

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



CHRISTIANO FRANCO VEROLA

"Estudos Biossistemáticos em Espécies de Hoffmannseggella H.G. Jones

(Orchidaceae: Laeliinae) ocorrentes em Complexos Rupestres de Altitude"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Christiano Franco Verola</u> e aprovada pela Comissão Julgadora. <u>Vera Nisaka Solferini</u>
--

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para a obtenção do
Título de Doutor em Ecologia.

Orientador: Prof. Dr. JOÃO SEMIR

Co-Orientadora: Profa. Dra. VERA NISAKA SOLFERINI

Campinas, 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

V599e

Verola, Christiano Franco
Estudos biossistemáticos em espécies de
Hoffmannseggella H. G. Jones (Orchidaceae: Laeliinae)
ocorrentes nos Complexos Rupestres de Altitude /
Christiano Franco Verola. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: João Semir.
Co-orientadora: Vera Nisaka Solferini.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Biogeografia. 2. Datação molecular. 3.
Polinização. 4. Reprodução. 5. Número cromossômico.
I. Semir, João. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Biosystematic studies in *Hoffmannseggella* H. G. Jones (Orchidaceae: Laeliinae) occurring in Altitude Rocky Complexes of Brazil.

Palavras-chave em inglês: Biogeography; Molecular dating; Pollination; Reproduction; Chromosome numbers.

Área de concentração: Ecologia.

Titulação: Doutor em Ecologia.

Banca examinadora: João Semir, Leandro Freitas, Marlies Sazima, Fábio de Barros, Julie Henriette Antoinette Dutilh.

Data da defesa: 17/01/2008.

Programa de Pós-Graduação: Ecologia.

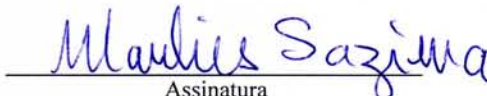
Campinas, 17 de janeiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini (Co-Orientadora)


Assinatura

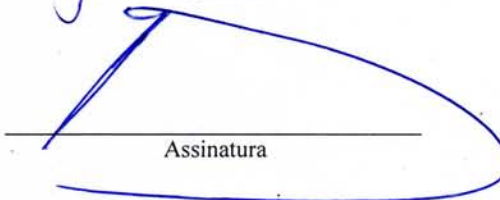
Profa. Dra. Marlies Sazima


Assinatura

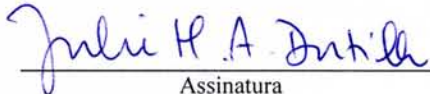
Prof. Dr. Leandro Freitas


Assinatura

Prof. Dr. Fábio de Barros


Assinatura

Profa. Dra. Julie Henriette Antoinette Dutilh


Assinatura

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins

Assinatura

Prof. Dr. George Shepherd

Assinatura

Profa. Dra. Ingrid Koch

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao querido mestre, João Semir, pela confiança, respeito, incentivo, orientação e amizade durante os vários anos de convivência, que tiveram grande influência na minha formação acadêmica, profissional e, sobretudo humana;

À Vera Nisaka Solferini por ceder espaço para cultivo das espécies estudadas na casa de vegetação do Departamento de Genética e Evolução, IB, UNICAMP, por me receber no Laboratório de Genética para desenvolvimento de parte deste trabalho, além da co-orientação;

À Eliana Regina Forni-Martins e Marlies Sazima pelo interesse, colaboração, incentivo e discussões inspiradoras durante o desenvolvimento deste projeto e por conceder autorização de utilização das dependências e da infra-estrutura do Laboratório de Biossistemática, Departamento de Botânica, IB, UNICAMP;

Aos professores Julie A. A. Dutilh, Eliana Regina Forni-Martins, Fábio de Barros, Ingrid Koch, Marlies Sazima e Leandro Freitas, pela leitura crítica, sugestões e correções das versões preliminares deste trabalho, além da participação na fase da pré-banca e banca examinadora;

Ao pesquisador e amigo Alexandre Antonelli (Universidade de Göteborg, Suécia), pelas constantes colaborações, parcerias, discussões e ensinamentos que fizeram deste, um trabalho mais completo;

Ao professor Cássio Van Den Berg (UEFS, BA) por fornecer parte da matriz filogenética utilizada neste trabalho, pelas valiosas discussões, dicas sobre localização, cultivo e ecologia das espécies estudadas;

Aos colaboradores Vitorino Castro-Neto, Maria do Rosário (Orquidário Quinta do Lago, RJ), Kleber Lacerda, Eduardo Catharino, Fábio de Barros (Orquidário do Estado, Instituto Botânico, SP), Prof. Leônidas (Diamantina/MG) e Samantha Koehler (Orquidário Paulo Sodero Martins, Esalq, SP) por ceder ou indicar a localização de amostras das espécies estudadas, que foram essenciais para a elaboração deste trabalho;

Às pesquisadoras Isabel Alves dos Santos (USP, SP) e Mardiore Pinheiro pela identificação dos polinizadores;

Ao pesquisador Cláudio N. Fraga (JBRJ, RJ), por ceder algumas fotos de um híbrido observado em condições naturais;

Ao desenhista Rogério Lupo pela rapidez e precisão na elaboração das ilustrações botânicas;

A todos os curadores de Herbários (UEC, UB, ESA, SPF, SP, BHCB, HXBH, ESAL, MBML, R, RB, HB) e responsáveis pelos institutos de pesquisa que visitei;

Ao Rafael Carvalho da Costa pelo auxílio com as análises estatísticas;

À Dona Marlene (Pousada Canto da Gente, Joaquim Felício, MG) e Dona Rosélia (Hotel e Pousada da Fazenda Monjolos, Cardeal Mota, MG) pela acolhida, por sempre me receber com

carinho, com um excelente “bate-papo” e uma comida mineira bem gostosa depois de um dia exaustivo de trabalho;

A Itayguara Ribeiro da Costa, Mariana Esteves Mansanares, Leonardo Meireles, Cátia Urbanetz, Ivonne San Martin-Gajardo e Maria Tereza Azevedo pelo auxílio nas viagens de campo;

Ao IBAMA/MMA e IEF/MG pela autorização de pesquisa e coleta do material biológico necessário para o desenvolvimento deste projeto;

Ao CNPq, FAEPEX/UNICAMP e FAPESP pela concessão dos recursos financeiros;

Aos coordenadores e funcionários responsáveis pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia/UNICAMP pela oportunidade concedida e apoio burocrático necessário para a realização deste projeto;

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Botânica/IB/UNICAMP pelo auxílio, compreensão e respeito durante as várias fases deste trabalho e, principalmente pelo apoio, por compartilhar conhecimentos e pelas discussões proveitosas durante o desenvolvimento deste projeto;

Aos amigos Alana, Ana Cecília, Ana Deckman, André Gil, Andréa Silveira, Aninha, Careca, Carla Magioni, Carla Vacari, Carla Vizeu, Cátia Urbanetz, Carolina Scatolin, Dani, Dudu, Éliton, Eric Smidt, Fabiana Firetti, Feranda Ferrari, Fernanda Aquino, Gabriel Mazotti, George Leandro, Grazi, Guilherme, Hilder, Ingrid Koch, Itayguara, Ivonne San Martin, Jackeline Prata, Jarbas, Jerônimo, João Aranha, Juan Urdampilleta, Júlia Yamaghishi, Karin, Karina Fidanza, Karina Lane, Kayna, Leonardo Meireles, Lidyanne Aona, Liliana Oliveira, Lovisa Gustafsson, Luiz Pedro, Marcela, Márcia Rocca, Mardiore Pinheiro, Mariana Mansanares, Nega, Nelci, Pai Mário, Raquel Sampaio, Rafael Costa, Roberta Macedo, Rogério Lupo, Rogleigiane, Rômulo, Rosilaine, Ruben Ávila, Samantha Koehler, Sandra Colômbia, Shesterson Aguiar, Silas Penha, Vanessa Mancuso, Veridiane e Viviane Silva-Pereira... Muito obrigado pela companhia e por tornar meus dias mais interessantes;

Aos que não foram citados, mas que de alguma forma colaboraram;

Meu agradecimento especial ao amigo, Itayguara Costa, por me auxiliar, apoiar e compreender ao longo de todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho;

À minha família, em especial meus pais, Nivaldo e Sueli, pelo constante incentivo e força, pelo carinho e respeito, pelos ensinamentos de uma vida toda que me foram passados através de concessões, esforços, muitas renúncias, uma certa dose de devoção e muito amor. Muito obrigado por propiciar condições para que eu desenvolvesse meus estudos e por não me deixar desistir nunca.

INDICE GERAL

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
<i>Laelia</i>, <i>Sophronitis</i> ou <i>Hoffmannseggella</i>? Um breve histórico dos problemas taxonômicos concernentes ao estudo das espécies brasileiras.	1
Referências Bibliográficas	9
INTRODUÇÃO GERAL	11
Objetivos Gerais e Específicos	13
Referências Bibliográficas	14
CAPÍTULO 1 - Análise dos padrões fitogeográficos associados a métodos de PAE e modelagem ecológica como ferramentas para delimitação de áreas prioritárias para conservação de espécies dos gêneros <i>Hoffmannseggella</i> H. G. Jones e <i>Dungsia</i> V. P. Castro & Chiron (Laeliinae: Orchidaceae).	18
Introdução	19
Material e Métodos	21
Resultados	24
Discussão	28
Referências Bibliográficas	35
CAPÍTULO 2 - Molecular dating and evolution in some genus of Laeliinae subtribus (Orchidaceae), with emphasis in <i>Hoffmannseggella</i> H. G. Jones and <i>Dungsia</i> V. P. Castro & Chiron.	51
Introduction	52
Material and Methods	53
Results	55
Discussion	58
Literature Cited	62
CAPÍTULO 3 - Biologia floral e ecologia da polinização em espécies de <i>Hoffmannseggella</i> H.G.Jones (Laeliinae:Orchidaceae) ocorrentes nos Campos Rupestres do Estado de Minas Gerais.	71
Introdução	72
Material e Métodos	74
Resultados	76
Discussão	82
Referências Bibliográficas	89
CAPÍTULO 4 - Sistemas de reprodução e potencial de hibridação em treze espécies de <i>Hoffmannseggella</i> H.G.Jones (Laeliinae:Orchidaceae), com notas sobre a quebra da auto-incompatibilidade em espécies poliplóides.	104
Introdução	105
Material e Métodos	107
Resultados	110
Discussão	118
Referências Bibliográficas	130
CAPÍTULO 5 - Chromosome studies, cytogeography and reassessment of polyploidy in the Brazilian endemic genus <i>Hoffmannseggella</i> H. G. Jones (Orchidaceae:Laeliinae).	152
Introduction	153
Material and Methods	154
Results	155
Discussion	157
Literature Cited	167
CAPÍTULO 6 - <i>Hoffmannseggella viridiflora</i> (Orchidaceae, Laeliinae), a New Species from Brazilian Campos Rupestres.	176
Introduction	176
Material and Methods	176
Results	177
Discussion	177
Literature Cited	180
CAPÍTULO 7 - Biosystematic studies in Brazilian endemic genus <i>Hoffmannseggella</i> H. G. Jones (Orchidaceae:Laeliinae): a multiple approach applied to conservation.	181
Introduction	181
Material and Methods	181
Results	181
Discussion	181
Literature Cited	183

INDICE DE TABELAS E FIGURAS

<i>Laelia</i>, <i>Sophranitis</i> ou <i>Hoffmannseggella</i>? Um breve histórico dos problemas taxonômicos concernentes ao estudo das espécies brasileiras.	1
Tabela 1. Comparação entre as propostas de classificação e espécies circunscritas por Lindley (1842) e Schlechter (1917) para o gênero <i>Laelia</i> .	6
Tabela 2. Comparação entre as propostas de classificação e espécies circunscritas por Pabst & Dungs (1975) e Withner (1990) para o gênero <i>Laelia</i> .	7
Tabela 3. Comparação entre as propostas de classificação e espécies circunscritas por van den Berg (2000) e Chiron & Castro-Neto (2002).	8
CAPÍTULO 1 - Análise dos padrões fitogeográficos associados a métodos de PAE e modelagem ecológica como ferramentas para delimitação de áreas prioritárias para conservação de espécies dos gêneros <i>Hoffmannseggella</i> H. G. Jones e <i>Dungisia</i> V. P. Castro & Chiron (Laeliinae: Orchidaceae).	18
Tabela 1. Lista de espécies de <i>Hoffmannseggella</i> e <i>Dungisia</i> dos Complexos Rupestres de Altitude, sua distribuição e regiões de ocorrência.	39
Figura 1. Complexos Rupestres de Altitude (CRA) dividido em sete meso-regiões geográficas.	41
Figura 2. Mapa dos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia, mostrando as áreas de distribuição natural das espécies de <i>Hoffmannseggella</i> e <i>Dungisia</i> .	42
Figura 3. Dendrograma resultante da análise de similaridade baseada em Índice de Jaccard/UPGMA.	43
Figura 4. Origem geológica das áreas ocupadas pelos diferentes sub-conjuntos de espécies de <i>Hoffmannseggella</i> evidenciados pela análise de similaridade UPGMA.	44
Figura 5. Distribuição da riqueza e diversidade das espécies de <i>Hoffmannseggella</i> nos complexos rupestres de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia.	45
Figura 6. Distribuição da riqueza e diversidade das espécies de <i>Dungisia</i> no Espírito Santo.	45
Figura 7. Análise de PAE baseada em quadrantes.	46
Figura 8. Distribuição potencial das espécies de <i>Hoffmannseggella</i> .	47
Figura 9. Distribuição potencial das espécies de <i>Dungisia</i> .	48
Figura 10. Distribuição potencial concatenada das espécies de <i>Dungisia</i> e <i>Hoffmannseggella</i> .	49
Figura 11. Cladograma filogenético molecular das espécies de <i>Hoffmannseggella</i> e <i>Dungisia</i> , com as áreas de distribuição predominante para cada espécie.	50
CAPÍTULO 2 - Molecular dating and evolution in some genus of Laeliinae subtribus (Orchidaceae), with emphasis in <i>Hoffmannseggella</i> H. G. Jones and <i>Dungisia</i> V. P. Castro & Chiron.	51
Table 1. Age of nodes.	66
Figure 1. The most likely phylogenetic tree obtained using bayesian inference.	67
Figure 2. Chronogram with nodes scaled proportional to their ages as estimated under the bayesian analysis.	68
Figura 3. Chronogram with nodes scaled proportional to their ages as estimated under the bayesian analysis and distribution of Laeliinae.	69
Figure 4. Distribution maps of <i>Hoffmannseggella</i> and <i>Dungisia</i> species.	70
CAPÍTULO 3 - Biologia floral e ecologia da polinização em espécies de <i>Hoffmannseggella</i> H.G.Jones (Laeliinae:Orchidaceae) ocorrentes nos Campos Rupestres do Estado de Minas Gerais.	71
Tabela 1. Espécies, localidades e material testemunho das populações focais acompanhadas em condições naturais.	93

Tabela 2. Ecologia da polinização em espécies de <i>Hoffmannseggella</i>	94
Tabela 3. Biologia floral e atrativos em espécies de <i>Hoffmannseggella</i>	95
Tabela 4. Fenologia de floração das espécies de <i>Hoffmannseggella</i> .	96
Tabela 5. Fenologia de floração e sobreposição geográfica das espécies estudadas.	96
Figura 1. Espécies estudadas.	97
Figura 2. Osmóforos e guias de nectários.	98
Figura 3. Variação de morfologia e coloração floral.	99
Figura 4. Nectários extraflorais e locais de produção de néctar.	100
Figura 5. Mecanismos de autopolinização espontânea.	101
Figura 6. Barreiras mecânicas evitando a hibridação entre espécies sincronopátricas.	102
Figura 7. Híbridos naturais observados entre espécies sincronopátricas.	103
 CAPÍTULO 4 - Sistemas de reprodução e potencial de hibridação em treze espécies de <i>Hoffmannseggella</i> H. G. Jones (Laeliinae: Orchidaceae), com notas sobre a quebra da auto-incompatibilidade em espécies poliplóides.	 104
 Tabela 1. Populações e espécies de <i>Hoffmannseggella</i> utilizadas nos cruzamentos experimentais manuais.	 138
Tabela 2. Viabilidade de sementes em cruzamentos experimentais em espécies de <i>Hoffmannseggella</i> .	139
Tabela 3. Percentual de sementes viáveis em cruzamentos experimentais inter-específicos entre espécies de <i>Hoffmannseggella</i> .	140
Tabela 4. Viabilidade de sementes em cruzamentos experimentais e em frutos coletados em populações naturais.	141
Apêndice 1. Percentual de frutificação em cruzamentos experimentais de espécies de <i>Hoffmannseggella</i> .	142
Figura 1. Espécies estudadas.	145
Figura 2. Box-Plot de viabilidade de sementes em cruzamentos intra-específicos.	147
Figura 3. Megasporogênese – Megagametogênese.	149
Figura 4. Germinação e crescimento dos tubos polínicos, fertilização e tipos de embrião.	150
Figura 5. Viabilidade de sementes em cruzamentos experimentais de autopolinização.	151
Figura 6. Viabilidade de sementes em cruzamentos inter-específicos.	151
 CAPÍTULO 5 - Chromosome studies, cytogeography and reassessment of polyploidy in Brazilian endemic genus <i>Hoffmannseggella</i> H. G. Jones (Orchidaceae: Laeliinae).	 152
 Table 1. Species and populations analyzed and details of voucher specimens	 168
Table 2. Somatic chromosome numbers (2n) and ploidy levels (x) in <i>Hoffmannseggella</i> specie.	169
Figure 1. Mitotic Metaphases in <i>Hoffmannseggella</i> .	170
Figure 2. Geographic distribution of ploidy levels in species of <i>Hoffmannseggella</i> .	171
Figure 3.1. Distribution of synchronopatric species.	172
Figure 3.2. Distribution of synchronopatric species.	173
Figure 3.3. Distribution of synchronopatric species.	174
Figure 4. Phylogeny, molecular dating and origin of polyploidy.	175
 CAPÍTULO 6 – <i>Hoffmannseggella viridiflora</i> (Orchidaceae, Laeliinae), a New Species from Brazilian Campos Rupestres.	 177
 Figure 1. <i>Hoffmannseggella viridiflora</i> Verola & Semir.	 178
Table 1. Diagnostic characters of <i>Hoffmannseggella viridiflora</i> and closely related taxa.	179

Resumo

Um estudo biossistemático foi realizado no gênero neotropical e endêmico do Brasil, *Hoffmannseggella* H.G. Jones. Este gênero é caracterizado por ser exclusivamente rupícola e apresentar flores de cores variadas, vívidas e contrastantes. As espécies estão distribuídas ao longo dos complexos rupestres de altitude, principalmente na região sudeste (MG, RJ e ES) e nordeste (BA). Foram descritos os padrões de distribuição geográfica para 34 espécies de *Hoffmannseggella* e três espécies de *Dungsia*, por meio de técnicas de georeferenciamento. Os resultados indicaram a formação de quatro subconjuntos de espécies: Chapada Diamantina - BA, centro-sul e centro-norte da Cadeia do Espinhaço - MG, e Complexos Rupestres do RJ/ES. As análises de PAE (Parsimony Analysis of Endemicity) e Modelagem Ecológica indicaram 12 áreas prioritárias para conservação, além de três áreas complementares para garantir a manutenção e sobrevivência destas espécies. São apresentados os resultados da datação molecular com ênfase em *Hoffmannseggella*, incluindo gêneros relacionados, sob uma perspectiva histórico-evolutiva. O cenário biogeográfico e histórico mais provável em Laeliinae, indica o surgimento e confinamento das espécies basais do grupo na América Central no Mioceno, com posterior irradiação de grupos derivados para a América do Sul, através da ligação parcial entre Ilhas da “Proto América Central”. Os principais eventos de cladogênese em *Hoffmannseggella* não estão associados a áreas específicas, mas a múltiplos eventos associados à expansão e retração de áreas campestres ocorridas entre o Plioceno e o Pleistoceno. Foram realizados estudos de biologia floral e ecologia da polinização em oito espécies de *Hoffmannseggella*, com atenção aos mecanismos de isolamento reprodutivo entre espécies sincronopátricas. As espécies são polinizadas por himenópteros de diferentes famílias, com sistemas de polinização não específicos e baseados no engano do polinizador, contrariando suposições anteriores que caracterizavam estas espécies como ornitófilas. O estudo dos sistemas reprodutivos de 13 espécies em 36 diferentes populações revelou que a maioria das espécies é auto-incompatível, porém uma mesma espécie pode apresentar diferentes sistemas reprodutivos dependendo da população. A quebra da auto-incompatibilidade em algumas espécies está fortemente associada à ocorrência da poliploidia, situação relativamente comum em Angiospermas, mas descrita pela primeira vez em Orchidaceae. A quebra da auto-incompatibilidade parece conferir vantagens ao estabelecimento de linhagens poliplóides em *Hoffmannseggella*, pois estas espécies apresentam mecanismos de auto-polinização espontânea. Foi realizado um estudo cromossômico, no qual foram obtidas contagens inéditas para 12 espécies e dois híbridos naturais em 24 diferentes populações, enfatizando a importância da poliploidia para a evolução deste grupo. Algumas espécies apresentaram citótipos, que foram discutidos sob uma visão citogeográfica e evolutiva, com ênfase nos principais mecanismos associados ao estabelecimento de complexos poliplóides. A poliploidia é um fenômeno relativamente recente em *Hoffmannseggella*, e surgiu independentemente várias vezes ao longo da sua história evolutiva. É descrita uma nova espécie, *H. viridiflora*, morfológicamente relacionada com as espécies de escapos curtos, flores pequenas e amarelas, ocorrentes no Planalto de Diamantina - MG. Por fim é apresentada uma visão biossistemática geral e conservacionista que revela os principais problemas associados à manutenção de áreas naturais com grande diversidade de espécies de *Hoffmannseggella*.

Abstract

A biosystematic study of the neotropical and Brazilian endemic genus *Hoffmannseggella* H. G. Jones was carried out. This genus is characterized by rupicolous habit, with varied-contrasting flowers colors. These species are distributed at high altitude rocky complexes, mainly in the Southeast (MG, RJ and ES) and Northeast (BA). The geographic distribution patterns of 34 *Hoffmannseggella* and three *Dungsia* species by GIS techniques were described. The results point to four sub-sets of species groups: Chapada Diamantina - BA, Northern and Southern part of Central area of the Espinhaço Range – MG and rocky complexes of RJ/ES. Parsimony analysis of endemism and ecological modeling indicated 12 priority areas for conservation and more three complementary areas to guarantee the species survival for a long time. The results of molecular dating are presented, with emphasis on *Hoffmannseggella*, including related genera, in a historical-evolutionary perspective. The most probable biogeographic and historical scenario in Laeliinae points to the origin and confinement of basal species in Central America in the Miocene, with posterior irradiation of derived groups to South America, through a partial link by islands in “Proto Central America”. The main cladogenesis events in *Hoffmannseggella* are not associated with specific areas, but happen in multiple events associated to the expansion and retraction of open vegetation in the Plio-Pleistocene. Floral biology and pollination ecology studies were carried out in eight *Hoffmannseggella* species, with attention to the reproductive isolation mechanisms between sympatric species. *Hoffmannseggella* species are pollinated by small bees (Hymenoptera) of different families, with unspecific and deceit based pollination systems that discredit previous suppositions that characterized *Hoffmannseggella* as ornithophilous. Breeding system studies of 13 species and 36 different populations revealed that most species are self-compatible, but the same species can present different breeding systems depending on the population. The break up of self-incompatibility in some species is associated to polyploidy, and this phenomenon is relatively frequent in Angiosperms, but had been never described in orchids. Self-compatibility in polyploid species can confer advantages in establishment of polyploid lineages. A review of chromosome numbers in *Hoffmannseggella*, show new counts for 12 species and two natural hybrids in 24 different populations, with emphasis in the importance of polyploidy for the evolution of this group. Some species presented different cytotypes, and this is discussed in a cytogeographic and evolutionary perspective, with emphasis on the main factors related with establishment of polyploid complexes. Polyploidy is a recent phenomenon in *Hoffmannseggella*, but can appear independently many times in its evolutionary history. A new species, *H. viridiflora*, is described and morphologically related to species with short racemes, yellow and smaller flowers, occurring at the Diamantina Plateau - MG. Finally, we present a general biosystematic and conservationist view, which points the main problems associated with the maintenance of natural areas with high diversity of *Hoffmannseggella* species.

***Laelia*, *Sophronitis* ou *Hoffmannseggella*? Um breve histórico dos problemas taxonômicos concernentes ao estudo das espécies brasileiras**

O gênero *Laelia* foi criado formalmente por Lindley, tendo como espécie tipo *Laelia grandiflora*, proveniente do México e anteriormente descrita por Lindley como *Bletia grandiflora* (La Llave & Lexarza, 1825 *apud* Withner, 1990) e *B. speciosa* (Humboldt, Bonpland & Kunth, 1815 *apud* Withner, 1990). Levando em consideração a sequência das publicações, o gênero *Laelia* conserva o epíteto específico de *B. speciosa* (Humboldt, Bonpland & Kunth, 1815 *apud* Withner, 1990), sinonimizando todos os nomes anteriores para a espécie tipo do grupo, inclusive *L. majalis* (Lindley, 1839 *apud* Withner, 1990).

A primeira proposta de classificação para o gênero *Laelia* foi elaborada por Lindley (1842 *apud* Withner, 1990), separando as espécies em dois grupos: *Grandiflorae* e *Parviflorae*. As principais características utilizadas para esta classificação foram as peças do perianto, apresentando pétalas maiores que as sépalas no primeiro grupo, e sépalas e pétalas do mesmo tamanho no segundo (Tabela 1). Desde então, várias propostas de classificação vêm sendo sugeridas (Schlechter, 1917; Pabst & Dungs, 1975; Brieger *et al.*, 1981; Withner, 1990; van den Berg & Chase, 2000; Chiron & Castro, 2002).

A classificação mais aceita, até recentemente, foi a de Schlechter (1917), que subdividiu o gênero *Laelia* em sete seções (Tabela 1), assim caracterizadas:

Seção ***Cattleyoides***: espécies de flores grandes, sem cristas ou quilhas na superfície do labelo.

Seção ***Hadrolaelia***: espécies de flores grandes, com cristas e quilhas evidentes na face interna e ao longo do labelo, pétalas maiores que as sépalas, escapos florais sem nós ou bainha de proteção (espata) e pseudobulbos com único entrenó.

Seção ***Eulaelia***: espécies de flores grandes, com cristas ou quilhas evidentes na face interna e ao longo do labelo, pétalas maiores que as sépalas, escapos florais sem nós ou bainha de proteção (espata) e pseudobulbos com mais de um entrenó.

Seção ***Microlaelia***: espécies de flores menores que as outras seções, labelo com cristas ou quilhas na face interna e ao longo do labelo, escapos florais sem nós ou bainha de proteção (espata) e sépalas e pétalas de tamanhos equivalentes.

Seção *Cyrtolaelia*: espécies com escapos florais apresentando nós e grandes bainhas de proteção, sépalas e pétalas de tamanho pouco diferenciado.

Seção *Podolaelia*: espécies com escapos florais apresentando nós, pétalas muito maiores que as sépalas, escapos florais sem bainhas de proteção, pseudobulbos com duas folhas, labelo com quilhas e sem dentes ao longo da face interna.

Seção *Calolaelia*: espécies com escapos florais apresentando nós, pétalas muito maiores que as sépalas, escapos florais sem bainhas de proteção, pseudobulbos com duas folhas, labelo com cristas e dentes proeminentes.

Pabst & Dungs (1975) fizeram uma nova tentativa de classificação infragenérica, propondo a estruturação do gênero em quatro seções, sendo estas *Cattleyodes*, *Hadrolaelia*, *Microlaelia* e *Parviflorae* (= *Cyrtolaelia*) (Tabela 2).

A última seção proposta por Pabst & Dungs (1975), *Parviflorae*, foi estabelecida para acomodar as espécies rupícolas e com pseudobulbos obclavados, exceto *Laelia harpophylla*, que é uma espécie exclusivamente epífita. De acordo com o autor, a seção foi subdividida em cinco alianças, levando em consideração a altura do escapo floral em relação às folhas, bem como a coloração predominante das flores, como segue:

Aliança *L. harpophylla*: única Aliança que circunscreve as espécies epífitas do grupo, com flores alaranjadas e inflorescências mais curtas que as folhas.

Aliança *L. crispata*: espécies rupícolas com flores de cor lilás ou púrpura, com inflorescências muito mais altas que as folhas.

Aliança *L. liliputana*: espécies rupícolas com flores de cor lilás ou púrpura, com inflorescências um pouco mais altas que as folhas.

Aliança *L. flava*: plantas rupícolas com flores amarelas, alaranjadas ou vermelhas, com inflorescências muito mais altas que as folhas.

Aliança *L. esalqueana*: plantas rupícolas com flores amarelas, alaranjadas ou vermelhas, com inflorescências um pouco mais altas que as folhas.

O gênero *Hoffmannseggella* H. G. Jones (Jones, 1968) foi criado para acomodar as espécies rupícolas brasileiras pertencentes anteriormente ao subgênero *Cyrtolaelia* (Schlechter, 1917) e/ou seção *Parviflorae* (Pabst & Dungs, 1975), tendo como espécie tipo *L. cinnabarina* Batem. ex Lindl. Mesmo sendo o gênero mais natural criado até então, pois leva em consideração

o hábitat, nicho ocupado, distribuição geográfica, coloração das flores e morfologia floral, *Hoffmannseggella* não tem sido utilizado e nem aceito (Garay, 1973; van den Berg, 2004), a não ser quando a intenção é invocar e reforçar as diferenças entre as espécies de *Laelia* da América Central e do México e as brasileiras.

Anteriormente ao trabalho de Jones (1968), o gênero *Amalias* (Hoffmannsegg, *apud* Withner, 1990) foi proposto, também para acomodar estas plantas rupícolas e ocorrentes principalmente no sudeste brasileiro. No entanto, o gênero *Amalias* nunca foi publicado formalmente, tornando qualquer tentativa de utilização inválida.

Withner (1990) publicou uma nova proposta de classificação (Tabela 2), utilizando caracteres vegetativos e florais, bem como coloração e medidas do perianto, dando especial atenção às espécies rupícolas brasileiras. Apesar de muito conhecido, o sistema de classificação proposto não foi muito difundido, aumentando ainda mais as confusões taxonômicas em *Laelia*, principalmente para as espécies brasileiras. O autor tratou das mesmas espécies tratadas por Pabst & Dungs (1975), somadas às espécies mexicanas, elevando as seções daqueles autores a subgêneros, e as alianças a seções, mantendo algumas das seções anteriores e segregando outras em novas seções.

Atualmente com o desenvolvimento de marcadores e técnicas relacionadas à biologia molecular, principalmente aquelas voltadas para sistemática filogenética, tais técnicas vêm sendo utilizadas para elucidar as relações filogenéticas entre gêneros (Palmer *et al.*, 1988; Baldwin, 1992; Chase *et al.*, 1993; Pridgeon *et al.*, 1997; van den Berg *et al.*, 2000), devido à possibilidade de estudos simultâneos de várias espécies e uma elevada quantidade de caracteres gerados (van den Berg *et al.*, 2003), dando maior confiabilidade à interpretação de parentesco entre espécies.

O uso de marcadores moleculares para elaboração de filogenias em plantas remonta ao trabalho de Vedel *et al.* (1976) (para detalhes ver Clegg & Zurawsky, 1993). No entanto, as seqüências gênicas utilizadas podem variar de acordo com o nível de refinamento taxonômico pretendido. O gene *rbcL* tem sido utilizado para acessar resolução filogenética em nível de famílias (Chase *et al.*, 1993) e subfamílias (Cameron *et al.*, 1999). Para estudos envolvendo gêneros e espécies próximas, são necessárias regiões gênicas mais variáveis, como *matK* (Johnson & Soltis, 1995) e *trnL-F* (Taberlet *et al.*, 1991).

Estudos envolvendo dados moleculares são de extrema importância, principalmente em representantes da subtribo Laeliinae, em que a ocorrência de gradações morfológicas e

homoplasias tornam controversos os sistemas de classificação elaborados até recentemente, baseados principalmente em caracteres morfológicos, levando, muitas vezes, à formação de agrupamentos artificiais como demonstrado por van den Berg *et al.* (2000).

Caracteres moleculares de seqüências dos espaçadores internos de genes ribossômicos *ITS-1* e *ITS-2* (van den Berg *et al.* 2000a), somados aos estudos morfológicos em espécies do México e América Central (Halbinger & Soto, 1997) revelaram a natureza polifilética de *Laeliinae* e provaram a artificialidade dos sistemas anteriormente propostos (Schlechter, 1917; Pabst & Dungs, 1975). Os resultados obtidos segregam as espécies de *Laelia* da América Central das brasileiras.

Tendo como ponto de partida a filogenia obtida, van den Berg & Chase (2000) realizam novas combinações nomenclaturais para as espécies de *Laelia* Lindl. brasileiras, transferindo-as para o gênero *Sophronitis* Lindl. (Tabela 3). No entanto, as novas combinações não foram bem recebidas pela comunidade científica, principalmente por orquidólogos, devido à elevada heterogeneidade morfológica entre as espécies brasileiras de *Laelia sensu lato* e as espécies circunscritas sob *Sophronitis* na proposta de van den Berg & Chase (2000), tornando as combinações propostas artificiais do ponto de vista morfológico. Posteriormente, Chiron & Castro-Neto (2002), com base em dados morfológicos e moleculares, sugeriram, entre outras coisas, a transferência das *Laelia* exclusivamente rupícolas para o gênero *Hoffmannseggella* (Tabela 3). Apesar de aceitarem a proposta de van den Berg & Chase (2000), de manter sob *Laelia* apenas as espécies do México e América Central, discordaram da circunscrição de todas as espécies brasileiras em *Sophronitis*. Desta forma, Chiron & Castro-Neto (2002) propuseram o desmembramento das espécies brasileiras em quatro gêneros distintos: *Hoffmannseggella* H. G. Jones, *Dungsia* Chiron & V. P. Castro (criado para circunscrever as espécies epífitas da seção *Parviflorae sensu* Pabst & Dungs), *Microlaelia* (Schltr.) Chiron & V. P. Castro (monotípico) e *Hadrolaelia* (Schltr.) Chiron & V. P. Castro (contendo 6 seções).

Em resposta, van den Berg (2004) publicou algumas considerações sobre a proposta de Chiron & Castro-Neto (2002), questionando as decisões tomadas para elaboração da nova proposta de classificação. Juntamente com estas considerações, van den Berg (2004) publicou dados moleculares parciais, baseados em seqüências de DNA plastidial (*trnL-F* e *matK*), revelando a fragilidade, bem como alguns problemas com os dados obtidos através de *ITS-1* e *ITS-2* (van den Berg *et al.*, 2000). O primeiro problema consiste no número reduzido de espécies utilizadas na elaboração da nova filogenia apresentada, comprometendo a interpretação do grupo

como um todo. O segundo problema, diz respeito à topologia das espécies, que varia de acordo com o marcador utilizado (e.g. *L. harpophylla*, antes pertencente ao mesmo clado de *Sophonitis cernua*, passa a espécie irmã de *Laelia rupestris* e *L. esalqueana*, grupo bem segregado no trabalho anterior).

A discussão exposta anteriormente, só vem a evidenciar alguns problemas relacionados às decisões taxonômicas tomadas com base em métodos e resultados unilaterais. A utilização de marcadores moleculares, apesar de muito útil, tem que ser encarada como uma ferramenta acessória e deve ser utilizada levando em consideração as limitações inerentes a qualquer método. Desta forma, a utilização de vários métodos num contexto biossistemático, como por exemplo: caracterização cromossômica (Blumenschein 1960; Costa 2006, Verola *et al.*, *não publicado* – CAPÍTULO 5), morfologia de sementes (Dressler, 1993) e coluna (Dressler, 1981), ontogenia da coluna (Kurzweil, 1987a,b), ontogenia da antera (Dressler, 1993), anatomia de raízes (Rosso, 1966; Sanford & Adanlawo, 1973; Jonsson, 1981; Stern *et al.*, 1993) e folhas (Williams, 1974; Pridgeon, 1982; Oliveira Pires *et al.*, 2003), biologia floral, biologia reprodutiva e ecologia da polinização (Dodson, 1962; Dressler, 1981, 1993; Pijl & Dodson, 1966), podem auxiliar na elaboração de sistemas de classificação mais naturais e cada vez mais próximos da realidade dos fenômenos biológicos envolvidos.

Em função dos vários problemas taxonômicos apresentados anteriormente e, enquanto não se chega a um consenso quanto ao “melhor” sistema de classificação, neste trabalho, resolvemos utilizar o sistema de Chiron & Castro-Neto (2002), por quatro motivos:

- i-) utilização conjunta de dados morfológicos e moleculares;
- ii-) circunscrição mais refinada, intuitiva e completa para o gênero *Hoffmannseggella* H. G. Jones.;
- iii-) sinonimização de espécies previamente descritas, evidenciando a existência de complexos morfológicos dentro dos gêneros;
- iv-) ênfase nas diferenças morfológicas dos gêneros e espécies apresentadas, facilitando a identificação das espécies em campo, sem a necessidade de técnicas elaboradas para reconhecê-las.

Tabela 1. Comparação entre as propostas de classificação e espécies circunscritas por Lindley (1842) e Schlechter (1917) para o gênero *Laelia*. Para sinônimos e detalhes ver trabalhos originais.

LINDLEY, 1842		SCHLECHTER, 1917	
Seção		Seção	
Grandiflorae	<i>Laelia albida</i> , <i>L. anceps</i> , <i>L. autumnalis majalis</i> <i>L. superbiens</i> , <i>L. perrini</i> , <i>L. rubescens</i>	Podolaelia	<i>Laelia albida</i> , <i>L. anceps</i> , <i>L. autumnalis</i> , <i>L. furfuracea</i> , <i>L. gouldiana</i> , <i>L. peduncularis</i> <i>L. rubescens</i>
		Calolaelia	<i>Laelia superbiens</i>
		Eulaelia	<i>Laelia speciosa</i>
Parviflorae	<i>Laelia cinnabarina</i> , <i>L. flava</i> , <i>L. rupestris</i>	Cattleyodes	<i>Laelia crispa</i> , <i>L. grandis</i> + (var. <i>tenebrosa</i>), <i>L. johniana</i> , <i>L. lobata</i> , <i>L. perrinii</i> , <i>L. purpurata</i> <i>L. xanthina</i>
		Hadrolaelia	<i>Laelia jongheana</i> , <i>L. pumila</i> + (var. <i>dayana</i> , var. <i>praestans</i>)
		Microaelia	<i>Laelia cattleyoides</i> , <i>L. lundii</i> e <i>L. regnelli</i>
		Cyrtolaelia	<i>Laelia caulescens</i> , <i>L. cinnabarina</i> , <i>L. crispilabia</i> , <i>L. flava</i> , <i>L. harpophylla</i> , <i>L. longipes</i> (+ var. <i>lucasiana</i>) <i>L. rupestris</i>

Tabela 2. Comparação entre as propostas de classificação e espécies circunscritas por Pabst & Dungs (1975) e Withner (1990) para o gênero *Laelia*. Para sinônimos e detalhes ver trabalhos originais.

PABST & DUNGS, 1975			WITHNER, 1990		
Seção	Aliança		Subgênero	Seção	
			<i>Laelia</i>	<i>Podolaelia</i>	<i>Laelia albida</i> , <i>L. anceps</i> , <i>L. autumnalis</i> , <i>L. bancalarii</i> , <i>L. furfuracea</i> , <i>L. gouldiana</i> , <i>L. rubescens</i> + (var. <i>aurea</i>)
				<i>Laelia</i>	<i>Laelia speciosa</i>
<i>Cattleyodes</i>		<i>Laelia crispa</i> , <i>L. fidelensis</i> , <i>L. grandis</i> , <i>L. lobata</i> , <i>L. perrinii</i> , <i>L. purpurata</i> , <i>L. tenebrosa</i> , <i>L. virens</i> e <i>L. xanthina</i>	<i>Crispae</i>	<i>Crispae</i>	<i>Laelia crispa</i> , <i>L. elegans</i> , <i>L. fidelensis</i> , <i>L. grandis</i> , <i>L. lobata</i> , <i>L. purpurata</i> , <i>L. tenebrosa</i> , <i>L. virens</i> e <i>L. xanthina</i>
				<i>Perriniae</i>	<i>Laelia perrinii</i>
<i>Hadrolaelia</i>		<i>Laelia alaorii</i> , <i>L. dayana</i> , <i>L. jongheana</i> , <i>L. praestans</i> , <i>L. pumila</i> e <i>L. sincorana</i>		<i>Hadrolaelia</i>	<i>Laelia alaorii</i> , <i>L. dayana</i> , <i>L. jongheana</i> , <i>L. spectabilis</i> e <i>L. pumila</i>
				<i>Sincoranae</i>	<i>Laelia sincorana</i>
<i>Microlaelia</i>		<i>Laelia cattleyodes</i> e <i>L. lundii</i>	<i>Microlaelia</i>		<i>Laelia lundii</i>
<i>Parviflorae</i>	Aliança		<i>Parviflorae</i>	Seção	
	<i>harpophylla</i>	<i>Laelia L. brevicaulis</i> , <i>L. harpophylla</i> e <i>L. kautskyi</i>		<i>Harpophyllae</i>	<i>Laelia brevicaulis</i> , <i>L. harpophylla</i> e <i>L. kautskyana</i>
	<i>crispata</i>	<i>Laelia caulescens</i> , <i>L. crispata</i> , <i>L. crispilabia</i> , <i>L. mantiqueirae</i> , <i>L. longipes</i> e <i>L. pfisteri</i>		<i>Rupestres</i>	<i>Laelia caulescens</i> , <i>L. crispata</i> , <i>L. crispilabia</i> , <i>L. gardneri</i> , <i>L. hispidula</i> , <i>L. mantiqueirae</i> , <i>L. pfisteri</i> e <i>L. tereticaulis</i>
	<i>liliputana</i>	<i>Laelia ghillanyi</i> , <i>L. liliputana</i> , <i>L. lucasiana</i> , <i>L. milletii</i> e <i>L. reginae</i>		<i>Liliputanae</i>	<i>Laelia duveenii</i> , <i>L. ghillanyi</i> , <i>L. kettieana</i> , <i>L. liliputana</i> , <i>L. longipes</i> , <i>L. lucasiana</i> e <i>L. reginae</i>
	<i>flava</i>	<i>Laelia angereri</i> , <i>L. bahiensis</i> , <i>L. blumenscheinii</i> , <i>L. briegeri</i> , <i>L. cinnabarina</i> , <i>L. cinnamomea</i> , <i>L. endsfeldzii</i> , <i>L. flava</i> , <i>L. gloedeniana</i> , <i>L. macrobulbosa</i> , <i>L. milleri</i> e <i>L. mixta</i>		<i>Parviflorae</i>	<i>Laelia angereri</i> , <i>L. bahiensis</i> , <i>L. blumenscheinii</i> , <i>L. briegeri</i> , <i>L. cardimii</i> , <i>L. cinnabarina</i> , <i>L. endsfeldzii</i> , <i>L. flava</i> , <i>L. gloedeniana</i> , <i>L. gracilis</i> , <i>L. milleri</i> , <i>L. mixta</i> e <i>L. sanguiloba</i>
	<i>esalqueana</i>	<i>Laelia bradei</i> , <i>L. esalqueana</i> e <i>L. itambana</i>		<i>Esalqueanae</i>	<i>Laelia bradei</i> , <i>L. esalqueana</i> e <i>L. itambana</i>

Tabela 3. Comparação entre as propostas de classificação e espécies circunscritas por van den Berg & Chase (2000) e Chiron & Castro-Neto (2002). Para sinônimos e detalhes ver trabalhos originais.

VAN DEN BERG & CHASE, 2000		CHIRON & CASTRO-NETO, 2002		
Gênero	Espécies	Gênero	Espécies	
<i>Laelia</i> Lindl. México e América Central	Não tratado	<i>Laelia</i> Lindl. México e América Central	Não tratado (ver Halbinger, 1993; Halbinger & Soto, 1997)	
<i>Sophronitis</i> Lindl. (incluindo <i>Hoffmannseggella</i> H. G. Jones + <i>Laelia</i> subgen. <i>Cattleyodes</i> , <i>Hadrolaelia</i> , <i>Microaelia</i> e <i>Cyrtolaelia</i> Schltr.) Brasil	<i>Sophronitis allaorii</i> , <i>S. alvaroana</i> , <i>S. angereri</i> , <i>S. bahiensis</i> , <i>S. blumenscheinii</i> , <i>S. bradei</i> , <i>S. brevicaulis</i> , <i>S. briegeri</i> , <i>S. xcaetensis</i> , <i>S. xcarassana</i> , <i>S. caulescens</i> , <i>S. cinnabarina</i> , <i>S. xcipoensis</i> , <i>S. crispa</i> , <i>S. crispata</i> , <i>S. dayana</i> , <i>S. duveenii</i> , <i>S. endsfeldzii</i> , <i>S. esalqueana</i> , <i>S. fidelensis</i> , <i>S. fourmieri</i> , <i>S. xgerhard-santosii</i> , <i>S. ghillanyi</i> , <i>S. gloedeniana</i> , <i>S. gracilis</i> , <i>S. grandis</i> , <i>S. harpophylla</i> , <i>S. hispidula</i> , <i>S. itambana</i> , <i>S. jongheana</i> , <i>S. kautskyi</i> , <i>S. kettieana</i> , <i>S. liliputana</i> , <i>S. lobata</i> , <i>S. longipes</i> , <i>S. lundii</i> , <i>S. macrobulbosa</i> , <i>S. milleri</i> , <i>S. mirandai</i> , <i>S. mixta</i> , <i>S. xmucugense</i> , <i>S. munchowiana</i> , <i>S. perrini</i> , <i>S. pfisteri</i> , <i>S. praestans</i> , <i>S. pumila</i> , <i>S. purpurata</i> , <i>S. reginae</i> , <i>S. sanguiloba</i> , <i>S. sincorana</i> , <i>S. tenebrosa</i> , <i>S. tereticaulis</i> , <i>S. verboonenii</i> , <i>S. virens</i> e <i>S. xanthina</i>	<i>Hadrolaelia</i>	Seção	
			<i>Crispae</i>	<i>Hadrolaelia crispa</i> , <i>H. grandis</i> , <i>H. lobata</i> , <i>H. purpurata</i> , <i>H. tenebrosa</i> , <i>H. xanthina</i>
			<i>Fidelensis</i>	<i>Hadrolaelia fidelensis</i>
			<i>Perrinae</i>	<i>Hadrolaelia perrinii</i>
			<i>Virens</i>	<i>Hadrolaelia virens</i>
			<i>Sophronitis</i>	<i>Hadrolaelia acuensis</i> , <i>H. bicolor</i> , <i>H. coccinea</i> , <i>H. mantiqueirae</i> , <i>H. pygmaea</i> , <i>H. wittigiana</i> ,
		<i>Microaelia</i>	<i>Microaelia lundii</i>	
		<i>Hoffmannseggella</i>	<i>Hoffmannseggella alvaroana</i> , <i>H. angereri</i> , <i>H. bahiensis</i> , <i>H. blumenscheinii</i> , <i>H. bradei</i> , <i>H. briegeri</i> , <i>H. cardimii</i> , <i>H. caulescens</i> , <i>H. cinnabarina</i> , <i>H. conceicioensis</i> , <i>H. crispata</i> , <i>H. duveenii</i> , <i>H. endsfeldzii</i> , <i>H. esalqueana</i> , <i>H. fourmieri</i> , <i>H. ghillanyi</i> , <i>H. gloedeniana</i> , <i>H. gracilis</i> , <i>H. hispidula</i> , <i>H. itambana</i> , <i>H. kettieana</i> , <i>H. liliputana</i> , <i>H. longipes</i> , <i>H. macrobulbosa</i> , <i>H. milleri</i> , <i>H. mixta</i> , <i>H. munchowiana</i> , <i>H. pfisteri</i> , <i>H. reginae</i> , <i>H. rupestris</i> , <i>H. sanguiloba</i> , <i>H. tereticaulis</i> e <i>H. verboonenii</i>	
		<i>Dungsia</i>	<i>Dungsia brevicaulis</i> , <i>D. kautskyi</i> e <i>D. marcaliana</i>	

Referências Bibliográficas

- Baldwin, B.G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **1**: 3-16.
- Blumenschein, A. 1960. **Estudos sobre a Evolução no subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae)**. Tese apresentada para obtenção do título de Livre Docente da Cadeira de Citologia e Genética Geral da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 54pp.
- Brieger, F.G., Maatsch, R. & Senghas, K. 1981. **Sclechter's die Orchideen**. 3ed. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Cameron, K.M., Chase, M.W., Whitten, W.M., Kores, P.J., Jarrel, D.C., Albert, V.A., Yukawa, T., Hills, H.G. & Goldman, D. H. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* **86**: 208-224.
- Chase, M.W., Soltis, D.E., Olmstead, R.G., Morgan, D., Les, D.H., Mishler, B.D., Duvall, M.R., Price, R.A., Hills, H.G., Qiu, Y.L., Kron, K.A. & Rettig, J.H. 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **80**: 528-580.
- Chiron, G.R. & Castro Neto, V.P. 2002. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley. *Richardiana* **2**: 4-28.
- Clegg, M.T. & Zurawsky, G. 1993. Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. **Molecular Systematics of Plants**. Chapman & Hall, New York. 1-13pp.
- Costa, J.Y. 2006. **Citotaxonomia e aspectos evolutivos de espécies de *Hoffmannseggella* H. G. Jones (Orchidaceae) de Campos Rupestres brasileiros**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, SP, 121pp.
- Dodson, C.H. 1962. The importance of pollination in the evolution of the orchids in tropical America. *American Orchid Society Bulletin* **31**: 641-649.
- Dressler, R.L. 1981. **The orchids: natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Garay, L.A. 1973. Studies in American orchids VIII. *Bradea* **1**: 301-308.
- Halbinger, F. & Soto, M. 1997. **Orquidea, Laelias of Mexico Vol. 15**. Herbário AMO, Mexico City.
- Johnson, L.A. & Soltis, D.E. 1995. Phylogenetic inference in *Saxifragaceae* sensu stricto and *Gilia* (Polemoniaceae) using *matK* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **82**: 149-175.
- Jones, H.G. 1968. Studies in neotropical orchidology. *Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae* **14**: 63-70.
- Jonsson, L.A. 1981. Monograph of the genus *Microlaelia* (Orchidaceae). *Acta Universitatis Upsaliensis* **23**: 8-49.
- Kurzweil, H. 1987a. Developmental studies in orchid flower I: Epidendroid and vandoid species. *Nordic Journal of Botany* **7**: 427-442.
- Kurzweil, H. 1987b. Developmental studies in orchid flower II: Orchidoid species. *Nordic Journal of Botany* **7**: 443-451.
- Oliveira Pires, M.F., Semir, J., Pinna, G.F.M. & Felix, L.P. 2003. Taxonomic separation of the genera *Prosthechea* and *Encyclia* (Laeliinae:Orchidaceae) using leaf and root anatomical features. *Botanical Journal of the Linnean Society* **143**: 293-303.

- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1975. **Orchidaceae Brasiliensis, Vol. 1.** Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Palmer, J.D., Jansen, R.K., Michaels, H.J., Chase, M.W. & Manhard, J.R. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **75**: 1180-1206.
- Pijl, L. van der & Dodson, C.H. 1966. **Orchid flowers: their pollination and evolution.** University of Miami Press, Coral Gables.
- Pridgeon, A.M. 1982. Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **69**: 921-938.
- Pridgeon, A.M., Bateman, R.M., Cox, A.V., Haperman, J.R. & Chase, M.W. 1997. Phylogenetics of subtribe Oncidiinae (Orchidoideae, Orchidaceae) based on nuclear ITS sequences. 1. Intergeneric relationships and polyphyly of *Orchis sensu latu*. *Lindleyana* **12**: 89-109.
- Rosso, S.W. 1966. The vegetative anatomy of Cypripedioideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **59**: 309-341.
- Sanford, W.W. & Adanlawo, I. 1973. Velamen and exodermis characters of west African epiphytic orchids in relation to taxonomic grouping and habitat tolerance. *Botanical Journal of the Linnean Society* **66**: 307-321.
- Schlechter, R. 1917. Die Einteilung der Gattung Laelia und die geographische Verbreitung ihrer Gruppen. *Orchis* **11**: 87-96.
- Stern, W.L., Morris, M.W. & Judd, W.S. 1993. Comparative vegetative anatomy and systematics of Spiranthoideae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **113**: 106-197.
- Taberlet, P.L., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* **17**: 1105-1109.
- van den Berg, C. & Chase, M.W. 2000. Nomenclatural notes on Laeliinae-I. *Lindleyana* **15**: 115-119.
- van den Berg, C. 2004. **Orchid News** **20**, Revista Eletrônica. http://members.xoom.virgilio.it/_XOOM/orchidnews?on20/pages/cassio01.htm
- van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M. & Culhan, A. 2003. **Molecular Systematics of the Laeliinae.** Science Sessions. Proceedings of the 16th World Orchid Conference. 170-176pp.
- van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Arenas, M.A.S., Culham, A. & Chase, M.W. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spaces (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96-114.
- Vedel, F., Quetier, F. & Bayen, M. 1976. Specific cleavage of chloroplast DNA from higher plants by EcoRI restriction nuclease. *Nature* **263**: 440-442.
- Williams, N.H. 1974. **The valor of plant anatomy in orchid taxonomy.** Proceedings of the 7th World orchid Conference. Medellin, 281-298pp.
- Withner, C.L. 1990. **The Cattleyas and their relatives Vol II: The Laelias.** Timber Press, Portland, Oregon. 154pp.

Introdução Geral

As Orchidaceae apresentam distribuição cosmopolita e constituem uma das maiores famílias de Angiospermas, contando com aproximadamente 25.000 espécies (Dressler, 1981, 1993; Pijl & Dodson, 1966). De acordo com esses números, Orchidaceae é a maior família entre as monocotiledôneas, representando 7% das Angiospermas existentes (Pijl & Dodson, 1966).

O amplo padrão de variação morfológica das Orchidaceae tem sido facilitado por sua rápida evolução através de características intrínsecas da família como: indivíduos perenes de vida longa, transferência do pólen em massas compactas (polínias) e produção de grande número de óvulos e sementes sem endosperma, facilitando a dispersão pelo vento a longas distâncias (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981, 1993). No entanto, a maioria das espécies de Orchidaceae tende a ser polinizada por uma ou poucas espécies de polinizadores (Dodson, 1962; Pijl & Dodson, 1966; Tremblay, 1992). Adaptações morfológicas especiais em resposta a polinizadores específicos para assegurar a polinização cruzada são considerados os fatores mais importantes no desenvolvimento e manutenção do grande número de espécies na família (Garay, 1960; Dodson, 1962; Pijl & Dodson, 1966; Faegri & Pijl, 1979). Por essa razão, vários autores como Dodson (1962), Dressler (1968, 1981, 1993) e Pijl & Dodson (1966) enfatizaram a importância de se conhecer a biologia reprodutiva das espécies de Orchidaceae, principalmente a polinização, para um melhor entendimento dos padrões de variação e da evolução deste grupo. A partir desses conhecimentos seria possível elaborar um sistema de classificação mais natural para a família.

As espécies de *Hoffmannseggella* possuem flores com coloração e formas muito variadas e são predominantemente polinizadas por abelhas (Dressler, 1981). No entanto, as espécies de *Hoffmannseggella*, que ocupam exclusivamente áreas de campos rupestres, apresentam características florais peculiares (Dressler, 1981) tais como: a coloração do perianto (róseo, amarelo ou laranja, sem a presença de guias de néctar), morfologia floral (labelo em forma de goela e a presença de cunículo na região do ovário) e o posicionamento das flores (labelo curvado para baixo ou horizontalmente) que, de acordo com Pijl & Dodson (1966) indicariam tratar-se de um grupo adaptado à ornitofilia.

De acordo com Dressler (1968), as relações de polinização não específicas na família Orchidaceae normalmente não conduziriam à especiação. Neste caso, a seleção natural tende a favorecer relações cada vez mais estreitas entre as orquídeas e seus polinizadores. Isso faz com que espécies filogeneticamente próximas possuam polinizadores muito distintos quando em

simpatria e com eventos de floração sobrepostos (Dressler, 1968). A especiação baseada em relações de especificidade fornece um modelo melhor de especiação simpátrica do que a constância floral pelo polinizador, uma vez que a constância poderia ser quebrada quando o número de flores fosse baixo, o que é esperado quando uma espécie incipiente surge por mutação (Dressler, 1968; Paulus & Gack, 1990).

Segundo Blumenschein (1960) a poliploidia e a hibridação entre espécies, teriam grande importância na diversificação de *Hoffmannseggella*. As Orchidaceae são geralmente inter-compatíveis, sendo o isolamento reprodutivo dado principalmente por barreiras pré-polinização (Dodson, 1962; Dressler, 1968, 1981, 1993; Paulus & Gack, 1990). Quando estas barreiras são quebradas, em geral, há formação de híbridos (Pijl & Dodson, 1966; Sundermann, 1977; Schrenk, 1978, 1984; Linder, 1990; Romero & Carnevali, 1990, 1992; Rossi *et al.*, 1992; Steiner *et al.*, 1994; Borba & Semir, 1998; Borba *et al.*, 1999, 2001). A adaptação a polinizadores específicos geralmente não afeta a compatibilidade genética entre grupos (gêneros e espécies), causando especiação muito rápida em muitas espécies de Orchidaceae, aliada a poucas ou nenhuma mudança em nível cromossômico o que mantém a compatibilidade entre elas (Sanford, 1964; 1967; Pijl & Dodson, 1966; Stort, 1972, 1986; Illg, 1975; Scacchi *et al.*, 1990; Borba & Semir, 1998).

Apesar da maior parte das espécies de Orchidaceae ser auto-compatível, a estrutura floral favorece fortemente a polinização cruzada (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981, 1993; Catling & Catling, 1991; Borba & Semir, 1999). Este sistema é bastante flexível, pois plantas isoladas ainda têm, pelo menos a princípio, a possibilidade da auto-polinização (reprodução sexuada), o que é importante em eventos de dispersão a longa distância, colonização de outros ambientes e especiação, seja ela por mutação ou hibridização.

O tipo de polinizador é um dos principais fatores que afetam a variabilidade genética de espécies e populações vegetais (Loveless & Hamrick, 1984; Hamrick, 1989; Hamrick & Godt, 1990; Ohsawa *et al.*, 1993; Borba & Semir, 2001; Borba *et al.*, 2001). Polinizadores apresentam padrões característicos de forrageamento e alguns podem visitar flores mais próximas, como algumas abelhas, enquanto outros realizam vôos a maiores distâncias entre visitas, como borboletas e algumas espécies de beija-flores (Levin & Kerster, 1968; Feinsinger & Colwell, 1978; Schaal, 1980; Schimitt, 1980; Waser, 1982; Ellstrand & Marshal, 1985; Fenster, 1991; Godt & Hamrick, 1993).

A forma e o tamanho da população são importantes fatores que podem afetar diretamente a variabilidade genética de espécies vegetais, sendo que populações pequenas estão mais sujeitas aos efeitos de endogamia, deriva genética e efeitos estocásticos do que grandes populações, o que pode promover diferenciação entre populações, queda da heterozigosidade e redução na variação dentro da população (Crawford, 1984; Loveless & Hamrick, 1984; Hamrick, 1989; Hamrick & Godt, 1990).

Campo rupestre é um tipo de vegetação que ocorre principalmente nos Estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás. Este tipo de vegetação é caracterizado por ocorrer em altitudes elevadas (acima de 900 metros) de vegetação aberta, com plantas herbáceas crescendo em solos arenosos e pedregosos e arbustos/subarbustos crescendo em “ilhas” de afloramentos rochosos de quartzito, arenito, gnaiss e canga (Joly, 1970; Giulietti & Pirani, 1988; Borba & Semir, 1998). As regiões de campos rupestres da Serra do Espinhaço são consideradas importantes centros de diversidade vegetal, apresentando grande número de espécies endêmicas (Giulietti & Pirani, 1988; Giulietti & Hensold, 1990; Wanderley, 1990; Semir, 1991; Eiten, 1992; Harley, 1988, 1995; Giulietti *et al.*, 1997; Lins *et al.*, 1997; Mendonça e Lins, 2000; Vasconcelos & Lombardi, 2001). Devido à descontinuidade destes ambientes, bem como de sua vegetação, muitas espécies estão distribuídas em populações disjuntas, sendo estas características frequentemente citadas como as responsáveis pela grande diversidade e endemismos observados nestes ambientes. A vegetação de campo rupestre é única do ponto de vista florístico (Joly, 1970; Giulietti & Pirani, 1988; Jesus *et al.*, 2001), no entanto, pouca atenção tem sido dada à conservação dessas áreas.

Este trabalho teve por objetivo geral estudar aspectos biossistemáticos em *Hoffmannseggella*, como: biogeografia histórica e evolutiva, biologia floral e ecologia da polinização, biologia reprodutiva e aspectos citogenéticos, com ênfase nas espécies distribuídas ao longo da Cadeia do Espinhaço no Estado de Minas Gerais.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Determinar os fatores responsáveis pela elevada diversidade de espécies observada em *Hoffmannseggella*, verificando como a diversidade e a riqueza de espécies estão organizadas ao longo da distribuição;
2. Verificar se as espécies de *Hoffmannseggella* são realmente polinizadas por beija-flores, como inferido previamente e quais os fatores responsáveis pela atração dos polinizadores;

3. Verificar a existência de relações de especificidade entre as espécies de *Hoffmannseggella* e seus polinizadores;
4. Verificar se existem, e quais são, os mecanismos de isolamento reprodutivo entre espécies sincronopátricas;
5. Verificar quais são os sistemas reprodutivos presentes no grupo;
6. Verificar a importância da poliploidia no estabelecimento e diversificação do gênero;
7. Utilizar e dispor das informações geradas através deste trabalho para elaboração de planos de conservação dos Campos Rupestres;
8. Contribuir com a taxonomia de espécies de *Hoffmannseggella* através dos conhecimentos gerados.

Referências Bibliográficas

- Blumenschein, A. 1960. **Estudos sobre a Evolução no subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae)**. Tese apresentada para obtenção do título de Livre Docente da Cadeira de Citologia e Genética Geral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 54pp.
- Borba, E.L. & Semir, J. 1998. *Bulbophyllum xcipoense* (Orchidaceae), a new natural hybrid from Brazilian “campo rupestre”: description and biology. *Lindleyana* **13**: 113-120.
- Borba, E.L. & Semir, J. 1999. Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution* **217**: 197-204.
- Borba, E.L. & Semir, J. 2001. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany* **88**: 75-88.
- Borba, E.L., Shepherd, G.J. & Semir, J. 1999. Reproductive system and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occurring in Brazilian ‘campo rupestre’ vegetation. *Plant Systematics and Evolution* **217**: 205-214.
- Borba, E.L.; Semir, J. & Shepherd, G.J. 2001. Self-incompatibility, inbreeding depression, and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* **88**: 89-99.
- Catling, P.M. & Catling, V.R. 1991. Anther-cap retention in *Tipularia discolor*. *Lindleyana* **6**: 113-116.
- Crawford, T. J. 1984. **What is a population? Evolutionary Ecology**. Blackwell, Oxford.
- Dodson, C.H. 1962. The importance of pollination in the evolution of the tropical America. *American Orchid Society Bulletin* **31**:525-534, 641-649, 731-735.
- Dressler, R.L. 1968. Observations on orchids and Euglossinae bees in Panama and Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* **15**: 143-183.
- Dressler, R.L. 1981. **The orchids: natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Dioscorides Press, Portland.
- Eiten, G. 1992. Natural Brazilian vegetation types and their causes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **64**: 35-65.
- Ellstrand, N.C. & Marshall, D.L. 1985. Interpopulation gene flow by pollen in wild radish, *Raphanus sativus*. *American Naturalist* **126**: 606-616.
- Faegri, K. & van der Pijl, L. 1979. **The principles of pollination ecology**, 3rd ed. Pergamon Press, Oxford.
- Feinsinger, P. & Colwell, R.K. 1978. Community organization among Neotropical nectar-feeding birds. *American Zoology* **18**: 779-795.
- Fenster, C.B. 1991. Gene flow in *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae) I. Gene dispersal. *Evolution* **45**: 398-409.
- Garay, L.A. 1960. On the origin of the Orchidaceae. *Botanical Museum Leaflets Harvard University* **19**: 57-96.
- Giulietti, A.M. & Hensold, N. 1990. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. *Acta Botanica Brasilica* **4**: 133-158.

- Giulietti, A.M. & Pirani, J.R. 1988. **Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns**. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais e Bahia, Brazil. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Giulietti, A.M.; Pirani, J.R. & Harley, R.M. 1997. **Centres of plant diversity, a guide and strategy for their conservation. Vol. 3.** Espinhaço range region. Eastern Brazil. Information Press, Oxford.
- Godt, M.J.W. & Hamrick, J.L. 1993. Patterns and level of pollen gene flow in *Lathyrus latifolius*. *Evolution* **47**: 98-110.
- Hamrick, J.L. & Godt, M.J. 1990. **Allozyme diversity in plant species**. Plant population genetics, breeding and genetic resources, Sinauer, Sunderland. Pp. 43-63.
- Hamrick, J.L. 1989. **Isozymes and the analysis of genetic structure in plant population**. Isozymes in plant biology, Dioscorides Press, Portland. Pp. 87-105.
- Harley, R.M. 1988. **Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns**. Evolution and distribution of *Eriope* (Labiatae) and its relatives, in Brazil. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Harley, R.M. 1995. **Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina- Bahia, Brazil**. Introduction. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Illeg, R.D. 1975. **Aspectos evolutivos em algumas Maxillarias brasileiras (Orchidaceae)**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Jesus, F.F., Solferini, V.N. & Prado, P.I. 2001. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **226**: 59-68.
- Joly, A.B. 1970. **Conheça a vegetação brasileira**. EDUSP, São Paulo.
- Levin, D.A. & Kerster, H.W. 1968. Local gene dispersal in *Phlox*. *Evolution* **22**: 130-139.
- Linder, H.P. 1990. Hybrids in *Disa* (Diseae-Orchidaceae). *Lindleyana* **5**: 224-230.
- Lins, L.V., Machado, A.B.M., Costa, C.M.R. & Hermann, G. 1997. Roteiro metodológico para elaboração de listas de espécies ameaçadas de extinção – contendo a lista oficial da fauna ameaçada de extinção de Minas Gerais. *Publicações Avulsas Fundação Biodiversitas* **1**: 1-50.
- Loveless, M.D. & Hamrick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant population. *Annual Review of Ecology and Systematics* **15**: 65-95.
- Mendonça, M.P. & Lins, L.V. 2000. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Fundação Biodiversitas and Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, Belo Horizonte.
- Ohsawa, R., Furuya, N. & Ukai, Y. 1993. Effect of spatially restricted pollen flow on spatial genetic structure of an animal-pollinated allogamous plant population. *Heredity* **71**: 64-73.
- Paulus, H.F. & Gack, C. 1990. Pollination of *Ophrys* (Orchidaceae) in *Cyprus*. *Plant Systematics and Evolution* **169**: 177-207.
- van der Pijl, L. & Dodson, C.H. 1966. **Orchid flower: their pollination and evolution**. University of Miami Press, Coral Gables.
- Romero, G.A. & Carnevali, G. 1990. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela-1. *Catasetum xtapiriceps* Reichb. f. *American Orchid Society Bulletin* **59**: 1214-1220.

- Romero, G.A. & Carnevali, G. 1992. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela-2. *Catasetum xdunstervillei* G. Romero and Carnevali. *American Orchid Society Bulletin* **60**: 115-120.
- Rossi, W., Arduino, P., Cianchi, R. & Bullini, L. 1992. A new natural hybrid in the genus *Orchis* L.: genetic data and description. *Lindleyana* **7**: 121-126.
- Sanford, W.W. 1964. Sexual compatibility relationships in *Oncidium* and related genera. *American Orchid Society Bulletin* **33**: 1035-1048.
- Sanford, W.W. 1967. Sexual compatibility relationships in *Oncidium* and related genera. *American Orchid Society Bulletin* **36**: 114-122.
- Scacchi, R., De Angelis, G. & Lanzara, P. 1990. Allozyme variation among and within eleven *Orchis* species (fam. Orchidaceae), with special reference to hybridization aptitude. *Genetica* **81**: 143-150.
- Schaal, B.A. 1980. Measurement of gene flow in *Lupinus texensis*. *Nature* **284**: 450-451.
- Schmitt, J. 1980. Pollination foraging behavior and gene dispersal in *Senecio* (Compositae). *Evolution* **34**: 934-943.
- Schrenk, J. 1978. North American Platantheras: evolution in the making. *American Orchid Society Bulletin* **47**: 429-437.
- Schrenk, J. 1984. Natural hybrids unlimited – How certain is certain? *American Orchid Society Bulletin* **53**: 130-143.
- Semir, J. 1991. **Revisão Taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernonieae:Compositae)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Steiner, K.E., Whitehead, V.B. & Johnson, S.D. 1994. Floral and pollinator divergence in two sexually deceptive South African orchids. *American Journal of Botany* **81**: 185-194.
- Stort, M.N.S. 1972. Estudos em híbridos F1 artificiais de orquídeas. *Ciência e Cultura* **24**: 847-851.
- Stort, M.N.S. 1986. Fertilidade de cruzamentos e relação filogenética entre algumas espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **9**: 69-73.
- Sundermann, H. 1977. The genus *Ophrys* – An example of the importance of isolation for especiation. *American Orchid Society Bulletin* **46**: 825-831.
- Tremblay, R.L. 1992. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. *Canadian Journal of Botany* **70**: 642-650.
- Vasconcelos, M.F. & Lombardi, J.A. 2001. Hummingbirds and their flowers in *campos rupestres* of Southern Espinhaço Range, Brazil. *Melopsittacus* **4**: 3-30.
- Wanderley, M.G.L. 1990. Diversidade e distribuição geográfica das espécies de *Ornithophytum* (Bromeliceae). *Acta Botanica Brasilica* **4**: 169-175.
- Waser, N.M. 1982. A comparison of distances flown by different visitors to flowers of the same species. *Oecologia* **55**: 251-257.

Análise dos padrões fitogeográficos associados a métodos de PAE e modelagem ecológica como ferramentas para delimitação de áreas prioritárias para conservação de espécies dos gêneros *Hoffmannseggella* H. G. Jones e *Dungsia* V. P. Castro & Chiron (Laeliinae: Orchidaceae).

Resumo: Padrões de distribuição geográfica, riqueza e diversidade de espécies refletem diretamente a história evolutiva e biogeográfica de uma região. *Hoffmannseggella* e *Dungsia* são gêneros de orquídeas endêmicos do Brasil, sendo o primeiro rupícola e o segundo epífita. Os padrões de distribuição fitogeográfica das espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungsia* foram estabelecidos através do georeferenciamento dos pontos de ocorrência, posteriormente plotados sobre quadrículas arbitrárias de 1° x 1° sobre a distribuição core das espécies estudadas. A análise de similaridade, baseada na distribuição das espécies dentro das quadrículas estabelecidas, revela a formação de quatro sub-conjuntos distintos de espécies. O primeiro grupo é formado por espécies endêmicas da Chapada Diamantina na Bahia, o segundo e o terceiro formados por espécies típicas e endêmicas do centro-norte e centro-sul da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais, e o quarto formado por espécies restritas aos complexos rupestres de granito do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Os centros de riqueza e diversidade de espécies de *Hoffmannseggella* estão localizados na região central da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, numa área de encontro entre dois blocos florísticos distintos. Por outro lado, os centros de riqueza e diversidade de *Dungsia* estão localizados no Espírito Santo. Das 34 espécies analisadas, 47% são micro-endêmicas e restritas a uma única serra com somente uma população conhecida. Somente uma das espécies, *H. cinnabarinna*, é amplamente distribuída e ocorre nos complexos rupestres de altitude de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Através da análise de PAE e modelagem ecológica, sugere-se a delimitação de: (a) 12 áreas prioritárias para conservação de espécies destes gêneros; (b) mais três áreas complementares para garantir ambientes adequados para ocorrência destas espécies; e (c) a conexão das áreas com elevado número de espécies endêmicas.

Introdução

Os gêneros *Hoffmannseggella* H. G. Jones e *Dungsia* Chiron e V. P. Castro & Chiron, estavam circunscritos sob *Laelia* Lidley *sensu* Schlechter (1917). Recentemente, o gênero *Laelia sensu lato* foi desmembrado em dois grupos principais: o das *Laelia* verdadeiras, que abrange espécies da América Central e México, e o das espécies da América do Sul, que foram segregadas em quatro outros gêneros: *Hadrolaelia* (ca. 22 spp., agrupadas em 6 seções), *Microlaelia* (gênero monotípico), *Hoffmannseggella* (ca. 39 spp.) e *Dungsia* (ca. cinco spp.) (Chiron & Castro Neto, 2002). Após a publicação do trabalho de Chiron & Castro Neto (2002) algumas espécies de *Hoffmannseggella* foram descritas, e hoje o número de espécies circunscritas sob este gênero aumentou para 42 (Verola & Semir, 2007). O gênero *Hoffmannseggella* é formado por espécies rupícolas, exclusivamente brasileiras e ocorrentes em “Complexos Rupestres de Granito e Complexos Rupestres de Quartzito” (*sensu* Semir, 1991), mais conhecidos como Campos Rupestres e Campos de Altitude, nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Sob o gênero *Dungsia*, estão circunscritas espécies brasileiras e exclusivamente epífitas, ocorrentes em formações do Domínio Floresta Atlântica de altitude no Estado do Espírito Santo. Do ponto de vista morfológico, *Dungsia* e *Hoffmannseggella* são muito variáveis, porém mantendo uma unidade comum quanto aos caracteres florais, sendo separadas somente pelo tipo de hábito (epífitas e rupícolas, respectivamente) e ambiente ocupado (formações florestais e formações rochosas, respectivamente).

Os campos rupestres são caracterizados por sua descontinuidade, funcionando como vários fragmentos de vegetação confinados a ilhas de afloramentos rochosos. Devido à descontinuidade das formações dos campos rupestres brasileiros, muitas espécies estão distribuídas em populações disjuntas, sendo isto frequentemente citado como responsável pela grande diversidade e endemismos observados nesses ambientes (Giulietti & Pirani, 1987, 1988; Giulietti & Hensold, 1990; Giulietti *et al.*, 1987, 1997). Apesar dos campos rupestres serem um dos tipos de vegetação mais ricos em diversidade no Brasil (Joly, 1970; Giulietti & Pirani, 1988), pouca atenção tem sido dada à conservação dessas áreas.

O número de espécies endêmicas em uma determinada região é um importante critério para seleção de áreas prioritárias para conservação (Gentry, 1986; Roberts, 1988), sendo que áreas montanhosas são geralmente reconhecidas como importantes centros de endemismo (Kruckeberg & Rabinowitz, 1985), necessitando atenção especial para conservação da biodiversidade (Rapini *et al.*, 2002).

O estudo de espécies endêmicas é importante por algumas razões, tais como: fornecer conhecimento sobre a história evolutiva das espécies e ajudar a reconstruir a história biogeográfica das áreas ocupadas pelas espécies e determinar a vulnerabilidade à extinção das espécies em questão (Manrique *et al.*, 2003). A vulnerabilidade à extinção de uma espécie é influenciada principalmente pela especificidade de hábitat, distribuição geográfica limitada e tamanho populacional reduzido, características comuns de espécies endêmicas (Manrique *et al.*, 2003).

Um dos aspectos que impedem o melhor entendimento da distribuição geográfica das espécies é a falta de registros botânicos, devido à falta de coleta em áreas de difícil acesso, o que causa um tipo de distribuição “viciada”, com as áreas bem coletadas às margens de estradas e locais de fácil acesso. Técnicas de georreferenciamento (GIS) e de modelagem ecológica são freqüentemente utilizadas para compensar as lacunas nos registros de coleta em áreas de difícil acesso e são extremamente úteis como ferramentas para estudos biogeográficos (Manrique *et al.*, 2003). A grande vantagem de se utilizar técnicas de modelagem ecológica é a possibilidade de correlacionar variáveis ambientais com a distribuição das espécies ou grupos de espécies com que se pretende trabalhar, fornecendo certa previsibilidade de quais os fatores responsáveis pela manutenção e distribuição destas espécies (Manrique *et al.*, 2003).

Por sua vez, a utilização da análise de PAE (Parsimony Analysis of Endemicity) é útil por fornecer cladogramas, que não necessariamente refletem aspectos filogenéticos, em que são baseados diretamente nos padrões de distribuição das espécies (Morrone, 1994). Segundo Rosen (1988) os cladogramas de PAE podem representar um cenário ecológico de áreas ambientalmente favoráveis para as espécies que se pretende estudar. Infelizmente, poucos são os trabalhos que utilizam estas ferramentas para avaliar o potencial de distribuição de espécies, bem como para identificar as melhores áreas para conservação de diversidade (Manrique, 2003).

Dentro desse contexto, este trabalho visa: i-) descrever os padrões de distribuição destes grupos; ii-) caracterizar biogeograficamente as espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungisia*, através da identificação de áreas de distribuição congruentes com as áreas ricas em endemismos; iii-) determinar quais as áreas com maiores índices de riqueza e diversidade de espécies; iv-) analisar os fatores responsáveis pela geração e manutenção da diversidade destes grupos de espécies; v-) estabelecer quais as áreas prioritárias para a conservação de *Hoffmannseggella* e *Dungisia* e vi-) avaliar se as áreas indicadas como prioritárias para conservação possuem características ambientais adequadas para manutenção destas espécies.

Material e Métodos

Análise do padrão de distribuição geográfica

Os dados sobre a distribuição das espécies foram obtidos através de levantamentos em herbários nacionais tais como: UEC, ESA, SPF, SP, BHCB, HXBH, ESAL, MBML, R, RB e HB (acrônimos de acordo com Holmgren *et al.*, 1990), além de levantamento em literatura especializada e observação de populações naturais.

Para este trabalho foram utilizadas as espécies válidas de *Dungisia* e *Hoffmannseggella* segundo Chiron & Castro Neto (2002), incluindo duas espécies posteriormente descritas, *H. viridiflora* (Verola & Semir, 2007 - CAPÍTULO 6) e *H. pendula* Mota & Viana. Foram incluídos somente registros de distribuição geográfica de espécies observadas em herbários, populações naturais ou literatura específica, evitando-se incluir registros duvidosos. Registros duvidosos foram aqueles com pontos de distribuição desconhecidos ou descritos de maneira vaga, impossibilitando o georeferenciamento acurado.

Todos os dados referentes à distribuição derivados deste levantamento foram transformados em coordenadas geográficas (graus decimais), e posteriormente, plotados em mapas de distribuição por meio de pontos georeferenciados, utilizando-se do programa DIVA GIS 5.2 (Gis.cip.cgiar.org/gis/tools/diva.htm). Para efeito de comparação os Complexos Rupestres de Altitude (CRA) foram divididos em sete meso-regiões geográficas (Fig.1):

- (1) CDA – Região da Chapada Diamantina, (-11,96N/-14.81S e -40.34L/-43.59O);
- (2) NCE – Região Norte da Cadeia do Espinhaço (-14.81N/-17.29S e -41.00L/-44.23O);
- (3) PDA – Região do Planalto de Diamantina (-17.29N/-18.64S e 41.36L/-44.96O);
- (4) RSC – Região da Serra do Cipó (-18.64N/-19.90S e -41.36L/-44.96O);
- (5) SCE – Região Sul da Cadeia do Espinhaço (-19.90N/-22.21S e -43.43L/-46.00O);
- (6) MRJ – Região do Maciço do Rio de Janeiro (-21.57N/-23.00S e -41.38L/-43.53O) e
- (7) MES – Região do Maciço do Espírito Santo (-19.00N/-21.15S e -44.30L/-41.79O).

As cinco primeiras meso-regiões, correspondem aos Complexos Rupestres de Quartzito, e as duas últimas, aos Complexos Rupestres de Granito, segundo classificação de Semir (1991). As meso-regiões do Estado de Minas Gerais foram conglomeradas em unidades maiores, agrupadas em duas macro-regiões geográficas principais: CNMG – Centro Norte de Minas Gerais

(NCE+PDA) e CSMG – Centro Sul de Minas Gerais (Fig. 1). Para critérios de inclusão relacionados aos padrões de distribuição, bem como para os acrônimos utilizados verificar legenda da Tabela 1.

Análise dos padrões de riqueza e diversidade

Todas as espécies e populações analisadas foram plotadas em quadrículas de 1° x 1° de latitude/longitude, sobre os mapas de distribuição total das espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungsia*. Foram incluídas somente as quadrículas que apresentassem pelo menos um ponto de ocorrência. Foram atribuídos códigos para cada quadrícula de acordo com a divisão política de cada região (Fig. 2). A verificação de padrões de riqueza (total de espécies por quadrícula) e diversidade (contribuição de cada espécie por quadrícula - índice de Shannon, Magurran, 1988) foram estabelecidos por meio de mapas gerados e analisados pelo programa DIVA GIS 5.2 (<http://www.gis.cip.cgiar.org/gis/tools/diva.htm>).

Para verificar a existência de blocos florísticos ao longo da distribuição geográfica de *Dungsia* e *Hoffmannseggella*, as mesmas quadrículas foram utilizadas para construção de uma matriz com dados binários (presença=1/ausência=0), verificando em qual das quadrículas determinada espécie ocorre. A matriz de ocorrência foi submetida a uma análise de agrupamento - UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean*), pelo Índice de Jaccard, utilizando o pacote de programas Fitopac 1.6 (Shepherd, 2006).

Análise de PAE (Parcimony Analysis of Endemicity)

A análise de PAE foi estabelecida a partir de uma matriz de presença e ausência (dados binários), que classifica áreas ou localidades com *táxons* análogos. A análise da matriz binária, leva em conta a distribuição das espécies ao longo das quadrículas pré-estabelecidas. Para enraizar o cladograma, foi utilizada uma quadrícula hipotética preenchida com zeros para todas as espécies utilizadas. A análise de parcimônia foi executada pelo programa PAUP 4.0b2 (Swofford, 1998), através do método TBR (*tree bisection-reconnection*). O nível de suporte da árvore obtido foi testado através da análise de “bootstrapping” (Felsenstein, 1981). A árvore reconhecida pelo método de parcimônia foi utilizada para indicar as áreas prioritárias para conservação das espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungsia*. Somente os terminais dicotômicos foram considerados relevantes para conservação da diversidade de espécies.

Modelagem Ecológica

Os pontos georeferenciados das espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungsia* foram utilizados para gerar modelos ecológicos de distribuição. A geração de modelos ecológicos consiste em associar os pontos de ocorrência de determinada espécie ou gênero a variáveis ambientais, ao longo da distribuição. Nesse contexto, os programas que geram as previsões de distribuição provável utilizam algoritmos específicos para distribuição potencial das espécies, concatenando as variáveis ambientais mais adequadas para ocorrência de um determinado grupo ou espécie.

Foram utilizadas as variáveis ambientais de clima do WorldClim (<http://www.gis.cip.cgiar.org/gis/tools/diva.htm>; <http://www.worldclim.org/>) e de topografia do U.S.Geological Survey's (grupo de dados do Hydro-1K; <http://edcdaac.usgs.gov/gtopo30/hydro>). Os dados de clima utilizados pertencem a um grupo de variáveis climáticas derivadas de valores de temperatura e precipitação mensais (BIO1, BIO5, BIO6, BIO12, BIO13 E BIO14 – para detalhes ver Beaumont *et al.*, 2005). As variáveis bioclimáticas selecionadas representam sazonalidade (médias anuais de temperatura e precipitação) e fatores extremos ou limitantes ambientais (temperatura no trimestre mais frio e no mais quente, precipitação no trimestre mais seco e no mais úmido). Estas variáveis foram selecionadas seguindo as recomendações de Nix (1986), para o qual esta combinação de camadas geralmente produz modelos melhores que aqueles obtidos com valores mensais de temperatura e precipitação. Optou-se por camadas com resolução de célula de 0.00417°.

Os dados de topografia selecionados foram elevação, relevo, aspecto e índice topográfico, com resolução de 0.01°. Os dados de índice de vegetação (NDVI) são derivados de medidas obtidas por satélites AVHRR (Advanced Very High Resolution Radiometer), e representam as concentrações de massa verde da vegetação na superfície.

Os dados de solos foram extraídos de mapas digitais (escala 1:5000000) da Embrapa (1981), versão digital fonte: U.S. Geological Survey's EROS Data Center, Sioux Falls, South Dakota (1992), onde são definidas setenta categorias de solos. Os dados geológicos e geomorfológicos são derivados de mapas digitais do IBGE (escala 1:5000000 – edição digital da Carta ao Milionésimo; <http://www.ibge.gov.br/mapserver>).

Os modelos de distribuição presente foram feitos através do algoritmo Bioclim, através do programa DIVA GIS versão 5.1 (<http://www.gis.cip.cgiar.org/gis/tools/diva.htm>) que leva em

consideração as camadas descritas anteriormente para o presente. Os modelos de distribuição futura foram obtidos através do algoritmo BIOCLIM (v 5.1), levando em consideração as camadas descritas anteriormente, com projeção para o futuro, que prevê condições adequadas para os pontos georeferenciados para os próximos 50 anos. Os modelos foram gerados separadamente para ocorrência das espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungsia* e, posteriormente, concatenados para verificar as áreas mais adequadas para conservação da diversidade de espécies destes gêneros.

Estabelecimento de Áreas Complementares (Corredores Ecológicos)

Além das áreas previstas pela Análise de PAE como importantes centros de conservação de diversidade de espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungsia*, foram estabelecidas áreas complementares para conservação de diversidade, com elevado potencial ecológico para ocorrência das espécies destes gêneros, com base nos modelos ecológicos gerados para o presente e futuro (concatenados). Essas áreas foram determinadas pelas características ecológicas adequadas para ocorrência das espécies (similaridade ecológica evidenciada pelo método de modelagem) e ligação entre áreas com elevada riqueza de espécies que não foram previstas pela análise de PAE. Dessa maneira, as áreas estabelecidas funcionam como corredores ecológicos de ligação entre áreas de diferentes conjuntos florísticos, garantindo o potencial de dispersão das espécies a longo prazo.

Resultados

Distribuição geográfica

Neste trabalho foram consideradas 34 espécies de *Hoffmannseggella* e três espécies de *Dungsia* (Tabela 1). Foi obtido um mapa com o padrão de distribuição geográfica geral para as espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungsia*. Todas as espécies estudadas são nativas do Brasil e ocorrem somente nos Complexos Rupestres de Altitude, principalmente na região sudeste, exceto duas espécies (5,9%), *H. pfisteri* e *H. bahiensis*, que ocorrem na porção sul da Chapada Diamantina – BA (quadrículas BA1 e BA2 – Fig. 2).

De todas as espécies de *Hoffmannseggella* estudadas, 25 (73,5%) são encontradas exclusivamente na Cadeia do Espinhaço ou Complexos Rupestres de Quartzito de Minas Gerais, das quais 12 (48%) são exclusivas da região centro-norte (CNMG) e 13 (52%) ocorrem somente

na região centro-sul (CSMG). Seis espécies (17,6%) são encontradas nos Complexos Rupestres de Granito dos Estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro (MES + MRJ), das quais quatro (80%) ocorrem exclusivamente no primeiro Estado (MES), e 1 (20%) no último (MRJ) (Fig. 1).

Das espécies de *Hoffmannseggella* analisadas, somente uma, *H. cinnabarina*, apresenta ampla distribuição, ocorrendo nas regiões centro-norte e centro-sul de Minas Gerais, bem como nos Estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro (Tabela 1). Três espécies (8,8%) apresentam distribuição regional, cinco (14,7%) apresentam distribuição inter-regional, nove (26,5%) apresentam endemismo local, sendo que a maioria, 16 espécies (47%) são micro-endêmicas, com somente uma população conhecida em condições naturais (Tabela 1). As espécies de *Dungsia* ocorrem exclusivamente no Maciço do Espírito Santo, sendo que duas delas apresentam distribuição regional, e uma é micro-endêmica (Tabela 1).

De acordo com as análises de similaridade, é possível observar a formação de quatro blocos fitogeográficos ou subconjuntos de espécies distintos, estabelecidas de acordo com a distribuição geral das espécies nas quadrículas (UPGMA/Índice de Correlação Cofenética de Jaccard = 0,93) (Fig. 3).

O primeiro bloco (D) é formado por somente duas espécies de *Hoffmannseggella* (*H. bahiensis* e *H. pfisteri*), que são exclusivas da meso-região CDA, sul da Chapada Diamantina na Bahia (Fig.3). No segundo bloco (C), estão circunscritas dez espécies das meso-regiões MRJ e MES, sendo três de *Dungsia* e sete de *Hoffmannseggella* dos Maciços Rochosos dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo (Fig. 3). O terceiro bloco (B) engloba 14 espécies de *Hoffmannseggella* que ocorrem nas meso-regiões RSC e SCE, com distribuição exclusiva na região centro-sul de Minas Gerais (CSMG) (Fig. 3). Por fim, o quarto bloco (A), é formado de 11 espécies de *Hoffmannseggella* típicas das meso-regiões NCE e PDA, ocorrentes no centro-norte da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais (CNMG) (Fig. 3). Aparentemente, os quatro blocos fitogeográficos são separados principalmente pelo padrão de origem geológica regional (Fig. 4). As espécies que formam o bloco fitogeográfico D (Fig. 3) ocorrem exclusivamente sobre terrenos de origem no mesoproterozóico (Fig. 4). A maioria das espécies do grupo C (Fig. 3) ocorre em terrenos de origem no paleoproterozóico e algumas poucos em terrenos do neoproterozóico (Fig. 4). As espécies do grupo B (Fig. 3) ocorrem predominantemente sobre terrenos de origem geológica antiga, do arqueano (Fig. 4). As espécies do grupo A (Fig. 3) ocorrem em áreas com origem geológica mista e complexa, que envolve formações geológicas distintas originadas em diferentes épocas, principalmente no arqueano, mesoproterozóico e neoproterozóico (Fig. 4).

Padrões de Riqueza e Diversidade

As regiões com maior riqueza em espécies de *Hoffmannseggella* foram: a meso-região RSC (Fig. 1 e 5), com 15 espécies (quadrícula MG9 – Fig. 2), seguida da meso-região PDA com 13 espécies (quadrícula MG6 – Fig. 2) e a meso-região SCE com cinco a nove espécies, dependendo da quadrícula (MG10 e MG11 – Fig. 2) (Fig. 5). As demais meso-regiões, CDA, NCE, MRJ e MES, apresentam baixa riqueza de espécies (Fig. 5). De acordo com o índice de diversidade de Shannon (H'), pode-se notar o seguinte: as áreas de maior diversidade são as do sul da meso-região PDA (quadrícula MG6 – Fig. 2) e o leste da meso-região RSC (quadrícula MG9 – Fig. 2), com H' entre 2.04 e 2.55 (Fig. 5). Outro importante centro de diversidade é o norte da meso-região SCE (quadrículas MG10 e MG11 – Fig. 2), com H' entre 1.53 e 2.04 (Fig. 5). As regiões sudoeste (quadrículas MG/ES1 – Fig. 2) da meso-região MES, oeste (quadrícula MG5 – Fig. 2) da meso-região PDA e sudoeste (MG13 – Fig. 2) da meso-região SCE, apresentam índices de diversidade semelhantes (H' entre 1.02 e 1.53 – Fig. 5). As demais quadrículas mostraram menor diversidade, H' variando de 0.0 a 1.0 (Fig. 5).

As espécies de *Dungsia* apresentam baixa riqueza de espécies em todas as quadrículas (ES1, ES2 e MG/ES1 – Fig. 2) da meso-região MES, bem como baixos índices de diversidade (H' entre 0.0 e 1.02) (Fig. 6).

Análise de PAE

Na matriz montada para análise de parcimônia, 21 dos 37 caracteres incluídos foram informativos de maneira parcimoniosa. Nas buscas heurísticas foram retidas 2840 árvores, com índice de consistência de 0.74 (IC=0.74) e índice de retenção de 0.72 (IR=0.72). A árvore mais parcimoniosa obtida com os respectivos valores de “bootstrapping” está apresentada na Figura 7. Das 22 quadrículas testadas, 12 foram reconhecidas como prioritárias para conservação da diversidade total de espécies de *Hofmannseggella* e *Dungsia* pelo método de parsimônia (Fig. 7). Cinco destas áreas estão localizadas na porção mineira da Cadeia do Espinhaço, uma na região limítrofe entre os Estados de Minas Gerais e Espírito Santo, duas no Espírito Santo, duas no Estado do Rio de Janeiro e duas na porção norte da Cadeia do Espinhaço, que corresponde à Chapada Diamantina na Bahia (Fig. 7).

Para as espécies de *Hoffmannseggella*, os modelos gerados para o presente evidenciaram que os locais mais adequados para ocorrência das espécies (acima de 25% de probabilidade) se sobrepõem às áreas de ocorrência de maior riqueza e diversidade (Fig. 5 e Fig. 8). Estas áreas estão localizadas nas quadrículas MG6, MG9, MG10, MG11 e MG/ES1 (Fig. 2), que são aquelas da porção Centro-Norte e Centro-Sul da porção Mineira da Cadeia do Espinhaço (Fig. 8A). Áreas de alta probabilidade de ocorrência foram previstas estendendo-se da região central do Espinhaço Mineiro em direção Nordeste do Estado, onde não são encontradas espécies de *Hoffmannseggella* (Fig. 8). As demais quadrículas nos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, são adequadas para ocorrência das espécies, porém com uma probabilidade menor (entre 5%-20%) (Fig. 8A). As quadrículas localizadas na Bahia (Chapada Diamantina) foram previstas, porém não possuem condições ideais para ocorrência de *Hoffmannseggella* (5%-10%) (Fig. 8A).

Os modelos de previsões futuras para as espécies de *Hoffmannseggella*, prevêm áreas adequadas para sua ocorrência muito similares ao observado nos modelos para o presente (Fig. 8B). No entanto, algumas quadrículas apresentam ligeira expansão (MG6, BA1, BA2 – Fig. 2 e Fig. 8B) ou retração das áreas adequadas (MG9, MG10, MG11 – Fig. 2) (Fig. 8B). Fora das áreas das quadrículas, existe a possibilidade de expansão de áreas adequadas no futuro, principalmente no setor mineiro nas direções sudoeste e centro-leste (Fig. 8B). As demais áreas permanecem inalteradas (Fig. 8B). Modelos concatenados para presente e futuro prevêm áreas adequadas comuns para ambos os modelos (Fig. 8C), com elevada probabilidade de expansão de áreas adequadas para as espécies de *Hoffmannseggella* do sul de Minas Gerais em direção nordeste do Estado de São Paulo (Fig. 8C).

Para as espécies de *Dungsia*, os modelos gerados para o presente apresentam áreas adequadas de ocorrência somente no Estado do Espírito Santo, que correspondem e se sobrepõem às quadrículas ES1 e ES2 (Fig. 9A). Os modelos gerados para o futuro, prevêm a expansão de áreas adequadas de ocorrência no sentido sul, que corresponde ao norte do Rio de Janeiro, que se sobrepõem às áreas previstas pela análise de PAE (Fig. 7) como áreas prioritárias para conservação (RJ1 e RJ2 – Fig. 2) (Fig. 9B). Os modelos concatenados para presente e futuro revelaram que as áreas de alta probabilidade de ocorrência são as mesmas em ambos os modelos (Fig. 9C).

Os modelos concatenados entre presente e futuro (Fig. 9D), tanto para as espécies de *Hoffmannseggella* (Fig. 8C) como de *Dungsia* (Fig. 9C), revelam que as áreas previstas como altamente adequadas (25%-100% de probabilidade) para ocorrência das espécies estão contempladas nas áreas prioritárias para conservação, evidenciadas na análise de PAE (Fig. 10 – quadrículas em cinza).

Áreas complementares

Além das áreas previstas pela análise de PAE como prioritárias para conservação (Fig. 7), sugere-se a delimitação de áreas complementares para ligar as áreas de alta riqueza e diversidade de espécies, através do reconhecimento das áreas adequadas previstas pelos modelos ecológicos (Fig. 10). Neste contexto, as áreas mais adequadas para ligar estas áreas e que não foram previstas pela análise de PAE (Fig. 7) são as quadrículas MG14, MG/RJ1 (Fig. 2), além de mais uma área que ligaria as quadrículas MG11 à MG/ES1 (Fig. 2) (Fig. 10 – quadrículas em azul).

Discussão

Padrões de distribuição, riqueza e diversidade

Os campos rupestres ocorrem nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás, que correspondem às regiões rochosas de maior altitude (acima de 900 m) (Giulietti *et al.*, 1997). Essa vegetação, embora ocupe uma áreas relativamente pequena, quando comparada a outros tipos de vegetação do Brasil, é reconhecida como uma das áreas de maior riqueza de espécies e endemismos (Giulietti *et al.*, 1997; Joly, 1970). Por exemplo, Giulietti *et al.* (2005) estimam que cerca de 90% das espécies de Eriocaulaceae, Xyridaceae e Velloziaceae ocorrentes nos campos rupestres sejam endêmicas.

De acordo com os resultados deste trabalho, as espécies de *Hoffmannseggella* podem ser consideradas como típicas dos Complexos Rupestres de Altitude, ocorrendo principalmente nos Complexos Rupestres de Quartzito de Minas Gerais. Estas, juntamente com outros táxons como Eriocaulaceae, Xyridaceae, Velloziaceae, Melastomataceae, Asteraceae entre outros (Giulietti & Pirani, 1988; Giulietti & Hensold, 1990) formam um conjunto de espécies característica deste tipo de formação vegetacional.

O principal centro de diversidade de espécies de *Hoffmannseggella* está localizado na Cadeia do Espinhaço, numa área entre a meso-região do Planalto de Diamantina e Região da Serra do Cipó (Fig. 2), assim como ocorre com alguns gêneros de Asteraceae (Semir, 1991), Eriocaulaceae (Guilietti *et al.*, 1997) e Asclepiadaceae (Rapini *et al.*, 2002).

Análise de similaridade tem sido utilizada para detecção de subconjuntos florísticos em diferentes biomas do Brasil, como Cerrados *sensu lato* incluindo Campos Rupestres (Simon & Proença, 2000) e Campos Rupestres *sensu stricto* (Barros, 1998), utilizando diferentes níveis taxonômicos como gênero (*Mimosa*: Leguminosae; Simon & Proença, 2000) e família (Orchidaceae; Barros, 1998). Neste contexto, a análise de similaridade entre as espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungsia* deixa claro que existem diferentes conjuntos de espécies que são substituídas ao longo da Cadeia do Espinhaço (Fig. 3). Estas formam um gradiente latitudinal de riqueza, que alcança a maior expressividade na porção mais central, representando uma zona de contato entre os blocos Centro Norte e Centro-Sul da Cadeia do Espinhaço (CNMG e CSMG) (Fig. 3 e Fig.6). No entanto, cada um dos blocos formados apresenta uma constituição florística própria, com poucos elementos compartilhados entre as meso-regiões, que são as espécies com distribuição do tipo IR (inter-regional) (Tabela 1). Isso pode ser devido ao ambiente particular ocupado por cada uma das espécies, caso haja poucas espécies generalistas no grupo, ou então pelo isolamento relativo entre as áreas, que permitiu o surgimento de espécies por vicariância. Todas as espécies deste grupo estão restritas a uma cota de altitude particular, e são dispersas pelo vento, o que facilita a ocupação de novas áreas isoladas, que pode ser seguida de eventos de especiação por isolamento geográfico (vicariância). Harley (1995) e Simon & Proença (2000) já haviam notado a natureza heterogênea dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço, onde cada unidade ou conjuntos isolados de montanhas apresentam um conjunto particular de espécies endêmicas. Ambos os trabalhos (Harley, 1995; Simon & Proença, 2000) também notaram um número maior de espécies endêmicas no setor centro-sul da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais.

Ao nível de gênero ocorrem duas áreas de distribuição disjunta. A primeira disjunção é formada nos Complexos Rupestres de Quartzito, entre o bloco de espécies da porção mineira da Cadeia do Espinhaço (A + B) e Chapada Diamantina (D). A segunda, entre o Complexo Rupestre de Quartzito da Cadeia do Espinhaço (A + B) e os Complexos Rupestres de Granito ou Maciços do Espírito Santo e Rio de Janeiro (C) (Fig. 5).

O primeiro padrão, no qual um gênero está disjunto entre a Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais e a Chapada Diamantina na Bahia, pode ser observado em *Barbacenia* (Velloziaceae), *Pseudotrimezia* (Iridaceae) (Giulietti & Pirani, 1987), *Raylea* (Sterculiaceae) e *Morithamnus* (Asteraceae) (Harley & Simmons, 1986). O segundo padrão de distribuição, no qual um gênero é disjunto entre os Campos Rupestres de Minas Gerais e os contrafortes rochosos do Rio de Janeiro e Espírito Santo, é menos freqüente, porém observado em *Camptosema* (Leguminosae) (Queiroz, 1999), *Constantia* e *Pseudolaelia* (ambos da família Orchidaceae) (Barros, 1998).

Tais padrões disjuntos não podem ser explicados por eventos de dispersão a longa distância. Uma provável hipótese, é que entre o final do Plioceno e o Pleistoceno, estas áreas estariam conectadas através de áreas contínuas de campos rupestres, similares àquelas encontradas no presente de maneira disjunta (van Der Hammen, 1974; Brunham & Graham, 1999). Segundo esses autores, neste período ocorreu uma série de episódios com épocas mais secas e amenas do que as atualmente observadas na América do Sul, devido a eventos de glaciação em regiões de latitudes maiores. Para van Der Hammen (1974) e Brunham & Graham (1999), nestes períodos, houve um deslocamento geral dos componentes florísticos para altitudes menores, como consequência das alterações causadas pelos efeitos da glaciação, deslocando os componentes de mata para regiões de baixada e aumentando a área de ocupação dos componentes campestres, devido ao recuo das matas. Nestas ocasiões, ocorreram, provavelmente, a expansão e comunicação entre as floras de *Hoffmannseggella* (blocos A e B), propiciando a dispersão de espécies restritas, para áreas anteriormente disjuntas, como a Chapada Diamantina (D), e os Complexos Rupestres de Granito do Rio de Janeiro e Espírito Santos (C), seguidos por eventos de especiação nestas áreas periféricas, hoje disjuntas (para discussão veja Capítulo 2).

A associação da distribuição geográfica de cada uma das espécies de *Hoffmannseggella*, com o nível de organização filogenética entre elas pode dar uma idéia da complexidade histórica, evolutiva e biogeográfica deste grupo (Fig. 11). Nas espécies de *Hoffmannseggella*, os principais eventos de cladogênese não estão associados diretamente a uma área particular de ocorrência das espécies. Ao contrário, evidenciam múltiplos eventos de colonização e estabelecimento de um mesmo grupo de espécies em áreas diferentes (ver discussão no Capítulo 2).

Fato surpreendente neste trabalho foi o número de espécies micro-endêmicas de *Hoffmannseggella* (47%), superior às percentagens obtidas em outros estudos realizados em diversas outras famílias de Angiospermas em áreas semelhantes como Asclepiadaceae (Rapini et

al., 2002), Asteraceae (Semir, 1991), Bromeliaceae (Forzza, 2001), entres outros (Harley, 1988, Araújo *et al.*, 2005).

Muito embora estas regiões estejam entre as mais bem coletadas do Brasil, a partir de estudos realizados por diversos pesquisadores, incluindo os que deram especial ênfase a Orchidaceae (Hoehne, 1927; Magalhães, 1956; Pabst, 1957a, 1957b, 1957c, 1958a, 1958b; Pabst & Strang, 1977; Giulietti *et al.*, 1987; Alves, 1990, 1991, entre outros), pode ser que o esforço de coleta ainda seja insuficiente para detectar outras populações das espécies consideradas neste trabalho como micro-endêmicas. Isto concorda com trabalhos anteriores que evidenciaram uma diminuição no esforço de coleta no sentido sul-norte da Serra do Espinhaço (Rapini *et al.*, 2002; Araújo *et al.*, 2005).

Outra possível justificativa para o alto grau de micro-endemismos aqui evidenciado, seria a elevada taxa de especiação das espécies deste grupo. O elevado grau de endemismo é uma característica particularmente interessante dos campos rupestres, fato já apontado por diversos autores (Joly 1970; Harley & Simons, 1986; Giulietti *et al.*, 1987; Giulietti & Pirani, 1988; Semir, 1991; Giulietti *et al.*, 1997; Rapini *et al.*, 2002; Giulietti *et al.*, 2005). Tal característica é atribuída a uma série de particularidades dos campos rupestres, como: topografia acidentada e fragmentada (em que cada afloramento se comporta como uma ilha), variados tipos de solos e ocorrência de diversos microclimas específicos, proporcionando condições ecológicas adequadas para uma intensa especiação (Giulietti *et al.*, 1987, 1996, 1997; Semir, 1991; Alves & Kolbek, 1994). Neste trabalho foi observada uma dissimilaridade no tipo de matriz geológica predominante nas áreas de distribuição dos diferentes blocos de espécies (Fig. 4). Os blocos de espécies (subconjuntos florísticos) B, C e D ocupam formações geológicas diferentes, porém relativamente homogêneas (Fig. 4). Ao contrário, no bloco de espécies A (Fig. 3 e Fig. 4), principalmente no seu extremo norte de distribuição, existem diferentes tipos de matrizes geológicas, que podem fornecer uma diversidade maior de nichos ecológicos para o estabelecimento de espécies. Realmente, nesta área estão localizados os centros de riqueza e diversidade de espécies de *Hoffmannseggella* (Fig. 5A e B), revelando a elevada taxa de especiação nesta área.

Além de fatores ecológicos, características intrínsecas das espécies de *Hoffmannseggella* poderiam justificar o elevado número de endemismos no gênero. Em Orchidaceae as barreiras à hibridação intra-genérica são geralmente mecânicas (pré-polinização) e espécies filogeneticamente próximas são, pelo menos a princípio, potencialmente inter-férteis (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1968, 1981, 1993). A hibridização é reconhecidamente um modo de especiação rápida,

principalmente em Orchidaceae (Anderson & Stebbins, 1954; Blumenschein, 1960; Brieger, 1960), dando origem a um elevado número de espécies de modo relativamente rápido (evolução explosiva ou “surto evolutivo”, segundo Blumenschein, 1960).

Espécies de *Hoffmannseggella* são especialmente susceptíveis a eventos de hibridização, pois não apresentam fortes barreiras mecânicas ou genéticas que evitem a hibridação (Capítulos 3 e 4), de modo que espécies simpátricas e com eventos de floração sobrepostos podem inter-cruzar dando origem a espécies híbridas (para detalhes ver Capítulos 3 e 4). Este fato pode justificar que a maior riqueza e a maior diversidade de espécies sejam observadas na área de encontro entre dois blocos florísticos distintos, CSMG e CNMG (Fig. 3), onde alguns pares de espécies podem ser encontrados em sincronopatria e a ocorrência de híbridos é relativamente frequente (Capítulos 3 e 4). A elevada frequência de híbridos naturais observada em *Hoffmannseggella*, concorda com a hipótese de Blumenschein (1960) de que muitas espécies deste gênero têm origem híbrida.

Outro fato que corrobora a origem híbrida de várias espécies de *Hoffmannseggella*, é a elevada taxa de poliplóides no grupo. Blumenschein (1960) estima que cerca de 50% das espécies do grupo sejam poliplóides. Para esse autor, a poliploidia teria um papel fundamental na exploração rápida de novos ambientes, funcionando como agente fixador de produtos (ou espécies) originados por eventos hibridação.

Análise de PAE e Modelagem Ecológica

A distinção entre biotas ou limites biológicos tem sido um dos maiores desafios dos biogeógrafos (Trejo-Torres & Ackerman, 2001). Frequentemente as análises biogeográficas são feitas utilizando métodos subjetivos (e.g. Gentry, 1982; Borridi, 1996). Trabalhos focados em métodos mais objetivos e analíticos vêm sendo desenvolvidos para analisar os dados de distribuição dos organismos (e.g. Rosen & Smith, 1988; Rosen, 1988; Posadas, 1996; Posadas *et al.*, 1997; Morrone, 1998; Trejo-Torres & Ackerman, 2001; Manrique *et al.*, 2003).

A análise de PAE (*Parsimony Analysis of Endemicity*) foi proposta primeiramente por Rosen (1985 *in* Rosen & Smith, 1988) e desenvolvida por Rosen & Smith (1988). Este método representa uma forma direta de avaliar afinidades biológicas entre áreas distintas (Trejo-Torres & Ackerman, 2001; Manrique *et al.*, 2003) e para detecção de áreas de endemismo (Morrone & Crisci, 1995; Posadas, 1996; Posadas *et al.*, 1997). O nível de organização hierárquica da análise de PAE é focado em diferentes unidades, como estudo de animais, plantas, comunidades

biológicas, biotas e em nível mundial (Trejo-Torres & Ackerman, 2001). Por outro lado, a delimitação das unidades amostrais de comparação pode ser artificial, como sítios, quadrículas de diversos tamanhos, formas e seções regionais (limites arbitrários) ou então áreas biogeográficas e áreas naturalmente delimitadas como ilhas, continentes e oceanos (Trejo-Torres & Ackerman, 2001).

Determinar a riqueza e a diversidade biológica através da análise PAE é uma importante forma de estabelecer áreas de conservação (Manrique *et al.*, 2003). A principal vantagem da utilização do método de PAE é que a diversidade total, dentro do nível hierárquico escolhido, pode ser garantida em sub-unidades menores e mais fáceis de serem implementadas, uma vez que uma área escolhida pelo método não necessariamente contempla somente espécies endêmicas e de distribuição restrita, mas obrigatoriamente, contempla espécies com distribuição geográfica mais ampla (Morrone, 1994).

O reconhecimento de áreas com elevada diversidade e endemismos indicados pela análise de PAE, não é suficiente para implementação de áreas de conservação. Além de conhecer a diversidade destas áreas, o reconhecimento das áreas com atributos ambientais e ecológicos específicos (adequação ambiental) para a sobrevivência das espécies a serem conservadas é de extrema importância para delimitação de áreas de conservação (Manrique *et al.*, 2003). A aplicação de métodos baseados em modelagem ecológica e análise PAE, ainda são escassos (Manrique *et al.*, 2003). No entanto, esta metodologia é sem dúvida uma poderosa ferramenta para identificação de áreas de diversidade, estabelecimento de planos de conservação e avaliação da adequação ambiental destas áreas para sobrevivência das espécies alvo que se quer conservar.

O algoritmo BIOCLIM é uma ferramenta de modelagem ecológica que utiliza 35 parâmetros ambientais interpolados (Nix, 1986; Houlder *et al.*, 2001; Beaumont *et al.*, 2005). A utilização deste algoritmo pode revelar três condições básicas: descrever as características ambientais em que determinada espécie ocorre naturalmente, identificar áreas com características ambientais adequadas onde uma determinada espécie pode ser encontrada e identificar o potencial de ocorrência de uma espécie em cenários bioclimáticos alterados (Beaumont *et al.*, 2005). Para uma discussão sobre as vantagens e limitações dos métodos e algoritmos utilizados em modelagem ecológica ver Ferrier & Watson (1997), Backer *et al.* (2000), Pearson & Dawson (2003) e, mais especificamente sobre o algoritmo BIOCLIM, Beaumont *et al.* (2005).

Com base no exposto acima e nos resultados obtidos neste trabalho, através da análise PAE, sugere-se a delimitação de doze áreas principais para a conservação da diversidade total de espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungsia*. Além destas áreas, os resultados obtidos através dos métodos de modelagem ecológica, sugerem ainda a delimitação de mais três áreas, que possuem características ambientais adequadas para a conexão entre áreas de alta diversidade de espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungsia*, que representam também corredores ecológicos estabelecidos ao longo da história evolutiva destes gêneros (para discussão ver Capítulo 2).

No entanto, mesmo sendo necessária a conservação das espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungsia*, uma vez que a maioria das espécies destes gêneros se encontra fora de áreas de conservação, a demarcação de áreas de conservação deve levar em consideração o maior número de espécies possível, que compõe a biota em foco, garantindo maior diversidade biológica. Os resultados deste trabalho indicam a necessidade de trabalhos adicionais, que incluam o maior número de espécies típicas e endêmicas dos Campos Rupestres, para que se possa identificar áreas comuns, prioritárias para conservação e com elevado potencial ecológico para manter o maior número de espécies possível por unidade de conservação.

Referências Bibliográficas

- Alves, R.J.V. 1990. The Orchidaceae of Itacolomi State Park in Minas Gerais, Brazil. *Acta Botanica Brasilica* **4**: 65-72.
- Alves, R.J.V. 1991. **Field guide to the orchids of the Serra de São José**. Tropicaleaf, Praga. 148 pp.
- Alves, R.J.V. & Kolbek, J. 1994. Plant species endemism in savanna vegetation on table mountains (Campo Rupestre) in Brazil. *Vegetatio* **113**: 125-139.
- Anderson, E. & Stebbins, G.L. 1954. Hybridization as evolutionary stimulus. *Evolution* **8**: 378-388.
- Araújo, A.O., Souza, V.C. & Chautems, A. 2005. Gesneriaceae da Cadeia do Espinhaço de Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **28**: 109-135.
- Baker, R.H.A., Sansford, C.E., Jarvis, C.H., Cannon, R.J.C., MacLeod, A. & Walters, K.F.A. 2000. The role of climatic mapping in predicting the potential geographical distribution of non-indigenous pests under current and future climates. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **82**: 57-71.
- Barros, F. 1998. **Análise multivariada da distribuição geográfica de espécies de orquídeas dos campos rupestres do Brasil**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas. 206 pp.
- Beaumont, L. J., Hughes, L. & Poulsen, M. 2005. Predicting species distributions: use of climatic parameters in BIOCLIM and its impact on predictions of species' current and future distributions. *Ecological Modelling* **186**: 250-269.
- Blumenschein, A. 1960. **Estudos sobre a Evolução no subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae)**. Tese apresentada para obtenção do título de Livre Docente da Cadeira de Citologia e Genética Geral da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 54 pp.
- Borridi, A. 1996. *Phytogeography and Vegetation: Ecology of Cuba*, 2nd ed. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary.
- Brieger, F.G. 1960. **Geographic Distribution and Phylogeny of Orchids**. The Report of the Third World Orchid Conference. pp. 328-333.
- Brunham, R.J. & Graham, A. 1999. The history of neotropical vegetation: new developments and status. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **86**: 546-589.
- Chiron, G.R. & Castro Neto, V.P. 2002. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley. *Richardiana* **2**:4-28.
- Dressler, R.L. 1968. Observations on orchids and Euglossine bees in Panama and Costa Rica. *Revista de Biologia Tropical* **15**: 143-183.
- Dressler, R.L. 1981. **The orchids: natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-376.

- Ferrier, S. & Watson, G. 1997. **An Evaluation of the Effectiveness of Environmental Surrogates and Modelling Techniques in Predicting the Distribution of Biological Diversity**. NSW National Parks and Wildlife Service, Armidale.
- Forzza, R.C. 2001. **Filogenia da Tribo Puyae Wittm. E Revisão Taxonômica do Gênero *Encholirium* Mart. ex Schult. and Schult.f. (Pitcairnioideae-Mromeliaceae)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Gentry, A.H. 1982. Neotropical floristic diversity: Phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of Andean orogeny? *Annals of the Missouri Botanical Garden* **69**: 557-593.
- Gentry, A.H. 1986. **Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity**. Endemism in tropical versus temperate plant communities. Ed. Soulé M. E, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Pp. 153-181.
- Giulietti, A.M. & Pirani, J.R. 1987. **Proceedings of a Workshop on Neotropical Distributional Patterns**. Patterns of Geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. Ed. P.E. Vanzolini & W. R. Heyer. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, Brazil. Pp. 39-69.
- Giulietti, A.M. & Hensold, N. 1990. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. *Acta Botânica Brasileira* **4**:133-158.
- Giulietti, A.M. & Pirani, J.R. 1988. **Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns**. Patterns of geografic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais e Bahia, Brazil. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Giulietti, A.M., Harley, R.M., Queiroz, L.P., Wanderley, M.G.L. & van Den Berg, C. 2005. Biodiversity and Conservation of Plants in Brazil. *Conservation Biology* **19**: 632-639.
- Giulietti, A.M., Wanderley, M.G.L., Longui-Wagner, H.M., Pirani, J.R. & Parra, L.R. 1996. Estudos em 'sempre-vivas': Taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. *Acta Botanica Brasileira* **10**:329-377.
- Giulietti, A.M., Pirani, J.R. & Harley, R.M. 1997. **Centres of Plant Diversity. Vol. 3**. Espinhaço Range Region – Eastern Brazil. The Americas. Eds. Davis, S.D.; Heywood, V.H.; Herrera-Mac Bryde, O.; Villa-Lobos, J. & Hamilton, A.C. The World Wild Found for Nature & The World Conservation Union, London. pp. 397-404.
- Giulietti, A.M., Menezes, N.L., Pirani, J.R., Meguro, M. & Wanderley, M.G. 1987. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista de espécies. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* **9**:1-151.
- Harley, R.M. & Simons, N.A. 1986. **Florula of Mucugê**. Royal Botanic Gardens, Kew. 227p.
- Harley, R.M. 1988. **Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns**. Evolution and distribution of *Eriope* (Labiatae) and its relatives, in Brazil. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Harley, R.M. 1995. **Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina- Bahia, Brazil**. Introduction. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp 1-37.
- Hoehne, F.C. 1927. Aspecto e flora das serras de Minas Gerais. *Ceres* **3**: 85-93.
- Holmgren, P.K., Holmgren, N.H. & Barnett, L.C. 1990. **Index Herbariorum**. Part 1: The Herbaria of the World. 8th edn. The New York Botanical Gardens, Kew, UK. Pp. 1-40.

- Houlder, D., Hutchinson, M., Nix, H. & McMahon, J. 2001. **ANUCLIM**. Centre for Resource and Environmental Studies, Canberra.
- Joly, A.B. 1970. **Conheça a vegetação brasileira**. EDUSP, São Paulo.
- Kruckeberg, A.R. & Rabinowitz, D. 1985. Biological aspects of endemism in higher plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 447-479.
- Magalhães, G.M. 1956. **Anais da V Reunião Anual da Sociedade Botânica do Brasil**. Contribuição para o conhecimento da flora dos campos alpinos de Minas Gerais – 1953 – 1954. Imprensa Universitária, Porto Alegre. Pp 227-304.
- Magurran, A.F. 1988. **Ecological diversity and its measurements**. London, Chapman and Hall.
- Manrique, C.E., Durán, R. & Argáes, J. 2003. Phytogeographic analysis of taxa endemic to the Yucatán Peninsula using geographic information systems, the domain heuristic method and parsimony analysis of endemism. *Diversity and Distribution* **9**: 313-330.
- Morrone, J.J. & Crisci, J.V. 1995. Historical biogeography: introduction to methods. *Annual Review of Ecology and Systematics* **26**: 373-401.
- Morrone, J. J. 1994. On the identification of areas of endemism. *Systematic Zoology* **43**: 438-441.
- Morrone, J.J. 1998. On Udvardy's Insulartartica province: a test from the weevils (Coleoptera: Curculionoidea). *Journal of Biogeography* **25**: 947-955.
- Nix, H. A. 1986. **Atlas of elapid snakes of Australia**. A biogeographic analysis of Australian elapid snakes. Ed. R. Longmore., Canberra: Australian Government Publishing Service. Pp. 4-15.
- Pabst, G.F.J. & Strang, H.E. 1977. **Trabalhos de XXVI Congresso Nacional de Botânica**. Orquídeas da Serra do Caraça. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. Pp. 435-442.
- Pabst, G.F.J. 1957a. Viagens botânicas através de Minas Gerais. *Orquídea (Rio de Janeiro)* **19**: 54-56.
- Pabst, G.F.J. 1957b. Viagens botânicas através de Minas Gerais – II. *Orquídea (Rio de Janeiro)* **19**: 108-110.
- Pabst, G.F.J. 1957c. Viagens botânicas através de Minas Gerais – III. *Orquídea (Rio de Janeiro)* **19**: 234-236.
- Pabst, G.F.J. 1958a. Viagens botânicas através de Minas Gerais – IV. *Orquídea (Rio de Janeiro)* **20**: 100-102.
- Pabst, G.F.J. 1958b. Viagens botânicas através de Minas Gerais – V. *Orquídea (Rio de Janeiro)* **20**: 165-169.
- Pearson, R.G. & Dawson, T.P., 2003. Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimatic envelope models useful? *Global Ecology and Biogeography* **12**: 361-371.
- Pijl, L. van der & Dodson, C.H. 1966. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. University of Miami Press, Coral Gables.
- Posadas, P. 1996. Distributional patterns of vascular plants in Tierra del Fuego: a study applying parsimony analysis of endemism (PAE). *Biogeographica* **72**: 161-177.

- Posadas, P., Estévez, J.M. & Morrone, J.J. 1997. Distributional patterns and endemism of vascular plants in Andean Subregion. *Fontqueria* **48**: 1-10.
- Queiroz, L.P. 1999. **Sistemática e Filogenia do gênero *Camptosema* W. J. Hook & Arn. (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.
- Rapini, A., Mello-Silva, R. & Kawasaki, M. L. 2002. Richness and endemism in Asclepiadoideae (Apocynaceae) from the Espinhaço Range of Minas Gerais, Brazil – a conservationist view. *Biodiversity and Conservation* **11**: 1733-1746
- Roberts, L. 1988. Hard choices ahead on biodiversity. *Science* **241**: 1759-1761.
- Rosen, B.R. & Smith, A.B. 1988. **Gondwana and Tethys**. Tectonics from fossils? Analysis of reef-coral and sea-urchin distributions from late Cretaceous to Recent, using a new method. Eds. M. G. Audeley-Charles and A. Hallam. Geological Society Special Publications, London. 37: 275-306.
- Rosen, B.R. 1988. **Analytical Biogeography: an Integrated Approach to the study of Animal and Plant Distributions**. From fossils to earth history: applied historical biogeography. Eds. A.A. Myers and P. S. Giller, Chapman & Hall, UK. Pp. 437-481.
- Schlechter, R. 1917. Die Einteilung der Gattung Laelia und die geographische Verbreitung ihrer Gruppen. *Orchis* **11**: 87-96.
- Semir, J. 1991. **Revisão Taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernonieae:Compositae)**. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Shepherd, G. J. 2006. **Fitopac 1.6**. publicação 30/03/2006. Manual do Usuário versão preliminar, Campinas, São Paulo.
- Simon, M.F. & Proença, C. 2000. Phytogeographic patterns of *Mimosa* (Mimosoideae, Leguminosae) in the *Cerrado* biome of Brazil: an indicator genus of high-altitude centers of endemism? *Biological Conservation* **96**: 279-296.
- Swofford, D.L. 1998. **PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods)**. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- Trejo-Torres, J.C. & Ackerman, J.D. 2001. Biogeography of the Antilles based on parsimony análisis of orchid distributions. *Journal of Biogeography* **28**: 775-794.
- van Der Hammen, T. 1974. The Pleistocene changes of vegetation and climate in tropical South America. *Journal of Biogeography* **1**: 3-26.
- Verola, C. F. & Semir, J. 2007. *Hoffmannseggella viridiflora* (Orchidaceae, Laeliinae) a New species from Brazilian Campos Rupestres. *Novon* **17**: 125-129.

Tabela 1. Lista de espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungisia* dos Complexos Rupestres de Altitude, sua distribuição e regiões de ocorrência. AD – Ampla Distribuição, espécie ocorrente em mais de três meso-regiões; IR – Inter Regional, espécie ocorrente em duas meso-regiões; DR – Distribuição Regional, espécie ocorrente em mais de uma quadrícula dentro de uma mesma meso-região; EL – Endemismo Local, espécie com mais de três populações (pontos) localizadas em uma mesma quadrícula dentro da mesma meso-região; ME – Micro Endemismo, espécie com somente um ponto de coleta e uma única população conhecida.

Padrão de distribuição Espécies	Local de ocorrência (Meso-Região)	Distribuição Geográfica/ Estado / Localidade
Espécie com ampla distribuição (AD)		
<i>Hoffmannseggella cinnabarina</i> (Batem. ex Lindley) H. G. Jones	NDE/PDA/RSC/SCE/MES/ MRJ	ES: Domingos Martins, Serras de Santa Teresa, do Forno Grande e Pico do Frade; MG: Diamantina, Serras da Moeda, de Catolés, de Itacambira, do Brigadeiro, do Caparão, do Caraça e do Cipó; RJ: Macaé de Cima, Serras do Desengano e dos Órgãos
Espécies com distribuição Inter-regional (IR)		
<i>H. briergeri</i> (Blumensch. Ex Pabst) V.P.Castro & Chiron	PDA/RSC	MG: Diamantina, Pico do Itambé e Serra do Cipó
<i>H. caulescens</i> (Lindley) H. G. Jones	RSC/SCE	MG: Serras da Moeda, da Piedade, de Carrancas, de Congonhas, de Itabirito, de Itutinga, de Mariana, de São José, do Caraça, do Curral e do Lenheiro
<i>H. crispata</i> (Thunb.) H.G.Jones	RSC/SCE	MG: Diamantina, Serras da Moeda, da Piedade, de Antônio Pereira, de Itabira, de Itabirito, de Lavras, de Mariana, de Ouro Banco, de Ouro Preto, de São Thomé, do Caraça, do Curral, do Ibitipoca, do Lenheiro e Serra do Papagaio
<i>H. fournieri</i> (Cogniaux) V.P.Castro & Chiron	RSC/SCE	MG: Diamantina, Serras da Moeda, de Lavras Novas, de Ouro Preto e do Caraça
<i>H. rupestris</i> (Lindley) V.P.Castro & Chiron	PDA/NCE	MG: Diamantina, Pico do Itambé, Serras de Botumirim, de Catolés, de Grão Mogol, de Itacambira, de Montes Claros, do Cabral e do Cipó
Espécies com distribuição Regional (DR)		
<i>Dungisia brevicaulis</i> (H.G. Jones) Chiron & V.P.Castro	MES	ES: Cachoeira do Itapemirim e Serra de Santa Teresa
<i>D. harpophylla</i> (Rchb.f.) Chiron & V.P.Castro	MES	ES: Cachoeira do Itapemirim, Domingos Martins, Pico do Frade e Serra de Santa Teresa
<i>H. bahiensis</i> (Schltr.) H.G.Jones	CDA	BA: Chapada Diamantina
<i>H. reginae</i> (Pabst) V.P.Castro & Chiron	SCE	MG: Serras da Moeda, da Piedade, do Caraça e do Curral
<i>H. sanguiloba</i> (Withner) V.P.Castro & Chiron	SCE	MG: Serras da Moeda, de Antônio Pereira e de Catolés

Tabela 1. Continuação.

Espécies com Endemismo Local (EL)		
<i>H. pfisteri</i> (Pabst & Senghas) V.P.Castro & Chiron	CDA	BA: Chapada Diamantina
<i>H. mixta</i> (Hoehne) V.P.Castro & Chiron	MES	ES: Pedra Paulista e Serra de Santa Teresa
<i>H. angereri</i> (Pabst) V.P.Castro & Chiron	PDA	MG: Diamantina
<i>H. bradei</i> (Pabst) V.P.Castro & Chiron	PDA	MG: Diamantina
<i>H. esalqueana</i> (Blumensch. Ex Pabst) V.P.Castro & Chiron	PDA	MG: Diamantina
<i>H. ghillanyi</i> (Pabst) V.P.Castro & Chiron	RSC	MG: Serra do Cipó
<i>H. endsfeldzii</i> (Pabst) V.P.Castro & Chiron	SCE	MG: Serra de Itutinga
<i>H. kettieana</i> (Pabst) V.P.Castro & Chiron	SCE	MG: Serras da Moeda e do Caraça
<i>H. longipes</i> (Rchb. F) V.P.Castro & Chiron	SCE	MG: Serras da Piedade, de Ouro Preto e do Caraça
Espécies Microendêmicas (ME)		
<i>D. kautskyi</i> (Pabst) Chiron & V.P.Castro	MES	ES: Domingos Martins
<i>H. blumensheinii</i> (Pabst) V.P.Castro & Chiron	MES	ES: Serra de Pequiá
<i>H. gloedeniana</i> (Hoehne) V.P.Castro & Chiron	MES	ES: Cachoeira do Itapemirim
<i>H. macrobulbosa</i> (Pabst) H.G.Jones	MES	ES: Serra do Forno Grande
<i>H. muchowiana</i> (F.E.L.Miranda) V.P.Castro & Chiron	MES	ES: Baixo Guandu
<i>H. alvaroana</i> (F.E.L.Miranda) V.P.Castro & Chiron	MRJ	RJ: Casimiro de Abreu
<i>H. hispidula</i> (Pabst & Mello) V.P.Castro & Chiron	PDA	MG: Diamantina
<i>H. itambana</i> (Pabst) V.P.Castro & Chiron	PDA	MG: Pico do Itambé
<i>H. tereticaulis</i> (Hoehne) V.P.Castro & Chiron	PDA	MG: Diamantina
<i>H. verbooneni</i> (F.E.L.Miranda) V.P.Castro & Chiron	PDA	MG: Diamantina
<i>H. viridiflora</i> C.F. Verola & Semir	PDA	MG: Diamantina
<i>H. cardimii</i> (Pabst & Mello) V.P.Castro & Chiron	RSC	MG: Serra do Cipó
<i>H. duveeni</i> (Fowlie) V.P.Castro & Chiron	RSC	MG: Serra do Cipó
<i>H. gracilis</i> (Pabst) V.P.Castro & Chiron	RSC	MG: Serra do Cipó
<i>H. pendula</i> Mota & Viana	RSC	MG: Serra do Cipó
<i>H. liliputana</i> (Pabst) H.G.Jones	SCE	MG: Serra de Ouro Banco
<i>H. milleri</i> (Blumensch. ex Pabst) V.P.Castro & Chiron	SCE	MG: Serra da Moeda

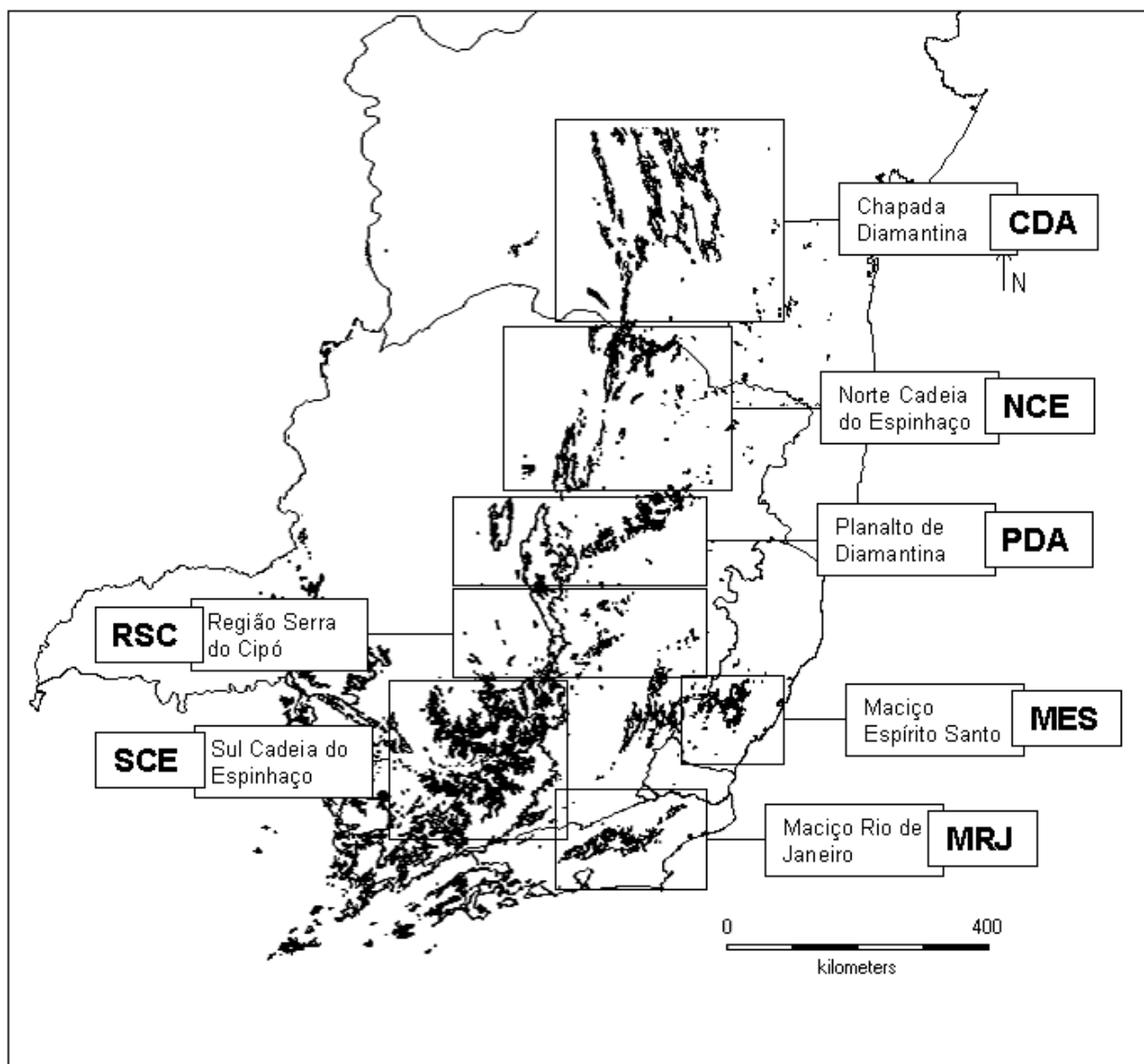


Figura 1. Complexos Rupestres de Altitude (CRA) divididos em sete meso-regiões geográficas: **CDA** – Região da Chapada Diamantina, **NCE** – Região Norte da Cadeia do Espinhaço, **PDA** – Região do Planalto de Diamantina, **RSC** – Região da Serra do Cipó, **SCE** – Região Sul da Cadeia do Espinhaço, **MRJ** – Região do Maciço do Rio de Janeiro e **MES** – Região do Maciço do Espírito Santo. Para efeito de comparação, as meso-regiões do Estado de Minas Gerais serão conglomeradas em unidades maiores, agrupadas em duas macro-regiões geográficas principais: **CNMG** – Centro Norte de Minas Gerais (NCE+PDA) e **CSMG** – Centro Sul de Minas Gerais (RSC+SCE). As manchas delimitam as regiões montanhosas acima de 1000 metros de altitude.

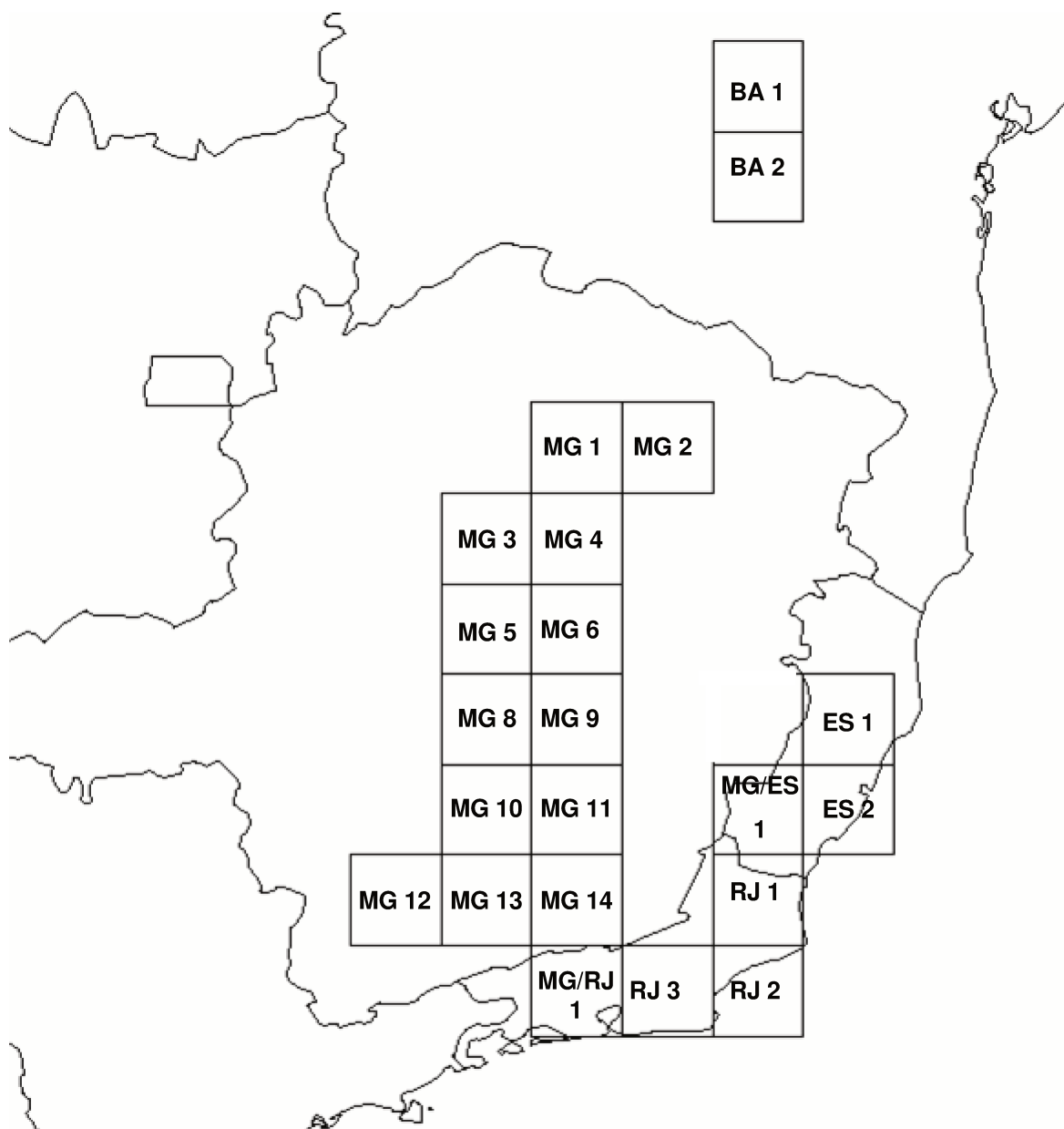


Figura 2. Mapa dos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia, mostrando as áreas de distribuição natural das espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungsia*. As áreas de distribuição geográfica das espécies estão divididas em 22 quadrículas iguais de 1 x 1 grau cada. As abreviaturas foram atribuídas levando em consideração a divisão política dos Estados.

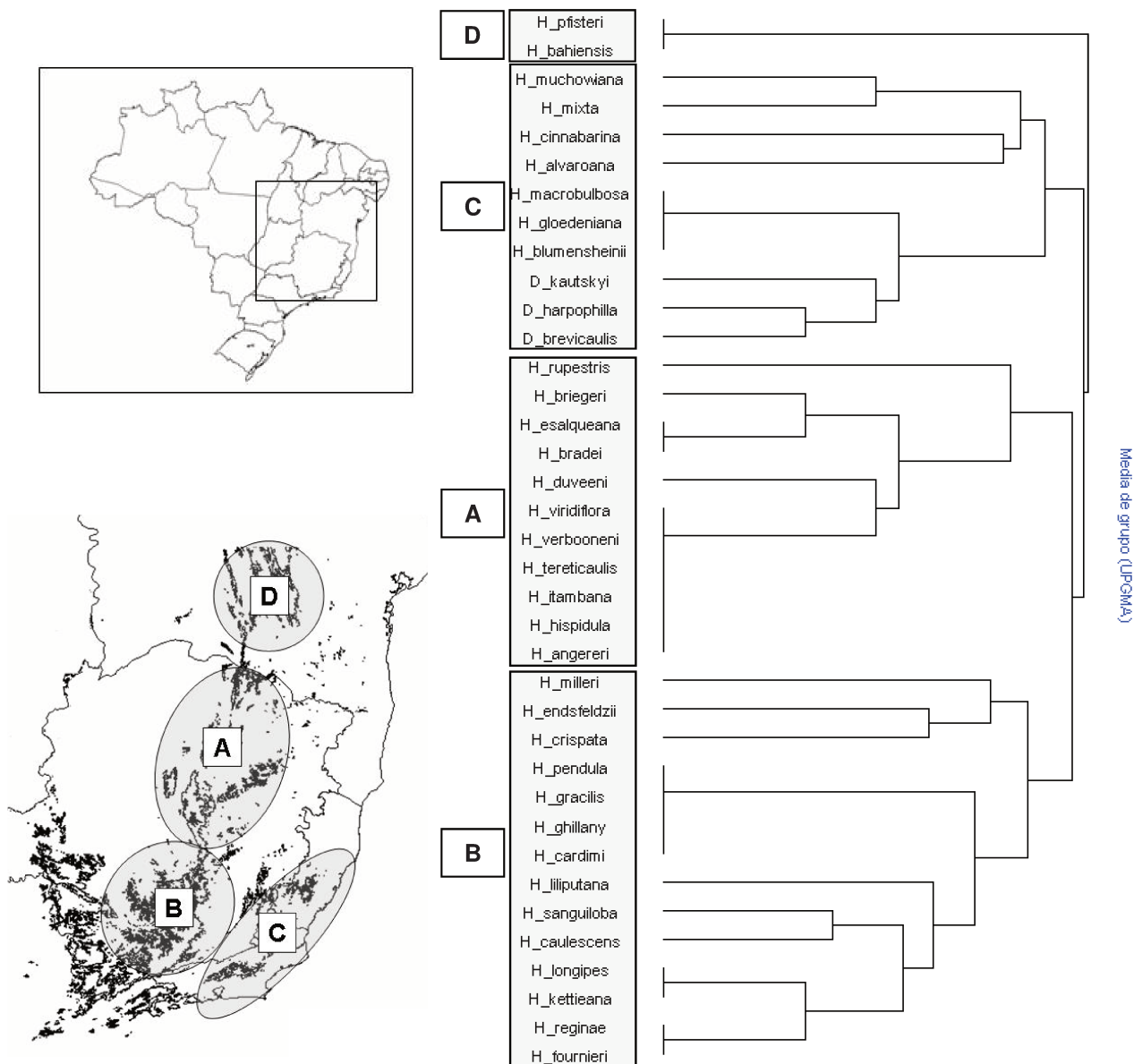


Figura 3. Dendrograma resultante da análise de similaridade baseada no Índice de Jaccard/UPGMA. Espécies do Centro-Norte de Minas Gerais (A); Centro-Sul de Minas Gerais (B); Maciços rochosos do Rio de Janeiro e Espírito Santo (C) e Chapada Diamantina (D).

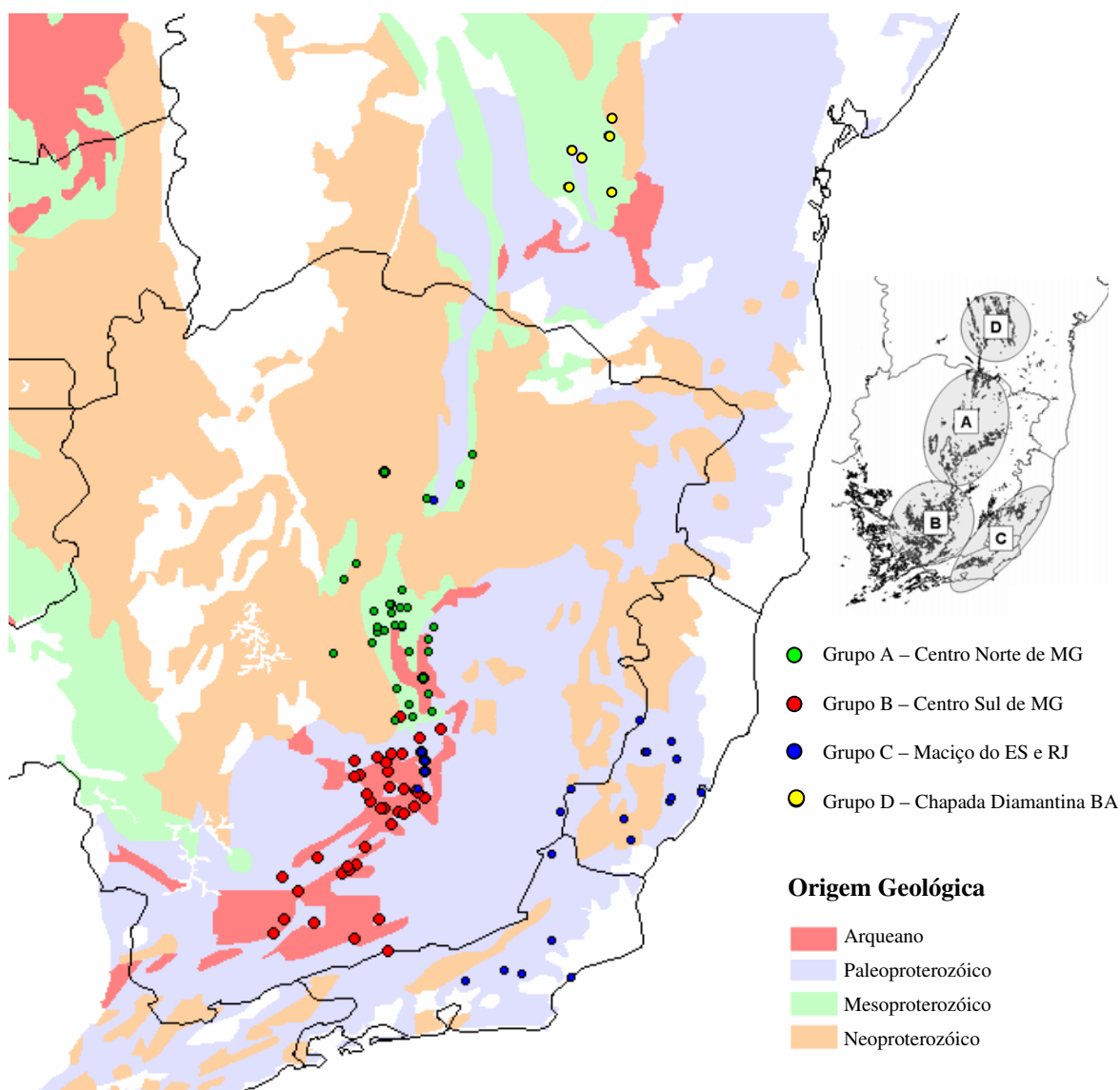


Figura 4. Origem geológica das áreas ocupadas pelos diferentes sub-conjuntos de espécies de *Hoffmannseggella* evidenciados pela análise de similaridade UPGMA. Arqueano=mais de 2500 milhões de anos (ma); Paleoproterozóico=2500-1600 ma; Mesoproterozóico=1600-1000 ma e Neoproterozóico=1000-540 ma.

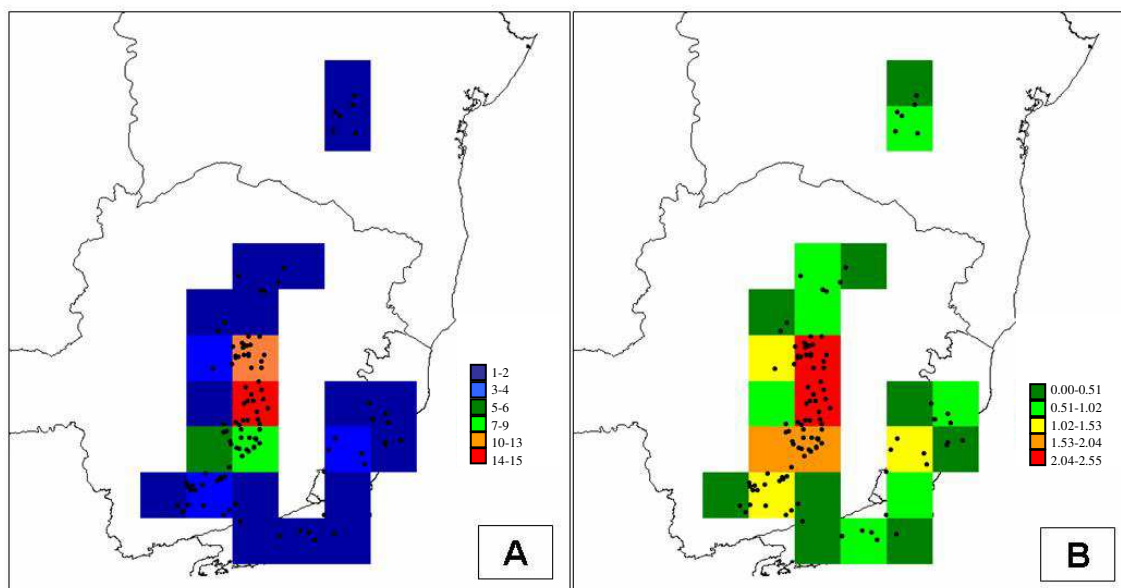


Figura 5. Distribuição da riqueza (A) e diversidade (B) das espécies de *Hoffmannseggella* nos complexos rupestres de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia.

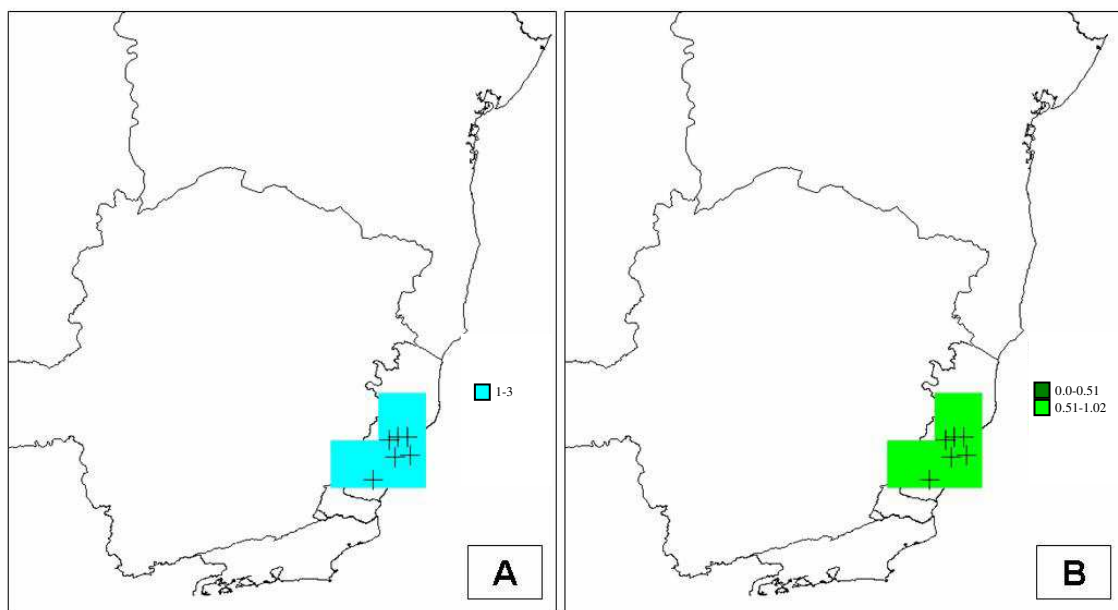


Figura 6. Distribuição da riqueza (A) e diversidade (B) das espécies de *Dungsia* no Espírito Santo.



Figura 7. Análise de PAE baseada em quadrículas de 1° x 1°. Árvore mais parcimoniosa derivada da análise de consenso (“Bootstrap”), dentre as 2840 árvores geradas pelo método TBR (Índice de Consistência = 0,74 e Índice de retenção = 0,72). Números acima dos ramos representam o nível de suporte da análise de “Bootstrap”. As áreas dentro das quadrículas cinzas, correspondem às áreas indicadas para conservação da diversidade total das espécies de *Hoffmannseggella* e *Dungsia*.

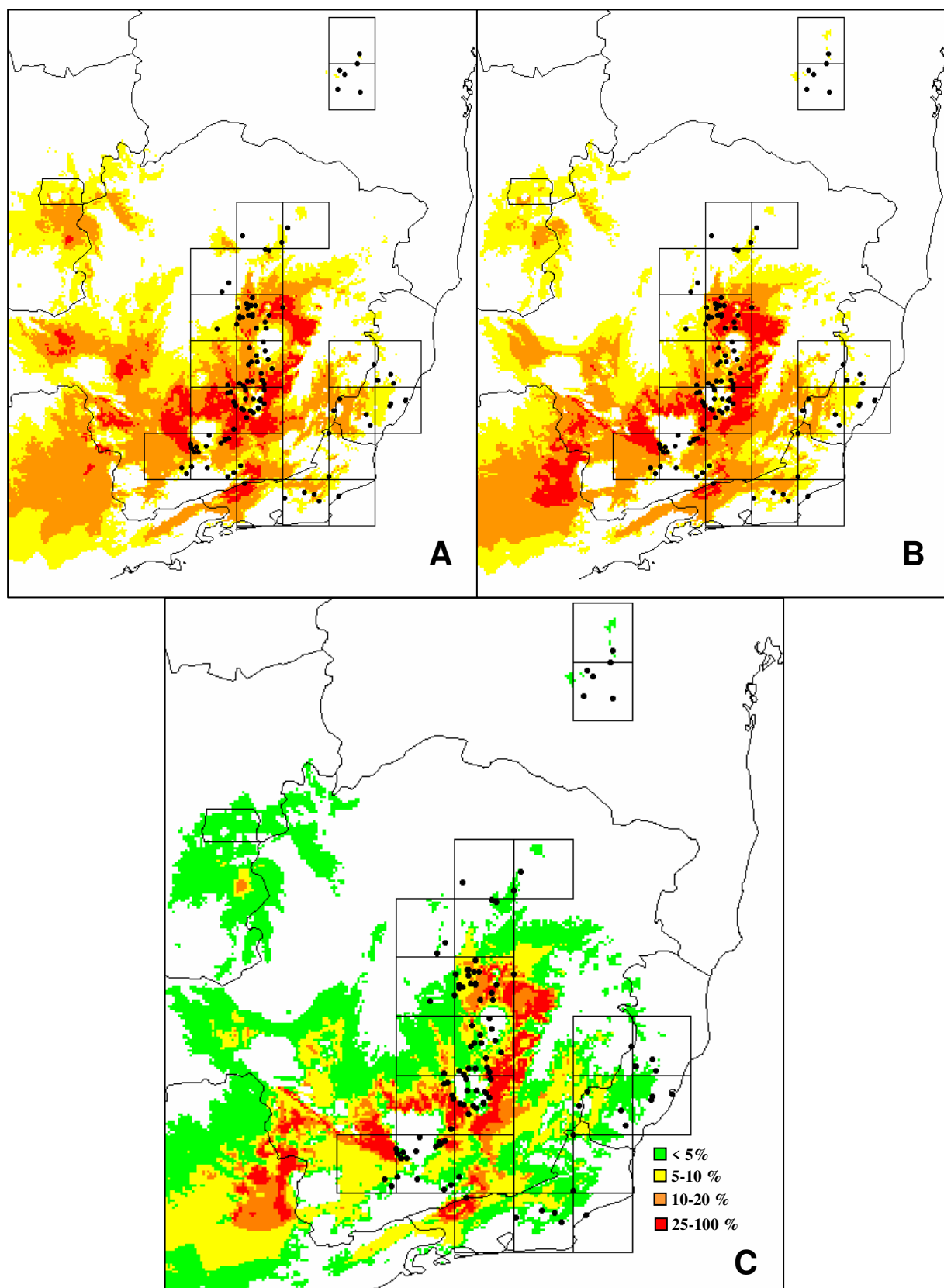


Figura 8. Distribuição potencial das espécies de *Hoffmannseggella* no Presente (A); Futuro (B) e distribuição concatenada Presente e Futuro (C).

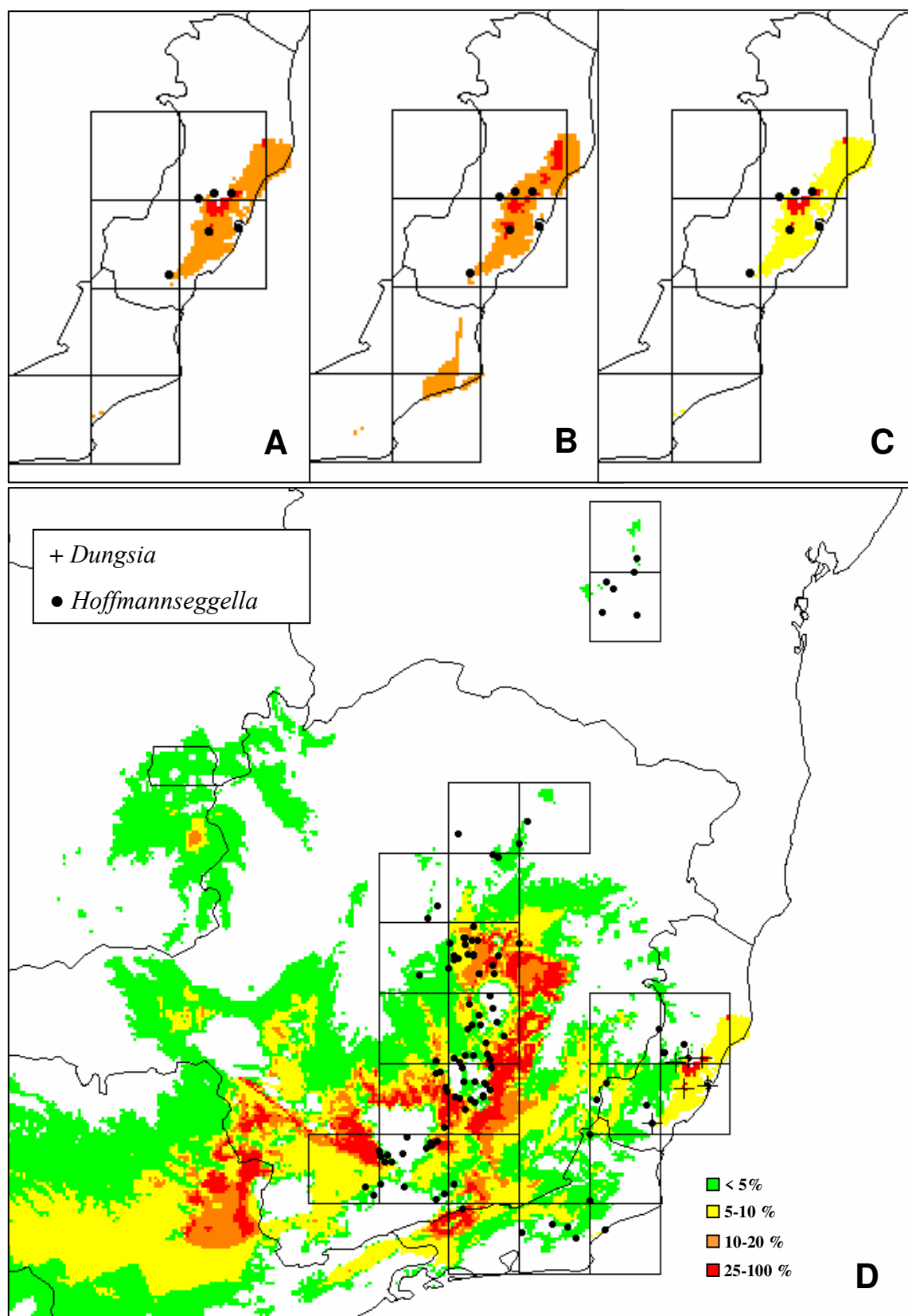


Figura 9. Distribuição potencial das espécies de *Dungsia* no Presente (A); Futuro (B); concatenado Presente e Futuro (C) e distribuição concatenada de *Hoffmannseggella* e *Dungsia*, no Presente e Futuro (D).

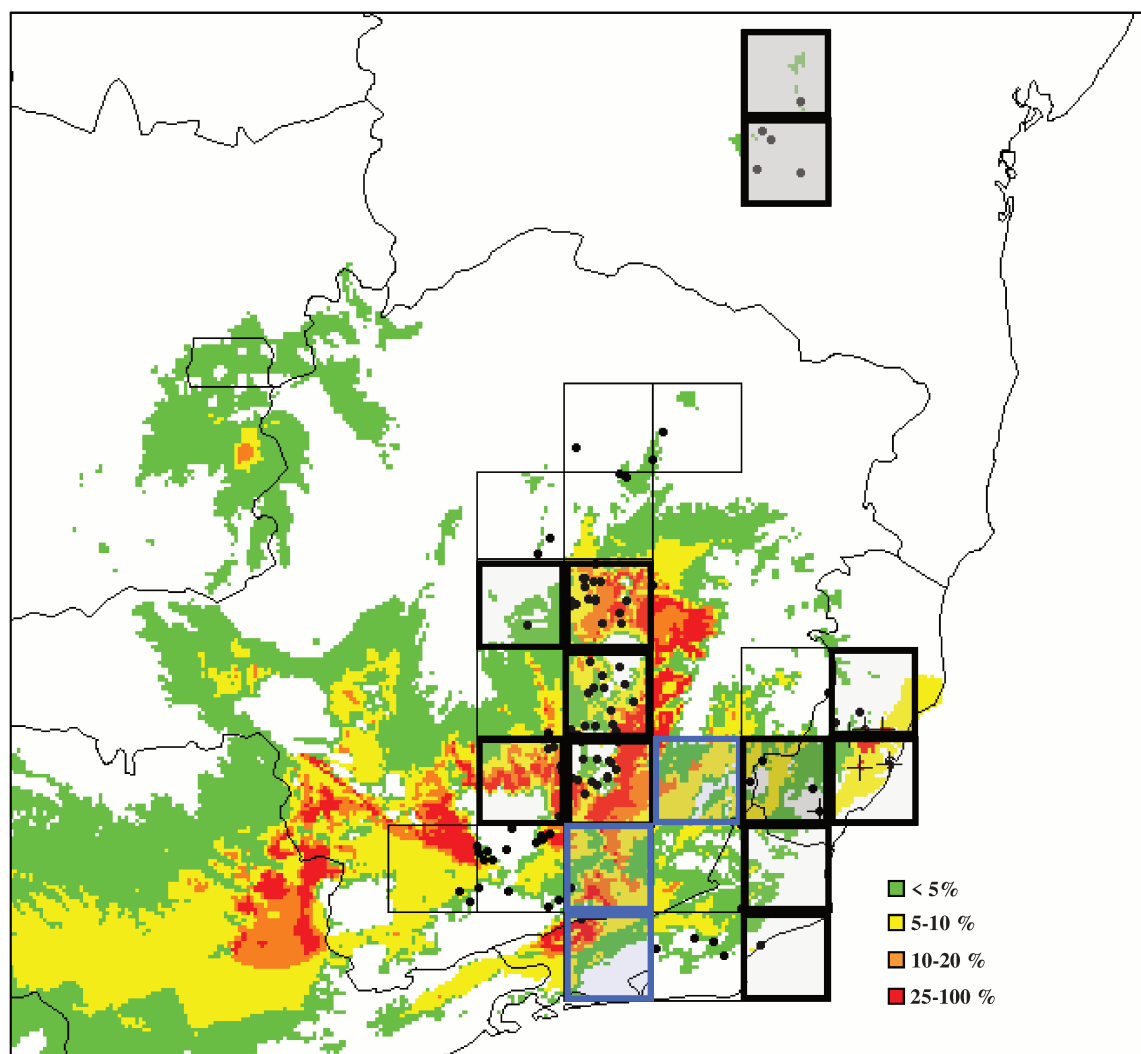


Figura 10. Distribuição potencial das espécies de *Dungsia* e *Hoffmannseggella*. Modelos concatenados Presente e Futuro. Quadrículas preenchidas de cinza, representam as áreas previstas como prioritárias pela Análise de PAE (Análise de Parcimônia). Quadrículas preenchidas de azul, representam as áreas complementares e adequadas para conectar as áreas previstas pela análise de PAE (corredores ecológicos).

Molecular dating and evolution in some genera of subtribus Laeliinae (Orchidaceae), with emphasis in *Hoffmannseggella* H. G. Jones and *Dungsia* V. P. Castro & Chiron.

Abstract: Phylogenetic research on Orchidaceae has been extraordinarily active over the past years. The familial interrelationship being sufficiently understood, questions about divergence times and origin of lineages are in focus. In this study we present an attempt to estimate the origin and derivation times of the Neotropical genera *Hoffmannseggella* and *Dungsia* lineages, based in ITS1 and ITS2 sequence data. These genera are one of the most derived inside *Laeliinae* subtribus with a geographic distribution exclusive to Brazil. From our analysis *Dungsia* diversification happened in the upper Miocene and *Hoffmannseggella* in Mio-Pliocene boundaries. The origin and diversification of these genera are discussed in a biogeographic perspective, with notes about multiple colonization and coalescent events linked to the Plio-Pleistocene climatic changes and main migration routes established in these eras.

Introduction

Among Angiosperms the Monocots circumscribe plants of worldwide distribution, being one group of extreme ecological and economic importance with high species diversity concentrated in tropical regions, as the orchids (Janssen & Bremer, 2004). Subtribus Laeliinae Benth. possess 43 genera and approximately 1470 epiphitic or rupicolous species with exclusive neotropical distribution (Dressler, 1993). In a recent work, Laeliinae was revised based on phylogenetic studies (Van Den Berg *et al.*, 2000), segregating the species of *Laelia* Lindl. in two principal genera: the true *Laelia*, encompassing Central American and Mexican species, and *Sophronitis* congregating all Brazilian species of *Laelia sensu lato* (Van Den Berg & Chase, 2000). However, the circumscription of all Brazilian species under the genus *Sophronitis* was not well accepted, for it is a conglomerate of species with great variation of morphology, habit and ecological requirements. Later, the Brazilian species were revised and segregated in four genera: *Hadrolaelia*, *Hoffmannseggella*, *Microlaelia* and *Dungsia* (Chiron & Castro Neto, 2002).

The Neotropical orchid genus *Hoffmannseggella* is one of the most ornamental genera within Laeliinae and distributed almost only in Southeastern Brazil, in a vegetation called “campos rupestres”. Especially Minas Gerais state represents the main center of diversity for plants characteristic of campos rupestres (Harley, 1995; Semir, 1991), including *Hoffmannseggella* (Blumenschein, 1960). Chiron & Castro (2002) recognized 32 species in the genus, but the number has now increased to 42 (Castro & Chiron, 2003; Chiron & Castro, 2005; Lacerda & Castro, 2005; Miranda & Lacerda, 2003; Mota *et al.*, 2003; Campacci, 2005; Miranda, 2005), including *H. viridiflora* (Verola & Semir, 2007). *Hoffmannseggella* is a taxonomically difficult genus because of morphological plasticity of the species and occurrence of hybridization (Blumenschein, 1960a, 1960b; Van den Berg *et al.*, 2000). Previous generic and specific treatments are conflicting (Chiron & Castro Neto, 2002; Jones, 1968; Pabst & Dungs, 1975; Schlechter, 1917; Van den Berg *et al.*, 2000; Van den Berg & Chase, 2000; Van den Berg, 2003; Withner, 1990).

Phylogenetic studies involving monocotyledons have received much interest in the last decades (Janssen & Bremer, 2004). On the other hand, studies based on molecular dating, mainly in monocots are scarce (Janssen & Bremer, 2004). The majority of available articles includes dating of general lineages of monocotyledons and use markers with different evolutive rate in the family level (Bremer, 2000; Bremer, 2002; Gvinish *et al.*, 2000; Janssen & Bremer, 2004; Wikström *et al.*, 2001; Vinnersten & Bremer, 2001). Investigations involving molecular dating

have received great attention in the last time, because of the great data availability generated with the phylogenetic studies (Vinnerten & Bremer, 2001). The main advantage of investigations involving molecular dating is the possibility of evolutive and biogeographic history assess of a particular group (Vinnerten & Bremer, 2001; Janssen & Bremer, 2004), allowing comparison to diverse groups.

One of the main problems that concern the trails of dating ages of Orchidaceae divergence is the complete absence of fossil availability for the branches calibration. However, the indirect calibration using closely related families to the Orchidaceae is being used with success (Janssen & Bremer, 2004). In accordance with results from Janssen & Bremer (2004), two very important families in tropical regions, Orchidaceae and Arecaceae, represent the oldest lineages among monocotyledons families, with an estimated origin in the beginning of Cretaceous around 111 myr. For a long time, the orchids have been considered a highly specialized group and with a relatively recent origin. Taking in consideration the results showed by Janssen & Bremer (2004), the evolutive history of Orchidaceae must be seen under another perspective, where the great diversity of species would not be, necessarily, result of fast and recent radiation as it was thought.

This is a first experiment to use molecular dating methods with a biogeographic viewpoint in a Neotropical group of Orchidaceae, having as main objective to establish the colonization, biogeography and evolutionary events in *Dungsia* and *Hoffmannseggella*.

Material and Methods

Taxon sampling

Since we aimed at dating the radiations within the clade comprised by *Hoffmannseggella* H.G. Jones with its closest relatives, an extra outgroup (*Lilium longiflorum*: Liliaceae) was used to determine the position of the root within the basal branch, but was subsequently excluded from rate calculations. The molecular matrix was based on two main areas of ribossomic *introns*, ITS 1 and ITS 2, subjected to higher mutation rates and that are generally used to detect divergency between closely related species. The species utilized in the analysis were chosen in accordance with the trees obtained by Van Den Berg *et al.* (2000), posteriorly accessed in the Genbank and included in the matrix. The nomenclature of *Hadrolaelia*, *Dungsia* and *Hoffmannseggella* genus follow Chiron & Castro Neto (2002) review.

Alignment

First we used ClustalX v1.81 (Thompson *et al.*, 1997) to sort the sequences by overall similarity. Gaps were then manually deleted and the sequences realigned with Mafft v. 5.64 (Katoh *et al.*, 2005). Indels were manually coded according to the principles specified by Andersson & Chase (2001).

Phylogenetic Analyses

In order to test congruency of results from different methods of phylogenetic inference, we performed our cladistic analyses using both PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 1999) and MrBayes 3.1 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Maximum likelihood methods (Felsenstein, 1981) such as bayesian inference, contrary to traditional parsimony analyses, usually yield a single most likely tree. Although the difference in likelihood scores to the next most likely tree might not be statistically significant, the method provides a way of objectively choosing one fully dichotomous tree among all others. MrBayes can also provide a “consensus” phylogram, in the sense that the branch lengths of the most likely tree are calculated based on their average length. This is particularly useful when dating lineages, since polytomies would otherwise indicate that radiations occurred simultaneously, an unrealistic assumption to make (Andersson, 2004).

Maximally parsimonious trees (MPTs) were found using the heuristic search algorithm in PAUP. Support was estimated using jackknife analysis (Farris, 1996). We ran 10000 replicates with 37% deletion, using random addition sequence (10 replicates), TBR branch swapping, saving 1 tree per replicate and using the other factory settings. We used MrModelTest 2.2 (Nylander, 2004) to find out which evolutionary model best fitted our data, out of 24 models of nucleotide substitution. The chosen model was then incorporated into a MrBayes block in the input file. We did two simultaneous runs of 1.500.000 generations each, sampling every 100 generations. We saved the branch lengths for every sampled tree and used the other default settings.

Molecular dating

Divergence times were estimated based on the consensus phylogram generated during the bayesian analysis. Since the number of substitutions along each branch was calculated on the

average values of 15.000 trees, we think that this may minimize the stochastic error that would be otherwise present if we chose to date a particular tree.

To test the hypothesis that the sequences evolved in a clocklike way, we performed a likelihood ratio (LR) test, comparing the scores of the ML tree with and without enforcing a molecular clock (Felsenstein, 1981; Sanderson, 1998). The LR was calculated as $2 (L_{\text{clock model}} - L_{\text{no clock model}})$ and was assumed to be distributed as a χ^2 with S-2 degrees of freedom, being S the number of taxa in the dataset (Nei & Kumar, 2000; Sanderson, 1998).

Divergence times were estimated using r8s program version 1.70 (Sanderson, 2002a). The number of restarts and the number of time guesses were set to five. We have chosen to use Nonparametric Rate Smoothing (NPRS) and Penalized Likelihood (PL) (Sanderson, 1997, 2002b) for our estimates. For the NPRS analysis, we used the Powell method for finding optima of objective functions, and in PL the Truncated Newton method was chosen, in accordance to recommendations of Sanderson (2004).

A critical point in phylogenetic dating is to calibrate the chronogram. Schmid & Schmid (1973) concluded that the Orchidaceae have no reliable fossil record, but considered a Pliocene fossil (Strauss, 1969) as the most plausible (Collinson *et al.*, 1993). Using a large data set for the monocots, Janssen & Bremer (2004) obtained a crown node age of 111 Myr for Orchidaceae. But according to them, this unexpected origin in the Early Cretaceous seems mostly due to a methodological bias, and this result should be interpreted with caution. Therefore, we have decided to use the results obtained by Wikström *et al.* (2001) and calibrate our chronogram by fixing the split between *Oncidium chrysomorphum* and *Cypripedium calceolus* at 35 Myr. The branch lengths used for this estimation were calculated using Maximum Likelihood, a procedure more consistent with our own methods than the *Acctran* and *Deltran* utilized by Wikström *et al.* (2001).

Results

The total number of characters in the matrix was 721, of which only 1 gap code. Out of 418 variable characters 164 were parsimony informative. Both the Hierarchical likelihood ratio test and the Akaike information criterion implemented in the MrModelTest software choose the GTR+G evolutionary model. Figure 1 shows the topology of the most likely tree for the complete data set, using bayesian inference. A thick-lined branch means that the branch was also

present in the majority-rule consensus of the jack-knife analysis. Numbers above branches indicate the posterior probability of the clade. Numbers below branches show jack-knife support values, whenever applicable. In the following, support will be referred to as strong for a posterior probability ≥ 0.91 or jack-knife support ≥ 88 . These values have been shown to represent minimal values required for a 95% confidence interval of a node (Zander, 2004). Other arbitrarily defined intervals of jack-knife support values will be referred to as moderate (76%-87%), weak (63%-75%) and ambiguous (<63%). There was no conflict between the results generated by the parsimony and maximum likelihood analyses, in the sense that there were no clades that were strongly supported in one analysis but not in the other. When describing and discussing elements of the tree, we will depart from topologically more extant taxa and successively move inwards.

All runs in r8s using PL failed in the cross-validation process, required to find the best smoothing value specific to the data set. According to the error messages, the failures were due to the shortness of several branches. Figure 2 shows therefore only the chronogram obtained using NPRS. All nodes are scaled proportional to their ages as estimated under the bayesian analysis. Node numbers refer to Table 1. The age of the root, fixed at 35 Myr, and the age separating *Oncidium* from the ingroup (16.27 Myr) are not shown, since their major roll in the analysis was to calibrate the chronogram. The time scale used is that from Gradstein *et al.* (2004).

Geographic distribution and branches origin

Species distributed mainly in Central America

In accordance with Bayesian analysis and molecular chronogram, the sister species of every other considered in this work is *Myrmecophila wendlandii* (Rchb. f.) G.C.Kenn, with estimated origin in about 9.2 Myr. In present times this species is distributed in Honduras and Nicaragua, in altitudes that vary from 350 –1.100 meters.

Cattleya bowringiana Veitch is distributed in Southern of Central America with populations in Belize, Guatemala and Honduras, between 250 and 900 meters.

Brassavola nodosa (L.) Lindl. is one of species with widest distribution in Belize, Costa Rica, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua and Panama, reaching the extreme north of South America, with few populations in Colombia, Equador and Venezuela. Most of populations occur

at 0 – 800 meters, usually can be found in places at 250 meter.

Cattleya dowiana Batem. is distributed mainly in Costa Rica and Panama, between 250 and 500 meters.

Rhyncolaelia digbyana (Lindl.) Schltr. is endemic to Honduras, in places with lower altitude, of 0 - 100 meters.

This species group, the Central American centered group, has its origin at the final of Miocene, between 9.16 to 7.8 Myr. The results of dating branches and principal ages of divergence see Table 1.

Species with South American distribution

Cattleya nobilior Rchb.f. occurs mainly in Bolivia, between 600 – 650 meters. This branch has its origin in the Miocene, about 9.18 Myr.

Species with exclusive Brazilian distribution

Dungsia harpophylla (Rchb.f.) Chiron & V.P. Castro e *D. kautskyi* (Pabst) Chiron & V.P. Castro are both endemic to Espírito Santo state and occur in places with variable altitudes between 600 and 800 meters.

Hadrolaelia coccinea (Lindley) Chiron & V.P. Castro has one of widest distributed in mountain regions of Brazil, occurring in the states of Rio de Janeiro (Serra dos Órgãos), Espírito Santo, Minas Gerais (Serra da Mantiqueira), São Paulo (Serra do Mar and Paranapiacaba) above 900 meters.

Hadrolaelia virens (Lindley) Chiron & V.P. Castro has a restrict distribution in Rio de Janeiro, Serra dos Órgãos, between 300 and 600 meters.

Hadrolaelia jongheana (Rchb.f.) Chiron & V.P. Castro occurs in some places of Minas Gerais, specifically in Itabira and Diamantina municipalities, in altitudes of 300 – 500 meters.

The species of *Hoffmannseggella* H.G. Jones are distributed mainly in the Espinhaço range of Minas Gerais, reaching the states of Bahia, Rio de Janeiro and Espírito Santo, always associated to rock field above of 900 meters. For complete description of distribution patterns of these species see Chapter 1.

This species group has its origin in the Miocene, about 6.16 Myr, with posterior diversification in the early Pliocene (5.37 Myr) and Pleistocene (Table 1).

Discussion

The results of this work reinforce the origin of this species group in the Miocene (9.16 Myr), related to components of Laurasic flora, probably in a region that today correspond to Central America (Raven & Axelrod, 1974). In accordance with Van Den Berg *et al.* (2000), the Laeliinae species would have originated in Central America with later South American colonization.

The results, which are based on distribution areas and divergency epochs of the Laeliinae species analysed, are in accordance with a general model in that Orchidaceae would have arrived South America in the Tertiary (Brieger, 1960, 1969, 1971; Braga, 1987). In this way, the basal lineages in the resulting tree (Figure 2), would have originated locally in the Central America and be confined to this region because of geographical barriers at the time. The rising epoch and derivation of this group, between 9.16 and 7.8 Myr, showed the retention of this group in Central America, probably due to dispersion impossibility to South America. In that time, the greatest barrier for the dispersion was the isolation of South and North America, from each other because of the union of the Pacific and Atlantic Oceans through a deep sea in the area of Panama and Southern Mexico.

Burnham & Grahman (1999) consider the Isthmus of Panama formation of particular biogeographic importance for the interchange of flora and fauna between South and North America. In about 7 to 6 Myr ago there was the “Proto-Central America” formation, an oceanic island group, relatively close, formed a “partial” inter continental link that cause the partial containment between the Pacific and Atlantic seas. Complet formation of the Panama Isthmus only has occurred approximately ground 3.5 – 3.1 Myr (Coates & Obando, 1996).

The independent origin of South American lineages of *Hoffmannseggella*, *Dungisia* and *Hadrolaelia* from the Central American group at 6.16 Myr ago, evidences the colonization made possible by those the “Proto-Central American” islands to reach South America by dispersion events.

In general the Orchidaceae is known by the potential to have long distance dispersion, made possible by the dusty seeds without endosperm, easily carried by the wind (Dressler, 1981, 1993). Garay (1964) in relation to the orchids, admitted that transoceanic transposition happens at dispersal by “leaps” where oceanic islands function as real “stepping stones” for the colonization of far areas. Long distance dispersion in Orchidaceae has been observed by some other authors too (Ridley, 1930; Sanford, 1974a).

The origin of Neotropical groups from the extinct boreotropical forest taxa and with occurrence in an extensive band in the Southern of Laurasic continent (Burnham & Johnson, 2004), was described in details by Lavin & Luckow (1993). Recent papers with combined phylogenies, molecular dating and biogeographic analyses (*i.e.*, Antonelli & Sanmartín, *unpubl. res.*; Richardson *et al.*, 2004; Chanderbali *et al.*, 2001), show that this route seems to provide the best explanation for the dispersion and posterior radiation of groups with crescent diversity in Neotropical regions.

Barros (1998) through distribution analyses of Campos Rupestres orchids, found some probable migration routes for these species. In general these species would have reached the Brazilian campos rupestres through distinct environments. The largely distributed species generally are associated with forested environment and periamazonic distribution. Other groups besides orchids show this same distribution pattern. De Granville (1988) made reference to several others species with a same distribution pattern associated with mountain tops, low montane forests and nebular forests, reinforcing the idea that the forest elements tend to be relatively continuous and so are an excellent migration corridor for species migration.

Barros (1998) calls attention to an uncommon distribution type the “groups with extention to the southern of South America” and the existence of a link between elements of the campos rupestres and the vegetation of the Southern American vegetation type. Rizzini (1979) treats jointly the “campos sulinos” and the “campos limpos” of central Brazil (which corresponds to campos rupestres) based mainly on the physiognomy. In turn, Oliveira-Filho & Ratter (1995) grouped the semideciduous montane forests of Minas Gerais with the semideciduous montane forests of Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul and Argentina. Ledru *et al.* (1998) in palinological studies, show that the vegetation of Central, Southeastern and Southern Brazil suffered great retractions and expansions in glacial (dry) and interglacial (wet) periods. This fact opens the possibility of past linking and interchanges between the field flora components of the campos rupestres and Southeastern-South flora in the past.

A third pattern detected by Barros (1998) is the disjunction between orchid genera like *Constantia* and *Pseudolaelia*, typically found in the Campos Rupestres of Espinhaço Range and Mantiqueira Range of Minas Gerais and Órgãos Range in the Rio de Janeiro. The same pattern was detected in other monocots groups as Velloziaceae (Pirani *et al.*, 1994) and Bromeliaceae (Martinelli & Vaz, 1986, 1988) showing that these areas could be connected in recent past times. The *Hoffmannseggella* species show the same disjoined pattern (Chapter 1).

Brunham & Grahan (1999) indicated that in the upper Miocene periods had most retraction and expansion of vegetation along the east face of the Andean region. These modifications are related to global cooling and Andes uplift. In accordance with molecular dating, *Hoffmannseggella* species have occupied first the Minas Gerais Campos Rupestres (Espinhaço Range), afterwards the granitic (gneiss) bulks of Rio de Janeiro and Espírito Santo, and finally the Campos Rupestres of Bahia (Chapada Diamantina) (Figure 3).

Today the *Hoffmannseggella* species are distributed in outcrops of granite (RJ, ES) and quartzite (MG, BA) always above of 900 meters of altitude, with a high diversity level found in the central region of Minas Gerais (Chaptes 1). The retraction and expansion events of high altitudinal vegetational complexes, would conect these areas in the Plio-Pleistocene boundary, making possible the connection and interchange between the field floral elements through vertical-horizontal lines. This process was called by Stebbins (1984, 1985) of “secondary contact model” and has been invoked to explain cyclic fragmentation and expansion of populations during the Pleistocene, and documented in several genera, including *Cerastium*, *Draba*, *Parnassia*, *Saxifraga*, *Vaccinium*, *Senecio* (Abbott & Brochmann, 2003; Brochmann *et al.*, 2004; Guggisberg *et al.*, 2006; Suda *et al.*, 2007) and the orchid genus *Dactylorhiza* (Pedersen, 2006; Hédren *et al.*, 2007).

This fact is easily visualized plotting lower altitudinal quotas (800 mts – campos rupestres during glaciation events) in contrast with higher altitudinal quotas (1000 mts – campos rupestres during interglaciation events), highlighting the migration corridors between rock outcrops during the expansion of campos rupestres vegetation (Fig. 4A-B). This flora displacement through vertical-horizontal lines is being studied in detail in others Brazilian formations as Mantiqueira Range and their conexions with neighboring Southeastern formations (to review see Safford, 2007).

The speciation models showed here are in accordance with the autochthonous models proposed for the campos rupestres, caused by population isolation, vicariance events in “islands of rocky outcrops” (Pirani *et al.*, 1994; Alves & Kolbek, 1994; Semir, 1991; Giulietti *et al.*, 1987, 1997) and posterior hybridation and introgression proposed by Blumenschein (1960) and Brieger (1960).

Literature Cited

- Abbott, R.J. & Brochmann, C. 2003. History and evolution of the arctic flora: in the footsteps of Eric Hultén. *Molecular Ecology* **12**: 299–313.
- Alves, R.J.V & Kolbek, J. 1994. Plant species endemism in savanna vegetation on table mountains (Campo Rupestre) in Brazil. *Vegetatio* **113**:125-139.
- Andersson, L. & Chase M.W. 2001. Phylogeny and classification of Marantaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **135**: 275–287.
- Antonelli, A. & Sanmartín, I. (submitted) The impact of the Andean uplift on lowland Amazonian taxa: a case study of the temporal and spatial evolution in tribes Cinchoneae and Isertieae (Rubiaceae). *Journal of Biogeography*
- Barros, F. 1998. **Análise Multivariada da Distribuição Geográfica de Espécies de Orquídeas dos Campos Rupestres do Brasil**. Phd. Thesis. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 206pp.
- Blumenschein, A. 1960a. **Estudos sobre a Evolução no subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae)**. Tese apresentada para obtenção do título de Livre Docente da Cadeira de Citologia e Genética Geral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 54pp.
- Blumenschein, A. 1960b. Número de cromossomas de algumas espécies de orquídeas. *Publicações Científicas do Instituto de Genética / Esalq / USP* **1**: 45-50
- Braga, P.I.S. 1987. Orquídeas – Entrada e dispersão na Amazônia. *Ciência Hoje* **5**: 44-51.
- Bremer, K. 2000. Early Cretaceous lineages of monocot flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**: 4707–4711.
- Bremer, K. 2002. Gondwanan evolution of the grass alliance of families (Poales). *Evolution* **56**: 1374–1387.
- Brieger, F.G. 1960. **The Report of the Third World Orchid Conference**. Geographic Distribution and Phylogeny of Orchids. pp. 328-333.
- Brieger, F.G. 1969. Contribuições à filogenia das Epidendrinae (Orchidaceae). *Ciência e Cultura* **21**:296-297
- Brieger, F.G. 1971. Conclusões paleogeográficas e paleoclimáticas baseadas na evolução filogenética e distribuição geográfica de plantas tropicais. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **43**: 197-200.
- Brochmann, C., Brysting, A.K., Alsos, I.G., Borgen, L., Grundt, H.H., Scheen, A.C. & Elven, R. 2004. Polyploidy in arctic plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 521–536.
- Burnham, R.J & Graham, A. 1999. The History of Neotropical Vegetation: New Developments and Status. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **89**: 546-589.
- Burnham, R.J. & Johnson, K.R. 2004 South American palaeobotany and the origins of neotropical rainforests. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **359**: 1595-1610.
- Campacci, M.A. 2005. Duas novas espécies de orquídeas do Brasil. *Boletim C.A.O.B.* **57**: 24-31.
- Castro, V.P. & Chiron, G.R. 2003. Une nouvelle espèce d'*Hoffmannseggella* (ORCHIDACEAE) du Brésil. *Richardiana* **3**: 64-68.
- Chanderbali, A.S., Van der Werff, H. & Renner, S.S. 2001. Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear genome. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **88**:104-134.
- Chiron, G.R. & Castro Neto, V.P. 2002. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley. *Richardiana* **2**: 4-28.
- Coates, A.G. & Obando, J.A. 1996. **Evolution and environment in tropical America**. The geologic evolution of the Central American Isthmus. Ed. J.B.C. Jackson, A.F. Budd & A.G. Coates, University of Chicago Press. pp 21-56.

- Collinson, M.E., Boulter, M.C. & Holmes, P.L. 1993. **The Fossil Record 2**. Magnoliophyta ('Angiospermae'). Ed M.J. Benton. Chapman & Hall, London.
- De Graville, J.J. 1988. Phytogeographical characteristics of the Guianan forests. *Taxon* **37**: 578-594.
- Dressler, R.L. 1981. **The orchids: natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Farris, J.S., Albert, V.A., Källersjö, M., Lipscomb, D. & Kluge, A.G. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* **12**: 99-124.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368-376.
- Garay, L.A. 1964. **Proceedings of the Fourth World Orchid Conference**. Evolutionary significance of geographical distribution of orchids. Straits Times Press, Singapore. pp. 170-187.
- Giulietti, A.M., Pirani, J.R. & Harley, R.M. 1997. **Centres of Plant Diversity. Vol. 3**. Espinhaço Range Region – Eastern Brazil. The Americas. Eds. Davis, S.D.; Heywood, V.H.; Herrera-Mac Bryde, O.; Villa-Lobos, J. & Hamilton, A.C.) The World Wild Found for Nature & The World Conservation Union, London. pp. 397-404.
- Giulietti, A.M., Menezes, N.L., Pirani, J.R., Meguro, M. & Wanderley, M.G. 1987. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Caracterização e lista de espécies. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* **9**: 1-151.
- Gradstein, F.M., Ogg, J.G., and Smith, A.G., Agterberg, F.P., Bleeker, W., Cooper, R.A., Davydov, V., Gibbard, P., Hinnov, L.A., House, M.R., Lourens, L., Luterbacher, H.P., McArthur, J., Melchin, M.J., Robb, L.J., Shergold, J., Villeneuve, M., Wardlaw, B.R., Ali, J., Brinkhuis, H., Hilgen, F.J., Hooker, J., Howarth, R.J., Knoll, A.H., Laskar, J., Monechi, S., Plumb, K.A., Powell, J., Raffi, I., Röhl, U., Sadler, P., Sanfilippo, A., Schmitz, B., Shackleton, N.J., Shields, G.A., Strauss, H., Van Dam, J., van Kolfschoten, T., Veizer, J. & Wilson, D. 2004. **A Geologic Time Scale 2004**. Cambridge University Press.
- Gvinish, T.J., Evans, T.M., Zjra, M.L., Patterson, T.B., Berry, P.E. & Sytsma, K.J. 2000. Molecular evolution, adaptative radiation and geographic diversification in the amphiatlantic family Rapataceae: evidence from *ndhF* sequences and morphology. *Evolution* **54**: 1915-1937.
- Guggisberg, A., Mansion, G., Kelso, S. & Conti, E. 2006. Evolution of biogeographic patterns, ploidy levels, and breeding systems in a diploid–polyploid species complex of *Primula*. *New Phytologist* 1-17 doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01722.x
- Harley, R.M. 1995. Introduction. Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina- Bahia, Brazil. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Hedrén, M., Norström, S., Hovmalm, H.A.P., Pedersen, H.A. & Hansson, S. 2007. Patterns of polyploid evolution in Greek marsh orchids (Dactylorhiza; Orchidaceae) as revealed by Allozymes, AFLPS, and Plastid DNA data. *American Journal of Botany* **94**: 1205–1218.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic. *Bioinformatics* **17**: 754-755.
- Janssen, T. & Bremer, K. 2004. The age of major monocot groups inferred from 800+ rbcL sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society* **146**: 385–398
- Jones, H.G. 1968. Studies in neotropical orchidology. *Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae* **14**: 63-70.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H. & Miyata, T. 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* **33**: 511-518.
- Lacerda, K.G. & Castro Neto, V.P. 2005. Deux nouveaux táxons de *Hoffmannseggella* du Minas Gerais (Brésil). *Richardiana* **5**: 15-25.

- Lavin, M. & Luckow, M. 1993. Origins and relationships of tropical North America in the context of the boreotropics hypothesis. *American Journal of Botany* **80**: 1-14.
- Ledru, M.P., Salgado-Laboriau, M.L. & Veneklaas, E.J. 1998. Vegetation dynamics in southern and central Brazil during the last 10.000 yr B.P. *Review of Palaeobotany and Palynology* **99**: 131-142.
- Martinelli, G. & Vaz, A.M.S.F. 1986/1988. Padrões fitogeográficos em Bromeliaceae dos campos de altitude da floresta pluvial costeira do Brasil, no Estado do Rio de Janeiro. *Rodriguésia* **64/66**: 3-10.
- Miranda, F. & Lacerda Jr., K.G. 2003. Studies in brazilian Laeliinae. Part 1. New species and natural hybrids in *Hoffmannseggella*. *Orchids* **72**: 848-857.
- Miranda, F. 2005. Studies in brazilian Laeliinae. Part 2. A new species in *Hoffmannseggella*. *Orchids* (West Palm Beach) **74**: 458-461.
- Mota, R.C., Viana, P.L. & Lacerda Jr., K.G. 2003. *Hoffmannseggella pendula*, une nouvelle espèce d'Orchidaceae du Brèsil. *Richardiana* **4**: 1-8.
- Nei, M. & Kumar, S. 2000. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford University Press.Oxford.
- Nylander, J.A.A. 2004. **MrModeltest v2**. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oliveira-Filho, A.T. & Ratter, J.A. 1995. A study of the origin of Central Brazilian forests by analysis of plant species distribution patterns. *Edinburgh Journal of Botany* **52**: 141-194.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1975. **Orchidaceae Brasiliensis, Vol. 1**. Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Pedersen, H.E. 2006. Systematics and evolution of the *Dactylorhiza romana/sambucina* polyploid complex (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **152**: 405-434.
- Pirani, J.R., Giuliatti, A.M., Mello-Silva, R. & Meguro, M. 1994. Checklist and patterns of geographical distribution of the vegetation of Serra do Ambrósio, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* **17**: 133-147.
- Raven, P.H. & Axelrod, D.I. 1974. Angiosperm biogeography and Past Continental Movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **61**:539-673.
- Richardson, J.E., Chatrou, L.W., Mols, J.B., Erkens, R.H.J. & Pirie, M.D. 2004. Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **359**: 1495-1508.
- Ridley, H.N. 1930. **The dispersal of Plants Throughout the World**. Reeve L. & Co. London. 744p.
- Rizzini, C.T. 1979. **Tratado de Fitogeografia do Brasil. Vol.2**. Aspectos Sociológicos e Florísticos. São Paulo, Hucitec & Editora da Universidade de São Paulo. 374 p.
- Safford, H.D. 2007. Brazilian Páramos IV. Phytogeography of the campos de altitude. *Journal of Biogeography* **17**: 1-22.
- Sanderson, M.J. 1997. A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Molecular Biology and Evolution* **14**: 1218-1231.
- Sanderson, M.J. 1998. **Molecular systematics of plants II: Dna sequencing**. Estimating rates and time in molecular phylogenies: beyond the molecular clock? Eds. D.E. Soltis, P.S. Soltis, and J.J. Doyle, Kluwer AP, Boston. Pages 242-264
- Sanderson, M.J. 2002a. **r8s version 1.70**. Software available at <http://ginger.ucdavis.edu/r8s/index.html>.
- Sanderson, M.J. 2002b. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 101-109.
- Sanderson, M.J. 2004. **r8s Version 1.70, User's manual**. Available at <http://ginger.ucdavis.edu/r8s/>
- Sanford, W.W. 1974a. **The Orchids: Scientific Studies**. The ecology of the Orchids. Ed. Withner, C.L., John Wiley & Sons, New York. Pp. 1-100.

- Schlechter, R. 1917. Die Einteilung der Gattung *Laelia* und die geographische Verbreitung ihrer Gruppen. *Orchis* **11**: 87-96.
- Schmid, R. & Schmid, M.J. 1973. Fossils attributed to the Orchidaceae. *American Orchid Society Bulletin* **42**: 17-27.
- Semir, J. 1991. Revisão Taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernonieae:Compositae). PhD. Thesys, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Strauss, A. 1969. Beiträge zur Kenntnis der Pliozanflora von Willershausen VII. Die angiospermen Früchte und Samen. *Argumenta Palaeobotanica* **3**: 163-197.
- Stebbins, G.L. 1984. Polyploidy and the distribution of the arctic-alpine flora: new evidence and a new approach. *Botanica Helvetica* **94**: 1-13.
- Stebbins, G.L. 1985. Polyploidy, hybridization, and the invasion of new habitats. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **72**: 824-832.
- Swofford, D.L. 1999. **PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods)**. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- Suda, J., Weiss-Schneeweiss, H., Tribsch, A., Schneeweiss, G.M., Trávníček, P. & Peter Schönschetter, P. 2007. Complex distribution patterns of di-, tetra-, and hexaploid cytotypes in the European high mountain plant *Senecio carniolicus* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **94**: 1391-1401.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**: 4876-4882.
- van den Berg, C. & Chase, M.W. 2000. Nomenclatural notes on Laeliinae-I. *Lindleyana* **15**: 115-119.
- van den Berg, C. 2003. Considerações sobre as ex-*Laelias* brasileiras, *Sophranitis* e outros gêneros. *Orchid News*, **20**.
- van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Arenas, M.A.S., Culham, A. & Chase, M.W. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spaces (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96-114.
- Verola, C.F. & Semir, J. 2007. *Hoffmannseggella viridiflora* (Orchidaceae, Laeliinae) a New species from Brazilian Campos Rupestres. *Novon* **17**: 125-129.
- Wikström, N., Savolainen, V. & Chase, M.W. 2001. Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society of London* **268**: 2211-2220.
- Vinnersten, A. & Bremer, K. 2001. Age and Biogeography of Major Clades in Liliales. *American Journal of Botany* **88**: 1695-1703.
- Withner, C.L. 1990. **The Cattleyas and their relatives Vol II: The Laelias**. Timber Press, Portland, Oregon. 154pp.
- Zander, R.H. 2004. Minimal values for reliability of bootstrap and jackknife proportions, decay index, and bayesian posterior probability. *Phyloinformatics* **2**: 1-13.

Table 1. Age of the nodes as shown in Figure 2.

Node	Age (Myr)	Node	Age (Myr)
1	9.16	21	1.90
2	8.38	22	1.99
3	8.05	23	1.41
4	7.85	24	1.48
5	6.16	25	2.94
6	5.37	26	1.59
7	4.92	27	0.39
8	4.25	28	1.37
9	3.61	29	4.79
10	3.37	30	4.18
11	2.76	31	3.70
12	2.07	32	3.07
13	1.85	33	1.86
14	1.50	34	0.84
15	1.13	35	3.33
16	0.86	36	2.44
17	1.23	37	1.43
18	0.62	38	7.23
19	0.28	39	6.18
20	2.43		

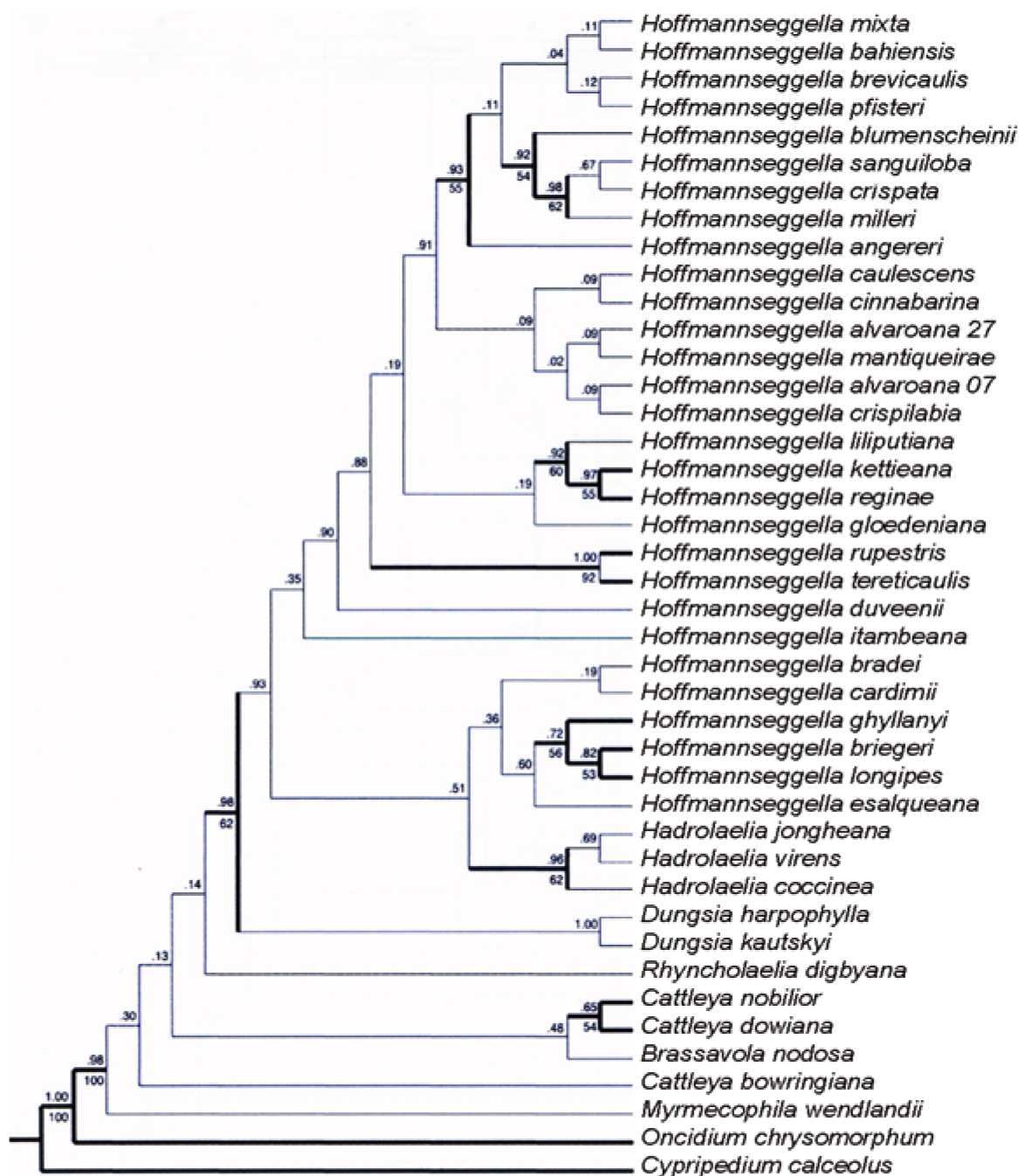


Figure 1. The most likely phylogenetic tree obtained using bayesian inference. A thick-lined branch indicate that the branch was also present in the majority-rule consensus of the jack-knife analysis. Numbers above branches indicate the posterior probability of the clade. Numbers below branches show jack-knife support values, whenever applicable.

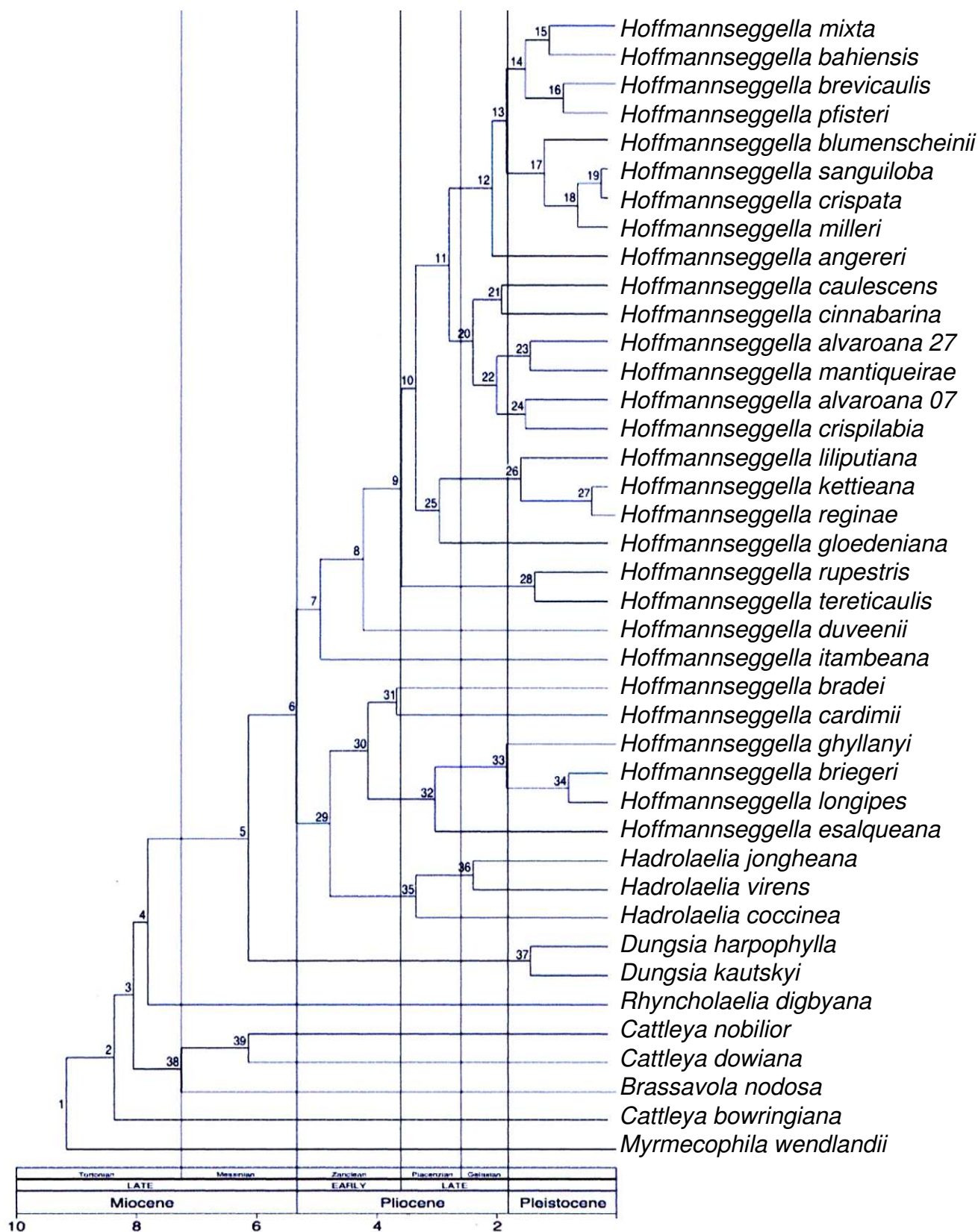


Figure 2. Chronogram with nodes scaled proportional to their ages as estimated under the bayesian analysis. Node numbers refer to Tab. 1. Time scale from Gradstein et al. (2004).

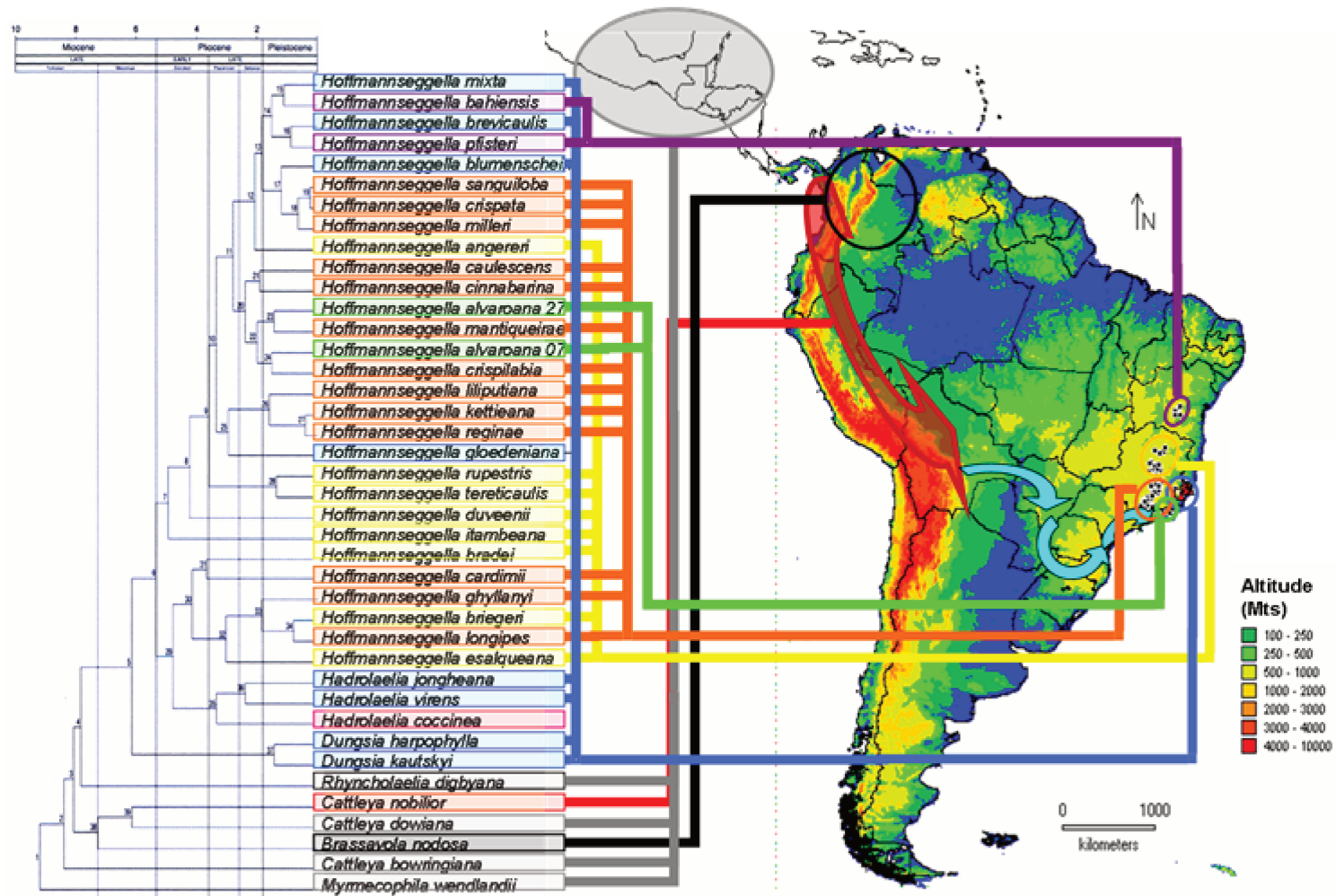


Figure 3. Chronogram with nodes scaled proportionally to their ages as estimated by the bayesian analysis. The areas and lines in grey represent the distribution areas and origin of basal lineages of cladogram. Long arrow with red colour=hipothetic route of ancestral Brazilian species. Arrows in blue=hipothetic migration route of *Hadrolaelia* species. Lines and circles show the occurrence of *Hoffmannseggella* and *Dungsia* species in accordance with phytogeographic real distribution. Orange colour=Southern of Minas Gerais species; Yellow colour=Northern of Minas Gerais species; Green=Rio de Janeiro species; Blue=Espírito Santo species and Violet=Bahia species.

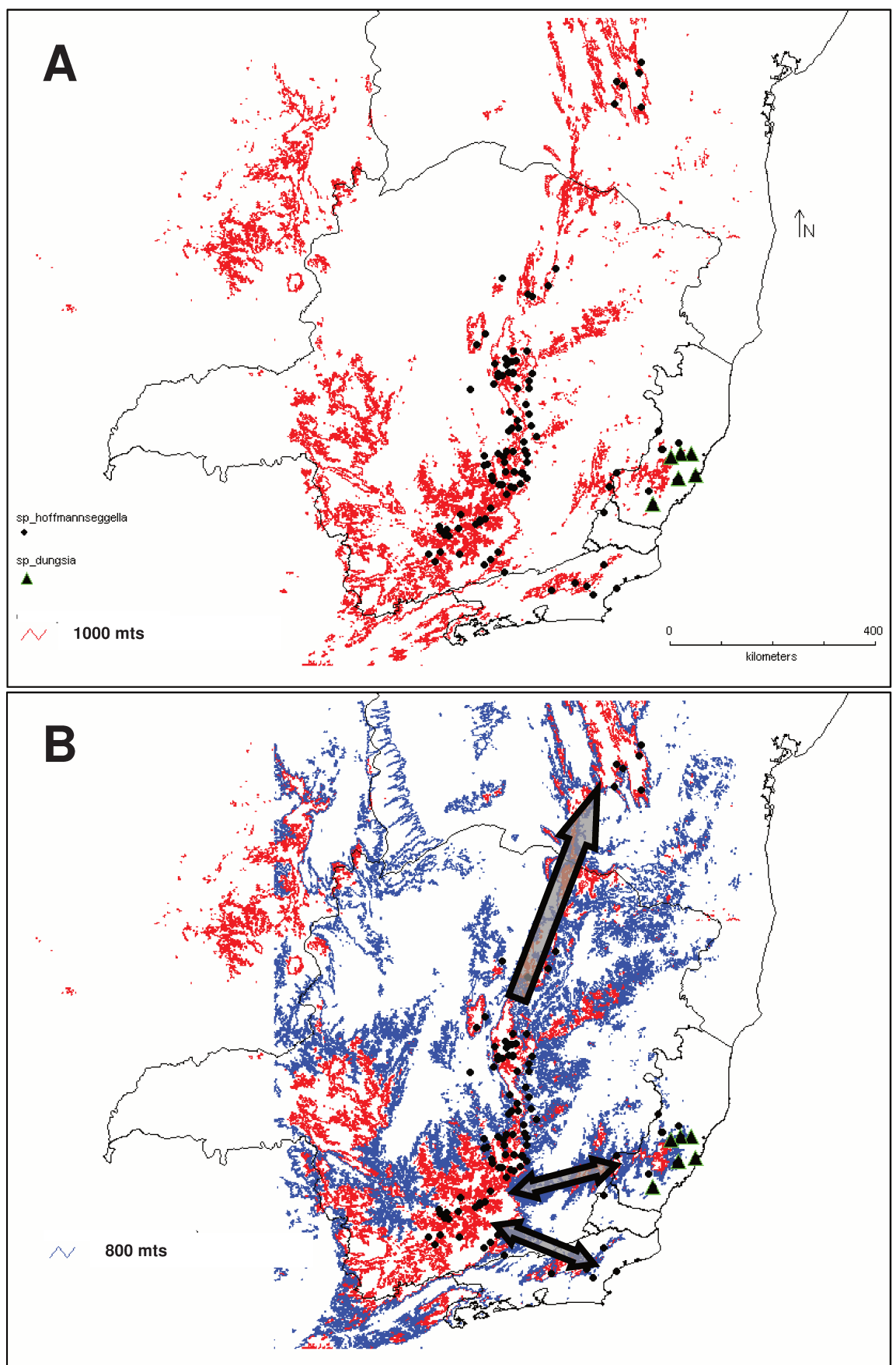


Figure 4. Distribution maps of *Hoffmannseggella* and *Dungsia* species. (A) Image shows the High Rocky Crops in the Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Bahia states. Red lines delimit isolated places higher than 1.000 meters; (B) Image shows hypothetical expansion routes of Brazilian Campos Rupestres vegetation in the cool and dry epochs. Blue lines delimit places with at least 800 meters of altitude. Wide arrows represent the probable migration and connection routes, and the putative direction of migration.

Biologia floral e ecologia da polinização em espécies de *Hoffmannseggella* H.G.Jones (Laeliinae:Orchidaceae) ocorrentes nos Campos Rupestres do Estado de Minas Gerais.

Resumo: Foram estudados a biologia floral, a ecologia da polinização e o potencial de hibridação em oito espécies do gênero *Hoffmannseggella* ocorrentes nos Campos Rupestres de Minas Gerais. Ao contrário das propostas anteriores, que consideravam *Hoffmannseggella* um gênero ornitófilo, todas as espécies são polinizadas por pequenas abelhas de diferentes famílias como Apidae (*Ceratini* sp.) e Halictidae (*Dialictus* sp. e *Augochlora* sp.). Além destes polinizadores, foi observada, em condições de cultivo, a remoção e a deposição de polínias por vespas do gênero *Mischocyttarus* (Hymenoptera:Vespidae). A grande diversidade de visitantes e polinizadores em *Hoffmannseggella* compromete as relações de especificidade, quebrando as barreiras de isolamento entre espécies sincronopátricas. As espécies estudadas são inter-compatíveis, com elevada taxa de viabilidade de sementes em cruzamentos inter-específicos, e apresentam barreiras mecânicas fracas para evitar a hibridização entre espécies sincronopátricas. O sistema de polinização em *Hoffmannseggella* é baseado no engano do polinizador, e ao que parece, utiliza um padrão floral típico e generalizado de flores melitófilas. A maioria das espécies apresenta mecanismos de autopolinização espontânea. Dois tipos diferentes de mecanismos de autogamia foram descritos, porém a maioria das espécies de *Hoffmannseggella* é auto-incompatível. A taxa de frutificação é baixa em todas as espécies e populações estudadas, devido aos polinizadores inconstantes e pouco frequentes. Baixo nível de frutificação é frequentemente observado em espécies de engano e parecem fazer parte de uma estratégia de sobrevivência a longo prazo, principalmente em espécies que vivem sob escassez de recursos, como observado em *Hoffmannseggella*.

Introdução

De distribuição cosmopolita, Orchidaceae representa uma das maiores famílias de Angiospermas, contando com aproximadamente 25.000 espécies (Dressler, 1981, 1993; Pijl & Dodson, 1966). De acordo com esses números, Orchidaceae é a maior família entre as monocotiledôneas, representando 7% das Angiospermas existentes (Pijl & Dodson, 1966).

O amplo padrão de variação morfológica em Orchidaceae tem sido facilitado por sua rápida evolução propiciada por características intrínsecas da família como: indivíduos perenes de vida longa, transferência do pólen em massas compactas (polínias) e produção de grande número de óvulos e sementes sem endosperma, facilitando a dispersão pelo vento a longas distâncias (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981, 1993).

A maioria das espécies de orquídeas tende a ser polinizada por uma ou poucas espécies de polinizadores (Dodson, 1962; Pijl & Dodson, 1966; Tremblay, 1992). Apesar de muitas vezes não apresentarem barreiras reprodutivas, tanto inter como intra-específica, adaptações morfológicas especiais a polinizadores específicos asseguram, na maioria das vezes, a polinização cruzada. Estes são considerados os fatores mais importantes no desenvolvimento e manutenção do grande número de espécies na família (Garay, 1960; Dodson, 1962; Pijl & Dodson, 1966; Faegri & Pijl, 1979). Por essa razão, vários autores como Dodson (1962), Dressler (1968, 1981, 1993) e Pijl & Dodson (1966) vêm enfatizando a importância de se conhecer a biologia reprodutiva das espécies de Orchidaceae, principalmente a polinização, para melhor entendimento dos padrões de variação e da evolução deste grupo e, partindo desses conhecimentos, elaborar um sistema de classificação mais natural para a família.

A subtribo Laeliinae Benth. é constituída por 43 gêneros e aproximadamente 1470 espécies, de plantas epífitas ou rupícolas distribuídas exclusivamente nos neotrópicos (Dressler, 1993) e constitui um dos melhores exemplos de radiação adaptativa em Orchidaceae, uma vez que neste grupo são encontrados quase todos os tipos de polinizadores (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981). O gênero *Hoffmannseggella* com aproximadamente 42 espécies (Verola & Semir, 2007) é um grupo complexo do ponto de vista taxonômico, devido ao alto polimorfismo intra-específico, que propicia o aparecimento de indivíduos com características intermediárias e de difícil identificação (Barros, 1990).

Estudos filogenéticos indicam que *Hoffmannseggella* é um dos gêneros mais derivados de Laeliinae (van Den Berg *et al.*, 2000) e suas espécies ocupam exclusivamente áreas de campos

rupestres. As flores deste gênero apresentam características peculiares (Dressler, 1981), como a coloração do perianto (róseo, amarelo ou laranja, sem a presença de guias de néctar), morfologia floral (labelo em forma de tubo e a presença de câmaras nectaríferas na região do ovário) e o posicionamento das partes florais (labelo curvado para baixo ou horizontalmente) que indicariam se tratar de um grupo adaptado à ornitofilia (Pijl & Dodson, 1966).

A subtribo Laeliinae e outros grupos de orquídeas apresentam sistemas de polinização baseados no engano dos polinizadores (Dressler, 1981; Nilsson, 1992). Neste tipo de sistema, as flores mimetizam um modelo geral de flores que oferecem recompensa alimentar e, mais raramente, um modelo específico, atraindo os polinizadores. Abelhas são os principais polinizadores de flores de engano, e são responsáveis pela polinização de aproximadamente 60% das espécies de orquídeas (van der Pijl & Dodson 1966). A arquitetura geral das flores em muitos gêneros de Laeliinae é descrita por Dressler (1981) como flores do tipo goela. Neste tipo de flor o labelo recobre a coluna, e forma uma espécie de câmara, na qual os polinizadores têm de entrar completamente para procurar possíveis recursos florais, com conseqüente remoção das polínias, que são depositadas no dorso do animal.

De acordo com Dressler (1968), relações de polinização não específicas na família Orchidaceae normalmente não conduziriam à especiação. Por outro lado, relações específicas poderiam levar à especiação simpátrica. Neste último caso, a seleção natural poderia impor relações cada vez mais específicas entre as plantas e seus polinizadores, principalmente em espécies filogeneticamente próximas que estivessem ocorrendo juntas. Especiação baseada em relações de especificidade fornece um modelo melhor de especiação simpátrica do que constância floral pelo polinizador, a qual poderia ser quebrada se o número de flores fosse baixo, o que é esperado em uma espécie incipiente que surge por mutação (Dressler, 1968; Paulus & Gack, 1990).

Segundo Blumenschein (1960), o isolamento geográfico e a hibridação em áreas de sobreposição geográfica das espécies de *Hoffmannseggella* podem ser responsáveis pelo grande número de espécies no gênero. Devido à descontinuidade dos campos rupestres brasileiros, muitas espécies estão distribuídas em populações disjuntas, sendo que esta característica vem sendo freqüentemente citada como responsável pela grande diversidade e endemismos observados nesses ambientes.

Foram estudadas a biologia floral, a ecologia da polinização e o potencial de hibridação em oito espécies de *Hoffmannseggella*. Os principais objetivos deste trabalho foram: i-) investigar o possível caráter ornitófilo das espécies de *Hoffmannseggella*; ii-) determinar o mecanismo de polinização predominante no gênero; iii-) verificar a existência de relações de especificidade entre as espécies de *Hoffmannseggella* e seus polinizadores; iv-) avaliar o potencial de hibridação e a existência de barreiras de isolamento entre os pares de espécies sincronopátricas, e qual a importância destes mecanismos no estabelecimento de novas espécies.

Material e Métodos

Áreas de estudo

O trabalho foi desenvolvido em diferentes localidades de Minas Gerais (Tabelas 1 e 4), em áreas de campos rupestres. Campo rupestre é um tipo de vegetação de altitude que ocorre principalmente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás. Este tipo de formação é caracterizado por vegetação aberta, com plantas herbáceas crescendo em solos arenosos e pedregosos, com arbustos e subarbustos crescendo em “ilhas” de afloramentos rochosos de quartzito, arenito, gnaiss e canga (Joly, 1970; Giulietti & Pirani, 1988; Borba & Semir, 1998). O clima das áreas de ocorrência das populações estudadas é tipo Cwb segundo a classificação de Köppen (1948), caracterizado por clima mesotérmico entre 17-19°C, verões brandos e chuvosos que perduram por 7-8 meses e uma estação seca de 3-4 meses.

Observação de visitantes e polinizadores

Foram feitas observações naturalísticas em oito espécies: *Hoffmannseggella angereri*, *H. bradei*, *H. caulescens*, *H. crispata*, *H. fourrieri*, *H. ghillanyi*, *H. liliputana* e *H. rupestris* (Fig. 1 e Tabela 1). As observações da atividade dos visitantes florais foram realizadas em uma população de cada espécie, no intervalo entre as 6:00 e 18:00 h, durante 10 dias consecutivos, completando cerca de 120 horas de observação para cada espécie. No final de cada dia, as flores dos indivíduos do grupo de observação (indivíduo focal) foram marcadas e examinadas no outro dia para verificação de remoção e/ou deposição de polinários fora do período de observação. O material testemunho das espécies estudadas foi depositado no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC) (Tabela 1).

Os visitantes florais foram coletados e armazenados por via seca, e enviados para identificação por especialistas. Quando não foi possível a coleta, as características dos visitantes foram anotadas, com a maior fidelidade possível para identificação posterior. O material testemunho das espécies estudadas foi depositado no Museu de História Natural da UNICAMP (ZUEC).

Biologia floral e ecologia da polinização

A presença de nectários florais foi verificada através de cortes longitudinais nas flores de todas as espécies estudadas. Para verificar a existência de osmóforos, flores frescas foram submersas em uma solução de vermelho neutro 1% por uma hora, posteriormente lavadas com uma solução de ácido acético glacial 5% (Vogel, 1990). A presença de guias de néctar, que podem ser detectados pela presença de pigmentos (flavonóides) que absorvem luz ultravioleta foi verificada colocando flores frescas em vidros com uma atmosfera saturada de hidróxido de amônia por cinco minutos (Scogin *et al.*, 1997).

A taxa de frutificação das espécies observadas foi obtida através da contagem direta de frutos em desenvolvimento nas populações naturais. A taxa de remoção e deposição de polinários foi obtida por meio de coleta de flores em fenecimento de indivíduos marcados em campo, acondicionadas em vidros com FAA 50% e levadas para análise em laboratório. O número de polínias removidas e/ou depositadas foi estimado pela contagem direta da ocorrência destes eventos nas flores coletadas, com auxílio de estereomicroscópio.

Além da coleta de material para estimativas relacionadas à taxa de frutificação e de remoção/deposição de polinários, nas populações focais, foi coletado material de outras populações das mesmas espécies para verificar a existência de variações destes parâmetros entre populações (Tabela 2).

Fenologia de floração e distribuição geográfica

Os dados referentes à fenologia de floração e à distribuição geográfica das espécies estudadas foram obtidos através de acompanhamento das populações naturais e em casa de vegetação, bem como pelo levantamento de informações em herbários nacionais (UEC, BHCB,

ESA, ESAL, HB, HXBH, MBML, R, RB, SP e SPF). Estes dados foram compilados para verificar a existências de sobreposição geográfica e/ou fenológica entre as espécies.

Resultados

Biologia floral e atrativos

Os dados sobre a biologia floral e atrativos florais das espécies estudadas estão resumidos na Tabela 3.

De forma geral, o número de inflorescências por indivíduo, número de flores por inflorescência e o número de flores disponíveis ao dia foi maior em *H. crispata* (Tabela 3). O tempo de duração de uma flor, entre a abertura e fenecimento, variou entre as espécies estudadas, porém foi maior em *H. liliputana* (cerca de 10 dias) (Tabela 3). O horário de antese variou entre as espécies e ocorreu mais cedo em *H. angereri* (entre 7:00 e 10:00 h) e mais tarde em *H. rupestris* (entre 11:00 e 14:00h). A antese floral ocorreu, na maioria das espécies, de maneira sequencial centrípeta, da base para o ápice da raque, com exceção de *H. rupestris* que apresenta antese sequencial centrífuga, do ápice para a base da raque (Tabela 3). De todas as espécies estudadas, somente alguns poucos indivíduos dentro das populações de *H. bradei* e *H. ghillanyi*, produziram odores perceptíveis, a qual ocorreu ao longo do dia todo, sem um pico de produção em horário específico (Tabela 3). Nenhuma das espécies produziu néctar. Em relação aos testes de vermelho neutro (osmóforos) e de hidróxido de amônia (guias de néctar), a grande maioria das espécies apresentou reação positiva em ambos os testes, exceto *H. angereri* e *H. caulescens* (Tabela 3). Os sítios evidenciados pelos testes de vermelho neutro e hidróxido de amônia variaram de acordo com a espécie considerada, porém concentrados somente no labelo (Fig. 2).

Morfologia floral e nectários extraflorais

Todas as espécies acompanhadas apresentaram elevada variação morfológica e de coloração, tanto intra como inter-populacional (Fig. 3). Além da variação morfológica e de coloração, a maioria das espécies, exceto *H. liliputana*, apresentou produção de néctar em nectários extraflorais (Fig. 4), localizados na base da bráctea floral (Fig. 4A), no ápice das sépalas (Fig. 4B) (durante a antese floral), na região de inserção do perianto floral (Fig. 4C) e no ápice de frutos em desenvolvimento (Fig. 4C). O local de produção de néctar mudou com o estágio de

desenvolvimento floral. Durante a antese os nectários do ápice das sépalas produziram néctar. Até o fenecimento floral o néctar foi produzido em nectários localizados na base das sépalas. Se a flor era polinizada, durante o desenvolvimento do fruto, somente o nectário da base das sépalas (ápice do fruto em desenvolvimento) manteve a produção de néctar. Os únicos nectários ativos durante todo o processo de florescimento e maturação dos frutos foram aqueles localizados na base das brácteas florais (local de inserção do pedicelo). Os locais de produção de néctar eram forrageados o dia todo por formigas, tanto em populações naturais como em populações em cultivo (Fig. 4D-E). As espécies de *Hoffmannseggella* que apresentaram nectários extraflorais e foram forrageadas por formigas, tiveram flores predadas numa taxa bem menor (5 %) que a única espécie sem nectários extraflorais funcionais, *H. liliputana* (47 %).

Mecanismos de Autopolinização

Foram observados dois tipos de mecanismos de autopolinização espontânea (Fig. 5). No primeiro mecanismo (Fig. 5.1), as autopolinizações ocorreram devido ao ressecamento do rostelo e posterior dobramento das polínias através do caudículo. Após a abertura da flor e com o passar dos dias, nas flores mais velhas o rostelo tornava-se cada vez menos túrgido e ressecado, diminuindo seu volume até que se tornava quase imperceptível. No período de ressecamento do rostelo, as polínias, que são unidas por um caudículo, mudavam de posição e aderiam ao ápice da lâmina rostelar. Concomitantemente ao ressecamento do rostelo, as polínias eram deslocadas, dobravam através do caudículo e entravam em contato com a superfície estigmática. Este mecanismo ocorreu em *H. brieri*, *H. caulescens*, *H. crispata*, *H. cinnabarina*, *H. endsfeldzii*, *H. fournieri*, *H. ghillanyi* e *H. liliputana* em condições naturais.

O segundo mecanismo (Fig. 5.2) ocorreu devido à abundante produção de fluido estigmático. Neste caso, após a abertura das flores e ao longo dos dias após a antese, houve uma produção elevada de um fluido viscoso na região da cavidade estigmática, que se acumulou, entrando em contato com as polínias e induzindo a germinação de tubos polínicos. Este mecanismo foi observado em populações naturais de *H. angereri* e *H. rupestris*.

Os mecanismos descritos anteriormente não foram generalizados nas populações acompanhadas e ocorreram em alguns indivíduos de cada população (0,1%), em poucas flores de um mesmo escapo floral (no máximo duas). Na maioria das vezes, as autopolinizações

espontâneas ocorreram em uma ou no máximo duas flores de uma mesma inflorescência, sempre em flores mais velhas inseridas na base do escapo floral.

Visitantes Florais e polinização

Hoffmannseggella caulescens

Os visitantes florais mais frequentes desta espécie foram himenópteros da família Apidae. As visitas ocorreram entre o início e o meio da tarde, sendo intensificadas nas horas mais quentes do dia, principalmente entre 14:00 e 15:00 h. As visitas foram esporádicas e inconstantes. Geralmente as abelhas pousaram no labelo, por um tempo que variou de 15-30 seg. e visitaram as flores de forma legítima. Não foi verificada remoção ou deposição de polinários fora do horário de observação.

Somente três remoções de polinários foram verificadas, por uma abelha pequena do gênero *Ceratini*. As remoções ocorreram à tarde (14:06 h, 14:35 h e 14:56 h). Estes insetos se aproximaram das flores, pousaram e entraram completamente no tubo floral. O inseto não ficou aprisionado pela flor, mas permaneceu nela por até 30 segundos. Ao abandonar a flor, o inseto não conseguiu se virar devido ao tubo estreito da flor, e teve de sair retrocedendo, quando removeu a polínia. Na maioria das vezes a capa da antera foi removida juntamente com as polínias. Após visitar uma flor, o inseto não mais visitou outras flores da mesma inflorescência.

Freqüentemente os exemplares de *H. caulescens* foram observados em simpatria com uma espécie arbustiva de Melastomataceae, que possuía flores com padrão de coloração semelhante a *H. caulescens*. Ambas foram visitadas pela mesma espécie de abelha.

Hoffmannseggella ghillanyi

Para esta espécie, os visitantes florais foram variados, como Hymenoptera, Coleoptera, Diptera e uma espécie de beija-flor (Trochilidae).

Os Hymenoptera foram representados por abelhas das famílias Anthophoridae, Halictidae, Euglossinae e Apidae. As visitas ocorreram ao longo do dia todo, sendo intensificadas nas horas mais quentes do dia, principalmente entre 12:00 e 15:30 h, mas de modo geral foram esporádicas e inconstantes. Geralmente as abelhas somente pousaram no labelo, por um tempo que variou de

6-15 seg. e, raramente, visitaram as flores de forma legítima. Não foi registrada nenhuma remoção ou deposição de polinários fora do horário de observação.

Foram verificadas duas remoções de polinário, por uma abelha pequena da família Halictidae, gênero *Dialictus*. As remoções ocorreram pela manhã (ca. 9:30h) e no início da tarde (ca. 14h). O modo como esta espécie foi visitada é muito similar ao descrito para *H. caulescens*, em que o inseto tem de entrar e sair de um tubo floral estreito, removendo a polínia ao sair da flor, retrocedendo.

Outro visitante floral foi representado por um indivíduo macho de *Thalurania furcata* (Trochilidae). A única visita com remoção de polinário efetuada por este beija-flor ocorreu por volta das 12:25 h, durando cerca de três segundos. Esta espécie de beija-flor visitou, constantemente, as flores de uma espécie arbustiva de Ericaceae (*Gaylussacia* sp.) muito freqüente na área de observação. Durante os outros dias de observação, apesar de continuarem visitando com freqüência a espécie de Ericaceae, não mais visitaram a espécie de orquídea.

Os demais visitantes florais foram inconstantes e pouco freqüentes e, na maioria das vezes, realizaram vôos próximos às flores e sem pousarem. Quando pousaram, não entraram nas flores, deslocando-se para flores de outras espécies.

Hoffmannseggella liliputana

O visitante mais freqüente desta espécie foi uma abelha da família Halictidae, no entanto devido ao comportamento furtivo deste inseto não foi possível capturar nenhum exemplar para identificação, no entanto parece se tratar do gênero *Dialictus*.

Foi verificada apenas uma remoção de polinário, por uma abelha pequena da família Halictidae (*Dialictus* sp.). As visitas ocorreram durante o dia todo, sendo intensificadas nas horas mais quentes do dia, principalmente entre 13:00 e 16:00 h. As visitas foram freqüentes, mas geralmente as abelhas somente pousaram no labelo ou nas pétalas, por 1-3 seg. e, raramente, visitaram as flores de forma legítima. O modo como esta espécie foi visitada é semelhante ao observado e descrito para as espécies anteriores. Não foi registrada remoção ou deposição de polinários fora do horário de observação.

Hoffmannseggella rupestris

Os visitantes mais frequentes desta espécie foram Himenópteros da família Halictidae. As visitas ocorreram nos horários mais quentes do dia, principalmente entre 14:00 e 16:00 h. As visitas foram raras, e geralmente as abelhas somente pousaram no labelo ou nas pétalas, por um tempo que variou de 5-7 seg. Não foi registrada nenhuma remoção ou deposição de polinários fora do horário de observação.

Foi verificada apenas uma remoção de polinário, por uma espécie de *Augochlora* (Halictidae). A remoção ocorreu no início da tarde (14h12min.). O mecanismo de polinização observado nesta espécie é semelhante ao descrito para as espécies anteriores.

Hoffmannseggella angereri, *H. bradei*, *H. crispata* e *H. fourrieri*

Durante as 120 horas de observação, não houve visitas às flores das populações acompanhadas. Não foi registrada remoção ou deposição de polinários fora do horário de observação. Os únicos insetos que efetuavam algum tipo de interação com estas espécies em condições naturais foram Hymenoptera (Formicinae), que forrageavam nectários extraflorais (Fig. 4). O mesmo comportamento de forrageio de nectários extraflorais por formigas, também foi observado nas outras espécies de *Hoffmannseggella* estudadas, exceto em *H. liliputana* (Fig. 4).

Polinizadores observados em condições de cultivo

Todas as espécies de *Hoffmannseggella* mantidas em casa de vegetação, quando em época de floração, foram visitadas por uma espécie de vespa do gênero *Mischocyttarus* “vespas papel”, que removiam e depositavam polinários de flores da mesma ou de espécies diferentes. Em condições naturais estes insetos não foram observados visitando as espécies acompanhadas.

Taxa de frutificação, remoção e deposição de polinários

Os dados de frutificação, floração, remoção, deposição de polinários e eficiência dos polinizadores das oito espécies estudadas, bem como das populações adicionais, encontram-se na Tabela 2.

A média de frutos por inflorescência foi baixa em todas as espécies e variou de 1,62 em *H. angereri* a 0,06 em *H. liliputana*. O número médio de indivíduos que frutificaram em cada população foi reduzido e variou de 20,8% em *H. angereri* a 3,1% em *H. liliputana*. A taxa de frutificação variou muito entre as espécies e populações analisadas, de 33% em *H. rupestris* a 4,8% em *H. angereri*. A taxa de remoção de polínários foi maior em *H. ghillanyi* (83,9%) e menor em *H. liliputana* (9,4%). A maior taxa de deposição de polínários foi observada em *H. angereri* (50%) e a menor em *H. liliputana* (3,1%). A eficiência de polinização, dada pelo balanço entre o número de polínias removidas e depositadas, variou muito entre as espécies, maior em *H. caulescens* (79,5%) e menor em *H. ghillanyi* (21,3%) (Tabela 2).

Fenologia de floração, sobreposição geográfica e potencial de hibridação

Os resultados sobre fenologia de floração e sobreposição geográfica entre as espécies estudadas estão resumidos nas Tabelas 4 e 5.

Três das espécies estudadas, *H. angereri*, *H. bradei* e *H. rupestris*, ocorrem no centro-norte da Cadeia do Espinhaço e podem coexistir simpatricamente na região de Diamantina. Além de sobreposição geográfica, dois pares de espécies, *H. angereri* x *H. rupestris* e *H. rupestris* x *H. bradei*, apresentam sobreposição da fenologia de floração (Tabela 4) e podem ser consideradas sincronopátricas (Tabela 5).

As outras cinco espécies estudadas, *H. caulescens*, *H. crispata*, *H. fournieri*, *H. ghillanyi* e *H. liliputana*, estão distribuídas na região centro-sul da Cadeia do Espinhaço, da região do quadrilátero ferrífero nas cercanias de Belo Horizonte até o limite sul do Espinhaço. A maioria delas pode ocorrer em simpatria ao longo da distribuição geográfica (Tabela 5), no entanto, apenas quatro pares de espécies são simpátricas e com fenologia de floração sobreposta, *H. caulescens* x *H. crispata*, *H. crispata* x *H. liliputana*, *H. fournieri* x *H. bradei*, *H. bradei* x *H. ghillanyi*, e *H. rupestris* x *H. ghillanyi* (Tabela 4) e podem ser consideradas sincronopátricas (Tabela 5).

Nas espécies que ocorrem em sincronopatria, a morfologia floral, principalmente tamanho das cavidades estigmáticas e polínias, são caracteres importantes para evitar, em algum grau, a hibridação (Fig. 6). O fluxo polínico pode ocorrer livremente entre três pares de espécies: *H. angereri* x *H. rupestris* (Fig. 6A e B), *H. caulescens* x *H. crispata* (Fig. 6D e E) e *H. bradei* x *H. ghillanyi* (Fig. 6H e I). Nos outros três pares de espécies, *H. rupestris* x *H. bradei* (Fig. 6B e C),

H. crispata x *H. liliputana* (Fig. 6E e F) e *H. fournieri* x *H. bradei* (Fig. 6G e H) o fluxo polínico é unidirecional, e ocorre somente quando as espécies com polínias de menor tamanho são as doadoras.

Alguns indivíduos foram considerados híbridos (Fig. 7), com base na morfologia e coloração floral intermediária entre as espécies parentais que ocorriam em sincronopatria na região de Diamantina. Um dos híbridos foi observado numa área de ocorrência simpátrica entre *H. rupestris* e *H. bradei* (Fig. 7A-C). Outros três foram registrados em áreas de sobreposição geográfica entre *H. angereri* e *H. rupestris* (Fig. 7D-H).

Discussão

Biologia floral e atrativos

Uma das características mais comuns da subtribo Laeliinae, incluindo *Hoffmannseggella*, é a presença de cunículo (nectário total ou parcialmente incluído no ovário) (Van den Berg *et al.*, 2000). Ao contrário do esperado, nenhuma das espécies de *Hoffmannseggella* possui nectários nupciais funcionais, ou outro tipo de recurso floral, configurando um sistema de polinização baseado no engano.

Cerca de um terço das espécies de orquídeas existentes enganam seus polinizadores (Pijl & Dodson, 1966; Ackerman, 1986; Nilsson, 1992). Muitos modelos sobre sistemas baseados no engodo vêm sendo propostos, havendo uma concordância entre eles, o da utilização e manipulação do comportamento dos polinizadores para a ocorrência da polinização, geralmente relacionado a alguma das necessidades indispensáveis ao seu ciclo de vida, tais como: defesa territorial, seleção de sítios de oviposição, comportamento sexual e busca por alimento (Wiens, 1978; Little, 1983; Ackerman, 1986). As características morfológicas, de coloração, presença de guias de néctar e presença de osmóforos em *Hoffmannseggella* indicam que estas espécies apresentam um tipo de mimetismo Mülleriano, no qual mimetizam um padrão floral generalizado de flores melitófilas da comunidade e acabam sendo polinizadas por visitantes inexperientes e ao acaso. O mimetismo de modelos generalizados é comum em Orchidaceae (Ackerman, 1981; Dafni & Calder, 1987; Catling & Catling, 1991; Nilsson, 1992; Johnson, 1993). Neste tipo de sistema mimético, os visitantes aprendem a identificar uma fraude, tornando as visitas raras e esporádicas, e comprometendo a frutificação, uma vez que os animais tendem a não retornar às flores (Ackerman, 1981; Dafni & Calder, 1987; Montalvo & Ackerman, 1987; Nilsson, 1992,

Rodríguez-Robles *et al.*, 1992). O modelo apresentado fornece a melhor explicação para a baixa frequência de visitas, bem como para os baixos níveis de frutificação nas espécies de *Hoffmannseggella*.

Todas as espécies estudadas apresentam longo tempo de floração e antese seqüencial. Espécies que enfrentam escassez de polinizadores, principalmente as de engano, apresentam período de floração longo e maciço, como uma estratégia para aumentar a atratividade e estender ao máximo a oportunidade de serem polinizadas (Ackerman, 1986; Catling & Catling, 1991b). Apesar de aumentar a probabilidade das flores serem polinizadas, a disponibilidade de flores por vários dias favorece a ocorrência de autopolinizações e polinizações geitonogâmicas, principalmente nas espécies de *Hoffmannseggella* nas quais ocorre autopolinização espontânea. No entanto, algumas espécies de *Hoffmannseggella* apresentam barreiras mecânicas parciais e esterilidade parcial ou total para evitar a autofertilização.

Polimorfismo floral

As espécies estudadas, inclusive aquelas que foram acompanhadas em casa de vegetação, principalmente *H. bradei*, *H. ghillanyi*, *H. crispata*, *H. caulescens*, *H. fourneri* e *H. rupestris*, apresentam flores com grande variabilidade morfológica e de coloração, tanto intra como interpopulacional. O elevado polimorfismo floral é característico de sistemas de polinização baseados no engano do polinizador. Baseados nisso, alguns autores vêm considerando tais características, como possíveis adaptações florais evoluídas no sentido de elevar a taxa de frutificação, através da diminuição do potencial de aprendizagem dos visitantes em relação às flores de engano, induzindo os polinizadores a algumas visitas antes de detectarem a fraude, garantindo a fertilização de algumas flores (Heirinch, 1975; Ackerman, 1981; Gregg, 1989; Nilsson, 1992).

Nectários extraflorais

A maioria das espécies de *Hoffmannseggella* estudadas (exceto *H. liliputana*) apresenta nectários extraflorais funcionais. A importância funcional e evolutiva destes nectários vem sendo interpretada de diversas maneiras. Uma das interpretações é que nectários extraflorais estariam envolvidos na atração primária de pequenos polinizadores, até que estes encontrem nectários florais realmente envolvidos na polinização (Patt *et al.*, 1989). A interpretação mais corrente,

entretanto, é a de que nectários extraflorais estão envolvidos na atração de defensores, principalmente formigas, para a proteção e diminuição de danos causados por predadores de folhas, flores e frutos (Inouye & Taylor, 1979; Keeler, 1977; Keeler, 1981; Beattie, 1985). Sckemske (1983) mostrou que pode haver relações de especificidade entre formigas associadas a nectários extraflorais em diferentes espécies de *Costus* no Panamá. Nas espécies de *Hoffmannseggella* com nectários extraflorais funcionais a taxa de predação floral foi baixa, em relação à única espécie que não tem nectário extrafloral funcional, *H. liliputana*. Esse fato pode estar evidenciando, que os nectários extraflorais podem estar envolvidos com a proteção de flores e frutos em desenvolvimento.

Mecanismos de autopolinização espontânea

Dois mecanismos de autopolinização foram observados e descritos neste trabalho. O primeiro mecanismo, no qual o rostelo tem que ressecar até as polínias entrarem em contato com o estigma, foi observado também em *Bletia purpurea* (Lamarck) De Candolle, *Basiphyllaea corallicola* (Small) Ames (Luer, 1971) e *Sacoila lanceolata* var. *paludicola* (Luer) Saulea (Catling, 1987). O segundo mecanismo, no qual a produção elevada de uma secreção estigmática é necessária para contatar e estimular a germinação das tétrades de pólen das anteras foi observado no gênero *Vanilla* sp. (Knuth & Loew, 1906 *apud* Pijl & Dodson, 1966). Mecanismos de autopolinização espontânea são particularmente adaptativos em espécies que enfrentam escassez de polinizadores, ou em espécies que estão colonizando novos ambientes, como um modo de garantir a reprodução sexuada (Catling, 1984; Catling, 1990; Catling & Catling, 1991b). Os mecanismos de autopolinização espontânea em *Hoffmannseggella*, parecem conferir adaptabilidade maior em espécies auto-compatíveis do gênero, que são as espécies poliplóides e/ou de origem híbrida (Capítulo 4).

Barreiras à autopolinização

As espécies de *Hoffmannseggella* retêm a capa da antera após a remoção das polínias. As Orchidaceae são geralmente auto-compatíveis, mas a estrutura floral favorece fortemente a polinização cruzada (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981, 1993; Catling & Catling, 1991a; Borba & Semir, 1999). A retenção da capa da antera por algum tempo após a remoção do polinário é, freqüentemente, interpretada como uma forma de diminuir a ocorrência de

autopolinização e/ou polinizações geitonogâmicas, aumentando, conseqüentemente, a ocorrência de polinizações cruzadas que promovam o fluxo gênico (Catling & Catling, 1991b; Catling & Catling, 1991a; Adams & Goss, 1976; Borba & Semir, 1999; Verola, 2002). Além do impedimento mecânico à autopolinização, dado pela retenção da capa da antera, as espécies de *Hoffmannseggella* são fortemente auto-incompatíveis (exceto *H. rupestris* e *H. angereri*) devido à forte depressão endogâmica (Capítulo 4).

Visitantes florais e mecanismo de polinização

Brieger (1960) foi o primeiro a situar as espécies de *Hoffmannseggella* (tratadas como *Laelia* seção *Parviflorae sensu* Schlechter, 1917), como ornitófilas, devido às características morfológicas: flores menores e tubulares, com cores fortes e contrastantes como amarelo, vermelho e lilás. Segundo Brieger (1960) as modificações de coloração e tamanho das flores nas espécies de *Hoffmannseggella*, surgiram devido a adaptações a um novo grupo de polinizadores quando estas espécies abandonaram o epifitismo e colonizaram os campos rupestres. Esta hipótese foi cada vez mais reforçada por outros autores, principalmente Pijl & Dodson (1966) e Dressler (1981). De qualquer forma, o único registro formal de ornitofilia no gênero foi feito por Dodson (não publicado, apêndice in Pijl & Dodson, 1966), que relatou o avistamento ocasional de “um beija-flor não identificado” polinizando *H. milleri* (Blumensch. ex Pabst) V.P. Castro & Chiron. No entanto, apesar das características apontadas como ornitófilas neste grupo de plantas por alguns autores (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981), os resultados deste trabalho, incluindo o padrão de coloração e morfologia floral, demonstram que a polinização é efetuada fundamentalmente por pequenos himenópteros de diferentes famílias.

Na família Orchidaceae, a maioria das espécies é polinizada por Hymenoptera, principalmente abelhas (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981). Sem dúvida a melitofilia é a síndrome de polinização predominante em Laeliinae, quando se exclui o gênero *Epidendrum*, que é polinizado principalmente por borboletas e mariposas (Dodson, 1962; Pijl & Dodson, 1966). O padrão de morfologia floral tubular em *Hoffmannseggella* é comum e difundido na família Orchidaceae. Dressler (1981) chamou este tipo de morfologia como flores em goela (“gullet”). Segundo Smidt *et al.* (2006) este tipo de morfologia floral evoluiu independentemente várias vezes em Orchidaceae.

Nas flores com este tipo de morfologia, como as espécies de *Hoffmannseggella*, o mecanismo de polinização é efetivo porque a morfologia floral obriga o polinizador a entrar no tubo floral estreito, removendo a polínia quando sai da flor, ao recuar (Dressler, 1981). O mecanismo de polinização observado nas espécies de *Hoffmannseggella* coincide com o descrito por Dressler (1981) para flores com morfologia floral do tipo “gullet”. O mesmo mecanismo de polinização foi observado em duas espécies de *Cattleya* (Smidt *et al.*, 2006), em *Hadrolaelia sincorana* (Schltr.) Chiron & V.P. Castro (Silva-Pereira *et al.*, 2007) e em *Hoffmannseggella pfisteri* (Pabst & Senghas) Chiron & V.P. Castro (Silva-Pereira *et al.*, 2007), todas espécies de engano e ocorrentes em áreas de campos rupestres da Bahia. No entanto, o tamanho dos polinizadores de *Hoffmannseggella* é bem menor do que observado anteriormente em Laeliinae (Matias *et al.*, 1996; Borba & Braga, 2003; Smidt *et al.*, 2006).

A polinização por abelhas, principalmente as de tamanho grande, é considerada uma característica plesiomórfica em Orchidaceae (van der Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981) e observada em espécies basais de Laeliinae (Matias *et al.*, 1996; Borba & Braga, 2003). O gênero *Hoffmannseggella* é um dos mais derivados dentro da subtribo Laeliinae (van den Berg *et al.*, 2000), na qual a polinização por pequenas abelhas constitui um caráter derivado e aparentemente responsável, juntamente com o hábito rupícola, pela radiação deste grupo nos campos rupestres brasileiros.

De acordo com Brieger (1960), a colonização dos campos rupestres por espécies de *Hoffmannseggella* foi possível devido ao abandono do epifitismo, concomitante à adaptação a uma classe diferente de polinizador, os beija-flores. Desta forma, é bom reforçar que a base das idéias de Brieger (1960) estava correta quanto à mudança de polinizadores (grandes abelhas para pequenas), no entanto, se enganou quanto aos novos polinizadores, pequenas abelhas ao invés de beija-flores.

Taxa de frutificação e ecologia da polinização

A família Orchidaceae é muito adequada para estudos de evolução, por apresentar toda a carga de pólen organizada na forma de polínias, que podem ser utilizadas para quantificar o sucesso reprodutivo, tanto do componente masculino como do feminino, por meio da amostragem direta da taxa de remoção e/ou deposição de polinários (Nilsson, 1992; Tremblay *et al.*, 2005). Tremblay (1992) ressalta a necessidade de polinizadores específicos, principalmente

em orquídeas nas quais toda a carga de pólen está concentrada em poucos “pacotes”, as polínias. Desta forma, espécies que atraíam polinizadores ineficientes ou inespecíficos, sofreriam uma seleção contrária pela perda de seu sucesso reprodutivo. Nas espécies de *Hoffmannseggella*, a eficiência dos polinizadores é elevada, e na maioria das espécies os polinizadores são capazes de depositar a maioria dos polinários removidos. No entanto, estes elevados índices podem estar sendo superestimados, pois as espécies apresentam mecanismos de autopolinização espontânea. Neste caso a apreciação dos resultados fica comprometida, impossibilitando qualquer inferência sobre a eficiência do sistema de polinização em *Hoffmannseggella*.

A taxa de produção de frutos em todas as espécies e populações foi reduzida, o que está de acordo com o observado para espécies de orquídeas com mecanismos de polinização baseados no engano do polinizador. Sistemas de polinização baseados em recompensa alimentar, normalmente possuem taxas de frutificação elevadas (Rodrigues-Robles *et al.*, 1992; Pleasants & Moe, 1993; Ackerman *et al.*, 1994), sendo o inverso verdadeiro, em espécies que não oferecem recompensas alimentares aos polinizadores (Montalvo & Ackerman, 1987; Ackerman, 1989; Zimmerman & Aide, 1989), como as espécies aqui estudadas.

No caso de *H. ghillanyi*, *H. fournieri*, *H. liliputana* e *H. bradei*, que crescem diretamente sobre rochas, uma grande produção de frutos em uma estação poderia interferir no crescimento vegetativo, reprodução sexual futura ou na sobrevivência a longo prazo, pois em muitos casos, as vantagens a curto prazo da alta produção de frutos são duvidosas, principalmente quando se trata de espécies que são expostas a limitação de recursos (Schemske, 1980; Montalvo & Ackerman, 1987; Zimmerman & Aide, 1989). Apesar de não ter sido quantificado, todas as espécies de *Hoffmannseggella* aqui estudadas, quando polinizadas num mesmo ano, apresentaram comprometimento no crescimento vegetativo na estação seguinte, gerando pseudobulbos e folhas menores que o habitual, além de não florescerem novamente. Estes dados corroboram a hipótese de limitação de recursos proposta para Orchidaceae (Schemske, 1980; Montalvo & Ackerman, 1987; Zimmerman & Aide, 1989).

A adaptabilidade (“fitness”) real das plantas, neste caso, pode estar sendo maximizada pela frutificação baixa ou moderada, resultante de baixos níveis de polinização (Montalvo & Ackerman, 1987; Calvo, 1990; Proctor *et al.*, 1996). Baixa taxa de frutificação pode ser particularmente adaptativa em plantas que se reproduzem predominantemente de forma vegetativa, como as espécies aqui estudadas. Nestes casos, clones podem, teoricamente, viver por centenas de anos e a reprodução sexual pode ser a única garantia de sobrevivência a longo prazo

ou de colonização de novas áreas (Pijl & Dodson, 1966; Proctor *et al.*, 1996). Assim, raros eventos de reprodução sexuada, representariam uma estratégia mais eficiente do que uma frutificação massiva em uma estação (Schemske, 1980; Montalvo & Ackerman, 1987; Zimmerman & Aide, 1989; Borba & Semir, 1998; Verola, 2002). Isso pode ser verdadeiro, principalmente em Orchidaceae, na qual a sobrevivência da espécie pode ser garantida por um único fruto que, na maioria das vezes, contém milhares de sementes (Dressler, 1981, 1993).

Fenologia de floração e hibridação

A floração de muitas espécies do gênero é sobreposto e a sobreposição geográfica entre elas é freqüente. Estas características, aliadas aos sistemas de polinização com baixa especificidade neste gênero, tornam as possibilidades de hibridação elevadas. Foi encontrado neste trabalho, um total de quatro híbridos naturais. Estes resultados, associados ao registro de grande número de espécies híbridas publicadas anteriormente, reforçam a proposta de Blumenschein (1960) de que parte das espécies de *Hoffmannseggella* teria se originado por eventos de hibridação (ver Capítulo 5).

A maioria das espécies de orquídeas é inter-compatível e o isolamento reprodutivo deve-se a uma série de barreiras parciais pré-polinização (Dodson, 1962; Dressler, 1968, 1981, 1993; Paulus & Gack, 1990). Se estas barreiras são quebradas, a consequência normalmente é a formação de híbridos (Pijl & Dodson, 1966; Sundermann, 1977; Schrenk, 1984; Linder, 1990; Romero & Carnevali, 1990, 1992; Rossi *et al.*, 1992; Steiner *et al.*, 1994; Borba & Semir, 1998; Borba *et al.*, 1999, 2001; Tremblay *et al.*, 2005). A adaptação a polinizadores específicos geralmente não afeta a compatibilidade genética entre grupos (gêneros e espécies), causando especiação muito rápida em muitas espécies de orquídeas, pois ocorre pouca ou nenhuma mudança no nível cromossômico e mantem-se a compatibilidade entre elas (Sanford, 1964, 1967; Pijl & Dodson, 1966; Stort, 1972, 1986; Illg, 1975; Scacchi, *et al.*, 1990; Borba & Semir, 1998). As espécies de *Hoffmannseggella* analisadas são inter-compatíveis e apresentam barreiras parciais, porém fracas, evitando a hibridação entre espécies.

Referências Bibliográficas

- Ackerman, J.D. 1981. Pollination biology of *Calypso bulbosa* var. *occidentalis* (Orchidaceae): a food deception system. *Madroño* **28**: 101-110.
- Ackerman, J.D. 1986. Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* **1**: 108-113.
- Ackerman, J.D. 1989. Limitations to sexual reproduction in *Encyclia krugii* (Orchidaceae). *Systematic Botany* **14**: 101-109.
- Ackerman, J.D., Rodríguez-Robles, J.A. & Meléndez, E.J. 1994. A meager nectar offering by an epiphytic orchid is better than nothing. *Biotropica* **26**: 44-49.
- Adams, R.M. & Goss, G.J. 1976. The reproductive biology of the epiphytic orchids of Florida III. – *Epidendrum anceps* Jacquin. *American Orchid Society Bulletin* **45**: 997-1001.
- Barros, F. 1990. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das Orchidaceae brasileiras. *Acta Botânica Brasilica* **4**: 177-187.
- Beattie, A.J. 1985. **The evolutionary ecology of ant-plant mutualisms**. Cambridge University Press, U.S.A. 182pp.
- Blumenschein, A. 1960. **Estudos sobre a Evolução no subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae)**. Tese apresentada para obtenção do título de Livre Docente da Cadeira de Citologia e Genética Geral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 54pp.
- Borba, E.L. & Braga, P.I.S. 2003. Biologia reprodutiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. *Revista Brasileira de Botânica* **26**: 541-549.
- Borba, E.L. & Semir, J. 1998. *Bulbophyllum xcipoense* (Orchidaceae), a new natural hybrid from Brazilian “campo rupestre”: description and biology. *Lindleyana* **13**: 113-120.
- Borba, E.L. & Semir, J. 1999. Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution* **217**: 197-204.
- Borba, E.L., Semir, J. & Sheferd, G.J. 2001. Self-incompatibility, inbreeding depression, and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* **88**: 89-99.
- Borba, E.L., Shepherd, G.J. & Semir, J. 1999. Reproductive system and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occurring in Brazilian ‘campo rupestre’ vegetation. *Plant Systematics and Evolution* **217**: 205-214.
- Brieger, F.G. 1960. Contribuições para a taxonomia das orquídeas. *Publicações Científicas do Instituto de Genética/Esalq/USP* **1**: 1-31
- Brieger, F.G. 1960. **The Report of the Third World Orchid Conference**. Geographic Distribution and Phylogeny of Orchids. pp. 328-333.
- Calvo, R.N. 1990. Inflorescence size and fruit distribution among individuals in three orchid species. *American Journal of Botany* **77**: 1378-1381.
- Catling, P.M. & Catling, V.R. 1991a. Anther-cap retention in *Tipularia discolor*. *Lindleyana* **6**: 113-116.
- Catling, P.M. & Catling, V.R. 1991b. A synopsis of breeding systems and pollination in North American orchids. *Lindleyana* **6**: 187-215.
- Catling, P.M. 1984. **Proceedings of the 11th World Orchid Conference**. Distribution and pollination biology of Canadian orchids. Pp. 121-135.
- Catling, P.M. 1987. Notes on the breeding systems of *Sacoila lanceolata* (Aublet) Garay (Orchidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **74**: 58-68.

- Catling, P.M. 1990. **Orchid Biology, reviews and perspectives. 5 ed.** Auto pollination in Orchidaceae. Timber Press, Portland, U.S.A. 121-158pp.
- Dafni, A. & Calder, D.M. 1987. Pollination by deceit and floral mimicry in *Thelemitra antennifera* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **158**: 11-22.
- Dodson, C.H. 1962a. The importance of pollination in the evolution of the orchids in tropical America. *American Orchid Society Bulletin* **31**: 525-534.
- Dodson, C.H. 1962b. The importance of pollination in the evolution of the orchids in tropical America. *American Orchid Society Bulletin* **31**: 641-649.
- Dressler, R.L. 1968. Observations on orchids and Euglossine bees in Panama and Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* **15**: 143-183.
- Dressler, R.L. 1981. **The orchids: natural history and classification.** Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family.** Cambridge University Press, Cambridge.
- Faegri, K. & Pijl, L. van der. 1979. **The principles of pollination ecology, 3^a ed.** Pergamon Press, Oxford.
- Garay, L.A. 1960. On the origin of the Orchidaceae. *Botanical Museum Leaflets* **19**: 57-96.
- Giulietti, A.M. & Pirani, J.R. 1988. **Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns.** Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais e Bahia, Brazil. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro.
- Gregg, K.B. 1989. Reproductive biology of the orchid *Cleistes divaricata* (L.) Ames var. *bifaria* Fernald growing in a West Virginia meadow. *Castañeda* **54**: 57-78.
- Heirinch, B. 1975. Energetics of pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics* **6**: 139-170.
- Illg, R.D. 1975. **Aspectos evolutivos em algumas Maxillarias brasileiras (Orchidaceae).** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Inouye, D.W. & Taylor, O.R. 1979. A temporate region plant-ant-seed predator system: Consequences of extrafloral nectar secretion by *Helianthella quinquinervis*. *Ecology* **60**: 1-7.
- Johnson, S.D. 1993. Carpenter bee pollination of *Herschelianthe graminifolia* (Orchidaceae). *Flora* **188**: 383-386.
- Joly, A.B. 1970. **Conheça a vegetação brasileira.** EDUSP, São Paulo.
- Keeler, K.H. 1977. The extrafloral nectaries of *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* **64**: 1182-1188.
- Keeler, K.H. 1981. Function of *Mentzelia nuda* (Loasaceae) post floral nectaries in seed defense. *American Journal of Botany* **68**: 295-299.
- Knuth, P. & Loew, E. 1906. **Handbook of flower pollination.** Oxford.
- Köppen, W. 1948. **Climatologia con un studio de los climas de la Tierra** (Transl. By Peres PRN) México City: Fondo de Cultura Económica.
- Linder, H.P. 1990. Hybrids in *Disa* (Diseae-Orchidaceae). *Lindleyana* **5**: 224-230.
- Little, R.J. 1983. **Handbook of experimental pollination biology.** A review of floral food deception mimicries with comments on floral mutualism. Van Nostrand Reinhold Company, New York. 294-309pp.
- Luer, C.A. 1971. Abnormal development of the anther – a report of two cases. *Florida Orchidist* **13**: 26-29.

- Matias, L.Q., Braga, P.I.S. & Freire, A.G. 1996. Biologia reprodutiva de *Constantia cipoensis* Porto & Brade (Orchidaceae), endêmica da Serra do Cipó, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Botânica* **19**: 119-125.
- Montalvo, A.M. & Ackerman, J.D. 1987. Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Biotropica* **19**: 24-31.
- Nilsson, L.A. 1992. Orchid pollination biology. *Tree* **7**: 255-259.
- Patt, J.M., Merchant, M. W., Williams, D.R.E. & Meeuse, B.J.D. 1989. Pollination biology of *Platanthera stricta* (Orchidaceae) in Olympic National Park, Washington. *American Journal of Botany* **76**: 1097-1106.
- Paulus, H.F. & Gack, C. 1990. Pollination of *Ophrys* (Orchidaceae) in Cyprus. *Plant Systematics and Evolution* **169**: 177-207.
- Pijl, L. van der & Dodson, C.H. 1966. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. University of Miami Press, Coral Gables.
- Pleasants, J.M. & Moe, S. 1993. Floral display size and pollination of the western prairie fringed orchid, *Platanthera praeclara* (Orchidaceae). *Lindleyana* **8**: 32-38.
- Proctor, M., Yeo, P. & Lack, A. 1996. **The natural history of pollination**. Harper Collins, London.
- Rodríguez-Robles, J.A., Meléndez, E.A. & Ackerman, J.A. 1992. Effects of display size, flowering phenology, and nectar availability on effective visitation frequency in *Comparettia falcata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **79**: 1009-1017.
- Romero, G.A. & Carnevali, G. 1990. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela-1. *Catasetum xtapiriceps* Reichb. f. *American Orchid Society Bulletin* **59**: 1214-1220.
- Romero, G.A. & Carnevali, G. 1992. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela-2. *Catasetum xdunstervillei* G. Romero and Carnevali. *American Orchid Society Bulletin* **60**: 115-120.
- Rossi, W., Arduino, P., Cianchi, R. & Bullini, L. 1992. A new natural hybrid in the genus *Orchis* L.: genetic data and description. *Lindleyana* **7**: 121-126.
- Sanford, W.W. 1964. Sexual compatibility relationship in *Oncidium* and related genera I. *American Orchid Society Bulletin* **33**: 1035-1048.
- Sanford, W.W. 1967. Sexual compatibility relationship in *Oncidium* and related genera II. *American Orchid Society Bulletin* **36**: 114-122.
- Scacchi, R., De Angelis, G. & Lanzana, P. 1990. Allozyme variation among and within eleven *Orchis* species (fam. Orchidaceae), with special reference to hybridization aptitud. *Genetica* **81**: 143-150.
- Schemske, D.W. 1980. Evolution of floral display in the orchid *Brassavola nodosa*. *Evolution* **34**: 489-493.
- Schlechter, R. 1917. Die Einteilung der Gattung *Laelia* und die geographische Verbreitung ihrer Gruppen. *Orchis* **11**: 87-96.
- Schrenk, J. 1984. Natural hybrids unlimited – How certain is certain? *American Orchid Society Bulletin* **53**: 130-143.
- Sckemske, D.W. 1983. Breeding system and habitat effects on fitness components in three Neotropical *Costus* (Zingiberaceae). *Evolution* **37**: 523-539.
- Scogin R., Young D.A. & Jones C.E. (1977) Anthochlor pigments and pollination biology. II. The ultraviolet patterns of *Coreopsis gigantea* (Asteraceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **104**: 155-159.

- Silva-Pereira, V., Smidt, E.C. & Borba, E.L. 2007. Isolation mechanisms between two sympatric *Sophranitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* (on-line publication in 26-Oct-2007; DOI 10.1007/s00606-007-0583-5).
- Smidt, E.C., Silva-Pereira, V. & Borba, E.L. 2006. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. *Plant Species Biology* **21**: 85-91
- Steiner, K.E.; Whitehead, V.B. & Johnson, S.D. 1994. Floral and pollinator divergence in two sexually deceptive South African orchids. *American Journal of Botany* **81**: 185-194.
- Stort, M.N.S. 1972. Estudos em híbridos F1 artificiais em orquídeas. *Ciência e Cultura* **24**: 847-851.
- Stort, M.N.S. 1986. Fertilidade de cruzamentos e relação filogenética entre algumas espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **9**: 69-73.
- Sundermann, H. 1977. The genus *Ophrys* – An example of the importance of isolation for especiation. *American Orchid Society Bulletin* **46**: 825-831.
- Tremblay, R. L., Ackerman, J.D., Zimmerman, J.K. & Calvo R.N. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biology Journal of the Linnean Society* **84**: 1-54.
- Tremblay, R.L. 1992. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. *Canadian Journal of Botany* **70**: 642-650.
- van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Arenas, M.A.S., Culham, A. & Chase, M.W. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spaces (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96-114.
- Verola, C.F. & Semir, J. 2007. *Hoffmannseggella viridiflora* (Orchidaceae, Laeliinae) a New species from Brazilian Campos Rupestres. *Novon* **17**: 125-129.
- Verola, C.F. 2002. **Biologia floral e sistemas de reprodução em espécies de *Bulbophyllum* (Orchidaceae) ocorrentes em mata de galeria, campo rupestre e floresta estacional**. Tese apresentada para obtenção do título de Mestre em Ecologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.
- Vogel, S. 1990. **The Role of Scent Glands in Pollination** (translated by Bhatti, J. S.). Smithsonian Institution, Washington.
- Wiens, D. 1978. Mimicry in plants. *Evolutionary Biology* **11**:365-403.
- Zimmerman, J.K. & Aide, T.M. 1989. Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. *American Journal of Botany* **76**: 67-73.

Tabela 1. Espécies, localidades e material testemunho das populações focais acompanhadas em condições naturais.

Espécies	Local de Observação/Município	Coordenadas Geográficas	Voucher
<i>H. angereri</i>	Estrada para Milho Verde – Diamantina - MG	18°17'S/043°33'W	<i>C.F. Verola</i> n°126
<i>H. bradei</i>	Trilha dos Escravos - Diamantina - MG	18°13'S/043°35'W	<i>C. F. Verola</i> n°083
<i>H. caulescens</i>	Serra de São José – Tirandentes - MG	21°08'S/044°17'W	<i>C.F. Verola</i> n°044
<i>H. crispata</i>	Serra de São Thomé - São Thomé das Letras - MG	21°43'S/044°58'W	<i>C. F. Verola</i> n°110
<i>H. fourrieri</i>	Ponte do Calixto - “Curva do S” – Ouro Preto - MG	20°27'S/043°36'W	<i>C.F. Verola</i> n°175
<i>H. ghillanyi</i>	Serra do Cipó – Conceição do Mato Dentro - MG	19°16'S/043°33'W	<i>C. F. Verola</i> n°062
<i>H. liliputana</i>	Serra do Ouro Branco – Ouro Branco - MG	20°29'S/043°42'W	<i>C.F. Verola</i> n°125
<i>H. rupestris</i>	Cachoeira dos Cristais – Diamantina/Biribiri - MG	18°18'S/043°53'W	<i>C.F. Verola</i> n°009

Tabela 2. Taxa de Frutificação, remoção de polinários, deposição de polinários e eficiência dos polinizadores em espécies de *Hoffmannseggella*. Colunas: IO=Número total de inflorescências amostradas; FLT= número total de flores amostradas; FLI= número de flores por inflorescência; FRT=número total de frutos observados; FRI= número de frutos por inflorescência; FR (%) = porcentagem de indivíduos frutificando por população; IF (%)= porcentagem das hastes florais frutificando por população; TF (%)= taxa de frutificação da população; RP= porcentagem de flores da população que tiveram as políneas removidas; PD= porcentagem de flores da população que receberam depósito de polínias e EP (%)= eficiência dos polinizadores, proporção entre o número de polinários que foram removidos e posteriormente depositados dentro da população.

Espécies	Código da População	Município/MG	coordenadas	IO	FLT	FLI	FRT	FRI	FR (%)	IF (%)	TF (%)	RP	PD	EP
<i>H. angereri</i>	CL28	Diamantina	18°17'S/043°33'W	3,0	24,0	8,0±1,0 (7-9)	5,0	1,6±2,0 (0-4)	20,8	66,7	0,2	79,2	50,0	63,1
<i>H. bradei</i>	CL05	Conselheiro Mata	18°12'S/043°42'W	74,0	113,0	1,5±0,6 (1-3)	24,0	0,3±0,6 (0-2)	21,2	21,6	0,2	54,0	32,8	60,7
	CL11	Diamantina	18°13'S/043°35'W	76,0	121,0	1,6±0,7 (1-3)	14,0	0,2±4,4 (0-2)	11,6	18,4	0,1	42,1	15,7	37,3
<i>Média</i>	-	-	-	51,0	86,0	1,5±0,6 (1-9)	14,3	0,25±2,3(0-4)	17,9	35,6	0,2	58,4	32,8	56,2
<i>H. caulescens</i>	CL14	Carrancas	21°18'S/044°36'W	7,0	18,0	2,5±0,7 (2-4)	2,0	0,3±0,7 (0-2)	11,1	14,3	0,1	27,8	27,8	100,0
	CL16	São João Del Rei	21°07'S/044°12'W	27,0	53,0	1,9±1,0 (1-4)	7,0	0,2±0,5 (0-2)	13,2	22,2	0,1	35,8	15,0	41,9
	CL17	Santa Cruz de Minas	21°29'S/044°36'W	24,0	46,0	1,9±1,2 (1-5)	9,0	0,3±0,8 (0-3)	19,6	20,8	0,2	63,0	28,3	44,9
<i>Média</i>	-	-	-	19,3	39,0	2,1±1,0 (1-5)	6,0	0,3±0,7 (0-3)	14,6	19,1	0,2	42,2	23,7	56,2
<i>H. crispata</i>	CL13B	São Thomé das Letras	21°43'S/044°58'W	15,0	90,0	6,0±2,2 (3-10)	10,0	0,7±0,8 (0-2)	11,1	46,7	0,1	15,6	14,4	92,3
	CL18	Conceição do Ibitipoca	21°42'S/043°53'W	40,0	209,0	5,4±2,5 (1-11)	24,0	0,6±1,0 (0-4)	11,5	30,0	0,1	25,8	17,2	66,7
<i>Média</i>	-	-	-	27,5	149,5	5,7±2,4 (1-11)	17,0	0,7±0,9 (0-4)	11,3	38,4	0,1	20,7	15,8	76,3
<i>H. fourrieri</i>	CL02	Lavras Novas	20°28'S/043°31'W	12,0	25,0	2,0±0,5 (1-3)	1,0	0,1±0,3 (0-1)	4,0	8,3	0,0	25,0	4,0	16,0
	CL35B	Ouro Preto	20°27'S/043°36'W	19,0	41,0	2,1±0,5 (1-3)	2,0	0,1±0,3 (0-1)	4,9	10,5	0,0	17,1	4,9	28,7
<i>Média</i>	-	-	-	15,5	33,0	2,0±0,5 (1-3)	1,5	0,1±0,3 (0-1)	4,5	9,4	0,0	21,1	4,5	21,1
<i>H. ghillanyi</i>	CL13	Conceição do Mato Dentro	19°16'S/043°32'W	44,0	106,0	2,4±1,4 (1-7)	6,0	0,1±0,4 (0-2)	5,7	11,4	0,1	83,9	17,9	21,3
<i>H. liliputana</i>	CL03	Ouro Branco	20°29'S/043°42'W	17,0	32,0	1,9±0,3 (1-2)	3,0	0,06±0,2 (0-1)	3,1	5,9	0,1	9,4	3,1	33,0
<i>H. rupestris</i>	CL04	Diamantina	18°12'S/043°42'W	10,0	24,0	2,4±1,3 (1-5)	1,0	0,1±0,3 (0-1)	4,2	10,0	0,0	29,1	20,8	71,5
	CL07	Biribiri	18°18'S/043°53'W	20,0	57,0	2,8±1,3 (1-6)	1,0	0,05±0,2 (0-1)	1,8	5,0	0,0	45,6	14,0	30,7
	CL34	Joaquim Felício	17°41'S/044°16'W	4,0	18,0	4,2±1,5 (3-6)	1,0	0,25±0,5 (0-1)	5,5	25,0	0,1	33,3	5,5	16,5
<i>Média</i>	-	-	-	11,3	33,0	3,2±1,4 (1-6)	1,0	0,1±0,3 (0-1)	3,8	13,3	0,0	36,0	13,4	37,3

Tabela 3. Biologia floral e atrativos florais em espécies de *Hoffmannseggella*. Primeira coluna = espécies estudadas. Ii = número de inflorescências por indivíduos; Ni = Número de flores por inflorescência; Nd = Número de flores em antese por dia; Lf = Longevidade floral; Ha = Horário de antese; Sa = seqüência de abertura das flores no escapo floral (Cga = Centrífuga; Cta: Centrípeta; Sia = Simultânea); Od/h= Odor perceptível / horário de produção; Ne = Produção de néctar; Os = Osmóforos (teste de vermelho neutro: + = presença; - = ausência) e Gn = Guias de néctar (teste de hidróxido de amônia: + = presença; - = ausência) / horário de produção. * = característica predominante na maioria dos indivíduos da população observada.

Espécies	Ii	Ni	Nd	Lf	Ha	Sa	Od/h	Os	Gn
<i>H. angereri</i>	1-3	7-9	2-5	4-8	7:00-10:00	Cta*	-*	-	-
<i>H. bradei</i>	1-3	1-4	1-3	5-6	9:00-12:00	Cga*, Cta, Sia	-, + / dia todo	+	+
<i>H. caulescens</i>	1-5	1-5	2-3	4-6	10:00-12:00	Cta*	-*	-	-
<i>H. crispata</i>	1-6	5-12	3-7	4-5	9:00-10:00	Cta*	-*	+	+
<i>H. fourrieri</i>	1-2	1-4	1-3	6-8	8:00-9:00	Cta*	-*	+	+
<i>H. ghillanyi</i>	1-3	1-6	1-4	4-7	9:00-10:00	Cta*	-, + / dia todo	+	+
<i>H. liliputana</i>	1-2	1-3	1-3	7-10	8:00-10:00	Cta*, Sia	-*	+	+
<i>H. rupestris</i>	1-2	2-7	1-5	5-7	11:00-02:00	Cga*	-*	+	+

Tabela 4. Fenologia de floração das espécies de *Hoffmannseggella*. Barras preenchidas representam os meses em que as espécies florescem.

Espécies	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
<i>H. angereri</i>												
<i>H. bradei</i>												
<i>H. caulescens</i>												
<i>H. crispata</i>												
<i>H. fournieri</i>												
<i>H. ghillanyi</i>												
<i>H. liliputana</i>												
<i>H. rupestris</i>												

Tabela 5. Fenologia de floração e sobreposição geográfica das espécies estudadas. X=espécies simpátricas; *=espécies com distribuição geográfica e fenologia floral sobrepostas.

Espécies	<i>rupestris</i>	<i>liliputana</i>	<i>ghillanyi</i>	<i>fournieri</i>	<i>crispata</i>	<i>caulescens</i>	<i>bradei</i>
<i>H. angereri</i>	*						X
<i>H. bradei</i>	*		*	*	X	X	
<i>H. caulescens</i>			X	X	*		
<i>H. crispata</i>		*	X	X			
<i>H. fournieri</i>			X				
<i>H. ghillanyi</i>	*						

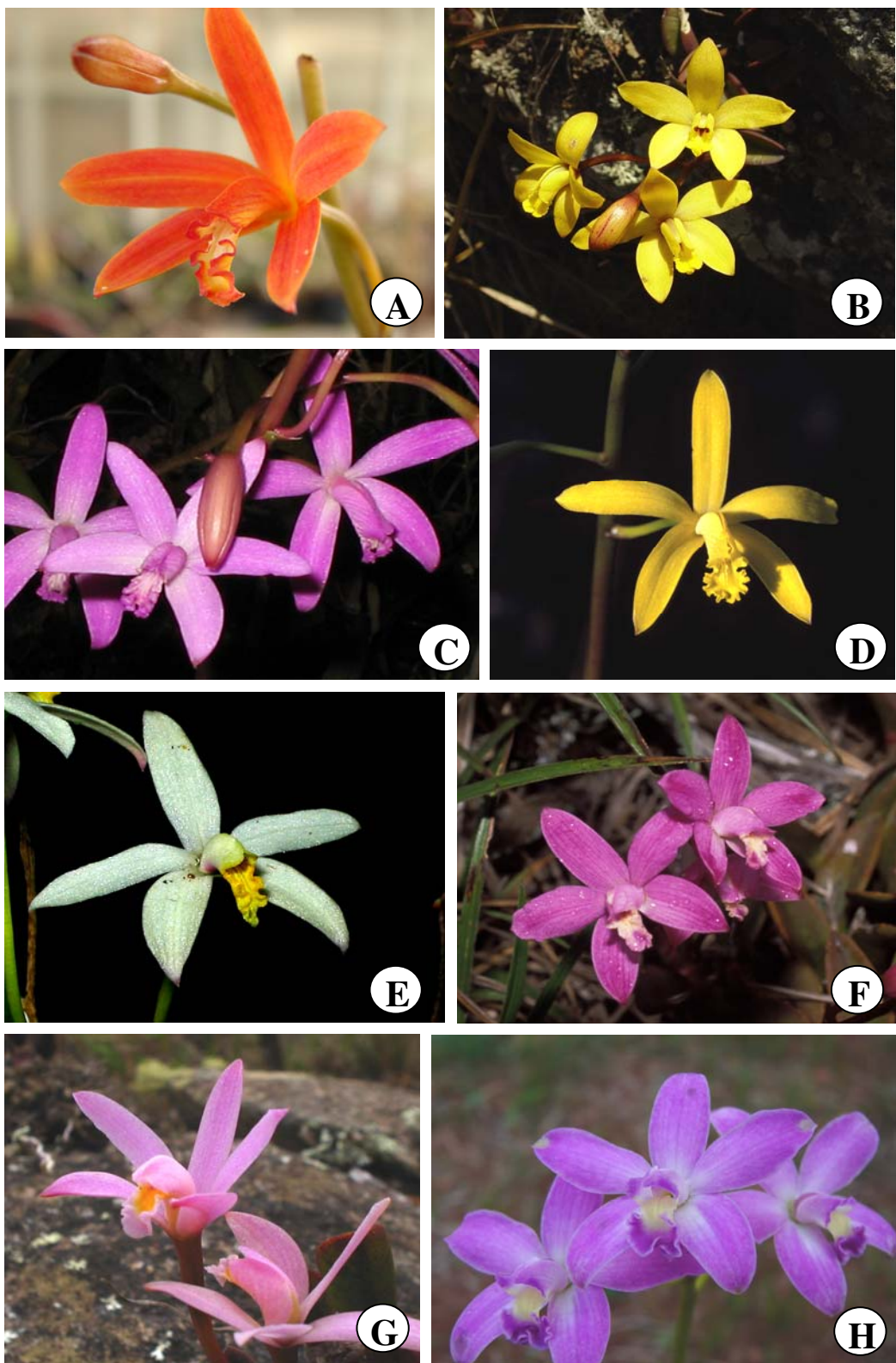


Figura 1. *Hoffmannseggella angereri* (A); *H. bradei* (B); *H. caulescens* (C); *H. crispata* (D); *H. fournieri* (E); *H. ghillanyi* (F); *H. liliputana* (G) e *H. rupestris* (H). Note a morfologia tubular do labelo e variação de coloração do perianto das espécies estudadas.

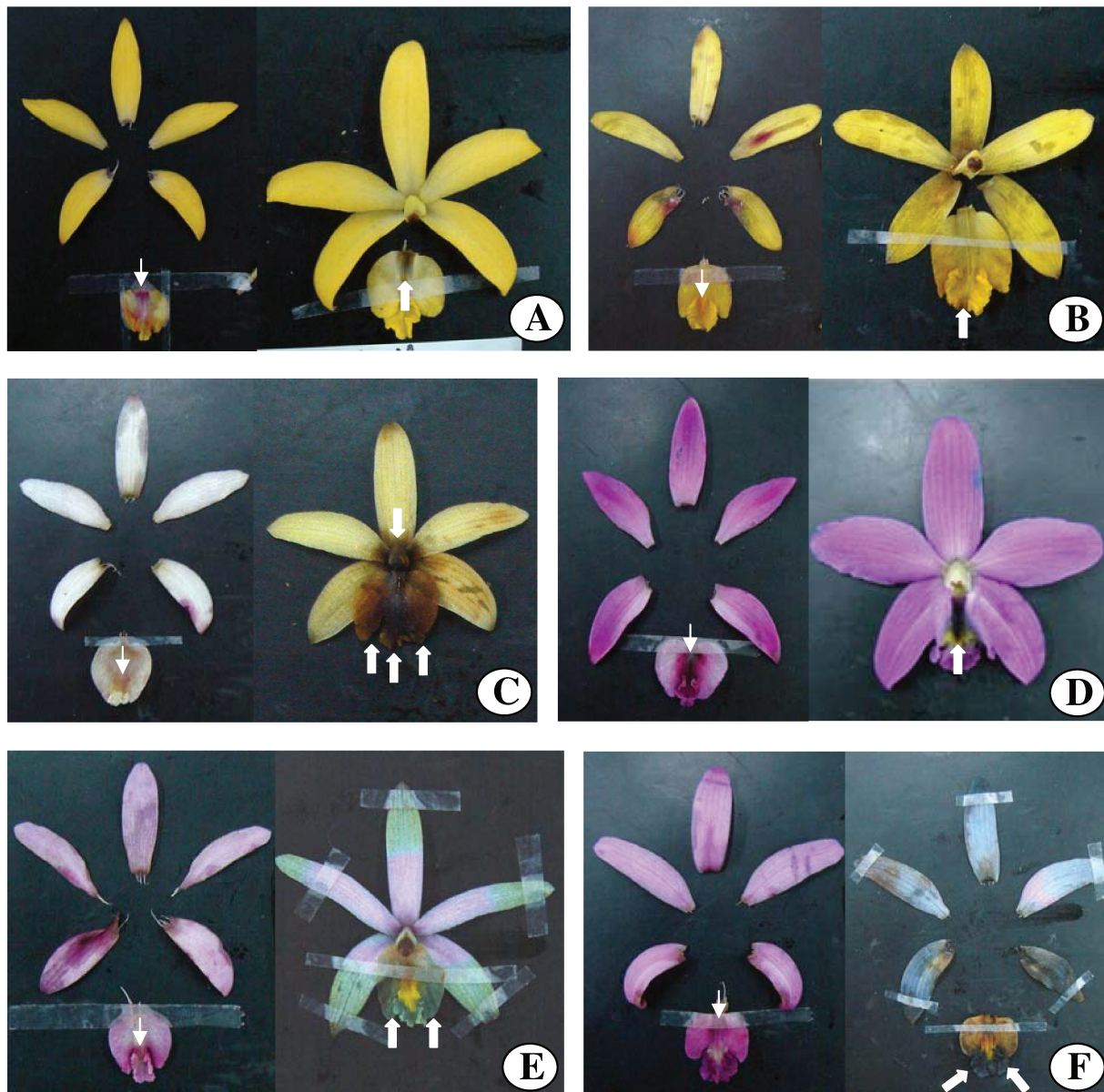


Figura 2. Perianto dissecado evidenciando osmóforos em lilás ou púrpura (setas estreitas) e guias de nectário em marrom escuro, preto ou azulado (setas largas). Osmóforos (teste de vermelho neutro - figuras da esquerda) e guias de nectários (teste de hidróxido de amônia - figuras da direita). *Hoffmannseggella bradei* (A); *H. crispata* (B); *H. fournieri* (C); *H. ghillanyi* (D); *H. liliputana* (E) e *H. rupestris* (F).

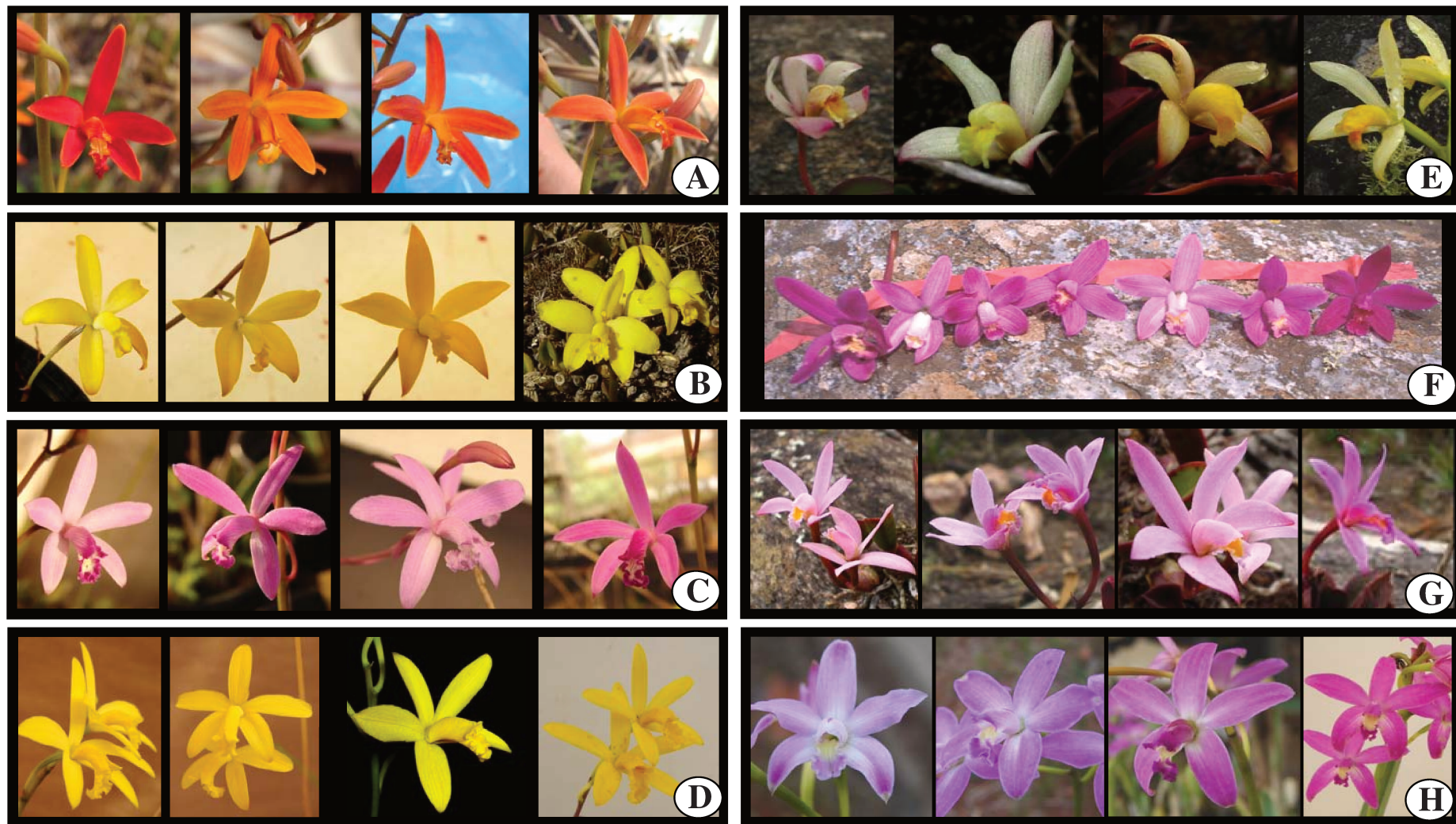


Figura 3. Variação de morfologia e coloração floral em *Hoffmannseggella angereri* (A); *H. bradei* (B); *H. caulescens* (C); *H. crispata* (D); *H. fournieri* (E); *H. ghillanyi* (F); *H. liliputana* (G) e *H. rupestris* (H).

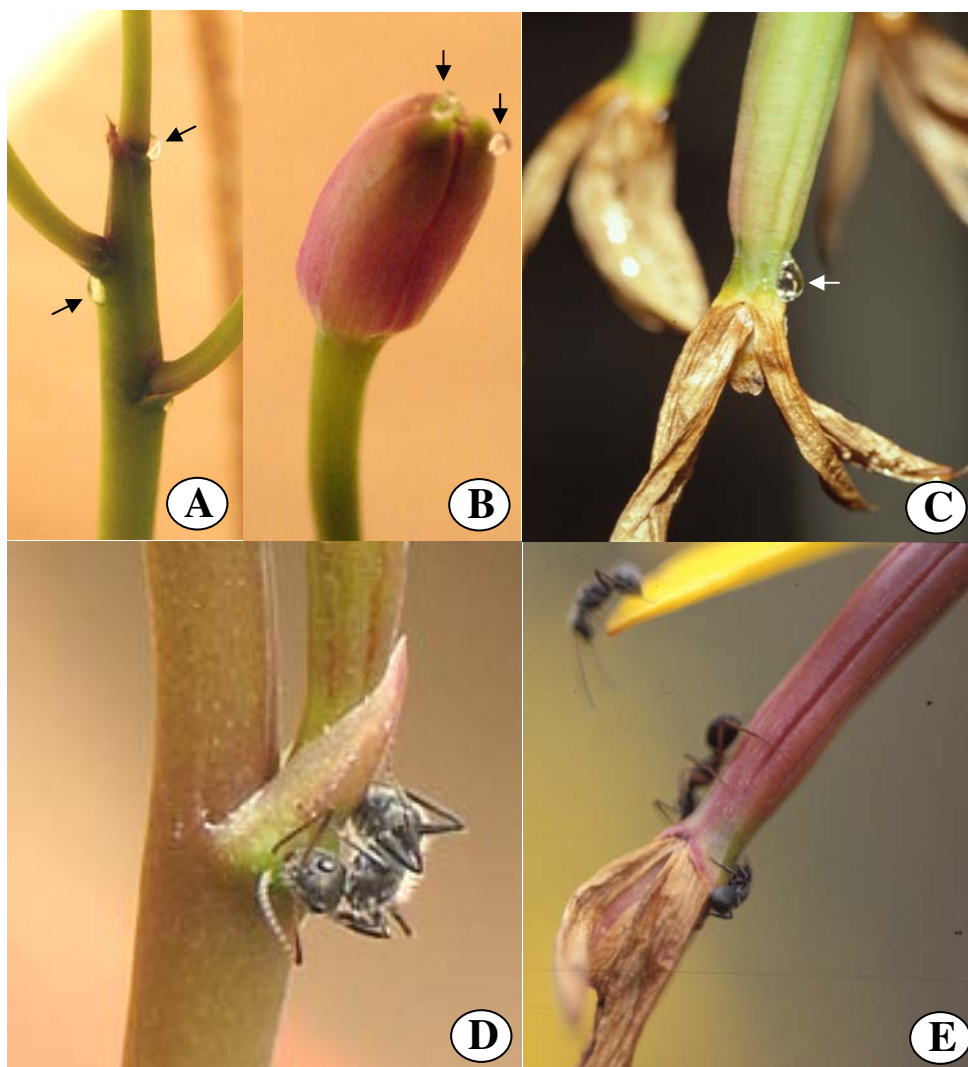


Figura 4. Nectários extraflorais produzindo néctar (setas). Nectários ativos, localizados na base das brácteas florais de *H. rupestris* (A); nectários ativos localizados no ápice das sépalas de *H. rupestris* (B); nectários localizados entre o perianto e o ovário de *H. angereri* (C); formiga consumindo néctar na base das brácteas florais de *H. angereri* (D) e formigas consumindo néctar produzido pelos nectários entre a base do perianto e o ovário. Nas figuras C e E as formigas estão se alimentando com o néctar produzido pelo fruto em desenvolvimento.

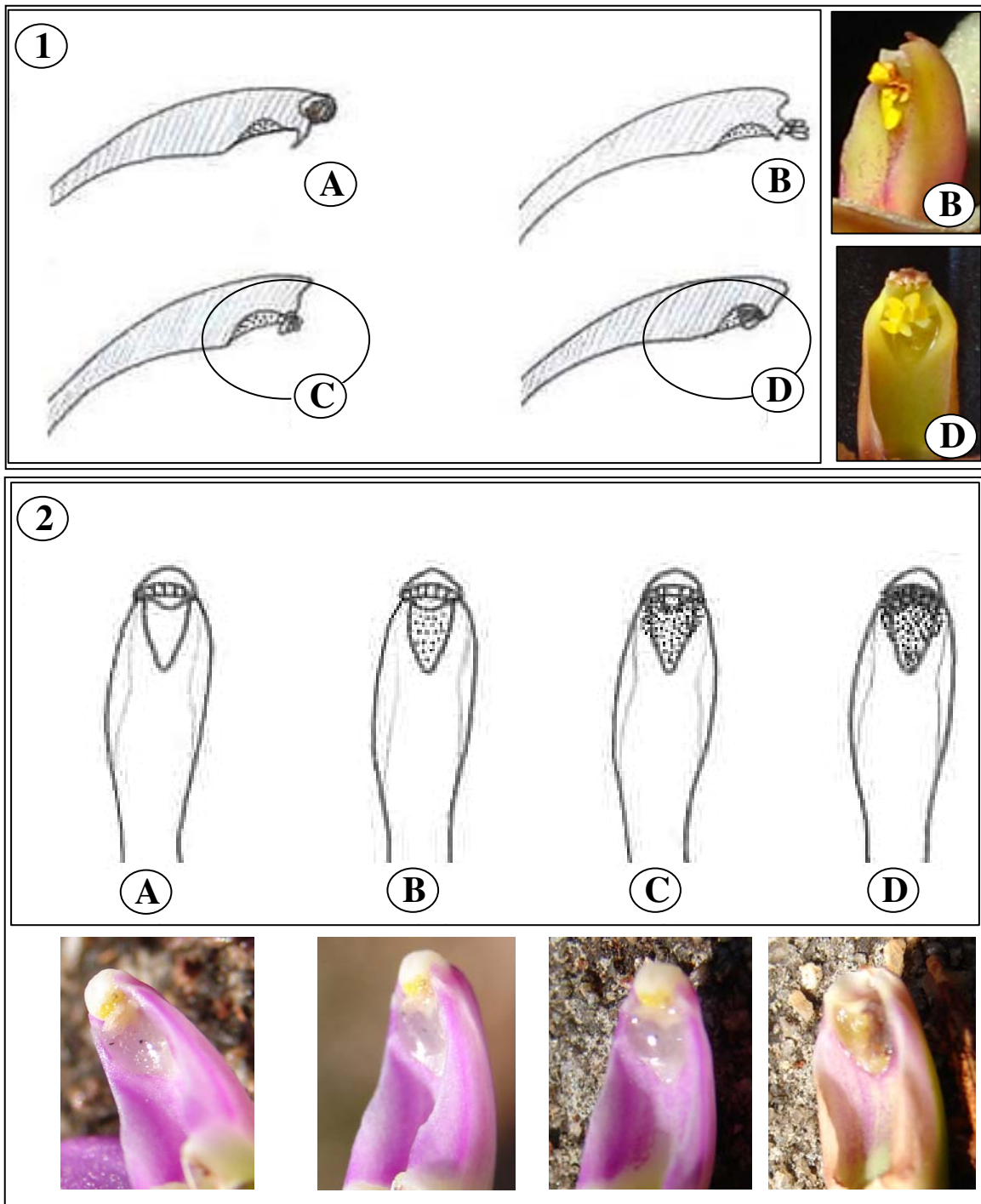


Figura 5. Mecanismos de autopolinização espontânea. **Mecanismo 1** – coluna floral logo após a antese (A); coluna logo após a perda da capa da antera (B); coluna floral, apresentando início do ressecamento do rostelo com polínias se dobrando em direção à cavidade estigmática (C); polínias em contato com a cavidade estigmática (D). **Mecanismo 2** – coluna floral logo após a antese (A); coluna com cavidade estigmática iniciando produção de secreção (B); cavidade estigmática com secreção tocando nas polínias (C); cavidade estigmática com grande acúmulo de secreção e polínias túrgidas, com grãos de pólen germinando (D).

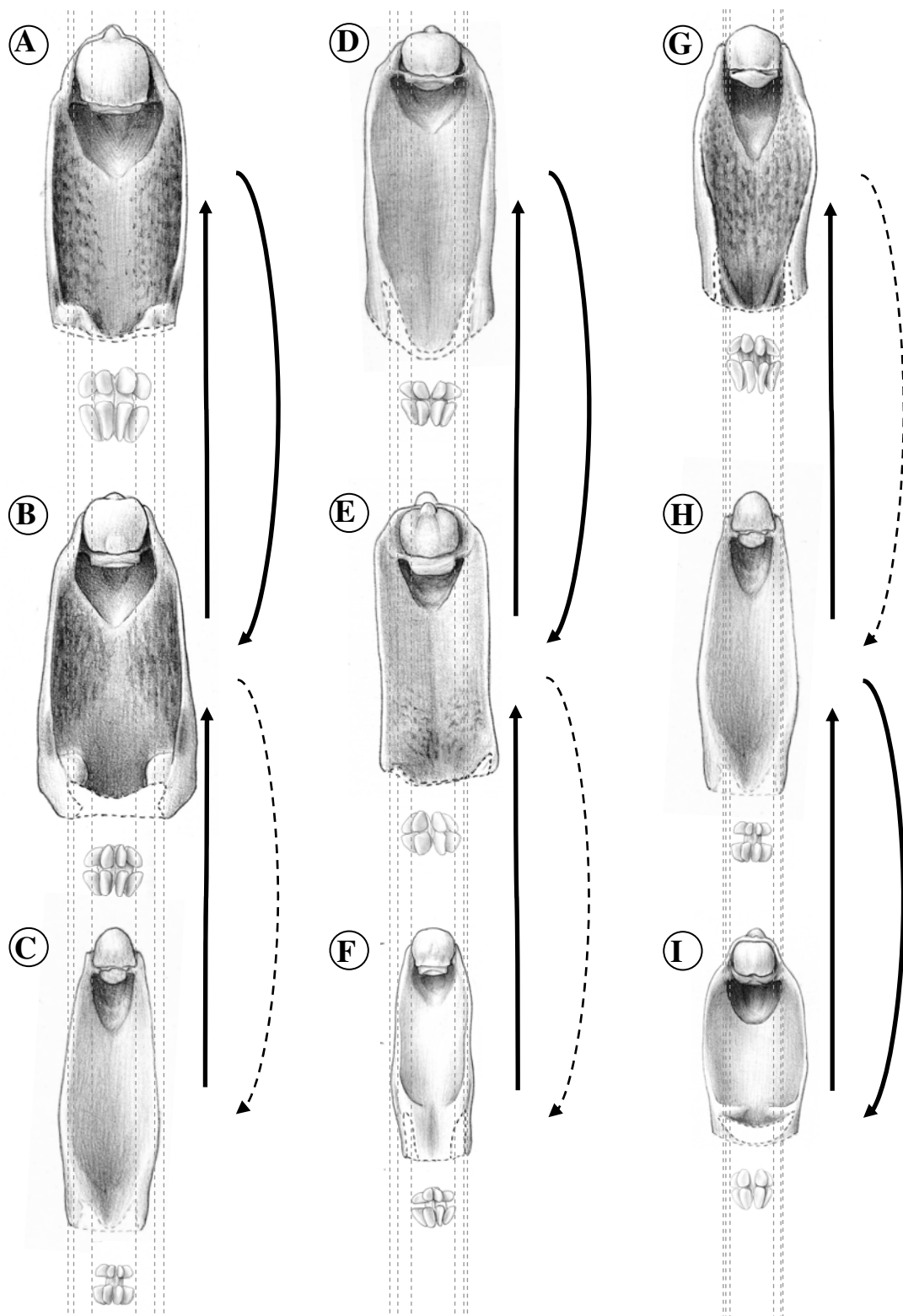


Figura 6. Barreiras mecânicas evitando a hibridação entre espécies sincronopátricas, determinada pela diferença tamanho das polínias em relação à largura da cavidade estigmática. *Hoffmannseggella angereri* (A); *H. rupestris* (B); *H. bradei* (C); *H. caulescens* (D); *H. crispata* (E); *H. liliputana* (F); *H. fourrieri* (G); *H. bradei* (H) e *H. ghillanyi* (I). As possibilidades de trocas estão representadas por setas. Setas contínuas indicam alta possibilidade de troca de polínias entre as respectivas espécies. Setas tracejadas indicam possibilidade baixa de troca de polínias. Ápice das setas representam a direção do cruzamento e espécie receptora.

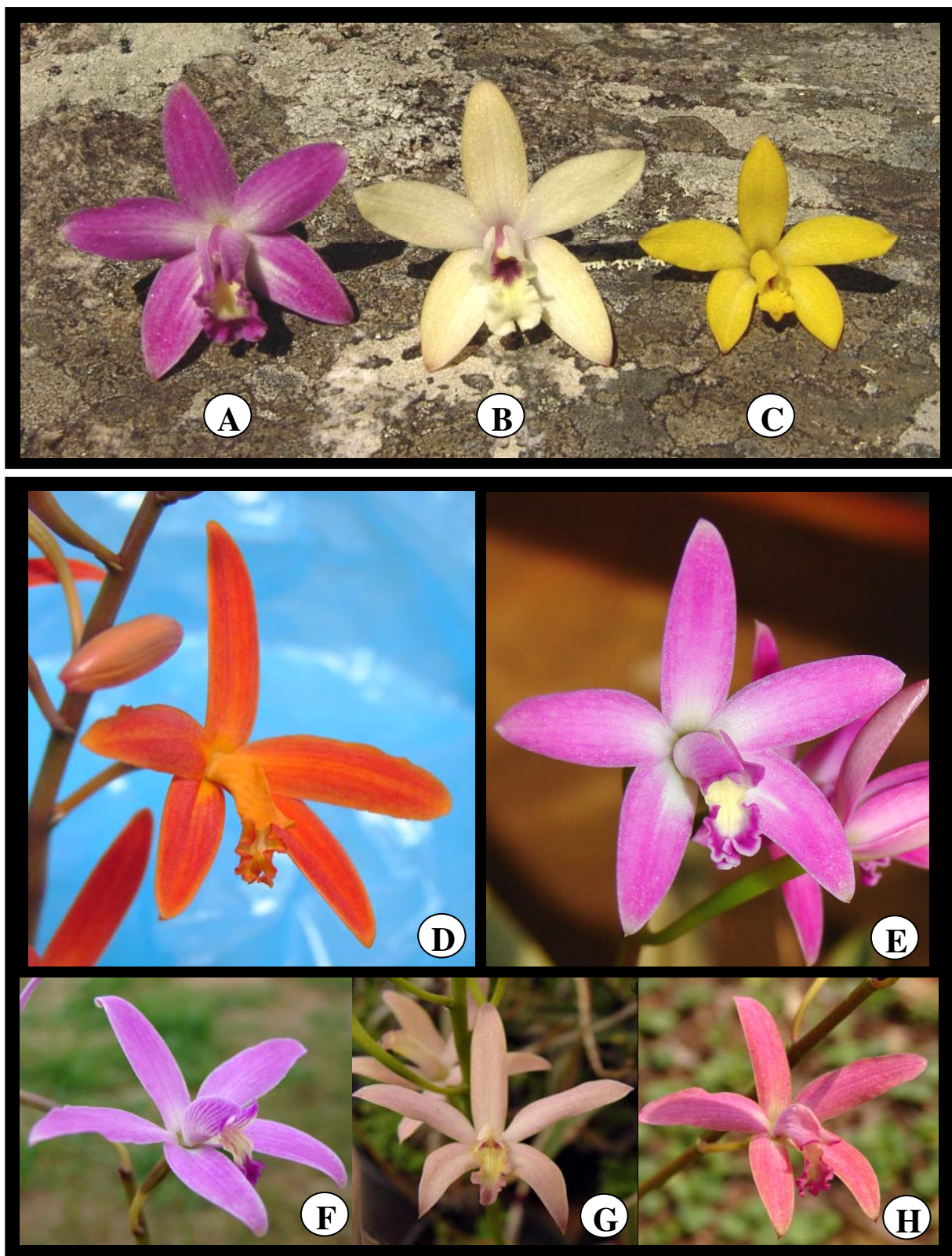


Figura 7. Híbridos observados “*in situ*” em áreas de ocorrência de espécies sincronopátricas. *Hoffmannseggella rupestris* (A); híbrido entre *H. rupestris* e *H. bradei* (B); *H. bradei* (C); *H. angereri* (D); *H. rupestris* (E); híbridos entre *H. angereri* e *H. rupestris* (F, G e H). Figuras A, B e C, fotografadas por Cláudio N. Fraga.

Sistemas de reprodução e potencial de hibridação em treze espécies de *Hoffmannseggella* H.G.Jones (Laeliinae:Orchidaceae), com notas sobre a quebra da auto-incompatibilidade em espécies poliplóides.

Resumo: Cruzamentos experimentais manuais, intra e inter-específicos foram realizados para determinar os sistemas de reprodução predominantes em 36 populações de 13 espécies de *Hoffmannseggella*. Dez espécies são predominantemente auto-incompatíveis, e três auto-compatíveis. Quatro das espécies, *H. angereri*, *H. bradei*, *H. caulescens* e *H. rupestris* podem apresentar populações com sistemas de reprodução diferentes, de completamente auto-compatíveis a incompatíveis. A maioria das espécies é fortemente alogâmica e não produz frutos por apomixia. A taxa de viabilidade de sementes não difere em cruzamentos intra e inter-populacionais e populações isoladas geograficamente não necessariamente são reprodutivamente isoladas. Cruzamentos inter-específicos revelaram que a maioria das espécies é inter-fértil, provando que em condições naturais a hibridação pode ocorrer desde que haja sobreposição geográfica e da fenologia de floração, uma vez que as espécies não possuem sistemas de polinização específicos. De acordo com os resultados obtidos, a auto-incompatibilidade é determinada por forte depressão endogâmica na maioria das espécies e populações. Alterações dos tubos polínicos na região do ovário, que ocorrem em frutos provenientes de autopolinizações, são similares às alterações observadas em espécies que apresentam mecanismos de auto-incompatibilidade gametofítica. Altas taxas de viabilidade de sementes em autopolinização foram observadas exclusivamente em espécies e populações poliplóides. A forte correlação entre poliploidia e auto-compatibilidade, aliada à forte depressão endogâmica observada em espécies diplóides, sugere que a supressão de alelos recessivos letais, devido à herança polissômica dos poliplóides, esteja envolvida com a redução da depressão endogâmica nestas espécies e populações de *Hoffmannseggella*. Ao contrário do observado em cruzamentos intra-específicos, o nível de ploidia não interfere na viabilidade de sementes em cruzamentos bidirecionais inter-específicos envolvendo diplóides e poliplóides, independentemente da espécie, população e direção dos cruzamentos.

Introdução

Espécies de orquídea são geralmente auto-compatíveis, sendo o isolamento reprodutivo dado principalmente por barreiras pré-polinização (Dodson, 1962; Dressler, 1968, 1981, 1993; Paulus & Gack, 1990; Tremblay *et al.*, 2005). Se estas barreiras são quebradas, a consequência normalmente é a formação de híbridos (Pijl & Dodson, 1966; Rossi *et al.*, 1992; Steiner *et al.*, 1994; Borba & Semir, 1998; Borba *et al.*, 1999, 2001; Tremblay *et al.*, 2005). A adaptação a polinizadores específicos geralmente não afeta a compatibilidade genética entre grupos (gêneros e espécies), ocorrendo pouca ou nenhuma mudança no nível cromossômico, o que pode causar especiação muito rápida em muitas espécies de orquídeas, mantendo a compatibilidade entre elas (Sanford, 1964; 1967; Pijl & Dodson, 1966; Stort, 1972; Stort & Pavanelli, 1986; Illg, 1975; Scacchi, *et al.*, 1990; Borba & Semir, 1998).

A ocorrência da auto-incompatibilidade em orquídeas tem sido descrita em diversas espécies de diferentes linhagens (Agnew, 1986; Stort & Martin, 1980; Johansen, 1990; East, 1940; Dieringer, 1982; Aragón & Ackerman, 2001; Whigham & O'Neil, 1991; Oh *et al.*, 2001; Parra-Tabla *et al.*, 2000; Ackerman, 1989; Christensen, 1992; Ackerman & Montero-Oliver, 1985; Borba *et al.*, 2001; Tremblay *et al.*, 2005) e parece ser predominante em espécies de Epidendroideae de regiões tropicais (Tremblay *et al.*, 2005), incluindo algumas espécies de *Hoffmannseggella* estudadas previamente (Stort & Galdino, 1984).

Em Orchidaceae, a compatibilidade entre espécies filogeneticamente próximas é normalmente mantida. Apesar da maior parte das espécies ser auto-compatível, a estrutura floral favorece fortemente a polinização cruzada (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981, 1993; Catling & Catling, 1991a; Borba & Semir, 1999; Borba *et al.*, 2001). Este sistema é bastante flexível, pois plantas isoladas ainda têm (pelo menos a princípio) a possibilidade da reprodução sexuada por auto-polinização e, mesmo, assexuada devido à longevidade dos indivíduos e reprodução vegetativa por brotamento. Estes fatores têm sido importantes em eventos de dispersão a longas distâncias, colonização de outros ambiente e especiação, seja ela por mutação ou hibridização.

Orquídeas são amplamente conhecidas pela especialização floral e adaptação a polinizadores específicos (Wallace, 2003). Cerca de 5% a 20% das espécies de orquídeas são capazes de se reproduzir através de mecanismos de autopolinização espontânea (Catling, 1990). De qualquer modo, a maioria das espécies é auto-compatível e apresenta uma série de barreiras pré-polinização evitando a auto-fertilização (van der Pijl & Dodson, 1966). Como em muitas

espécies de Angiospermas, a polinização cruzada em orquídeas pode ser garantida, também, através da ação de barreiras genéticas pós polinização, como por exemplo, depressão endogâmica (Wallace, 2003). Poucos são os estudos que enfocam os custos da depressão endogâmica em Orchidaceae. Os resultados destes estudos indicam uma variedade de respostas à depressão endogâmica, em que espécies capazes de auto-fertilização via autogamia ou facilitação da autopolinização, mostram poucas evidências de depressão endogâmica (Peakall & James, 1989; Ortiz-Barney & Ackerman, 1999; Alexandersson & Agren, 2000), ao contrário de espécies predominantemente xenogâmicas que exibem graus variados de depressão endogâmica (Nilsson, 1983; Johnson, 1994; Peakall & Beattie, 1996; Vallius, 2000; Borba *et al.*, 2001; Luyt & Johnson, 2001; Meléndez-Ackerman & Ackerman, 2001; Wallace 2003).

A magnitude da depressão endogâmica em uma determinada espécie é fortemente influenciada pela história demográfica e reprodutiva de cada uma de suas populações. Modelos clássicos de depressão endogâmica predizem que populações com histórico de isolamento geográfico e gargalo genético não são severamente afetadas pelos efeitos da depressão endogâmica, uma vez que alelos recessivos letais são repetidamente expostos à seleção natural (Lande & Schemske, 1985; Charlesworth & Charlesworth, 1987; Barrett & Charlesworth, 1991). Por outro lado, populações grandes e alogâmicas, adaptadas a elevadas taxas de fluxo gênico, são mais afetadas pelos efeitos da depressão endogâmica se o cruzamento entre aparentados se torna mais freqüentes (Lande & Schemske, 1985; Charlesworth & Charlesworth, 1987; Barrett & Charlesworth, 1991). Modelos teóricos mais recentes sugerem que a interação de fatores complexos, como efeitos genéticos, sistemas reprodutivos, tamanho populacional e o vigor da seleção natural agem conjuntamente na expressão de alelos recessivos letais (Byers & Waller, 1999). Uma vez que a predominância da alogamia é substituída pela predominância da autogamia como forma principal de reprodução, populações não aptas a burlar os efeitos da depressão endogâmica podem ser levadas à extinção (Wallace, 2003).

Depressão endogâmica pode agir como uma importante força seletiva atuando contra a evolução de sistemas reprodutivos que promovam autogamia (Lande & Schemske 1985; Husband & Schemske, 1997). Alguns trabalhos têm demonstrado que os efeitos da depressão endogâmica são reduzidos ou mesmo anulados através da poliploidia, levando à evolução da auto-compatibilidade e de sistemas autogâmicos em espécies poliplóides (Stebbins, 1950; Thompson & Lumaret, 1992; Johnston & Schoen 1996; Lande & Schemske 1985; Husband & Schemske, 1997; Contreras *et al.*, 2007).

No entanto, mesmo sabendo-se da alta frequência de espécies poliplóides em *Hoffmannseggella* (Blumenschein, 1960; Costa, 2006), e que a poliploidia é um importante mecanismo de especiação, uma vez que poliplóides podem expressar novos fenótipos que facilitam a diversificação ecológica e a ocupação de novos nichos (Otto & Whitton, 2000), não encontramos nenhum trabalho correlacionando os efeitos da poliploidia com a expressão da depressão endogâmica em Orchidaceae.

Tendo em vista o exposto acima, este trabalho descreve os sistemas de reprodução em 13 espécies de *Hoffmannseggella*, através de indivíduos provenientes de 36 populações naturais, ocorrentes nos campos rupestres brasileiros. Os principais objetivos deste trabalho foram: i-) investigar se existem mecanismos genéticos envolvidos na prevenção da auto-fecundação; ii-) investigar o potencial reprodutivo em cruzamentos provenientes de autopolinização, polinização cruzada intrapopulacional e o potencial de intercâmbio genético entre diferentes populações de uma mesma espécie; iii-) verificar a existência de barreiras prevenindo a hibridização entre espécies sincronopátricas; iv-) investigar a influência da poliploidia sobre os sistemas de reprodução das espécies estudadas.

Material e métodos

Foram coletados, em 36 populações naturais, indivíduos de 13 espécies de *Hoffmannseggella* nos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo (Tabela 1, Figura 1), os quais foram mantidos em casa de vegetação do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas (22°49'S; 47°06'W; ca. 700m alt.). Somente fragmentos (três pseudobulbos) dos indivíduos foram coletados, minimizando, desta forma, danos às populações naturais, pois as populações, muitas vezes, são pequenas e/ou microendêmicas. O material testemunho das espécies e populações estudadas foi depositado no herbário UEC. Foram atribuídos códigos específicos para as diferentes populações e indivíduos para facilitar a manipulação dos dados (Tabela 1, Figura 2).

Quatro tipos de tratamentos manuais experimentais foram realizados para cada espécie, como receptora de pólen: autopolinização, polinização cruzada intra-específica intra-populacional, polinização cruzada intra-específica inter-populacional, polinização cruzada inter-específica. Experimentos controlados complementares foram realizados para verificar a ocorrência de agamospermia (flores ensacadas e emasculadas) e autopolinização espontânea

(flores ensacadas não emasculadas). Todos os cruzamentos foram realizados em flores no primeiro dia de antese e aleatoriamente nas inflorescências, evitando a utilização de mais de cinco flores por inflorescência. O número de cruzamentos variou entre os tratamentos e as espécies, dependendo da disponibilidade de flores (Tabela 2).

O tempo de desenvolvimentos dos frutos e/ou aborto de flores tratadas em condições experimentais foi obtido através de visitas regulares em casa de vegetação.

Frutos maduros e flores/frutos abortados após os tratamentos foram coletados e fixados em FAA 50%. Para cada fruto maduro coletado foi examinada uma amostra de 300 sementes e calculado o percentual de sementes viáveis, a partir das características morfológicas. Sementes com embrião rudimentar ou sem embrião foram consideradas inviáveis e sementes com embrião bem desenvolvido foram consideradas viáveis. Testes preliminares foram realizados para verificar se a viabilidade poderia ser acessada através da morfologia das sementes. Para isso, amostras de sementes recém coletadas foram submersas em uma solução a 1% de 2,3,5-trifeniltetrazólio clorido. Embriões bem formados ficaram corados de vermelho, enquanto embriões rudimentares e mal formados não. As lâminas foram montadas com cerca de três gotas da solução precipitada contendo as sementes fixadas e, posteriormente, observadas em microscopia convencional com aumento de 20X.

As diferenças nas taxas de viabilidade de sementes obtidas nos diferentes tipos de tratamentos experimentais intra-específicos foram testadas através de Análise de Variância (ANOVA um fator) e teste de Tukey com comparações múltiplas a posteriori, com dados previamente transformados em arcoseno (Zar, 1999).

Para definição do sistema de reprodução predominante em cada uma das espécies e populações, foi aplicado um índice de auto-incompatibilidade (IAI) calculado pela seguinte função:

$$IAI = XA (\%) / XC (\%) * 100$$

$XA (\%) = \% \text{ média de viabilidade de sementes em autopolinização};$

$XC (\%) = \% \text{ média de viabilidade de sementes em polinização cruzada}.$

Espécies e populações com $IAI \leq 25$ foram consideradas auto-incompatíveis. No caso das espécies, o índice foi extrapolado a partir da média das médias obtidas em cada população (adaptado de Bullock, 1985).

Para acompanhar o desenvolvimento dos frutos e os eventos relacionados que ocorrem após a polinização, como desenvolvimento de placenta, óvulos, tubos polínicos e fecundações, flores de cada espécie foram submetidas a tratamentos de autopolinização e polinização cruzada intra-específica intra-populacional. Após a polinização, o crescimento dos frutos foi interrompido a cada 24 horas nos primeiros 60 dias de desenvolvimento e, posteriormente, a cada 10 dias, até o final da maturação. Todo material coletado foi fixado em FAA 50% por 48 horas, e estocado em álcool etílico 50%. Frutos previamente tratados foram lavados em água destilada por seis vezes e imersos em NaOH comercial por 7 horas, lavados novamente, corados com azul de anilina, e observados e fotografados sob microscopia de fluorescência (modificado de Martin, 1959).

Para verificar a sobreposição das populações parentais e locais de ocorrência dos híbridos, foi realizado um levantamento de literatura atualizada, herbários e acompanhamento das populações naturais.

Para verificar os efeitos da poliploidia sobre os sistemas reprodutivos das espécies de *Hoffmannseggella* estudadas, a viabilidade de sementes em cruzamentos experimentais deste trabalho foi comparada com o nível de ploidia apresentado por cada uma das espécies e populações, que foi compilada dos trabalhos previamente citados. Os efeitos do nível de ploidia (diplóides e poliplóides) sobre a viabilidade de sementes obtidas nos diferentes tipos de tratamentos (autopolinização, polinização cruzada intra-específica intra-populacional, polinização cruzada intra-específica interpopulacional e cruzamentos interespecíficos) foram verificados através de Análise de Variância (ANOVA dois fatores). As interações com efeitos significativos ($P \leq 0.001$) foram posteriormente comparadas através de Análise de variância (ANOVA um fator) com teste de Tukey a posteriori (Zar, 1999).

Resultados

Taxa de frutificação e abortos espontâneos

Cruzamentos intra-específicos

O tempo de fenecimento em flores autopolinizadas que não iniciaram o desenvolvimento de frutos variou pouco entre as espécies e populações, no mínimo de nove dias em *H. briegei* até o máximo de 19 dias em *H. rupestris*.

Oito espécies (61.5%) produziram frutos espontaneamente: *H. angereri*, *H. briegei*, *H. caulescens*, *H. crispata*, *H. fournieri*, *H. ghillanyi*, *H. liliputana* e *H. rupestris*. No entanto, a ocorrência de autopolinização espontânea ocorreu em uma pequena parcela dos indivíduos dentro de cada população (aproximadamente 0,1%). Mesmo com a ocorrência de autopolinização espontânea, sua baixa frequência revela que a visita de polinizadores é essencial para a formação de frutos. A apomixia não foi observada em flores emasculadas e ensacadas.

O tempo de maturação dos frutos formados em autopolinizações, geralmente, foi 1-2 meses menor que em frutos formados em polinizações cruzadas intra-específicas e variou de acordo com as espécies e populações. A completa maturação de frutos provenientes de autopolinizações levou cerca de: 4 meses em *H. ghillanyi*; 5-6 meses em *H. endsfeldzii*, *H. fournieri*, *H. gracilis*, *H. liliputana* e *H. longipes*; 7-8 meses em *H. angereri*, *H. bradei*, *H. caulescens*, *H. cinnabarina* e *H. crispata*; 10 meses em *H. briegei*; e de 12-14 meses em *H. rupestris*. Em polinizações cruzadas intra-específicas, o tempo de maturação dos frutos variou de: 7-8 meses em *H. fournieri*, *H. gracilis* e *H. longipes*; 9 meses em *H. angereri*, *H. bradei*, *H. caulescens*, *H. cinnabarina*, *H. crispata*, *H. endsfeldzii* e *H. ghillanyi*; 10 meses em *H. liliputana*; 11 meses em *H. briegei*; e 12-16 meses em *H. rupestris*.

Espécies poliplóides (Tabela 1) apresentaram tempo de maturação de frutos similar em autopolinizações e polinizações cruzadas intra-específicas, ao contrário de espécies diplóides, nas quais o tempo de maturação de frutos foi relativamente menor no tratamento de autopolinização. Os resultados das polinizações manuais efetuadas para as espécies de *Hoffmannseggella* e o percentual de frutificação em todos os cruzamentos estão resumidos no Apêndice 1.

Em todos os tipos de cruzamentos intra-específicos a taxa de frutificação foi elevada. Os dados de frutificação estão sumarizados no Apêndice 1.

A taxa de abortos espontâneos em todos os tipos de tratamentos intra-específicos foi reduzida, na maioria das vezes abaixo de 20%. Não houve uma relação direta do tipo de tratamento efetuado sobre a taxa de frutificação e/ou abortos espontâneos. Dado este resultado homogêneo, todas as análises sobre os sistemas de reprodução foram feitas a partir da taxa de viabilidade de sementes obtidas em condições experimentais. Os dados de abortos espontâneos em cruzamentos experimentais estão sumarizados no Apêndice 1.

Cruzamentos inter-específicos

A taxa de frutificação em cruzamentos inter-específicos variou entre os diferentes pares de espécies (0-100%) e populações (48-100%), chegando a superar, muitas vezes, taxas de frutificação em cruzamentos intra-específicos (Apêndice 1). Valores extremos foram observados em uma das direções dos seguintes cruzamentos: *H. fournieri* x *H. bradei* e *H. liliputuna* x *H. fournieri* (0%); *H. angereri* x *H. rupestris* (40%); e *H. fournieri* x *H. crispata* (50%), sendo acima de 75% em cruzamentos bidirecionais envolvendo as demais espécies (Apêndice 1).

Flores que receberam cruzamentos interespecíficos e não iniciaram o desenvolvimento dos frutos, murcharam e feneceram entre 7 e 12 dias após a polinização. Em cruzamentos inter-específicos o tempo de maturação dos frutos foi semelhante ao tempo de maturação observado em cruzamentos xenogâmicos intra-específicos, e foi determinado pela espécie que recebeu a carga de pólen, ou seja, pelo componente feminino da flor.

A taxa de abortos espontâneos em polinizações inter-específicas variou de acordo com os pares de espécies considerados, sendo os valores mais expressivos, observados em cruzamentos envolvendo *H. fournieri*/CL02 x *H. crispata*/CL13AB e *H. angereri*/CL27 x *H. rupestris*/CL06 (Apêndice 1).

Assim como observado nos cruzamentos intra-específicos, a taxa de frutificação e/ou de abortos espontâneos foi homogênea, não sendo possível observar nenhuma diferença significativa entre os tratamentos, impossibilitando qualquer inferência sobre os sistemas reprodutivos baseados nestes valores.

Viabilidade de sementes

A viabilidade de sementes foi analisada com base em taxas obtidas através de amostras provenientes de 470 frutos formados em autopolinizações, 518 em polinizações cruzadas intra-específicas intra-populacionais, 234 em polinizações cruzadas intra-específicas inter-populacionais e 276 em polinizações cruzadas inter-específicas, perfazendo um total de 1.498 frutos e, aproximadamente 449.400 sementes analisadas (Tabelas 2, 3 e 4).

Autopolinizações

Os frutos formados em autopolinizações manuais, na maioria das vezes, apresentaram percentuais reduzidos de viabilidade de sementes. Dez das espécies (*H. angereri*, *H. bradei*, *H. cinnabarina*, *H. crispata*, *H. endsfeldzii*, *H. fournieri*, *H. ghillanyi*, *H. gracilis*, *H. liliputana* e *H. longipes*) apresentaram viabilidade média de sementes entre 0-8% em autopolinizações (Tabela 2). Em *H. briegeri*, *H. caulescens* e *H. rupestris* a taxa média de viabilidade de sementes em autopolinização foi elevada, entre 18-52,4% dependendo da espécie (Tabela 2).

Grandes variações na viabilidade de sementes em autopolinização foram observadas entre populações de quatro das espécies analisadas, de 1,3-14,6% em *H. angereri* (populações CL27 e CL28, respectivamente), de 4,1-21,5% em *H. bradei* (populações CL05A e CL08B, respectivamente), de 0-28,3% em *H. caulescens* (populações CL19 e CL16, respectivamente) e de 1,3-66,6% em *H. rupestris* (populações CL40 e CL04, respectivamente) (Tabela 2).

Frutos obtidos de autopolinizações, na maioria das espécies analisadas, apresentaram grande parte das sementes inviáveis, sem embrião e, na maioria das vezes, com embriões rudimentares e em diferentes estádios de desenvolvimento.

Polinizações cruzadas intra-específicas intra-populacionais

A viabilidade de sementes em frutos formados em cruzamentos intra-específicos intra-populacionais, variou em média de 7,6% em *H. gracilis* a 64,6% em *H. crispata*. Entre populações da mesma espécie, a taxa de viabilidade de sementes foi relativamente homogênea e poucas vezes inferior a 50%. Algumas espécies apresentaram taxa de viabilidade significativamente diferente (Anova um fator; $P > 0,001$) entre populações, de 8,7-59,2% em *H.*

fournieri (populações CL35 e CL25, respectivamente) e de 12,9-75,6% em *H. rupestris* (populações CL40 e CL04, respectivamente) (Tabela 2).

Neste tipo de tratamento, na maioria das espécies, a viabilidade de sementes foi significativamente maior que as taxas observadas em tratamentos de autopolinização (Anova um fator; $P > 0,001$) (Tabela 2). Três espécies, *H. briegei*, *H. gracilis* e *H. rupestris*, uma população de *H. angereri* (CL28), uma de *H. bradei* (CL08B), uma de *H. caulescens* (CL16) e uma de *H. fournieri* (CL35) apresentaram taxas de viabilidade de sementes significativamente iguais em autopolinização e polinização cruzada intra-específica intra-populacional (Anova um fator; $P < 0,001$) (Tabela 2).

As sementes consideradas viáveis, provenientes de frutos formados por polinizações cruzadas intra-específicas intra-populacionais, apresentaram embriões bem desenvolvidos com poucas sementes inviáveis, sendo estas últimas, na maioria das vezes, sem embrião.

Polinizações cruzadas intra-específicas inter-populacionais

Os frutos formados a partir de polinizações cruzadas intra-específicas inter-populacionais, geralmente apresentaram altas taxas de viabilidade de sementes, e variaram, em média, de 34,6% em *H. fournieri* a 69,5% em *H. rupestris*. Algumas vezes a taxa de viabilidade de sementes neste tipo de tratamento superou as taxas obtidas em cruzamentos intra-populacionais (Tabela 2).

Na maioria das espécies, não houve diferença significativa entre a viabilidade de sementes observada em cruzamentos intra-específicos intra-populacionais e cruzamentos intra-específicos inter-populacionais (Anova um fator; $P < 0,001$). Duas espécies representaram exceções a esta regra. Nelas, uma das populações analisadas apresentou diferenças significativas entre cruzamentos intra-específicos intra-populacionais e inter-populacionais. Em *H. ghillanyi* a taxa de viabilidade de sementes foi menor (população CL12 - Anova um fator; $P > 0,001$) e em *H. rupestris* maior (população CL40 - Anova um fator; $P > 0,001$) em cruzamentos intra-específicos inter-populacionais (Tabela 2).

As sementes oriundas deste tipo de cruzamento apresentaram-se desenvolvidas e com embriões bem formados. Sementes consideradas inviáveis não apresentaram embriões.

A interação entre os resultados obtidos em cruzamentos intra-específicos está resumida na Figura 2.

Polinizações cruzadas inter-específicas

Frutos formados por polinizações inter-específicas apresentaram taxas variáveis de viabilidade de sementes entre os diferentes pares de espécies, mas de maneira geral foram elevadas (Tabela 3). Somente alguns cruzamentos tiveram taxa de viabilidade reduzida, principalmente quando *H. briegei*, *H. longipes* e *H. liliputana* foram os doadores de pólen para qualquer uma das espécies (0-0,8%), e em cruzamentos bidirecionais entre *H. caulescens* x *H. endsfeldzii* (0-2,8%) e *H. fournieri* x *H. liliputana* (0-13,4%). Os demais cruzamentos tiveram taxa de viabilidade entre 25,2% e 91,6%, chegando, muitas vezes, a ultrapassar as taxas observadas em polinizações cruzadas intra-específicas (Tabelas 2 e 3).

As sementes provenientes deste tipo de cruzamento foram viáveis e apresentaram embriões bem desenvolvidos; as inviáveis, na maioria das vezes, estavam sem embrião.

Viabilidade de sementes em populações naturais

A média de viabilidade de sementes em frutos coletados em populações naturais variou de 21,5% em *H. fournieri* a 78,5% em *H. liliputana*, e foi muito semelhante aos resultados observados em frutos provenientes de polinizações cruzadas intra-específicas intra-populacionais. As taxas mais discrepantes de viabilidade de sementes, entre frutos formados em populações naturais e frutos obtidos em condições experimentais, foram observadas nas populações de *H. fournieri* (populações CL02B e CL35), *H. rupestris* (populações CL04 e CL07) e *H. endsfeldzii*. Os resultados estão sumarizados na Tabela 4.

Duas populações de *H. fournieri* (CL02B e CL25), uma de *H. rupestris* (CL40) e a única população conhecida de *H. gracilis*, apresentaram taxas muito reduzidas e críticas de viabilidade de sementes em condições naturais, que na maioria das vezes assemelharam-se às taxas de viabilidade de sementes observadas em frutos provenientes de autopolinização em condições experimentais.

As sementes consideradas viáveis, oriundas de frutos coletados em populações naturais, apresentaram embriões bem desenvolvidos.

Poliembrionia

Sementes com dois embriões (poliembriões – Fig. 4N) ocorreram com baixa frequência e em todos os tipos de cruzamentos realizados. Poliembrionia foi mais frequente em amostras provenientes de polinizações cruzadas inter-específicas (16,2%) e polinizações cruzadas intra-específicas intra-populacionais (13,4%), mas ocorreu também em polinizações cruzadas intra-específicas inter-populacionais (8,3%) e em autopolinizações (5,6%). Em todos os casos, a poliembrionia ocorreu em cruzamentos envolvendo *H. angereri*, *H. caulescens*, *H. crispata* e *H. rupestris*.

Índice de auto-incompatibilidade

Dentre as espécies estudadas, *H. briegeri*, *H. caulescens* e *H. rupestris* foram predominantemente auto-compatíveis (Tabela 2). Uma população de *H. angereri* (CL28), uma de *H. bradei* (CL08B), uma de *H. caulescens* (CL19) e uma de *H. rupestris* (CL40) foram consideradas auto-incompatíveis (Tabela 2). As demais espécies e populações foram consideradas completamente auto-incompatíveis (Tabela 2).

Desenvolvimento do óvulo: megasporogênese e megagametogênese

Neste trabalho foram estudadas 12 espécies de *Hoffmanseggella*. Devido ao número elevado de espécies estudadas, bem como à pequena variação de tempo no desenvolvimento de cada estrutura durante os processos de desenvolvimento do megasporófito em cada espécie, a descrição dos eventos será dada em linhas gerais e em tempos médios de ocorrência de cada um.

Em todas as espécies estudadas o processo de megasporogênese ocorreu somente após o processo de polinização. Antes da polinização, a região do ovário apresentou somente primórdios placentários, que originaram posteriormente o tecido arquesporial. As primeiras divisões celulares que deram origem aos primórdios de óvulo ocorreram somente após o trigésimo dia depois da polinização. Na região da placenta, as células se dividiram e deram origem a uma protuberância axial com oito a nove células nucleares, cobertas por uma epiderme simples de uma camada (Fig. 3A). As células terminais da coluna nucelar sofreram divisões simultâneas, seguidas de expansão celular, que deram origem ao arqueósporo (Fig. 3A). Na região externa, a formação dos tegumentos e epiderme nucelar foi evidente (Fig. 3A). A região do funículo

continuou a se desenvolver, com crescimento diferencial das células das regiões ventral e dorsal, que causou o curvamento do megásporo em direção à placenta, que assumiu a posição anátropa (Fig. 3A). Nesta fase a célula mãe do megásporo foi evidente (Fig. 3C), e se tornou maior e alongada com um grande núcleo, quando ocorreu a primeira divisão do megásporo (Fig. 3D). Concomitante ao desenvolvimento da célula mãe do megásporo, ocorreu o desenvolvimento dos tegumentos, interno e externo, e o mais interno recobriu a epiderme do nucelo (Fig. 3B). O crescimento do tegumento interno deu origem à micrópila (Fig. 3B). As duas células da primeira divisão do megásporo se dividiram transversalmente, dando origem a um conjunto de quatro células alinhadas longitudinalmente (Fig. 3E) o que completou o processo de megasporogênese.

O processo de megagametogênese se iniciou quando três das células degeneraram, e a célula apical do megásporo aumentou de tamanho tornando-se elíptica e com grande conteúdo citoplasmático, quando o núcleo sofreu a primeira divisão mitótica, dando origem a uma célula com dois núcleos (Fig. 3F). Os núcleos sofreram mais duas divisões mitóticas e deram origem a uma grande célula com oito núcleos (Fig. 3G-H). Nesta fase, ocorreu uma reorganização dos núcleos. Após a formação da membrana, três dos núcleos migraram para o pólo apical (antípodas), três deles para o pólo basal (o maior deu origem à oosfera, os dois menores laterais deram origem às sinérgides), e dois se posicionaram um pouco acima da oosfera (núcleos polares) (Fig. 3I). Após esta fase os núcleos polares degeneraram (Fig. 3J) e o processo se completou, dando origem ao saco embrionário maduro (Fig. 3J). Nesta fase, se o saco embrionário for fertilizado, as antípodas darão origem, posteriormente, ao suspensor do embrião (Fig. 4L) e a degeneração dos núcleos polares dará origem a sementes sem endosperma (Fig. 4M). Os processos que levaram à formação dos óvulos não ocorreram simultaneamente no ovário, mas se iniciaram por volta do trigésimo dia após a polinização. Por volta do sexagésimo dia foi possível observar, dentro de um único carpelo, todas as fases de desenvolvimento, do início da megasporogênese até a formação do saco embrionário.

Todos os processos de desenvolvimento dos óvulos ocorreram independentemente do tipo de tratamento efetuado, seja ele autopolinização, polinização cruzada intra-específica ou polinização inter-específica. Não houve diferença entre o tempo de desenvolvimento dos óvulos e o tipo de tratamento.

Crescimento do tubo polínico e processo de fertilização

O processo de início da germinação dos tubos polínicos ocorreu entre 3 e 5 dias após deposição das polínias na cavidade estigmática (Fig. 4A). O feixe de tubos polínicos levou de 7-10 dias (polinizações cruzadas – Fig. 4B) a 10-14 dias (autopolinizações) para alcançar o final do canal estigmático (estilete) (Fig. 4B). A morfologia dos tubos polínicos neste estágio de desenvolvimento foi semelhante em todos os tratamentos. De 15 a 20 (algumas vezes 25) dias após a polinização, os tubos polínicos alcançaram o início do ovário. Nesta fase, após a entrada no ovário, os tubos polínicos passaram a crescer mais lentamente.

Em polinizações cruzadas o crescimento do tubo polínico foi normal e alcançou o meio do ovário entre o vigésimo quarto e trigésimo dia (Fig. 4C). Em frutos provenientes de autopolinização, a partir do vigésimo quarto e até o trigésimo segundo dia, os tubos polínicos passaram a apresentar sinais de deformação no primeiro terço do ovário, com início de deposição de calose e morfologia alterada (Fig. 4D). Em todos os tratamentos, os tubos polínicos alcançaram o final do ovário por volta do sexagésimo dia, quando os óvulos estavam completando o processo de diferenciação. Em autopolinizações, as fertilizações foram raras, mas ocorreram mesmo com grande deformação dos tubos polínicos. Em geral, os tubos polínicos estavam tão comprometidos e com morfologia tão alterada que paravam de crescer (Fig. 4E-F). Algumas vezes foi possível ver os tubos polínicos entrando na micrópila, mas saíam novamente, chegando a estourar (Fig. 4G). Em frutos provenientes de polinizações cruzadas (qualquer tipo) as fertilizações ocorreram entre 60 e 80 dias após a polinização (Fig. 4H a J). As primeiras divisões do zigoto ocorreram pouco tempo depois da fertilização (Fig. 4K). O tempo de desenvolvimento dos embriões e, por consequência, o tempo de maturação dos frutos, variou em cada espécie, mas de modo geral, os processos de fertilização e crescimento de tubos polínicos foram semelhantes em todas elas.

Espécies auto-compatíveis apresentaram processos de crescimento de tubo polínico, fertilização e desenvolvimento de embriões exatamente iguais em autopolinizações e polinizações cruzadas intra-específicas. Em espécies auto-incompatíveis, grande parte dos poucos embriões formados foi abortada ao longo do desenvolvimento dos frutos em diferentes estágios de desenvolvimento. Óvulos fecundados deram origem a sementes normais e bem desenvolvidas (principalmente em polinização cruzada - Fig. 4L). Independente do tipo de cruzamento, óvulos não fertilizados ou aqueles fertilizados e abortados, continuavam a desenvolver a capa da

semente (derivada do tegumento externo – Fig. 4O) dando origem a uma semente sem embrião ou com embrião rudimentar (Fig. 4M).

Viabilidade de sementes, auto-incompatibilidade e poliploidia

A taxa de viabilidade de sementes em frutos provenientes de autopolinização e polinização cruzada intra-específica foi comparável entre espécies e populações diplóides e poliplóides (Tabelas 1 e 2). Em espécies e populações diplóides houve grande diferença na taxa de viabilidade de sementes entre os dois tratamentos (Anova dois fatores; $P \geq 0,001$), baixa viabilidade em autopolinizações e alta em polinizações cruzadas intra-específicas (Tabela 2, Fig. 5). Por outro lado, em espécies e populações poliplóides a taxa de viabilidade de sementes foi elevada, tanto em autopolinizações, como em polinizações cruzadas intra-específicas (Tabela 2, Fig. 5) e não diferiu significativamente entre os dois tratamentos (Anova dois fatores; $P \leq 0,001$). Portanto, a quebra da auto-incompatibilidade está intimamente relacionada com o nível de ploidia em espécies e populações de *Hoffmannseggella*, nas quais espécies ou populações diplóides são predominantemente auto-incompatíveis e espécies poliplóides são predominantemente auto-compatíveis (Fig. 5).

A influência do nível de ploidia foi testada também em cruzamentos inter-específicos (Fig. 6). Em cruzamentos inter-específicos, a viabilidade de sementes não diferiu significativamente (Anova um fator; $P \leq 0,001$) em relação ao nível de ploidia dos pares de espécies envolvidos nos cruzamentos (Fig. 6), e nem em relação ao nível de ploidia e a direção do cruzamento tendo diplóide ou poliplóide como doador ou receptor de pólen de espécies diplóides ou poliplóides (Anova um fator; $P \leq 0,001$) (Fig. 6). Portanto, o nível de ploidia não interfere na viabilidade de sementes em cruzamentos inter-específicos (Fig. 6).

Discussão

Origem e evolução de sistemas de reprodução em Hoffmannseggella

Padrões de modos de reprodução nas Angiospermas são diversos e resultam de interações ecológicas complexas entre fatores ambientais, polinizadores e vetores de pólen, bem como de características florais das espécies (Barret & Hander, 1996; Holsinger, 1996; Barret *et al.*, 2000),

que apresentam uma série de adaptações morfológicas e fisiológicas como forma de prevenir a auto-fecundação (Barret, 1998).

Entre as barreiras fisiológicas mais generalizadas e efetivas na prevenção da auto-fecundação está a auto-incompatibilidade (Sage *et al.*, 2000). Auto-incompatibilidade é um processo que resulta no reconhecimento e rejeição de pólen próprio ou relacionado, funcionando como mecanismo promotor de alogamia e heterozigosidade (de Nettancourt, 1977).

Sistemas de autoincompatibilidade são muito diversos (de Nettancourt, 1977), sendo entre eles, os mais estudados o “GSI” – sistema de incompatibilidade homomórfico gametofítico e “SSI” – sistema de incompatibilidade homomórfico esporofítico (Sage *et al.*, 2000). As maiores forças de seleção que governam a evolução floral, bem como as estratégias reprodutivas, são depressão endogâmica, dispersão efetiva do pólen, garantia de reprodução e máxima alocação de recursos para funções reprodutivas dos componentes masculino e feminino (Charlesworth & Charlesworth, 1987; Holsinger, 1996).

Segundo Borba *et al.* (2001) a expressão da total auto-incompatibilidade e da total auto-compatibilidade em uma determinada espécie ou população, nada mais é do que a representação de extremos de um contínuo muitas vezes de difícil detecção. Poucas espécies se enquadram exatamente nestes extremos (Schemske & Lande, 1985; Borba *et al.*, 2001) e muitos índices e métodos vêm sendo utilizados para estabelecer limites entre estas condições. Na maioria das vezes, os limites são estabelecidos com base em taxas de frutificação e, menos frequentemente, viabilidade de sementes (Bawa, 1979; Zapata & Arroyo, 1978; Sobrevilla & Arroyo, 1982; Jaimes & Ramirez, 1999), no entanto os limites são arbitrários (Borba *et al.*, 2001).

De acordo com os limites fixados neste trabalho, com base na viabilidade das sementes obtidas em cruzamentos intra-específicos, a maioria das espécies e populações analisadas (exceto espécies poliplóides) é auto-incompatível. O comportamento dos tubos polínicos em frutos provenientes de autopolinização é homogêneo no tempo de reação e semelhante ao comportamento observado em espécies que apresentam mecanismo de auto-incompatibilidade homomórfico gametofítico (de Nettancourt, 1977; Dafni & Calder, 1987; Richards, 1997). Nas espécies aqui estudadas, apesar de semelhante no tipo de reação, o local em que a auto-incompatibilidade se manifesta é diferente do observado em outras espécies vegetais, ocorrendo na região do ovário e micrópila. Mesmo com a ocorrência das reações de incompatibilidade

típicas, o número de fertilizações observadas em espécies de *Hoffmannseggella* estudadas sugere que outros mecanismos estejam envolvidos na prevenção de autofertilizações.

O elevado número de sementes sem embrião e de embriões abortados em diferentes estádios de desenvolvimento observados em frutos de autopolinização, sugere a ocorrência de depressão endogâmica nestas espécies. Mecanismos pós-zigóticos, como a presença de alelos recessivos letais, resultam em ausência ou baixa formação de sementes viáveis e aborto em diferentes estádios de desenvolvimento (Seavey & Bawa, 1986; Johansen, 1990; Tremblay, 1994;). Estudos sugerem que mutações letais tendem a ocorrer em estádios iniciais do desenvolvimento (Templeton & Read, 1983). Segundo Husband & Schemsk (1996), depressão endogâmica em uma população natural é observada, geralmente, durante o desenvolvimento dos óvulos, a maturação das sementes ou nos estádios de crescimento ou reprodução, raramente na germinação. Depressão endogâmica em estádios iniciais do desenvolvimento, como aborto de embriões, tem sido demonstrada em várias espécies de Orchidaceae (Loch & Profita, 1975; Stort, 1972; Stort & Martins, 1980; Cattling, 1982; Matias *et al.*, 1996; Borba *et al.*, 2001), inclusive em espécies de *Hoffmannseggella* previamente estudadas (Stort & Galdino, 1984).

Este tipo de reação, na qual o mecanismo de auto-incompatibilidade ocorre em conjunto com depressão endogâmica como forma de evitar a endogamia, não é comum, no entanto, alguns autores têm descrito mecanismos semelhantes aos aqui observados, em Bignoniaceae (Bertin *et al.*, 1989), Fabaceae (Gibbs & Sassaki, 1998), e espécies de Orchidaceae ocorrentes nos campos rupestres brasileiros (Borba *et al.*, 2001).

O nível de depressão endogâmica observado na maioria das espécies estudadas é freqüente em espécies e populações predominantemente alógamas (Stebbins, 1974, Lande & Schemske, 1985; Husband & Schemske, 1996), indicando que as espécies de *Hoffmannseggella* se reproduzem, em condições naturais, através de polinizações cruzadas. Esta afirmação é reforçada, pelos altos índices de viabilidade de sementes encontrados em frutos coletados em populações naturais, que são muito próximos aos índices de viabilidade de sementes obtidas em frutos provenientes de polinizações cruzadas intra-específicas em condições experimentais. A ocorrência de forte auto-incompatibilidade na maioria das espécies de *Hoffmannseggella* estudadas é um fato inusitado, raramente observado em espécies da subtribo Laeliinae estudadas anteriormente, principalmente em relação a outras espécies polinizadas por abelhas (Matias *et al.*, 1996; Borba & Braga, 2003; Schimdt *et al.*, 2006).

A auto-incompatibilidade, seja ela resultado de qualquer mecanismo, segundo alguns autores, raramente ocorre em Orchidaceae, onde a regra geral é a auto-compatibilidade (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981, 1993; Johansen, 1990; Pedersen, 1995). No entanto, vários estudos mostram que a auto-incompatibilidade em orquídeas não ocorre tão raramente como se pensava (Stort & Martin, 1980; East, 1940; Dieringer, 1982; Aragón & Ackerman, 2001; Whigham & O'Neil, 1991; Oh *et al.*, 2001; Parra-Tabla *et al.*, 2000; Ackerman, 1989; Christensen, 1992; Ackerman & Montero-Oliver, 1985; Tremblay *et al.*, 2005; Agnew, 1986; Johansen, 1990; Christensen, 1992; Borba *et al.*, 2001; Verola, 2002). Essa generalização da autocompatibilidade, muitas vezes se deve ao fato da associação errônea da simples frutificação após autopolinização, sugerindo auto-compatibilidade, sem que seja testada a viabilidade de sementes que pode ser nula, assim como observado em espécies de *Hoffmannseggella*.

Mesmo sendo mais eficiente em evitar a autogamia, a auto-incompatibilidade (barreira genética) pode ser pouco vantajosa já que implica em perda de pólen e de flores, e evitar tal perda é especialmente importante em orquídeas que disponibilizam todo o pólen de uma flor em uma ou poucas unidades (Tremblay, 1992). Em orquídeas, barreiras mecânicas e mecanismos de auto-incompatibilidade podem estar associados ao fato destas espécies possuírem polinizadores com comportamento de permanecer na flor após a remoção de polinário, visitar outras flores da mesma inflorescência ou retornar à mesma flor após a remoção do polinário, o que propiciaria a ocorrência da autopolinização ou geitonogamia (Pedersen, 1995; Borba & Semir, 1999, 2001; Borba *et al.*, 2001; Singer & Cocucci, 1999; Verola, 2002). Os polinizadores das espécies acompanhadas são pequenos himenópteros (ver Capítulo 3) que apresentam comportamento de não permanecem na mesma flor ou inflorescência após a remoção de polinários, sendo difícil estabelecer os custos da auto-incompatibilidade em relação ao comportamento dos polinizadores.

Por algum tempo, concordou-se com a hipótese de que a auto-compatibilidade é, por si, desvantajosa (Darwin, 1877). No entanto, a ampla ocorrência da auto-compatibilidade prova que este mecanismo é claramente adaptativo sob algumas condições (Lloyd, 1980; Schemske & Land, 1985), como escassez de polinizadores e populações pequenas em gargalo genético (Horovitz & Harding, 1972; Lande & Schemske, 1985; Schemske & Land, 1985).

Grant (1975) e Lloyd (1979) indicam que várias espécies possuem sistemas de reprodução intermediários, com uma “mistura” de mecanismos de auto-compatibilidade e auto-incompatibilidade. Vários modelos de evolução e manutenção de estratégias de sistemas de reprodução mistos vêm sendo propostos (Lloyd, 1980; Schemske & Lande, 1985), e de fato,

muitas espécies apresentam populações autógamas e/ou alógamas, incluindo as variações destes sistemas (Lande & Schemske, 1985; Schemske & Lande, 1985). Desta forma, as taxas de viabilidade de sementes obtidas no presente trabalho dão uma idéia de como os sistemas de reprodução em espécies de *Hoffmannseggella* podem variar, desde fortemente auto-incompatível, na maioria das espécies acompanhadas, até completamente auto-compatível, no caso da maioria das populações de *H. rupestris*, *H. briegei*, *H. caulescens* e uma população de *H. angereri* e de *H. bradei*.

Muitos trabalhos mostram que a evolução da autogamia pode ter se originado a partir de linhagens alógamas (Stebbins, 1959; Baker, 1976) e pode ter evoluído, independentemente, em diferentes espécies dentro de diversas famílias como Polemoniaceae (Grant, 1975), Onagraceae (Raven, 1979) e Pinaceae (Langner, 1959; Fowler, 1965), indicando que espécies filogeneticamente próximas, podem desenvolver, independentemente, sistemas reprodutivos divergentes (Schemske & Lande, 1985). A autogamia facultativa ocorre em diversas espécies de orquídeas (Catling, 1990; Tremblay *et al.*, 2005), geralmente associada com ambientes fragmentados, severos e sob escassez de polinizadores (Tremblay *et al.*, 2005). Nestas condições a autogamia pode ser considerada como uma estratégia apropriada, em que um único evento de polinização cruzada garantiria a variabilidade genética necessária para anular os efeitos da depressão endogâmica, gerada através de sucessivas autopolinizações (Tremblay *et al.*, 2005). Mecanismos de autopolinização espontânea observados em algumas espécies de *Hoffmannseggella*, mesmo ocorrendo em escala reduzida dentro das populações e resultando em taxa de viabilidade de sementes tão baixa nas espécies auto-incompatíveis, podem ser adaptativos sob condições de escassez de polinizadores e em populações pequenas e isoladas. Os mecanismos de autopolinização espontânea e autogamia em espécies de *Hoffmannseggella* são condições derivadas e relativamente recentes (ver Capítulo 5), e relacionadas principalmente com espécies poliplóides. No caso de *Hoffmannseggella* a evolução da autogamia tem origem a partir de linhagens alógamas e pode derivar independentemente dentro do gênero, inclusive em diferentes populações da mesma espécie, como observado em *H. angereri*, *H. bradei*, *H. caulescens* e *H. rupestris*.

Um fato curioso a ser esclarecido é o porquê as espécies de *Hoffmannseggella* mantêm frutos provenientes de autopolinização até o final da maturação, mesmo apresentando baixa viabilidade de sementes, uma vez que vivem sob escassez de recursos e crescem em solos pobres e/ou diretamente sobre rochas. Do ponto de vista energético, a produção de frutos é altamente

dispendiosa, principalmente para espécies que vivem sob escassez de recursos (Montalvo & Ackerman, 1987; Zimmerman & Aide, 1989; Calvo, 1993). O aumento da taxa de frutificação em algumas espécies pode interferir drasticamente na taxa de crescimento subsequente e reprodução futura (Ackerman, 1989; Snow & Whigham, 1989; Zimmerman & Aide, 1989; Ackerman & Montalvo, 1990; Primack & Hall, 1990; Meléndez-Ackerman *et al.*, 2000). Embora não tenha sido avaliado experimentalmente, em condições de cultivo, todas as espécies de *Hoffmannseggella* que mantiveram hastes com frutos em desenvolvimento durante um ano, geraram pseudobulbos e folhas menores e não floresceram na estação seguinte, concordando com a idéia de comprometimento das funções de crescimento e reprodução futura em detrimento de taxas de frutificação elevadas (Ackerman, 1989; Snow & Whigham, 1989; Zimmerman & Aide, 1989; Ackerman & Montalvo, 1990; Primack & Hall, 1990; Meléndez-Ackerman *et al.*, 2000). Em condições naturais, a taxa de frutificação em espécies de *Hoffmannseggella* é baixa, indicando que ela é limitada pela disponibilidade de polinizadores. Pode ser que, em condições naturais, a taxa de autopolinizações seja tão baixa que manter frutos em desenvolvimento até o final da maturação, mesmo com uma carga de sementes viáveis baixa, não seja uma característica exposta aos efeitos da seleção contrária, ou seja, pode ser uma característica neutra. Por outro lado, pode ser que estas poucas sementes viáveis (que são muitas levando em consideração a enorme quantidade de sementes produzidas pelas orquídeas), formadas através de autopolinizações e associadas com os mecanismos de autopolinização espontânea nestas espécies, sejam muito importantes em eventos de colonização, estabelecimento de novas populações e especiação, garantindo a reprodução sexuada nestes locais.

Ocorrência de Poliembrionia

A ocorrência de poliembrião em Orchidaceae é relativamente pouco documentada. Nos poucos casos descritos, a poliembrião é atribuída a eventos de apomixia, em que os embriões são derivados de divisões mitóticas do tegumento externo durante o processo de megasporogênese (Swamy, 1949; Lenz & Wimber, 1959; Catling, 1982, 1987; Catling & Catling, 1991b). Em todos os casos descritos, a taxa de sementes poliembriônicas é elevada e associada principalmente a espécies autógamas e apomíticas. No entanto, existem dois casos descritos em que a poliembrião ocorre aleatoriamente, e com baixa frequência, em amostras provenientes de frutos não apomíticos derivados de cruzamentos intra-específicos e inter-específicos (Pintaúdi *et al.*, 1990; Borba *et al.*, 2001); nestes casos as sementes poliembriônicas foram originadas pela

clivagem de um único zigoto. Segundo O'Neill (1997) a taxa de sementes poliembriônicas é maior em frutos provenientes de cruzamentos inter-específicos. As espécies de *Hoffmannseggella* estudadas apresentaram baixos níveis de sementes poliembriônicas em todos os tipos de tratamentos, com frequência muito reduzida. A porcentagem de sementes poliembriônicas é um pouco maior em tratamentos inter-específicos, no entanto, a diferença entre os outros tipos de tratamentos não é significativa. Durante o acompanhamento do desenvolvimento dos óvulos e embriões em todos os tipos de tratamentos nas espécies de *Hoffmannseggella*, não foi constatado nenhum indício de origem de poliembriões através da apomixia. Essas características, aliadas à baixa incidência de poliembriões nas amostras analisadas, sugerem que os embriões supranumerários observados sejam derivados de eventos esporádicos e devidos à clivagem de um mesmo embrião.

Cruzamentos inter-específicos, fenologia de floração, simpatria e hibridação

Em cruzamentos inter-específicos a taxa de viabilidade de sementes foi elevada, mostrando claramente que espécies sincronopátricas podem potencialmente hibridizar, fato confirmado pelo grande número de híbridos naturais descritos em literatura (*H. xcaetensis* (Pabst) V.P. Castro & Chiron, *H. xcarassana* (Pabst) V.P. Castro & Chiron, *H. xfeldmaniana* F.E.L. Miranda & K.G. Lacerda, *H. xcristinae* F.E.L. Miranda & K.G. Lacerda, *H. xraganii* F.E.L. Miranda & K.G. Lacerda, *H. xmucugensis* (Pabst) V.P. Castro & Chiron, *H. xbritoi* K.G. Lacerda & V.P. Castro, *H. xitabiritensis* K.G. Lacerda, *H. xcipoensis* (Pabst) V.P. Castro & Chiron e *H. xzaslawskiana* Chiron & V.P. Castro) e observados nas populações naturais acompanhadas (três híbridos não descritos entre *H. rupestris* e *H. angereri* e um entre *H. rupestris* e *H. bradei*). Somente três pares de espécies sincronopátricas estudadas neste trabalho apresentaram barreiras genéticas à hibridação, *H. fournieri* x *H. longipes*, *H. briegei* x *H. ghillanyi* e *H. caulescens* x *H. endsfeldzii*, e não produziram sementes viáveis quando inter-cruzadas. Os outros pares de espécies sincronopátricas testados foram interférteis e potencialmente poderiam formar híbridos em condições naturais. As demais espécies testadas em condições experimentais que apresentaram sobreposição de fenologia floral mas não geográfica, poderiam hibridizar se entrassem em contato em condições naturais, uma vez que não possuem polinizadores específicos (ver Capítulo 3).

Alguns estudos mostram haver correlação entre similaridade morfológica e potencialidade de hibridização entre espécies (Sanford, 1964, 1967; Scacchi, *et al.*, 1990), embora exista uma série de barreiras pré-polinização que previnam a hibridização, como isolamento geográfico, barreiras mecânicas e especificidade de polinizadores (Dodson, 1962; Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1968; 1981, 1993; Steiner *et al.*, 1994). Segundo Hogenboom (1975), a ausência de frutificação em cruzamentos inter-específicos pode ser resultado da falta de similaridade genética entre indivíduos de diferentes espécies, devido ao grau de divergência evolutiva entre elas. De acordo com a proposta de Hogenboom (1975), a capacidade de inter-cruzamento poderia ser utilizada como uma medida de proximidade filogenética ou divergência evolutiva de um determinado grupo (Sanford, 1964, 1967; Stort, 1972; Stort & Pavanelli, 1986; Scacchi *et al.*, 1990). No entanto, não foi observada nenhuma correlação entre similaridade morfológica e/ou filogenética (Van den Berg *et al.*, 2000) e potencialidade de hibridação entre as espécies de *Hoffmannseggella* estudadas, contrariando a proposta de Hogenboom (1975). Ao contrário, as espécies mais próximas filogeneticamente (Van den Berg *et al.*, 2000) apresentaram algum grau de esterilidade quando inter-cruzadas. A única barreira morfológica à hibridação entre as espécies analisadas, consiste na diferença de tamanho entre cavidade estigmática e polínias e comprimento de coluna que pode determinar diferentes locais de deposição de polínias sobre os polinizadores.

Grau de heterose e persistência de pequenas populações em gargalo genético

Populações de três espécies, *H. fournieri* (CL35), *H. gracilis* e *H. rupestris* (CL40) apresentaram taxas de viabilidade de sementes inusitadamente baixas em todos os tipos de tratamentos intra-específicos realizados. Na população de *H. fournieri* (CL35) a taxa de viabilidade de sementes foi baixa, inclusive nos tratamentos inter-específicos como receptora ou doadora de polínias, o que não ocorreu com as populações das outras espécies. A taxa de viabilidade de sementes nesta população não foi incrementada, nem quando recebeu ou doou polínias de/para outras populações. Desta forma, parece que esta população sofre de forte esterilidade, tanto masculina quanto feminina, mas as causas são obscuras e precisam ser investigadas.

No caso das populações de *H. gracilis*, *H. fournieri* (CL02B) e *H. rupestris* (CL40) a esterilidade não pode explicar os baixos níveis de viabilidade de sementes observados em tratamentos intra-específicos e em condições naturais. Como nas outras espécies e populações

diplóides estudadas, esperava-se que a viabilidade de sementes em autopolinização fosse baixa, como foi realmente observado. No entanto, a viabilidade de sementes em polinizações cruzadas intra-específicas intra-populacionais foi inesperadamente baixa nestas espécies. *Hoffmannseggella fournieri* (pop. CL02B) apresentou taxa de frutificação baixa em autopolinização, alta em polinização cruzada e muito baixa em condições naturais (Tabela 4).

Em espécies naturalmente alogâmicas, o principal risco de extinção é devido à depressão endogâmica que pode reduzir drasticamente o fitness individual e produzir populações geneticamente homogêneas (Mills & Smouse, 1994; Frankham, 1995; Amos & Balmford, 2001). A magnitude dos efeitos da endogamia em populações alógamas é um forte indicador de persistência e viabilidade a longo prazo, principalmente em populações pequenas, isoladas e com acesso restrito ao fluxo gênico entre populações coespecíficas (Barrett & Kohn, 1991; Lesica, 1993; Newman & Pilson, 1997; Amos & Balmford, 2001). A depressão endogâmica não se expressa somente em eventos de autopolinização e pode ser altamente restritiva, através da redução da fertilidade em cruzamentos envolvendo indivíduos geneticamente similares (Wallace, 2003).

Dentre todas as espécies e populações estudadas, *H. fournieri* (CL02B), *H. gracilis* e *H. rupestris* (CL40) foram as que apresentaram o menor tamanho populacional em condições naturais, com 37, 41 e 15 indivíduos, respectivamente. Devido ao tamanho populacional reduzido, e como se tratam de populações e espécies fortemente alógamas e sujeitas a efeitos severos da endogamia, a baixa viabilidade de sementes observada em condições experimentais, e em frutos provenientes de populações naturais parece ser causada pelo cruzamento entre indivíduos aparentados, devido à redução do tamanho populacional a limites extremos. Todas essas populações estavam em áreas expostas a forte influência antrópica, como pastagens e fogo recorrente, o que pode comprometer sua viabilidade a longo prazo, devido à sua redução a níveis reprodutivos críticos. Apesar de ameaçadas, *H. fournieri* e *H. rupestris* possuem muitas outras populações distribuídas ao longo da Cadeia do Espinhaço. No caso de *H. gracilis* a probabilidade de extinção a curto prazo é maior, por se tratar de uma espécie micro-endêmica, com somente uma população conhecida crescendo junto à população de *Vellozia gigantea* no Parque Nacional da Serra do Cipó-MG. Durante o acompanhamento desta população em condições naturais foi observado que a taxa de frutificação é muito baixa, e que além do tamanho reduzido, a população era formada somente por indivíduos adultos em estágio reprodutivo, sem nenhum indivíduo

jovem (ver Capítulo 3). Estas observações conferem a esta espécie o status de mais ameaçada do gênero *Hoffmannseggella*, sugerindo que ações imediatas sejam adotadas para sua conservação.

Supressão da depressão endogâmica, poliploidia e evolução da auto-compatibilidade

A poliploidia é um fenômeno difundido entre as Angiospermas e segundo estimativas ocorre entre 47-70% das plantas atuais (Grant, 1981; Lewis, 1980), e vem sendo reconhecida como a principal forma de evolução em muitos grupos (Soltis & Soltis 1993, 2000; Ramsey & Schemske 1998; Otto & Whitton 2000). Devido à sua grande incidência dentre as espécies de plantas conhecidas, a poliploidia é um dos principais fatores a ser considerado em estudos biosistemáticos (Stebbins, 1947, 1950, 1971, 1985; Grant, 1981; Soltis *et al.*, 2007).

A frequência da poliploidia em Orchidaceae é alta, e ela ocorre em grupos como *Platanthera* (Wallace, 2003; Sheviak & Bracht 1998; Tanaka & Kamemoto 1984), *Dactylorhiza* (Devos *et al.*, 2006; Pedersen, 2006; Hedrén *et al.*, 2007) e *Calopogon* (Goldman *et al.*, 2004) entre outros gêneros. Em Laeliinae a poliploidia vem sendo descrita em alguns gêneros como *Cattleya* e *Laelia* (Tanaka & Kamemoto, 1974; Tanaka & Kamemoto, 1984), incluindo *Hoffmannseggella* (Blumenschein, 1960 a,b; Costa, 2006).

De acordo com Blumenschein (1960) e Costa (2006), no gênero *Hoffmannseggella* existem espécies com números cromossômicos que variam entre $2n=40$, 60 e 80, configurando um complexo de espécies poliplóides, incluindo espécies híbridas (para revisão sobre poliploidia em *Hoffmannseggella* ver Capítulo 5). A interpretação das causas e efeitos da poliploidia é vasta, principalmente quanto ao seu papel na evolução. Stebbins (1950) chama a atenção para diferenças no potencial adaptativo de espécies diplóides e poliplóides, em que autopoliplóides produzidos artificialmente, apresentam menor capacidade de adaptação aos mesmos ambientes onde são encontrados seus ancestrais diplóides, porém se adaptam melhor a ambientes diferentes dos de seus ancestrais. A poliploidia tem grande influência na fertilidade dos indivíduos, principalmente quando é associada a alopoliplóides, ou seja, indivíduos que apresentam duplicação de cromossomos de origem híbrida. Se um híbrido estéril, devido à falta de homologia entre cromossomos, tiver seu lote cromossômico dobrado por poliploidia, o pareamento de cada cromossomo com seu homólogo será possível, resultando na recuperação da fertilidade (Blumenschein, 1960). Baseado nestes argumentos, a poliploidia é considerada como um mecanismo de isolamento reprodutivo capaz de gerar especiação simpátrica, quando populações

diplóides e tetraplóides são segregadas, pela produção de indivíduos triplóides, que geralmente são estéreis, impossibilitando a troca de genes entre elas (Blumenschein, 1960).

O conhecimento dos sistemas reprodutivos em plantas é especialmente importante, pois fornece informações úteis para julgamentos taxonômicos e interpretações evolutivas (Ornduff, 1969, 1978; Catling, 1982). A duplicação cromossômica afeta a magnitude de expressão da depressão endogâmica e tem implicações fundamentais para a evolução da poliploidia, bem como para os sistemas reprodutivos em populações naturais de plantas (Stebbins 1971; Grant 1981; Husband & Schemske 1996, 1997; Rausch & Morgan, 2005).

Alguns modelos de especiação recentes demonstram que, sob algumas circunstâncias, que dependem da fertilidade diferencial entre citótipos, o estabelecimento dos poliplóides é favorecido (Felber, 1991; Rodriguez, 1996; Rausch & Morgan, 2005). Neste caso a evolução de linhagens poliplóides está intimamente relacionada ao grau de expressão da depressão endogâmica em linhagens diplóides e poliplóides.

O grau de expressão da depressão endogâmica pode atuar como forte agente de seleção contra a evolução de sistemas reprodutivos auto-compátíveis (Lande & Schemske, 1985; Husband & Schemske, 1997). Muitos trabalhos mostram que os efeitos negativos da depressão endogâmica são reduzidos, ou mesmo anulados por eventos de poliploidia, levando à evolução de sistemas de auto-compatibilidade e/ou autogamia (Stebbins, 1950; Thompson & Lumaret, 1992; Johnston & Schoen, 1996; Lande & Schemske, 1985; Husband & Schemske, 1997; Contreras *et al.*, 2007).

Neste trabalho foi observada forte correlação entre o grau de ploidia e a fertilidade das sementes obtidas em cruzamentos intra-específicos, e a diferença entre a fertilidade de diplóides e poliplóides foi altamente significativa ($P > 0,001$ – Anova dois fatores). Em espécies diplóides o grau de fertilidade em frutos provenientes de autopolinização foi em média 18 vezes menor que a observada em espécies poliplóides. Em frutos provenientes de polinização cruzada intra-específica, não houve diferença significativa na viabilidade de sementes entre diplóides e poliplóides.

Para que ocorra a evolução de sistemas de reprodução auto-compátíveis, os ganhos relacionados ao aumento de fertilidade através da autogamia, têm de superar os efeitos deletérios causados pela depressão endogâmica, manifestada através da perda de “fitness” da prole gerada (Charlesworth & Charlesworth, 1979; Lande & Schemske, 1985). Como os descendentes gerados

através da autogamia possuem duas cópias do genoma parental, enquanto a prole gerada por alogamia possui somente uma, assume-se que o nível crítico de depressão endogâmica que determina a evolução de sistemas autógamos seja 50% (Charlesworth & Charlesworth, 1979; Lande & Schemske, 1985). Segundo essas afirmações, o nível de depressão endogâmica observado nas espécies diplóides de *Hoffmannseggella* consideradas auto-incompatíveis neste trabalho, estão bem abaixo (0,5% em média) do nível crítico estabelecido para que sistemas autógamos possam evoluir. Ao contrário do observado em espécies diplóides, as espécies poliplóides são auto-compatíveis, com a média de viabilidade de sementes em autopolinizações acima de 60%, e sistemas autógamos podem ser estabelecidos e fixados.

Existem dois modelos genéticos prevalentes para explicar a expressão da depressão endogâmica em sistemas naturais: dominância parcial e super-dominância (Charlesworth & Charlesworth, 1987). De acordo com o modelo de dominância parcial, indivíduos de uma população possuem um número de mutações deletérias que são recessivas ou parcialmente recessivas, em que a severidade da expressão da depressão endogâmica é intimamente relacionada ao aumento de frequência desses recessivos letais em homozigose, que é devida a cruzamentos entre indivíduos geneticamente semelhantes ou a eventos de autogamia.

Dessa forma, espécies diplóides tendem a expressar essas mutações mais facilmente que espécies poliplóides, devido à herança polissômica intrínseca aos poliplóides. Espécies poliplóides apresentam lotes cromossômicos duplicados e múltiplas cópias dos mesmos genes. Por consequência a expressão de cópias múltiplas, de um mesmo gene deletério em homozigose recessiva, é muito menos provável de ser expressa em poliplóides, e os efeitos da depressão endogâmica sob estas condições são tamponados ou diminuídos (Husband & Schemske, 1997).

O nível de depressão endogâmica diferencial observado em espécies diplóides e poliplóides de *Hoffmannseggella*, através da viabilidade de sementes em cruzamentos experimentais intra-específicos, está de acordo com o modelo de dominância parcial, e corrobora a hipótese de supressão/redução da depressão endogâmica através da poliploidia, possibilitando a evolução de sistemas autogâmicos em linhagens poliplóides de *Hoffmannseggella*.

Referências Bibliográficas

- Ackerman, J.D. & Montero-Oliver, J.C. 1985. Reproductive biology of *Oncidium variegatum*: moon phases, pollination and fruit set. *American Orchid Society Bulletin* **54**: 326–329.
- Ackerman, J.D. & Montalvo, A.M. 1990. Short and long term limitations to fruit production in a tropical orchid. *Ecology* **71**: 263–272.
- Ackerman, J.D. 1989. Limitations to sexual reproduction in *Encyclia krugii* (Orchidaceae). *Systematic Botany* **14**: 101–109.
- Agnew, J.D. 1986. Self-compatibility/incompatibility in some orchid of the subfamily Vandoideae. *Plant Breeding* **97**: 183–186.
- Alexandersson, R. & Ågren, J. 2000. Genetic structure of the nonrewarding bumblebee pollinated *Calypso bulbosa*. *Heredity* **85**: 401–409.
- Amos, W. & Balmford, A. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity* **87**: 257–265.
- Aragón, S. & Ackerman, J.D. 2001. Density effects on the reproductive success and herbivory of *Malaxis massonii*. *Lindleyana* **16**: 3–12.
- Baker, H.G. 1976. **Tropical trees: variation, breeding and conservation**. “Mistake” pollination as a reproductive system with special reference to the Caricaceae. Academic Press, New York. 161–169pp.
- Barret, S.C.H. & Hander, L.D. 1996. Ecology and Evolution of plant mating. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 73–79.
- Barret, S.C.H. 1998. **Plant Reproductive Ecology Patterns and Strategies**. The evolution, maintenance, and loss of self-incompatibility systems. Oxford University Press, Oxford. 98–124pp.
- Barret, S.C.H., Baker, A.M. & Jesson, L.K. 2000. **Monocots, systematics and evolution**. Mating strategies in monocotyledons. CSIRO publishing, Collingwood, Australia. 258–269pp.
- Barrett, S.C.H. & Kohn, J.R.. 1991. **Genetics and conservation of rare plants**. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. Eds D. A. Falk and K. E. Holsinger,. Oxford Univ. Press, New York. Pp. 3–30
- Barrett, S.C.H. & Charlesworth, D. 1991. Effects of a change in the level of inbreeding on the genetic load. *Nature* **352**: 522–524.
- Bawa, K.S. 1979. Breeding systems of trees in a wet forest. *New Zealand Journal of Botany* **17**: 521–524.
- Bertin, I.E., Barnes, C. & Guttman S.I. 1989. Self-sterility and cryptic self-fertility in *Campsis radicans* (Bignoniaceae). *Botanical Gazette* **150**: 397–403.
- Blumenschein, A. 1960a. **Estudos sobre a Evolução no subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae)**. Tese apresentada para obtenção do título de Livre Docente da Cadeira de Citologia e Genética Geral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 54pp.
- Blumenschein, A. 1960b. Número de cromossomas de algumas espécies de orquídeas. *Publicações Científicas do Instituto de Genética / Esalq / USP* **1**: 45–50

- Borba, E.L. & Braga, P.I.S. 2003. Biologia reprodutiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. *Revista Brasileira de Botânica* **26**: 541-549.
- Borba, E.L. & Semir, J. 1998. *Bulbophyllum xcipoense* (Orchidaceae), a new natural hibrid from brazilian “campo rupestre”: description and biology. *Lindleyana* **13**: 113-120.
- Borba, E.L. & Semir, J. 1999. Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution* **217**: 197-204.
- Borba, E.L. & Semir, J. 2001. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany* **88**: 75-88.
- Borba, E.L., Semir, J. & Sheferd, G.J. 2001. Self-incompatibility, inbreeding depression, and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* **88**: 89-99.
- Borba, E.L., Shepherd, G.J. & Semir, J. 1999. Reproductive system and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occurring in Brazilian ‘campo rupestre’ vegetation. *Plant Systematics and Evolution* **217**: 205-214.
- Bullock, S. H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest. *Biotropica* **17**: 287-301.
- Byers, D.L. & Waller, D.M. 1999. Do plant populations purge their genetic load? Effects of population size and mating history on inbreeding depression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **30**: 479–513.
- Calvo, R.N. 1993. Evolutionary demography of orchids: intensity and frequency of pollination and the cost of fruiting. *Ecology* **74**: 1033–1042.
- Catling P.M. 1982. Breeding systems of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* **60**: 3017–3039.
- Catling, P.M. & Catling, V.R. 1991a. Anther-cap retention in *Tipularia discolor*. *Lindleyana* **6**: 113-116.
- Catling, P.M. & Catling, V.R. 1991b. A synopsis of breeding systems and pollination in North American orchids. *Lindleyana* **6**: 187-215.
- Catling, P.M. 1987. Notes on the breeding systems of *Sacoila lanceolata* (Aublet) Garay (Orchidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **74**: 58-68.
- Catling, P.M. 1990. **Orchid Biology, reviews and perspectives. 5 ed.** Auto pollination in Orchidaceae. Timber Press, Portland, U.S.A. 121-158pp.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. 1979. The evolutionary genetics of sexual systems in flowering plants. *Proceedings of the Royal Society of London B* **205**: 511–530.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 237–268.
- Christensen, D.E. 1992. Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. *Lindleyana* **7**: 28-33.

- Contreras, R.N., Ranney, T.G. & Tallury, S.P. 2007. Reproductive Behavior of diploid and allotetraploid *Rhododendron* L. "Fragrant Afinitty". *HortScience* **42**: 31-34
- Costa, J.Y. 2006. **Citotaxonomia e aspectos evolutivos de espécies de *Hoffmannseggella* H. G. Jones (Orchidaceae), de Campos Rupestres brasileiros.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, SP, 121pp.
- Dafni, A. & Calder, D.M. 1987. Pollination by deceit and floral mimesis in *Thelemitra antennifera* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **158**: 11-22.
- Darwin C. 1877. **The various contrivances by which orchids are fertilized by insects.** University of Chicago Press, Chicago (1984 ed.).
- de Nettancourt, D. 1977. **Incompatibility in Angiosperms.** Springer-Verlag, Berlin.
- Devos, N., Raspé, O., Oh, S.H., Tyteca, D. & Jacquemart, A.L. 2006. The evolution of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) allotetraploid complex: Insights from *nrDNA* sequences and cpDNA PCR-RFLP data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 767-778.
- Dieringer G. 1982. The pollination ecology of *Orchis spectabilis* L. (Orchidaceae). *Ohio Journal of Science* **82**: 218-225.
- Dodson, C.H. 1962. The importance of pollination in the evolution of the orchids in tropical America. *American Orchid Society Bulletin* **31**: 525-534.
- Dressler, R.L. 1968. Observations on orchids and Euglossine bees in Panama and Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* **15**: 143-183.
- Dressler, R.L. 1981. **The orchids: natural history and classification.** Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family.** Cambridge University Press, Cambridge.
- East, E.M. 1940. The distribution of self-fertility in flowering plants. *Proceedings of the American Philosophical Society* **82**: 449-518.
- Felber, E. 1991. Establishment of a tetraploid cytotype in a diploid population: effect of relative fitness of the cytotypes. *Journal of Evolutionary Biology* **4**: 195-207.
- Fowler, D.P. 1965. Effects of inbreeding in Red Pine, *Pinus resinosa* Ait. II. Pollination studies. *Silvae Genetics* **14**: 12-23.
- Frankham, R. 1995. Inbreeding and extinction: a threshold effect. *Conservation Biology* **9**: 792-799.
- Gibbs, P.E. & Sasaki, R. 1998. Reproductive biology of *Dalbergia miscolobium* Benth. (Leguminosae: Papilionoideae) in SE Brazil: the effects of pistillate sorting on fruit set. *Annals of Botany* **81**: 735-740.
- Goldman, D.H., Jansen, R.K., Van Den Berg, C., Leitch, I.J., Fay, M.F. & Chase, M.W. 2004. *Calopogon* (Orchidaceae, Epidendroideae): circumscription, phylogeny, polyploidy, and possible hybrid speciation. *American Journal of Botany* **91**: 707-723.
- Grant, V. 1975. **Genetics of flowering plants.** Columbia University Press, New York.
- Grant, V. 1981. **Plant speciation. 2nd ed.** Columbia Univ. Press, New York.

- Hedrén, M., Nordström, S., Persson-Hovmalm, H. A., Pedersen, H. AE. & Hansson, S. 2007. Patterns of polyploid evolution in Greek marsh orchids (*Dactylorhiza*; Orchidaceae) as revealed by Allozymes, AFLPs, and plastid DNA data. *American Journal of Botany* **94**: 1205–1218
- Hogenboom, N.G. 1975. Incompatibility and incongruity: two different mechanisms for the non-functioning of intimate partner relationships. *Proceedings of the Royal Society of London B* **88**:361-375.
- Holsinger, K.E. 1996. **Pollination biology and the evolution of mating systems in flowering plant**. Evolutionary Biology. Plenum Press, New York. 107-149pp.
- Horovitz, A. & Harding, J. 1972. Genetics of *Lupinus*. V. Intraspecific variability for reproductive traits in *Lupinus nanus*. *Botanical Gazette* **133**: 155-165.
- Husband, B.C. & Schemske, D.W. 1996. Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* **50**: 54-70.
- Husband, B.C. & Schemske, D.W. 1997. The Effect of Inbreeding in Diploid and Tetraploid Populations of *Epilobium angustifolium* (Onagraceae): Implications for the Genetic Basis of Inbreeding Depression. *Evolution* **51**: 737-746.
- Illg, R.D. 1975. **Aspectos evolutivos em algumas Maxillarias brasileiras (Orchidaceae)**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Jaimes, I. & Ramírez, N. 1999. Breeding systems in a secondary deciduous forest in Venezuela: the importance of life form, habitat, and pollination specificity. *Plant Systematics and Evolution* **215**: 23-36.
- Johansen, B. 1990. Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **103**:165-196.
- Johnson, S.D. 1994. Evidence for Batesian mimicry in a butterfly-pollinated orchid. *Biological Journal of the Linnean Society* **53**: 91–104.
- Johnston, M.O. & Schoen, D.J. 1996 Correlated Evolution of Self-Fertilization and Inbreeding Depression: An Experimental Study of Nine Populations of *Amsinckia* (Boraginaceae). *Evolution* **50**:1478-1491.
- Lande, R. & Schemske, D.W. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* **39**:24-40.
- Langner, V.W. 1959. Selbstfertilität und Inzucht bei *Picea omorika* (Pancic) Purkyne. *Silvae Genetics* **8**:84-93.
- Lenz, L.W. & Wimber, D. E. 1959. **The orchids, a scientific survey**. Hybridization and inheritance in orchids. Ed. Withner CL. Krieger, Malabar. pp. 261-314.
- Lesica, P. 1993. Using plant community diversity in reserve design for pothole prairie on the Blackfeet Indian Reservation, Montana, USA. *Biological Conservation* **65**: 69–75.
- Lewis, W.H. 1980. **Polyploidy: Biological Relevance**. Polyploidy in species populations. Ed. Lewis, W. H. Plenum Press, New York, Pp. 103-144.
- Lloyd, D.G. 1980. Sexual strategies in plants. I. A hypothesis of serial adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytologist* **86**: 81–92.

- Lloyd, D.G. 1979. Some reproductive factors affecting the selection of self-fertilization in plants. *American Naturalist* **113**:67-97.
- Loch, J.M. & Profita, J.C. 1975. Pollination of *Eulophia cristata* (Sw.) Steud. (Orchidaceae) in Southern Ghana. *Acta Botanica Neerlandica* **24**: 135-138.
- Luyt, R. & Johnson, S.D. 2001. Hawkmoth pollination of the African epiphytic orchid *Mystacidium venosum*, with reference to flower and pollen longevity. *Plant Systematics and Evolution* **228**: 49-62.
- Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology* **34**: 125-128.
- Matias, L.Q., Braga, P.I.S. & Freire, A.G. 1996. Biologia reprodutiva de *Constantia cipoensis* Porto & Brade (Orchidaceae), endêmica da Serra do Cipó, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Botânica* **19**: 119-125.
- Meléndez-Ackerman, E.J., Ackerman, J.D. & Rodríguez-Robles, J.A. 2000. Reproduction in an orchid is resource limited over its lifetime. *Biotropica* **32**: 282-290.
- Meléndez-Ackerman, E.J., Ackerman, J.D. 2001. Density dependent variation in reproductive success in a terrestrial orchid. *Plant Systematics and Evolution* **227**: 27-36.
- Mills, S. L., & Smouse, P. 1994. Demographic consequences of inbreeding in remnant populations. *American Naturalist* **144**: 412-431.
- Montalvo, A.M. & Ackerman, J.D. 1987. Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Biotropica* **19**: 24-31.
- Newman, D. & Pilson, D. 1997. Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella*. *Evolution* **51**: 354-362.
- Nilsson, L.A. 1983. Anthecology of *Orchis mascula* (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany* **3**: 157-179.
- O'Neill, S.D. 1997. Pollination regulation of flower development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 547-574.
- Oh, G.S., Chung, M.Y., Chung, S.G. & Chung, M.G. 2001. Contrasting breeding systems: *Liparis kumokiri* and *L. makinoana* (Orchidaceae). *Annales Zoologici Fennici* **38**: 281-284.
- Ornduff, R. 1969. Reproductive biology in relation to systematics. *Taxon* **18**: 121-133.
- Ornduff, R. 1978. Reproductive characters and taxonomy. *Systematic Botany* **3**: 420-427.
- Ortiz-Barney, E., Ackerman, J.D. 1999. The cost of selfing in *Encyclia cochleata* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **219**: 55-64.
- Otto, S.P. & Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* **34**: 401-437.
- Parra-Tabla, V., Vargas, C.L., Magaña-Rueda, S. & Navarro, J. 2000. Female and male pollination success of *Oncidium ascendens* Lindley sic. (Orchidaceae) in two contrasting habitat patches: forest vs. agricultural field. *Biological Conservation* **94**: 335-340.
- Paulus, H.F. & Gack, C. 1990. Pollination of *Ophrys* (Orchidaceae) in Cyprus. *Plant Systematics and Evolution* **169**: 177-207.

- Peakall, R. & Beattie, A.J. 1996. Ecological and genetic consequences of pollination by sexual deception in the orchid *Caladenia tentaculata*. *Ecology* **50**: 2207–2220.
- Peakall, R. & James, S.H. 1989. Outcrossing in an ant pollinated clonal orchid. *Heredity* **62**: 161–167.
- Pedersen, H.A. 1995. Anthecological observations on *Dendrochilum longibracteatum* – a species pollinated by facultatively anthophilous insects. *Lindleyana* **10**: 19–28.
- Pedersen, H.A. 2006. Systematics and evolution of the *Dactylorhiza romana/sambucina* polyploid complex (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **152**: 405–434.
- Pijl, L. van der & Dodson, C.H. 1966. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. University of Miami Press, Coral Gables.
- Pintaúdi, C.A., Stort, M.N.S. & Marin-Morales, M.A. 1990. Polinizações naturais e artificiais de *Xylobium squalens* Lindl. (Orchidaceae). *Naturalia* **15**: 67–80.
- Primack, R.B. & Hall, P. 1990. Cost of reproduction in the pink lady's slipper orchid: a four year experimental study. *American Naturalist* **136**: 638–656.
- Ramsey, J. & Schemske, D. W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 467–501.
- Rausch, J.H. & Morgan, M.T. 2005. The effect of self-fertilization, inbreeding depression, and population size on autopolyploid establishment. *Evolution* **59**: 1867–1875.
- Raven, P.H. 1979. A survey of reproductive biology in Onagraceae. *New Zealand Journal of Botany* **17**: 575–594.
- Richards, A.J. 1997. **Plant breeding systems**. 2nd. Ed. London, Chapman & Hall.
- Rodriguez, D.J. 1996. A model for the establishment of polyploidy in plants. *American Naturalist* **147**: 33–46.
- Rossi, W., Corrias, B., Arduino, P., Cianchi, R. & Bullini, L. 1992. Gene variation and gene flow in *Orchis morio* (Orchidaceae) from Italy. *Plant Systematics and Evolution* **179**: 43–58.
- Sage, T.L., Strumas, F., Cole, W.W. & Barret, S.C. H. 2000. Differential ovule development following self- and cross-pollination: the basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* **86**: 855–870.
- Sanford, W.W. 1964. Sexual compatibility relationship in *Oncidium* and related genera I. *American Orchid Society Bulletin* **33**: 1035–1048.
- Sanford, W.W. 1967. Sexual compatibility relationship in *Oncidium* and related genera II. *American Orchid Society Bulletin* **36**: 114–122.
- Scacchi, R., De Angelis, G. & Lanzana, P. 1990. Allozyme variation among and within eleven *Orchis* species (fam. Orchidaceae), with special reference to hybridization aptitud. *Genetica* **81**: 143–150.
- Schemske, D.W. & Lande, R. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution* **39**: 41–52.
- Seavey, S.R. & Bawa, K.S. 1986. Late acting self-incompatibility in angiosperms. *The Botanical Review* **52**: 195–219.

- Sheviak, C.J. & Bracht, M. 1998. New chromosome numbers determinations in *Platanthera*. *Native North American Orchid Journal* **4**:168–172.
- Singer, R.B. & Cocucci, A.A. 1999. Pollination mechanism in four sympatric southern Brazilian Epidendroideae orchids. *Lindleyana* **14**: 47-56
- Smidt, E.C., Silva-Pereira, V. & Borba, E.L. 2006. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. *Plant Species Biology* **21**: 85-91
- Snow, A.A. & Whighan, D.F. 1989. Cost of flower and fruit production in *Tipularia discolor*. *Ecology* **70**: 1286–1293.
- Sobrevilla, C. & Arroio, M.T.K. 1982. Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. *Plant Systematics and Evolution* **140**: 19-37.
- Soltis, D.E. & Soltis, P.S. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews In Plant Sciences* **12**:243–273.
- Soltis, D.E. & Soltis, P.S. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:7051–7057.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Schemske, D.W., Hancock, J.F., Thompson, J.N., Husband, B.C. & Judd, J.F. 2007. Autopolyploidy in Angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* **56**: 13-30.
- Stebbins, G.L. 1959. The role of hybridization in evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society* **103**: 231-251
- Stebbins, G.L. 1974. **Flowering plants: evolution above the species level**. Cambridge Mass., USA: Harvard University Press.
- Stebbins, G.L. 1947. Types of polyploids: their classification and significance. *Advances in Genetics* **1**: 403–29
- Stebbins, G.L. 1950. **Variation and evolution in plants**. New York, NY, USA: Columbia University Press.
- Stebbins, G.L. 1971. **Chromosomal evolution in higher plants**. Edward Arnold, London, UK.
- Stebbins, G.L. 1985. Polyploidy, hybridization, and the invasion of new habitats. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **72**:824-832.
- Steiner, K.E., Whitehead, V.B. & Johnson, S.D. 1994. Floral and pollinator divergence in two sexually deceptive South African orchids. *American Journal of Botany* **81**: 185-194
- Stort, M.N.S. & dos Santos Pavanelli, E.A. 1986. Crossing systems in *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae). *Revista de Biologia Tropical* **34**: 59–62.
- Stort, M.N.S. & Galdino, G.L. 1984. Self- and cross pollination in some species of the genus *Laelia* Lindl. (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Genética* **7**: 671-676
- Stort, M.N.S. & Martins, P.S. 1980. Autopolinização e polinização cruzada em algumas espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). *Ciência e Cultura* **32**: 1080-1084
- Stort, M.N.S. 1972. Estudos em híbridos F1 artificiais de orquídeas. *Ciência e Cultura* **24**: 847-851

- Swamy, B.G.L. 1949. Embriological studies in the Orchidaceae. II. Embriogeny. *The American Midland Naturalist* **41**: 202-232.
- Tanaka, R. & Kamemoto, H. 1984. **Orchid biology: reviews and perspectives III**. Chromosomes in orchids: counting and numbers. Ed. Arditti, J. Ithaca, NY, Cornell University Press, 323–410 pp.
- Tanaka, R. & Kamemoto, H. 1974. **The Orchids: Scientific Studies**. List of Chromosome Numbers in Species of the Orchidaceae. Ed. Withner, C. L. John Wiley & Sons, Inc. USA., 411-483pp.
- Templeton, A. R. & Read, B. 1983. **Genetic and Conservation: A reference for managing wild animal and plant populations**. The elimination of inbreeding depression in a captive herb of Speke's gazelle. Eds. C. M. Schoenwald-Cox, S. M. Chamber, B. MacBryde, L. Thomas. Benjamin/Cummings, London, 241-261 Pp..
- Thompson, J.D & Lumaret, R. 1992. The evolutionary dynamics of polyploidy plants: origins, establishment and persistence. *Trends in Ecology and Evolution* **7**: 302–307.
- Tremblay, R.L., Ackerman, J.D., Zimmerman, J.K. & Calvo R.N. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biology Journal of the Linnean Society* **84**: 1–54.
- Tremblay, R.L. 1994. Frequency and consequences of multiparental pollinations in a population of *Cypripedium calceolus* L. var. *pubescens* (Orchidaceae). *Lindleyana* **9**: 161–167.
- Tremblay, R.L. 1992. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. *Canadian Journal of Botany* **70**: 642-650.
- Vallius, E. 2000. Position-dependent reproductive success of flowers in *Dactylorhiza maculata* (Orchidaceae). *Functional Ecology* **14**: 573–579.
- van den Berg, C., Higgins, W.E., Dressler, R.L., Whitten, W.M., Arenas, M.A.S., Culham, A. & Chase, M.W. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spaces (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96-114
- Verola, C.F. 2002. **Biologia floral e sistemas de reprodução em espécies de *Bulbophyllum* (Orchidaceae) ocorrentes em mata de galeria, campo rupestre e floresta estacional**. Tese apresentada para obtenção do título de Mestre em Ecologia, Instituto de Biologia, UNICAMP.
- Wallace, L.E. 2003. Molecular evidence for allopolyploid speciation and recurrent origins in *Platanthera huronensis* (Orchidaceae). *International Journal of Plant Sciences* **164**: 907–916.
- Whigham, D.F. & O'Neill, J. 1991. **Population ecology of terrestrial orchids**. The dynamics of flowering and fruit production in two eastern North American terrestrial orchids, *Tipularia discolor* and *Liparis lilifolia*. Eds. Wells TCE, Willems JH. The Hague, SPB Academic Publishing, 89–101pp.
- Zapata, T.R. & Arroyo, M.T.K. 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* **10**: 221-230.
- Zar, J.H. 1999. **Biostatistical analysis** 4th edt. London: Prentice-Hall.
- Zimmerman, J.K. & Aide, T.M. 1989. Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. *American Journal of Botany* **76**: 67-73.

Tabela 1. Populações e espécies de *Hoffmannseggella* utilizadas nos cruzamentos experimentais manuais. (*=diplóides; **poliplóides)

Espécie/população	Localidade	Localização Geográfica	Voucher
<i>H. angereri</i> (Pabst) V. P. Castro & Chiron			
CL27 (pop. 1) *	Biribiri – MG	18°09'S/043°35'W	<i>C.F.Verola</i> 0084A
CL28 (pop. 2) *	Diamantina – MG	18°17'S/043°33'W	<i>C.F.Verola</i> 0126
<i>H. bradei</i> (Pabst) V. P. Castro & Chiron			
CL05A (pop. 1) *	Diamantina-Conselheiro Mata-MG	18°12'S/043°42'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>M.E.Mansanares</i> 0081A
CL05B (pop. 2) *	Diamantina-Conselheiro Mata-MG	18°12'S/043°42'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>M.E.Mansanares</i> 0081B
CL08A (pop. 3) *	Gouveia-Curvelo-MG	18°24'S/043°52'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>M.E.Mansanares</i> 0012A
CL08B (pop. 4) *	Gouveia-Curvelo-MG	18°24'S/043°52'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>M.E.Mansanares</i> 0012B
CL11 (pop. 5) *	Diamantina-MG	18°13'S/043°35'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>M.E.Mansanares</i> 0082
<i>H. briergeri</i> (Blumensch. Ex Pabst) V. P. Castro & Chiron			
CL09 (pop. 1) **	Gouveia-Datas-MG	18°25'S/043°38'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>M.E.Mansanares</i> 0012D
CL10 (pop. 2) **	Pedro Lessa-MG	18°34'S/043°29'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>M.E.Mansanares</i> 0056
<i>H. caulescens</i> (Lindl.) H. G. Jones			
CL14 (pop. 1) **	Carrancas-MG	21°18'S/044°36'W	<i>C.F.Verola</i> 0038
CL15 (pop. 2) **	Itutinga-MG	21°08'S/044°17'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>C. Urbanetz</i> 0039
CL16 (pop. 3) **	São João Del Rei-MG	21°07'S/044°12'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>C. Urbanetz</i> 0042
CL17 (pop. 4) **	Santa Cruz de Minas-MG	21°29'S/044°36'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>C. Urbanetz</i> 0044
CL19 (pop. 5) **	Brumadinho-MG	20°04'S/043°59'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>A.F.Verola</i> 0063B
<i>H. cinnabarina</i> (Batem, ex Lindl.) H. G. Jones			
CL24 (pop. 1) *	Catas Altas-MG	20°05'S/043°29'W	<i>C.F.Verola</i> 0069
CL29 (pop. 2) *	Santa Teresa-ES	19°50'S/040°47'W	<i>C.F.Verola et al.</i> s/n°
<i>H. crispata</i> (Thumb.) H. G. Jones			
CL13AB (pop. 1) *	São Thomé das Letras-MG	21°43'S/044°58'W	<i>C.F.Verola</i> 0110
CL18 (pop. 2) *	Conceição do Ibitipoca-MG	21°42'S/043°53'W	<i>C.F.Verola</i> 0045
CL20 (pop. 3) *	Brumadinho-MG	20°04'S/043°59'W	<i>C.F.Verola</i> 0063A
CL23 (pop. 4) *	Caeté-MG	19°48'S/043°40'W	<i>C.F.Verola</i> s/n°
<i>H. endsfeldzii</i> (Pabst) V. P. Castro & Chiron			
CL31 (pop. 1) *	Itutinga-MG	21°19'S/044°58'W	<i>C.F.Verola et al.</i> 0123
<i>H. fournieri</i> (Cogn.) V. P. Castro & Chiron			
CL02B (pop. 1) *	Lavras Novas-MG	20°28'S/043°31'W	<i>C.F.Verola et al.</i> 0174
CL25 (pop. 2) *	Catas Altas-MG	20°05'S/043°28'W	<i>C.F.Verola</i> 0070B
CL35 (pop. 3) *	Ouro Preto-MG	20°27'S/043°36'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>I.R.Costa</i> 0175
<i>H. ghillanyi</i> (Pabst.) H. G. Jones			
CL12 (pop. 1) *	Conceição do Mato Dentro-MG	19°16'S/043°33'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>M.E.Mansanares</i> 0062
CL13 (pop. 2) *	Conceição do Mato Dentro-MG	19°16'S/043°32'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>M.E.Mansanares</i> 0027
<i>H. gracilis</i> (Pabst) V.P.Castro & Chiron			
Cipó (pop. 1) *	Conceição do Mato Dentro-MG	19°16'S/043°32'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>I.R.Costa</i> s/n°
<i>H. liliputana</i> (Pabst) H. G. Jones			
CL03 (pop. 1) *	Ouro Branco-MG	20°29'S/043°42'W	<i>C.F.Verola et al.</i> 0165
<i>H. longipes</i> (Rchb. F) V.P.Castro & Chiron			
Caraça (pop. 1) *	Catas Altas-MG	20°05'S/043°29'W	<i>C.F.Verola</i> 0070A
<i>H. rupestris</i> (Lindl.) V. P. Castro & Chiron			
CL01 (pop. 1) **	Itacambira-MG	17°00'S/043°20'W	<i>C.F.Verola et al.</i> 0002
CL04 (pop. 2) **	Diamantina-MG	18°12'S/043°42'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>M.E.Mansanares</i> 0007
CL06 (pop. 3) **	Conselheiro Mata-MG	18°17'S/043°50'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>M.E.Mansanares</i> 0008
CL07 (pop. 4) **	Biribiri-MG	18°18'S/043°53'W	<i>C.F.Verola</i> & <i>M.E.Mansanares</i> 0009
CL26 (pop. 5) **	Mandanha-MG	18°01'S/043°34'W	<i>C.F.Verola</i> 0071B
CL34 (pop. 6) **	Joaquim Felício-MG	17°41'S/044°16'W	<i>C.F.Verola et al.</i> 0129
CL40 (pop. 7) *	Botumirim-MG	16°87'S/043°01'W	<i>C.F.Verola et al.</i> s/n°

Tabela 2. Viabilidade de sementes em cruzamentos experimentais em espécies de *Hoffmannseggella*.

Espécie/população	autogamia/tipo	Autopolinização (A)	cruzada intra-populacional (C)	cruzada inter-populacional (CI)	Interação dos Resultados	IAI
<i>H. angereri</i>						
CL27	S/1	1,3 (20)	50,7 (20)	59,5 (13)	A≠C=CI	2,6
CL28	S/1	14,6 (21)	50,8 (27)	44,7 (11)	A≠C=CI	28,7*
Média		7,9 (41)	50,7 (47)	52,1 (24)	A≠C=CI	15,6
<i>H. bradei</i>						
CL05A	N	4,1 (13)	57,3 (10)	-	A≠C	7,0
CL05B	N	4,3 (12)	49,4 (14)	-	A≠C	8,6
CL08A	N	3,5 (25)	40,7 (23)	-	A≠C	8,7
CL08B	N	21,5 (8)	62,5 (10)	-	A=C	34,4*
CL11B	N	6,8 (9)	75,4 (6)	-	A≠C	9,1
Média		8,0 (67)	57,1 (63)	-	A≠C	13,6
<i>H. briegeri</i>						
CL09	S/2	59,9 (9)	64,1 (9)	71,7 (6)	A=C=CI	93,4*
CL10	S/2	45,0 (9)	59,8 (16)	58,5 (6)	A=C=CI	75,1*
Média		52,4 (18)	61,9 (25)	65,1 (12)	A=C=CI	84,3*
<i>H. caulescens</i>						
CL14	S/2	16,8 (10)	43,7 (17)	56,3 (18)	A≠C=CI	37,0*
CL15	S/2	27,4 (22)	70,5 (29)	58,8 (17)	A≠C=CI	38,9*
CL16	S/2	28,3 (19)	51,6 (23)	69,0 (17)	A=C=CI	54,8*
CL17	S/2	17,5 (13)	65,1 (13)	77,6 (16)	A≠C=CI	26,8*
CL19	S/2	0,0 (6)	40,6 (6)	-	A≠C	0
Média		18,0 (70)	54,3 (88)	65,4 (68)	A≠C=CI	31,5*
<i>H. cinnabarina</i>						
CL24	N	0 (17)	64,1 (17)	57,7 (6)	A≠C=CI	0
CL29	N	0,5 (6)	36,8 (7)	28,1 (6)	A≠C=CI	1,4
Média		0,2 (23)	50,4 (24)	42,9 (12)	A≠C=CI	1,4
<i>H. crispata</i>						
CL13AB	S/2	2,3 (26)	61,1 (32)	76,8 (6)	A≠C=CI	3,8
CL18	S/2	5,7 (24)	64,3 (24)	65,7 (6)	A≠C=CI	8,8
CL20	S/2	0 (6)	62,6 (6)	59,8 (7)	A≠C=CI	0
CL23	S/2	0,8 (6)	70,5 (6)	74,2 (6)	A≠C=CI	1,2
Média		2,2 (62)	64,6 (68)	69,1 (25)	A≠C=CI	3,5
<i>H. endsfeldzii</i>						
CL31	N	0 (11)	55,0 (9)	-	A≠C	0
<i>H. fournieri</i>						
CL02B	S/2	0,5 (10)	43,2 (14)	29,5 (13)	A≠C=CI	1,1
CL25	S/2	1,7 (33)	59,2 (49)	70,7 (7)	A≠C=CI	2,9
CL35	N	0 (6)	8,7 (6)	3,5 (6)	A=C=CI	0
Média		0,7 (49)	37,0 (69)	34,6 (26)	A≠C=CI	1,3
<i>H. ghillanyi</i>						
CL12	S/2	0 (6)	62,9 (6)	32,0 (6)	A≠C≠CI	0
CL13	S/2	0 (6)	62,4 (6)	48,0 (6)	A≠C=CI	0
Média		0 (12)	62,6 (12)	40,0 (12)	A≠C=CI	0
<i>H. gracilis</i>						
Cipó	N	1,0 (8)	7,6 (8)	-	A=C	13,0
<i>H. liliputana</i>						
CL03	S/2	0,6 (6)	73,9 (10)	-	A≠C	0,8
<i>H. longipes</i>						
caraça	N	0 (7)	57,6 (10)	-	A≠C	0
<i>H. rupestris</i>						
CL01	S/1	53,0 (20)	68,9 (15)	78,6 (9)	A=C=CI	77,0*
CL04	S/1	66,6 (14)	75,8 (16)	76,3 (6)	A=C=CI	87,9*
CL06	S/1	57,0 (12)	62,5 (14)	60,1 (15)	A=C=CI	91,4*
CL07	S/1	60,5 (11)	70,0 (12)	72,4 (7)	A=C=CI	86,5*
CL26	S/1	66,5 (8)	75,1 (8)	82,4 (6)	A=C=CI	88,6*
CL34	S/1	59,5 (17)	49,4 (9)	61,5 (6)	A=C=CI	120,3*
CL40	S/1	1,3 (14)	12,9 (11)	55,3 (6)	A≠C≠CI	10,4
Média		52,1 (96)	59,2 (85)	69,5 (55)	A=C=CI	80,3*

Ocorrência de Autogamia (S=sim; N=não; 1=produção de viscosidade pela cavidade estigmática, 2=dobramento da polínia), A = Autopolinização (viabilidade de sementes %; n = número de réplicas entre parênteses), C = Polinização cruzada intra-específica intra-populacional (viabilidade de sementes %; n = número de réplicas entre parênteses) e CI = polinização cruzada intra-específica inter-populacional (viabilidade de sementes %; n = número de réplicas entre parênteses). IAI = Índice de Auto-incompatibilidade (* = espécie ou população auto-compatível). Ver tabela 1 para as abreviações das populações. Tamanho das amostras entre parênteses. Para a coluna de Interação dos Resultados, (=) diferença não significativa e (≠) diferença significativa (ANOVA um fator com teste de Tukey a posteriori; $P \leq 0.001$). Primeira coluna representa espécies e populações como receptores de pólen.

Tabela 3. Percentual de sementes viáveis em cruzamentos experimentais inter-específicos entre espécies de *Hoffmannseggella*. Colunas representam os acrônimos formados pelas três primeiras letras do epíteto específico de cada espécie doadora de polínias (*xacrônimo*). Na primeira coluna as espécies e populações receptoras de polínias, e na última linha os meses do ano. Barras em branco na tabela, quando comparadas à última linha representam os meses em que as espécies da primeira coluna florescem ao longo do ano. Células preenchidas de cinza claro representam que as duas espécies envolvidas no cruzamento têm fenologia de floração sobreposta em condições naturais, e cinza escuro que as espécies têm fenologia de floração e distribuição geográfica sobrepostas.

Espécie / População receptora	<i>xangereri</i>	<i>xbradei</i>	<i>xbriegeri</i>	<i>xcaulescens</i>	<i>xcinnabarina</i>	<i>xcrispata</i>	<i>xendsfeldzii</i>	<i>xfournieri</i>	<i>xghillanyi</i>	<i>xliliputana</i>	<i>xlongipes</i>	<i>xrupestris</i>
<i>H. angereri</i>												
CL27	-	-	-	-	47.3	50.3	-	-	-	-	-	45.3
CL28	-	-	-	-	44.9	56.0	-	-	-	-	-	46.0
<i>H. bradei</i>												
CL05A	-	-	-	-	-	-	-	67.6	-	-	-	-
CL08A	-	-	-	-	-	-	-	58.5	-	-	-	-
<i>H. briegeri</i>												
CL10	-	-	-	-	-	-	-	-	64.2	-	-	-
<i>H. caulescens</i>												
CL15	-	-	-	-	-	55.0	-	-	-	-	-	-
CL16	-	-	-	-	-	85.7	-	-	-	-	-	-
CL17	-	-	-	-	-	57.0	-	-	-	-	-	-
CL19	-	-	-	-	-	54.5	2.8	-	-	-	-	-
<i>H. cinnabarina</i>												
CL24	71.8	-	-	-	-	89.2	-	31.9	-	-	-	55.9
<i>H. crispata</i>												
CL13AB	82.5	-	-	53.5	60.7	-	31.0	53.1	-	-	-	25.2
CL18	63.9	-	-	60.7	-	-	-	-	-	-	-	-
CL20	51.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CL23	59.6	-	-	50.8	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. endsfeldzii</i>												
CL31	-	-	-	0.0	-	30.6	-	-	-	-	-	-
<i>H. fournieri</i>												
CL02	-	-	-	-	-	71.4	-	-	-	-	0.0	-
CL25	-	47.3	-	-	58.8	59.2	-	-	-	-	-	-
CL35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.8	-	-
<i>H. ghillanyi</i>												
CL12	-	-	0.0	-	-	-	-	-	-	-	0.0	-
<i>H. liliputana</i>												
CL03	-	-	-	-	-	-	-	13.4	-	-	-	-
<i>H. longipes</i>												
caraça	-	-	-	-	-	-	-	50.2	32.0	-	-	-
<i>H. rupestris</i>												
CL01	78.6	-	-	-	77.5	-	-	-	-	-	-	-
CL06	52.9	-	-	-	65.9	91.6	-	-	-	-	-	-
CL07	58.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CL26	86.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meses	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez

Tabela 4. Viabilidade de sementes em cruzamentos experimentais e em frutos coletados em populações naturais. Onde auto = autopolinização; intra = polinização cruzada intra-específica intra-populacional; natural = frutos coletados em campo. Todos os valores estão em porcentagem e o tamanho da amostra representado entre parênteses. * espécies com taxa viabilidade de sementes muito reduzida em todos os tratamentos.

Espécie/população	auto	intra	natural
<i>H. angereri</i>			
CL27	1,3 (20)	50,7 (20)	63,9 (4)
CL28	14,6 (21)	50,8 (27)	44,8 (8)
Média	7,9 (41)	50,7 (47)	54,4 (12)
<i>H. bradei</i>			
CL05A	4,1 (13)	57,3 (10)	58,4 (6)
CL05B	4,3 (12)	49,4 (14)	51,0 (3)
CL08A	3,5 (25)	40,7 (23)	48,7 (6)
CL08B	21,5 (8)	62,5 (10)	48,0 (6)
CL11B	6,8 (9)	7,4 (6)	51,9 (3)
Média	8,0 (67)	57,1 (63)	51,6 (24)
<i>H. briegei</i>			
CL09	59,9 (9)	64,1 (9)	62,1 (12)
CL10	45,0 (9)	59,8 (16)	54,7 (13)
Média	52,4 (18)	61,9 (25)	58,4 (25)
<i>H. caulescens</i>			
CL14	16,8 (10)	43,7 (17)	47,2 (3)
CL15	27,4 (22)	70,5 (29)	72,6 (3)
CL16	28,3 (19)	51,6 (23)	64,5 (6)
CL17	17,5 (13)	65,1 (13)	66,8 (4)
CL19	0 (6)	40,6 (6)	40,0 (3)
Média	18,0 (70)	54,3 (88)	58,2 (19)
<i>H. cinnabarina</i>			
CL24	0 (17)	64,1 (17)	67,3 (3)
CL29	0,5 (6)	36,8 (7)	40,2 (3)
Média	0,2 (23)	50,4 (24)	53,7 (6)
<i>H. crispata</i>			
CL13AB	2,3 (26)	61,1 (32)	44,6 (8)
CL18	5,7 (24)	64,3 (24)	68,7 (4)
CL20	0 (6)	62,6 (6)	63,0 (3)
CL23	0,8 (6)	70,5 (6)	68,5 (3)
Média	2,2 (62)	64,6 (68)	61,2 (18)
<i>H. endsfeldzii</i>			
CL31	0 (11)	55,0 (9)	33,7 (7)
<i>H. fournieri</i>			
CL02B	0,5 (10)*	43,2 (14)	11,8 (6)*
CL25	1,7 (33)	59,2 (49)	51,7 (4)
CL35	0 (6)*	8,7 (6)*	0,9 (3)*
Média	0,7 (49)	37,0 (69)	21,5 (13)
<i>H. ghillanyi</i>			
CL12	0 (6)	62,9 (6)	60,4 (3)
CL13	0 (6)	62,4 (6)	62,5 (3)
Média	0 (12)	62,6 (12)	61,5 (6)
<i>H. gracilis</i>			
Cipó	1,0 (8)*	7,6 (8)*	6,9 (3)*
<i>H. liliputana</i>			
CL03	0,6 (6)	73,9 (10)	78,5 (3)
<i>H. longipes</i>			
caraça	0 (7)	57,6 (10)	59,0 (3)
<i>H. rupestris</i>			
CL01	53,0 (20)	68,9 (15)	66,2 (3)
CL04	66,6 (14)	75,8 (16)	43,6 (4)
CL06	57,0 (12)	62,5 (14)	70,0 (3)
CL07	60,5 (11)	70,0 (12)	36,5 (4)
CL26	66,5 (8)	75,1 (8)	65,2 (3)
CL34	59,5 (17)	49,4 (9)	51,8 (4)
CL40	1,3 (14)*	12,9 (11)*	10,8 (3)*
Média	52,1 (96)	59,2 (85)	48,7 (24)

Apêndice 1. Percentual de frutificação e abortos espontâneos em cruzamentos experimentais de espécies de *Hoffmannseggella*. (auto = autopolinização; intrasp. intrapop.= polinização cruzada intra-específica intra-populacional; ** = polinização cruzada intra-específica inter-populacional, tendo as espécies e populações da primeira coluna como receptores de polinário; * = polinização cruzada inter-específica). Colunas representam os acrônimos formados pelas três primeiras letras do epíteto específico de cada espécie doadora de polínias (**xacrônimo**). Todas as combinações de cruzamentos efetuados utilizando populações de *H. angereri*, *H. bradei*, *H. briegeri* e *H. caulescens*.

Espécie / População	auto	intrapop. intrapop. p.	Xang (CL27)	Xang (CL28)	Xcin (CL24)	Xcri (CL13AB)	Xcri (CL18)	Xcri (CL23)	Xfou (CL25)	Xrup (CL01)	Xrup (CL06)	Xrup (CL07)	Xrup (CL26)
<i>H. angereri</i>													
CL27	70 (30)	77,4 (22,6)	-	**88,2 (11,8)	*71,4 (28,6)	*100 (0)	*100 (0)	-	-	*83,3 (16,7)	*40 (60)	*100 (0)	-
CL28	96,6 (3,4)	93,3 (6,7)	**80 (20)	-	*85,7 (14,3)	-	*75 (25)	*100 (0)	-	-	-	*100 (0)	*100 (0)
Média	83,3 (16,7)	85,3 (14,7)	**84,1 (15,9)	*94,4 (5,6)									
<i>H. bradei</i>													
CL05A	100 (0)	100 (0)	-	-	-	-	-	-	*100 (0)	-	-	-	-
CL05B	92,3 (7,7)	100 (0)	-	-	-	-	-	-	*00 (0)	-	-	-	-
CL08A	92,6 (7,4)	92 (8)	-	-	-	-	-	-	*44,4 (55,6)	-	-	-	-
CL08B	80 (20)	100 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CL11	100 (0)	100 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	93,0 (7)	98,4 (1,6)	** -	*48,0 (52)									
Espécie / População	auto	intrapop. intrapop. p.	Xbri (CL09)	Xbri (CL10)	Xcau (CL14)	Xcau (CL15)	Xcau (CL16)	Xcau (CL17)	Xcri (CL13AB)	Xcri (CL18)	Xcri (CL23)	Xend (CL31)	Xghi (CL12)
<i>H. briegeri</i>													
CL09	100 (0)	100 (0)	-	**100 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CL10	88,9 (9,1)	100 (0)	**100 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*100 (0)
Média	98,9 (1,1)	100 (0)	**100 (0)	*100 (0)									
<i>H. caulescens</i>													
CL14	88,3 (16,7)	95,8 (4,2)	-	-	-	**100 (0)	**100 (0)	**100 (0)	-	-	-	-	-
CL15	96,6 (3,4)	93,5 (6,5)	-	-	**100 (0)	-	**100 (0)	**80 (20)	-	*90 (10)	-	-	-
CL16	91,3 (8,7)	85,7 (14,3)	-	-	**100 (0)	**100 (0)	-	**100 (0)	-	-	*100 (0)	-	-
CL17	100 (0)	82,1 (17,9)	-	-	**80 (20)	**80 (20)	**100 (0)	-	-	-	-	-	-
CL19	100 (0)	50 (50)	-	-	-	-	-	**100 (0)	*100 (0)	-	-	*100 (0)	-
Média	95,2 (4,8)	81,4 (18,6)	**95,4 (4,6)	*95,4 (4,6)									

Apêndice 1. Percentual de frutificação e abortos espontâneos em cruzamentos experimentais de espécies de *Hoffmannseggella*. (auto = autopolinização; intrasp. intrapop.= polinização cruzada intra-específica intra-populacional; ** = polinização cruzada intra-específica inter-populacional, tendo as espécies e populações da primeira coluna como receptores de polinário; * = polinização cruzada inter-específica). Colunas representam os acrônimos formados pelas três primeiras letras do epíteto específico de cada espécie doadora de polínias (**xacrônimo**). Todas as combinações de cruzamentos efetuados utilizando populações de *H. cinnabarina*, *H. crispata* e *H. endsfeldzii*.

Espécie / População	auto	intrapop. intrapop.	Xang (CL27)	Xang (CL28)	Xcau (CL15)	Xcau (CL16)	Xcau (CL19)	Xcin (CL24)	Xcin (CL29)	Xcri (CL13AB)	Xcri (CL18)	Xcri (CL20)	Xcri i(C23)	Xend (CL31)	Xfou (CL02)	Xfou (CL25)	Xrup (CL01)	Xrup (CL06)
<i>H. cinnabarina</i>																		
CL24	85,7 (14,3)	100 (0)	*100 (0)	*85,7 (14,3)	-	-	-	-	**100 (0)	*100 (0)	-	-	-	-	-	*83,3 (16,7)	*100 (0)	*100 (0)
CL29	80 (20)	80 (20)	-	-	-	-	-	**100 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	82,8 (17,2)	90,0 (10)	**100 (0)	*94,8 (5,2)														
<i>H. crispata</i>																		
CL13AB	94,1 (5,9)	97,1 (2,9)	*100 (0)	-	-	-	*80 (20)	*100 (0)	-	-	-	-	**100 (0)	*80(20)	*75 (25)	*75 (25)	-	*50 (50)
CL18	91,9 (8,1)	96,6 (3,4)	*85,7 (14,3)	*87,5 (12,5)	*90 (10)	-	-	-	-	-	-	**100 (0)	-	-	-	-	-	-
CL20	66,6 (33,3)	25 (75)	-	-	-	-	-	-	-	-	**100 (0)	-	-	-	-	-	-	-
CL23	100 (0)	100 (0)	-	*100 (0)	-	*100 (0)	-	-	-	**100 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	88,1 (11,9)	79,7 (20,3)	**100 (0)	*85,3 (14,7)														
<i>H. endsfeldzii</i>																		
CL31	76,9 (23,1)	100 (0)	-		-	-	*100 (0)	-	-	*80 (20)	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	76,9 (23,1)	100 (0)	** -	*90 (10)														

Apêndice 1. Percentual de frutificação e abortos espontâneos em cruzamentos experimentais de espécies de *Hoffmannseggella*. (auto = autopolinização; intrasp. intrapop.= polinização cruzada intra-específica intra-populacional; ** = polinização cruzada intra-específica inter-populacional, tendo as espécies e populações da primeira coluna como receptores de polinário; * = polinização cruzada inter-específica). Colunas representam os acrônimos formados pelas três primeiras letras do epíteto específico de cada espécie doadora de polínias (**xacrônimo**). Todas as combinações de cruzamentos efetuados utilizando populações de *H. fournieri*, *H. ghillanyi*, *H. gracilis*, *H. liliputana*, *H. longipes* e *H. rupestris*.

Espécie / População	auto	intrapop. intrapop.	Xbra (CL05A)	Xbra (CL05B)	Xbra (CL08A)	Xbri (CL10)	Xcin (CL24)	Xcri (CL13AB)	Xfou (CL02)	Xfou (CL25)	Xfou (CL35)	Xghi (CL12)	Xghi (CL13)	Xlil (CL03)
<i>H. fournieri</i>														
CL02	100 (0)	100 (0)	-	-	-	-	-	*50 (50)	-	**100 (0)	**100 (0)	-	-	-
CL25	100 (0)	98 (2)	*100 (0)	*100 (0)	*75 (25)	-	*100 (0)	*100 (0)	**66,6 (33,4)	-	-	-	-	-
CL35	100 (0)	50 (50)	-	-	-	-	-	-	**100 (0)	-	-	-	-	*100 (0)
Média	100 (0)	82,6 (17,4)	**91,6 (8,4)	*89,3 (10,7)										
<i>H. ghillanyi</i>														
CL12	33,3 (66,7)	100 (0)	-	-	-	*100 (0)	-	-	-	-	-	-	**100 (0)	-
CL13	100 (0)	90 (10)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**100 (0)	-	-
Média	66,6 (33,4)	95,0 (5)	**100 (0)	*100 (0)										
<i>H. gracilis</i>														
-cipó	100 (0)	100 (0)												
Espécie / População	auto	intrapop. intrapop. p.	Xang (CL27)	Xang (CL28)	Xcin (CL24)	Xcri (CL13 AB)	Xfou (CL35)	Xrup (CL01)	Xrup (CL04)	Xrup (CL06)	Xrup (CL07)	Xrup (CL26)	Xrup (CL34)	Xrup (CL40)
<i>H. liliputana</i>														
CL03	70 (30)	75 (25)	-	-	-	-	*00 (100)	-	-	-	-	-	-	-
Média	70 (30)	75 (25)	**	*00 (100)										
<i>H. longipes</i>														
caraça	100 (0)	100 (0)												
<i>H. rupestris</i>														
CL01	87 (13)	68,2 (31,8)	*50 (50)	-	*100 (0)	-	-	-	-	**100 (0)	**00 (0)	-	-	-
CL04	100 (0)	100 (0)	-	-	-	-	-	-	-	**100 (0)	**100 (0)	-	-	-
CL06	92,8 (7,2)	87,5 (12,5)	*80		*100 (0)	*100 (0)	-	**100 (0)	**100 (0)	-	**100 (0)	-	-	**66,7 (33,3)
CL07	78,6 (21,4)	75	*00	*66,6 (33,4)	-	-	-	**100 (0)	**100 (0)	**00 (100)	-	-	-	-
CL26	88,9 (11,1)	62,5 (37,5)	-	*100 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	**50 (50)	-
CL34	100 (0)	100 (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	**100 (0)	-	-
CL40	100 (0)	68,8 (31,2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Média	92,5 (7,5)	80,3 (19,7)	**93,6 (6,4)	*74,6 (25,4)										

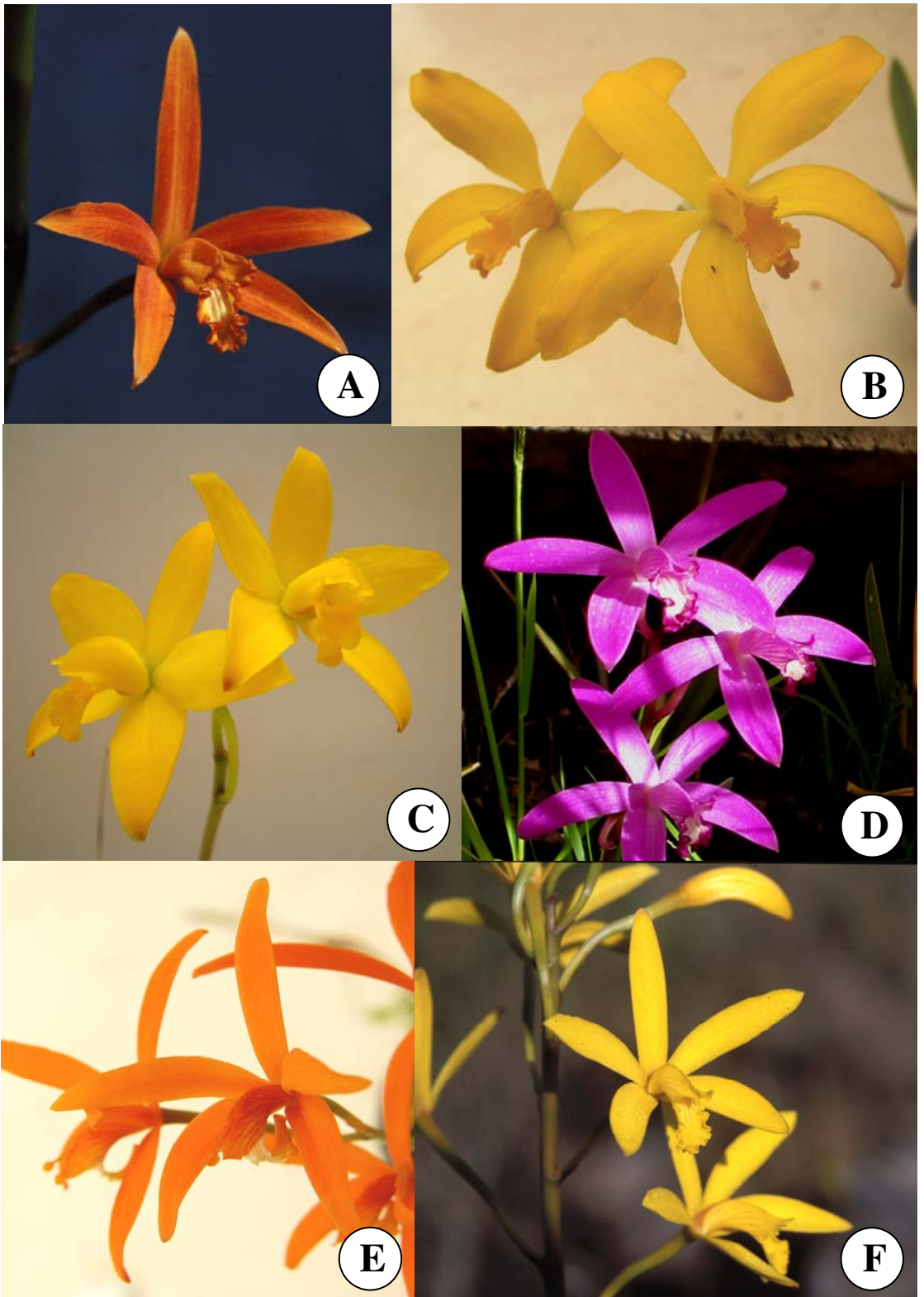


Figura 1. *Hoffmannsegglla angereri* (A); *H. bradei* (B); *H. briegei* (C); *H. caulescens* (D); *H. cinnabarina* (E) e *H. crispata* (F).

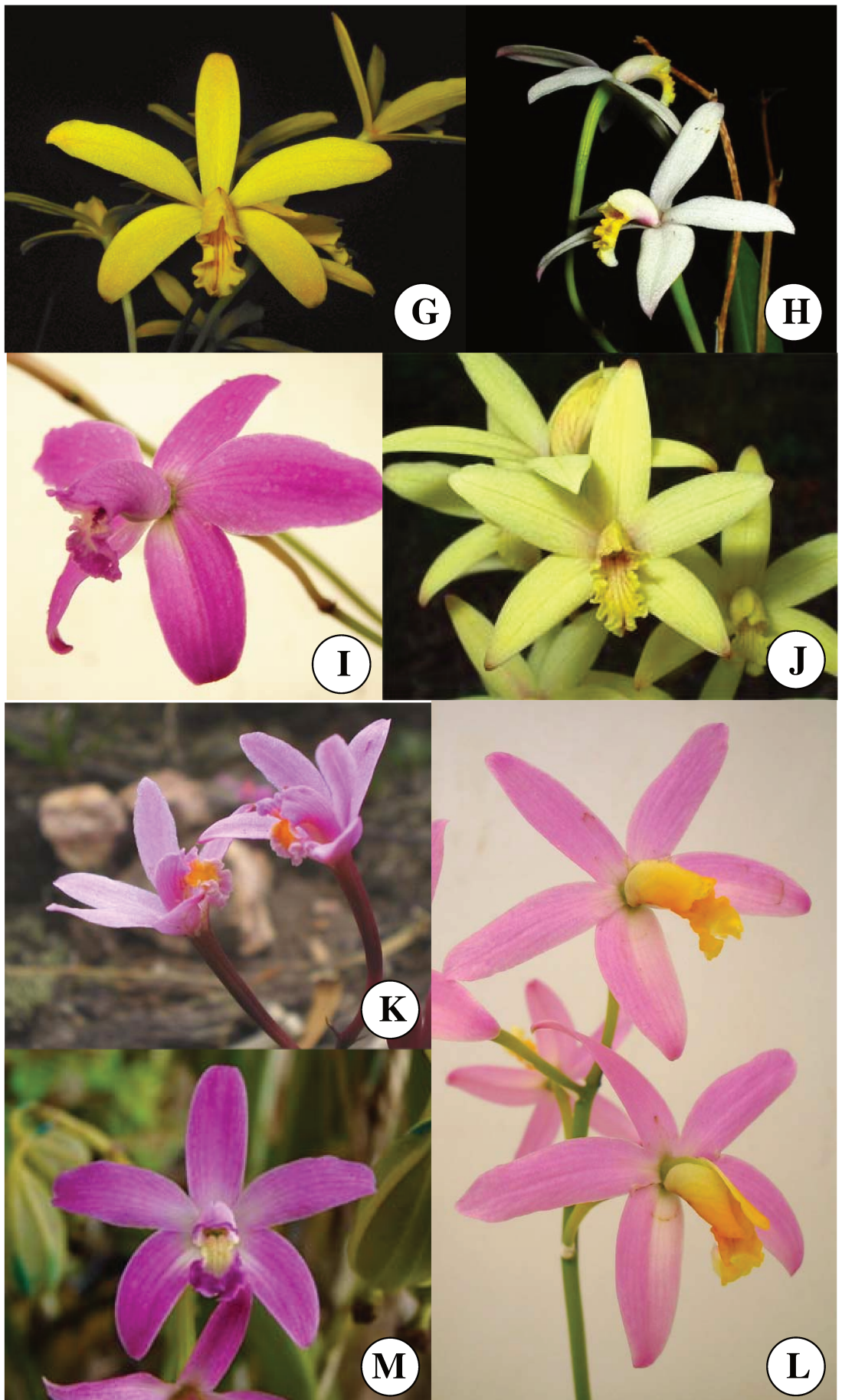


Figura 1 (continuação). *Hoffmannseggella endsfeldzii* (G); *H. fournieri* (H); *H. ghillanyi* (I); *H. endsfeldzii* (J); *H. liliputana* (K); *H. longipes* (L) e *H. rupestris* (M).

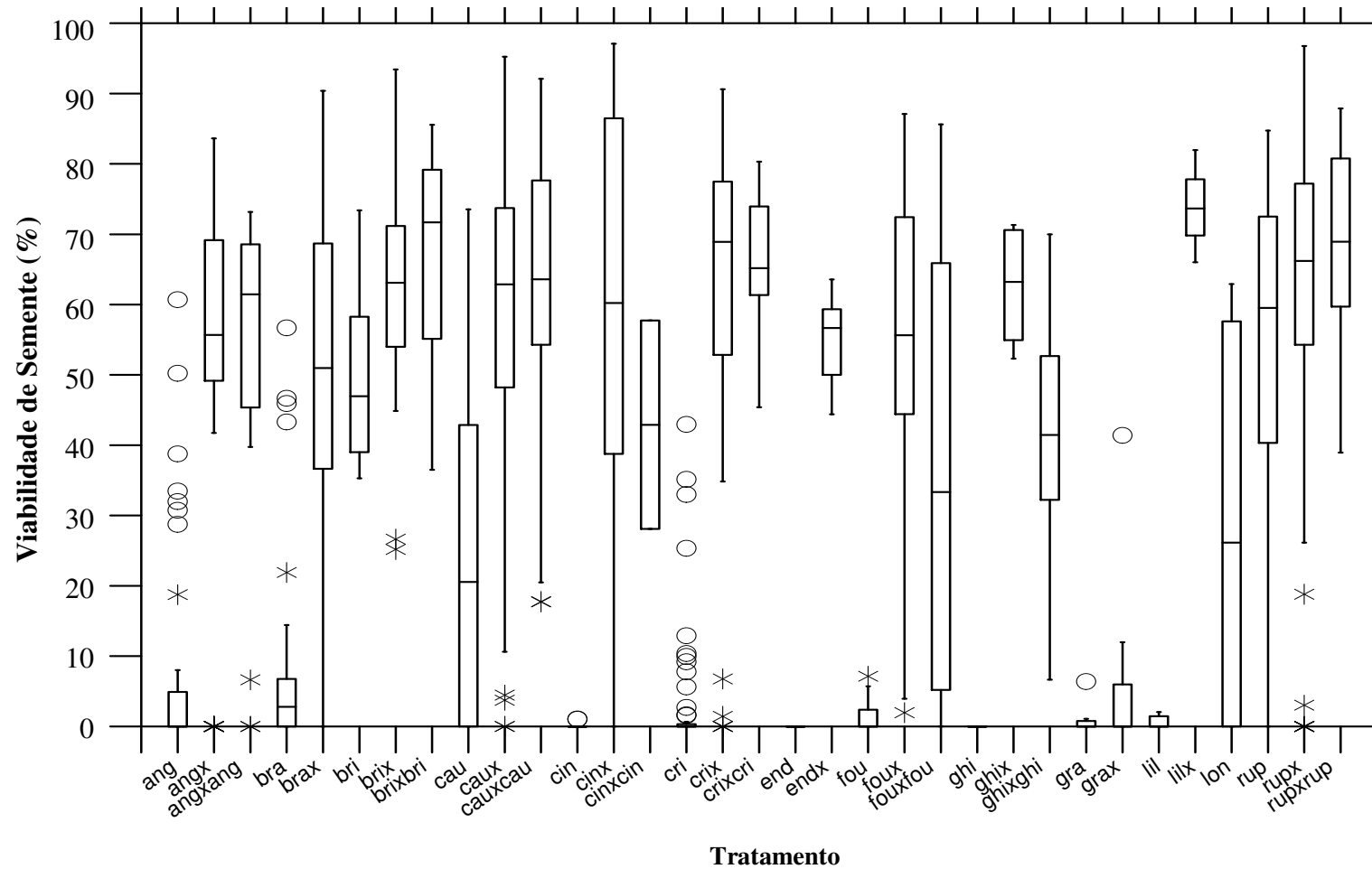


Figura 2. Box-Plot de viabilidade de sementes em cruzamentos intra-específicos. Acrônimos formados pelas três primeiras letras do epíteto específico. Acrônimo sozinho representa auto-polinização (ex. ang); acrônimos seguidos de x (ex. angx) representam polinização cruzada intra-específica intra-populacional e acrônimos unidos pelo x (ex. angxang) representam polinização cruzadas intra-específica inter-populacional. As linhas horizontais no interior das caixas indicam os valores da medianas. Os símbolos (*) e o (o) representam valores não levados em consideração na análise (“outlines”).

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 3. (A) primórdios do desenvolvimento do óvulo; (B) estrutura diferenciada do óvulo em estágio inicial; Megasporogênese: (C) célula mãe do megásporo; (D) divisão I do megasporófito; (E) divisão II do megasporófito; Megagametogênese: (F) divisão III do megagametófito; (G) início da divisão V do megagametófito; (H) final da divisão V do megagametófito; (I) saco embrionário no início da maturação e (J) saco embrionário maduro, sem o núcleo polar (degenerado). pl=placenta; fn=funículo; n=nucelo; ti=tegumento interno; te=tegumento externo; mi=micrópila; rc=região calazal; cme=célula mãe do megásporo; se=saco embrionário; si=sinégides; o=oosfera; np=núcleo polar e an=antípodas.

Figura 4. (A) tubos polínicos normais germinando na cavidade estigmática (polinização cruzada 3-5 dias); (B) tubos polínicos normais no final da coluna (polinização cruzada 7-10 dias); (C) tubos polínicos normais (seta longa) embebidos nos primórdios de óvulos (seta curta) em desenvolvimento na placenta do ovário (polinização cruzada 25-30 dias); (D) tubos polínicos normais (seta longa) passando a deformados (seta curta) em autopolinizações (24-32 dias); (E) tubos polínicos completamente deformados no final do ovário (autopolinização 60 dias); (F) detalhe dos tubos polínicos deformados, com grande deposição de calose e espessamento nas paredes (autopolinização 60 dias); (G) tubo polínico deformado e com ápice estourando antes de ocorrer a fertilização (autopolinização 60-80 dias); (H) tubo polínico na região da micrópila antes da fertilização (60-80 dias); (I) tubo polínico entrando na micrópila pouco antes da fertilização; (J) fecundação do óvulo; (K) primeira divisão embrionária; (L) sementes com embriões bem desenvolvidos; (M) sementes sem embrião e com embrião rudimentar; (N) semente poliembriônica e (O) capa da semente em desenvolvimento (verde) mesmo após a degeneração do óvulo não fecundado (vermelho-autopolinização). o=oosfera, tp=tubo polínico, ne=núcleo espermático, fe=fecundação, su=suspensor, er=embrião rudimentar.

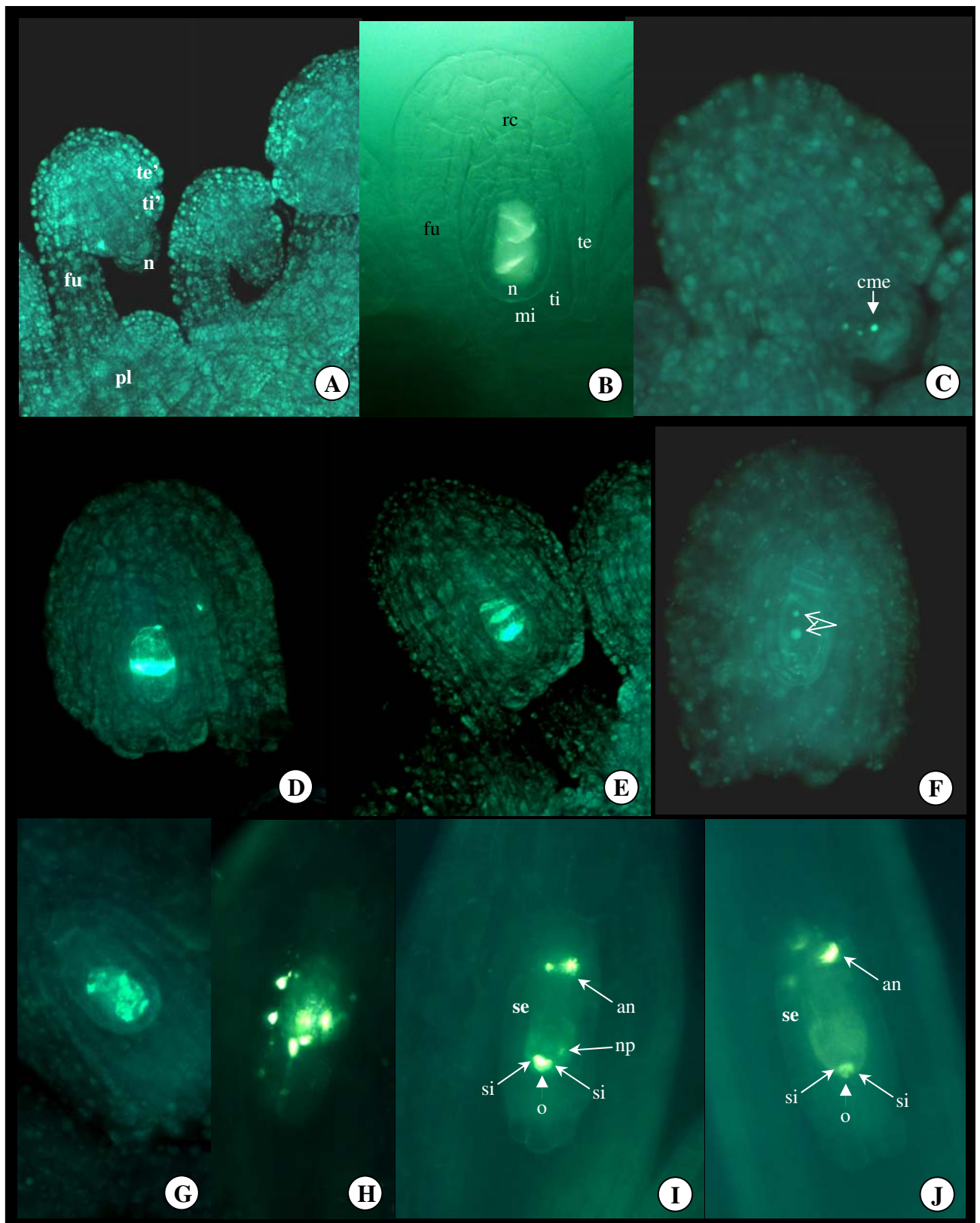


Figura 3.

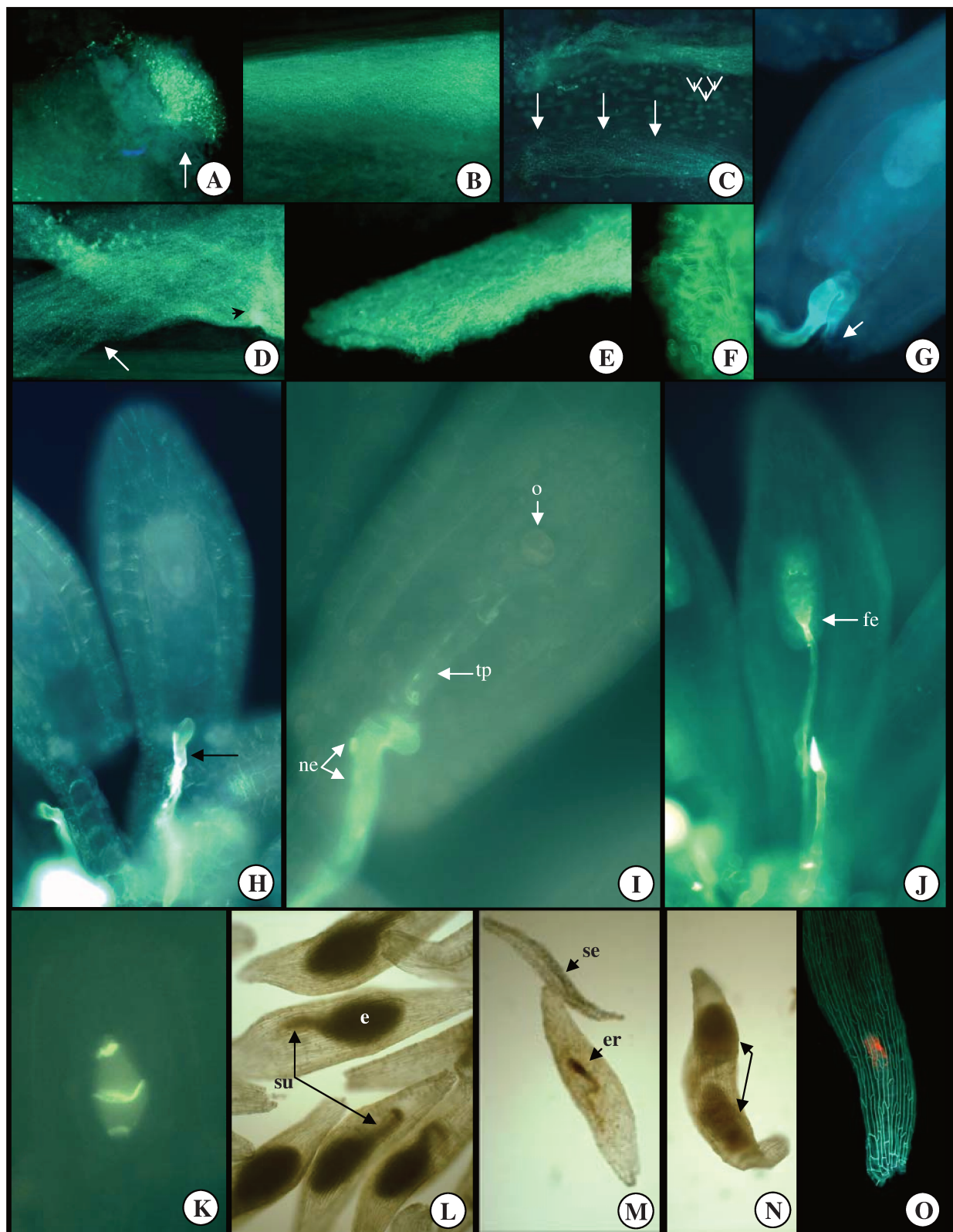


Figura 4.

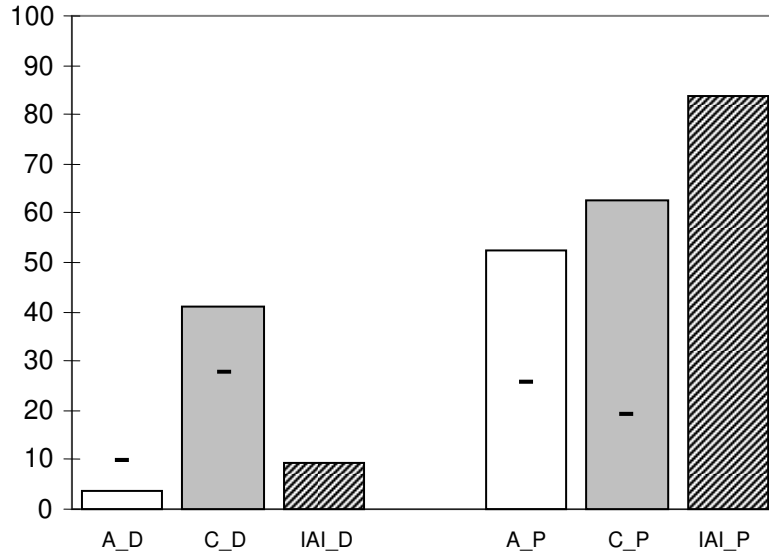


Figura 5. Porcentual de viabilidade de sementes em cruzamentos experimentais de auto-polinização (A) e polinização cruzada intra-específica intra-populacional (C), envolvendo espécies diplóides (D) e poliplóides (P). Índice de auto-incompatibilidade (IAI) representado pelas barras preenchidas por linhas transversais. (-) = desvio padrão. ANOVA dois fatores; $P \leq 0.001$ entre diplóides e poliplóides. Diferenças significativas observadas entre diplóides (auto e cruzada) e poliplóides, e não significativa dentro de poliplóides (auto e cruzada).

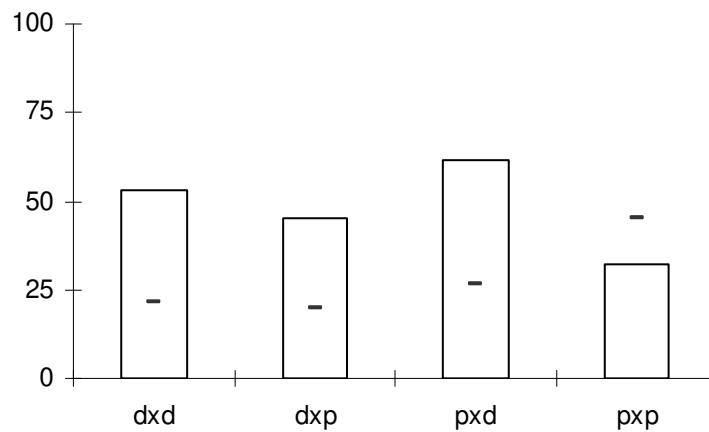


Figura 6. Percentual de viabilidade de sementes em cruzamentos inter-específicos, considerando o nível de ploidia entre os pares de espécies utilizados nos cruzamentos experimentais. dxd = cruzamento entre duas espécies diplóides; dxp = cruzamento entre diplóides e poliplóides, tendo diplóide como receptor de polínias; pxd = cruzamento entre poliplóide e diplóide, tendo poliplóide como receptor de polínias e pxp = cruzamento entre espécies poliplóides. (-) desvio padrão. (ANOVA um fator $P \geq 0,001$). Diferença não significativa entre dxd = dxp = pxd = pxp.

Chromosome studies, cytogeography and reassessment of polyploidy in the Brazilian endemic genus *Hoffmannseggella* H. G. Jones (Orchidaceae:Laeliinae)

Abstract: The chromosome number of the Brazilian endemic genus *Hoffmannseggella* H.G.Jones is here described and discussed, in order to help determine the principal mechanisms responsible for diversity and evolution in this group. The chromosome counts of 12 species and 24 populations were obtained, eight of which are new. The chromosome counts of twelve species and three natural hybrids of this study, added to twelve species studied before, revealed that sixteen species of the group are diploid ($2n=2x=40$), one triploid ($2n=3x=60$), two tetraploid ($2n=4x=80$), one dysploid with $2x=44$ and five that can be recognized as a polyploid series with numbers that varies among $2n=40$, 60 or 80 chromosomes. Of the three hybrids studied here, one is triploid and two are diploid. With these results, the knowledge of the chromosome numbers in *Hoffmannseggella* was increased from 12 (28.6%) to 25 species (59.5%, without hybrids). Polyploidy (29.2% of studied species) seems to have an important role in the evolution of this genus, but is not so prevalent in this group as previously supposed. In accordance to results of molecular dating, polyploid species are a new trend in the *Hoffmannseggella* evolution and appeared several times independently, but only in new lineages between late Pliocene and mainly in the Pleistocene. Biogeographically, polyploid series are more frequent in central areas of Espinhaço range in Minas Gerais state and can be the result of hybridization processes between previously established cytotypes or between different species, with further polyploidization.

Introduction

The Brazilian orchid genus *Hoffmannseggella* H.G.Jones is a member of the subfamily Epidendroideae Kosteletzky, subtribe Laeliinae Benth. Laeliinae is one of the largest subtribes in the Orchidaceae with approximately 1470 species, surpassed only by Pleurothaliinae (Dressler, 1993). *Hoffmannseggella* was recently reestablished by Chiron & Castro Neto (2002) and their species were previously included in diverse genus (as *Laelia* Lindl. and *Sophranitis* Lindl.). In the most recent review (Chiron & Castro Neto, 2002) 32 species were recognized in the genus, but the number has now increased to 42 (Verola & Semir, 2007). *Hoffmannseggella* circumscribes only perennial and rupicolous herbs, with inflorescences in simple, 2-20-flowered apical racemes, with medium size flowers and diverse color variation among species, including pink, red, orange, yellow, white, and combinations. It is one of the most ornamental genera within Laeliinae and is distributed only in the high altitude rocky complex at elevations above 900 m in Southeastern (Minas Gerais, Rio de Janeiro and Espírito Santo states) and Northeastern (Bahia state) Brazil (Verola & Semir, 2007). These areas are discontinuous and restricted to the rocky outcrops surrounded in lower altitudes by diverse kinds of vegetational matrices. Due to the discontinuity of the mountain ranges, many species of *Hoffmannseggella* are distributed in scattered populations, and this led to the high levels of microendemism (47% of the genus) with only one population known in natural conditions (Verola *et al.*, 2007). In spite of this great amount of endemism, only two species, *H. endsfeldzii* (Pabst) V. P. Castro & Chiron and *H. gracilis* (Pabst) V. P. Castro & Chiron, are protected in private and National conservation areas, respectively. Remaining species of *Hoffmannseggella*, in spite of prohibition of international commerce of species collected in the wild (CITES), and Brazilian National Environmental Agency (IBAMA), are outside of protected areas and exposed to diverse anthropic pressure in natural conditions such as habitat destruction through quarries, ore prospection, cattle pasture, fire or illegal collecting and commercialization (Verola *et al.*, 2007).

The exceptional diversity of orchids presents an excellent opportunity for studying factors that promote speciation in plants. Several factors have been considered important in orchid speciation, such as chromosome diversity and high incidence of polyploidy, adaptation to specialized pollinators and spatial isolation (Gill, 1989).

Until now, cytological data on Brazilian *Hoffmannseggella* have been reported by Blumenschein (1960) and more recently by Costa (2006). Both authors call attention at the high incidence of polyploidy and hybrids in this group. Polyploidy has been frequently associated to

evolution and diversification in plants (Soltis *et al.*, 2007) reaching from 47% to 70% of Angiosperm species (Grant, 1981; Lewis, 1980). This process is recognized to play a principal role in the evolution of many groups of organisms (Soltis & Soltis, 1993, 2000; Ramsey & Schemske, 1998; Otto & Whitton, 2000) and is one of the most important factor to be considered in biosystematic research (Stebbins, 1947, 1950, 1971, 1985; Grant, 1981; Soltis *et al.*, 2007).

Polyploidy is widespread in orchids and has been recorded in different groups, such as *Platanthera* (Wallace, 2003; Sheviak & Bracht, 1998; Tanaka & Kamemoto, 1984), *Dactylorhiza* (Devos *et al.*, 2006; Pedersen, 2006; Hedrén *et al.*, 2007), *Calopogon* (Goldman *et al.*, 2004) and in different genera of Laeliinae, such as *Hoffmannseggella* (Blumenschein 1960a,b; Costa 2006), *Cattleya* and *Laelia* (Tanaka & Kamemoto, 1974; Tanaka & Kamemoto, 1984) and in intrafamilial levels (Felix & Guerra, 2005).

Knowledge of breeding systems may strengthen taxonomic judgments and provide background information for evolutionary interpretations (Ornduff, 1969, 1978; Catling, 1982). Chromosome doubling can affect the magnitude of inbreeding depression expression in flowering plants, and has important implications for the evolution of polyploidy and breeding systems in natural populations (Stebbins, 1971; Grant, 1981; Husband & Schemske, 1996, 1997; Rausch & Morgan, 2005). Current models have shown that some reproductive circumstances favour polyploidy in diploid populations or mixed cytotypes, depending on the relative differences in fertility and viability between cytotypes (Felber, 1991; Rodriguez, 1996; Rausch & Morgan, 2005). In this case, the evolution of polyploidy in natural systems are linked to the differential expression of inbreeding depression among cytotypes, altering the outcome of selection on self-fertilizing genotypes and mating systems evolution.

The aim of this work is to determinate the chromosome numbers in *Hoffmannseggella* species to access the origin and importance of polyploidy in the evolution, biogeography and breeding systems of this group.

Material and Methods

Twenty three populations representing twelve species and three natural hybrids of *Hoffmannseggella* occurring in the Brazilian Campos Rupestres vegetation and rocky outcrops were studied in different localities of Southeastern and Northeastern Brazil (Table 1). Individuals were collected in natural populations and grown in the greenhouse of Genetics and Evolution

Department at State University of Campinas (UNICAMP) (22°49'S; 47°06'W; ca. 700m alt.) or collected of *typus* specimens donated by authors. Vouchers were deposited in the herbarium of State University of Campinas (UEC) (Table 1). Identification of species followed the review of Chiron & Castro Neto (2002).

For mitotic analysis, root tips and ovary tissues were pretreated with 0.2 mM 8-hydroxyquinoline for 24 h at 8 °C, after which the material was fixed in Farmer solution (ethanol: acetic acid, 3:1, v/v) for 24 h and maintained in 70% ethanol in a freezer. The slides preparation followed the HCl-Giemsa technique (Guerra, 1983). Chromosome numbers were based on counts of 10 to 20 cells per species in each population. The slides were examined by light microscopy and cells with a good chromosome condensation and spreading were photographed with a photomicroscope (Olympus BX 51) coupled with digital camera and Image Pro Plus 6.0 software.

Distribution maps of populations and their respective chromosome data obtained were plotted with DIVA-GIS 5.2 software (gis.cip.cgiar.org/gis/tools/diva.htm). The species distribution and phenology information were assessed through national herbaria, specialized bibliography and fieldwork observations. Available chromosome counts were compared with phylogenetic and molecular dating cladograms (Verola *et al.*, *unpublished* – Chapter 2) to establish genealogic and temporal origin of the polyploidization processes in *Hoffmannseggella* and some closely related genera.

Results

Chromosome counts and ploidy level

The chromosome numbers obtained for 12 species and three natural hybrids in 23 different populations were $2n=40$, $2n=60$ and $2n=80$ (Figure 1, Table 2).

Nine species (*H. bahiensis*, *H. cinnabarina* – two populations, *H. concepcionensis*, *H. crispata* – two populations, *H. endsfeldzii*, *H. fournieri* – two populations, *H. gracilis*, *H. kautskyiana* and *H. verboonenii*) and two natural hybrids between *H. rupestris* and *H. angereri* (*H. xhybrid* 1 and *H. xhybrid* 2) are diploid ($2n=2x=40$). Only *H. gloedeniana* and *H. xbritoi* are triploid ($2n=3x=60$). Cytotypes with different ploidy levels were observed in *H. caulescens* ($2n=40$, 60 and 80) and *H. rupestris* ($2n=40$ and 80) distributed in different populations (Table 2). For *H. caulescens*, three populations (*pops* 3, 4 and 5) were tetraploids ($2n=4x=80$), one

population (*pop* 1) had triploid ($2n=60$) and tetraploid ($2n=80$) individuals and only one population (*pop* 2) presented a polyploid series with $2n=40$, 60 and 80. Diploid and tetraploid cytotypes were also observed in *H. rupestris* in different populations (Table 2). No dysploid populations were observed.

Geographical distribution of ploidy levels and flowering phenology

In the Figure 2 a geographic distribution of ploidy levels of species with known chromosome numbers are presented. Diploid populations occur mainly in the borders of *Hoffmannseggella* distribution that correspond the North (Chapada Diamantina – BA), South (South of Serra do Espinhaço – MG) and East (East of Serra do Espinhaço – MG) of Espinhaço Range and in the high altitudes rock outcrops of Rio de Janeiro and Espírito Santo states (Fig. 2). Tetraploid, triploid (with exception of *H. gloedeniana*), dysploid and polyploid series populations are predominant in the center of Espinhaço Range in Minas Gerais state (Fig. 2).

Species that form polyploid series (*H. briegei*, *H. caulescens*, *H. ghillanyi*, *H. liliputana* and *H. rupestris*) present superposed flowering phenology (Verola & Semir, *unpublished* – Chapters 3 and 4) and geographic distribution with other species, as follows: *H. briegei* x *H. angereri*, *H. bradei*, *H. cinnabarina*, *H. esalqueana* or *H. rupestris* (Fig. 3.1A-E); *H. caulescens* x *H. endsfeldzii* (Fig. 3.1 F); *H. ghillanyi* x *H. bradei*, *H. briegei* or *H. cinnabarina* (Fig. 3.2 A-C); *H. liliputana* x *H. crispata* (Fig. 3.2 D); and *H. rupestris* x *H. angereri*, *H. bradei*, *H. briegei*, *H. cinnabarina*, *H. esalqueana*, *H. ghillanyi* (Fig. 3.3 A-F).

Phylogenetics and Molecular dating insights

Combination between phylogenetic and molecular clock trees (Fig. 4) revealed a diploid chromosome number ($2n=2x=40$) is a plesiomorphic condition in *Hoffmannseggella* and its ancestral related genera, such *Dungisia* and *Hadrolaelia*. In contrast, species with ploidy level higher than diploid state ($2n=40$) occur only in more recent lineages (Fig. 4) distributed in the central region of Espinhaço Range (Fig. 2), where the most synchronopatric species occur (Fig. 3). Polyploid species ($3x$, $4x$) arose in late Pliocene-early Pleistocene boundaries (between 1.9-1.4 Myr), in isolated and independent events in the evolutive history of *Hoffmannseggella* (Fig. 2).

Discussion

Chromosome counts and ploidy level

In *Hoffmannseggella* chromosome numbers were previously known for only ten species (Blumenschein, 1960). Costa (2006) determined the chromosome numbers for seven more species. The chromosome data here obtained plus those previously recorded by Blumenschein (1960) and Costa (2006) totalize an amount of 24 species and three hybrids with known chromosome number in *Hoffmannseggella*. Our data has increased this number to 24 species (64% of the known species), and included three natural hybrids for the first time. Numbers for eight species studied here (19 % of total) are new counts, with $2n=40$. All obtained data corroborate the basic chromosome number, $x=20$, previously pointed out by Blumenschein (1960), except for $2n=44$ in *H. viridiflora* (Costa, 2006; Verola & Semir, 2007).

The chromosome number of $2n=40$ for two different populations, not sampled by Costa (2006) were obtained for *H. cinnabarina*, *H. crispata* and *H. fournieri*, which reinforces the karyological stability of these species. Sixteen species and two hybrids are exclusively diploids ($2n=2x=40$) and one species and one hybrid are triploids ($2n=3x=60$) (Table 2). Only *H. viridiflora* was dysploid, with $2n=44$ (Table 2). Five species were considered as polyploid series.

Three different cytotypes ($2x$, $3x$ and $4x$) occurred in *H. briegei*, *H. caulescens*, *H. ghillanyi* and *H. rupestris*, while two cytotypes ($2x$ and $3x$) occurred only in *H. liliputana* (Table 2). Blumenschein (1960) found polyploid series ($2x$, $3x$ and $4x$) in *H. briegei*, *H. ghillanyi* (misidentified as *Laelia longipes* Reich. f.) and *H. rupestris*. Diploid and triploid cytotypes were registered for *H. liliputana* by Costa (2006). The last author confirms the occurrence of three cytotypes ($2x$, $3x$ and $4x$) in *H. rupestris*, also recorded by Blumenschein (1960). We found diploid and tetraploid cytotypes in two additional populations (*pop1* and *pop2*) of *H. rupestris* not sampled by Costa (2006) (Table 2). Occurrence of polyploid series ($2x$, $3x$ and $4x$) were here registered in *H. caulescens* for the first time, while Blumenschein (1960) has found only tetraploid individuals for this species (addressed as *Laelia crispilabia* A. Rich.).

Geographic distribution of ploidy levels and flowering phenology

Polyploid series formation

Natural hybrids between *H. rupestris* and synchronopatric species have been described, such as: *H. xcristinae* F.E.L. Miranda & K.G. Lacerda (*H. rupestris* x *H. briegei*), *H. xzaslowskiana* Chiron & V.P. Castro (*H. rupestris* x *H. briegei*), *H. xraganii* F.E.L. Miranda & K.G. Lacerda (*H. rupestris* x *H. bradei*), *H. xcipoensis* (Pabst) V.P. Castro & Chiron (*H. rupestris* x *H. ghillanyi*), *H. xhybrid 1* and *H. xhybrid 2* (*H. rupestris* x *H. angereri*) in this work.

Some hypothesis could be addressed to explain the occurrence of cytotypes in *Hoffmannseggella* species. First those tetraploid cytotypes were previously established (autopolyploids), and contacted with diploid populations generating the triploid cytotype. Second, that tetraploid cytotypes of different species that present polyploid series stay in contact forming allotetraploids by hybridization. The last explanation is that some diploid synchronopatric species were crossed generating a diploid hybrid, stabilized by posterior polyploidy (allotetraploids), forming a hybrid system where segmental allopolyploids interbreed freely and recurrently with diploid parental lineages, generating triploids in the contact zones. Probably the species that form those polyploid complexes such as *H. rupestris* and others are hybrids, which is in accordance to meiosis abnormalities typical of hybrid species – principally chromosomes laggard, presence of multivalent and microcytes formation (Stace, 2000; Ramsey & Schemske, 1998), as observed in individuals of *H. bradei* (Costa, 2006), *H. briegei* (Blumenschein, 1960; Costa, 2006), *H. ghillanyi* (Blumenschein, 1960), *H. liliputana* (Costa, 2006) and *H. rupestris* (Blumenschein, 1960; Costa, 2006), independently of ploidy level.

Another process could have occurred in *H. caulescens*, where exclusively tetraploid populations are found in the Northern limit of distribution, complete polyploid series (2x, 3x and 4x) found in the central distribution area and the triploid and tetraploid cytotypes found in the southern distribution limit. Ramsey & Schemske (1998) call attention at the importance of unreduced gametes in the triploid cytotypes formation, and their importance in the establishment of tetraploid cytotype via triploid bridge. In this case, some explanations can be achieved to explain cytotype formation in *H. caulescens*. Triploid formation by the union of reduced (n) plus unreduced (2n) gametes and tetraploid formation by backcrossing between triploid and diploid

parents. Another possibility consists of homoploid hybridization between two diploid and synchronopatric species, followed by polyploidy. Only *H. endsfeldzii* is diploid, and has a distribution and flowering superposed with *H. caulescens* where a polyploid complex exists. In fact *H. xfeldmanniana* F.E.L.Miranda & K.G. Lacerda is described as a natural hybrid between *H. pabstii* F.E.L. Miranda & K.G. Lacerda (assumed here to be a synonym of *H. caulescens*) and *H. endsfeldzii*. In this case, the most likely is that *H. caulescens* cytotypes arise from autopoliploidy, in accordance with regular meiosis observed in diploid and tetraploid individuals (not presented here), where bivalents occur.

Another explanation would be that diploid cytotype in *H. caulescens* was eliminated from populations in the extremes of distribution, where only polyploid cytotypes remain today. In fact *H. caulescens* circumscribes a great diversity of morphological and floral features, distributed continuously across its natural geographic range. Maybe this complex called *H. caulescens* represents more than one species. Pure polyploid populations of *H. caulescens*, with $2n=80$ chromosomes are distributed only in the extremes of distribution, occurring exclusively in areas with particular soil or stone types, called in Brazil as “canga”, that represent a kind of ironstone outcrops in central areas of Espinhaço range in Minas Gerais. Besides the occurrence of this ecotype in a specific soil it also presents specific morphological features, like smaller leaf and floral stalk, recurved labelum and only three flowers per inflorescence. These characteristics contrasting with its Southern diploid relatives that occur in sandstone rocks are twice as big and with more than seven flowers per inflorescence. Before the nomenclatural review proposed by van den Berg & Chase (2000) and Chiron & Castro Neto (2002) that circumscribes this ecotype under *H. caulescens* it was called *Laelia crispilabia* A. Rich., and today the different attributes observed in this ecotype would make possible to reestablish this entity under the epithet *crispilabia*, leaving the name *H. caulescens* only to the Southern populations.

The last mechanism observed in this work, concerns homoploid hybrid lineages (*H. xhybrid 1* and *H. xhybrid 2*) formed by crossing between two different diploid species (*H. rupestris* x *H. angereri*). Diploid hybrids presented different viability in the seed set in self pollination treatments; *H. xhybrid 1* is totally sterile, while *H. xhybrid 2* showed 60% of seed viability. In backcrosses with their parents, sterile hybrid (*H. xhybrid 1*) rescued partially its fertility in 40% as pollen receptor and in 60% as pollen donor. On the other side, when the viable hybrid (*H. xhybrid 2*) was backcrossed with either parent it presented 80% of seed viability in crosses with *H. rupestris* and 40% with *H. angereri*. Blumenschein (1960) and Costa (2006)

called attention to variations observed in populations of *H. rupestris*, and concluded that continuous dissimilarities in floral and vegetative attributes are consequence of recurrent hybridization events. This continuous dissimilarity was observed in the mixed populations where examined homoploid hybrids were collected, including variations in both the diploid putative parentals *H. angereri* and *H. rupestris*. Variation in seed viability observed in the hybrids, when self pollinating or backcrossing with one of their parental species could explain at least partially, the complexity in breeding systems that can be seen in natural natural populations of *Hoffmannseggella*. Because of the unspecific pollinators and overlapping in flowering of the different species, natural hybrids may be formed. These hybrids, when established in a natural populations, can then continuously backcrossed with their parents. The resulting introgression can give rise to a whole range of morphological and fertility variation as the ones observed in the populations.

Polyploidy and its effects in breeding systems

According to Ramsey & Schemske (1998) two stages are critical for polyploid evolution, formation and establishment. The experimental hand-pollination treatments realised by Verola & Semir (*unpublished* – see Chapter 4) to access predominant breeding systems of *Hoffmannseggella* species, revealed that the majority of them are allogamous. The magnitude of inbreeding depression in self-pollination experiments in diploid cytotypes (3.6% of seed viability) is higher severe than in mixed or tetraploid (42.9% of seed viability) populations (polyploid species). These reproductive characteristics of *Hoffmannseggella* increase the potential formation of polyploid lineages in natural conditions.

Many polyploid plant species appear to rely on autogamous fertilization, while their proposed diploid parents are often allogamous, suggesting a causal link between polyploidy and autogamy (Stebbins, 1950; Thompson & Lumaret, 1992). In *Hoffmannseggella* polyploid species and small isolated populations show low rates of autogamy achieved by self-pollination mechanisms (Verola & Semir, *unpublished* – see Chapters 3 and 4). These characteristics lead us to suggest that autogamy occurrence in polyploid *Hoffmannseggella* species is an adaptative condition to promote establishment and fixation of polyploid colonizing population lineages.

Polyploids can show novel phenotypes, ecological diversification, and new niche invasion, and polyploidy is a prominent mechanism of speciation (Otto & Whitton, 2000).

Polyploids have a state of fixed heterozygosity that provides a vast reservoir of new alleles for selection, mutation, and gene evolution (Adams, 2007). The consequences of polyploidy on gene and genome evolution and gene expression have been investigated extensively in plants in recent years (Adams, 2007).

The effects of chromosome doubling on the magnitude of inbreeding depression will have important implications for the evolution of polyploidy (Stebbins, 1971; Grant, 1981). Current models of the evolutionary dynamics of polyploids indicate that the circumstances favoring a polyploid in a diploid population, or favoring mixed cytotypes, are quite restrictive but will depend, in part, on the relative differences in fertility and viability between cytotypes (Felber, 1991; Rodriguez, 1996; Rausch & Morgan, 2005). Thus, differences in inbreeding depression among cytotypes may influence the opportunities to the evolution of polyploidy in *Hoffmannseggella*. Furthermore, differences in inbreeding depression may alter the outcome of selection on self-fertilizing genotypes and thereby affect the direction and rate of mating system evolution in related cytotypes.

Currently, interest in inbreeding depression is widespread because of its role in the evolution of reproductive systems in natural populations and its potential importance in conservation biology (Husband & Schemske, 1996, 1997). There are two prevailing genetic models of inbreeding depression: partial dominance and overdominance (Charlesworth & Charlesworth, 1987). Under the partial dominance model, individuals possess a number of deleterious mutations that are recessive or partially recessive; inbreeding depression is caused by the increased frequency of recessive homozygotes due to inbreeding. In this way, diploid species tend to express deleterious mutations when self-crossed or crossed with genetically relatives, as observed in *Hoffmannseggella* species. On the other hand, polyploids have doubled chromosomes and multiple copies of the same gene. In consequence, copies carrying deleterious mutations (significant only in homozygosity) are rarely expressed, and inbreeding effects buffered.

The observed differences in expression of inbreeding depression between diploid and tetraploid *Hoffmannseggella* species may have important implications for the evolution of polyploidy in natural populations. Theoretical studies (Felber, 1991; Rodriguez, 1996; Rausch & Morgan, 2005) indicate that the establishment of a polyploid in a diploid population is unlikely, but its probability would be enhanced if the fitness of polyploids greatly exceeds that of diploids. Characteristics of tetraploids observed in *Hoffmannseggella* species that may confer a fitness advantage over diploids include lower inbreeding depression, self-pollination mechanisms and

consequent higher fruit/seed set. In artificial self-pollination experiments, a tendency was observed; species with polyploid series (*i.e.* *H. rupestris*, *H. ghillanyi*, *H. liliputana*, *H. caulescens* and *H. briegei*) or populations with triploid/tetraploid individuals (mixed populations) have higher levels of seed viability (42.9%) than diploid ones (3.6%) (*i.e.* *H. angereri*, *H. crispata*, *H. endsfeldzii*, *H. fournieri*, *H. gracilis*, *H. longipes*) (see Chapter 4). In these terms, polyploidy and hybridation would be considered important adaptive mechanisms promoting diversity in recent lineages of *Hoffmannseggella*.

Phylogenetics and Molecular dating insights

Combined tree obtained from phylogeny and molecular clock methodologies (Verola *et al.*, *unpublished* – see Chapter 2), indicate that ancestral lineages in Laeliinae are diploid $2n=40$, confirming the basic number $n=20$ to this subtribe proposed previously by Blumeschein (1960). Diploid chromosome ($2n=40$) number is a plesiomorphic character in this group, but can be maintained in recent lineages too. In opposition, polyploidy ($2n=60$ or 80) is a recent innovation and arose independently at least eight times in the evolutive history of *Hoffmannseggella*. In these way, polyploid species are not clustered and do not represent a specific species group. In spite of the absence of some species in the molecular dating tree, such as *H. concepcionensis*, *H. endsfeldzii*, *H. fournieri*, *H. gracilis*, *H. kautskyana*, *H. verboonenii* and *H. viridiflora* the appreciation of the results on evolution of polyploidy in *Hoffmannseggella* is not compromised because these species are diploid.

Rather than isolated species, Stebbins (1971) considered the polyploid complexes as evolutionary units, and proposed its classification in accordance with maturity status, where initial or young phase are called neopolyploids (polyploids of more recent origin), and declining and relictual paleopolyploids (ancient polyploids without close diploid relatives). In these terms, polyploid species in *Hoffmannseggella* would be considered neopolyploids given their recent origin and establishment.

One species, *H. gloedeniana*, represents the older polyploid lineage. This species is the most distinct among congeners and shows some intermediary attributes, similar to *Hadrolaelia* in vegetative structure and closer to *Hoffmannseggella* in floral morphology. Pabst & Dungs (1975) have described interespecific hybrids between *Hadrolaelia* and *Hoffmannseggella*. Maybe *H. gloedeniana* represent an ancestral hybrid lineage between different genera, reinforced by

paraphyly among *Hadrolaelia* and *Hoffmannseggella*, but this suggestion needs to be investigated.

Another and more probable possibility is that *H. gloedeniana* was formed by union of a non reduced ($2n$) and a reduced gamete (n) of diploid ancestral species. Unreduced gametes are believed to be the most important mechanism of polyploid formation, being observed in hybrid and non-hybrid species (Ramsey & Schemsk, 1998). Triploids are frequently characterized as sterile and unviable (Ramsey & Schemske, 1998). The triploid nature of *H. gloedeniana*, allied to its perennial habit and its pronounced microendemism, reinforces the idea that triploids can be maintained reproductively isolated in natural conditions for a long time through vegetative reproduction.

Phytogeographic scenario in the Hoffmannseggella evolution

The evolutionary history of south-eastern (Espinhaço Range - MG and High Rock crops - ES, RJ) and north-eastern (Chapada Diamantina - BA) Brazilian mountains points clearly to allopatry (and consequent vicariance) as a primary mechanism for species differentiation, driven by the fragmented nature of high altitude vegetations (Beling, 2002; Safford, 2007; Pirani *et al.*, 1994; Alves & Kolbec, 1994). High altitude vegetational formations of south-eastern Brazil has been deeply influenced by repeated cooling episodes beginning in the late Tertiary, turning more frequent in Quaternary (mainly in Pleistocene) causing several expansion-retraction of open habitat vegetation (Beling, 2002; Safford, 2007; Pirani *et al.*, 1994; Alves and Kolbec, 1994).

Hoffmannseggella species experienced these events and in wet and hottest periods the population confinement (vicariance) and posterior contact (hybridization) has generated the great endemism (47% of species are micro-endemic) (see Chapter 1). In favourable periods (dry/cool) the open habitats expanded and the differentiated diploid populations came into contact again and hybridized, giving origin to polyploid, self-compatible species. This process, called ‘secondary contact model’ was proposed by Stebbins (1984, 1985) and may be extended to explain the frequent association among polyploidy, self-compatibility and current patterns of distribution in *Hoffmannseggella* species. Extensive polyploidization attributed to cyclic population fragmentation and expansion during the Pleistocene has been documented in several genera, including *Cerastium*, *Draba*, *Parnassia*, *Saxifraga*, *Vaccinium*, *Senecio* (Abbott & Brochmann,

2003; Brochmann *et al.*, 2004; Guggisberg *et al.*, 2006; Suda *et al.*, 2007) and the orchid genus *Dactylorhiza* (Pedersen, 2006; Hédren *et al.*, 2007).

Unreliability of pollinators and/or shifts in pollinator faunas associated with Pleistocene climate cycles might have provided the selective forces that favoured the establishment of the newly formed self-compatible polyploid *Hoffmannseggella* species.

Polyploids are known by their higher ability to recolonize new open areas, when compared with their diploid and allogamous parents (Stebbins, 1957). The present distribution of *Hoffmannseggella* is complex, and is composed by four principal geographic subsets of species clustering (Verola *et al. unpublished* – Chapter 1) that don't reflect phylogenetic relationship, corroborating the hypothesis of multiple events of colonization and speciation by vicariance linked with Plio-Pleistocene climatic fluctuations. The most convincing explanation for high frequency of poliploids and hybrids in *Hoffmannseggella* in the centre of the geographic distribution of the genus is that this area represents the meeting point of previously isolated species followed by hybridizing and polyploidy events.

Literature Cited

- Abbott, R.J. & Brochmann, C. 2003. History and evolution of the arctic flora: in the footsteps of Eric Hultén. *Molecular Ecology* **12**: 299–313.
- Adams, K.L. 2007. Evolution of Duplicate Gene Expression in Polyploid and Hybrid Plants. *Journal of Heredity* **98**: 136–141.
- Alves, R.J.V. & Kolbek, J. 1994. Plant species endemism in savanna vegetation on table mountains (Campo Rupestre) in Brazil. *Vegetatio* **113**: 125–139.
- Behling, H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **177**: 19–27.
- Blumenschein, A. 1960a. **Estudos sobre a Evolução no subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae)**. Tese apresentada para obtenção do título de Livre Docente da Cadeira de Citologia e Genética Geral da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 54pp.
- Blumenschein, A. 1960b. Número de cromossomas de algumas espécies de orquídeas. *Publicações Científicas do Instituto de Genética / Esalq / USP* **1**: 45–50.
- Brochmann, C., Brysting, A.K., Alsos, I.G., Borgen, L., Grundt, H.H., Scheen, A.C. & Elven, R. 2004. Polyploidy in arctic plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **82**: 521–536.
- Catling, P.M. 1982. Breeding systems of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* **60**: 3017–3039.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 237–268.
- Chiron, G.R. & Castro Neto, V.P. 2002. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley. *Richardiana* **2**: 4–28.
- Costa, J.Y. 2006. **Citotaxonomia e aspectos evolutivos de espécies de *Hoffmannseggella* H. G. Jones (Orchidaceae), de Campos Rupestres brasileiros**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, SP, 121pp.
- Devos, N., Raspé, O., Oh, S.H., Tyteca, D. & Jacquemart, A.L. 2006. The evolution of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) allotetraploid complex: Insights from nrDNA sequences and cpDNA PCR-RFLP data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**: 767–778.
- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Felber, E. 1991. Establishment of a tetraploid cytotype in a diploid population: effect of relative fitness of the cytotypes. *Journal of Evolutionary Biology* **4**: 195–207.
- Felix, L.P. & Guerra, M. 2005. Basic chromosome numbers of terrestrial orchids. *Plant Systematics and Evolution* **254**: 131–148.
- Gill, D.E. 1989. **Speciation and its consequences**. Fruiting failure, pollinator inefficiency, and speciation in orchids. Eds. D. Otte and J. A. Endler. Sinauer, Sunderland, MA.
- Goldman, D.H., Jansen, R.K., Van Den Berg, C., Leitch, I.J., Fay, M.F. & Chase, M.W. 2004. *Calopogon* (Orchidaceae, Epidendroideae): circumscription, phylogeny, polyploidy, and possible hybrid speciation. *American Journal of Botany* **91**: 707–723.
- Grant, V. 1981. **Plant Speciation**. New York: Columbia Univ. Press. 2nd ed.
- Guerra, M. 1983. O uso do Giemsa em citogenética vegetal - comparação entre coloração simples e bandamento. *Ciência e Cultura* **35**: 190–193.

- Guggisberg, A., Mansion, G., Kelso, S. & Conti, E. 2006. Evolution of biogeographic patterns, ploidy levels, and breeding systems in a diploid–polyploid species complex of *Primula*. *New Phytologist* **17** doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01722.x
- Hedré, M., Norström, S., Hovmalm, H.A.P., Pedersen, H.A. & Hansson, S. 2007. Patterns of polyploid evolution in Greek marsh orchids (*Dactylorhiza*; Orchidaceae) as revealed by Allozymes, AFLPS, and Plastid DNA data. *American Journal of Botany* **94**: 1205–1218.
- Husband, B.C. & Schemske, D.W. 1996. Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* **50**:54-70
- Husband, B.C. & Schemske, D.W. 1997. The effect of inbreeding in diploid and tetraploid populations of *Epilobium angustifolium* (Onagraceae): implications for the genetic basis of inbreeding depression. *Evolution* **51**:737-746
- Lewis, W.H. 1980. **Polyploidy: Biological Relevance**. New York: Plenum
- Ornduff, R. 1969. Reproductive biology in relation to systematics. *Taxon* **18**: 121-133.
- Ornduff, R. 1978. Reproductive characters and taxonomy. *Systematic Botany* **3**: 420-427.
- Otto, S.P. & Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* **34**: 401–437.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1975. **Orchidaceae Brasiliensis – Band I**. Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Pedersen, H.E. 2006. Systematics and evolution of the *Dactylorhiza romana/sambucina* polyploid complex (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **152**: 405–434.
- Pirani, J.R., Giulietti, A.M., Mello-Silva, R. & Meguro, M. 1994. Checklist and patterns of geographical distribution of the vegetation of Serra do Ambrósio, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* **17**: 133-147.
- Ramsey, J. & Schemske, D.W. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 467–501.
- Rausch, J.H. & Morgan, M.T. 2005. The effect of self-fertilization, inbreeding depression, and population size on autopolyploid establishment. *Evolution* **59**: 1867–1875
- Rodriguez, D.J. 1996. A model for the establishment of polyploidy in plants. *American Naturalist* **147**: 33-46.
- Safford, H.D. 2007. Brazilian Páramos IV. Phytogeography of the campos de altitude. *Journal of Biogeography* **17**: 1-22.
- Sheviak, C.J. & Bracht, M. 1998. New chromosome numbers determinations in *Platanthera*. *Native North American Orchid Journal* **4**: 168–172.
- Soltis, D.E. & Soltis, P.S. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews In Plant Sciences* **12**: 243–273.
- Soltis, D.E. & Soltis, P.S. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 7051–7057.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S., Schemske, D.W., Hancock, J.F., Thompson, J.N., Husband, B.C. & Judd, J.F. 2007. Autopolyploidy in Angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* **56**: 13-30.
- Stebbins, G.L. 1957. Self-fertilization and population variability in the higher plants. *American Naturalist* **91**: 337-354.
- Stebbins, G.L. 1947. Types of polyploids: their classification and significance. *Advances in Genetics* **1**: 403–29

- Stebbins, G.L. 1950. **Variation and evolution in plants**. New York, NY, USA. Columbia University Press.
- Stebbins, G.L. 1971. **Chromosomal evolution in higher plants**. Edward Arnold, London, UK.
- Stebbins, G.L. 1984. Polyploidy and the distribution of the arctic-alpine flora: new evidence and a new approach. *Botanica Helvetica* **94**: 1–13.
- Stebbins, G.L. 1985. Polyploidy, hybridization, and the invasion of new habitats. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **72**: 824–832.
- Suda, J., Weiss-Schneeweiss, H., Tribsch, A., Schneeweiss, G.M., Trávníček, P. & Peter Schönswetter, P. 2007. Complex distribution patterns of di-, tetra-, and hexaploid cytotypes in the European high mountain plant *Senecio carniolicus* (Asteraceae). *American Journal of Botany* **94**: 1391–1401.
- Tanaka, R.H. & Kamemoto, H. 1974. **The orchids: scientific studies**. List of chromosome numbers in species of the Orchidaceae. Ed. C.L. Withner. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA. 411–483 pp.
- Tanaka, R.H. & Kamemoto, H. 1984. **Orchid biology reviews and perspectives. III**. Chromosomes in orchids: counting and numbers. Ed. J. Arditti. Cornell University Press, Ithaca, N.Y. 323–410 pp.
- Thompson, J.D. & Lumaret, R. 1992. The evolutionary dynamics of polyploidy plants: origins, establishment and persistence. *Trends in Ecology and Evolution* **7**: 302–307.
- Van Den Berge, C. & Chase, M.W. 2000. Nomenclatural notes on Laeliinae – I. *Lindleyana* **15**: 115–119.
- Wallace, L.E. 2003. Molecular evidence for allopolyploid speciation and recurrent origins in *Platanthera huronensis* (Orchidaceae). *International Journal of Plant Sciences* **164**: 907–916.
- Verola, C.F. & Semir, J. 2007. *Hoffmannseggella viridiflora* (Orchidaceae, Laeliinae) a New species from Brazilian Campos Rupestres. *Novon* **17**: 125–129.
- Verola, C.F., Semir, J., Antonelli, A. & Koch, I. 2007. Biosystematic studies in the brazilian endemic genus *Hoffmannseggella* H. G. Jones (Orchidaceae: Laeliinae): a multiple approach applied to conservation. *Lankesteriana* **7**: 419–422.

Table 1. Species and populations analyzed and details of voucher specimens. States: BA: Bahia, ES: Espírito Santo, MG: Minas Gerais, RJ: Rio de Janeiro; 2n: somatic chromosome number.

Species / Population	2n	Voucher details: State, Municipality, collector
<i>H. bahiensis</i> (Schltr.) H. G. Jones	40	BA, Rio de Contas, <i>C.F.Verola</i> & <i>I.R.Costa</i> 32/07 (UEC)
<i>H. caulescens</i> (Lindl.) H.G.Jones (<i>pop1</i>)	60, 80	MG, Carrancas, <i>C.F.Verola</i> 0038 (UEC)
(<i>pop2</i>)	40, 60, 80	MG, Itutinga, <i>C.F.Verola</i> & <i>C. Urbanetz</i> 0039 (UEC)
(<i>pop3</i>)	80	MG, São João del Rey, <i>C.F.Verola</i> & <i>C. Urbanetz</i> 0042 (UEC)
(<i>pop4</i>)	80	MG, Santa Cruz de Minas, <i>C.F.Verola</i> & <i>C. Urbanetz</i> 0044 (UEC)
(<i>pop5</i>)	80	MG, Brumandinho, <i>C.F.Verola</i> & <i>A.F.Verola</i> 0063B (UEC)
<i>H. cinnabarina</i> (Batem. ex. Lindl.) H. G. Jones (<i>pop1</i>)	40	RJ, Lumiar, <i>C.F.Verola et al. s/n°</i> (UEC)
(<i>pop2</i>)	40	ES, Santa Teresa, <i>C.F.Verola et al. s/n°</i> (UEC)
<i>H. concepcionensis</i> V. P. Castro & Campacci	40	MG, Conceição do Mato Dentro, donated material from species typus
<i>H. crispata</i> (Thunb.) H. G. Jones (<i>pop1</i>)	40	MG, Conceição do Ibitipoca, <i>C.F.Verola</i> 0045 (UEC)
(<i>pop2</i>)	40	MG, Brumadinho, <i>C.F.Verola</i> & <i>A.F.Verola s/n°</i> (UEC)
<i>H. endsfeldzii</i> (Pabst) V. P. Castro & Chiron	40	MG, Itutinga, <i>C.F.Verola et al.</i> 0123
<i>H. fournieri</i> (Cogn.) V. P. Castro & Chiron (<i>pop1</i>)	40	MG, Lavras Novas, <i>C.F.Verola et al.</i> 0004 (UEC)
(<i>pop2</i>)	40	MG, Catas Altas, <i>C.F.Verola</i> 0070 (UEC)
<i>H. gloedeniana</i> (Hoehne) V. P. Castro & Chiron	60	ES, Voucher n° 27100 (Orquidário do Estado)
<i>H. gracilis</i> (Pabst) V. P. Castro & Chiron	40	MG, Conceição do Mato Dentro, <i>C.F.Verola</i> & <i>I.R.Costa s/n°</i> (UEC)
<i>H. kautzkyana</i> V. P. Castro & Chiron	40	Donated by V. P. Castro.
<i>H. rupestris</i> (Lindl.) V. P. Castro & Chiron (<i>pop1</i>)	80	MG, Joaquim Felício, <i>C.F.Verola et al.</i> 0129 (UEC)
(<i>pop2</i>)	40	MG, Itacambira, <i>C.F.Verola et al.</i> 0002 (UEC)
<i>H. verboonenii</i> (F.E.L. Miranda) V. P. Castro & Chiron	40	MG, Diamantina, <i>F. E. Miranda</i> 1386 (HB)
<i>H. xbritoi</i> K. G. Lacerda & V. P. Castro	60	MG, Itacambira, <i>K. G. Lacerda</i> 122 (BHCB)
<i>H. xhybrid 1</i> (<i>H. rupestris</i> x <i>H. angereri</i>)	40	MG, Diamantina, <i>C.F.Verola s/n°</i>
<i>H.x hybrid 2</i> (<i>H. rupestris</i> x <i>H. angereri</i>)	40	MG, Diamantina, <i>C.F.Verola s/n°</i>

Table 2. Somatic chromosome numbers ($2n$) and ploidy level (x) in *Hoffmannseggella* species. *= first counts for the species.

Species	Chromosome number ($2n$) and ploidy level (x)	References
<i>H. angereri</i> (Pabst) V. P. Castro & Chiron	40 ($2x$)	Costa 2006
<i>H. bahiensis</i> (Schltr.) H. G. Jones*	40 ($2x$)	This work
<i>H. bradei</i> (Pabst) V. P. Castro & Chiron	40 ($2x$)	Costa 2006
<i>H. briegei</i> (Blumesch. ex. Pabst) V. P. Castro & Chiron	40 ($2x$), 60 ($3x$), 80 ($4x$)	Blumenschein 1960; Costa 2006
<i>H. caulescens</i> (Lindl.) H.G.Jones	40 ($2x$), 60 ($3x$), 80 ($4x$)	Blumenschein 1960 (as <i>Laelia crispilabia</i> A. Rich. $2n=80$); This work
<i>H. cinnabarina</i> (Batem. ex. Lindl.) H. G. Jones	40 ($2x$)	Blumenschein 1960; This work
<i>H. concepcionensis</i> V. P. Castro & Campacci*	40 ($2x$)	This work
<i>H. crispata</i> (Thunb.) H. G. Jones	40 ($2x$)	Blumenschein 1960; Costa 2006; This work
<i>H. endsfeldzii</i> (Pabst) V. P. Castro & Chiron*	40 ($2x$)	This work
<i>H. esalqueana</i> (Blumensch. ex Pabst) V. P. Castro & Chiron	40 ($2x$)	Blumenschein 1960
<i>H. fourrieri</i> (Cogn.) V. P. Castro & Chiron	40 ($2x$)	Blumenschein 1960; This work
<i>H. ghillanyi</i> (Pabst) H. G. Jones	40 ($2x$), 60 ($3x$), 80 ($4x$)	Blumenschein 1960 (as <i>Laelia longipes</i> Reich. f.)
<i>H. gloedeniana</i> (Hoehne) V. P. Castro & Chiron*	60 ($3x$)	This work
<i>H. gracilis</i> (Pabst) V. P. Castro & Chiron*	40 ($2x$)	This work
<i>H. kautskyiana</i> V. P. Castro & Chiron*	40 ($2x$)	This work
<i>H. liliputana</i> (Pabst) H. G. Jones	40 ($2x$), 60 ($3x$)	Costa 2006
<i>H. longipes</i> (Rchb. f.) V. P. Castro & Chiron	40 ($2x$)	Blumenschein 1960 (as <i>Laelia ostermayerii</i> Hoehne)
<i>H. milleri</i> (Blumesch. ex. Pabst) V. P. Castro & Chiron	40 ($2x$)	Blumenschein 1960
<i>H. mixta</i> (Hoehne) V. P. Castro & Chiron	40 ($2x$)	Blumenschein 1960
<i>H. rupestris</i> (Lindl.) V. P. Castro & Chiron	40 ($2x$), 60 ($3x$), 80 ($4x$)	Blumenschein 1960; Costa 2006; This work
<i>H. sanguiloba</i> (Withner) V. P. Castro & Chiron	40 ($2x$)	Costa 2006 (as <i>H. cinnabarina</i>)
<i>H. tereticaulis</i> (Hoehne) H. G. Jones	80 ($4x$)	Blumenschein 1960
<i>H. verboonenii</i> (F.E.L. Miranda) V. P. Castro & Chiron*	40 ($2x$)	This work
<i>H. viridiflora</i> Verola & Semir	44 ($2x + 4$)	Costa 2006
<i>H. xbritoi</i> K. G. Lacerda & V. P. Castro*	60 ($3x$)	This work
<i>H. xhybrid 1</i> *	40 ($2x$)	This work
<i>H. xhybrid 2</i> *	40 ($2x$)	This work

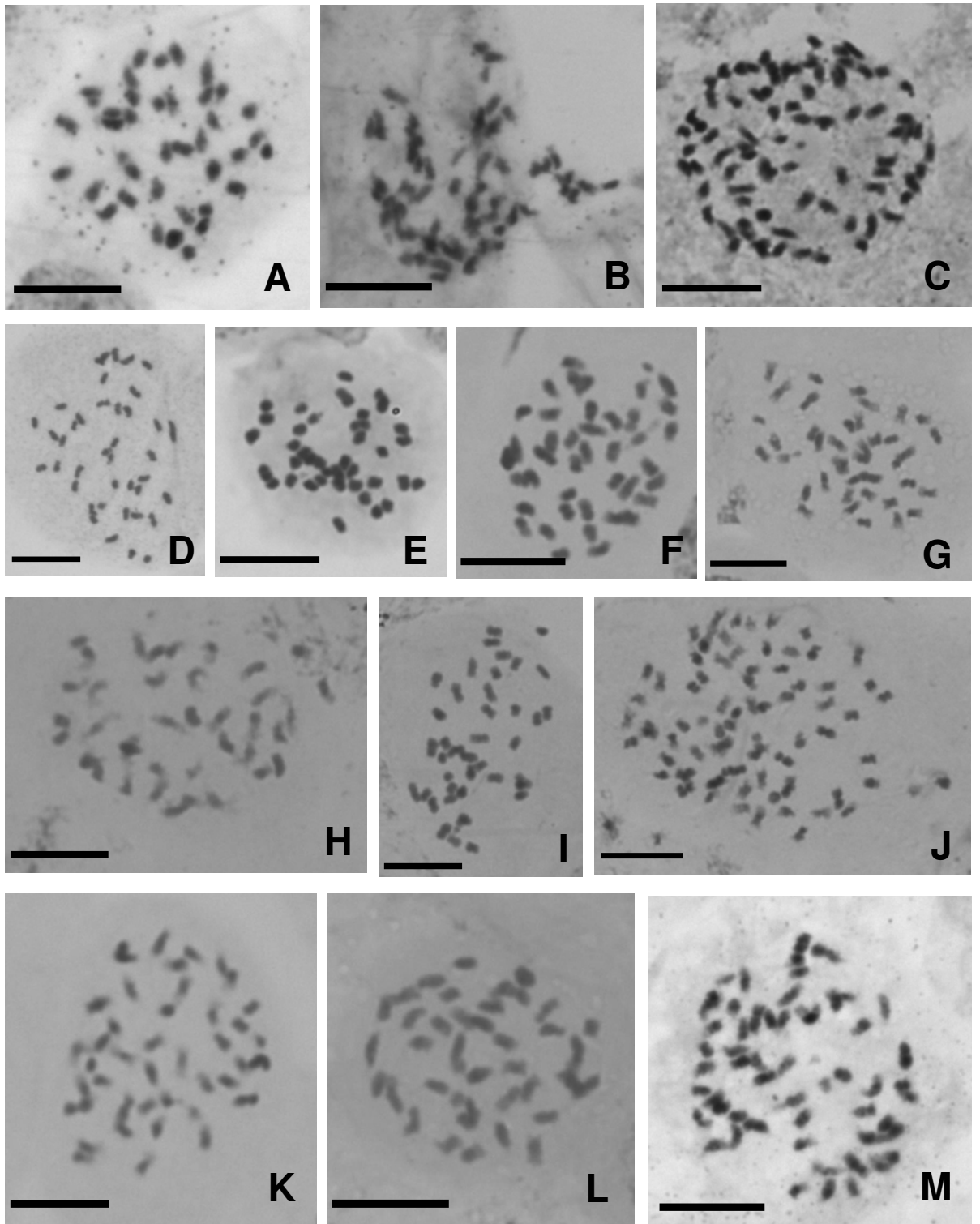


Figure 1. Mitotic metaphases in *Hoffmannseggella* species. (A) *H. bahiensis*, $2n=40$; (B) *H. caulescens* (pop2), $2n=60$; (C) *H. caulescens* (pop4), $2n=80$; (D) *H. cinnabarina* (pop1), $2n=40$; (E) *H. cinnabarina* (pop2), $2n=40$; (F) *H. crispata* (pop2), $2n=40$; (G) *H. endsfeldzii*, $2n=40$; (H) *H. fournieri* (pop1), $2n=40$; (I) *H. fournieri* (pop2), $2n=40$; (J) *H. rupestris* (pop1), $2n=80$; (K) *H. xhybrid 1*, $2n=40$; (L) *H. xhybrid 2*, $2n=40$ and (M) *H. xbritoi*, $2n=40$. Barra: $10\mu\text{m}$

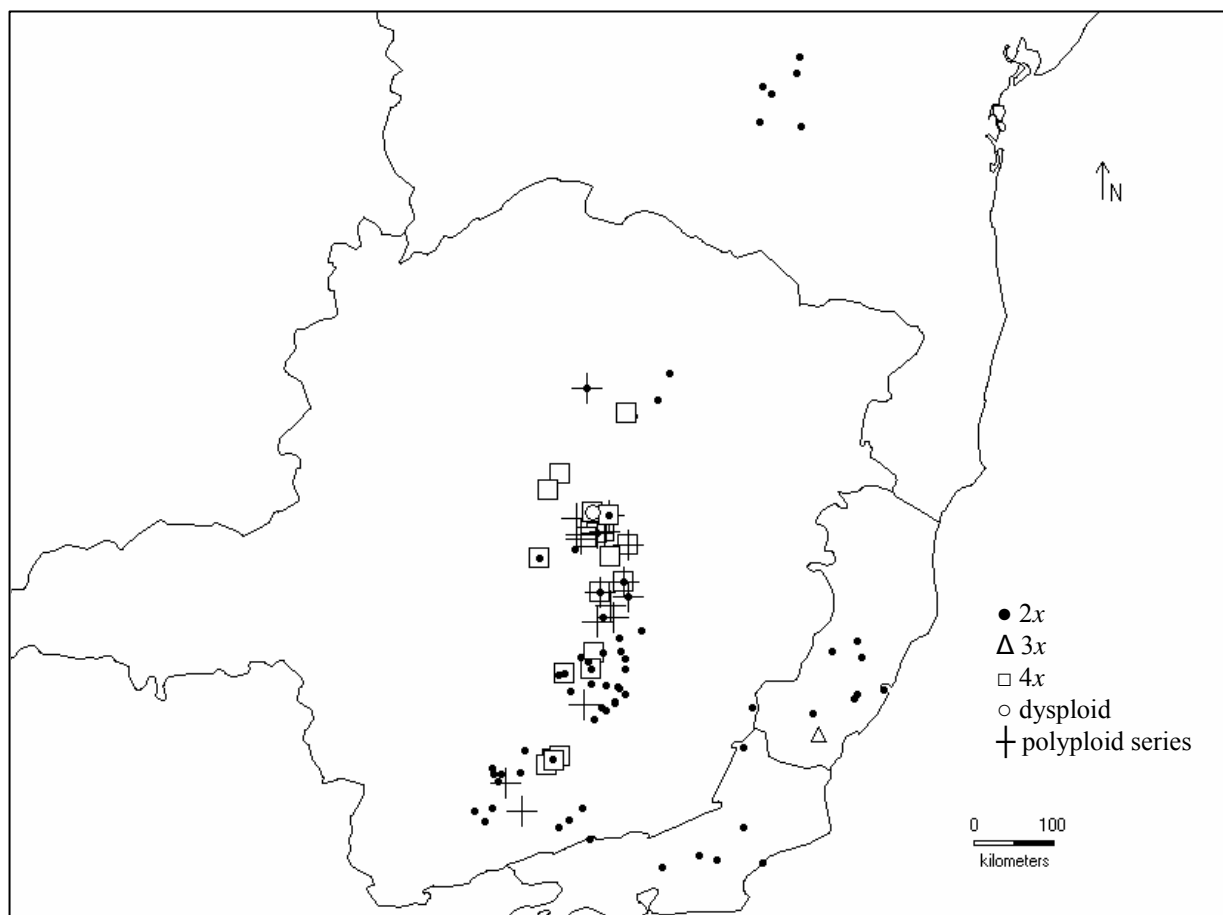


Figure 2. Geographic distribution of ploidy levels in species of *Hoffmannseggella*. (●) for exclusive diploid ($2n=2x=40$), (Δ) exclusive triploid ($2n=3x=60$), (□) exclusive tetraploid ($2n=4x=80$) and (○) exclusive dysploid ($2n=44$) species. The symbol (+) mark the occurrence of species with polyploid series (for details see Tables 1 and 2).

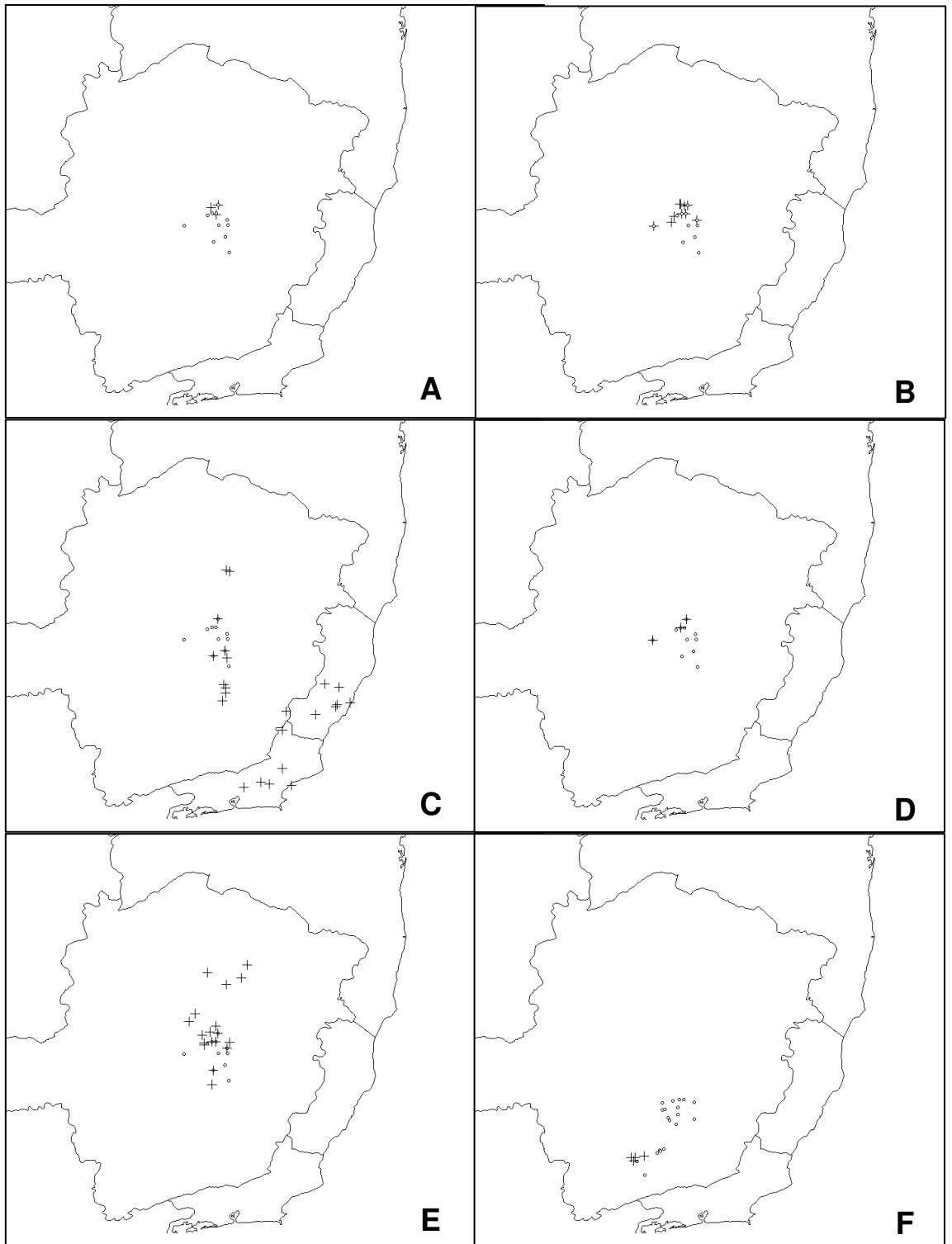


Figure 3.1. Distribution of sympatric species. (A) *Hoffmannseggella briegei* (○) x *H. angereri* (+); (B) *H. briegei* (○) x *H. bradei* (+); (C) *H. briegei* (○) x *H. cinnabarina* (+); (D) *H. briegei* (○) x *H. esalqueana* (+); (E) *H. briegei* (○) x *H. rupestris* (+) and (F) *H. caulescens* (○) x *H. endsfeldzii* (+).

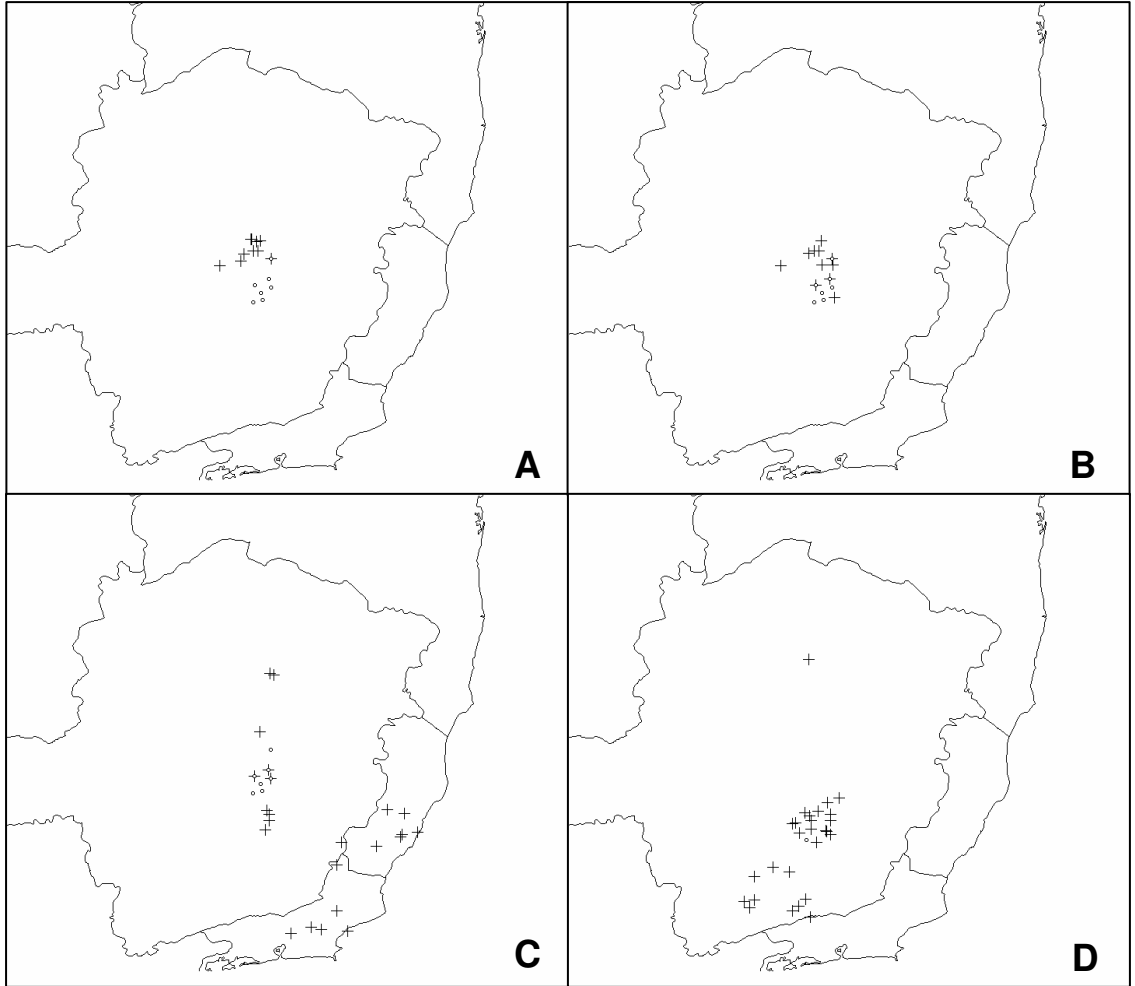


Figure 3.2. Distribution of sympatric species. (A) *Hoffmannseggella ghillanyi* (○) x *H. bradei* (+); (B) *H. ghillanyi* (○) x *H. brieri* (+); (C) *H. ghillanyi* (○) x *H. cinnabarina* (+) and (D) *H. liliputana* (○) x *H. crispata* (+).

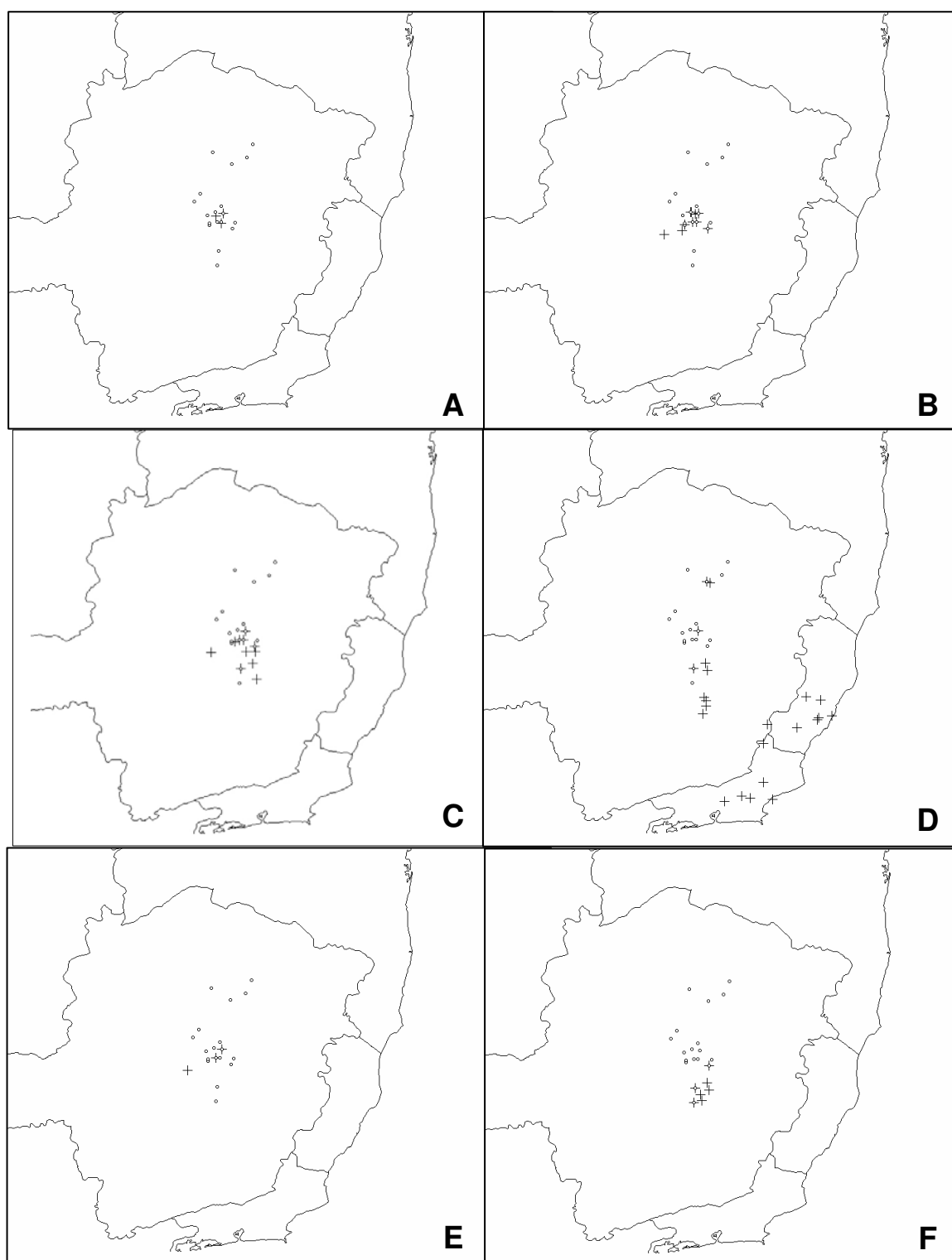


Figure 3.3. Distribution of sympatric species. (A) *Hoffmannseggella rupestris* (○) x *H. angereri* (+); (B) *H. rupestris* (○) x *H. bradei* (+); (C) *H. rupestris* (○) x *H. brieri* (+); (D) *H. rupestris* (○) x *H. cinnabarina* (+); (E) *H. rupestris* (○) x *H. esalqueana* (+) and (F) *H. rupestris* (○) x *H. ghillanyi* (+).

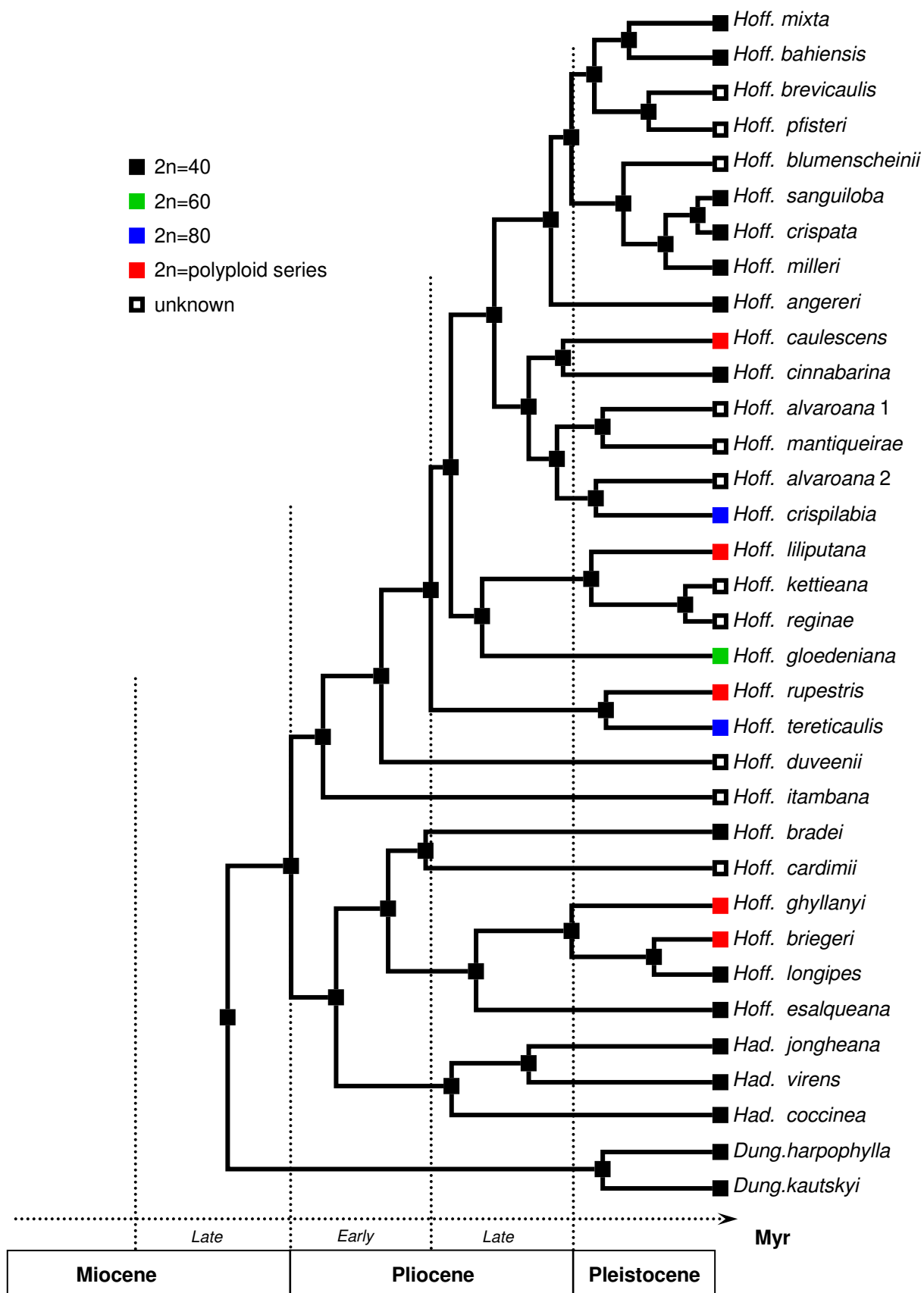


Figure 4. Evolutionary trends of polyploidy and chromosome number in *Hoffmannseggella* species. Chronogram proportionally scaled with base in age estimated by Bayesian Analysis of ribosomal ITS1 and ITS2 region and Molecular Dating based in NPRS method (Verola *et al.*, unpublished).

Hoffmannseggella viridiflora (Orchidaceae, Laeliinae), a New Species
from Brazilian Campos Rupestres

Christiano Franco Verola

Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de
Biologia, Departamento de Botânica, Laboratório de Biosistemática e Evolução, Cidade
Universitária "Zeferino Vaz," s/n° 13083-970, CP 6109, São Paulo, Brazil.
cfverola@yahoo.com.br

João Semir

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Cidade
Universitária "Zeferino Vaz," s/n° 13083-970, CP 6109, São Paulo, Brazil

ABSTRACT. The species of the Brazilian genus *Hoffmannseggella* H. G. Jones (Orchidaceae, Laeliinae) are under investigation as part of a biosystematic study. A new species, *H. viridiflora* Verola & Semir, is recognized by differences in morphological characters, such as the spatulate petals and reduced lip, the greenish yellow coloration of the perianth, and the chromosome number, $2n = 44$. Its relationship with closely related taxa, such as *H. bradei* (Pabst) V. P. Castro & Chiron, is discussed.

RESUMO. As espécies de *Hoffmannseggella* H. G. Jones (Orchidaceae, Laeliinae), um gênero exclusivamente brasileiro, estão sendo investigadas como parte de um estudo biosistemático. A nova espécie, *H. viridiflora* Verola & Semir, pode ser reconhecida por caracteres diagnósticos como pétalas espatuladas, labelo reduzido, coloração amarelo esverdeado do perianto e o número cromossômico de $2n = 44$. Sua relação com espécies próximas como *H. bradei* (Pabst) V. P. Castro & Chiron é discutida.

Key words: Brazil, cytotaxonomy, *Hoffmannseggella*, Laeliinae, morphology, Orchidaceae, taxonomy.

The Neotropical orchid genus *Hoffmannseggella* H. G. Jones is a member of the subfamily Epidendroideae Kosteletzky, subtribe Laeliinae Benth. It is one of the most ornamental genera within this subtribe and is distributed only in the Brazilian campos rupestres of Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, and Bahia states. Southeastern Brazil, especially Minas Gerais, represents the main center of diversity for plants characteristic of campos rupestres (Harley, 1995; Semir, 1991), including *Hoffmannseggella* (Blumenschein, 1960a, b). Chiron and Castro (2002) recognized 32 species in the genus, but the number has now increased to 42 (Castro & Chiron, 2003;

Miranda & Lacerda, 2003; Mota et al., 2003; Campacci, 2005; Chiron & Castro, 2005; Lacerda & Castro, 2005; Miranda, 2005), including *H. viridiflora* Verola & Semir. *Hoffmannseggella* is a taxonomically difficult genus because of the morphological plasticity of species and occurrence of hybridization (Blumenschein, 1960a, b; Van den Berg et al., 2000), and previous generic and specific treatments are in conflict (Schlechter, 1917; Jones, 1968; Pabst & Dungs, 1975; Withner, 1990; Van den Berg & Chase, 2000; Van den Berg et al., 2000; Chiron & Castro, 2002; Van den Berg, 2003).

The range of morphological variation within *Hoffmannseggella*, including hybrids and closely similar species, can lead to difficulties in specific classification and identification. Variation occurs in both vegetative and floral morphology, such as the shape and size of the pseudobulb and the size of leaf, stalk, and pedicel. Floral colors are variable among and within species, including pink, red, orange, yellow, white, and combinations. Perianth characters, such as the shape and ornamentation of the lips and lobes, are associated with other characters (e.g., color and stalk size) and are therefore more diagnostic (Schlechter, 1917; Pabst & Dungs, 1975; Withner, 1990). Other evidence, including cytogenetics, has been useful both in the delimitation of species and in evolution studies in *Hoffmannseggella* (Blumenschein, 1960a, b).

The new species *Hoffmannseggella viridiflora* is here described and illustrated. It can be distinguished from all other species by its greenish yellow flowers, which are the smallest in the genus, together with its apical undulate petals and erect perianth parts.

MATERIAL AND METHODS

Individuals of *Hoffmannseggella viridiflora* and *H. bradei* (Pabst) V. P. Castro & Chiron were collected

NOVON 17: 125–129. PUBLISHED ON 23 APRIL 2007.

from synchronopatric natural populations in Diamantina City, in southeastern Brazil. The plants were maintained in the greenhouse of the Genetic and Evolution Department of the Universidade Estadual de Campinas, São Paulo State. Specimens from the UEC herbarium, as well as those from BHCB, ESA, ESAL, HB, HXBH, MBML, R, RB, SP, and SPF, were examined.

Hoffmannseggella viridiflora Verola & Semir, sp. nov. TYPE: Brazil. Minas Gerais: Diamantina, Conselheiro Mata road, 43°42'W, 18°12'S, 1100 m, 14 Aug. 2003, C. F. Verola & M. E. Mansanares s.n. [flowered under cultivation, 12 Dec. 2003] (holotype, UEC 139238). Figure 1.

Haec species *Hoffmannseggellae viridiflorae*, *H. bradei*, *H. itambanae* (Pabst) V. P. Castro & Chiron, *H. verboonenii* (Miranda) V. P. Castro & Chiron et *H. esalqueanae* (Blumenschein ex Pabst) V. P. Castro & Chiron affinis sed floribus viride-flavescentibus, sepalis et labello patentibus brevioribus, petalis spatulatis brevioribus apice undulato, labelli lobo mediano curvato differt.

Perennial rupicolous herb; roots fasciculate, cylindrical, 2.3–3.5 mm; pseudobulbs 41–50 mm, green, 1 or 2 internodes, clavate, basal portion 9–11.3 mm wide to 4.5–5 mm at apex with 2 translucent green, compressed sheaths. Leaf sessile, lanceolate, dark green with purple spots in margins and the abaxial side, 45–48 × 9.5–11.5 mm, smooth, coriaceous, conduplicate, softly reflexed; spathe pale green, asymmetric, oblanceolate, 22–25 × 3.6–4 mm, flattened, softly ventricose on adaxial side. Inflorescence apical, racemiform, stalk 9.1–10 cm, 0.7–1.9 mm diam., erect, rigid, dark green with purple and cream spots, 1 or 2 sterile bracts 3.4–4.2 mm, green, acuminate; raceme 50–55.6 mm, 3- to 5-flowered, erect, rachis green with purple spots, erect; floral bracts translucent, green, triangular, 3.1–4 × 2.5–3.1 mm, persistent, acuminate; pedicel + ovary 23–25 mm, light green, cylindrical. Dorsal sepal brownish yellow adaxially, greenish yellow abaxially, suberect, oblanceolate, 10–10.6 × 3.2–3.7 mm, concave, acuminate; lateral sepals greenish yellow, erect, oblique, oblanceolate, 9–9.5 × 3–3.2 mm, slightly concave, acuminate; petals light greenish yellow, erect, spatulate, 9.5–9.9 × 3.6–4 mm, apically undulate; lip light greenish yellow, erect, trilobate, 6.7–7 × 7.4–7.6 mm, lateral lobes obovate, 6–6.3 × 3–3.2 mm, apex obtuse, tube-shaped and embracing the column, frontal lobe suborbicular, 2.2–2.5 × 2.2–2.5 mm, slightly curved, disc with 4 inconspicuous parallel keels, yellow-ochre; column greenish yellow, subcylindrical, slender, curved, 5.8–6.9 × 2–2.3 mm, subtriangular in transversal

section; stigmatic surface deep, subtriangular, 1.4–1.6 mm, separated from the anther by a flexible, viscous and membranous rostellum; anther with 8 cavities, pale yellow, pollinia 8, yellow, dimorphic with 4 smaller. Capsule sulcate, 25–30 × 10–15 mm, delimiting carpels; seeds pale yellow, diminutive.

Etymology. The epithet refers to the greenish yellow color of the perianth of the new species.

Hoffmannseggella viridiflora was collected without flowers from the natural population and cultivated into flower. At first glance, we believed this to be a specimen of *H. bradei* because of the high intra-specific morphological variation and plasticity shown between natural populations of this species. However, comparison of this plant with other closely related species shows that it is a new species, related to the yellow-flowered species of the Diamantina region such as *H. bradei*, *H. esalqueana*, *H. itambana*, and *H. verboonenii*. The new species is closely related to the members of the section *Esalqueanae* (Withner, 1990) that include small plants with short stalks and yellow flowers.

Hoffmannseggella viridiflora flowers in synchronopatry with *H. bradei*, and in this respect it could be a morphological variant of this species. However, their chromosome numbers are different: *H. bradei* has $2n = 40$, whereas *H. viridiflora* has $2n = 44$ (Costa, 2006). *Hoffmannseggella esalqueana* has chromosome number $2n = 40$ (Blumenschein, 1960b). The chromosome number counts for other related species, *H. itambana* and *H. verboonenii*, are unknown. This suggests that *H. viridiflora* may have originated from *H. bradei* by aneuploidy (see Costa, 2006). Aneuploid species are unusual in the genus, where polyploidy prevails in more than 50% of the species (Blumenschein, 1960a, b). Aneuploid complexes were recorded for populations of *H. brieri* (Blumenschein ex Pabst) V. P. Castro & Chiron (Blumenschein, 1960a) and *H. rupestris* (Lindley) V. P. Castro & Chiron (Costa, 2006). Further corroborating this probable origin of *H. viridiflora* is the low representation of the new species in the original population. Only three individuals were observed for the description, while a few others were unfit to describe, being too old or damaged. They occurred in a mixed population with *H. bradei* and represented about 1% of the total number of individuals of this population. *Hoffmannseggella viridiflora* is endangered because it grows outside a conservation area, in a pasture field near the highway, and is subjected to cattle congestion, occasional fire, and collector action. The endemic status of this species is suggested based on our fieldwork observations and herbarium survey.

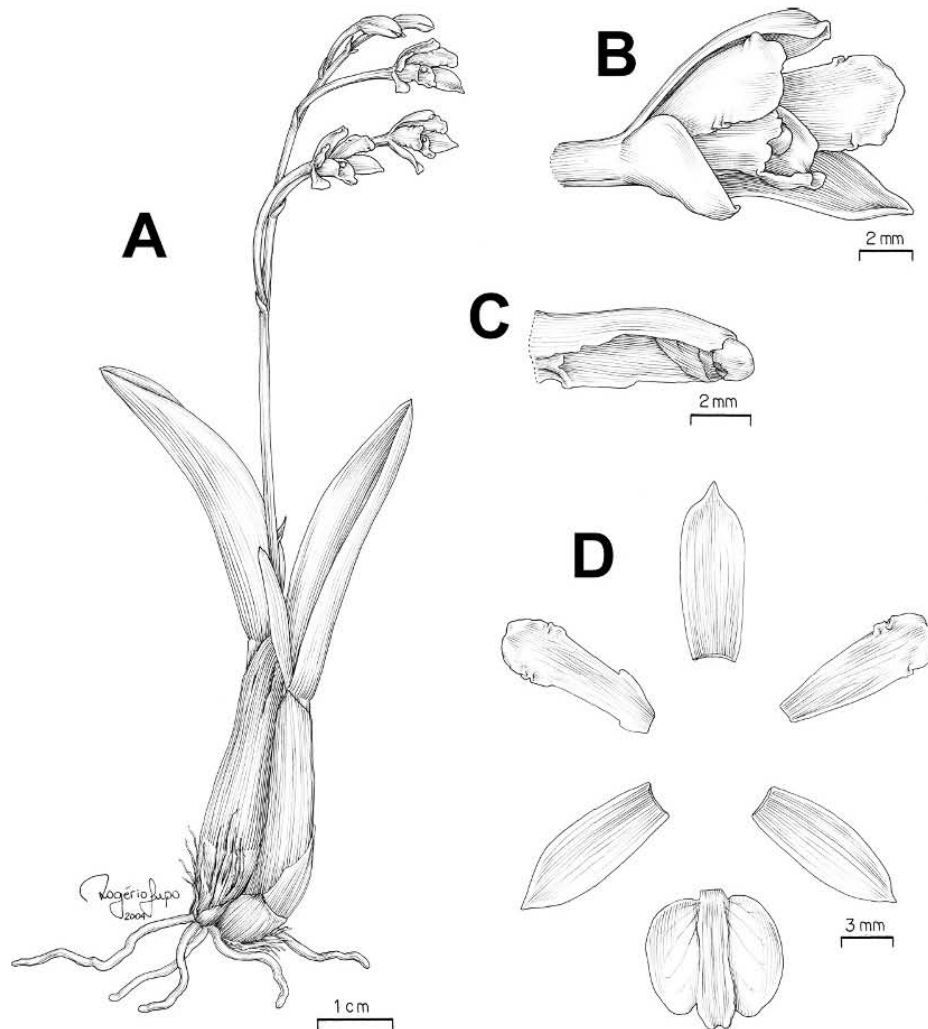


Figure 1. *Hoffmannseggella viridiflora* Verola & Semir. —A. Habit. —B. Flower. —C. Column. —D. Dissected perianth detail. Drawn from the holotype (UEC 139238).

Additionally, an intensive search and georeferenced data bank of natural populations do not indicate another occurrence of this species.

Beyond the cytological evidence, characteristics such as the greenish yellow flowers, the spatulate petals, and the erect portion of the perianth singularly identify this new species. The petals, sepals, and lip are very reduced in relation to related species (Table 1), and the erect midlobe of the lip differs from every other species in the genus due to its recurved shape. The characteristic features of the new

species and the differences between *Hoffmannseggella viridiflora* and its related species are summarized in Table 1.

Acknowledgments. The authors thank Júlia Yamagishi Costa and Eliana Regina Forni-Martins (Laboratório de Biosistemática e Evolução, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas) for sharing cytological data about species and for helpful discussions, Fábio de Barros and reviewers for the manuscript revision and improvements, Rogério Lupo

Table 1. Diagnostic morphological characters of *Hoffmannseggella viridiflora* and closely related taxa. *Characteristics were based on original description, with dashes indicating those not included in descriptions.

Structure	Characters	<i>H. viridiflora</i>	<i>H. bradei</i> *	<i>H. esalqueana</i> *	<i>H. itambuna</i> *	<i>H. verboomii</i> *
Pseudobulbs	shape					
	length × width (mm)	41–50 × 9–11.3	40 × 9–10	ovate	terete	elliptical-clavate
Leaf	shape	lanceolate	elliptical	oblong	25–35 × 6–8	30 × 10
	length × width (mm)	45–48 × 9.5–11.5	30 × 15	49 × 14	ovate	linear-lanceolate
Floral stalk	length (mm)	91–100	50–60	45	45 × 25	40 × 10
Dorsal sepal	shape	oblanceolate	oblong		± 40	80
	length × width (mm)	10–10.6 × 3.2–3.7	16 × 4	oblong-lanceolate	elliptic	lanceolate
Lateral sepal	shape	oblanceolate	oblong	falcate	25 × 10	14 × 5
	length × width (mm)	9–9.5 × 3–3.2	16 × 5	14 × 5	ovoid-asymmetric	falcate
Petals	shape	spatulate	falcate-tongued	ovate to falcate-tongued	20 × 12	12 × 5
	length × width (mm)	9.5–9.9 × 3.6–4	16 × 4	15 × 5	ovate to falcate	lanceolate
	total length × width (mm)	6.7–7 × 7.4–7.6	11 × 9.5	10 × 9	23 × 12	14 × 4.5
Lip	lateral lobe shape / apex shape	obovate to obtuse	ovate to obtuse	ovate to obtuse	15 × 15	—
	length × width (mm)	6–6.3 × 3–3.2	8 × 4	—	semiround to rotund	subelliptical to falcate
Column	length × width (mm)	5.8–6.9 × 2–2.3	5 × 1.75	10 × —	—	—
Pedicel	length (mm)	23–25	18–30	—	40	30

for his fast drawing, and Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) and Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (IEF/MG) for collection authorization. This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (02/08707-1, 02/08706-5) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (471742/03-1).

Literature Cited

- Blumenschein, A. 1960a. Estudo sobre a Evolução no Subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae). Tese para obtenção do Título de Livre Docente em Citologia e Genética, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz," Universidade de São Paulo, São Paulo.
- . 1960b. Número de cromossomos de algumas espécies de orquídeas. Publicação Científica do Instituto de Genética, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 1: 34–44.
- Campacci, M. A. 2005. Duas novas espécies de orquídeas do Brasil. *Bol. C.A.O.B.* 57: 24–31.
- Casto Neto, V. P. & G. R. Chiron. 2003. Une nouvelle espèce d'*Hoffmannseggella* (Orchidaceae) du Brésil. *Richardiana* 3(1): 64–68.
- Chiron, G. R. & V. P. Casto Neto. 2002. Revision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley. *Richardiana* 2(1): 4–28.
- & ———. 2005. Contribution à la connaissance des orchidées du Brésil. VI—Une nouvelle espèce de *Hoffmannseggella* du Minas Gerais (Brésil). *Richardiana* 5(1): 7–14.
- Costa, J. Y. 2006. Citotaxonomia e Aspectos Evolutivos de Espécies de *Hoffmannseggella* H. G. Jones (Orchidaceae), de Campos Rupestres Brasileiros. Ph.D. Dissertation, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil.
- Harley, R. M. 1995. Flora of the Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil (B. L. Stannard, editor), 1st ed. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Jones, H. G. 1968. Studies in neotropical orchidology. *Acta Bot. Acad. Sci. Hung.* 14: 63–70.
- Lacerda Jr., K. G. & V. P. Casto Neto. 2005. Deux nouveaux taxons de *Hoffmannseggella* du Minas Gerais (Brésil). *Richardiana* 5(1): 15–25.
- Miranda, F. 2005. Studies in Brazilian Laeliinae. Part 2: A new species in *Hoffmannseggella*. *Orchids* (West Palm Beach) 74(6): 458–461.
- & K. G. Lacerda Jr. 2003. Studies in Brazilian Laeliinae. Part 1: New species and natural hybrids in *Hoffmannseggella*. *Orchids* 72(11): 848–857.
- Mota, R. C., P. L. Viana & K. G. Lacerda Jr. 2003. *Hoffmannseggella pendula*, une nouvelle espèce d'Orchidaceae du Brésil. *Richardiana* 4(1): 1–8.
- Pabst, G. & F. Dungs. 1975. *Orchidaceae Brasilienses*, 1st ed., Vol. 1. Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Schlechter, R. 1917. Die Einteilung der Gattung *Laelia* und die geographische Verbreitung ihrer Gruppen. *Orchis* 11: 87–96.
- Semir, J. 1991. Revisão Taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaeae: Compositae). Ph.D. Dissertation, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brazil.
- Van den Berg, C. 2003. Considerações sobre as ex-*Laelias* brasileiras, *Sophranitis* e outros gêneros. *Orchid News*, 20.
- & M. W. Chase. 2000. Nomenclatural notes on Laeliinae I. *Lindleyana* 15: 115–119.
- , W. E. Higgins, L. D. Robert, W. M. Whitten, M. A. S. Arenas, A. Culham & M. W. Chase. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* 15: 96–104.
- Withner, C. L. 1990. *The Cattleyas and Their Relatives*, 1st ed., Vol II: The Laelias. Timber Press, Portland, Oregon.

**BIOSYSTEMATIC STUDIES IN THE BRAZILIAN ENDEMIC GENUS
HOFFMANNSEGELLA H. G. JONES (ORCHIDACEAE: LAELIINAE): A
MULTIPLE APPROACH APPLIED TO CONSERVATION**

CHRISTIANO FRANCO VEROLA^{1,5}, JOÃO SEMIR², ALEXANDRE ANTONELLI³
& INGRID KOCH⁴

¹Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Programa de Pós-graduação em Ecologia, Campinas, São Paulo, Caixa Postal 6109, CEP 13083-970, Brazil.

²Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Campinas, São Paulo, Caixa Postal 6109, CEP 13083-970, Brazil.

³Göteborg University, Department of Plant and Environmental Sciences, Göteborg, P.O.Box 461 SE-405 30, Sweden.

⁴Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Av. Darci Carvalho Dafferner, 200, Sorocaba, São Paulo, CEP 18043-970, Brazil.

⁵ Author for correspondence: cfverola@yahoo.com.br

KEY WORDS: Biosystematics, *Hoffmannseggella*, Laeliinae, endemic species, Campos Rupestres Vegetation, Conservation

Introduction

In recent molecular studies, the orchid genus *Laelia* Lindl. was segregated in two main groups: *Laelia* (a Mexican/Central American group), and *Sophronitis* Lindl. (a South American group) (van den Berg *et al.* 2000, van den Berg & Chase 2000). Later, other studies argued the legitimacy of this classification, suggesting the segregation of the South American group (*Sophronitis* sensu van den Berg *et al.* 2000) in four genera: *Hadrolaelia* (Schltr.) Chiron & V.P. Castro, *Hoffmannseggella* H.G. Jones, *Dungsia* Chiron & V.P. Castro, and *Microlaelia* (Schltr.) Chiron & V.P. Castro (Chiron & Castro 2002).

Hoffmannseggella is one of the most ornamental genus of subtribus Laeliinae and has been shown to be monophyletic (van den Berg *et al.* 2000). It comprises exclusively rupicolous species and has a scattered distribution confined to the High Altitude Rocky Complexes (Brazilian Campos Rupestres and Campos de Altitude) (Semir 1991, but see discussion in Benites 2003) of Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, and Bahia states. Chiron & Castro (2002) recognized 32 species in the genus, but the number has now increased to 42 (Castro & Chiron 2003, Chiron & Castro 2005, Lacerda & Castro 2005, Miranda & Lacerda 2003, Mota *et al.* 2003, Campacci 2005, Miranda 2005, Verola & Semir in press). Species delimitation is problematic, due to a great polymorphism in floral col-

oration and morphology, and the occurrence of natural hybrids (Blumenschein 1960a, 1960b, Brieger 1960, Barros 1990). This study aims at investigating the ecology and evolution of *Hoffmannseggella*, in order to provide the grounds for a more natural classification of the genus, and increase the knowledge necessary for the management and conservation of its species.

Material and methods

A multidisciplinary survey with emphasis on floral biology, breeding systems, pollination ecology, phylogeny, biogeography, and divergence times of 13 species of *Hoffmannseggella* is being conducted based on a varying number of populations.

Results and discussion

The majority of *Hoffmannseggella* species in this study does not normally produce nectar or floral odors, but this can vary among populations with fewer than 0.05% of the individuals in some populations with nectar and/or floral odor production). Generally, each flower lasts seven days on average and the anthesis is sequential racemose with about 3-7 available flowers at the same time. The species recorded so far are pollinated by small and inconstant Hymenoptera (belonging predominantly to families Apidae or Halictidae), through deceit mechanisms. Bee pollination in *Hoffmannseggella* contradicts previous suggestions

(Brieger 1960a, Dressler 1981) which attribute a *ornithophilous* (in this case hummingbird) syndrome to these plants, but is in accordance with general trends in *Laeliinae*, where about 60% of species are pollinated by Hymenoptera (van der Pijl & Dodson 1966). The pollination by small bees in *Hoffmannseggella* can be interpreted as an evolutionary innovation in the subtribe, whereas pollination by large bees represents a plesiomorphic condition (Borba & Braga 2003, Smidt *et al.* 2006). This shift in pollinator type, accompanied by reduction in floral size and change in coloration patterns, was suggested to have occurred in response to the colonization of a new habitat, the Campos Rupestres (Blumenschein 1960a, Brieger 1960, 1961, 1966). Pollinators generally visit a single flower per inflorescence and the pollination mechanism observed fits the "gullet type" described by Dressler (1981). Visits are sporadic and diurnal, and although they may occur at any time they seem more frequent during warmer periods. Despite population isolation and pollinator scarcity, many species developed (or retained) spontaneous self-pollination mechanisms (Luer 1971, Catling 1987, Knuth & Loew 1906) as a way to guarantee sexual reproduction in adverse situations (Catling 1990). The proportion of individuals with these mechanisms vary, with the highest number being found in small and isolated populations.

None of the species studied produced fruits through agamospermy, and fructification rate was generally low. A low rate of fruit formation has been observed in other deceptive orchids (Montalvo & Ackerman 1987, Ackerman 1989, Zimmerman & Aide 1989) and can be an adaptation to limited resources (Schemske 1980, Montalvo & Ackerman 1987, Zimmerman & Aide 1989). In these latter studies, species' survivor could only be assured by fruit formation with a high number of seeds (Dressler 1981, 1993).

Breeding systems were observed to vary from self-incompatibility to self-compatibility, depending on the species and population. Fructification and seed viability can vary considerably among populations of the same species. Grant (1975) and Lloyd (1979) pointed out that a great number of species can show mixed breeding systems, from exclusive selfing to outcrossing, including variations of those systems (Barrett *et al.* 2000, Lande & Schemske 1985, Schemske & Lande 1985). High seed viability was observed in interspecific crossings, sometimes reaching even higher levels of

viability than in cross-pollination experiments. This corroborates the hybridization hypothesis proposed by Blumenschein (1960a, 1960b) and Brieger (1960). Hybridization between synchronopatric species, polyploidy (Blumenschein 1960a, 1960b, Brieger 1960, Barros 1990), and dispoloidy (see Costa 2006 for a discussion on the same species and populations included in this work) seem to be the main mechanisms triggering radiation in the genus.

Estimates of divergence times in *Hoffmannseggella*, based on molecular sequence variation, indicate a recent diversification event. The crown age of the genus is placed in the Latest Miocene, and the short ages of several species imply that speciation is still occurring at a high rate (Verola *et al.* unpubl. data). A high speciation rate seems correlated with the climate oscillation that characterized the Pliocene and Pleistocene, causing the expansion and retraction of open vegetation types (Ledru 2002, Safford 1999). These events promoted high allopatric speciation by vicariance during wet periods, when populations became isolated in the few patches of open vegetation confined to mountain tops. As climate became drier, the expansion of open habitats and establishment of migratory corridors promoted contact between previously isolated species and thus facilitated sympatric speciation (mainly hybridization and polyploidy) (Verola *et al.* unpubl. data). A similar speciation mechanism has been proposed by other authors, such as Alves & Kolbek (1994), Pirani *et al.* (1994), and Semir (1991).

Threats and conservation status

Similarly to many other plant groups occurring in the Brazilian campos rupestres (Giullietti *et al.* 2005), the current status of conservation of the species in *Hoffmannseggella* is precarious. The majority of its species seem to be endangered, as they grow outside protected areas and are thus subjected to grazing, fires, illegal collecting, and habitat destruction. As many as 47% of the species are micro-endemic (with only one natural population known), and some are known only from the type collection.

The highest species diversity is found in the state of Minas Gerais, in the proximities of Belo Horizonte city. The area is densely populated and comprises a large number of ore prospection fields. Considering the isolation of the area, its high level of endemism, and poor availability of pollinators, coupled with the great anthro-

ecological pressure on natural populations, the populations occurring in this area appear highly subjected to stochastic events, which may lead to extinction. We therefore suggest the delimitation of fifteen new areas for the conservation of the group's total diversity. These areas were designed considering present and future climate conditions (obtained by the Ecological Modelling Techniques of Beaumont *et al.* 2005, Hijmans *et al.* 2004, and Hijmans *et al.* 2005) as well as centers of endemism (inferred by Parsimony Analysis of Endemism; Morrone & Crisci 1995). The suggested areas lay outside current conservation areas, which emphasizes the necessity of an immediate establishment. This study urges for additional works on other taxa characteristic of the Brazilian Campos Rupestres, to better identify regions of range overlaps and thus increase the total number of species per conservation area.

ACKNOWLEDGMENTS. The authors would like to thank IBAMA and IEF for collection permits, Julie Dutilh for improvements in the manuscript and Jardín Botánico Lankester, Universidad de Costa Rica, for publishing this paper. This work was supported by grants from FAPESP (02/08707-1 and 02/08706-5) and CNPq (471742/03-1).

LITERATURE CITED

- Ackerman, J.D. 1989. Limitations to sexual reproduction in *Encyclia krugii* (Orchidaceae). *Syst. Bot.* 14: 101-109.
- Alves, R.J.V. & J. Kolbek. 1994. Plant species endemism in savanna vegetation on table mountains (Campo Rupestre) in Brazil. *Vegetatio* 113: 125-139.
- Barrett, S.C.H., A.M. Baker & L.K. Jesson. 2000. Matting strategies in Monocotyledons. Pp. 258-269 in: K.L. Wilson & D.A. Morrison (eds.). *Monocots: Systematics and Evolution*. CSIRO, Melbourne, Australia.
- Barros, F. 1990. Diversidade taxonômica e distribuição geográfica das Orchidaceae brasileiras. *Acta bot. bras.* 4: 177-187.
- Beaumont, L.J., L. Hughes, & M. Poulsen. 2005. Predicting species distribution: use of climatic parameters in BIOCLIM and its impact on predictions of species' current and future distributions. *Ecol. Model.* 186: 250-269.
- Benites, V.M., A.N. Caiafa, E.S. Mendonça, C.E. Schaefer & J.C. Ker. 2003. Solos e vegetação nos complexos rupestres de altitude da mantiqueira e do espinhaço. *Floresta e Ambiente*. 10 (1): 76-85.
- Blumenschein, A. 1960a. Estudo sobre a evolução no subgênero *Cyrtolaelia* (Orchidaceae). Livre Docente diss., Universidade de São Paulo / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Esalq, Piracicaba, São Paulo, Brazil.
- Blumenschein, A. 1960b. Número de cromossomas de algumas espécies de orquídeas. Publicação Científica do Instituto de Genética, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 1: 34-44.
- Borba, E.L. & P.I.S. Braga. 2003. Reproductive biology of *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melittophily and self-compatibility in a basal Laeliinae. *Rev. Bras. Bot.* 26: 541-549.
- Brieger, F.G. 1960. Contribuições para a taxonomia das orquídeas. Publicações Científicas do Instituto de Genética, Esalq, USP 1: 1-31.
- Brieger, F.G. 1961. A evolução filogenética nos trópicos. Pp. 154-161 in: F.G. Brieger *et al.* (eds.). Atas do Primeiro Simpósio Sul Americano de Genética. Cadeira de Citologia e Genética Geral da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brazil.
- Brieger, F.G. 1966. Evolução filogenética, com referência especial às plantas superiores. Pp. 464-515. in Pavan, C. & Da Cunha, A.B. eds. *Elementos de Genética*. Companhia Editora Nacional & Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Campacci, M.A. 2005. Duas novas espécies de orquídeas do Brasil. *Boletim CAOB* 57: 24-31.
- Castro Neto, V.P. & G.R. Chiron. 2003. Une nouvelle espèce d'*Hoffmannseggella* (Orchidaceae) du Brésil. *Richardiana* 3 (1): 64-68.
- Catling, P.M. 1987. Notes on the breeding systems of *Saccolola lanceolata* (Aublet) Garay (Orchidaceae). *Ann. Mo. Bot. Gard.* 74: 58-68.
- Catling, P.M. 1990. Auto pollination in Orchidaceae. Pp. 121-158 in: J. Arditti (ed.). *Orchid Biology, reviews and perspectives*, V. Timber Press, Portland, U.S.A.
- Chiron, G.R. & V.P. Castro Neto. 2002. Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley. *Richardiana* 2: 4-28.
- Chiron, G.R. & V.P. Castro Neto. 2005. Contribution à la connaissance des orchidées du Brésil. VI – Une nouvelle espèce de *Hoffmannseggella* du Minas Gerais (Brésil). *Richardiana* 5 (1): 7-14.
- Costa, J.Y. 2006. Citotaxonomia e aspectos evolutivos de espécies de *Hoffmannseggella* H.G. Jones (Orchidaceae) de campos rupestres brasileiros. Ph. D. diss., Instituto de Biologia, Universidade Estadual de São Paulo, Campinas, Brazil.
- Dressler, R.L. 1981. The orchids: natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R.L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Cambridge University Press, Cambridge.
- Giullietti, A.M., R.M. Harley, L.P. Queiroz, M.G. Wanderley & C. Van den Berg. 2005. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiversidade* 1 (1): 52-61.
- Grant, V. 1975. Genetics of Flowering Plants. Columbia University Press, New York.
- Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P. G. Jones & A. Jarvis. 2004. The WorldClim interpolated global terrestrial climate surfaces. Version 1.3. <http://biogeo.berkeley.edu/world-clim/worldclim.htm>.
- Hijmans, R.J., L. Guarino, A. Jarvis, R. O'Brien, P. Mathur, C. Bussink, M. Cruz, I. Barrantes & E. Rojas. 2005. Diva-

- GIS. Version 5.2. <http://www.diva-gis.org/docs/DIVA-GIS5.manual.pdf>.
- Knuth, P. & E. Loew. 1906. Handbook of flower pollination. Clarendon Press, Oxford.
- Lacerda Jr., K.G. & V.P. Castro Neto. 2005. Deux nouveaux taxons de *Hoffmannseggella* du Minas Gerais (Brésil). *Richardiana* 5 (1): 15-25.
- Lande, R. & D.W. Schemske. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* 39:24-40.
- Ledru, M.P. 2002. Late Quaternary history and evolution of the cerrados as revealed by palynological records. Pp. 33-50 in: P.S. Oliveira & R.J. Marquis (eds.). The cerrados of Brazil. Columbia University Press, New York, USA.
- Lloyd, D.G. 1979. Some reproductive factors affecting the selection of self-fertilization in plants. *Amer. Natur.* 113:67-79.
- Luer, C.A. 1971. Abnormal development of the anther – a report of two cases. *Florida Orchidist* 13: 26-29.
- Miranda, F. & Jr., K.G. Lacerda. 2003. Studies in Brazilian Laeliinae. Part 1: New species and natural hybrids in *Hoffmannseggella*. *Orchids* 72 (11): 848-857.
- Miranda, F. 2005. Studies in Brazilian Laeliinae. Part 2: A new species in *Hoffmannseggella*. *Orchids* 74 (6): 458-461.
- Montalvo, A.M. & J.D. Ackerman. 1987. Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Biotropica* 19: 24-31.
- Morrone, J.J. & J.V. Crisci. 1995. Historical Biogeography: Introduction to Methods. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 26: 373-401.
- Mota, R.C., P.L. Viana & K.G. Lacerda Jr. 2003. *Hoffmannseggella pendula*, une nouvelle espèce d'Orchidaceae du Brésil. *Richardiana* 4 (1): 1-8.
- Pirani, J.R., A.M. Giulietti, R. Mello-Silva & M. Meguro. 1994. Checklist and patterns of geographical distribution of the vegetation of Serra do Ambrósio, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Bot.* 17 (2): 133-147.
- Safford, D.S. 1999. Brazilian Páramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. *J. Biogeogr.* 26: 693-712.
- Schemske, D.W. & R. Lande. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution* 39:41-52.
- Schemske, D.W. 1980. Evolution of floral display in the orchid *Brassavola nodosa*. *Evolution* 34: 489-493.
- Semir, J. 1991. Revisão Taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniae:Compositae). Ph. D. diss., Instituto de Biologia, Universidade Estadual de São Paulo, Campinas, Brazil.
- Smidt, E.C., V. Silva-Pereira & E.L. Borba. 2006. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. *Plant Species Biology* 21: 85-91.
- van den Berg, C. & M.W. Chase. 2000. Nomenclatural notes on Laeliinae - I. *Lindleyana* 15: 115-119.
- van den Berg, C., W.E. Higgins, R.L. Dressler, W.M. Whitten, M.A.S. Arenas, A. Culham & M.W. Chase. 2000. A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spaces (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* 15: 96-114.
- van der Pijl, L. & C.H. Dodson. 1966. Orchid flower: their pollination and evolution. University of Miami Press, Coral Gables.
- Verola, C.F. & J. Semir. 2007. *Hoffmannseggella viridiflora* (Orchidaceae, Laeliinae), A New Species from Brazilian Campos Rupestres. *Novon* (accepted)
- Zimmerman, J.K. & T.M. Aide. 1989. Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. *Amer. J. Bot.* 76: 67-73.

Christiano Franco Verola was born in Brazil in 1977. He graduated in biological sciences at Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" and received his M. Sc. in ecology at Universidade Estadual de Campinas. His research interests concern breeding systems, floral biology, pollination mechanisms, and pollination ecology in *Bulbophyllum* and *Hoffmannseggella* species (Orchidaceae). He is currently concluding his PhD thesis dealing with biosystematics studies in *Hoffmannseggella* species.

João Semir graduated and received his M. Sc. at Universidade de São Paulo. Later he wrote a PhD thesis dealing with the taxonomy of *Lychnophora* (Asteraceae). Since then, he has been working with the systematics of several groups from the Brazilian Campos Rupestres, including the Orchidaceae, Asteraceae, Bignoniaceae, and Melastomataceae. Today, he is a teacher and researcher at Universidade Estadual de Campinas and is involved in taxonomic projects concerning the Brazilian Flora, such as *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*.

Alexandre Antonelli was born in Brazil in 1978. After undergraduate studies in biology at Universidade Estadual de Campinas and Université de Genève, Switzerland, he received his M. Sc. in plant systematics at University of Göteborg, Sweden. He is now working on his PhD thesis concerning the systematics and historical biogeography of Neotropical plants.

Ingrid Koch graduated in biology at Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". She received her M.Sc. and PhD in plant biology at Universidade Estadual de Campinas, in which she conducted taxonomic studies in Apocynaceae. In her post-doc, she worked with GIS and Ecological Modeling applied to plant distribution and conservation, at Centro de Referência em Informação Ambiental (CRIA) in Campinas. Today she collaborates in various botanical projects, one of which investigates the taxonomy of Neotropical Apocynaceae. She also acts as a teacher at Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" and project assistant at Universidade Estadual de Campinas.