyta</i> (Luer) Pridgeon & M.W. Chase	A.L.V. Toscano de Brito 3106 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis paranapiacabensis</i> (Hoehne) F. Barros	A.L.V. Toscano de Brito 3366 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis perouparvae</i> (Hoehne & Brade) F. Barros	A.L.V. Toscano de Brito 3699 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis petropolitana</i> (Hoehne) Luer & Toscano	A.L.V. Toscano de Brito 3727 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis piratiningana</i> (Hoehne) F. Barros	A.L.V. Toscano de Brito 3399 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis pusilla</i> (Barb. Rodr.) F. Barros	A.L.V. Toscano de Brito 3529 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis rabei</i> (Foldats) Luer	A.L.V. Toscano de Brito 2938 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis radialis</i> (Porto & Brade) Pridgeon & M.W. Chase	G.R. Chiron 10144 (HUEFS)	JQ306345	-	-	-	-	-	-
<i>Anathallis recurvipetala</i> (Barb. Rodr.) Luer & Toscano	A.L.V. Toscano de Brito 3363 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis rubens</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase	A.P. Karremans 4824 (L)	OK	-	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis sclerophylla</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase	A.L.V. Toscano de Brito 3033 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis sertularioides</i> (Sw.) Pridgeon & M.W. Chase	A.L.V. Toscano de Brito 2962 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis tigidens</i> (Loefgr.) Luer & Toscano	E.C. Smidt 945 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis vitorinói</i> (Luer & Toscano) Luer & Toscano	C.A. Royer 124 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Anathallis welteri</i> (Pabst) F. Barros	A.L.V. Toscano de Brito 3330 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Andinia ciliaris</i> (Luer & Hirtz) Karremans & S.V. Uribe	O'Shaughnessy 1380 (COCO)	KP012372	-	-	-	-	-	-
<i>Andinia lymniana</i> (Luer) Karremans & S.V. Uribe	O'Shaughnessy 2869 (COCO)	KR827587	-	-	-	-	-	-

## Continuação do apêndice 1.

Táxons	Voucher	Regiões moleculares						
		<i>nrITS</i>	<i>matK</i>	<i>psbD-trnT</i>	<i>rps16-trnQ</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>	
<i>Barbosella australis</i> (Cogn.) Schltr.	M.E. Engels 392 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	
<i>Barbosella miersii</i> (Lindl.) Schltr.	M. Bolson e D.F. Lima 498 (UPCB)	OK	-	OK	OK	OK	OK	
<i>Blelia catenulata</i> Ruiz & Pav.	A.V.S.R. Mauad 9 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	
<i>Brachionidium restrepioides</i> (Hoehne) Pabst	W.S. Mancinelli 1349 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	-	
<i>Brachionidium valerioi</i> Ames & C. Schweinf.	-(Pridgeon <i>et al.</i> , 2001)	AF262913	AF265488	-	-	-	-	
<i>Cattleya coccinea</i> Lindl.	T.F. Santos e M. Machnicki-Reis 146 (UPCB)	AY008646	OK	OK	-	OK	-	
<i>Cattleya forbesii</i> Lindl.	E.C. Smidt 967 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	
<i>Condylago rodrigoii</i> Luer	Hermans 1926 (K)	AF262829	AF265460	-	-	-	-	
<i>Crocodelanthe atwoodii</i> (Luer) Luer	A.P. Karremans 3540 (JBL)	JQ995343	KY988781	-	-	-	-	
<i>Crocodelanthe galeata</i> (Lindl.) Luer	A.P. Karremans 4800 (L)	JQ995348	KY988787	-	-	-	-	
<i>Crocodelanthe spiralis</i> (Lindl.) Toscano	M.C. Santos <i>et al.</i> 1 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	
<i>Crocodelanthe sp.</i>	A.L.V. Toscano de Brito 2841 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	-	
<i>Dracontia oblongifolia</i> (Lindl.) Luer	H. Stenzel 643 (HAJB)	JQ995368	KY988789	-	-	-	-	
<i>Dracontia powelli</i> (Schltr.) Luer	F. Pupulin 4498 (JBL)	JF934803	AF265461	-	-	-	-	
<i>Dryadella edwallii</i> (Cogn.) Luer	E.C. Smidt 1011 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	
<i>Dryadella lilliputiana</i> (Cogn.) Luer	W.S. Mancinelli 1065 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	
<i>Effusiella amparoana</i> (Schltr.) Luer	F. Pupulin 7203 (JBL)	JF934787	AF265467	-	-	-	-	
<i>Effusiella immersa</i> (Linden & Rehb.f.)	Hermans 1708 (K)	AF262828	-	-	-	-	-	
<i>Effusiella nigriflora</i> (L.O. Williams) Luer	Reyes, 5684 (MEXU)	FR837535	FR837538	-	-	-	-	
<i>Epidendrum armeniacum</i> Lindl.	W.S. Mancinelli 1369 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	
<i>Epidendrum tridactylum</i> Lindl.	G.F. Gonçalves 49 (SP)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	
<i>Fronitaria caulescens</i> (Lindl.) Luer	C.A. Luer 18778 (K)	AF262914	AF265471	-	-	-	-	
<i>Lankesteriana barbulata</i> (Lindl.) Karremans	M.R. Cabral 14 (UPCB)	OK	-	OK	OK	OK	OK	
<i>Lankesteriana caudatipetala</i> (C. Schweinf.) Karremans	A.L.V. Toscano de Brito 3277 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	
<i>Lankesteriana cuspidata</i> (Luer) Karremans	D. Bogarin 9619 (JBL)	KF747835	-	-	-	-	-	
<i>Lankesteriana duplooyi</i> (Luer & Sayers) Karremans	A.P. Karremans 4888 (JBL)	KF747836	-	-	-	-	-	
<i>Lankesteriana fractiflexa</i> (Ames & C. Schweinf.) Karremans	D. Bogarin 8988 (JBL)	KC425729	-	-	-	-	-	
<i>Lankesteriana heloisae</i> (F.J.de Jesus, R.Miranda & Chiron) Chiron & Krahl.	F.J. de Jesus e J.R. Gomes s.n. (SP 454082)	OK	-	OK	OK	OK	-	
<i>Lankesteriana imberbis</i> (Luer & Hirtz) Karremans	A.L.V. Toscano de Brito 3370 (UPCB)	OK	-	OK	-	OK	-	
<i>Lepanthes elata</i> Rehb.f.	D. Bogarin 10554 / D. Bogarin 11778 (USJ)	KY988850	KY988667	-	-	-	-	
<i>Lepanthes helicocephala</i> Rehb.f.	M.R. Cabral 5 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	

## Continuação do apêndice 1.

Táxons	Voucher	Regiões moleculares					
		<i>nrITS</i>	<i>matK</i>	<i>psbD-trnT</i>	<i>rps16-trnQ</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>
<i>Lepanthopsis astrophora</i> (Rehb. f. ex Kraenzl.) Garay	Manning 921101 (K)	AF262893	AF265487	-	-	-	-
<i>Lepanthopsis floripecten</i> (Rehb. f.) Ames	A.L.V. Toscano de Brito 2912 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Madsonia kerrii</i> (Braga) Luer	A.L.V. Toscano de Brito 2852 (SEL)	OK	OK	OK	OK	-	-
<i>Masdevallia curtipes</i> Barb.Rodr.	A.L.V. Toscano de Brito 3475 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Masdevallia infracta</i> Lindl.	A.L.V. Toscano de Brito 3473 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Myoxanthus lonchophyllus</i> (Barb. Rodr.) Luer	M.L. Klingelfus 187 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Myoxanthus punctatus</i> (Barb. Rodr.) Luer	A.L.V. Toscano de Brito 2871 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Mystacorchis mystax</i> (Luer) Szlach. & Marg.	A.L.V. Toscano de Brito 2948 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Octomeria gracilis</i> Lodd. ex Lindl.	E.C. Smidt 947 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Octomeria grandiflora</i> Lindl.	W.S. Mancinelli 1372 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Pabstiella mirabilis</i> (Schltr.) Brieger & Senghas	E.C. Smidt 921 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Pabstiella yauapertensis</i> (Barb. Rodr.) F. Barros	A.L.V. Toscano de Brito 3054 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Phloeophila nummularia</i> (Rehb.f.) Garay	A.P. Karremans 5959	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Phloeophila pleurothallopsis</i> (Kraenzl.) Pridgeon & M.W. Chase	A.P. Karremans 4818 / D.C. Imig 411 (UPCB)	KF747839	-	-	-	-	-
<i>Physothallis harlingii</i> Garay	- K 46701 (Pridgeon <i>et al.</i> , 2001)	KC425746	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Platystele edmundoi</i> Pabst	M.R. Cabral 4 (UPCB)	AF262846	EF065591	-	-	-	-
<i>Platystele oxyglossa</i> (Schltr.) Garay	W.S. Mancinelli 1333 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Pleurothallis isthmica</i> Luer	A.L.V. Toscano de Brito 2945 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Pleurothallis loranthophylla</i> Rehb.f.	A.L.V. Toscano de Brito 2961 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Pleurothallis nemorosa</i> (Barb. Rodr.) Porto & Brade	A.L.V. Toscano de Brito 3414 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Restrepia elegans</i> H. Karst.	M.L. Klingelfus 165 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Restrepia trichoglossa</i> F. Lehm. ex Sander	M.L. Klingelfus 117 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Restrepia ophiocephala</i> (Lindl.) Garay & Dunst.	A.L.V. Toscano de Brito 3126 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Sansonia bradei</i> (Schltr.) Chiron	M. Bolson 565 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Scaphosepalum gibberosum</i> (Rehb. f.) Rolfe	Hermans 2366 (K)	AF262817	AF265458	-	-	-	-
<i>Scaphosepalum microdactylum</i> Rolfe	A.L.V. Toscano de Brito 2957 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Specklinia grobyi</i> (Bateman ex Lindl.) F. Barros	J. Klein 94 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Specklinia megalops</i> (Luer) Pridgeon & M.W. Chase	A.P. Karremans 4792 (Karremans <i>et al.</i> , 2016)	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Stelis allenii</i> L.O. Williams	- JBL 03905 (Karremans, <i>et al.</i> , 2013) / (Pérez-Escobar <i>et al.</i> , 2017)	KC425807	-	-	-	-	-
<i>Stelis aprica</i> Lindl.	M.E. Engels 1599 (UPCB)	JQ995342	KY988780	-	-	-	-
<i>Stelis argentata</i> Lindl.	A.L.V. Toscano de Brito 3377 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK

## Continuação do apêndice 1.

Táxons	Voucher	Regiões moleculares						
		<i>nrITS</i>	<i>matK</i>	<i>psbD-trnT</i>	<i>rps16-trnQ</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>trnS-trnG</i>	
<i>Stelis ciliaris</i> Lindl.	E.C. Smidt 960 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	-
<i>Stelis grandiflora</i> Lindl.	E. Cagliioni e C. Signoelli 288 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Stelis lankesteri</i> Ames	A.P. Karremans 4269 (JBL)	JQ995353	KY988788	-	-	-	-	-
<i>Stelis papaquerensis</i> Rchb.f.	W.S. Mancinelli 1341 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Stelis ruprechtiana</i> Rchb.f.	M.C. Santos <i>et al.</i> 14 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Trichosalpinx blaisdellii</i> (S. Watson) Luer	A.L.V. Toscano de Brito 2940 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Trichosalpinx montana</i> (Barb. Rodr.) Luer	A.L.V. Toscano de Brito 2909 (UPCB)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Trichosalpinx orbicularis</i> (Lindl.) Luer	A.L.V. Toscano de Brito 3239 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	-
<i>Uncifera canae</i> (Ames) Luer	D. Bogarín 6805 (JBL) / (Pérez-Escobar <i>et al.</i> , 2017)	JF934793	KY988782	-	-	-	-	-
<i>Uncifera segoviensis</i> (Rchb.f.) Luer	A.P. Karremans 544 (JBL) / (Pérez-Escobar <i>et al.</i> , 2017)	JQ995365	KY988790	-	-	-	-	-
<i>Zootrophion atropurpureum</i> (Lindl.) Luer	A.B.R. Almeida 32 (HUUCP)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
<i>Zootrophion griffithii</i> Luer	A.L.V. Toscano de Brito 2939 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	-
<i>Zootrophion lappaceum</i> Luer & R. Escobar	A.L.V. Toscano de Brito 3244 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	-
<i>Zootrophion williamsii</i> Luer	A.L.V. Toscano de Brito 2952 (SEL)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

## Apêndice 2: Informações sobre os primers utilizados nas PCRs.

Nome do primer	Sequência do primer (5'-3')	Referência	Região molecular correspondente
17SE	ACG AAT TCA TGG TCC GGT GAA GTG TTC	Sun <i>et al.</i> , 1994	nrITS (ITS1, gene 5.8S e ITS2)
26SE	TAG AAT TCC CCG GTT CGC TCG CCG TTA C	Sun <i>et al.</i> , 1994	
75	TAT GCT TAA ACT CAG CCG G	Desfeaux <i>et al.</i> , 1996	nrITS (ITS1, gene 5.8S e ITS2)
92	AAG GTT TCC GTA GGT GAA	Desfeaux <i>et al.</i> , 1996	
19F	CGT TCT CAT ATT GCA CTA TG	Pridgeon <i>et al.</i> , 2001	gene <i>matK</i> , sequência incompleta
88IR	TMT TCA TCA GAA TAA GA GT	Pridgeon <i>et al.</i> , 2001	
psbD	CTC CGT ARC CAG TCA TCC ATA	Shaw <i>et al.</i> , 2007	espaçador intergênico <i>psbD-trnT</i> <sup>(GGU)</sup>
trnT_GGU_R	CCC TTT TAA CTC AGT GGT AG	Shaw <i>et al.</i> , 2007	
rps16x1	GTT GCT TTY TAC CAC ATC GTT T	Shaw <i>et al.</i> , 2007	espaçador intergênico <i>rps16-trnQ</i> <sup>(UUG)</sup>
trnQ_UUG	GCG TGG CCA AGY GGT AAG GC	Shaw <i>et al.</i> , 2007	
trnHf_05	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC	Tate, 2002	espaçador intergênico <i>trnH</i> <sup>(GUG)</sup> - <i>psbA</i> , gene <i>rps19</i> e parte do gene <i>psbA</i>
psbA3f	GGT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	Sang <i>et al.</i> , 1997	
trnS_GCU	AGA TAG GGA TTC GAA CCC TCG	Shaw <i>et al.</i> , 2005	espaçador intergênico <i>trnS</i> <sup>(GCU)</sup> - <i>trnG</i> <sup>(UCC)</sup> e parte do gene <i>trnG</i> <sup>(UCC)</sup>
trnG_UUC	GTA GCG GGA ATC GAA CCC GCA TC	Shaw <i>et al.</i> , 2005	

**Apêndice 3:** Matriz morfológica. Estados de caráter entre parênteses indicam polimorfismo da característica para o táxon. “?” representam dados faltantes e “-” se referem a características que não se aplicam ao táxon. Continua nas próximas páginas.

Taxa	Character states
<i>Acianthera aphthosa</i>	101000000021(1 2)10000(0 2)2010001000011110110
<i>Acianthera luteola</i>	10100000000211000023000001000031120010
<i>Anathallis acuminata</i>	001010100011021010023000001000020020000
<i>Anathallis adenochila</i>	000010(0 1)011011210000(0 3)2210001000011100110
<i>Anathallis anderssonii</i>	?010?0100010121001023000000000020120010
<i>Anathallis anfracta</i>	100010101101121001011010001000021110110
<i>Anathallis aquinoi</i>	000010(0 1)01101100000012210001000011110110
<i>Anathallis aristulata</i>	(0 1)00010100001120000001001000000010120110
<i>Anathallis attenuata</i>	(0 1)00010(0 1)0000(0 3)1210000(1 3)2010001001030020010
<i>Anathallis bleyensis</i>	00101000000(0 1)121000001000000000030110010
<i>Anathallis brevipes</i>	000010001(0 1)011(0 2)10000010(0 1)00000000(0 1)1110110
<i>Anathallis burzlaiffiana</i>	100000001000100001011110001000021110010
<i>Anathallis carvalhoi</i>	000010001001121000012000000000011110010
<i>Anathallis citrina</i>	(0 1)0(0 1)010000001121000001000000000030010010
<i>Anathallis corticicola</i>	10001000100(0 1)(0 1)210000010000010000111(0 1)(0 1)(0 1)10
<i>Anathallis dalessandroi</i>	000010001000100011011110000000121111110
<i>Anathallis deborana</i>	1000100011011210000100000000000(2 3)1110010
<i>Anathallis dolichopus</i>	001010100011021010032000001000030010000
<i>Anathallis dryadum</i>	0011101000010210000000000000000030010010
<i>Anathallis fastigiata</i>	00101000110(0 1)121000001010001000001000110
<i>Anathallis ferdinandiana</i>	00(0 1)01010000100100(0 1)0010100010000(0 2 3)0011010
<i>Anathallis flammea</i>	00001000100(0 1)12100000(0 1)000001000011110010
<i>Anathallis funerea</i>	000010101100121000001000000000021110010
<i>Anathallis gerthatschbachii</i>	000010100001121000010000000000010010010
<i>Anathallis graveolens</i>	00(0 1)010100001(1 2)210000110000000000(0 2)0110010
<i>Anathallis grayumii</i>	0000?0001001101000001000000000021010010
<i>Anathallis guarujaensis</i>	00101002---010100001(0 1)(0 1)00000000011111010
<i>Anathallis heterophylla</i>	001010100001(0 1)2100001(0 1)0000000000(1 3)0(0 1)10010
<i>Anathallis johnsonii</i>	000010001001120001011010001000031110110
<i>Anathallis kautskyi</i>	0000?0101110120000001110001000021010010
<i>Anathallis laciniata</i>	00001000100010100(0 1)0(0 1)1(0 1)100010000(1 3)1(0 1)10110
<i>Anathallis lewisiae</i>	100010(0 1)010011210000010100000000(1 3)11(0 1)0110
<i>Anathallis linearifolia</i>	000010100001(1 2)210000(0 1)(0 1 2)0000000010(0 1 3)001(0 1)010
<i>Anathallis lobiserrata</i>	0000100010011(0 2)10000(0 1)(0 1)0000010000(0 1)1110110
<i>Anathallis luteola</i>	00001000100(0 1)1210000(0 3)20000000000(0 3)1110010
<i>Anathallis microphyta</i>	00001000100(0 3)(1 2)0100(0 1)0(0 1)(1 2)(0 1)00010000(1 3)1110110
<i>Anathallis minutalis</i>	100010(0 1)0100(0 1)1210000010000000000(0 1)00(0 1)0010
<i>Anathallis modesta</i>	00(0 1)0100011001210110011100010000(1 3)1(0 1)10110
<i>Anathallis muscoidea</i>	000010101000121000001000001000031110010
<i>Anathallis obovata</i>	00(0 1)01000000(0 1)1210000(0 1)10000000000(2 3)00(0 1)0010
<i>Anathallis pachyphyta</i>	1000100010001200000200000010000111(0 1)1110
<i>Anathallis paranapiacabensis</i>	000010(0 1)01(0 1)0112000000(0 5)0100010000(0 1)11(2 6)1110
<i>Anathallis peroupavae</i>	0000101010001200000001100000000(0 2)1110110
<i>Anathallis petropolitana</i>	00001000110(0 1)1010000050100010000(0 2 3)1060110
<i>Anathallis piratingana</i>	100010100001(0 1)200000(0 1)00(0 1)00000010100(0 1)0010
<i>Anathallis pusilla</i>	000010(0 1)011011210100(0 3)2110001000021160110
<i>Anathallis rabei</i>	00(0 1)01000100010101100(1 2)11000(0 1)0000(2 3)1110010
<i>Anathallis radialis</i>	00(0 1)0?0100010221000032000001000010110010
<i>Anathallis recurvipetala</i>	001010001001101001010000001000021110110
<i>Anathallis rubens</i>	0010101000101210110220000010000(2 3)0010010
<i>Anathallis sclerophylla</i>	001010100011(0 1)210110220000010000(1 3)0110000

## Continuação do apêndice 3.

<i>Anathallis sertularioides</i>	100010(0 1)(0 2)100(0 1)1210000(1 3)1000001000031110010
<i>Anathallis tigridentis</i>	00(0 1)0100011001210000(0 1)11100010000(0 3)11(0 1)1100
<i>Anathallis vitorinoi</i>	0000100(0 2)1000(1 2)0000101(0 1)0000010000(2 3)1110110
<i>Anathallis welteri</i>	00001000100(0 1)1210000(0 3)20000000000(0 1)1111010
<i>Andinia ciliaris</i>	1001100010012000110421110001-0010111100
<i>Andinia lynniana</i>	100110001001(1 2)004110420110001-0010111100
<i>Barbosella australis</i>	10000012---1201000001200001010010040001
<i>Barbosella miersii</i>	10000012---(0 1)(1 2)000000(0 1)12000000000(1 3)00(0 1)0001
<i>Bletia catenulata</i>	1200011010020200000100000011-0010150011
<i>Brachionidium restrepioides</i>	10000002---0(0 1)10000000000011000010171103
<i>Brachionidium valerioi</i>	10000002---0510000007010001000010171102
<i>Cattleya coccinea</i>	01000002---022000001300000?1-0010100013
<i>Cattleya forbesii</i>	00100100000022000000200000?1-0020160001
<i>Condylago rodrigo</i>	000010101110201011022001001000010010010
<i>Crocodelanthe atwoodii</i>	001010101001120400022000001010010010000
<i>Crocodelanthe galeata</i>	00101000001(0 1)(1 2)(0 1)00110(0 3)20000010100(1 2)0110000
<i>Crocodelanthe sp</i>	00001010001(0 2)200001022000001010010110000
<i>Crocodelanthe spiralis</i>	00001010001(0 1 2)2001000(0 1)20010010100101100(0 1)0
<i>Dracontia oblogifolia</i>	00(0 1)010100(0 1)(0 1)(0 1)(1 2)100000220000010000101(0 1)0000
<i>Dracontia powelli</i>	0010101000131100000(2 3)2000001000020100010
<i>Dryadella edwallii</i>	00000000100150?000122001101000021010010
<i>Dryadella lilliputiana</i>	00000000100150?000122001001000021010010
<i>Effusiella amparoana</i>	00001010001(0 1)11001000(2 4)000001000010110010
<i>Effusiella immersa</i>	00000010011(0 2)110010022000101000000110010
<i>Effusiella nigriflora</i>	0000?0001001211000022000001000000110010
<i>Epidendrum armeniacum</i>	0010011000101000000310000001-0000120001
<i>Epidendrum tridactylum</i>	0010010000103400000130000001-0000100?00
<i>Fronitaria caulescens</i>	001010100011100000001000000000010110000
<i>Lankesteriana barbulate</i>	000010(0 1)0110(0 1)(1 2)100000110100010001(1 3)1020110
<i>Lankesteriana caudatipetala</i>	0000101011011100110200(0 1)000100011111(0 1)110
<i>Lankesteriana cuspidata</i>	000010101101011010000000001000121010110
<i>Lankesteriana duplooyi</i>	10001010100(0 2)(1 2)010000110100010001010(0 1)1110
<i>Lankesteriana fractiflexa</i>	00001010111211010015100001000121010110
<i>Lankesteriana heloisae</i>	10001010100(0 1)11?000011010000000130000110
<i>Lankesteriana imberbis</i>	000010101001(1 2)1?000012000001000111010010
<i>Lepanthes elata</i>	0011100010111000000421010001-00501?1100
<i>Lepanthes helicocephala</i>	0011100010011000000421010001-00501?1100
<i>Lepanthopsis astrophora</i>	0011101001010000110111100111-00101(0 1)0000
<i>Lepanthopsis floripecten</i>	001110100011(1 2)100000020000001-0010110000
<i>Madisonia kerrii</i>	10000012---32110000310000011-0010110000
<i>Masdevallia curtipes</i>	0000100010015111000340011010000(2 3)0010000
<i>Masdevallia infracta</i>	000010(0 1)010025111000340001010000(2 3)0010000
<i>Myoxanthus lonchophyllus</i>	101000011-(0 1)(0 2)200000015000001000011110010
<i>Myoxanthus punctatus</i>	101000011-(0 1)(0 2 3)2000000150000010000(0 1)1110110
<i>Mystacorthis mystax</i>	0010101010010000000(0 1)10000011-0020010000
<i>Octomeria gracilis</i>	(0 1)0(0 1)000010--(0 1)(1 2)20000001000001000010130003
<i>Octomeria grandiflora</i>	(0 1)0(0 1)00001(0 1)--(0 1 2)200000010000010000001(3 4)0003
<i>Pabstiella mirabilis</i>	00110010010(0 1)2110000220000001-0020110000
<i>Pabstiella yauaperiensis</i>	0000?010111(0 2)111000022000001000020030010
<i>Phloeophila nummularia</i>	10000012---(0 2)1111110(0 3)10000010000(1 3)0110000
<i>Phloeophila pleurothallopsis</i>	000010001(0 1)0(0 2 3)11020002(1 2)0000001-003011(0 1)(0 1)10
<i>Physothallis harlingii</i>	100010101011101100022000001000010110000
<i>Platystele edmundoi</i>	0000101000111000000210000001-0030010010
<i>Platystele oxyglossa</i>	0000101011010200000100000001-0010020010
<i>Pleurothallis isthmica</i>	00(0 1)00001---0110000031000001000010010000
<i>Pleurothallis loranthophylla</i>	00(0 1)010100011110000011(0 1)100001-0010(0 1)10000
<i>Pleurothallopsis nemorosa</i>	00100012---(0 1)1100000220000010000(2 3)01(1 3)0003

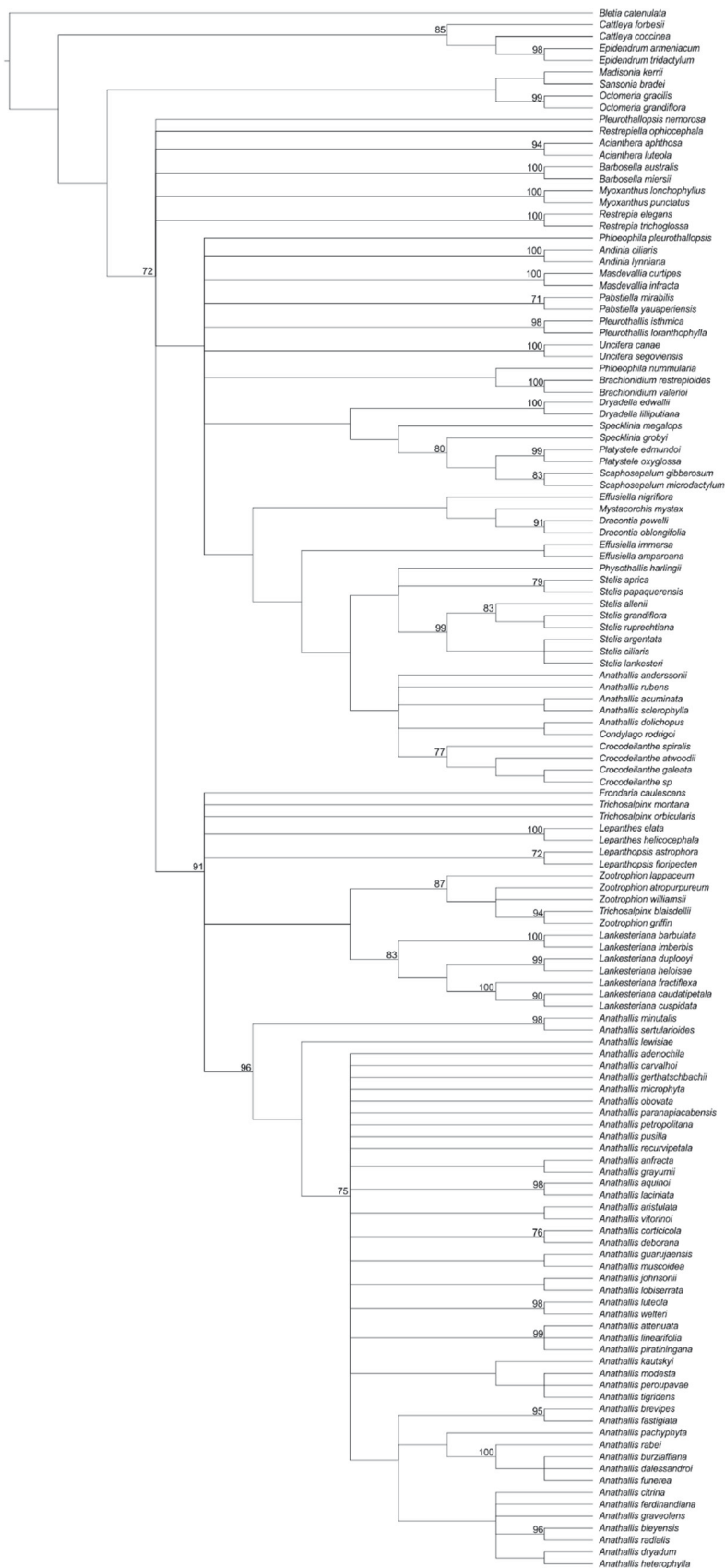
## Continuação do apêndice 3.

---

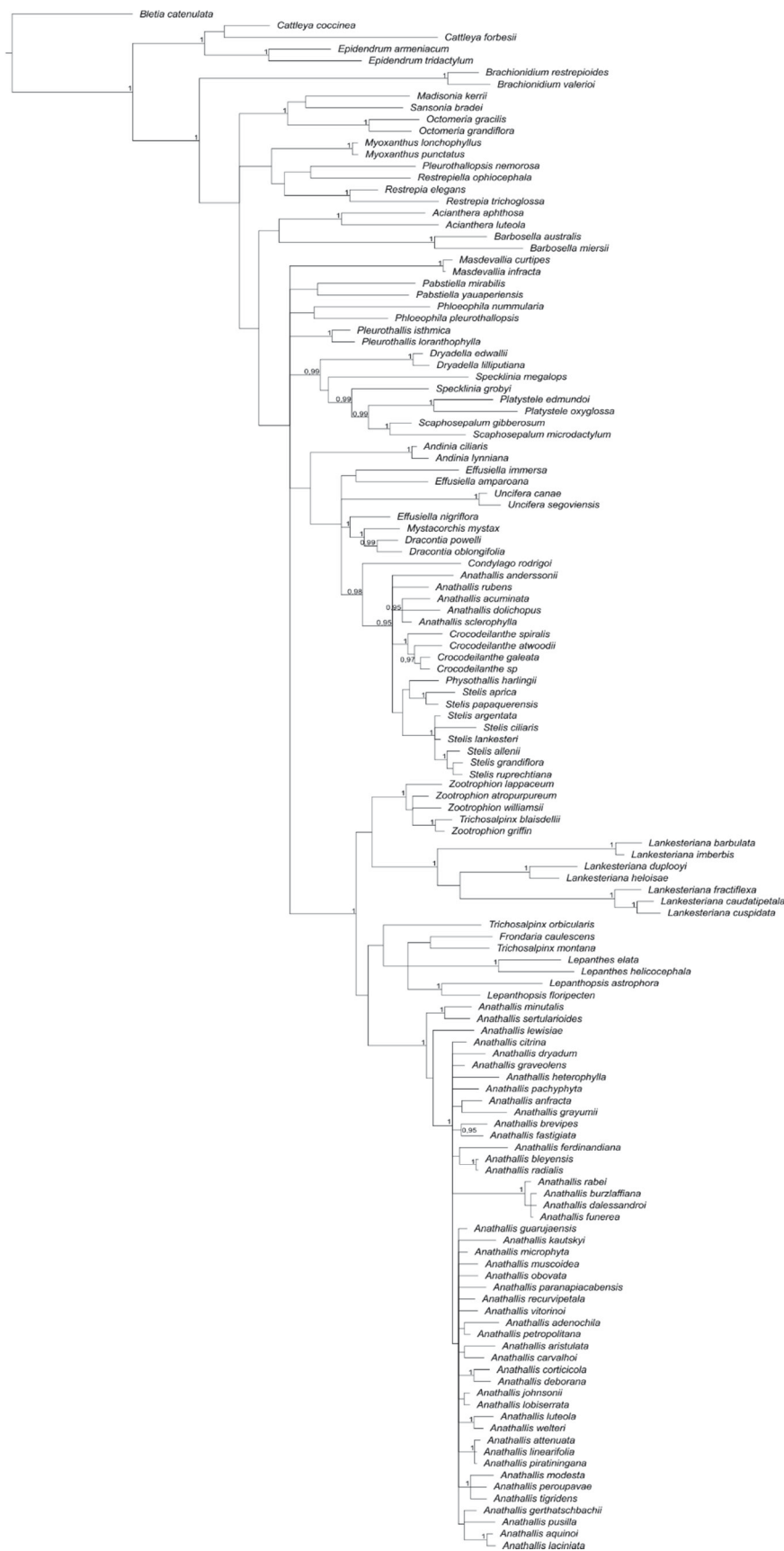
<i>Restrepia elegans</i>	00100011---14100000150000011-0010?30001
<i>Restrepia trichoglossa</i>	00100001---14100000150000011-0010?(1 3)0001
<i>Restrepiella ophiocephala</i>	00(0 1)00001---0211011002110001000000020011
<i>Sansonia bradei</i>	10000002---111010001000000000000110000
<i>Scaphosepalum gibberosum</i>	000010101111510010014001001000011110010
<i>Scaphosepalum microdactylum</i>	100010(0 1)0101(1 2 3)2100001010010000000(0 1)1110010
<i>Specklinia grobyi</i>	000010100(0 1)(0 1)111100002(1 2)0000010000(2 3)0010010
<i>Specklinia megalops</i>	0000101011035200110100100011-0020111110
<i>Stelis allenii</i>	00(0 1)010100011110400042000011000040010000
<i>Stelis aprica</i>	00(0 1)010(0 1)00011(1 2)004000420000100000400(0 2)1000
<i>Stelis argentata</i>	0000101010(0 1)1200411042000011000040020000
<i>Stelis ciliaris</i>	000010(0 1)0001(0 1)200401042000010000040010000
<i>Stelis grandiflora</i>	000010100011(1 2)0040001(1 2)000011000040010000
<i>Stelis lankesteri</i>	000010100011210400042000011000040011000
<i>Stelis papaquerensis</i>	00(0 1)010100011(1 2)00411042000011000040010000
<i>Stelis ruprechtiana</i>	000010100011200400022000011000040010000
<i>Trichosalpinx blaisdellii</i>	00111000000(0 1)(1 2)(0 1)100(0 1)0(0 2 3)20(0 1)00010000(1 2)1?10110
<i>Trichosalpinx montana</i>	0011101011(0 1)10(0 1)00000220000010000(0 1 2)0110000
<i>Trichosalpinx orbicularis</i>	00111000000(0 1)1010000(0 2 3)(1 2)000001000011000110
<i>Uncifera canae</i>	000010(0 1)0101(0 1)1100110(0 2)4000001000020110000
<i>Uncifera segoviensis</i>	000010100(0 1)1(0 1)1100100(0 2 3)(1 2)000001000010110000
<i>Zootrophion atropurpureum</i>	00001001---(0 2 3)1103000(2 3)(2 4)000001000001100000
<i>Zootrophion griffin</i>	00(0 1)010001002110300024000001000010100000
<i>Zootrophion lappaceum</i>	00(0 1)01001---211030001100000000001?1(0 1)0000
<i>Zootrophion williamsii</i>	00001001---011030002(2 6)000001000001100000

---

**Apêndice 4:** Filogenia molecular de Máxima Parcimônia com base na matriz de nrITS, consenso estrito. Acima dos nós estão os valores da porcentagem de *bootstrap*. Valores menores que 70 não foram mostrados.



**Apêndice 5:** Filogenia molecular de Inferência Bayesiana com base na matriz de nrITS. Acima dos nós estão os valores da probabilidade posterior. Valores menores que 0,9 não foram mostrados.



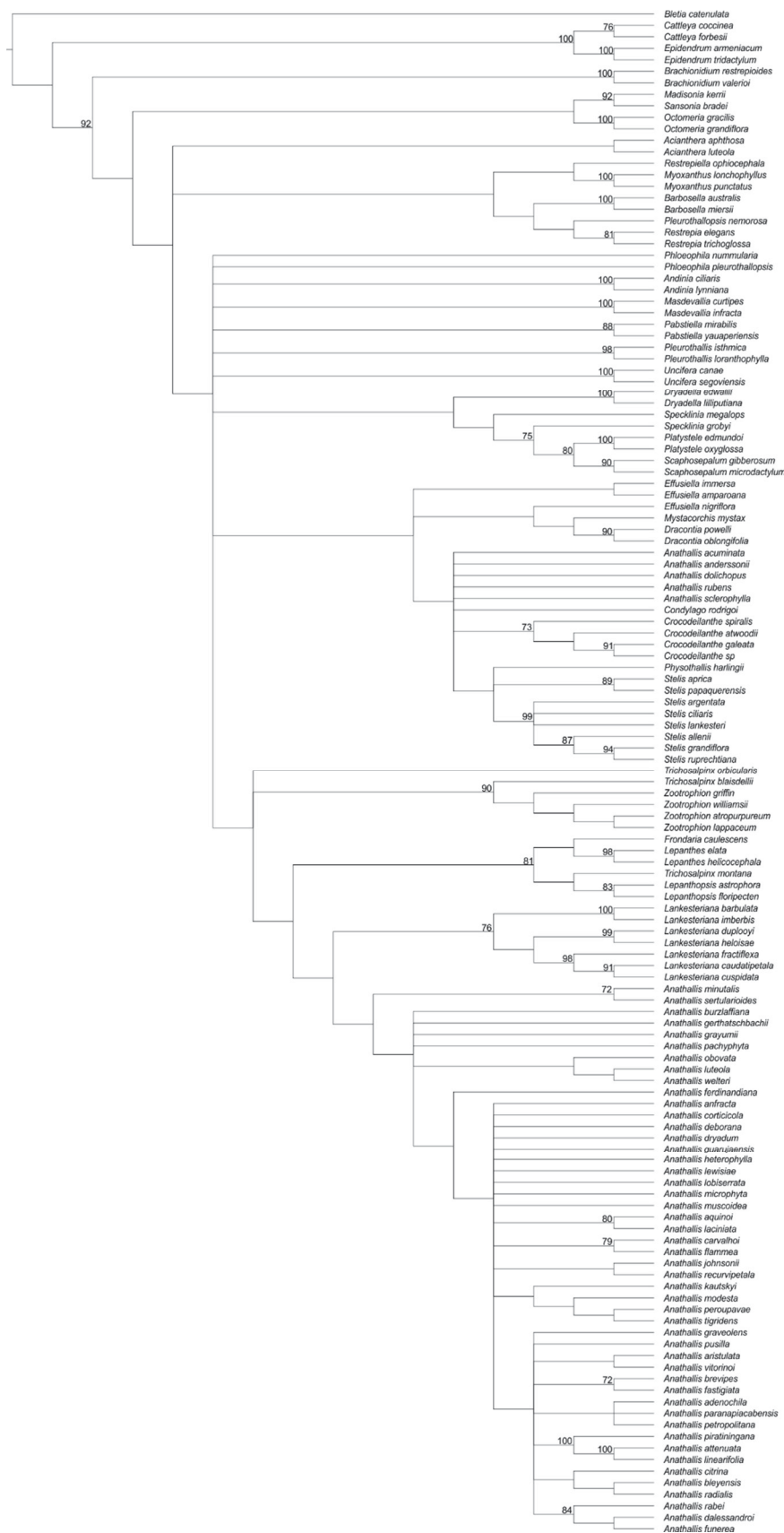
**Apêndice 6:** Filogenia molecular de Máxima Parcimônia com base na matriz de cpDNA, consenso estrito. Acima dos nós estão os valores da porcentagem de *bootstrap*. Valores menores que 70 não foram mostrados.



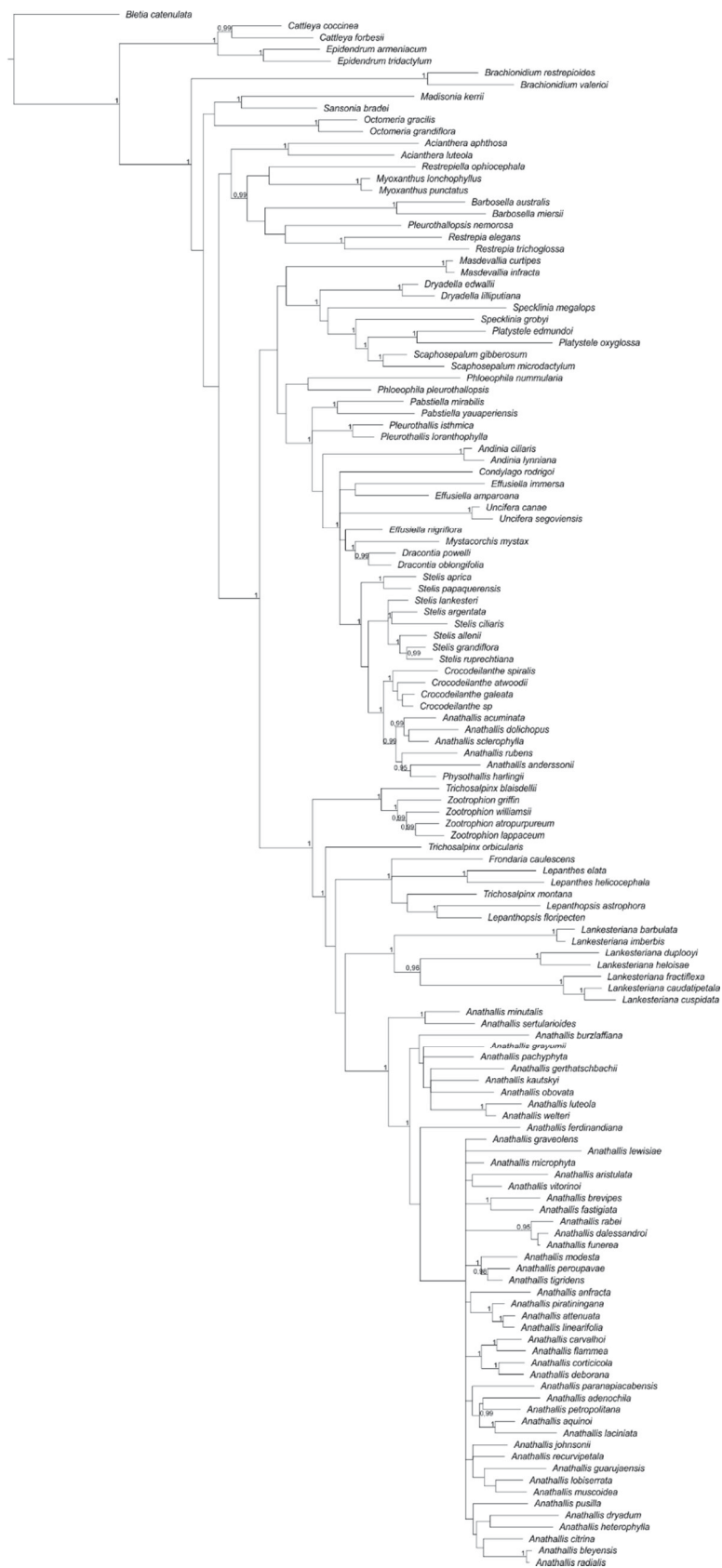
**Apêndice 7:** Filogenia molecular de Inferência Bayesiana com base na matriz de cpDNA. Acima dos nós estão os valores da probabilidade posterior. Valores menores que 0,9 não foram mostrados.



**Apêndice 8:** Filogenia molecular de Máxima Parcimônia com base na matriz de nrITS+cpDNA, consenso estrito. Acima dos nós estão os valores da porcentagem de *bootstrap*. Valores menores que 70 não foram mostrados.



**Apêndice 9:** Filogenia molecular de Inferência Bayesiana com base na matriz de nrITS+cpDNA. Acima dos nós estão os valores da probabilidade posterior. Valores menores que 0,9 não foram mostrados.



## CAPÍTULO 2

*Complete chloroplast genome of Anathallis obovata (Orchidaceae: Pleurothallidinae).*

Anna Victoria Silvério Righetto Mauad<sup>1</sup>, Mônica Bolson<sup>2</sup>, Leila do Nascimento Vieira<sup>1</sup>,  
Valter Antonio de Baura<sup>3</sup>, Eduardo Balsanelli<sup>3</sup>, Emanuel Maltempi de Souza<sup>3</sup>, A. L.  
V. Toscano de Brito<sup>4</sup> and Eric de Camargo Smidt<sup>1</sup>.

Manuscrito formatado para a revista *Brazilian Journal of Botany*. ISSN 0100-8404 (versão impressa) e ISSN 1806-9959 (versão on-line).

---

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Postal box 19031, 81530-900, Curitiba, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil.

<sup>3</sup> Núcleo de Fixação de Nitrogênio, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Postal box 19031, 81530-900, Curitiba, Paraná, Brazil.

<sup>4</sup> Marie Selby Botanical Gardens, 811 South Palm Avenue, Sarasota, Florida 34236, USA. Orchid Herbarium of Oakes Ames, Harvard University Herbaria, 22 Divinity Avenue, Cambridge, Massachusetts 20138, USA.

## Abstract

*Anathallis* (Pleurothallidinae) is a Neotropical orchid genus with over 150 species. Although previous phylogenetic studies suggest the polyphyletism of the genus, there is little information about the group in the literature due to the lack of *Anathallis*-focused molecular studies and the absence of genomic research in Pleurothallidinae. Here we sequenced and characterized the complete plastid genome (plastome) sequence of *A. obovata*, the type-species of the genus. In addition, we compared its structure and gene content with two Pleurothallidinae species: *Masdevallia coccinea* (NC\_026541) and *M. picturata* (NC\_026777.1), and one Laeliinae: *Cattleya crispata* (NC\_026568). The plastome of *A. obovata* is 155,515 bp in length, with a typical quadripartite structure, and presents *accD*, *ndhA*, *ndhB*, *ndhF* genes with premature stop codons that may be related to a pseudogenization process and probably produces non-functional proteins. The whole genome alignment of the four plastomes showed a small inversion (~100 bp) in the *rps11/rpl36* intron when comparing Pleurothallidinae and Laeliinae species, also the deletion of the *ndhf*, *ndhA*, *ndhI* genes and a reduction in length of *ndhH* and *ndhG* in *Cattleya crispata*. In addition, we observed some differences in the IR borders: the IR/SSC boundary is just within the coding sequence of *ycf1* in Pleurothallidinae, creating a short *ycf1* fragment in IR, but in *Cattleya crispata* the SSC contains the *ycf1* gene entirely. The molecular divergences observed between the plastomes of Pleurothallidinae and Laeliinae are possibly intrinsic to the evaluated subtribes.

**Key-words:** *accD*, Epidendroideae, NADH, NGS, *ycf1*.

## Introduction

The chloroplast genome (plastome) is unique, circular and reduced, ranging from 107 to 218 kb in length and containing about 120 genes (Daniell et al 2016). Its structure and gene content are highly conserved (Palmer et al 1988, Tian & Li 2002, Wu et al 2010). In angiosperms, with the exception of some Fabaceae, the plastome has a quadripartite structure: it consists of two inverted regions (IRs) interspersed between two regions called the large single copy region (LSC) and small single copy region (SSC) (Wicke et al 2011, Zhu et al 2016).

With the emergence of next generation sequencing technologies, genome sequencing has become more accessible and widely used in evolutionary and phylogenetic studies because it provides a much larger amount of data than with markers for specific DNA fragments (Yang et al 2013, Rogalski et al 2015, Daniell et al 2016). In Orchidaceae, plastome sequences have been used to study the evolution of *ndh* genes encoding NADH dehydrogenase (Kim et al 2015, Lin et al 2015, 2017) and the plastome evolution in heterotrophic species (Barret et al 2004, Schelkunov et al to 2015, Feng et al 2016, Graham et al 2017). In addition, the general structure of plastomes has been described and compared with the purpose of finding more informative regions for phylogenetic analyses and inferring about the evolutionary dynamics of botanical families (Niu et al 2017) and lower taxonomic groups (Yang et al 2013, Luo et al 2014, Perini et al 2015).

After heterotrophic orchids, some groups of the subfamily Epidendroideae, mainly the subtribes Cymbidiinae and Dendrobiinae, have been the focus of genomic studies in Orchidaceae due to their large number of species and the economic importance. However, there is still much to be studied in this subfamily. One example is the absence of genomic studies focused on the subtribe Pleurothallidinae (Epidendroideae, Epidendrae), a group composed of ca. 5,000 species (Karremans 2016) occurring exclusively in the Neotropics (Pridgeon 2005), representing about 20% of the richness of the whole Orchidaceae. To date, there are only two

plastomes of representatives of this subtribe in the NCBI database (GenBank), both of the genus *Masdevallia* Lindl.

The genus *Anathallis* Barb.Rodr. belongs to subtribe Pleurothallidinae. It comprises more than 150 species (Chase et al 2015) distributed from the Greater Antilles and southern Mexico to Brazil, Bolivia and Argentina (Pridgeon 2005), with *A. obovata* (Lindl.) Pridgeon & M.W. Chase as type species. Although no genome-based phylogenetic studies have been performed, there is evidence that it is polyphyletic (Chiron et al 2012, Karremans et al 2013, Karremans 2014).

In this study, we aimed to report the complete chloroplast genome sequence of *Anathallis obovata*, describing its structure and gene composition. In addition, we compare it with the available plastomes of the genus *Masdevallia* and *Cattleya crispata* (Thunb.) Van den Berg, from the subtribe Laeliinae, the sister group of Pleurothallidinae (Chase et al 2015), in order to find molecular variation patterns.

## Material and Methods

The fresh leaf material of *Anathallis obovata* was collected from an individual in a greenhouse at the Federal University of Paraná (UFPR) (voucher: M.C. Santos 22, UPCB). The chloroplast isolation was performed according to the protocol developed by Vieira et al (2014), adapted for few amounts of tissue (Sakaguchi et al 2017). Chloroplast DNA (cpDNA) was extracted according to Doyle & Doyle (1987), scaled to 2 ml. Purification of cpDNA was performed with DNA Clean and Concentrator kit (Zymo Research, Orange, CA).

Approximately 1 ng of purified cpDNA was used for library preparation with the Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina Inc., San Diego, CA), following the manufacturer's instructions. The sequencing was performed through Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA) platform.

The 1,378,072 reads obtained from sequencing were imported as Illumina's fastQ file in CLC Genomics Workbench v.11.0 (<http://www.qiagenbioinformatics.com>). The reads were filtered by quality with error probability limit of 0.05, remaining 1,267,373 reads. A hybrid reference-guided *de novo* assembly approach was used to obtain the complete genome sequence, using *Masdevallia coccinea* Linden ex Lindl. (NC\_026541) as reference genome sequence.

The final consensus sequence was imported into the online Dual Organellar Genome Annotation (DOGMA) program (Wyman et al 2004) for the preliminary annotation of the genes. Determination of correct positioning of start and stop codons and introns were made based on comparisons with homologous genes from other plastomes available on GenBank. The plastome plot was obtained from the online program Organellar Genome DRAW (OGDRAW) (Lohse et al 2007, 2013), and the plastome nucleotide sequence was submitted to GenBank under accession number MH979332.

To verify structural differences between the plastomes of *Anathallis obovata*, *Cattleya crispata* (NC\_026568), *Masdevallia coccinea* and *M. picturata* Rchb.f. (NC\_026777.1) a Mauve alignment with the progressive Mauve algorithm (Darling et al 2004) was performed through the Geneious R7 program (Kearse et al 2012). The IR borders of the plastomes were compared visually in the same program.

## Results

The plastome of *Anathallis obovata* is a circular molecule of 155,515 bp arranged in the typical quadripartite structure: the LSC has 83,722 bp, each IR has 26,930 bp, and the SSC 17,933 bp. It encodes 113 genes, being 79 protein coding, 30 of tRNA and 4 of rRNA (Table 1). Some of these genes are duplicated in the IRs (Fig. 1), which are: all rRNA-coding, 8 tRNA-coding and 20 protein-coding, of which the *ycf1* gene is only partially duplicated gene (Table 1). The majority of genes have only one exon, 15 are composed of two exons (9 protein-coding and 6 tRNA-coding), and the *clpP*, *rps12* and *ycf3* genes have three exons (Table 1).

From the referenced annotation of plastid genes of *Anathallis obovata* we verify the presence of premature stop codons in the *accD* and *ndhF* genes, in the larger copy of *ycf1* and in the first exon of the *ndhA* and *ndhB* genes (in both copies). In the former three genes this results in a reduction of approximately 380, 230 and 270 aa, respectively. Similarly, the premature stop codons in the first exon of the *ndhA* and *ndhB* genes cause a decrease of about 100 aa in both protein products. These cases may be related to a pseudogenization process and may result in non-functional proteins.

## Discussion

The percentage of reads mapped in the referenced assembly (16.1%) is similar to that found by Sakaguchi et al (2017), of 14.7%, when establishing the adaptation of the chloroplast isolation protocol proposed by Vieira et al (2014). Besides requiring only 2 g of leaf material instead of 20 g, which is very advantageous because of the small size of the individuals of the Pleurothallidinae subtribe, the adapted protocol that we followed in this study results in a high-quality chloroplast isolation. Although most of the reads acquired in the sequencing referred to non-plastidial sequences, the percentage of reads pertaining to cpDNA was enough for the successful assembly of *A. obovata* plastome, with a high depth of coverage (~ 160x).

The Mauve alignment indicated that there are no major structural differences between the analysed plastomes, only an inversion of ~100 bp in the *rps11/rpl36* intron when comparing Laeliinae and Pleurothallidinae plastomes. Moreover, there is a slight length variation of the LSC, IRs and SSC regions (Table 2). The SSC region of *Cattleya crispata* is considerably smaller than the other three plastomes, about 5 kb, due to the deletion of the *ndhA*, *ndhF* and *ndhI* genes and the smaller copy of the *ycf1* gene. Furthermore, all genes of the *ndh* family are probably pseudogenes, with the exception of *ndhE*. The other three plastomes have all the *ndh* genes, but in *Anathallis obovata* the genes *ndhA*, *ndhB* and *ndhF* have premature stop codons. This observation is corroborated by the results of Luo et al (2014), who compared different plastomes of the subfamily Epidendroideae and found that closely related species show a similar pattern of variation of *ndh* gene content.

The *ndh* family comprises 11 genes that act on electron transport in photosystem I (Martín & Sabater 2010). However, in the Orchidaceae family there is a great variation in the retention / deletion of the *ndh* genes along the lineages, suggesting the occurrence of multiple independent events of loss of these genes during the evolution of the orchids (Kim et al 2015, Lin et al 2015, Niu et al 2017). Because they are important genes for photosynthesis, there is

the possibility of functional copies in the nuclear genome (Chang et al 2006). However, from transcriptome analyses in species lacking the *ndh* genes in plastome, traces of functional copies of these genes in the other genomes were not found (Johnson et al 2012, Lin et al 2015).

It is believed that *ndh* genes are dispensable in contemporary plants because there are no deleterious effects on species that do not possess these genes (Ruhlman et al 2015). Also, the existence of an alternative route for the transport of electrons in photosystem I, the cyclic electron transport pathway PGR5-dependent, make the *ndh* family redundant in the genome (Munekage et al 2002, 2004, DalCorso et al 2008, Niu et al 2017).

Kim et al (2015) suggested that there is a strong relationship between the loss of the *ndh* genes and the instability in IR/SSC boundaries due to the great structural variation of plastomes of mycoheterotrophic orchid (Delannoy et al 2011, Logacheva et al 2011, Barret & Davis 2012). Besides that, it was observed that there was an expansion of the IRs in plastomes of gnetophytes and conifers (Braukman et al 2009, Wu et al 2009, 2011), of orchids (Chang et al 2006, Wu et al 2010, Kim et al 2015, Lin et al 2015, Niu et al 2017) and of *Najas flexilis* (Willd.) Rostk. and Schmidt (Peredo et al 2013) with deletion of the total or partial set of *ndh* genes.

In this study, we also observed variations in the IR/LSC borders between the four plastomes analysed (Fig. 2). The *rpl22* gene has 366 bp and belongs entirely in LSC region, but in *Masdevallia coccinea* it has 102 bp in the IR<sub>A</sub>, producing a copy of this size in the IR<sub>B</sub>. Conversely, the *rps19* gene has 279 bp and is presented in two copies in the IRs, but in *M. picturata* it has 207 bp in the LSC, making the copy on the IR<sub>B</sub> to be truncated, with only 72 bp.

Other differences between the plastomes were observed in the IR/SSC borders (Fig. 2). The *ycf1* gene is located in the SSC with a 3' portion occupying the IR, producing a smaller copy in the other IR. In *Anathallis obovata* this gene has a premature stop codon, and in *Cattleya crispata* it is entirely in SSC, therefore the smaller copy is absent in this plastome. Similarly,

the *ndhF* gene is absent in *Cattleya coccinea* and has a premature stop codon in *Anathallis obovata*, while in both *Masdevallia* plastomes this gene is complete, overlapping 73 bp with *ycf1*, of which 64 bp are in IR<sub>A</sub>.

From the comparison of only four plastomes, three of them of subtribe Pleurothallidinae, it was possible to observe a considerable molecular variation. This indicates that future studies focused on the subtribe should sequence chloroplast genomes of more genera to understand the molecular evolution of the group. Also, with the large amounts of data generated by the next generation sequencing, explore variable molecular markers to be used in phylogenetic inference.

## References

- Barbosa Rodrigues J. 1877. Gen Sp Orchid. Sebastianopolis, Brazil.
- Barret CF, Davis JI. 2012. The plastid genome of the mycoheterotrophic *Corallorhiza striata* (Orchidaceae) is in the relatively early stages of degradation. *Am J Bot* 99: 1513-1523.  
<https://doi.org/10.3732/ajb.1200256>.
- Barret CF, Freudenstein JV, Li J, Mayfield-Jones DR, Perez L, Pires JC, Santos C. 2014. Investigating the path of plastid genome degradation in an early-transitional clade of heterotrophic orchids, and implications for heterotrophic Angiosperms. *Mol Biol Evol* 31: 3095-3112.
- Braukmann TW, Kuzmina M, Stefanovic S. 2009. Loss of all plastid *ndh* genes in Gnetales and conifers: extent and evolutionary significance for the seed plant phylogeny. *Curr Genet* 55: 323-337.  
<https://doi.org/10.1007/s00294-009-0249-7>.
- Chang CC, Lin HC, Lin IP, Chow TY, Chen HH, Chen WH, Cheng CH, Lin CY, Liu SM, Chang CC, Chaw SM. 2006. The chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* (Orchidaceae): comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and its phylogenetic implications. *Mol Biol Evol* 23: 279-291.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msj029>.
- Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar G, Van den Berg C, Schuiteman A. 2015. An updated classification of Orchidaceae. *Bot J Linean Soc* 177: 151-174.
- Chiron GR, Guiard J, Van den Berg C. 2012. Phylogenetic relationships in Brazilian *Pleurothallis* sensu lato (Pleurothallidinae, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences. *Phytotaxa* 46: 34-58.

- DalCorso G, Pesaresi P, Masiero S, Aseeva E, Schünemann D, Finazzi G, Joliot P, Barbato R, Leister D. 2008. A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electric flow in *Arabidopsis*. *Cell* 132: 273-285.
- Daniell H, Lin CS, Yu M, Chang WJ. 2016. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biol Evol* 17: 134.  
<http://doi.org/10.1186/s13059-016-1004-2>.
- Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. 2004. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 14: 1394-1403.  
<https://doi.org/10.1101/gr.2289704>.
- Dellano E, Fujii S, Colas des Francs-Small C, Brundrett M, Small, I. 2011. Rampant gene loss in the underground orchid *Rhizanthella gardneri* highlights evolutionary constraints on plastid genomes. *Mol Biol Evol* 28: 2077-2086.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msr028>.
- Doyle J, Doyle J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 810-815.
- Feng Y, Wicke S, Li J, Han Y, Lin C, Li D, Zhou T, Huang W, Huang L, Jin X. 2016. Lineage-specific reductions of plastid genomes in an orchid tribe with partially and fully mycoheterotrophic species. *Genome Biol Evol* 8: 2164-2175.
- Graham SW, Lam VKY, Merckx VSFT. 2017. Plastomes on the edge: the evolutionary breakdown of mycoheterotroph plastid genomes. *New Phytol* 214: 48-55.
- Johnson MT, Carpenter EJ, Tian Z, Bruskiewich R, Burris JN, Carrigan CT, Chase MW, Clarke ND, Covshoff S, dePamphilis CW, Edger PP, Goh F, Graham S, Greiner S, Hibberd JM, Jordon-Thaden I, Kutchan TM, Leebens-Mack J, Melkonian M, Miles N, Myburg H, Patterson J, Pires JC, Ralph P, Rolf M, Sage RF, Soltis D, Soltis P, Stevenson D, Stewart Jr CN, Surek B, Thomsen CJM, Villarreal JC, Wu X, Zhang Y, Deyholos

- MK, Wong GKS. 2012. Evaluating methods for isolating total RNA and predicting the success of sequencing phylogenetically diverse plant transcriptomes. *PLoS One* 7: e50226.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050226>.
- Karremans AP. 2014. *Lankesteriana*, a new genus in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Lankesteriana* 13: 319-332.
- Karremans AP. 2016. Genera Pleurothallidarum: and updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. *Lankesteriana* 16: 219-242.
- Karremans AP, Bakker FT, Pupulin F, Solano-Gómez R, Smulders MJM. 2013. Phylogenetics of *Stelis* and closely related genera (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Syst Evol* 299: 151-176.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.
- Kim HT, Kim JS, Moore MJ, Neubig KM, Williams NH, Whitten WM, Kim J. 2015. Seven new complete plastome sequences reveal rampant independent loss of the *ndh* gene family across orchids and associated instability of the Inverted Repeat/ Small Single Copy region boundaries. *PLoS One* 10: e0142215.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142215>.
- Lin C, Chen JJW, Chiu C, Hsiao HCW, Yang C, Jin X, Leebens-Mack J, Pamphilis CW, Huang Y, Yang L, Chang W, Kui L, Wong GK, Hu J, Wang W, Shih M. 2017. Concomitant loss of *ndh* complex-related genes with chloroplast and nuclear genomes in some orchids. *Plant J* 90: 994-1006.

<https://doi.org/10.1111/tpj.13525>.

Lin C, Chen JJW, Huang Y, Chan M, Daniell H, Chang W, Hsu C, Liao D, Wu F, Lin S, Liao C, Deyholos MK, Wong GK, Albert VA, Chou M, Chen C, Shih M. 2015. The location and translocation of *ndh* genes of chloroplast origin in the Orchidaceae family. *Sci Rep* 5: 9040.

<https://doi.org/10.1038/srep09040>.

Logacheva MD, Schelkunov MI, Penin AA. 2011. Sequencing and analysis of plastid genome in mycoheterotrophic orchid *Neottia nidus-avis*. *Genome Biol Evol* 3: 1296-1303.

<https://doi.org/10.1093/gbe/evr102>.

Lohse M, Drechsel O, Bock R. 2007. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) - a tool for the easy generation of high-quality custom graphical maps of plastid and mitochondrial genomes. *Curr Genet* 52: 267-274.

<https://doi.org/10.1007/s00294-007-0161-y>.

Lohse M, Drechsel O, Kahlau S, Bock R. 2013. OrganellarGenomeDRAW: a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets. *Nucleic Acids Res* 41: W575-W581.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkt289>.

Luo J, Hou B, Niu Z, Liu W, Xue Q, Ding X. 2014. Comparative chloroplast genomes of photosynthetic orchids: insights into evolution of the Orchidaceae and development of molecular markers for phylogenetic applications. *PLoS One* 9: e99016.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099016>.

Martín M, Sabater B. 2010. Plastid *ndh* genes in plant evolution. *Plant Physiol Biochem* 48: 636-645.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.04.009>.

- Munekage Y, Hojo M, Meurer J, Endo T, Tasaka M, Shikanai T. 2002. *PGR5* is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell* 110: 361-371.
- Munekage Y, Hashimoto M, Miyake C, Tomizawa K, Endo T, Tasaka M, Shikanai T. 2004. Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429: 579-582.  
<https://doi.org/10.1038/nature02598>.
- Niu Z, Xue Q, Zhu S, Sun J, Liu W, Ding X. 2017. The complete plastome sequences of four orchid species: insights into the evolution of Orchidaceae and the utility of plastomic mutational hotspots. *Front Plant Sci* 8: 715. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00715>.
- Palmer JD, Jansen RK, Michaels HJ, Chase MW, Manhart JR. 1988. Chloroplast variation and plant phylogeny. *Ann Mo Bot Gard* 75: 1180-1206.
- Pan IC, Liao DC, Wu FH, Daniell H, Singh ND, Chang C, Shih MC, Chan MT, Lin CS. 2012. Complete chloroplast genome sequence of an orchid model plant candidate: *Erycina pusilla* apply in tropical *Oncidium* breeding. *PLoS One* 7: e34738.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034738>.
- Peredo EL, King, UM, Les DH. 2013. The plastid genome of *Najas flexilis*: adaptation to submersed environments is accompanied by the complete loss of NDH complex in an aquatic angiosperm. *PLoS One* 8: e68591.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068591>.
- Perini VR, Leles B, Furtado C, Prosdocimi F. 2015. Complete chloroplast genome of the orchid *Cattleya crispata* (Orchidaceae: Laeliinae), a Neotropical rupicolous species. *Mitochondrial DNA* 27: 1-3.  
<https://doi.org/10.3109/19401736.2014.1003850>.

- Pridgeon AM. 2005. Subtribe Pleurothallidinae. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. *Genera Orchidacearum IV: Epidendroidae (Part One)*. Oxford University Press, Oxford, pp. 405-412.
- Rogalski M, Vieira LN, Fraga HPF, Guerra MP. 2015. Plastid genomics in horticultural species: importance and applications for plant population genetics, evolution, and biotechnology. *Front Plant Sci* 6: 586. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00586>
- Ruhlman TA, Chang WJ, Chen JJ, Huang YT, Chan MT, Jin Z, Liao DC, Blazier JC, Jin X, Shih MC, Jansen RK, Lin CS. 2015. NDH expression marks major transitions in plant evolution and reveals coordinate intracellular gene loss. *BMC Plant Biol* 15: 100. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0484-7>.
- Sakaguchi S, Ueno S, Tsumura Y, Setoguchi H, Ito M, Hattori C, Nozoe S, Takahashi D, Nakamasu R, Sakagami T, Lannuzel G, Fogliani B, Wulff AS, L'Hullier L, Isagi Y. 2017. Application of a simplified method of chloroplast enrichment to small amounts of tissue for chloroplast genome sequencing. *Appl Plant Sci* 5: 1700002. <https://doi.org/10.3732/apps.1700002>.
- Schelkunov MI, Shtratnikova VY, Nuraliev MS, Selosse M, Penin AA, Logacheva MD. 2015. Exploring the limits for reduction of plastid genomes: a case study of the mycoheterotrophic orchids *Epipogium aphyllum* and *Epipogium roseum*. *Genome Biol Evol* 7: 1179-1191.
- Tian X, Li DZ. 2002. Application of DNA sequences in plant phylogenetic study. *Acta Bot Yunnanica* 24: 170-184.
- Vieira LN, Faoro H, Fraga HPF, Rogalski M, Souza EM, Pedrosa FO, Nodari RO, Guerra MP. 2014. An improved protocol for intact chloroplasts and cpDNA isolation in conifers. *PLoS One* 9: e84792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084792>.

- Whicke S, Schneeweiss GM, dePamphilis CW, Müller KF, Quandt D. 2011. The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. *Plant Mol Biol* 76: 273-297.  
<https://doi.org/10.1007/s11103-011-9762-4>.
- Wu CS, Lai YT, Lin CP, Wang YN, Chaw SM. 2009. Evolution of reduced and compact chloroplast genomes (cpDNAs) in gnetophytes: selection toward a lower-cost strategy. *Mol Phylogenetics Evol* 52: 243-254.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.12.026>.
- Wu CS, Wang YN, Hsu CY, Lin CP, Chaw SM. 2011. Loss of different inverted repeat copies from the chloroplast genomes of Pinaceae and Cupressophytes and influence of heterotachy on the evaluation of gymnosperm phylogeny. *Genome Biol Evol* 3: 1284-1295.  
<https://doi.org/10.1093/gbe/evr095>.
- Wu FH, Chan MT, Liao DC, Hsu CT, Lee YW, Daniell H, Duvall MR, Lin CS. 2010. Complete chloroplast genome of *Oncidium* Gower Ramsay and evaluation of molecular markers for identification and breeding in Oncidiinae. *BMC Plant Biol* 10: 68.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-68>.
- Wyman SK, Jansen RK, Boore JL. 2004. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics* 20: 3252-3255.
- Yang J, Tang M, Li H, Zhang Z, Li D. 2013. Complete chloroplast genome of the genus *Cymbidium*: lights into the species identification, phylogenetic implications and population genetic analyses. *BMC Evol Biol* 13: 84.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-84>.

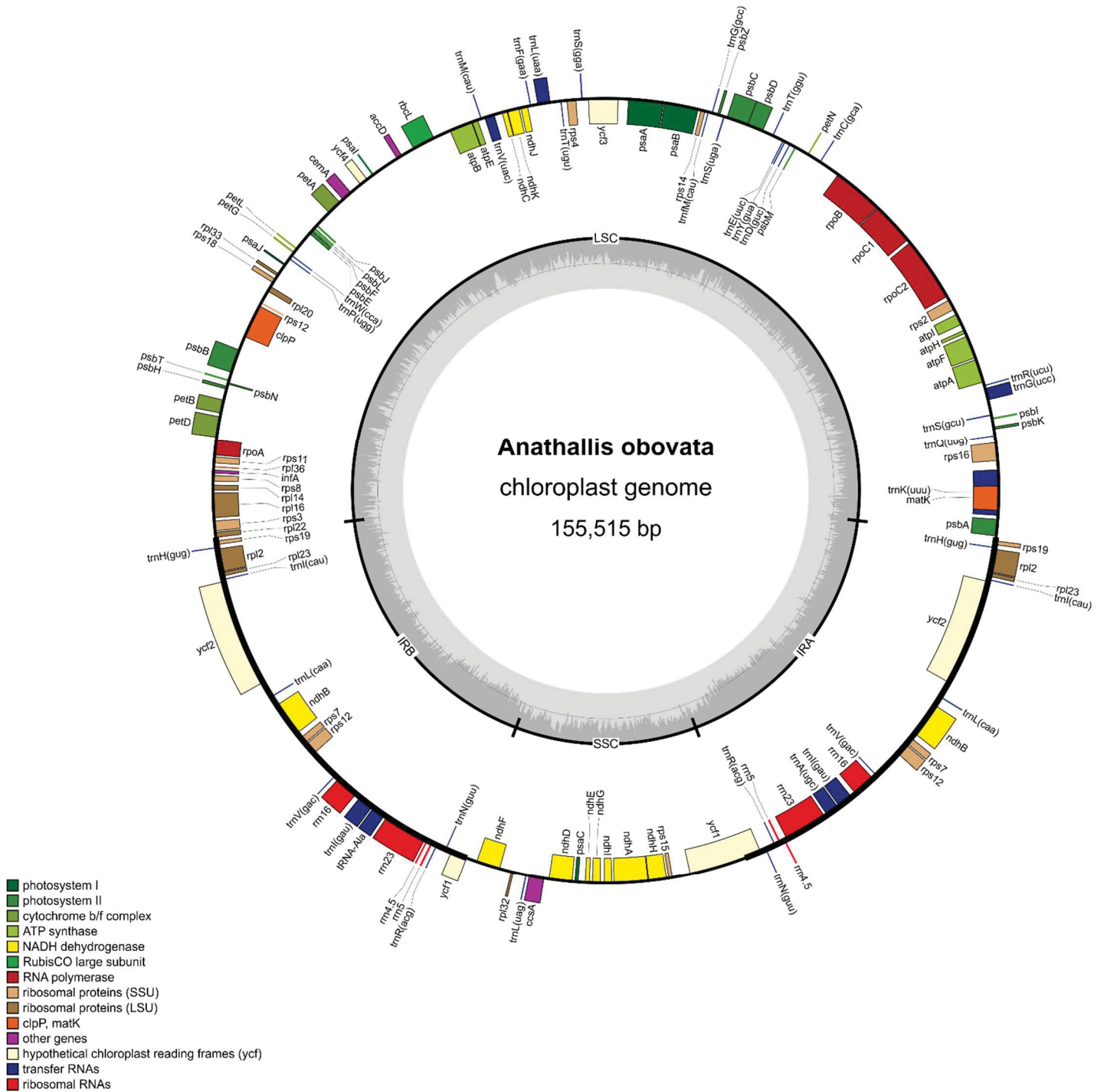
Zhu A, Guo W, Gupta S, Fan W, Mower JP. 2016. Evolutionary dynamics of the plastid inverted repeat: the effects of expansion, contraction, and loss on substitution rates. *New Phytol* 209: 1747-1756.  
[https:// doi.org/10.1111/nph.13743](https://doi.org/10.1111/nph.13743).

**Authors' contributions**

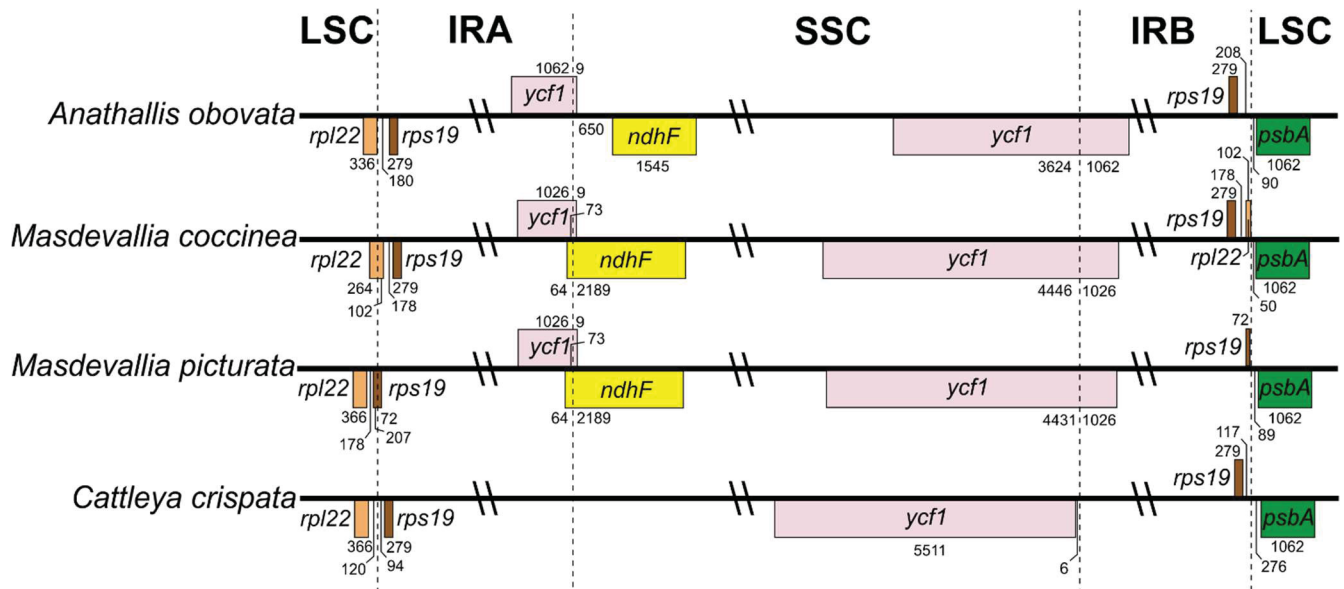
AVSRM, ECS, LNV and ALVTB designed research; AVSRM, ECS, collected samples; AVSRM, MB, LNV, VAB, EB and EMS performed the lab work; AVSRM, ECS, and LNV performed all analyses; AVSRM, ECS, LNV and ALVTB wrote the manuscript.

**Acknowledgements**

We thank Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade/Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO/ICMBio) for the collecting permits. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) with scholarships granted to AVSRM (134737/2016-4). ALVTB thanks for grant Programa Pesquisador Visitante Especial (PVE), 88881.065009/2014-0, Finance Code 001." ECS thanks Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for grant Bolsa de Produtividade em Pesquisa do CNPq-Nível 2 (Proc. 308460/2017-0).



**Figure 1:** Map of *Anathallis obovata* complete chloroplast genome sequence. The IRs are represented by the thick lines, and the genes by coloured rectangles. Genes inside the circle are transcribed clockwise, and those outside the circle are transcribed counter clockwise.



**Figure 2:** Comparison scheme of the IR borders in the four plastomes analysed. The numbers indicate the lengths of genes, intergenic spacers and distance between IR/LSC and IR/SSC junctions in base pairs.

**Table 1:** List of genes identified in the plastome of *Anathallis obovata*.

Group of gene	Gene name
<b>Gene expression machinery</b>	
Ribosomal RNA genes	<i>rrn4.5<sup>b</sup>; rrn5<sup>b</sup>; rrn16<sup>b</sup>; rrn23<sup>b</sup></i>
Transfer RNA genes	<i>trnA</i> –UGC <sup>ab</sup> ; <i>trnC</i> –GCA; <i>trnD</i> –GUC; <i>trnE</i> –UUC; <i>trnF</i> –GAA; <i>trnFM</i> –CAU; <i>trnG</i> –GCC; <i>trnG</i> –UCC <sup>a</sup> ; <i>trnH</i> –GUG <sup>b</sup> ; <i>trnI</i> –CAU <sup>b</sup> ; <i>trnI</i> –GAU <sup>ab</sup> ; <i>trnK</i> –UUU <sup>a</sup> ; <i>trnL</i> –CAA <sup>b</sup> ; <i>trnL</i> –UAA <sup>a</sup> ; <i>trnL</i> –UAG; <i>trnM</i> –CAU; <i>trnN</i> –GUU <sup>b</sup> ; <i>trnP</i> –UGG; <i>trnQ</i> –UUG; <i>trnR</i> –ACG <sup>b</sup> ; <i>trnR</i> –UCU; <i>trnS</i> –GCU; <i>trnS</i> –GGA; <i>trnS</i> –UGA; <i>trnT</i> –GGU; <i>trnT</i> –UGU; <i>trnV</i> –GAC <sup>b</sup> ; <i>trnV</i> –UAC <sup>a</sup> ; <i>trnW</i> –CCA; <i>trnY</i> –GUA
Small subunit of ribosome	<i>rps2; rps3; rps4; rps7<sup>b</sup>; rps8; rps11; rps12<sup>ab</sup>; rps14; rps15; rps16<sup>a</sup>; rps18; rps19<sup>b</sup></i>
Large subunit of ribosome	<i>rpl2<sup>ab</sup>; rpl14; rpl16<sup>a</sup>; rpl20; rpl22; rpl23<sup>b</sup>; rpl32; rpl33; rpl36</i>
DNA-dependent RNA polymerase	<i>rpoA; rpoB; rpoC1<sup>a</sup>; rpoC2</i>
Translational initiation factor	<i>infA</i>
Maturase	<i>matK</i>
<b>Genes for photosynthesis</b>	
Subunits of photosystem I (PSI)	<i>psaA; psaB; psaC; psal; psaJ; ycf3<sup>a</sup>; ycf4</i>
Subunits of photosystem II (PSII)	<i>psbA; psbB; psbC; psbD; psbE; psbF; psbH; psbI; psbJ; psbK; psbL; psbM; psbN; psbT; psbZ</i>
Subunits of cytochrome <i>b<sub>6</sub>f</i>	<i>petA; petB<sup>a</sup>; petD<sup>a</sup>; petG; petL; petN</i>
Subunits of ATP synthase	<i>atpA; atpB; atpE; atpF; atpH; atpI</i>
Subunits of NADH dehydrogenase	<i>ndhA<sup>a</sup>; ndhB<sup>ab</sup>; ndhC; ndhD; ndhE; ndhF; ndhG; ndhH; ndhI; ndhJ; ndhK</i>
Large subunit of Rubisco	<i>rbcL</i>
<b>Other functions</b>	
Envelope membrane protein	<i>cemA</i>
Subunit of acetyl-CoA carboxylase	<i>accD</i>
C-type cytochrome synthesis	<i>ccsA</i>
Subunit of protease Clp	<i>clpP<sup>a</sup></i>
Component of TIC complex	<i>ycf1<sup>c</sup></i>
Unknown function	<i>ycf2<sup>b</sup></i>

<sup>a</sup> Genes containing introns<sup>b</sup> Duplicated genes<sup>c</sup> Partially duplicated genes**Table 2:** General features of plastid genomes analysed in this study.

Plastome	Total cpDNA size (bp)	Length of LSC region (bp)	Length of IR regions (bp)	Length of SSC region (bp)	% GC
<i>Anathallis obovata</i>	155,515	83,722	26,930	17,933	37.1
<i>Cattleya crispata</i>	148,343	85,756	24,711	13,165	37.3
<i>Masdevallia coccinea</i>	157,423	84,957	27,009	18,448	36.8
<i>Masdevallia picturata</i>	156,045	84,948	26,534	18,029	36.9

## CONCLUSÃO FINAL

Os resultados corroboram em grande parte a literatura quanto à organização dos principais gêneros da subtribo Pleurothallidinae nos grupos artificiais, e posicionam o gênero *Brachionidium* como o mais basal da subtribo, reforçando como sendo as características mais basais da subtribo o hábito predominantemente reptante, flores solitárias ou inflorescências paucifloras e múltiplas políneas. Também estão de acordo com trabalhos anteriores quanto ao polifiletismo do gênero *Anathallis*, pois táxons pertencentes ao grupo *Acuminatae* foram inclusos no clado referente a *Stelis* s.l. Bem como reforçam que espécies pertencentes ao gênero *Lankesteriana* formam um grupo monofilético que é irmão do clado de *Anathallis* s.s., com alto suporte estatístico. Porém, em contraste com a literatura, *Stelis* s.s. forma um clado dentro de *Stelis* s.l., possibilitando o restabelecimento de gêneros antigos como *Condylago*, *Crocodelanthe*, *Dracontia*, *Mystacorchis* e *Uncifera*, assim como abre a possibilidade de que o grupo *Acuminatae* venha a ser elevado ao nível de gênero em trabalhos futuros.

Este trabalho representa a primeira investigação acerca da existência de significado evolutivo nos grupos morfológicos do gênero *Anathallis*, com a conclusão de que somente *Acuminatae* e *Margaritifera* de fato representam grupos naturais. Também de maneira inédita foram apresentadas análises filogenéticas com uma amostragem robusta de *Anathallis*, com maior número de espécies e as espécies-tipo de todos os grupos morfológicos, além do sequenciamento de seis regiões moleculares (além das comumente utilizadas, nrITS e *matK*) e da codificação de caracteres morfológicos.

Mesmo com a grande quantidade de dados empregados nas análises, não foi possível obter uma resolução satisfatória dos nós internos de *Anathallis*, cuja causa foi identificada como pouca variação molecular entre as espécies devido ao baixo comprimento dos ramos observado nas análises de inferência Bayesiana e provavelmente à origem recente do grupo. Isso indica a necessidade de estudos filogenéticos que utilizem marcadores moleculares ainda mais variáveis para desvendar as relações infragenéricas de *Anathallis*.

Ainda, neste estudo foi verificada uma grande melhora na informatividade das análises filogenéticas com a inclusão de dados morfológicos, que até então não eram codificados em análises moleculares em Pleurothallidinae devido ao grande número de homoplasias. Assim, a codificação de mais caracteres morfológicos, principalmente florais e micromorfológicos, é viável e pode ser decisiva para a separação de espécies muito próximas molecularmente como em *Anathallis*.

Estudos genômicos em Pleurothallidinae são ainda mais urgentes, pois um conhecimento mais robusto acerca da biologia molecular do grupo pode indicar regiões do genoma ainda melhores a serem exploradas em análises filogenéticas. Este trabalho, ainda, dá um pontapé inicial na área de pesquisa genômica na subtribo ao sequenciar o genoma cloroplastidial completo de *Anathallis obovata* e compará-lo com plastomas de espécies próximas. A partir disso, foram observadas diferenças na composição dos genes *ndh* entre os plastomas de Pleurothallidinae e Laeliinae, além de variações nas bordas das IRs e diferentes processos de pseudogenização entre o plastoma de *Anathallis obovata* e os de outras pleurothalidíneas. Esses resultados abrem caminhos para futuros estudos genômicos na subtribo, com o sequenciamento de genomas de mais espécies de diferentes grupos para a realização de análises comparativas e filogenômicas, e, com isso, compreender a dinâmica evolutiva do grupo.

## REFERÊNCIAS

ANTONELLI, A.; NYLANDER, J.A.A.; PERSSON, C.; SANMARTÍN, I. **Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.106, n.24, p.9749-9754, 2009.

BARBOSA RODRIGUES, J. **Genera et Species Orchidearum Novarum I**. Sebastianopolis, pp. 23, 1877.

BARRET, C.F.; DAVIS, J.I. **The plastid genome of the mycoheterotrophic *Corallorhiza striata* (Orchidaceae) is in the relatively early stages of degradation**. American Journal of Botany, v. 99, p.1513-1523, 2012.

BARRET, C.F.; FREUDENSTEIN, J.V.; LI, J.; MAYFIELD-JONES, D.R.; PEREZ, L.; PIRES, J.C.; SANTOS, C. **Investigating the path of plastid genome**

**degradation in an early-transitional clade of heterotrophic orchids, and implications for heterotrophic Angiosperms.** *Molecular Biology and Evolution*, v.31, p.3095-3112, 2014.

BEERLING, D.J., OSBORNE, C.P. **The origin of the savanna biome.** *Global Change Biology*, v.12, p.2023–2031, 2006.

BFG – The Brazil Flora Group. **Growing knowledge:** an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v. 66, p. 1085–1113, 2015.

BRAUKMANN, T.W.; KUZMINA, M.; STEFANOVIC, S. **Loss of all plastid *ndh* genes in Gnetales and conifers: extent and evolutionary significance for the seed plant phylogeny.** *Current Genetics*, v.55, p.323-337, 2009.

CHANG, C.C.; LIN, H.C.; LIN, I.P.; CHOW, T.Y.; CHEN, H.H.; CHEN, W.H.; CHENG, C.H.; LIN, C.Y.; LIU, S.M.; CHANG, C.C.; CHAW, S.M. **The chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* (Orchidaceae): comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and its phylogenetic implications.** *Molecular Biology and Evolution*, v.23, p.279-291, 2006.

CHASE, M.W.; CAMERON, K.M.; FREUDENSTEIN, J.V.; PRIDGEON, A.M.; SALAZAR, G.; VAN DEN BERG, C.; SCHUITEMAN, A. **An updated classification of Orchidaceae.** *Botanical Journal of the Linnean Society*. v.177, p.151–174, 2015.

CHIRON, G.R.; GUIARD, J.; VAN DEN BERG, C. **Phylogenetic relationships in Brazilian *Pleurothallis* sensu lato (Pleurothallidinae, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences.** *Phytotaxa*, v. 46, p.34-58, 2012.

CHIRON, G.R.; KARREMANS, A.P.; VAN DEN BERG, C. **Nomenclatural notes in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): *Phloeophila*.** *Phytotaxa*, v. 270, n. 1, p. 56-62, 2016.

CHIRON, G.R.; VAN DEN BERG, C. **Révision taxonomique du genre *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae).** *Richardiana*, v. 12, n. 2, p. 59-77, 2011.

CHOMICKI, G.; BIDEL, L.P.R.; MING, F.; COIRO, M.; ZHANG, X.; WANG, Y.; BAISSAC, Y.; JAY-ALLEMAND, C.; RENNER, S.S. **The velamen protects photosynthetic orchid roots against UV-B damage, e a large dated phylogeny implies multiple gains e losses of this function during the Cenozoic.** *New Phytologist*, 12 p., 2014.

COGNIAUX, C.A. *Pleurothallis*. In: von Martius, C.F.P., Eichler, A.W., Urban, I. **Flora Brasiliensis**, v. 3, p. 377–593, 1896.

CRISAFULI, F.A.P.; RAMOS, E.B.; ROCHA, M.S. **Characterizing the interaction between DNA e GelRed fluorescent stain.** *European Biophysics Journal*, v.44, p.1–7, 2015.

DALCORSO, G.; PESARESI, P.; MASIERO, S.; ASEEVA, E.; SCHÜNERMANN, D.; FINAZZI, G.; JOLIOT, P.; BARBATO, R.; LEISTER, D. **A complex containing PGR1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electric flow in *Arabidopsis***. Cell Press, v.132, p.273-285, 2008.

DANIELL, H.; LIN, C.S.; YU, M.; CHANG, W.J. **Chloroplast genomes: diversity, evolution, e applications in genetic engineering**. Genome Biology, v.17, n.134, 2016.

DARLING, A.C.E.; MAU, B.; BLATTNER, F.R.; PERNA, N.T. **Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements**. Genome Research, v.14, p.1394-1403, 2004.

DELLANOY, E.; FUJII, S.; COLAS DES FRANCS-SMALL, C.; BRUNDRETT, M.; SMALL, I. 2011. **Rampant gene loss in the underground orchid *Rhizanthella gardneri* highlights evolutionary constraints on plastid genomes**. Molecular Biology and Evolution, v.28, p.2077-2086, 2004.

DESFEAUX, C.; MAURICE, S.; HENRY, J.P.; LEJEUNE, B.; GOUYON, P.H. **Evolution of reproductive system in the genus *Silene***. Proceedings of the Royal Society of London, v.263, p.409-414, 1996.

DOYLE, J.; DOYLE, J. **A rapid DNA isolation procedure for small amounts of leaf tissue**. Phytochemical Bulletin, v.19, p.810–815, 1987.

DRUMMOND, A.J.; HO, S.Y.W.; PHILLIPS, M.J.; RAMBAUT, A. **Relaxed Phylogenetics e Dating with Confidence**. PLoS Biology, v.4, p.e88, 2006.

DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. **Bayesian phylogenetics with BEAUti e the BEAST 1.7**. Molecular Biology and Evolution, v.29, p.1969–1973, 2012.

FELSENSTEIN, J. **Confidence limits on phylogenies: an approach to using bootstrap**. Evolution, v.39, p.783–791, 1985.

FENG, Y.; WICKE, S.; LI, J.; HAN, Y.; LIN, C.; LI, D.; ZHOU, T.; HUANG, W.; HUANG, L.; JIN, X. **Lineage-specific reductions of plastid genomes in an orchid tribe with partially and fully mycoheterotrophic species**. Genome Biology and Evolution, v.8, p.2164-2175, 2016.

FITCH, W.M. **Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology**. Systematic Zoology, v.20, p.406–416, 1971.

FOREST, F. **Calibrating the Tree of Life: fossils, molecules, e evolutionary timescales**. Annals of Botany, v.104, p.789-794, 2009.

FREUDENSTEIN, J.V.; CHASE, M.W. **Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations:**

**progressive specialization e diversification.** *Annals of Botany*, v.115, n.4, p.665-681, 2015.

GERNHARD, T. **The conditioned reconstructed process.** *Journal of Theoretical Biology*, v.253, p.769–778, 2008.

GIRIBERT, G. **Efficient tree searches with available algorithms.** *Evolutionary Bioinformatics Online*, v.3, p.341–356, 2007.

GIUDICELLI, G.C.; MÄDER, G.; SILVA-ARIAS, G.A.; ZAMBERLAN, P.M.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B. **Secondary structure or nrDNA Internal Transcribed Spacers as a useful tool to align highly divergent species in phylogenetic studies.** *Genetics and Molecular Biology*, v.40, p.191–199, 2017.

GIVNISH, T.J.; SPALINK, D.; AMES, M.; LYON, S.P.; HUNTER, S.J.; ZULUAGA, A.; ILES, W.J.D.; CLEMENTS, M.A.; ARROYO, M.T.K.; LEEBENS-MACK, J.; ENDARA, L.; KRIEBEL, R.; NEUBIG, K.M.; WHITTEN, W.M.; WILLIAMS, N.H.; CAMERON, K.M. **Orchid phylogenomics e multiple drivers of their extraordinary diversification.** *Proceedings of the royal society B: Biological Sciences*, v.282, p.1-10, 2015.

GIVNISH, T.J.; SPALINK, D.; AMES, M.; LYON, S.P.; HUNTER, S.J.; ZULUAGA, A.; DOUCETTE, A.; CARO, G.G.; McDANIEL, J.; CLEMENTS, M.A.; ARROYO, M.T.K.; ENDARA, L.; KRIEBEL, R.; WILLIAMS, N.H.; CAMERON, K.M. **Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal.** *Journal of Biogeography*, v.43, n.10, p.1905-1916, 2016.

GONTIJO, S.L.; BARBOSA, A.R.; MELO, M.C.; BORBA, E.L. **Occurrence of different sites of self-incompatibility reaction in four *Anathallis* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species.** *Plant Species Biology*, v.25, p.129-135, 2010.

GRAHAM, S.W.; LAM, V.K.Y.; MERCHX, V.S.F.T. **Plastomes on the edge: the evolutionary breakdown of mycoheterotroph plastid genomes.** *New Phytologist*, v.214, p.48-55, 2017.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. **New algorithms e methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0.** *Systematic Biology*, v.59, p.307-321, 2010.

GUSTAFSSON, A.L.S.; VEROLA, C.F.; ANTONELLI, A. **Reassessing the temporal evolution of orchids with new fossils e a Bayesian relaxed clock, with implications for the diversification of the rare South American genus *Hoffmannseggella* (Orchidaceae: Epidendroideae).** *BMC Evolutionary Biology*, v.10, n.177, 13 p., 2010.

HOEHNE, F.C. **Orchidaceae** In: HOEHNE, F.C. *Flora Brasileira*. São Paulo: Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo, v.12. p.1-254, 1940.

JOHNSON, M.T.; CARPENTER, E.J.; TIAN, Z.; BRUSKIEWICH, R.; BURRIS, J.N.; CARRIGAN, C.T.; CHASE, M.W.; CLARKE, N.D.; COVSHOFF, S.; DEPAMPHILIS, C.W.; EDGER, P.P.; GOH, F.; GRAHAM, S.; GREINER, S.; HIBBERD, J.M.; JORDON-THADEN, I.; KUTCHAN, T.M.; LEEBENS-MACK, J.; MELKONIAN, M.; MILES, N.; MYBURG, H.; PATTERSON, J.; PIRES, J.C.; RALPH, P.; ROLF, M.; SAGE, R.F.; SOLTIS, D.; SOLTIS, P.; STEVENSON, D.; STEWART J.R., C.N.; SUREK, B.; THOMSEN, C.J.M.; VILLARREAL, J.C.; WU, X.; ZHANG, Y.; DEYHOLOS, M.K.; WONG, G.K.S. **Evaluating methods for isolating total RNA and predicting the success of sequencing phylogenetically diverse plant transcriptomes**. PLoS One, v.7, p.e50226, 2012.

KARREMANS, A.P. **Genera Pleurothallidarum: e updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae**. Lankesteriana, v.16, n.2, p.219-242, 2016.

KARREMANS, A.P. **Lankesteriana, a new genus in the Pleurothallidinae (Orchidaceae)**. Lankesteriana, v.13, n.3, p.319-332, 2014.

KARREMANS, A.P.; ALBERTAZZI, F.J.; BAKKER, F.T.; BOGARÍN, D.; EURLINGS, M.C.M.; PRIDGEON, A.M.; PUPULIN, F.; GRAVENDEEL, B. **Phylogenetic reassessment of *Specklinia* and its allied genera in the Pleurothallidinae**. Phytotaxa, v. 272, n. 1, p. 1-36, 2016.

KARREMANS, A.P.; BAKKER, F.T.; PUPULIN, F.; SOLANO-GÓMEZ, R.; SMULDERS, M.J.M. 2013. **Phylogenetics of *Stelis* e closely related genera (Orchidaceae: Pleurothallidinae)**. Plant Systematic Evolution, v. 299, p.151-176, 2013.

KARREMANS, A.P.; BOGARÍN, D.; DÍAZ-MORALES, M.; FERNÁNDEZ, M.; OSES, L.; PUPULIN, F. **Phylogenetic reassessment of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae)**. Harvard Papers in Botany, v. 21, n. 2, p. 171-187, 2016.

KATOH, K.; STANDLEY, D.M. **MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance e usability**. Molecular Biology and Evolution, v.30, p.772–780, 2013.

KATOH, K.; TOH, H. **Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT based framework**. BMC Bioinformatics, v.9, p.212, 2008.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJIES, P.; DRUMMOND, A. **Geneious Basic: an integrated e extendable desktop software platform for the organization e analysis of sequence data**. Bioinformatics, v.28, p.1647–1649, 2012.

KELCHNER, S.A. **The evolution of non-coding chloroplast DNA e its application in plasnt systematics.** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.87, p.482–498, 2000.

KIM, H.T.; KIM, J.S.; MOORE, M.J.; NEUBIG, K.M.; WILLIAMS, N.H.; WHITTEN, W.M.; KIM, J. **Seven new complete plastome sequences reveal rampant independent loss of the *ndh* gene family across orchids and associated instability of the Inverted Repeat/ Small Single Copy region boundaries.** *PLoS One*, v.10, p.e0142215, 2015.

LANFEAR, R.; FRANDBSEN, P.B.; WRIGHT, A.M.; SENFELD, T.; CALCOTT, B. **PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular e morphological phylogenetic analyses.** *Molecular Biology and Evolution*, v.34, p.772-773, 2017.

LIN, C., CHEN, J.J.W.; CHIU, C.; HSIAO, H.C.W.; YANG, C.; JIN, X.; LEEBENS-MACK, J.; PAMPHILIS, C.W.; HUANG, Y.; YANG, L.; CHANG, W.; KUI, L.; WONG, G.K.; HU, J.; WANG, W.; SHIH, M. **Concomitant loss of *ndh* complex-related genes with chloroplast and nucleat genomes in some orchids.** *The Plant Journal*, v.90, p.994-1006, 2017.

LIN, C.; CHEN, J.J.W.; HUANG, Y.; CHAN, M.; DANIELL, H.; CHANG, W.; HSU, C.; LIAO, D.; WU, F.; LIN, S.; LIAO, C.; DEYHOLOS, M.K.; WONG, G.K.; ALBERT, V.A.; CHOU, M.; CHEN, C.; SHIH, M. **The location and translocation of *ndh* genes of chloroplast origin in the Orchidaceae family.** *Scientific Reports*, v.5, p.9040, 2015.

LINDLEY, J. **Folia Orchidacea: An enumeration of the known species of orchids.** Londres, v. 1, 1895.

LOGACHEVA, M.D.; SCHELKUNOV, M.I.; PENIN, A.A. **Sequencing and analysis of plastid genome in mycoheterotrophic orchid *Neottia nidus-avis*.** *Genome Biology and Evolution*, v.3, p.1296-1303, 2011.

LOHSE, M.; DRECHSEL, O.; BOCK, R. **OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) - a tool for the easy generation of high-quality custom graphical maps of plastid and mitochondrial genomes.** *Current Genetics*, v.52, p.267-274, 2007.

LOHSE, M.; DRECHSEL, O.; KAHLAU, S.; BOCK, R. **OrganellarGenomeDRAW: a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets.** *Nucleic Acids Research*, v.41, p.W575-W581, 2013.

LUER, C.A. **A systematic method of classification of the Pleurothallidinae versus a strictly phylogenetic method.** *Selbyana*, v.23, n.1, p.57–110, 2002.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidarum I: Systematics of the Pleurothallidinae.** *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, v.15, 81 p., 1986a.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidinarum III**: Systematics of *Pleurothallis* (Orchidaceae). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.20, 107 p., 1986b.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidinarum IV**: Systematics of *Acostaea*, *Condylago* e *Porroglossum*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.24, pp. 91, 1987.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidinarum IX**: Systematics of *Myoxanthus*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.44, pp. 124, 1992.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidinarum V**: Systematics of *Dresslerella* e *Scaphosepalum*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.26, pp. 108, 1988.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidinarum VII**: Systematics of *Platystele*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.38, pp. 134, 1990.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidinarum VIII**: Systematics of *Lepanthopsis*, *Octomeria* subgenus *Pleurothallopsis*, *Restrepiella*, *Restrepiopsis*, *Salpistele* e *Teagueia*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.39, pp. 158, 1991.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidinarum XI**: Systematics of *Lepanthes* subgenus *Brachycladium* e *Pleurothallis* subgenus *Aenigma*, subgenus *Elongatia*, subgenus *Kraenzlinella*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.52, pp. 137, 1994.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidinarum XIII**: Systematics of *Restrepia*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.59, pp. 168, 1996a.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidinarum XIX**: Systematics of *Masdevallia* part one. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.77, pp. 263, 2000a.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidinarum XV**: Systematics of *Trichosalpinx*. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 64, pp. 136, 1997.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidinarum XVI**: Systematics of *Pleurothallis* subgenera *Crocodelianthe*, *Rynchopera* e *Talpinaria*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.65, pp. 122, 1998a.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidinarum XVII**: Systematics of subgen. *Pleurothallis* sect. *Abortivae*, sect. *Truncatae*, sect. *Pleurothallis* subsect. *Acroniae* e subsect. *Pleurothallis*, subgen. *Dracontia* e subgen. *Uncifera*.

Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.72, pp. 121, 1998b.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidarum XVIII**: Systematics of *Pleurothallis*: subgen. *Pleurothallis* sect. *Pleurothallis* subsect. *Antenniferae*, subsect. *Longiracemosae*, subsect. *Macrophyllae-Racemosae*, subsect. *Perplexae*. Subgen. *Pseudostelis*. Subgen. *Acuminatia*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.76, 182 p., 1999.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidarum XX**: Systematics of *Jostia*, *Andinia*, *Barbosella*, *Barbrodria* e *Pleurothallis* subgen. *Antilla*, subgen. *Effusia*, subgen. *Restrepioidea*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.79, pp. 140, 2000b.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidarum XXIV**: A first century of new species of *Stelis* of Ecuador, part one. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.88, pp. 122, 2002.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidarum XXIX**: A third century of *Stelis* of Ecuador; systematics of *Apoda-Prorepentia*; systematics of miscellaneous small genera. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.112, pp. 130, 2007.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidarum XXVI**: *Pleurothallis* subgenus *Acianthera* e three allied subgenera; a second century of new species of *Stelis* of Ecuador; *Epibator*, *Ophidion*, e *Zootrophion*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.95, pp. 265, 2004.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidarum XXVII**: *Dryadella* e *Acronia* section *Macrophyllae-Fasciculatae*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.103, pp. 311, 2005.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidarum XXVIII**: Reconsideration of *Masdevallia*, and the systematic of *Specklinia* e vegetatively similar genera (Orchidaceae). Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.105, 274 p., 2006.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidarum XXX**: *Lepanthes* of Jamaica, systematics of *Stelis*, *Stelis* of Ecuador, part four. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.115, 265 p., 2009.

LUER, C.A. **Icones Pleurothallidarum XXXI**: *Lepanthes* of Bolivia; systematics of *Octomeria*, species North e West of Brazil. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.120, pp. 154, 2010.

LUER, C.A., **Icones Pleurothallidarum XIV**: Systematics of *Draconanthes*, *Lepanthes* subgenus *Marsipanthes* e subgenus *Lepanthes* of Ecuador. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v.61, pp. 281, 1996b.

LUER, C.A.; TOSCANO DE BRITO, A.L.V. **Miscellaneous new species in Pleurothallidinae (Orchidaceae) from Brazil**. Harvard Papers in Botany, v.17, p.307-315, 2012.

LUO, J.; HOU, B.; NIU, Z.; LIU, W.; XUE, Q.; DING, X.; **Comparative chloroplast genomes of photosynthetic orchids: insights into evolution of the Orchidaceae e development of molecular markers for phylogenetic applications**. PLOS ONE, v.9, n.6, 15 p., 2014.

MADDISON, W.P.; MADDISON, D.R. **Mesquite**: a modular system for evolutionary analysis, version 3.04. 2015. Disponível em: <<http://mesquiteproject.org>>.

MARTÍN, M.; SABATER, B. **Plastid *ndh* genes in plant evolution**. Plant Physiology Biochemistry, v.48, p.636-645, 2010.

MENEZES, A.P.A.; RESENDE-MOREIRA, L.C.; BUZATTI, R.S.O.; NAZARENO, A.G.; CARLSEN, M.; LOBO, F.P.; KALAPOTHAKIS, E.; LOVATO, M.B. **Chloroplast genomes of *Byrsonima* species (Malpighiaceae): comparative analysis e screening of high divergence sequences**. Scientific Reports, v.8, n.2210, 2018. doi:10.1038/s41598-018-20189-4.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. **Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees**. Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), New Orleans, USA, pp. 1–8, 2010.

MUNEKAGE, Y.; HASHIMOTO, M.; MIYAKE, C.; TOMIZAWA, K.; ENDO, T.; TASAKA, M.; SHIKANAI, T. **Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis**. Nature, v.429, p.579-582, 2004.

MUNEKAGE, Y.; HOJO, M.; MEURER, J.; ENDO, T.; TASAKA, M.; SHIKANAI, T. ***PGR5* is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis***. Cell Press, v.110, p.361-371, 2002.

NEUBIG, K.M.; WHITTEN, W.M.; CARLSWARD, B.S.; BLANCO, M.A.; ENDARA, L.; WILLIAMS, N.H.; MORRE, M. **Phylogenetic utility of *ycf1* in orchids**: a plastid gene more variable than *matK*. Plant Systematics and Evolution, v.277, p.75–84, 2009.

NEYLAND, R.; URBATSCH L.E. **A phylogenetic analysis of subtribe Pleurothallidinae (Orchidaceae)**. Botanical Journal of the Linnean Society, v.117, p.13-28, 1995.

NIU, Z.; XUE, Q.; ZHU, S.; SUN, J.; LIU, W.; DING, X. **The complete plastome sequences of four orchid species**: insights into the evolution of the Orchidaceae e the utility of plastomic mutational hotspots. Frontiers in Plant Science, v.8, p.715, 2017.

NIXON, K.C. **WinClada, version 1.00.08**. Published by the author. Ithaca, 2002.

PABST, G.F.J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasiliensis**. Hildesheim: Kurt Schmersonw, v. 1, 1975.

PAITHANKAR, K.R.; PRASAD, K.S. **Precipitation of DNA by polyethylene glycol e ethanol**. Nucleic Acids Research, v.19, p.1346, 1991.

PALMER, J.D.; JANSEN, R.K.; MICHAELS, H.J.; CHASE, M.W.; MANHART, J.R. **Chloroplast variation and plant phylogeny**. Annals of the Missouri Botanical Garden, v.75, p.1180-1206, 1988.

PAN, I.C.; LIAO, D.C.; WU, F.H.; DANIELL, H.; SINGH, N.D.; CHANG, C.; SHIH, M.C.; CHAN, M.T.; LIN, C.S. **Complete chloroplast genome sequence of an orchid model plant candidate: *Erycina pusilla* apply in tropical *Oncidium* breeding**. PLoS One, v.7, p.e34738, 2012.

PARKS, M.; CRONN, R.; LISTON, A. **Increasing phylogenetic resolution at low taxonomic levels usign massively parallel sequencing of chloroplast genomes**. BMC Biology, v.7, n.84, 2009.

PENNINGTON, R.T.; LAVIN, M.; SÄRKINEN, T.; LEWIS, G.P.; KLITGAARD, B.B.; HUGHES, C.E. **Contrasting plant diversification histories within the Andean biodiversity hotspot**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.107, p. 13783-13787, 2010.

PEREDO, E.L.; KING, U.M.; LES, D.H. **The plastid genome of *Najas flexilis*: adaptation to submersed environments is accompanied by the complete loss of NDH complex in an aquatic angiosperm**. PLoS One, v.8, p.e68591, 2013.

PÉREZ-ESCOBAR, O.A.; CHOMICKI, G.; CONDAMINE, F.L.; KARREMANS, A.P.; BOGARÍN, D.; MATZKE, N.J.; SILVESTRO, D.; ANTONELLI, A. **Recent origin e rapid speciation of Neotropical orchids in the world's richest plant biodiversity hotspot**. New Phytologist, v.215, p. 891-905, 2017.

PERINI, V.R.; LELES, B.; FURTADO, C.; PROSDOCIMI, F. **Complete chloroplast genome of the orchid *Cattleya crispata* (Orchidaceae: Laeliinae), a Neotropical rupicolous species**. Mitochondrial DNA, 2015. doi: 10.3109/19401736.2014.1003850.

PINNA, M.G.G. DE. **Concepts e tests of homology in the cladistic paradigm**. Cladistics, v.7, p.367–394, 1991.

PIRIE, M.D.; CHATROU, L.W.; MOLS, J.B.; ERKENS, R.H.J.; OOSTERHOF, J. **'Andean-centred' genera in the short-branch clade of Annonaceae: Testing biogeographical hypotheses using phylogeny reconstruction e molecular dating**. Journal of Biogeography, v.33, p.31–46, 2006.

PRIDGEON, A.M. **Numerical analysis in the classification of the Pleurothallidinae (Orchidaceae)**. Botanical Journal of the Linnean Society, v.85: p.103-131, 1982a.

PRIDGEON, A.M. **Anatomical Characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae)**. American Journal of Botany, v.69, n.6, p.921-938, 1982b.

PRIDGEON, A.M. **Subtribe Pleurothallidinae**. In: PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASSMUSEN, F.N. **Genera Orchidacearum**, v.4, Epidendroidae (Part One), p.405-412, 2005.

PRIDGEON, A.M.; CHASE, M.W. **Phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae)**. Lindleyana, v.16, n.4, p.235-271, 2001.

PRIDGEON, A.M.; CHASE, M.W. **Phylogenetics of the subtribe Pleurothallidinae (Epidendreae: Orchidaceae) based on combined evidence from DNA sequences**. Lankesteriana, v.7, p.49-50, 2003.

PRIDGEON, A.M.; SOLANO, R.; CHASE, M.W. **Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear e plastid DNA sequences**. American Journal of Botany, v.88, n.12, p.2286-2308, 2001.

RAMBAUT, A. **FigTree version v1.4.3 [computer program]**. 2009. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtre>>.

RAMBAUT, A.; SUCHARD, M.A.; DRUMMOND, A.J. **Tracer version 1.6**. 2014. Disponível em: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>.

RAMÍREZ, S.R.; GRAVENDEEL, B.; SINGER, R.B.; MARSHALL, C.R.; PIERCE, N.E. **Dating the origin of the Orchidaceae from a fossil orchid with its pollinator**. Nature, v.448, p.1042-1045, 2007.

REGINATO, M.; NEUBIG, K.M.; MAJURE, L.C.; MICHELANGELI, F.A. **The first complete plastid genomes of Melastomataceae are highly structurally conserved**. PeerJ, 2016. doi: 10.7717/peerj.2715.

ROGALSKI, M.; VIEIRA, L.N.; FRAGA, H.P.F.; GUERRA, M.P. **Plastid genomics in horticultural species: importance and applications for plant population genetics, evolution, and biotechnology**. Frontiers in Plant Science, v.6, p.586, 2015.

ROGSTAD, S.H. **Saturated NaCl-CTAB solution as a means of field preservation of leaves for DNA analyses**. Taxon, v.41, p.701-708, 1992.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M.A.; HUELSENBECK, J.P. **MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference e model choice across a large model space**. Systematic Biology, v.61, p.539-542, 2012.

RUHLMAN, T.A.; CHANG, W.J.; CHEN, J.J.; HUANG, Y.T.; CHAN, M.T.; JIN, Z.; LIAO, D.C.; BLAZIER, J.C.; JIN, X.; SHIH, M.C.; JANSEN, R.K.; LIN, C.S. **NDH expression marks major transitions in plant evolution and reveals coordinate intracellular gene loss**. *BMC Plant Biology*, v.15, p.100, 2015.

SAKAGUCHI, S.; UENO, S.; TSUMURA, Y.; SETOGUCHI, H.; ITO, M.; HATTORI, C.; NOZOE, S.; TAKAHASHI, D.; NAKAMASU, R.; SAKAGAMI, T.; LANNUZEL, G.; FOGLIANI, B.; WULFF, A.S.; L'HULLIER, L.; ISAGI, Y. **Application of a simplified method of chloroplast enrichment to small amounts of tissue for chloroplast genome sequencing**. *Applied Plant Science*, v.5, p.1700002, 2017

SANG, T.; CRAWFORD, D.J.; STUESSY, T.F. **Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution e biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae)**. *American Journal of Botany*, v.84, p.1120–1136, 1997.

SANGER, F.; COULSON, A.R. **A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase**. *Journal of Molecular Biology*, v.94, n.3, p.441-446, 1975.

SANTOS, M.C. ***Anathallis* Barb.Rodr. s.l. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) para o estado do Paraná e estudos florais no gênero**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Paraná, Brasil. 125 pp., 2017.

SHELKUNOV, M.I.; SHTRATNIKOVA, V.Y.; NURALIEV, M.S.; SELOSSE, M.; PENIN, A.A.; LOGACHEVA, M.D. **Exploring the limits for reduction of plastid genomes: a case study of the mycoheterotrophic orchids *Epipogium aphyllum* and *Epipogium roseum***. *Genome Biology and Evolution*, v.7, p.1179-1191, 2015.

SERENO, P.C. **Logical basis for morphological characters in phylogenetics**. *Cladistics*, v.23, p.565–587, 2007.

SHAW, G. **The chemistry of sporopollenin**. In: BROOKS, J.; GRANT, P.P.; MUIR, M.; VAN GIZEL, P.; SHAW, G. **Sporopollenin**. 1 ed. Imperial College, Londres: Elsevier, 728 p., 1971.

SHAW, J.; LICKEY, E.B.; BECK, J.T.; FARMER, S.B.; LIU, W.; MILLER, J.; SIRIPUN, K.C.; WINDER, C.T.; SCHILLING, E.E.; SMALL, R.L. **The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis**. *American Journal of Botany*, v.92, p.142–166, 2005.

SHAW, J.; LICKEY, E.B.; SCHILLING, E.E.; SMALL, R.L. **Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The Tortoise e the hare III**. *American Journal of Botany*, v.94, p.275–288, 2007.

SIMMONS, M.P.; OCHOTERENA, H. **Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses**. *Systematic Biology*, v.49, p.369–381, 2000.

STEARN, W.T. **Botanical Latin**. Timber Press, Portland, 546 pp, 2004.

SUN, Y.; SKINNER, D.Z.; LIANG, G.H.; HULBERT, S.H. **Phylogenetic analysis of *Sorghum* e related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA**. Theoretical Applied Genetics, v.89, p.26–32, 1994.

SWOFFORD, D.L. **PAUP\***: Phylogenetic analysis using parcimony e others methods, version 4.0b10. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA, USA, 2002.

SWOFFORD, D.L.; MADDISON, W. **Reconstructing ancestral character states under Wagner Parsimony**. Mathematical Biosciences, v.87, p.199-229, 1987.

TATE, J.A. **Systematics and evolution of *Tarasa* (Malvaceae): an enigmatic Andean polyploid genus**. Ph.D. thesis. The University of Texas at Austin, TX, USA, 2002.

THIERS, B. [continuously updated] **Index Herbariorum**: A global directory of public herbaria e associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em: <<http://sweetgum.nybg.org/ih/>>.

TIAN, X.; LI, D.Z. **Application of DNA sequences in plant phylogenetic study**. Acta Botanica Yunnanica, v.24, p.170-184, 2002.

VAIDYA, G.; LOHMAN, D.J.; MEIER, R. **SequenceMatrix**: concatenation software for the fast assembly of multigene datasets with character set e codon information. Cladistics, v.27, p.171–180, 2011.

VAN DEN BERG, C.; GOLDMAN, D.H.; FREUDENSTEIN, J.V.; PRIDGEON, A.M.; CAMERON, K.M.; CHASE, M.W. **An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions e recircumscription of Epidendreae e Arethuseae (Orchidaceae)**. American Journal of Botany, v.92, n.4, p.613-24, 2005.

VIEIRA, L.N.; FAORO, H.; FRAGA, H.P.F.; ROGALSKI, M.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. **An improved protocol for intact chloroplasts and cpDNA isolation in conifers**. PLoS One, v.9, p.e84792, 2014.

WANG, Y.; QU, X.; CHEN, S.; LI, D.; YI, T. **Plastomes of Mimosoideae: structural e size variation, sequence divergence, e phylogenetic implication**. Tree Genetics & Genomes, v.13, n.41, 18 p., 2017.

WHEELER, Q.; ASSIS, L.; RIEPPEL, O. **Phylogenetics: Heed the father of cladistics**. Nature, v.496, p.295-296, 2013.

WHICKE, S.; SCHNEEWEISS, G.M.; DEPAMPHILIS, C.W.; MÜLLER, K.F.; QUANDT, D. **The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene**

content, gene order, gene function. *Plant Molecular Biology*, v.76, p.273-297, 2011.

WILSON, M.; FRANK, G.S.; JOST, L.; PRIDGEON, A.M.; VIEIRA-URIBE, S.; KARREMANS, A.P. **Phylogenetic analysis of *Andinia* (Pleurothallidinae; Orchidaceae) and a systematic re-circumscription of the genus.** *Phytotaxa*, v. 295, n. 2, p. 101-131, 2017.

WU, F.H.; CHAN, M.T.; LIAO, D.C.; HSU, C.T.; LEE, Y.W.; DANIELL, H.; DUVALL, M.R.; LIN, C.S. **Complete chloroplast genome of *Oncidium goweri* Ramsay e evaluation of molecular markers for identification e breeding in *Oncidiinae*.** *BMC Plant Biology*, v.10, n.68, 2010.

WU, C.S.; LAI, Y.T.; LIN, C.P.; WANG, Y.N.; CHAW, S.M. **Evolution of reduced and compact chloroplast genomes (cpDNAs) in gnetophytes: selection toward a lower-cost strategy.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.52, p.243-254, 2009.

WU, C.S.; WANG, Y.N.; HSU, C.Y.; LIN, C.P.; CHAW, S.M. **Loss of different inverted repeat copies from the chloroplast genomes of Pinaceae and Cupressophytes and influence of heterotachy on the evaluation of gymnosperm phylogeny.** *Genome Biology and Evolution*, v.3, p.1284-1295, 2011.

WYMAN, S.K.; JANSEN, R.K.; BOORE, J.L. **Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA.** *Bioinformatics*, v.20, p.3252-3255, 2004.

YANG, J.; TANG, M.; LI, H.; ZHANG, Z.; LI, D. **Complete chloroplast genome of the genus *Cymbidium*: lights into the species identification, phylogenetic implications e population genetic analyses.** *BMC Evolutionary Biology*, v.13, n.84, 12 p., 2013.

YULE, G.U. **A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. J.C. Willis, F.R.S.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v.213, p.21–87, 1925.

ZHU, A.; GUO, W.; GUPTA, S.; FAN, W.; MOWER, J.P. **Evolutionary dynamics of the plastid inverted repeat: the effects of expansion, contraction, and loss on substitution rates.** *New Phytologist*, v.209, p.1747-1756, 2016.