

Conservação genética de populações naturais: uma revisão para Orchidaceae

Cristiane Gouvêa Fajardo¹, Fábio de Almeida Vieira², Wagner Franco Molina³

1. Bióloga (Universidade Federal de Juiz de Fora). Doutora em Ecologia (Universidade Federal do Rio Grande do Norte). Professora da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil.

2. Biólogo (Universidade Estadual de Montes Claros). Doutor em Engenharia Florestal (Universidade Federal de Lavras). Professor da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil.

3. Biólogo (Universidade Federal do Rio Grande do Norte). Doutor em Genética e Evolução (Universidade Federal de São Carlos). Professor da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil.

* Autor para correspondência: genegoista@yahoo.com.br

RESUMO. Esta revisão apresenta a importância da conservação genética para a elaboração de estratégias conservacionistas adequadas à distribuição espacial da diversidade genética, sendo apresentados e contextualizados exemplos de estudos de genética de populações e filogeografia na família Orchidaceae. O principal foco da biologia da conservação é a compreensão e a manutenção da diversidade genética, já que ela fornece o potencial adaptativo e evolutivo de uma espécie. Deste modo, o conhecimento da diversidade genética de uma espécie é primordial para as ações de conservação e manejo. Os níveis de variabilidade genética podem ser determinados pela estrutura populacional de uma espécie, sendo o resultado de características reprodutivas e demográficas, ocasionadas pela interação e ação uma série de mecanismos evolutivos e ecológicos. A avaliação da estrutura populacional das espécies permite descobrir as Unidades Evolutivas Significativas (UES), que devem ser explicitamente definidas em características que realcem o potencial para a sobrevivência da espécie. Por conseguinte, é necessário que haja um foco na preservação da diversidade funcional. Técnicas genéticas são essenciais, pois fornecem estimativas de fluxo gênico entre as populações e, assim, norteiam os esforços para sustentar os níveis genéticos e intercâmbio entre as populações. Os métodos filogenéticos e filogeográficos contribuem para responder diversas questões em biologia da conservação, como quais são os locais prioritários para a conservação, quais espécies conservar e quais são os esforços conservacionistas necessários. E, finalmente, delineiam as estratégias que devem ser tomadas para conservar a maior quantidade de diversidade genética, visando manter o potencial evolutivo de uma espécie ou população.

Palavras-chave: ecologia molecular, espécie ameaçada, estratégias de conservação, diversidade genética, unidades evolutivas significativas.

Conservation genetics of natural populations: a review for Orchidaceae

ABSTRACT. This review shows the importance of genetic conservation for developing appropriate conservation strategies to the spatial distribution of genetic diversity, and presents contextualized examples of studies of population genetics and phylogeography in the Orchidaceae. The main focus of conservation biology is the understanding and maintenance of genetic diversity, since it provides the adaptive and evolutionary potential of a species. Therefore, knowledge of the genetic diversity of a species is essential for the conservation and management actions. Levels of genetic variability may be determined by the population structure of a species as the result of reproductive and demographic characteristics, caused by the interaction and action a number of evolutionary and ecological mechanisms. The evaluation of the population structure of the species allows discovering the Evolutionarily Significant Units (ESUs) that must be explicitly defined features which enhance the potential for the survival of the species. Therefore, there must be a focus on preservation of functional diversity. Genetic techniques are essential because they provide estimates of gene flow between populations and thereby guide the efforts to sustain the levels and genetic exchange between populations. Phylogenetic and phylogeographic contribute to answer various questions in conservation biology. As which sites are priorities for conservation, which conserve species, which conservation efforts are needed. And, finally, how to save the most amount of genetic diversity to maintain the evolutionary potential of a species or population.

Keywords: Molecular ecology; endangered species; conservation strategies; genetic diversity; evolutionarily significant units.

1. Introdução

A compreensão e a manutenção da diversidade genética é um dos principais focos da biologia da conservação, já que é ela que fornece o potencial adaptativo e evolutivo de uma espécie (MORITZ, 1994). Dessa forma, o conhecimento da diversidade genética de uma espécie é primordial para as ações de conservação e manejo. Os níveis de variabilidade genética podem ser determinados pela estrutura populacional de uma espécie, sendo o resultado de características reprodutivas e demográficas, ocasionadas pela interação de uma série de mecanismos evolutivos e ecológicos (eg. ALVAREZ-BUYLLA et al., 1996; SMITHSON, 2006; VIEIRA et al., 2012).

Neste sentido, é fundamental avaliar se os padrões de estruturação da diversidade genética se devem às características naturais da espécie, ou se são consequência de barreiras físicas, muitas vezes produzidas por ações antrópicas, como o processo de fragmentação do hábitat

(FRANKHAM et al., 2008). A fragmentação dos ecossistemas provoca uma descontinuidade da distribuição da vegetação original, acarretando importantes reduções nos habitats disponíveis às plantas e animais silvestres. Este processo pode levar a perdas da biodiversidade e mudanças na distribuição e abundância dos vegetais, associadas aos padrões de dispersão e migração (OLSON, 2001).

Estudos em biologia da conservação têm procurado integrar disciplinas como a ecologia, a sistemática molecular baseada em dados moleculares e a genética de populações, criando uma área de investigação científica denominada Conservação Genética (FRANKHAM, 1995). Nas últimas décadas houve tentativas de unir os princípios teóricos da Genética de Populações, interessada nas alterações de frequências alélicas e genotípicas, com os princípios teóricos da Ecologia de Populações, preocupados em entender as relações de causa e efeito na regulação do número de indivíduos. Assim, surgiu a

Biologia de Populações, que vem oferecendo embasamento teórico consistente para analisar e interpretar, sob o enfoque evolutivo, a dinâmica populacional (SIMBERLOFF, 1988).

Na medida em que os processos de evolução e especiação por seleção natural ocorrem de forma variável em cada local, a distribuição espacial da diversidade genética segue padrões geográficos (WRIGHT, 1931). Nesse contexto, uma espécie pode ter distribuição cosmopolita ou seguir padrões de endemismo de acordo com as variações e barreiras geográficas. Uma explicação possível para a distribuição da diversidade genética de um táxon é a de que sua distribuição geográfica atual se deve a uma dispersão a partir da região na qual a linhagem evoluiu originalmente (GUO et al., 2012). Tanto a partir da dispersão, com a qual um novo ambiente pode ser ocupado, quanto por mudanças na distribuição espacial associada a processos de isolamento geográfico, muitos padrões de vicariância foram produzidos, e, conseqüentemente, de endemismo (KRUCKEBERG; RABINOWITZ, 1985).

Neste sentido, métodos filogenéticos e filogeográficos são ferramentas importantes para a genética de populações (MORITZ; FAITH, 1998; NEWTON et al., 1999), que podem contribuir para responder algumas questões em biologia da conservação: O que conservar? Onde focalizar os esforços conservacionistas? Como conservar a maior quantidade de diversidade genética visando manter o potencial evolutivo de uma espécie ou população?

A família Orchidaceae é a segunda maior família de plantas com flores (CHASE et al., 2015). Devido a mudanças ambientais e climáticas em algumas regiões da América do Norte, 90% das espécies de orquídeas estudadas estão ameaçadas de extinção (KNAPP; WIEGAND, 2014). Diante da importância ecológica e evolutiva e como modelo de impactos antrópicos, o objetivo deste trabalho é revisar a importância da conservação genética para a elaboração de estratégias conservacionistas adequadas à distribuição espacial da diversidade genética, sendo apresentados e contextualizados exemplos de estudos de conservação genética e filogeografia na família Orchidaceae.

2. Conservação Genética e Ecologia Molecular

Aplicações

Atualmente a Conservação Genética e a Ecologia Molecular são duas áreas amplamente sobrepostas, uma vez que grande parte dos estudos considerados como pertencendo à Ecologia Molecular trata da utilização de polimorfismo genético em populações naturais como base para a compreensão de fenômenos evolutivos, demográficos ou ecológicos (MILLIGAN et al., 1994), os quais devem ser considerados nas estratégias de conservação genética dos táxons (FAJARDO et al., 2014).

A reconstrução do padrão evolutivo pode determinar prioridades para a conservação biológica. Isto inclui a investigação das relações filogenéticas, ou taxa supra-específicas, que visam compreender os processos evolutivos e biogeográficos que atuam em determinado grupo, ou

ainda, definir problemas de sistemática envolvendo espécies ameaçadas (MORITZ, 1995). Essas averiguações podem ter grande influência no delineamento de políticas para a preservação do grupo em questão (O'BRIEN; MAYR, 1991). Uma proposta relevante, por exemplo, seria a de que táxons distantes filogeneticamente, ou seja, que não apresentam grupos-irmãos próximos, devam ser priorizados para fins de esforços de conservação em relação a outros que pertencem a grupos amplamente representados na biota atual (EIZIRIK, 1996).

Desde a sua concepção, a Genética da Conservação tem se concentrado nas conseqüências genéticas de populações pequenas, que podem limitar a sobrevivência de espécies (FRANKEL, 1974). Além disso, contribui com a resolução de incertezas taxonômicas e unidades de gestão (BYTEBIER et al., 2007), e do uso de análises genéticas moleculares em medicina forense e compreensão da biologia das espécies (CHEN et al., 2012). Os marcadores genéticos auxiliam nos programas de conservação genética, monitoram espécies raras e ameaçadas e permitem identificar potencial de resiliência, capacidade evolutiva e taxa de sobrevivência das futuras gerações (KRAMER; HAVENS, 2009).

A reorganização do padrão evolutivo em nível infraespecífico é também de grande importância para a determinação de estratégias adequadas para a conservação biológica, pois permite a identificação de estrutura geográfica e subdivisões populacionais históricas e ou atuais em espécies ameaçadas (AVISE et al., 1987). Estudos destes padrões filogeográficos têm sido extremamente úteis na definição de unidades para a conservação e que se baseiam primariamente em filogenias intraespecíficas de linhagens do mtDNA (AVISE et al., 1987), ou cpDNA para plantas (BEHEREGARAY, 2008; VIEIRA et al., 2015).

Unidades evolutivas significativas

Ryder (1986) definiu o conceito de Unidades Evolutivas Significativas (UES) (*Evolutionary Significant Unit*). De acordo com WAPLES (1991) as UES seriam populações que estão reprodutivamente separadas e possuem adaptações únicas. Desde então, as UES vem sendo discutidas e aprofundadas por diversos autores (VOGLER et al., 1993; MORITZ, 1994): uma UES consiste essencialmente de uma população ou grupo de populações que se encontram diferenciados em termos ecológicos, genéticos, e morfológicos, de populações próximas, refletindo uma história de isolamento geográfico em níveis variáveis. Esses grupos possuem características próprias, e merecem ser considerados como unidades independentes para fins de conservação. A maneira de definir estas unidades certamente depende de como interpretar os padrões de variação observados entre populações no contexto da história de vida de cada espécie, sua evolução e biogeografia (CAVERS et al., 2003).

Segundo Moritz (1994) o critério genético para a definição de UES seria: "devem ser reciprocamente monofiléticas para 'alelos' no mtDNA e oferecer divergência significativa nas frequências alélicas em loci nucleares". Esta

definição é bastante consistente em termos operacionais e refletiria o padrão e a antiguidade da separação geográfica entre os grupos populacionais de animais e plantas.

Unidades Evolutivas Significativas devem ser explicitamente definidas em características que realcem o potencial para a sobrevivência da espécie. Portanto, é necessário que haja um foco na preservação da diversidade funcional (CRANDALLA et al., 2000). Técnicas genéticas são essenciais, pois fornecem estimativas de fluxo gênico entre as populações e, assim, norteiam os esforços para sustentar os níveis genéticos e intercâmbio entre as populações. Adicionalmente, a rede de conexões genéticas entre populações é a teia que mantém o potencial para evolução (MANNI et al., 2004). Assim, ao invés de focar apenas em populações isoladas, os esforços devem ser guiados para a manutenção da diversidade ao longo da paisagem de ocorrência natural das espécies (STORFER et al., 2007).

Conservação e filogeografia: o quê conservar?

A diversidade genética é componente fundamental da biodiversidade e sua proteção deve ser incorporada às ações e políticas conservacionistas. Entretanto, questiona-se a eficiência dos conceitos e métodos usados para verificar o valor da conservação da diversidade genética em relação à distribuição geográfica. Assim, a utilização de métodos filogeográficos pode ser útil para identificar conjuntos de espécies com histórias de vicariância comuns (MORITZ; FAITH, 1998).

Há 25 anos, foi proposta a integração da filogenia e da genética de populações para investigar a ligação entre os fenômenos micro e macro-evolutivos, e esse novo campo foi denominado filogeografia (AVISE et al., 2008). O termo filogeografia foi proposto primeiramente para descrever a área de estudo que se ocupa dos princípios e processos que direcionam a distribuição das linhagens genealógicas, especialmente aquelas em nível intraespecífico. A filogeografia associa a filogenia à biogeografia, no intuito de contribuir para o planejamento da conservação, revelando rompimentos históricos entre populações e espécies, ou ainda áreas com alta diversidade genética e endemismo (BEHEREGARAY, 2008). Espécies geneticamente próximas apresentam divisões filogeográficas similares provavelmente causadas pelas mesmas barreiras, favorecendo estratégias de conservação fundamentadas nas UES (CRISCIONE et al., 2007). Desta forma, a filogeografia permite a detecção de áreas prioritárias para conservação fundamentadas em altos níveis de diversidade genética e endemismo (NEWTON, 1999).

Descrições hierárquicas, como a construção de árvores genealógicas baseadas em marcadores nucleares ou de organelas (mtDNA ou cpDNA), podem refletir relações filogenéticas entre populações e espécies (GROS-LOUIS et al., 2005). Nesse contexto de avaliação da biodiversidade, privilegia-se o uso de filogenias moleculares interespecíficas para esclarecer distinções filogenéticas e seu valor para conservação (CROZIER, 1997). Na

abordagem filogenética, grupos monofiléticos representam linhagens historicamente isoladas, sendo definidas como UES (MORITZ; FAITH, 1998).

Uma abordagem complementar à análise de diversidade filogenética é a comparação de filogeografia intraespecífica para diferentes espécies de distribuição geográfica similar, visando identificar áreas entre as quais tais comunidades coevoluíram independentemente durante algum tempo, devido a eventos de vicariância (BELL et al., 2011). Desta maneira, a filogeografia comparativa permite identificar UES intraespecíficas e assembleias de espécies, incorporando a informação espacial em escala regional à diversidade genética, e permitindo o planejamento adequado das estratégias de conservação da biodiversidade (MORITZ; FAITH, 1998).

Três passos devem ser seguidos numa investigação filogeográfica comparativa (BERMINGHAM; MORITZ, 1998): 1) definir áreas apropriadas para análise, seja por critérios externos à informação genética, como biogeografia da espécie, dados históricos da paisagem e anseios conservacionistas, ou então, os próprios dados genéticos podem ser utilizados para definir as áreas de populações distintas; 2) determinar se existe história de vicariância entre as áreas comparadas, indicando convergência de padrões filogeográficos entre espécies ou o reconhecimento de barreiras biogeográficas; 3) identificar combinações de áreas visando maximizar a diversidade total a ser representada.

O uso da filogeografia comparativa para identificar áreas ou comunidades evolutivamente distintas vem buscando a avaliação qualitativa da similaridade entre filogenias (MARCILI et al., 2009). Podem-se avaliar padrões de distribuição espacial da diversidade genética influenciados por eventos de vicariância que moldaram comunidades de localidades distintas (BREMER et al., 2005), e determinar valores para a conservação de áreas prioritárias. Portanto, espera-se que a distribuição da diversidade genética e o endemismo de espécies como medidas de biodiversidade estejam em concordância quando submetidas por forças históricas similares, isto é, histórias de vicariância comuns (ADAMOWICZ et al., 2004).

Previsões recentes sobre as perspectivas da filogeografia evidenciam um grande avanço nos estudos (HICKERSON et al., 2009). A próxima fase provavelmente abrangerá de forma interativa análises múltiplas de táxons por meio de modelos coalescentes, estudos genômicos de seleção natural, modelagem de nicho ecológico, inferências sobre a especiação em comunidades e a evolução de características funcionais (CARSTENS; RICHARDS, 2007). As abordagens filogeográficas e de conservação genética podem ser particularmente úteis para identificar barreiras biogeográficas e refúgios, para testar modelos demográficos alternativos, na identificação de padrões demográficos concordantes inter e intraespecífico para um único ecossistema e na análise de conservadorismo do nicho temporal (SCOBLE; LOWE, 2010). Os marcadores moleculares têm muito a oferecer à modelagem de distribuição de espécies, em particular na compreensão da

histórica dos haplótipos (demografia) em função de variações climáticas (JAKOB et al., 2007). Além disso, incorporar os conhecimentos adquiridos por meio desses estudos permitirá aos gestores de conservação definir estratégias eficientes para a manutenção em longo prazo do potencial evolutivo das espécies (SCOBLE; LOWE, 2010).

3. Conservação Genética em Orchidaceae

Orchidaceae é a maior família em número de espécies entre as monocotiledôneas. Segundo a classificação da APG III (2009) pertence à ordem Asparagales, sendo constituída por aproximadamente 26.000 espécies distribuídas em cerca de 800 gêneros (JOPPA et al., 2011). É composta por plantas epífitas, terrícolas, rupícolas, perenes e algumas são saprófitas. Sua distribuição é cosmopolita, apesar de ser mais abundante e diversificada em florestas tropicais (GRAVENDEEL et al., 2004).

Lineu e Darwin foram os primeiros grandes admiradores dessa exuberância, contudo o tamanho da família tem sido historicamente um obstáculo para seu estudo (FAY; CHASE, 2009). Além de ser uma família numerosa, possui muitas espécies singulares (e.g., elevada diversidade; processos de coevolução; polinizadores específicos; estruturas florais especializadas; etc.), que compõe um grupo muito importante para a biologia da conservação (PILLON; CHASE, 2007).

Entretanto, diante da diversidade de espécies da família ainda há escassez de dados sobre as relações filogenéticas do grupo, impedindo a reconstrução da história evolutiva da família (SWARTS; DIXON, 2009a). Como a maioria das plantas, as orquídeas são particularmente ameaçadas pela perda de hábitat, especialmente as epífitas que habitam, preferencialmente, florestas primárias, e espécies terrestres que são sensíveis à poluição dos solos (PILLON; CHASE, 2007). Outra questão preocupante com as populações naturais de orquídeas é a coleta indiscriminada, a quebra nas conexões ecológicas, alteração das condições abióticas, e pragas que provocam doenças, tornando várias espécies ameaçadas de extinção. Além disso, ainda sofrem com os impactos das alterações climáticas que acarretam consequências prejudiciais para muitas espécies em seu hábitat degradado (SWARTS; DIXON, 2009b). A irradiação rápida dos grupos isolados filogeneticamente deve ser prioridade de conservação também, devido à grande biodiversidade de táxons (CROZIER, 1997).

Apesar dos estudos realizados nas últimas décadas sobre a filogenia de alguns grupos, há ainda muitas lacunas no conhecimento taxonômico de Orchidaceae (BYTEBIER et al., 2007; FAY; CHASE, 2009). Os primeiros estudos em sistemática molecular de Orchidaceae basearam-se na variação entre sequências de cloroplasto com intuito de compreender a posição filogenética da família em relação às outras famílias próximas bem como entre suas subfamílias (ALBERT, 1994; YUKAWA et al., 1996; CAMERON et al., 1999). Infelizmente, Orchidaceae está sujeita a excessivos erros taxonômicos devido à variabilidade morfológica e atração carismática pelos

historiadores naturais amadores (PILLON; CHASE, 2007).

Há duas décadas têm-se observado um aumento crescente do uso de técnicas moleculares por Jardins Botânicos e grupos de pesquisa na área de conservação de orquídeas. Os dados moleculares fornecem um quadro empírico, através do qual os profissionais em conservação terão informações necessárias para definir prioridades, reduzir custos e aperfeiçoar decisões de gestão. Em particular, dados moleculares permitem aos conservacionistas abordar questões de variação genética entre populações, delimitação de espécies e a manutenção de processos evolutivos (VAN DEN BERG et al., 2009). As orquídeas apresentam uma série de questões genéticas complexas relacionadas, em parte, a sua elevada diversidade e, para muitos táxons, à recente radiação evolutiva (SWARTS; DIXON, 2009b).

Estudos de filogenia

Estudos recentes filogenéticos baseados em sequências de *rbcl* (DNA de plastídeos) identificaram a monofilia das cinco subfamílias atualmente reconhecidas: (Apostasioideae (Vanillioideae (Cyripedioideae (Orchidoideae (Epidendroideae)))))). Epidendroideae e Orchidoideae constituem as duas maiores subfamílias (CAMERON, 2010; CHASE et al., 2015).

Adicionalmente, regiões de rápida evolução, tais como o espaçador ITS do DNA nuclear e os espaçadores intergênico *trnL-F* e *matK* do DNA de plastídeos, têm sido intensamente utilizadas em estudos em nível de gêneros e espécies (e.g. BATEMAN et al., 2003, CLEMENTS et al., 2002, VAN DEN BERG et al., 2000).

Segundo Cameron (2010) estudos taxonômicos e filogenéticos ancoram a elaboração de projetos de conservação em Orchidaceae. As relações filogenéticas auxiliam os conservacionistas na definição das prioridades para a conservação (SWARTS; DIXON, 2009a). Primeiramente, porque guiam os taxonomistas na revisão de classificações de grupos de espécies, que é fundamental para os inventários florísticos. Em segundo, podem revelar espécies crípticas, ou raras, que precisam e merecem reconhecimento e a proteção. Em terceiro, contribuem para a definição da existência ou não de um táxon, ou seja, delimitam os complexos de espécies. E por último, permitem encontrar e divulgar novas variedades.

Reconstruir a filogenia de grupos vegetais contribui para o reconhecimento de sua enorme diversidade de espécies. Por exemplo, o sequenciamento de DNA nuclear e plastídico em espécies do gênero *Spiranthes* Rich., que habitam a região Ocidental da América do Norte, apontou a descoberta de novas espécies (BROWN et al., 2008).

A taxonomia da espécie rara *Dracula aphrodes* Luer & Escobar, descrita em 1989 na Colômbia, foi recentemente revisada. A filogenia do gênero *Dracula* Luer foi proposta através de sequências nucleares ribossomais ITS e plastídicas *matK*, no qual foram posicionados em dois clados distintos. Os dados obtidos sugerem ainda a ocorrência de *D. aphrodes* como híbrido natural entre *D. verticulosa* Luer & Escobar e *D. insolita* Luer & R. Escobar (CAMERON, 2010).

As árvores filogenéticas têm sido ainda utilizadas no reconhecimento de características sinapomórficas, que podem apresentar ou não valor medicinal e econômico. Neste sentido, algumas análises têm sido focadas, por exemplo, no gênero *Vanilla* Plum. ex Mill. Existem mais de 100 espécies distribuídas pelo mundo, das quais somente uma única espécie, *V. Planifolia* Andrews, provavelmente endêmica das florestas tropicais no leste do México, é substancialmente de valor econômico, sendo fonte natural de sabor e da fragrância de baunilha (BORY et al., 2008). Recentemente há um número crescente de novas informações moleculares voltadas à elucidação da sistemática de *Vanilla* Plum. ex Mill. (SOTO-ARENAS, 2006; RAMIREZ et al., 2007; BORY et al., 2008; CAMERON, 2009; BOUETARD et al., 2010). Duas espécies, *V. tahitensis* J.W.Moore e *V. pompona* Schiede, também são cultivadas como aromáticas, porém, em menor escala. Assim, o conhecimento do grau de parentesco entre as espécies de potencial econômico poderá coordenar os cruzamentos de *Vanilla* Plum. ex Mill. com o objetivo de melhoramento genético e aumento da variação genética. Medidas de conservação *ex situ* têm permitido proteger os indivíduos selvagens, contudo, persistem dúvidas sobre a extensão das espécies a serem protegidas.

Análises filogenéticas moleculares de *Vanilla* Plum. ex Mill. revelaram que as espécies produtoras de frutas aromáticas estão no clado de espécies neotropicais (CAMERON, 2005). De uma perspectiva econômica é apropriado buscar as espécies neste clado como um primeiro passo para a conservação e para a melhoria das culturas. Desta forma, o conhecimento das relações interespecíficas permite escolher a melhor estratégia para conservar um grupo ou um táxon. Há um grande esforço internacional para proteger e estudar as espécies do gênero em suas áreas de origem, bem como em áreas onde a cultura foi introduzida, uma vez que é considerado como um patrimonial genético de importância econômica (BORY et al., 2008).

Algumas espécies, como *V. tahitensis* J.W.Moore, cuja distribuição é restrita na Polinésia Francesa e Papua na Nova Guiné apresentam a sua presença duvidosa. Tem sido investigada a suposta hibridação e descendência de *V. tahitensis* J.W.Moore em relação aos progenitores Neotropicais (LUBINSKY et al., 2008). A herança uniparental materna de cpDNA sugere que *V. planifolia* Andrews e *V. odorata* C.Presl serviram como seus respectivos contribuintes genômicos maternos e paternos. Enquanto a elevada porcentagem de sítios polimórficos conservados na maioria dos indivíduos de *V. tahitensis* J.W.Moore indica um híbrido F_1 , de *V. planifolia* Andrews e *V. odorata* C.Presl, e que ocorreram pelo menos alguns episódios de poliploidia e regeneração sexual. Uma vez que *V. tahitensis* J.W.Moore é evolutivamente recente, é possível que um cenário plausível para sua origem histórica seja acessos de *V. planifolia* Andrews e *V. odorata* C.Presl trazidos e cultivados juntos em sistema agroflorestal compartilhado, onde ocorreu a hibridação. Seguiu-se a propagação por métodos artificiais ou, ocorreu no Novo

Mundo, por meios naturais (HUGHES et al., 2007). Essa hibridação intencional ou inadvertida poderia ter acontecido entre 1350 a 1500 ainda na Mesoamérica, quando as populações de *Vanilla* Plum. ex Mill. foram exploradas por silvicultores maias (BARRERA; FERNÁNDEZ, 2006).

É importante ressaltar que há um número grande de espécies de orquídeas sem interesse econômico. Entretanto, essas espécies podem fornecer pistas sobre a evolução, ecologia, ou padrões de biogeográficos da família. Por exemplo, dois gêneros irmãos *Clematepistephium* (Rchb.f.) N.Hallé e *Eriaxis* Rchb.f da Ilha do Pacífico da Nova Caledônia são intimamente relacionados com espécies do gênero *Epistephium* Kunth da América Sul (CAMERON, 2010). A posição dos ramos da Vanilloideae tem o potencial de fornecer hipótese para a origem antiga de orquídeas no supercontinente de Gondwana há mais de 90 milhões de anos.

A recente descoberta na República Dominicana de uma abelha extinta sem ferrão, *Problebeia dominica*, preservada em âmbar juntamente com a polínea da orquídea *Meliorchis caribea*, do Mioceno, permitiu estimar que o ancestral comum das orquídeas viveu durante o Cretáceo (76-84 Ma), há pelo menos 20 milhões de anos, após o rompimento do Gondwana (RAMIREZ et al., 2007). Em apoio a estes dados foram encontrados microfósseis de folhas de dois gêneros de orquídeas epífitas, *Dendrobium* sw e *Earina* Lindl., em sedimentos na Nova Zelândia (CONRAN et al., 2009). Tal achado forneceu a primeira evidência robusta da diversificação do clado da maior subfamília Epidendroideae, durante o final do Cretáceo (LOVISA et al., 2010; LEE et al. 2012).

A análise minuciosa da filogenia da subfamília Cyripedioideae, composta por cinco gêneros e conhecida popularmente como orquídeas “sapatinho”, de distribuição disjunta em regiões temperadas e tropicais, esclareceu como provavelmente ocorreu a diversificação da família das orquídeas tropicais e herbáceas. Guo et al. (2012) revelaram que o gênero *Cypripedium* L., com ampla distribuição em regiões temperadas do Norte e Zonas Subtropicais, divergiram primeiro, seguido por *Selenipedium* Rchb.f, que é endêmica na América do Sul. Os gêneros *Mexipedium* V.A.Albert & M.W.Chase e *Phragmipedium* Rolfe, que ocorrem nos Neotrópicos, se mostram estreitamente relacionados com o clado irmão para *Paphiopedilum* Pfitzer da Ásia tropical. De acordo com estimativas de relógio molecular, *Selenipedium* Rchb.f surgiu no Paleoceno, enquanto que o ancestral mais recente comum de orquídeas “sapatinho” pode ser datado do Eoceno. A reconstrução dos ancestrais indicou que a vicariância é responsável pela distribuição disjunta das orquídeas “sapatinho” em regiões Palaeotropical e Neotropical (GUO et al., 2012).

Análises filogenéticas constituem ferramenta potencial para datar eventos históricos e contribuem com informações sobre a evolução de ecossistemas (BYTEBIER et al., 2011). A análise da filogenia molecular da orquídea do gênero *Disa* da África do Sul revelou como o

fogo foi um componente crucial na evolução da flora do Cabo da África do Sul, uma região caracterizada por elevado nível de riqueza de espécies e endemismo.

Novas ferramentas moleculares têm sido desenvolvidas nos últimos anos fornecendo meios para identificação e designação de táxons vegetais. Muitas questões evolutivas e taxonômicas podem ser respondidas com base nesses marcadores, que anteriormente não seriam possíveis com apenas métodos fenotípicos morfológicos. Técnicas moleculares como AFLP, RAPD, RFLP, ISSR, SSR, SNP, DNA barcoding, entre outros, têm sido usados para estudos de diversidade de espécies vegetais (ARIF et al., 2010; CBOL Plant Working Group, 2009; KOCYAN et al., 2008).

Estudos de genética de populações

Em nível populacional, as ferramentas moleculares esclarecem eventos de diversidade genética, estrutura genética, gargalos genéticos, fluxo gênico, endogamia e deriva genética. Pesquisas com essas abordagens têm resolvido os impactos da fragmentação do hábitat sobre fluxo gênico e estrutura da população de orquídeas (WALLACE, 2002; JACQUEMYNA et al., 2007; JUÁREZ et al., 2011), consequências genéticas de síndromes de polinização (TREMBLAY et al., 2005; VERECKEN, 2010; GASKETT, 2011; 2012), potencial evolutivo das populações (ACKERMAN; WARD, 1999; ACKERMAN et al., 2007; KISEL et al., 2012), endogamia (WALLACE, 2003; SMITHSON, 2006; BORBA et al., 2007), deriva genética (TREMBLAY; ACKERMAN, 2001; CHUNG; CHUNG, 2007; CHUNG; PARK, 2008; CHUNG, 2009; PHILLIPS et al., 2012) e estrutura genética espacial das populações em fina escala em orquídeas (CHUNG et al., 2004; 2005; WALLACE, 2006; JACQUEMYN et al., 2012). Diversos estudos têm sido empregados no intuito de elucidar os processos demográficos e evolutivos envolvidos na diversificação de espécies e linhagens, como hibridação e poliploidia (HEDRÉN et al., 2008), e fatores demográficos originados pela dinâmica histórica de oscilações climáticas em populações do Mediterrâneo e Europa Ocidental de *Anacamptis palustris* (Jacq.) R.M.Bateman, Pridgeon & M.W.Chase (COZZOLINO et al., 2003).

Muitas orquídeas podem possuir um ciclo de vida longo permitindo inúmeros cruzamentos e a dispersão de sementes a longa distância, características essas almejadas para produzir populações geneticamente diversas com pouca diferenciação entre si. Segundo Hamrick e Godt (1996), a diversidade genética média esperada (G_{ST}) em Orchidaceae é 0,087, que é relativamente baixa, entretanto está dentro do padrão para espécies herbáceas. Contudo, nenhuma tendência foi clara nos estudos populacionais em Orchidaceae até a presente data, com valores de G_{ST} que variam entre 0,012 em *Pterostylis angusta* A. S. George (SHARMAA et al., 2001) e 0,924 em *Zeuxine strateumatica* (Ln.) Schltr. (SUN; WONG, 2001). Portanto, há uma dificuldade na padronização de metodologias para os programas de conservação em orquídeas. Constata-se que para cada espécie é necessário um plano de manejo apropriado embasado em

dados genéticos. Assim, a análise molecular das populações e das espécies é uma ferramenta essencial para a delimitação da procedência, amostragem e propagação de sementes, precisão taxonômica, identificação de clones e seleção de genótipos adequados para programas de reintrodução e armazenamento em longo prazo. Torna-se necessário, ainda, agregar informações sobre as paisagens naturais de ocorrência das espécies (STORFER et al., 2007) e identificação dos nichos mais prováveis das espécies em diferentes escalas temporais (CARSTENS; RICHARDS, 2007).

O conhecimento da diversidade genética permeia as estratégias de conservação, pois a resistência em longo prazo das espécies depende do nível de variação genética. Geralmente espécies que apresentam altos níveis de diversidade genética tornam-se mais eficientes em suportar mudanças ambientais, pois suas populações possuem melhor capacidade de se adaptar a essas alterações. Portanto, maior diversidade genética aumenta a aptidão e diminui o risco de extinção (BRZOSKO et al., 2011). Baixos níveis de variação genética, normalmente estão associados à raridade das espécies (FRANKHAM et al., 2003), embora GITZENDANNER e SOLTIS (2000) contra argumentem essa hipótese. Previsões teóricas e dados empíricos mostram que a variação genética baixa muitas vezes é consequência do pequeno tamanho populacional (COZZOLINO et al., 2003; NAZARENO; JUMP, 2012). Populações pequenas e isoladas são muitas vezes geradas a partir de uma contínua fragmentação ou perda de hábitat devido à pressão antrópica (FRANKHAM et al., 2003). Impactos humanos reduzem o tamanho da população e aumentam a distância entre populações remanescentes, reduzindo o fluxo de genes entre elas. Populações pequenas, fragmentadas e isoladas têm geralmente baixa variação genética e, portanto, são mais vulneráveis a oscilações demográficas, ambientais e estocasticidades genéticas; isto levanta o risco de extinção. Consequentemente, aumenta a probabilidade de deriva genética e depressão por endogamia nessas populações (BRZOSKO et al., 2011).

Estudos de conservação genética de espécies são primordiais para estabelecer planos de manejo para conservar a biodiversidade. A destruição, modificação e fragmentação de florestas naturais, bem como a extração ilegal de orquídeas de populações naturais, tiveram uma forte influência na extinção de muitas espécies em várias regiões de todo o mundo. A família Orchidaceae possui inúmeros exemplos de espécies que foram extintas devido a ações antrópicas (KOOPOVITZ, 2001). Dessa forma, verifica-se a intensificação de estudos de diversidade genética para construção de planos de conservação em Orchidaceae (ÀVILA-DIAZ; OYAMA, 2007).

As orquídeas epífitas geralmente possuem um padrão de estrutura genética diferencial quando comparadas com os outros hábitos. A maioria das orquídeas epífitas aponta uma alta diversidade genética e estruturação populacional (ÀVILA-DIAZ; OYAMA, 2007). A diversidade genética de populações e estrutura ao longo da sua

distribuição geográfica de *Laelia speciosa* Schltr. (HBK), orquídea mexicana endêmica e ameaçada de extinção, foi examinada por Ávila-Díaz e Oyama (2007). Os autores verificaram que entre as populações há baixos níveis de diversidade genética e sugeriram estratégias de restauração, principalmente utilizando a reintrodução de indivíduos a partir de propagação *in vitro* de sementes das populações próximas a área de reintrodução, para manter a mesma estrutura encontrada no campo. Além disso, recomendam um projeto multidisciplinar sobre *L. speciosa* incluindo estudos biológicos bem como programas de educação ambiental nas comunidades locais.

A diversidade genética de seis populações de *Oncidium hookeri* Rolfe, espécie epífita neotropical e ameaçada de extinção, encontrada em remanescentes de Mata Atlântica brasileira na Serra da Mantiqueira foram avaliadas por Alcântara e colaboradores (2006). Treze locos polimórficos de aloenzimas foram utilizados para avaliar o fluxo gênico entre as populações e a ocorrência de gargalos recentes. Vários alelos raros foram encontrados em todas as populações e três populações apresentaram alelos privados. Constataram-se baixa diferenciação genética entre as populações de *O. hookeri* e foi detectada $F_{ST} = 0,029$. A diferenciação genética entre as populações foi baixa, tendo nenhuma correlação com a matriz de distância geográfica (teste de Mantel: $r = 0,34$, $P = 0,72$), porém não significativa. Apenas duas populações mostraram sinais de gargalos recentes. A deficiência de heterozigotos encontrada, provavelmente pode ser causada pelo comportamento de polinizadores, já as frequências baixas de vários alelos de diferentes loci podem ser mantidas devido à propagação clonal. Apesar da natureza estocástica da dispersão pelo vento das sementes a longas distâncias, este processo pode promover um fluxo gênico eficaz entre as populações, e assim evitar a diferenciação genética (ALCÂNTARA et al., 2006).

Outra espécie brasileira ameaçada de extinção devido à perda de hábitat e pela intensa pressão de coleta é a *Cattleya labiata* Lindl. Os primeiros dados sobre a diversidade genética e estrutura de seis populações selvagens foram estimados por meio de marcadores RAPD e ISSR em remanescentes de Floresta Atlântica no Nordeste do Brasil (PINHEIRO et al., 2012). Os dados de marcadores indicaram um alto nível de polimorfismo e complexa estruturação genética para as populações de *C. labiata*. A similaridade genética entre indivíduos de *C. labiata* com aqueles de diferentes regiões sugere que a dispersão anemocórica de suas sementes ocorre a longas distâncias. Os índices de diversidade genética encontrados indicaram maior nível de diferenciação dentro da população, em comparação com outros estudos de espécies de Orchidaceae por meio de marcadores dominantes. As populações de *C. labiata* examinadas não estão localizadas em áreas protegidas, sendo isso um fator importante para a prioridade de conservação desta espécie de orquídea (PINHEIRO et al., 2012).

Análise de diversidade genética em espécie endêmica do Nordeste do Brasil foi também realizada em *Cattleya*

elongata Barb. Rodr., orquídea rupícola, que ocorre em ilhas de afloramento rochoso em campo rupestre da vegetação da Chapada Diamantina (CRUZ et al., 2011). Foram avaliadas nove populações naturais quanto à variabilidade morfológica e genética, cobrindo toda a área de distribuição da espécie, empregando marcadores isoenzimáticos e ISSR, e análises morfométricas. As populações são geneticamente estruturadas e com baixa endogamia (isoenzimas, $F_{IS} = 0,06$). A similaridade genética entre as populações foi elevada em ambos os marcadores, apesar da descontinuidade dos afloramentos da Chapada Diamantina. Observaram-se ainda alta variabilidade morfológica com diferenciação moderada entre as populações, mas não foi encontrada qualquer correlação entre distâncias genéticas, morfológicas e geográficas, e entre a variabilidade encontrada na morfologia e marcadores genéticos. As diferenças observadas entre os dois marcadores genéticos e variáveis morfológicas ressalta a importância da avaliação de parâmetros para a conservação, planejamento ou de gestão da variabilidade encontrada nas diferentes populações (CRUZ et al., 2011).

Níveis de variação de aloenzimas e a estrutura genética detectada na rara orquídea terrestre *Epipactis thunbergii* A. Gray foram examinados para oito populações na Coreia do Sul (CHUNG; CHUNG, 2007). Foram encontrados níveis extremamente baixos de variação de aloenzimas dentro das populações: a frequência média de loci polimórficos foi de 3,8%, o número médio de alelos por loco foi de 1,04, e a heterozigosidade média esperada de 0,013. O índice de fixação foi próximo de zero $F_{IS} = 0,069$, embora a espécie seja autocompatível. No entanto, um grau muito elevado de diferenciação populacional foi encontrado entre as populações ($F_{ST} = 0,388$) na área estudada. Além disso, análise de autocorrelação espacial revelou significativa coancestria em um raio de até 3 m do indivíduo focal dentro das populações. Estas observações sugerem que os principais fatores explicativos para os níveis extremamente baixos da diversidade genética e da formação da estrutura genética de populações de *E. thunbergii* são a deriva genética, como resultado de um pequeno tamanho da população efetiva, um fluxo de genes restrito, e o isolamento das populações. Considerando a atual estrutura genética de *E. thunbergii*, três diretrizes foram sugeridas para o desenvolvimento de estratégias de conservação para as espécies na Coreia do Sul: (1) proteção dos habitats das populações, (2) a proibição por lei de qualquer coleta de *E. thunbergii*, e (3) a proteção de populações dos polinizadores, dado o fato da produção de frutos em habitats naturais ser muito baixa (CHUNG; CHUNG, 2007).

A orquídea *Orchis militaris* L. é uma das mais raras orquídeas da Grã-Bretanha com apenas três populações conhecidas. Duas destas populações contêm cerca de 200 plantas, mas a terceira é ainda muito menor, com apenas seis plantas quando a população foi descoberta. Esta pequena população se distancia em apenas 9 km do Buckinghamshire, sugerindo que tenha sido derivada dessa maior população como resultado da dispersão recente de

sementes (HUTCHINGS et al., 1998). O marcador AFLP demonstra claramente que as três populações são distintas, e não há evidências de que a população Oxfordshire é derivada da população Buckinghamshire. Além disso, a população de Suffolk, apesar de seu tamanho, tem muito pouca variação genética, enquanto que em Oxfordshire a população das plantas originais é claramente distinguível. Assim, uma pequena amostra de sementes a partir de Suffolk irá captar toda a diversidade genética deste local, enquanto que uma amostragem muito mais completa é necessária em outros locais, para maximizar a amostragem da variação genética. Os microssatélites também demonstraram um padrão genético próprio da população Oxfordshire (SMITH et al., 2003).

A orquídea *Cypripedium calceolus* L. também é considerada como extinta, com apenas um indivíduo na natureza no Reino Unido. Além dessa, existem diversos espécimes em coleções e dois indivíduos supostamente introduzidos na natureza. A análise dos marcadores AFLP nessa espécie demonstrou-se altamente problemática devido ao grande genoma (FAY; COWAN, 2001). *Cypripedium calceolus*, embora difundida por toda a Eurásia, é uma espécie rara em muitos países. Marcadores cloroplastidiais são os mais esclarecedores para avaliar espécies poliploides como *C. calceolus*. Estudos de genética de populações baseados em microssatélite plastidiais e espaçador intergênicos *trnL-trnF* foram utilizados para a compreensão da variação dentro e entre 32 populações e dos padrões biogeográficos de *C. calceolus* na Europa. Dentro das populações naturais da Inglaterra foram encontrados indivíduos originados de autopolinização, ou polinização cruzada com outras orquídeas e devem ser excluídos do programa de reintrodução da espécie. Apesar do extremo efeito gargalo sofrido por esta espécie na Inglaterra, encontrou-se um maior nível de diversidade genética nas populações maiores do que nas populações da Dinamarca. Os dados para microssatélites também mostram que os espécimes ingleses e suecos são geneticamente mais variáveis que as plantas dinamarquesas, que são geneticamente homogêneas. A ausência de polimorfismo nas populações dinamarquesas poderia ser devido a um efeito fundador, sendo provavelmente fundada pela longa distância de dispersão de sementes (FAY et al. 2009).

Outro importante exemplo de espécies de orquídeas que tem valor científico para um melhor entendimento dos processos evolutivos em plantas é o estudo de Pinheiro e colaboradores (2010). Os autores testaram a hipótese de fluxo gênico entre as espécies com grau de poliploidia diferentes no gênero *Epidendrum* L. entre as espécies *E. fulgens* Brongn. e *E. puniceoluteum* F. Pinheiro e F. Barros, que ocorrem no litoral brasileiro. Estudos como esse não são comuns, pois essas espécies são consideradas isoladas reprodutivamente por causa das barreiras pós-zigóticas. Foram analisadas populações naturais alopátricas e simpátricas com a utilização de microssatélites plastidiais e nucleares. Todas as populações simpátricas analisadas apresentaram zonas híbridas e introgressão, além disso, o estudo sugere que a hibridização e a introgressão são

processos evolutivos que desempenham um importante papel na diversificação do gênero.

Em seu livro “*A origem das espécies*” Darwin (1859) argumentou que a grande diversidade e incrível beleza dessas plantas poderia ser o produto de um fenômeno que é impulsionado por altos níveis de variabilidade e complexidade, que cria situações que geram níveis de especiação cada vez maiores, como por exemplo, os casos extremos de *Angraecum sesquipedale* Thouars e o do gênero *Ophrys* Linnaeus. Portanto estudos sobre a diversidade genética são essenciais para que se possa identificar genótipos endêmicos e a importância evolutiva dessas espécies de plantas. Além disso, os projetos multidisciplinares que englobam estudos biológicos como aspectos ecológicos, biogeográficos, taxonômicos e filogenéticos, a conscientização ambiental das comunidades locais, além de ações imediatas para preservar o hábitat dessas plantas em todo seu alcance geográfico, são indispensáveis para se alcançar uma conservação efetiva das espécies de orquídeas.

Considerações finais

Como a biota enfrenta níveis sem precedentes de extinção devido à influência humana nas mudanças climáticas, destruição do hábitat, introdução de espécies invasoras, extrativismo e ocupação de áreas naturais pelo crescimento da população, as prioridades de conservação genética devem ser definidas. Programas de conservação são complexos e exigem conhecimento atualizado sobre o status da taxonomia, biologia, ecologia, filogenia e filogeografia das espécies (SEATON et al., 2010). Riscos de extinção são cada vez mais generalizados entre as espécies, contudo tornam-se maximizados no grande e suscetível grupo das orquídeas. Sua diversidade de espécies, em grande parte com distribuição restrita, e padrões ecológicos especializados, sofre intenso impacto pela coleta predatória, crescente destruição de habitats e extinção de polinizadores. Em Orchidaceae, o alto nível de diversidade biológica se reflete em variados padrões de diferenciação genética de suas populações que precisam ser rapidamente conhecidos. A proteção da diversidade genética foi definitivamente incorporada nos protocolos conservacionistas. Contudo, necessita-se de maiores progressos em relação ao conhecimento e proteção da diversidade genética, uma vez que bases convencionais de dados se mostram inadequadas no planejamento do uso da terra e de estratégias conservacionistas.

4. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa de pesquisa concedida a CGF e à Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento da pesquisa.

5. Referências Bibliográficas

ACKERMAN, J. D.; TREJO-TORRES, J. C.; CRESPO-CHUY, Y. Orchids of the West Indies: predictability of diversity and endemism. *Journal of*

- Biogeography**, v. 34, p. 779-786, 2007.
- ACKERMAN, J. D., WARD, S. Genetic variation in a widespread, epiphytic orchid: where is the evolutionary potential? **Systematic Botany**, v. 24, p. 282-291, 1999.
- ADAMOWICZ, S. J., HEBERT, P. D. N.; MARINONE, M. C. Species diversity and endemism in the Daphnia of Argentina: a genetic investigation. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 140, p. 171-205, 2004.
- ALBERT, V. A. Cladistic relationships of the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae) from congruent morphological and molecular data. **Lindleyana**, v. 9, p.115-132, 1994.
- ALCANTARA, S., SEMIR, J., SOLFERINI, V. N. Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the Atlantic Rainforest of South-eastern Brazil. **Annals of Botany**, v. 98, p. 1207-1213, 2006.
- ALVAREZ-BUYLLA, E. R.; GARCIA-BARRIOS, R.; LARA-MORENO, C.; MARTINEZ-RAMOS, M. Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest tree species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 27, p. 387-421, 1996.
- APG III. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APGIII. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009.
- ARIF, I. A.; BAKIR, M. A.; KHAN, H. A.; AL FARHAN, A. H.; HOMAIDAN, A. A. A.; BAHKALI, A. H.; SADOON, M. A.; SHOBRAK, M. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 2079-2096, 2010.
- ÁVILA-DIAZ, I.; OYAMA, K. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae) **American Journal of Botany**, v. 94, p. 184-193, 2007.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, p. 3-15, 2008.
- AVISE, J. C.; JONATHAN, A. T.; MARTIN, B. R.; ELDREDGE, B.; TRIP, L.; JOSEPH, E.; NEIGEL, L.; CAROL, A.; REEB, A.; NANCY, C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.
- BARRERA, C.L.; FERNÁNDEZ, M.A. Cacao, Vanilla and Anatto: Three production and exchange systems in the southern Maya lowlands, XVI-XVII centuries. **Journal of Latin American Geography**, v. 5, p. 29-52, 2006.
- BATEMAN, R. M.; HOLLINGSWORTH, P. M.; PRESTON, J.; YI-BO, L.; PRIDGEON, A. M.; CHASE, M. W. Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 142, p. 1-40, 2003.
- BEHEREGARAY, L. B. Twenty years of Phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 3754-3774, 2008.
- BELL, R. C.; MACKENZIE, J. B.; HICKERSON, M. J.; CHAVARRIA, K. L.; CUNNINGHAM, M.; WILLIAMS, S.; MORITZ, C. Comparative multi-locus phylogeography confirms multiple vicariance events in co-distributed rainforest frogs. **Proceedings of the Royal Society B**, doi: 10.1098/rspb.2011.1229, 2011.
- BERMINGHAM, E.; MORITZ, C. Comparative phylogeography: concepts and applications. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 367-369, 1998.
- BORBA, E. L.; FUNCH, R. R.; RIBEIRO, P. L.; SMIDT, E. C.; SILVA-PEREIRA, V. Demography, and genetic and morphological variability of the endangered *Sophranitis sincorana* (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 267, p. 129-146, 2007.
- BORY, S.; GRISONI, M.; DUVAL, M. F.; BESSE, P. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 55, p. 551-571, 2008.
- BOUETARD, A.; LEFEUVRE, P.; GIGANT, R.; BORY, S.; PIGNAL, M.; BESSE, P.; GRISONI, M. Evidence of transoceanic dispersion of the genus *Vanilla* based on plastid DNA phylogenetic analysis. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 621-630, 2010.
- BREMER, J. R. A.; VINAS, J.; MEJUTO, J.; ELY, B.; PLA, C. Comparative phylogeography of Atlantic bluefin tuna and swordfish: the combined effects of vicariance, secondary contact, introgression, and population expansion on the regional phylogenies of two highly migratory pelagic fishes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, p. 169-187, 2005.
- BROWN, P. M.; DUECK, L. A.; CAMERON, K. M. *Spiranthes stellata* (Orchidaceae), a new species of ladies'-tresses from the western United States. **North American Native Orchid Journal**, v. 14, p. 3-21, 2008.
- BRZOSKO, E.; WRÓBLEWSKA, A.; TAŁAJ, I.; WASILEWSKA, E. Genetic diversity of *Cypripedium calceolus* in Poland. **Plant Systematics and Evolution**, v. 295, p. 83-96, 2011.
- BYTEBIER, B.; ANTONELLI, A.; BELLSTEDT, D. U.; LINDER, H. P. Estimating the age of fire in the Cape flora of South Africa from an orchid phylogeny. **Proceedings of The Royal Society B-Biological Sciences**, v. 278, p. 188-195, 2011.
- BYTEBIER, B.; BELLSTEDT, D. U.; LINDER, H. P. A molecular phylogeny for the large African orchid genus *Disa*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, p. 75-90, 2007.
- CAMERON, K. M. Recent advances in the systematics biology of *Vanilla* and related orchids (Vanilloideae, Orchidaceae). *Vanilla First International Congress, Carol Stream, Anais... Carol Stream: Allured Publishing*, p. 89-93, 2005.
- CAMERON, K. M. On the value of nuclear and mitochondrial gene sequences for reconstructing the phylogeny of vanilloid orchids (Vanilloideae, Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 104, p. 377-385, 2009.
- CAMERON, K. M. On the value of taxonomy, phylogeny, and systematics to orchid conservation: implications for China's Yachang Orchid Reserve. **Botanical Review**, v. 76, p. 165-173, 2010.
- CAMERON, K. M.; CHASE, M. W.; WHITTEN, W. M.; KORES, P. J.; JARRELL, D. C.; ALBERT, V. A.; YUKAWA, T.; HILLS, H. G.; GOLDMAN, D. H. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 208-224, 1999.
- CARSTENS, B. C.; RICHARDS, C. L. Integrating coalescent and ecological niche modeling in comparative phylogeography. **Evolution**, v. 61, p. 1439-1454, 2007.
- CAVERS, S.; NAVARRO, C.; LOWE, A. J. A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. **Conservation Genetics**, v. 4, p. 571-580, 2003.
- CBOL Plant Working Group. A DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 12794-12797, 2009.
- 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.
- CHEN, Y.-Y.; LEE, P.-F.; HSIAO, Y.-Y.; WU, W.-L.; PAN, Z.-J.; LEE, Y.-I.; LIU, K.-W.; CHEN, L.-J.; LIU, Z.-J.; TSAI, W.-C. C- and D-class MADS-Box Genes from *Phalaenopsis equestris* (Orchidaceae) display functions in gynostemium and ovule development. **Plant Cell Physiology**, v. 53, p. 1053-1067, 2012.
- CHUNG, M. Y. Lack of allozyme diversity in populations of the rare, endangered terrestrial orchids *Tipularia japonica* and *Epipactis papillosa* in Korea. **Plant Systematics and Evolution**, v. 278, p. 203-209, 2009.
- CHUNG, M. Y.; CHUNG, M. G. Extremely low levels of genetic diversity in the terrestrial orchid *Epipactis thunbergii* (Orchidaceae) in South Korea: implications for conservation. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 155, p. 161-169, 2007.
- CHUNG, M. Y.; NASON, J. D.; CHUNG, G. Spatial genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Orchis cyclochila* (Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 254, p. 209-219, 2005.
- CHUNG, M. Y.; NASON, J. D.; CHUNG, G. Spatial genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Cephalanthera longibracteata* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 91, p. 52-57, 2004.
- CHUNG, M. Y.; PARK, C. W. Fixation of alleles and depleted levels of genetic variation within populations of the endangered lithophytic orchid *Amitostigma gracile* (Orchidaceae) in South Korea: implications for conservation. **Plant Systematics and Evolution**, v. 272, p. 119-130, 2008.
- CLEMENTS, M. A.; JONES, D. L.; SHARMA, I. K.; NIGHTINGALE, M. E.; GARRATT, M. J.; FITZGERALD, K. J.; MACKENZIE, A. M.; MOLLOY, B. P. J. Phylogenetic systematics of the Diurideae (Orchidaceae) based on the ITS and 5.8S coding region of nuclear ribosomal DNA. **Lindleyana**, v. 17, p. 135-171, 2002.
- CONRAN, J. G.; BANNISTER, J. M.; LEE, D. E. Earliest orchid macrofossils: Early Miocene *Dendrobium* and *Earina* (Orchidaceae: Epidendroideae) from New Zealand. **American Journal of Botany**, v. 96, p. 466-74, 2009.

- COZZOLINO, S.; CAFASSO, D.; PELLEGRINO, G.; MUSACCHIO, A.; WIDMER, A. Fine-scale phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2783-2792, 2003.
- CRANDALL, K. A.; BININDA-EMONDSB, O. R. P.; MACEC, G. M.; WAYNED, R. K. Considering evolutionary processes in conservation biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, p. 290-295, 2000.
- CRISCIONE, C. D.; BLOUIN, M. S. Parasite phylogeographical congruence with salmon host evolutionarily significant units: implications for salmon conservation. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 993-1005, 2007.
- CROZIER, R. H. Preserving the information content of species: genetic diversity, phylogeny, and conservation worth. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 28, p. 243-268, 1997.
- CRUZ, D. T.; SELBACH-SCHNADLACH, A.; LAMBERT, S. M.; RIBEIRO, P. L.; BORBA, E. L. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 294, p. 87-98, 2011.
- DARWIN, C.R. On the origin of species by means of natural selection, or, the preservation of favoured races in the struggle for life. J. Murray, 1859.
- EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas. **Revista Brasileira de Genética**, v. 19, p. 23-29, 1996.
- FAJARDO, C. G.; ALMEIDA VIEIRA, F.; MOLINA, W. F. Interspecific genetic analysis of orchids in Brazil using molecular markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, p. 1825-1832, 2014.
- FAY, M. F.; BONE, R.; COOK, P.; KAHANDAWALA, I.; GREENSMITH, J.; HARRIS, S.; PEDERSEN, H.; INGROUILLE, M. J.; LEXER, C. Genetic diversity in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) with a focus on north-western Europe, as revealed by plastid DNA length polymorphisms. **Annals of Botany**, v. 104, p. 517-525, 2009.
- FAY, M. F.; CHASE, M. W. Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. **Annals of Botany**, v. 104, p. 359-364, 2009.
- FAY, M. F.; COWAN, R. S. Plastid microsatellites in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae): genetic fingerprints from herbarium specimens. **Lindleyana**, v. 16, p. 151-156, 2001.
- FRANKEL, O. H. Genetic conservation: our evolutionary responsibility. **Genetics**, v. 78, p. 53-65, 1974.
- FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **Comptes rendus Biologies**, v. 326, p. 22-29, 2003.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Fundamentos de Genética da Conservação. Editora Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 2008.
- FRANKHAM, R. Conservation genetics. **Annual Review of Genetics**, v. 29, p. 305-327, 1995.
- FUTUYMA, D. J. Biologia evolutiva. 2ª ed. Ed. Funpec, Ribeirão Preto, 2002.
- GASKETT, A. C. Orchid pollination by sexual deception: pollinator perspectives. **Biological Reviews**, v. 86, p. 33-75, 2011.
- GASKETT, A.C. Floral shape mimicry and variation in sexually deceptive orchids with a shared pollinator. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 106, p. 469-481, 2012.
- GITZENDANNER, M. A.; SOLTIS, S. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. **American Journal of Botany**, v. 87, p. 783-792, 2000.
- GRAVENDEEL, B.; SMITHSON, A.; SLIK, F. J. W.; SCHUITEMAN, A. Epiphytism and pollinator specialisation: drivers for orchid diversity? **Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 359, p. 1523-1535, 2004.
- GROS-LOUIS, M.-C.; BOUSQUET, J.; PÂQUES, L. E.; ISABEL, N. Species-diagnostic markers in *Larix* spp. based on RAPDs and nuclear, cpDNA, and mtDNA gene sequences, and their phylogenetic implications. **Tree Genetics Genomes**, v. 1, p. 50-63, 2005.
- GUO, Y.-Y.; LUO, Y.-B.; LIU, Z.-J.; WANG, X.-Q. Evolution and biogeography of the slipper orchids: Eocene vicariance of the conduplicate genera in the old and new world tropics. **Plos One**, v. 7, p. 1-13, 2012.
- HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. **Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 351, p. 1291-1298, 1996.
- HEDRÉN, M.; NORDSTRÖM, S.; STÅHLBERG, D. Polyploid evolution and plastid DNA variation in the *Dactylorhiza incarnata/maculata* complex (Orchidaceae) in Scandinavia. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 5075-5091, 2008.
- HICKERSON, M. J.; CARSTENS, B. C.; CAVENDER-BARES, J.; CRANDALL, K. A.; GRAHAM, C. H.; JOHNSON, J. B.; RISSLER, L.; VICTORIANO, P. F.; YODER, A. D. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, p. 291-301, 2009.
- HUGHES, C. E.; RAJANIKANTH, G.; ROBERTSON, A.; FILER, D. L.; HARRIS, S. A.; BAILEY, C. D. Serendipitous backyard hybridization and the origin of crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 14389-14394, 2007.
- HUTCHINGS, M. J.; MENDOZA, A.; HAVERS, W. Demographic properties of an outlier population of *Orchis militaris* L. (Orchidaceae) in England. **Botanical Journal of The Linnean Society**, v. 126, p. 95-107, 1998.
- JACQUEMYN, H.; BRYN, R.; HONNAY, O.; ROLDÁN-RUIZ, I.; LIEVENS, B.; WIEGAND, T. Nonrandom spatial structuring of orchids in a hybrid zone of three *Orchis* species. **New Phytologist**, v. 193, p. 454-464, 2012.
- JACQUEMYNA, H.; VANDEPITTE, K.; BRYSA, R.; HONNAY, O.; ROLDÁN-RUIZ, I. Fitness variation and genetic diversity in small, remnant populations of the food deceptive orchid *Orchis purpurea*. **Biological Conservation**, v. 139, p. 203-210, 2007.
- JAKOB, S. S.; IHLOW, A.; BLATTNER, F. R. Combined ecological niche modelling and molecular phylogeography revealed the evolutionary history of *Hordeum marinum* (Poaceae)—niche differentiation, loss of genetic diversity, and speciation in Mediterranean Quaternary refugia. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1713-1727, 2007.
- JOPPA, L.N.; ROBERTS, D.L.; PIMM, S.L. How many species of flowering plants? **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 278, p. 554-559, 2011.
- JUÁREZ, L.; MONTANÁ, C.; FERRER, M. M. Genetic structure at patch level of the terrestrial orchid *Cyclopogon luteoalbus* (Orchidaceae) in a fragmented cloud forest. **Plant Systematics and Evolution**, v. 297, p. 237-251, 2011.
- KISEL, Y.; MORENO-LETELIER, A. C.; BOGARÍN, D.; POWELL, M. P.; CHASE, M. W.; BARRACLOUGH, T. G. Testing the link between population genetic differentiation and clade diversification in Costa Rican orchids. **Evolution**, v. 66, p. 3035-3052, 2012.
- KOCYAN, A.; DE VOGEL, E. F.; CONTI, E.; GRAVENDEEL, B. Molecular phylogeny of *Aerides* (Orchidaceae) based on one nuclear and two plastid markers: A step forward in understanding the evolution of the Aeridinae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, p. 422-443, 2008.
- KOPOWITZ, H. Orchids and their conservation. Portland: Timber Press, 2001.
- KRAMER, A. T.; HAVENS, K. Plant conservation genetics in a changing world. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 559-607, 2009.
- KRUCKEBERG, A. R.; RABINOWITZ, D. Biological aspects of endemism in higher plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 16, p. 447-479, 1985.
- LEE, D. E.; CONRAN, J. G.; LINDQVIST, J. K.; BANNISTER, J. M.; MILDENHALL, D. C. New Zealand Eocene, Oligocene and Miocene, macrofossil and pollen records and modern plant distributions in the southern hemisphere. **The Botanical Review**, v. 78, p. 235-260, 2012.
- LOVISA, A. G. S.; VEROLA, C. F.; ANTONELLI, A. Reassessing the temporal evolution of orchids with new fossils and a Bayesian relaxed clock, with implications for the diversification of the rare South American genus *Hoffmannseggella* (Orchidaceae: Epidendroideae). **Evolutionary Biology**, v. 10, p. 177, 2010.
- LUBINSKY, P.; CAMERON, K. M.; MOLINA, M. C.; WONG, M.; LEPEPERS-ANDRZEJEWSKI, S.; GÓMEZ-POMPA, A.; KIM, S.-C. Neotropical roots of a Polynesian spice: the hybrid origin of *Tahitian vanilla*, *Vanilla tahitensis* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 95, p. 1040-1047, 2008.
- MANNI, F.; GUÉRARD, E.; HEYER, E. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. **Human Biology**, v. 76, p. 173-190, 2004.
- MARCILI, A.; LIMA, L.; VALENTE, V. C.; VALENTE, S. A.; BATISTA, J.; JUNQUEIRA, A. C. V. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TcIIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial

- clustering. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 1265-1274, 2009.
- MILLIGAN, B. G.; LEEBENSACK, J.; STRAND, A. E. Conservation genetics-beyond the maintenance of marker diversity. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 423-435, 1994.
- MORITZ, C. Defining "Evolution Significant Units" for conservation. **Trends Ecology Evolution**, v. 9, p. 373-375, 1994.
- MORITZ, C. Uses of molecular phylogenies for conservation. **Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences**, v. 349, p. 113-118, 1995.
- MORITZ, C.; FAITH, D. P. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 419-429, 1998.
- NAZARENO, A. G.; JUMP, A. S. Species-genetic diversity correlations in habitat fragmentation can be biased by small sample sizes. **Molecular Ecology**, 21, p. 2847-2849, 2012.
- NEWTON, A. C.; ALLNUT, T. R.; GILLIES, A. C. M.; LOWE, A. J.; ENNOS, R.A. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, p. 140-145, 1999.
- O'BRIEN, S. J.; MAYR, E. Bureaucratic mischief: reconize endangered species and subspecies. **Science**, v. 251, p. 1187-1188, 1991.
- OLSON, D. M.; DINERSTEIN, E.; WIKRAMANAYAKE, E. D.; BURGESS, N. D.; POWELL, G. V. N.; UNDERWOOD, E. C.; D'AMICO, J. A.; ITOUA, I.; STRAND, H. E.; MORRISON, J. C.; LOUCKS, C. J.; ALLNUTT, T. F.; RICKETTS, T. H.; KURA, Y.; LAMOREUX, J. F.; WETTENGEL, W. W.; HEDAO, P.; KENNETH, R.; KASSEM, K. R.; Terrestrial ecoregions of the world: A new map of life on earth, **BioScience**, v. 51, p. 933-938, 2001.
- PHILLIPS, R. D.; DIXON, K. W.; PEAKALL, R. Low population genetic differentiation in the Orchidaceae: implications for the diversification of the family. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 5208-5220, 2012.
- PILLON, Y.; CHASE, M. W. Taxonomic Exaggeration and Its Effects on Orchid Conservation. **Conservation Biology** v. 21, p. 263-265, 2007.
- PINHEIRO, F.; BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; MEYER, D.; FAY, M. F.; SUZUKI, R. M.; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). **Molecular Ecology**, v. 19, p. 3981-3994, 2010.
- PINHEIRO, L. R.; RABBANI, A. R. C.; SILVA, A. V. C.; LÉDO, A. S.; PEREIRA, K. L. G.; DINIZ, L. E. C. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, p. 1-11, 2012.
- RAMIREZ, 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.
- RYDER, O. A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **Trends Ecology Evolution**, v. 1, p. 9-10, 1986.
- SCOBLE, J.; LOWE, A. J. A case for incorporating phylogeography and landscape genetics into species distribution modelling approaches to improve climate adaptation and conservation planning. **Diversity and Distributions**, v. 16, p. 343-353, 2010.
- SEATON, P. T.; HU, H.; PERNER, H.; PRITCHARD, H. W. *Ex situ* conservation of orchids in a warming world. **Botanical Review**, v. 76, p. 193-203, 2010.
- SIMBERLOFF, D. The contribution of population and community biology to conservation science. **The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 19, p. 473-511, 1988.
- SHARMA, I. K.; JONESA, D. L.; YOUNGA, A. G.; FRENCH, C. J. Genetic diversity and phylogenetic relatedness among six endemic *Pterostylis* species (Orchidaceae; series *Grandiflorae*) of Western Australia, as revealed by allozyme polymorphisms. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 697-710, 2001.
- SMITH, R. D.; DICKIE, J. B.; LININGTON, S. H.; PRITCHARD, H. W.; PROBERT, R. J. Seed conservation: turning science into practice. London, The Royal Botanic Gardens, Kew, 2003.
- SMITH, S. Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1863-1872, 2000.
- SMITHSON, A. Pollinator limitation and inbreeding depression in orchid species with and without nectar rewards. **New Phytologist**, v. 169, p. 419-430, 2006.
- SOTO-ARENAS, M. A. La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. **Biodiversitas**, v. 66, p. 2-9, 2006.
- STORFER, A.; MURPHY, M. A.; EVANS, J. S.; GOLDBERG, C. S.; ROBINSON, S.; SPEAR, S. F.; DEZZANI, R.; DELMELLE, E.; VIERLING, L.; WAITS, L. P. Putting the 'landscape' in landscape genetics. **Heredity**, v. 98, p. 128-142, 2007.
- SUN, M.; WONG, K. C. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 2180-2188, 2001.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, p. 199-203, 2000.
- SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. **Annals of Botany**, v. 104, p. 543-556, 2009a.
- SWARTS, N. D.; DIXON, K. W. Perspectives on orchid conservation in botanic gardens. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 590-598, 2009b.
- TREMBLAY, R.; ACKERMAN, J. D. Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 72, p. 47-62, 2001.
- TREMBLAY, R. L.; ACKERMAN, J. D.; ZIMMERMAN, J. K.; CALVO, R. N. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 84, p. 1-54, 2005.
- VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W. E.; DRESSLER, R. L.; WHITTEN, W. M.; SOTO-ARENAS, M. A.; CHASE, M. W. A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. **Annals of Botany**, v. 104, p. 417-430, 2009.
- VAN DEN BERG, C.; HIGGINS, W. E.; DRESSLER, R. L.; WHITTEN, W. M.; ARENAS, M.; CULHAM, A.; CHASE, M. W. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Lindleyana** v. 15, p. 96-114, 2000.
- VERECCEN, N. J.; DAFNI, A.; COZZOLINO, S. Pollination Syndromes in Mediterranean Orchids-Implications for Speciation, Taxonomy and Conservation. **Botanical Review**, v. 76, p. 220-240, 2010.
- VIEIRA, F. A.; FAJARDO, C. G.; CARVALHO, D.; REIS, C. A. F.; MARCOS, A. S. Fine-scale genetic dynamics of a dominant neotropical tree in the threatened Brazilian Atlantic Rainforest. **Tree Genetics & Genomes**, v. 8, p. 1191-1201, 2012.
- VIEIRA, F. A.; NOVAES, R. M. L.; FAJARDO, C. G.; SANTOS, R. M.; ALMEIDA, H. S.; CARVALHO, D.; LOVATO, M. B. Holocene southward expansion in seasonally dry tropical forests in South America: phylogeography of *Ficus bonijesulapensis* (Moraceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, p. 189-201, 2015.
- VOGLER, A. P.; KNISLEY, C. B.; GLUECK, S. B.; HILL, J. M.; DESALLE, R. Using molecular and ecological data to diagnose endangered populations of the puritan tiger beetle *Cicindela puritana*. **Molecular Ecology**, v. 2, p. 375-383, 1993.
- WALLACE, L. E. Examining the effects of fragmentation on genetic variation in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae): inferences from allozyme and random amplified polymorphic DNA markers. **Plant Species Biology**, v. 17, p. 37-49, 2002.
- WALLACE, L. E. The cost of inbreeding in *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 90, p. 235-242, 2003.
- WALLACE, L. E. Spatial genetic structure and frequency of interspecific hybridization in *Platanthera aquilonis* and *P. dilatata* (Orchidaceae) occurring in sympatry. **American Journal of Botany**, v. 93, p. 1001-1009, 2006.
- WAPLES, R. S. Pacific salmon, *Oncorhynchus* spp., and the definition of 'species' under the endangered species act. **Marine Fisheries Review**, v. 53, p. 11-22, 1991.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97-159, 1931.
- YUKAWA, T.; OHBA, H.; CAMERON, K. M.; CHASE, M. W. Chloroplast DNA phylogeny of subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae): insights from a combined analysis based on rbcL sequences and restriction site variation. **Journal of Plant Research**, v. 109, p. 169-176, 1996.