

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Botânica**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**

Gustavo Komel Pimenta

**MELITOFILIA, AUTOCOMPATIBILIDADE E MICROENDEMISMO EM  
COTYLOLABIUM, O GÊNERO MONOTÍPICO IRMÃO DAS DEMAIS  
SPIRANTHINAE (ORCHIDACEAE)**

Belo Horizonte

2021

Gustavo Komel Pimenta

**MELITOFILIA, AUTOCOMPATIBILIDADE E MICROENDEMISMO EM  
COTYLOLABIUM, O GÊNERO MONOTÍPICO IRMÃO DAS DEMAIS  
SPIRANTHINAE (ORCHIDACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba

Co-orientador: Prof. Dr. Ubirajara Oliveira

Belo Horizonte

2021

043

Pimenta, Gustavo Komel.

Melitofilia, autocompatibilidade e microendemismo em *Cotylolabium*, o gênero monotípico irmão das demais *Spiranthinae* (Orchidaceae) [manuscrito] / Gustavo Komel Pimenta. - 2021.

40 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba. Co-Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

1. Desenvolvimento Vegetal. 2. Orchidaceae. 3. Polinização. I. Borba, Eduardo Leite. II. Oliveira, Ubirajara. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Botânica

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**



**“Melitofilia, autocompatibilidade e microendemismo em *Cotylolabium*, o gênero monotípico irmão das demais Spiranthinae (Orchidaceae)”**

**Dissertação defendida por Gustavo Komel Pimenta e aprovada, em 31 de março de 2021, pela banca examinadora constituída pelos professores:**

Dr. Eduardo Leite Borba (UFMG)

Dr. Eric de Camargo Smidt (Universidade Federal do Paraná/UFPR)

Dr. João Aguiar Nogueira Batista (UFMG)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria, em primeiro lugar, de agradecer do fundo do meu coração ao professor Eduardo Borba por aceitar conduzir meu trabalho de pesquisa. Pela confiança depositada na minha proposta de projeto e por me manter motivado, tarefa que acredito nem sempre ter sido fácil. Por me auxiliar em todos os passos dessa minha jornada, sendo sempre muito prestativo demonstrando uma enorme paciência digna de um verdadeiro guia. Acredito que sem sua ajuda e orientação essa tarefa se tornaria impossível para mim. O enxergo como uma inspiração não só acadêmica, mas também de vida pessoal. Sou grato por todo conhecimento que me foi passado, o que me engrandeceu não só como biólogo e acadêmico, mas também como ser humano.

Em segundo, tenho muita gratidão pelo professor Ubirajara Oliveira, pela sua didática impecável, por sua boa vontade e por sempre se mostrar acessível, disposto e alegre nas horas em que precisei, além de todo conhecimento que pude adquirir com o mesmo, seja através de suas aulas, de nossas conversas e reuniões.

Também agradeço ao professor Joao Batista, que sempre se mostrou prestativo em ajudar a todos do laboratório, nunca me negando atenção quando necessário. Além de sua parceria e companheirismo com o professor Eduardo, atitude que me abriu os olhos para como se devem ser dadas boas relações no ambiente de trabalho e o quanto isso impacta no dia a dia.

Dos colegas de laboratório, tenho que dar atenção especial a Gabriela e ao Vinicius, com os quais criei um carinho enorme. Que me apoiaram durante esse caminho, se preocupando comigo ao longo de minha trajetória tornando-a mais prazerosa e agradável.

Também faço questão de citar a Mariana, que sempre me ajudou com seu conhecimento em anatomia vegetal, me auxiliando a aprender e dominar técnicas que foram essenciais para execução do meu projeto.

Aos funcionários do Parque Nacional do Caparaó por me receberem tão bem durante meus trabalhos de campo.

A toda minha família, em especial a minha mãe Grace, meu pai Ricardo e meu irmão Pedro que sempre estiveram ao meu lado, por todo o esforço investido na minha educação, pois sem eles não teria chegado até este ponto da minha vida.

A minha esposa Lorena que sempre me incentivou e esteve ao meu lado nos momentos difíceis.

Não posso deixar de citar algumas personagens dessa minha trajetória que vieram antes da minha entrada no programa de pós-graduação como a Professora Maria de Fatima Starling

do programa de graduação em ciências biológicas da PUC-Minas que me apresentou ao fascinante mundo da biologia vegetal a qual considero praticamente como uma mãe no início dessa minha caminhada me abrindo diversas portas. Também agradeço alguns colegas de graduação Humberto e Luiz Henrique na arte da fotografia e ilustração científica os quais carrego como amigos até hoje.

Agradeço a UFMG, ao programa de pós-graduação em Biologia Vegetal e todo o seu corpo docente, pela excelência técnica de cada um e a qualidade do ensino oferecido.

## RESUMO

Foi estudada a biologia floral, o sistema reprodutivo, o mecanismo de polinização e a área de distribuição geográfica de *Cotylolabium Lutzii* (Orchidaceae), na Serra do Caparaó, na divisa dos estados de Espírito Santo e Minas Gerais. O primeiro objetivo desse estudo foi de elucidar a biologia reprodutiva de *C. lutzii* com ênfase no seu mecanismo de polinização, contribuindo para o conhecimento da evolução e irradiação dos sistemas de polinização na subtribo Spiranthinae. As flores de *C. lutzii* possuem néctar em pequena quantidade e alta concentração. São polinizadas exclusivamente por *Bombus (Thoracobombus) brasiliensis* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae), as visitas observadas foram relativamente raras o que contrasta com a observação de frutificação relativamente alta. *Cotylolabium lutzii* é auto compatível e dependente do polinizador para frutificação. O posicionamento filogenético da espécie, aliado a estudos de biologia floral em outros gêneros da subtribo, permite indicar que melitofilia e autocompatibilidade sejam características basais na subtribo Spiranthinae, com posterior irradiação adaptativa no grupo para polinização por beija-flores e Lepidoptera. A espécie floresce do início de janeiro ao final de março, com pico de floração em fevereiro. O segundo objetivo foi de se utilizar Modelos de distribuição de espécies e exploração em campo para localizar novas áreas de ocorrência e áreas com potencial de ocorrência para mesma, onde os fatores físicos e climáticos são adequados aos requisitos fisiológicos da espécie, e assim oferecer suporte para medidas de conservação, quantificando a amplitude ambiental das ocorrências dessa espécie. Através das amostragens de pontos de ocorrência em campo, foi possível registrar novos locais de ocorrência para *C. lutzii*. Os modelos gerados mostram uma área realmente muito restrita, com todas as subpopulações limitadas ao território do Parque Nacional do Caparaó, próximas ao cume dos maiores picos do maciço Caparaó.

**Palavras-chave:** Spiranthinea, Orchidaceae, Polinização, Biologia reprodutiva.

## ABSTRACT

It was studied the floral biology, the reproductive system, the pollination mechanism and the geographic distribution area of *Cotylolabium lutzii* (Orchidaceae), in the Caparaó mountain range, on the border between Espírito Santo and Minas Gerais states. The first objective of this study was to elucidate the reproductive biology of *C. lutzii* with an emphasis on its pollination mechanism, contributing to the knowledge of the evolution and irradiation of pollination systems in the subtribe Spiranthinae. The flowers of *C. lutzii* present nectar in small quantity and high concentration. They are pollinated exclusively by *Bombus* (*Thoracobombus*) *brasiliensis* Lepelletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae). Visits were relatively rare, which contrasts with the relatively high fruit set. *Cotylolabium lutzii* is self-compatible and dependent on pollinators for fruiting. The phylogenetic positioning of the species, combined with studies of floral biology in other genera of the subtribe, allows indicating that melittophily and self-compatibility are ancestral characteristics in the subtribe Spiranthinae, with subsequent adaptive radiation in the group for pollination by hummingbirds and Lepidoptera. The species blooms from early January to late March, with flowering peak in February. The second objective was to use Species Distribution Models and exploration in the field to locate possible new populations and potential areas for the species, and thus offer support for conservation measures, quantifying the environmental amplitude of occurrences of this species. Through checking points generated by the models in the field, it was possible to register new occurrence sites for *C. lutzii*. The models generated show a very restricted distribution area, with all subpopulations limited to within the Caparaó National Park, close to the summit of the highest peaks of the Caparaó massif.

**Keywords:** Spiranthinea, Orchidaceae, Pollination, Reproductive Biology.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E METODOLOGIA.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A observação de que a cor geralmente é correlacionada com outras características florais, como tamanho, simetria, forma e odor, resulta nas conhecidas síndromes de polinização: grupos de características florais que ocorrem junto tipicamente em flores que são polinizadas por um agente particular (Rausher 2008). Exemplos de síndromes incluem (1) flores ornitófilas (polinizadas por aves), que são avermelhadas a alaranjadas, com um longo tubo floral e grande quantidade de néctar diluído, (2) flores melitófilas (polinizadas por abelhas), geralmente azuis ou roxas com tubo floral curto e largo contendo pequena quantidade de néctar concentrado, (3) flores falenófilas (polinizadas por mariposas), de coloração clara com tubo floral longo e antese noturna. Estimar o número de transições das síndromes usando métodos filogenéticos e reconstrução de caracteres pode prover importantes informações para estudos mais profundos das bases ecológicas da seleção. Outro importante fator consiste na polaridade das transições e quando transições particulares são reversíveis ou evolutivamente lábeis (Rausher 2008).

A megadiversa família Orchidaceae é um excelente grupo para estudos evolutivos, possuindo características marcantes da ação de processos evolutivos recentes, fortemente marcados por processos de especiação abrupta, fenômenos de convergência e irradiação adaptativa (Dressler 1993). A grande maioria das orquídeas é polinizada por engodo, possuindo flores que mimetizam um modelo geral de flor que oferece néctar (principalmente melitófila, e menos frequentemente ornitófila, psicófila e falenófila), local de oviposição (sapromiíófilas) ou parceiro sexual (mimetizando fêmeas de himenópteras ou dípteras) (Ackerman 1986). No entanto, em diferentes espécies de orquídeas são também ofertadas aos visitantes florais uma ampla variedade de recursos, sendo o néctar o mais comum, mas também fragrâncias ou óleos florais, e mais raramente pólen ou pseudopólen (van der Pijl & Dodson 1966). O papel dos polinizadores na evolução das orquídeas é refletido na complexidade das características dos mecanismos de polinização. Aparentemente, a polinização por abelhas é a condição ancestral na família, ocorrendo atualmente em aproximadamente 75% das espécies. Porém, vários eventos de irradiação ocorreram em Orchidaceae, principalmente da condição melitófila para a polinização por aves (ornitofilia), borboletas (psicofilia), mariposas (falenofilia e esfingofilia), dípteras (miofilia e sapromiofilia) e besouros (cantarofilia) (van der Pijl & Dodson 1966). Apesar do crescente número de estudos sobre a biologia de polinização em Orchidaceae no Brasil nos últimos anos, esses ainda são relativamente escassos quando comparados a sua importância e o

número de espécies na família, especialmente em alguns grupos, tais como a subfamília Orchidoideae.

A subtribo Spiranthinae (Orchidoideae: Cranichideae), uma das principais linhagens de orquídeas terrestres, abrange cerca de 42 gêneros e aproximadamente 500 espécies com predominância de distribuição no Neotrópico (Garay 1982; Salazar 2003). Segundo a lista da Flora do Brasil (2020), são encontrados 23 gêneros e 189 espécies desse grupo no território brasileiro. Recentes estudos moleculares indicam que a evolução dos caracteres florais nessa subtribo é mais complexa do que comparações prévias haviam sugerido, onde alguns destes caracteres parecem ser homoplásticos, relacionados a adaptação ao mesmo ou similar polinizador em grupos distantemente relacionados (Salazar et al. 2011, 2018). Os escassos estudos realizados e a estrutura geral das flores em Spiranthinae indicam que a síndrome da melitofilia é a mais comum e amplamente distribuída no grupo. No livro “Orchid flowers: their pollination and evolution”, obra de referência de suma importância sobre polinização na família (van der Pijl & Dodson 1966), são mencionados exemplos de gêneros em Spiranthinae possivelmente ornitófilos, em um pequeno grupo de flores de coloração vermelha e rosada, como *Sacoila*, *Stenorrhynchos* e *Dichromanthus*, sugerindo que sua polinização seja feita por beija-flores. Salazar et al. (2011) estudaram espécies de *Dichromanthus* e concluíram que a maioria apresenta uma síndrome de polinização por beija-flores, o que é consistente com o proposto por van der Pijl & Dodson (1966). Além disto, Singer & Sazima (2000) confirmaram a polinização por beija-flores em *Sacoila lanceolata*.

Diversos estudos de biologia floral têm confirmado as abelhas como grupo principal de polinizadores em Spiranthinae (Singer & Cocucci 1999; Singer & Sazima 1999; Singer 2003; Sanguinetti & Singer 2014). Porém, outros estudos mostraram que, em algumas espécies aparentemente melitófilas, há efetivamente polinização por lepidópteros diurnos e noturnos, como mariposas em *Sauroglossum elatum* (Singer 2002) e borboletas em *Pteroglossa* (Pansarin & Ferreira 2015). Isso mostra que ocorreu uma irradiação adaptativa na subtribo para diversos grupos de polinizadores, provavelmente a partir de uma condição ancestral melitófila (Borba et al. 2014). Salazar et al. (2011) sugerem que a polinização por beija-flores em Spiranthinae tenha surgido diversas vezes, notando a grande convergência dos caracteres florais para esse tipo de polinização, hipótese suportada por análises filogenéticas mais recentes para a subtribo (Borba et al. 2014; Salazar et al. 2018).

Néctar é o único recurso conhecido oferecido em flores de Spiranthinae. Tanto o volume quanto a concentração de açúcares do néctar estão frequentemente correlacionados com o tipo de polinizador, sendo usualmente mais concentrados e com menor volume em

flores polinizadas por abelhas e mais diluídos e com maior volume em flores polinizadas por beija-flores e Lepidoptera (Proctor et al. 1996). A emissão de fragrância também está ligada ao tipo de polinizador, e geralmente as flores de Spiranthinae com odor liberam uma fragrância levemente adocicada, geralmente em osmóforos localizados no labelo (Wiemer et al. 2009; Borba et al. 2014) e atraem abelhas e lepidópteros, enquanto as flores sem fragrância costumam ser polinizadas por beija-flores.

Salazar et al. (2011) demonstraram que a ocorrência de polinização por beija-flores em espécies ou grupos de espécies pertencentes a clados distantes em Spiranthinae, ou seja, algumas espécies de *Dichromanthus* e (provavelmente) *Svenkoeltzia* no clado Spiranthes; *Sacoila* e *Stenorrhynchos* no clado Stenorrhynchos; e provavelmente *Coccineorchis* no clado Pelexia (Fig. 1). Cada um destes gêneros está intimamente relacionado a grupos que exibem outras síndromes de polinização, sugerindo que a polinização por beija-flores surgiu várias vezes independentemente na subtribo. Salazar et al. (2003, 2018) observaram vários casos de incongruência entre clados recuperados por análises moleculares e agrupamentos taxonômicos prévios baseados em morfologia floral. Eles propuseram que alguns dos caracteres florais usados para definir os gêneros que são diretamente envolvidos na polinização e, portanto, propenso a homoplasia resultante de pressões seletivas de polinizadores. Assim, similaridade em tais caracteres entre grupos distantemente relacionados pode refletir adaptação convergente aos polinizadores em vez de proximidade filogenética. Seus resultados apoiam essa hipótese em relação a *Dichromanthus* e *Stenorrhynchos*, em que a semelhança geral, forma de flor e coloração provavelmente evoluíram independentemente, indicando que a morfologia floral é evolutivamente lábil. Assim, a confiabilidade de tais caracteres em delimitar gêneros naturais (ou seja, monofiléticos) e taxa de níveis superiores não deve ser assumida a priori. Os autores ainda destacaram a necessidade de obtenção de mais informações detalhadas e comparativas sobre a biologia da polinização no grupo. Estudos estruturais e de polinização que, juntamente com análises filogenéticas formais, permitirão alcançar a compreensão do papel dos órgãos florais na polinização e sua utilidade para delimitar historicamente grupos taxonômicos significativos em Spiranthinae (Salazar et al. 2011)

O gênero *Cotylolabium* é mono-específico, sendo *C. lutzii* a sua única espécie, e também o grupo irmão do restante da subtribo (Borba et al. 2014). A análise de área ancestral indica que Spiranthinae se originou no leste da América do Sul, com migrações subsequentes e radiações secundárias na Mesoamérica e América do Norte, além de uma migração derivada desta última região para o Velho Mundo (Salazar et al. 2018). Originalmente a

espécie foi descrita em *Stenorrhynchos*, gênero caracterizado pelo longo e afilado rostelo e demais características ornitófilas. Posteriormente, várias de suas espécies foram segregadas em diversos outros gêneros, tais como *Cotylolabium*, *Skeptrostachys* e *Sacoila*, decisão sustentada recentemente por estudos filogenéticos demonstrando que o gênero era polifilético (Salazar et al. 2003, 2009, 2011, 2018). Sendo o único representante atual desta linhagem relictual irmã de uma grande radiação neotropical (Borba et al. 2014; Salazar et al. 2018), o conhecimento de sua biologia reprodutiva e de polinização é de grande importância para o entendimento da evolução da subtribo.

*Cotylolabium lutzii* é endêmica da Serra do Caparaó, conhecida por apenas uma pequena população, próxima ao Pico da Bandeira, o ponto mais alto da América do Sul oriental com 2.892m de altitude, ocupando uma área menor do que 200m<sup>2</sup> e possuindo poucas dezenas de indivíduos (Borba et al. 2014). Com base nos critérios do World Conservation Union Red List Categories and Criteria (IUCN, 2001), *C. lutzii* pode ser classificada como em perigo. É uma erva terrestre que cresce em solo raso nas fendas das rochas em campo de altitude. Sua floração ocorre de final de fevereiro ao final de março, durante o final da estação chuvosa, e a fase de crescimento ocorre durante o verão com dormência no inverno. Todos os registros recentes indicam que a espécie ocorre acima de 2600m de altitude, o que implica em uma pequena área próxima ao cume. Porém, coletas a 1890. indicam sua ocorrência a uma elevação de 2000m alt., além de uma coleta de 1960 a 2400m alt. Esses registros sugerem que possam ocorrer outras populações de *C. lutzii* na Serra do Caparaó (Borba et al. 2014). Não existem informações sobre o polinizador, o mecanismo de polinização nem a biologia reprodutiva em *Cotylolabium*, e as suas flores possuem características tanto de Spiranthinae ornitófilas (flores com coloração vibrante, flores tubulares patentes sem plataforma de pouso desenvolvida, cavidade nectarífera separada por uma barreira de difícil acesso para aparelhos bucais não rígidos) quanto melitófilas (presença de osmóforos emitindo odor levemente adocicado e lobo terminal do labelo mais amplo do que as espécies ornitófilas na subtribo). De destaque especial é a coloração fortemente amarela de suas flores, não usual em Spiranthinae, sendo mais próximo do que é observado nas espécies ornitófilas do que nas melitófilas do grupo (Salazar et al. 2011).

Na eminente crise da biodiversidade, aliada à falta de recursos destinados à conservação (Brooks et al. 2002), as espécies ameaçadas devem ser diferenciadas umas das outras para que aquelas sob maior risco possam receber melhor atenção (Pimm et al. 1998; Wilson et al. 2006). A maioria dos estudos de conservação avalia a distribuição das espécies e as ameaças à sua manutenção, desconsiderando o conteúdo evolutivo das linhagens

filogenéticas como direcionamento relevante para áreas para a conservação (Gaiarsa 2010). Abordagens que não consideram os dados filogenéticos não são eficazes na proteção das linhagens evolutivas que são essenciais para preservar a história da vida, bem como a ampla gama de serviços ecossistêmicos fornecidos pela biodiversidade. Dentro de uma mesma linhagem, as espécies terão diferentes importâncias relativas para a conservação da diversidade evolutiva e ecológica seja atual ou passada. Quanto mais próximas filogeneticamente forem, menor será a diversidade genética entre elas e quanto mais distantes, maior será a diversidade, o que destaca a importância dos estudos filogenéticos em conjunto com estudos de biogeografia. Avanços recentes na aquisição de dados moleculares levaram a um notável aumento nas publicações sobre filogenias de espécies tropicais, como os trabalhos de Salazar et al. (2018) e Borba et al. (2014) para *Spiranthinae*, e estão começando a permitir o uso de linhagens evolutivas em estudos de conservação regional.

Quando consideramos espécies de uma mesma linhagem, podemos quantificar a biodiversidade a partir da diversidade de caracteres (Faith 1992; Purvis & Hector 2000), por meio de sua “singularidade ecológica”, sendo o grau de singularidade definido como a distância absoluta do fenótipo de uma determinada espécie em relação ao fenótipo mais comum na linhagem (Redding et al. 2010). Desta forma, quanto mais distinta uma espécie é em relação às outras espécies de uma linhagem, maior sua singularidade ecológica. Já foi também proposto que o cálculo da biodiversidade (May 1990) deveria considerar a representação da história evolutiva de um grupo (Faith 1992, 2002), supondo que esta medida representaria a diversidade de características relictuais. Assim, o grau de distinção de uma espécie seria inversamente proporcional à sua proximidade às demais espécies de uma linhagem e ao número relativo de espécies próximas (Owens & Bennett 2000; para diferentes abordagens veja May 1990; Vane-Wright et al. 1991; Heard & Mooers 2000; Mace et al. 2003; Forest et al. 2007; Steel et al. 2007). O grau de “distinção filogenética” é uma das métricas desenvolvidas para quantificar a história evolutiva de um grupo (May 1990; Vane-Wright et al. 1991): quanto mais relictual é uma espécie, maior será a sua distinção filogenética. Assim, diferentes espécies de uma mesma linhagem terão diferentes importâncias relativas para a conservação da diversidade evolutiva e ecológica, atual e passada.

Os modelos de distribuição de espécies (MDE) têm se mostrado uma ferramenta importante de análise para aumentar o conhecimento da distribuição de espécies, podendo direcionar esforços de coleta para áreas onde falta conhecimento ecológico e biológico, otimizando as atividades de campo, reduzindo custos e contribuindo para estratégias de

conservação (Guisan et al. 2006; Rodríguez et al. 2007; Siqueira et al. 2009). Entre suas diversas aplicações, destacam-se a realização de testes de hipóteses biogeográficas, ecológicas e evolutivas e a quantificação de nichos ecológicos de espécies (Siqueira et al. 2009); conservação de espécies raras ou ameaçadas (Araújo & Williams 2000; Engler et al. 2004); impactos de mudanças climáticas (Peterson et al. 2002; Oberhauser & Peterson 2003; Siqueira & Peterson 2003; Thomas et al. 2004; Pearson et al. 2006; Araújo et al. 2006, 2008; Wiens et al. 2009); estudo sobre a dinâmica de populações e fluxo gênico (Peterson et al. 2006).

Os MDE utilizam da associação entre as variáveis ambientais e os dados de ocorrência das espécies para produzir mapas de distribuição, indicando áreas que apresentam condições favoráveis à ocorrência das espécies (Guisan & Thuiller 2005). Existe um grande número de algoritmos que vão desde aqueles de lógica mais simples, tais como o Bioclim e Domain, até algoritmos mais complexos, de aprendizagem de máquina, como Maxent e GARP, além daqueles que utilizam parâmetros estatísticos como o GAM (Hastie & Tibshirani 1986) e que por utilizarem dados de ausência se aproximam da distribuição real das espécies (Jiménez-Valverde et al. 2008).

Estudos revelam que amostras pequenas ou enviesadas podem diminuir a acurácia dos MDE (Stockwell & Peterson 2002; Kadmon et al. 2003, 2004; Hernandez et al. 2006; Hortal et al. 2008; Wisz et al. 2008; Costa et al. 2010; Bean et al. 2011; Feeley & Silman 2011), características dos dados para a maioria das espécies nos ambientes montanhosos (Martinelli 2007; Madeira et al. 2008). No Global Biodiversity Information Facility (GBIF) um dos mais importantes bancos de dados digitais sobre a distribuição geográfica para espécies de vários grupos taxonômicos, se encontram apenas 18 registros para *C. lutzii*, a maioria deles antigos e apenas 6 deles georreferenciados, sendo todos para a mesma localidade (GBIF 2020). A distribuição geográfica de *C. lutzii* é aparentemente restrita a uma pequena área de afloramentos rochosos próximos ao Pico da Bandeira em substrato raso situado nas fendas das rochas. Devido à escassez de material coletado, a falta de conhecimento sobre a biologia da espécie e a dificuldade de amostragem devido ao relevo de seu habitat, acreditamos que a espécie tem sua distribuição subamostrada, e muito provavelmente ocorre em outros morros e picos dentro do parque com elevação similar ao pico da bandeira, e com probabilidade de ocorrer até em outros locais fora da unidade de conservação relativamente próximos com semelhança florística, geológica e altitudinal, como algumas localizações da Serra do Mar e Serra da Mantiqueira. Apesar da sua grande vulnerabilidade, não há registro da espécie nas listas de espécies ameaçadas de Minas Gerais,

Espírito Santo e Brasil.

Diante das limitações do conhecimento sobre a biologia reprodutiva, da limitada distribuição espacial e de todo potencial de ameaça à conservação dessa linhagem endêmica e relictual, é fundamental que se conheça a distribuição real de *Cotylolabium lutzii* como suporte para ações de conservação e conhecimento sobre sua dinâmica populacional. Assim, foram objetivos deste estudo 1) elucidar a biologia reprodutiva de *C. lutzii*, com ênfase no seu mecanismo de polinização e o sistema reprodutivo, a fim de se ter uma melhor compreensão das suas interações ecológicas, servindo de base para discutir a evolução e irradiação dos sistemas reprodutivos e síndromes de polinização na subtribo Spiranthinae, e 2) baseando-se na hipótese de que o conhecimento da distribuição da espécie é incompleto, aplicar modelos de distribuição de espécies para indicar áreas potenciais de ocorrência, que podem ser utilizados na localização de novas populações e conseqüentemente na sua conservação, indicando áreas com relevância para sua preservação.

## 2 MATERIAIS E METODOLOGIA

### Área de estudo

O estudo foi realizado no Parque Nacional do Caparaó, situado entre as coordenadas 20°19'-20°37'S e 41°43'-41°53'W, na divisa dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo, região Sudeste do Brasil (Fig. 2). De acordo com a classificação de Köppen (1948), a região possui clima do tipo Cwb, clima tropical de altitude com temperatura média anual entre 19° C e 22° C, máxima absoluta de 34 a 36° C e mínima absoluta de -4 a 0° C, sendo fevereiro o mês mais quente e julho o mais frio. A pluviosidade está em torno de 1.000 mm anuais, e as maiores ocorrências de chuvas estão entre os meses de novembro a janeiro, sendo setembro o mês mais seco (ICMBIO 2019). A unidade abrange uma área de aproximadamente 31,8 mil hectares, concentrando uma das mais representativas áreas de preservação da Mata Atlântica (ICMBIO 2019). O Parque abriga o terceiro ponto mais alto do país, o Pico da Bandeira (20°26'05"S, 41°47'45"W), com 2.891 metros de altitude, além dos Picos do Cruzeiro (2.861 m), do Cristal (2.798 m) e do Calçado (2.766 m) (IBGE 2018). O Parque guarda amostras singulares de campos de altitude, tipo de vegetação peculiar, fortemente influenciada pelas condições de solo, clima e altitude do maciço do Caparaó, que surgem em geral acima de 2.000 m (Fig. 3A-B), e compreendem uma flora diversificada e característica, incluindo muitas espécies endêmicas e ameaçadas de extinção (Leoni & Souza 1999).

### Biologia reprodutiva

#### Polinizações experimentais

Foram realizadas polinizações experimentais em campo, em duas populações naturais da espécie, abrangendo dois diferentes experimentos. No primeiro, foram realizados quatro tratamentos: autopolinizações, polinizações cruzadas entre indivíduos da população do Pico da Bandeira, e polinizações interpopulacionais bidirecionais entre indivíduos das populações do Pico da Bandeira e do Pico do Cristal. No quarto tratamento, algumas flores não foram polinizadas e nem emasculadas em cada população, para a verificação da ocorrência de agamosperma diplospórica e/ou autopolinização espontânea. Apenas flores recém-abertas foram utilizadas, sendo empregadas 10 flores para cada tipo de tratamento, totalizando 40 polinizações experimentais. A formação dos frutos e seu desenvolvimento foram monitorados até a sua maturação. As sementes de frutos maduros foram removidas, fixadas

em FAA 50% e armazenadas em etanol 50%. A viabilidade de uma amostra de 200 sementes por fruto foi avaliada por seu caráter morfológico ao microscópio óptico, seguindo a metodologia de Borba et al. (1999, 2001): sementes com embrião bem desenvolvido foram consideradas viáveis, e sementes sem embrião ou com embrião rudimentar foram considerados inviáveis.

No segundo experimento foram realizadas polinizações experimentais seguindo os mesmos tratamentos anteriores, mas o desenvolvimento foi interrompido em intervalos regulares de 3, 7 e 11 dias após a polinização para observação de germinação dos grãos de pólen, crescimentos dos tubos polínicos, desenvolvimento do ovário e fertilização. As flores foram fixadas em FAA 50%, armazenadas e etanol 50% e posteriormente tratadas com 8N NaOH a 60°C por 30min em estufa. Em seguida, foram lavadas com água destilada, coradas com azul de anilina, esmagadas e observadas em microscópio de epifluorescência (modificado de Martin 1959).

### Biologia floral

A atividade de visitantes florais foi observada na população de *C. lutzii* próxima ao cume do Pico da Bandeira, no Parque Nacional do Caparaó. As observações foram feitas de 6:30 até às 18:00 horas (do amanhecer ao anoitecer), durante cinco dias consecutivos, de 15-19 de março de 2018. Todas as flores disponíveis foram mapeadas ao fim do dia, associadas à informação sobre presença do polinário na antera ou estigma, sendo examinadas no início do dia seguinte para verificar se houve remoção/deposição de polinário fora do período de observação. A frequência e comportamento dos visitantes florais foram registrados, e amostras dos insetos foram coletadas e enviadas para especialistas para identificação e depositadas na Coleção Zoológica da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A frutificação nas populações foi quantificada a partir da contagem do número de flores e frutos formados em indivíduos amostrados ao acaso. Foram mensurados a concentração de solutos sólidos (equivalentes de açúcares) utilizando-se um refratômetro de mão (ATAGO) e o volume de néctar usando microseringa (HAMILTON, 50µl). Foram utilizadas 28 flores durante o horário de maior visita (11hs) para serem feitas estas mensurações.

### **Biogeografia**

Foi utilizada modelagem de distribuição de espécies como ferramenta para encontrar locais com alta adequabilidade ambiental e probabilidade de ocorrência de *C. lutzii* para posterior

verificação em campo, indicando novas áreas de potencial ocorrência, se ter melhor conhecimento da distribuição da espécie e auxiliar medidas de conservação.

#### Tratamento dos pontos de ocorrência da espécie.

Pela escassez de material de herbários, com pouca quantidade de coletas realizadas e amostragens muito antigas, em sua maioria não georreferenciadas, sendo todas para o mesmo local, optou-se por georreferenciar diretamente os pontos de ocorrência em campo, o que confere uma maior robustez para o estudo. Para definir os locais de coleta foram usados os dados encontrados em Borba et al. (2014), GBIF (<https://www.gbif.org/>) e Flora do Brasil (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>), além da indicação de funcionários do parque sobre possíveis localidades em que haviam visualizado a espécie. Foram feitas incursões em campo (março 2018 e 2019) no Parque Nacional do Caparaó a fim de se delimitar de maneira mais precisa os limites da distribuição da população. Os pontos para análise foram georreferenciados usando GPS. Foram feitos transectos, e marcados e numerados todos os indivíduos encontrados, sendo que indivíduos com menos de 2 metros de distância foram considerados como um único ponto.

#### Tratamento e escolha das camadas ambientais

Para a modelagem foram selecionadas 3 variáveis ambientais do WorldClim (<https://www.worldclim.org/>), sendo elas: a precipitação, a temperatura máxima e a temperatura mínima do mês de março do ano de 2010 a 2018 como parâmetros preditivos, uma vez que essas variáveis estão temporalmente mais bem relacionadas com as coletas realizadas em campo, gerando uma melhor relação entre as variáveis ambientais e os pontos de ocorrência para a análise.

Também foi utilizado um Índice de Vegetação da Diferença Normalizada (NDVI- Normalized Difference Vegetation Index) gerado através de imagens de satélite (Land Sat 8), retiradas da biblioteca do INPE (<http://www.dgi.inpe.br/CDSR/>). Foram utilizadas imagens do período mais próximo possível do mês e ano de amostragem em campo (03/2018), com o objetivo de se ter uma variável que representasse de maneira mais precisa o estado da vegetação no campo. O relevo acidentado origina solos rasos e forma um mosaico de micro-habitats com condições distintas do contexto do entorno, fazendo com que o índice de vegetação seja considerado um bom preditor. Todos os mapas foram reamostrados para escala de 30 m<sup>2</sup> pois as amostras coletadas em campo apresentavam alta precisão espacial.

Assim as variáveis foram preparadas com pixels de 30 m<sup>2</sup> por ser a melhor alternativa de escala, uma vez que a espécie ocorre em uma área bastante restrita. Foram aplicadas análises de componentes principais (PCA) com todas as variáveis ambientais (Thuiller 2004; Araújo et al. 2006) para remover a correlação entre as variáveis e reduzir a chance de sobreparametrização e sobrajuste.

#### Escolha dos algoritmos de modelagem

Com um pequeno número de amostras, como o de estudos de espécies ameaçadas ou de área de ocorrência restrita, modelos mais simples são desejáveis. Considerando que o resultado preditivo da modelagem pode ser influenciado pela natureza do algoritmo utilizado (Thuiller 2004), representando uma fonte de incerteza, optou-se por usar uma abordagem pluralista. Assim, foram testados diferentes algoritmos, com o propósito de buscar um consenso daqueles com maior qualidade preditiva (Thuiller 2004). Para isto, foram testados cinco algoritmos muito utilizados na atualidade para modelar a distribuição da espécie, sendo eles: Modelo Linear Generalizado (GLM) (Guisan et al. 2002; Dobson & Barnett 2008), Análise Discriminante Flexível (FDA) (Hastie et al. 1994), Floresta Aleatória (RF) (Breiman 2003), Máxima Entropia (Maxent) (Phillips et al. 2006) e Support Vector Machine (SVM) (Boser et al. 1992). Os algoritmos foram selecionados por utilizarem apenas dados de presença e apresentarem bons resultados com baixo número de pontos de ocorrência (Wisiz et al. 2008). O uso de todos esses procedimentos deve ser considerado, não só para garantir a utilidade desses modelos em uma abordagem conservacionista, mas também para uma melhor comparação dos resultados, garantindo a robustez das conclusões atingidas. Os modelos foram gerados utilizando-se o software BioDinamica (Oliveira et al. 2019).

#### Avaliação dos modelos gerados

Os dados foram subdivididos em dois grupos: uma parte composta por 70% dos dados para a calibração (treino) dos ajustes e os 30% restantes para a avaliação (teste) dos ajustes, conforme sugerido por Thuiller (2003). Os métodos adotados para avaliar os modelos gerados foram: área sob a curva (AUC), obtida através da curva ROC, acurácia, sensibilidade, especificidade, Kappa e TSS.

A acurácia é a razão entre a soma de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos (A+D), e a área total utilizada na criação dos modelos (no caso, em pixels). Ela representa o grau de acerto do modelo, e serve como avaliação da verossimilhança do mesmo. Podemos

considerar a sensibilidade como uma medida que descreve a probabilidade de um pixel de ocorrência verdadeira ser corretamente classificado como uma ocorrência. A especificidade é a probabilidade de um pixel onde a espécie não está presente ser corretamente classificado como uma ausência (Segurado & Araujo 2004; Fielding & Bell 1997). A AUC é a área sob uma curva ROC. Essa curva é obtida quando representamos graficamente a sensibilidade no eixo y e 1- especificidade no eixo x (Fielding & Bell 1997). Ela é um indicador direto da capacidade discriminatória do modelo e é interpretada diretamente como a probabilidade do modelo de, dado um ponto de verdadeira presença e um ponto de verdadeira ausência, o modelo classificá-los corretamente (Phillips et al. 2006). A estatística Kappa também é obtida através da análise da matriz de confusão. Este índice é interessante pois mede o desempenho de modelos de distribuição de espécies fazendo uso de todas as informações contidas na matriz de confusão (Fielding & Bell 1997) e indica o grau de concordância do modelo com a realidade. Infelizmente, Kappa é sabidamente sensível à prevalência, ou seja, o número de pontos de presença por área. O True Skill Statistics (TSS) foi desenvolvido por Allouche et al. (2006). Sua proposta foi criar um método de avaliação de modelos que não sofresse influência da prevalência e do número de pontos utilizados para gerar os modelos analisados, mantendo ainda as vantagens do método anterior.

### 3 RESULTADOS

#### **Biologia reprodutiva**

##### Fenologia e biologia floral

Os indivíduos de *C. lutzii* possuem órgãos epígeos apenas em parte do ano, iniciando a produção de folhas (três a quatro por indivíduo) e inflorescência durante o verão. Sua floração ocorre no final de fevereiro, se estendendo até o final de março, no final da estação chuvosa. O desenvolvimento dos seus frutos é relativamente rápido, e a sua maturação leva aproximadamente 50 dias após a polinização, com a deiscência no decorrer dos meses de abril a maio. Durante o inverno, o ambiente se encontra mais seco e ocorre a senescência das partes aéreas dos indivíduos, que sobrevivem devido ao seu sistema hipógeo de um pequeno rizoma e raízes de reserva, dando origem a um novo crescimento vegetativo na próxima estação chuvosa.

As inflorescências racemosas de *C. lutzii* possuem cerca de 20 a 40 cm de altura, e produzem em média  $8,71 \pm 2,89$  (4-15) flores (n=55) (Fig. 3C-D). A antese floral é diurna, com a abertura de uma a duas flores por inflorescência a cada dia. A abertura completa das flores dura cerca de 24 horas, começando no início da manhã e se estendendo até o início da manhã do dia seguinte, quando as peças florais completamente abertas distendidas. Quando não polinizadas, as flores permanecem abertas e receptivas durante aproximadamente 15 dias, de forma que frequentemente ocorrem várias flores disponíveis concomitantemente em uma inflorescência (Fig. 3D-E).

Aqui é apresentada uma caracterização simplificada da morfologia floral de *C. lutzii*, evidenciando as características mais relevantes associadas à polinização; veja Borba et al. (2014) para uma descrição detalhada da complexa morfologia da espécie. As flores de *C. lutzii* possuem cerca de 1,5-2cm de comprimento, de coloração amarela e formato tubular devido às peças florais eretas, com as pétalas aderidas à sépala dorsal e as margens do labelo na porção medial aderentes às laterais da coluna (Fig. 3E-F). A sépala dorsal é lanceolada, com cerca de 15 mm de comprimento e 5 mm de largura, e as sépalas dorsais são obliquamente lanceoladas e cerca de 2-3 mm mais longas e 1 mm mais largas do que a dorsal. A partir do segundo dia de antese, as sépalas laterais começam a se tornar patentes. As pétalas são obovo-lanceoladas, falcadas, e um cerca de 1 mm mais curtas e estreitas do que a sépala dorsal. O labelo é côncavo, em formato de barco (Fig. 3G-H), em média com 15 mm de comprimento e 5-10 mm de largura, glandular em sua face externa; os lobos laterais abraçam

a coluna, com cada lobo possuindo um pequeno lóbulo proximal carnosos de cerca de 1-2 mm, o lobo terminal é aproximadamente orbicular e patente a reflexo (Fig. 3F, H). O labelo possui uma parede transversal carnosos (trabécula), aproximadamente no final do seu quarto proximal, que se estende de uma margem à outra, dividindo-o em duas câmaras distintas (Fig. 3G). Os nectários ocorrem internamente nos dois pequenos lóbulos laterais da porção proximal do labelo (hipoquilo), a qual forma uma cavidade onde o néctar é acumulado (Fig. 3F-G). A trabécula, que possui um conjunto de tricomas na sua parte superior, juntamente com o ápice da coluna, bloqueia o acesso ao nectário, protegendo a flor contra ladrões de néctar. A coluna possui um canal ventral que permite o acesso seletivo do aparato bucal do polinizador à cavidade nectarífera.

Suas flores possuem um odor fresco levemente adocicado, com maior intensidade no decorrer da manhã até o meio da tarde (8:00 as 16:00 horas), tornando-se imperceptível no período noturno. O néctar é viscoso e em pouca quantidade, e sua mensuração realizada durante o horário de maior frequência das visitas florais (11hs) apresentou o volume médio de  $6,0 \pm 1,6$  (3,0-9,0)  $\mu\text{l}$  (n=28) e concentração média de  $31 \pm 6$  (24-41) % (n=28).

### Polinização

*Bombus brasiliensis* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera Apoidea) foi a única espécie a visitar as flores de *C. lutzii* durante o período de observação (55hs), funcionando como polinizadora efetiva. A frequência de visitas foi baixa (n=6), e estas ocorreram do meio da manhã ao início da tarde, entre 09:00 e 14:00hs. Houve a remoção do polinário pelo polinizador em apenas duas das visitas realizadas e a deposição em apenas uma (com a deposição total do polinário). O inseto permanece poucos segundos na flor durante a visita (cerca de 2 a 10s). O polinizador visitou apenas uma flor por inflorescência, em seguida voando para longe das flores observadas, exceto em uma ocasião na qual logo após a visita o inseto voou para um indivíduo de *C. lutzii* a poucos metros da inflorescência, visitando outra flor e depositando nela o polinário. Nenhum polinário foi removido ou depositado nas flores marcadas fora do período de observação.

Ao se aproximar da flor, esta abelha pousa no lobo terminal do epiquilo do labelo, agarrando-se nas suas margens com os dois primeiros pares de pernas, usando-o como plataforma de pouso. Em seguida ela insere a cabeça entre o labelo e a coluna buscando passagem de seu aparelho bucal para alcançar o néctar, deslocando o labelo para baixo e inserindo a língua na cavidade nectarífera (hipoquilo) através do canal formado pela trabécula e a coluna da flor (Fig. 4A). Este movimento faz com que a abelha encoste sua

cabeça na antera, com a remoção do polinário ocorrendo quando o inseto recua para alçar voo da flor, encostando no viscidio que então se fixa ao seu rostro. Ao visitar outra flor da mesma espécie, desta vez com o polinário aderido ao seu rostro, e repetir o mesmo comportamento, o inseto promove o contato entre as polínias da flor anterior com a cavidade estigmática dessa nova flor, promovendo a polinização cruzada entre essas. Ao longo de todo o período da manhã e início ao meio da tarde, *B. brasiliensis* foi avistado em maior frequência visitando flores de várias outras espécies (principalmente Asteraceae), que ocorrem na área de estudo e florescem conjuntamente com os indivíduos de *C. lutzii* (Fig. 4B)

### Sistema reprodutivo

Não foram formados frutos por agamospermia ou autopolinização espontânea, sendo necessário o transporte do polinário por um vetor para ocorrência da polinização e frutificação. O percentual de frutificação entre os tratamentos experimentais foi similar, variando de 50% a 70%, com o maior valor obtido nas autopolinizações (Tab. 1). A viabilidade de sementes por fruto também foi similar entre os tratamentos experimentais, variando de 71% a 83%, sendo novamente superior nas autopolinizações (Tab. 1; Fig. 5H).

A análise dos tubos polínicos nos tratamentos realizados em *C. lutzii* não demonstrou diferenças na morfologia e desenvolvimento destes entre as polinizações cruzadas e autopolinizações experimentais. Foi observada uma grande quantidade de grãos de pólen aderidos ao estigma (Fig. 5A-B), muitos desses germinando e desenvolvendo tubos polínicos com aspectos normais. Foi encontrado um número elevado de tubos bem desenvolvidos, de morfologia estreita e regular, com paredes finas e plugs de calose depositados em intervalos mais ou menos regulares (Fig. 5E). Após 3 dias da polinização, foi possível observar que os tubos percorreram toda a extensão da coluna, dividindo-se em três feixes ao chegar à porção distal do ovário (Fig. 5C). Nas amostras fixadas 7 dias após a polinização, os feixes de tubos haviam percorrido entre 1/2 e 3/5 da porção distal do ovário (Fig. 5D-F), podendo-se observar alguns poucos deles penetrando os óvulos (Fig. 5G). Após 11 dias das polinizações os feixes de tubos polínicos penetraram por todo o ovário, chegando até a sua base, sendo observado um elevado número de fertilizações dos óvulos já completamente desenvolvidos. Nos frutos maduros ainda foi possível visualizar o desenvolvimento normal dos tubos polínicos divididos nos 3 feixes, com cada um deles percorrendo uma região placentária.

## Biogeografia

### Amostragem em campo

Durante as incursões ao Parque Nacional do Caparaó foram encontradas novas áreas de ocorrência de *C. lutzii*, com diversos indivíduos espalhados em locais de elevada altitude nas trilhas e entornos do Pico do Cristal e Pico do Calçado, sendo amostrados 544 pontos de ocorrência (Fig. 2). A amostragem dos pontos de ocorrência realizada em campo revelou indivíduos encontrados em uma altitude mínima de 2.447 m. Porém, esses poucos indivíduos são encontrados de maneira isolada e os locais de ampla ocorrência surgem acima de 2.600 m, onde é possível encontrar os indivíduos ocorrendo de maneira agregada, com um elevado número de plantas em um pequeno espaço nas fendas rochosas contendo solo. Dos indivíduos amostrados, 5,2% se encontram abaixo de 2.600 m alt., 18% entre 2600 e 2700 m alt., 37,2% entre 2701 e 2800 m alt. e 39,6% ocorrendo acima de 2.800 m alt., com a maior altitude amostrada para indivíduos da espécie a 2.875 m, a poucos metros do cume do Pico da Bandeira.

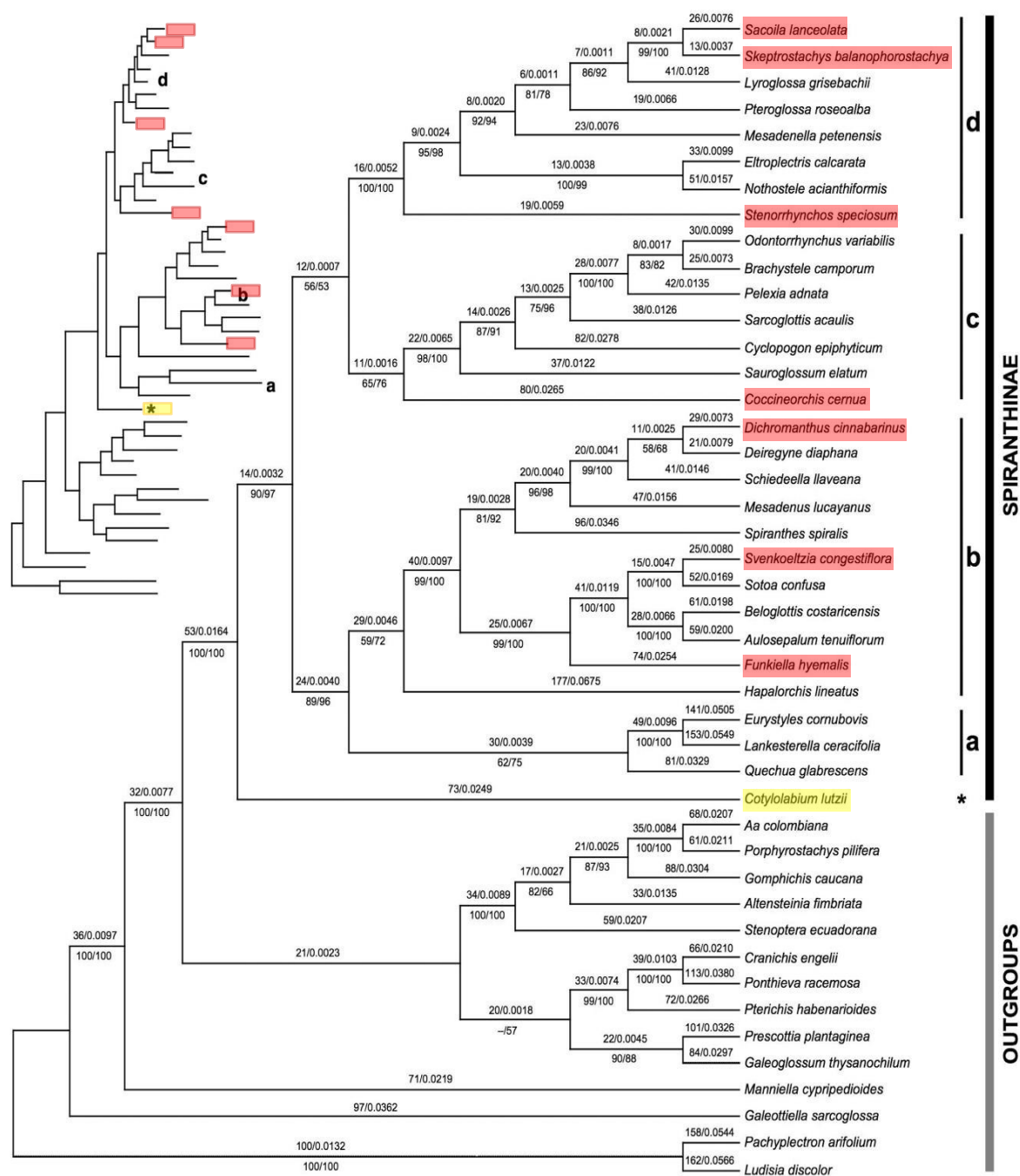
### Modelagem de Distribuição de Espécies

Dos cinco algoritmos testados, somente o SVM se mostrou capaz de produzir modelos a partir das amostras, esse algoritmo funciona bem com conjuntos de dados menores e dados mais agregados espacialmente. Ainda assim os valores gerados pelo modelo devem ser analisados de maneira crítica, uma vez que os pontos de ocorrência da espécie são altamente agregados e podem gerar algumas distorções.

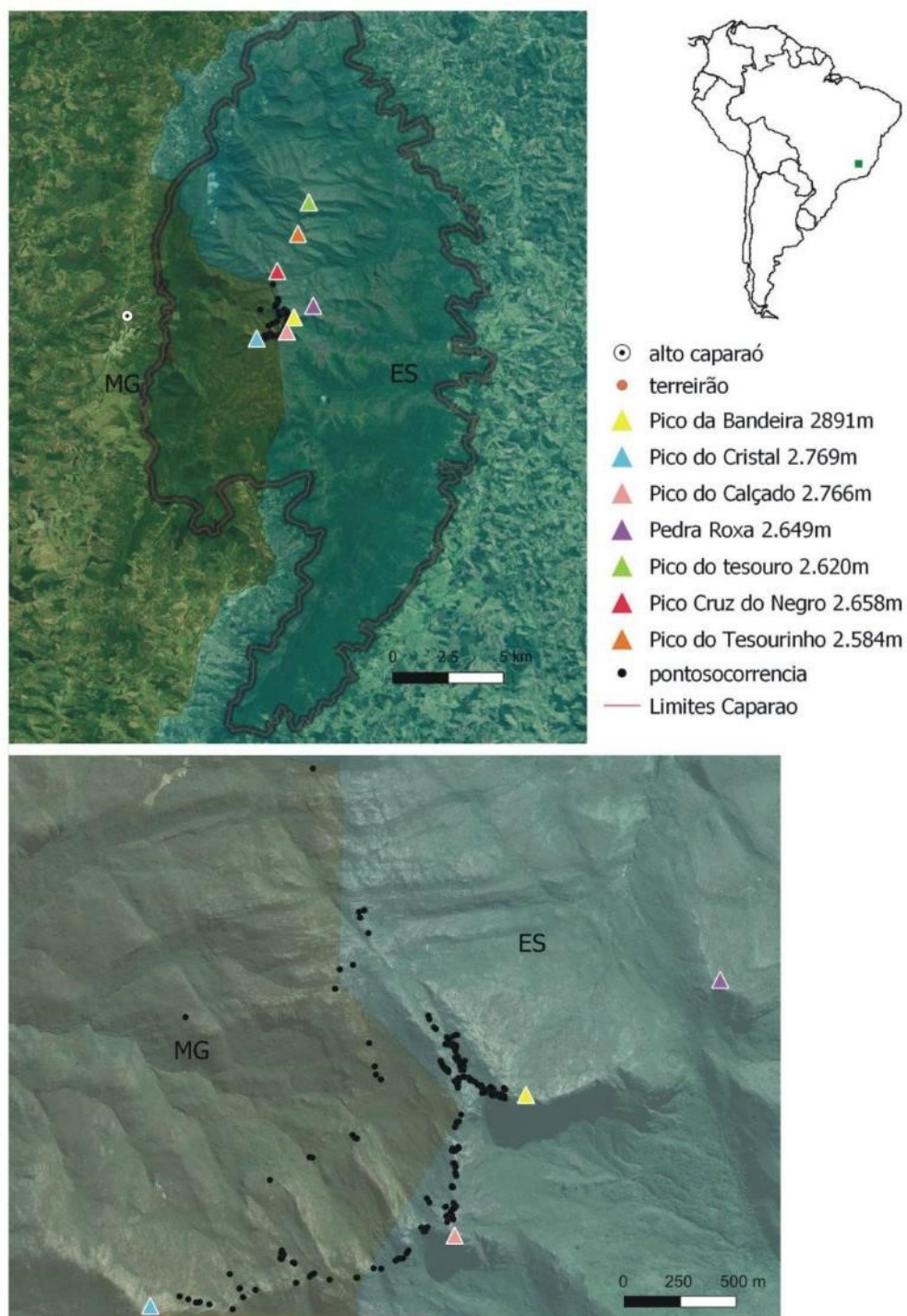
A proporção de acertos de presença apresentou um valor de aproximadamente 0,8, o que demonstra uma alta proporção de acerto, o que implica em uma robustez relativamente alta do modelo. A espécie se mostra altamente restrita com todas as áreas de adequabilidade relevantes, com valor de adequabilidade acima de 0,8 ocorrendo em locais de elevada altitude restritas ao território da unidade de conservação (Fig. 6). Essa área é relativamente maior do que o mostrado na amostragem em campo. Além disso, destacam-se somente algumas pequenas áreas de maior adequabilidade em Minas Gerais (20°9'11"S, 43°36'43"O e 20°42'55"S, 42°26'51"O), onde situam-se a Serra da Gandarela e a Serra do Brigadeiro, respectivamente (Fig 6). Essas regiões encontram-se a dezenas de quilômetros ao leste do Parque, com elevada altitude (<1.800 m) e presença de campos de altitude com algum grau de similaridade e valores de adequabilidade de até 0,4, representando uma pequena possibilidade de ocorrência para a espécie.

**Tabela 1.** Frutificação e viabilidade de sementes em diferentes tratamentos de polinizações experimentais em duas populações de *Cotylolabium lutzii*, no Parque Nacional do Caparaó

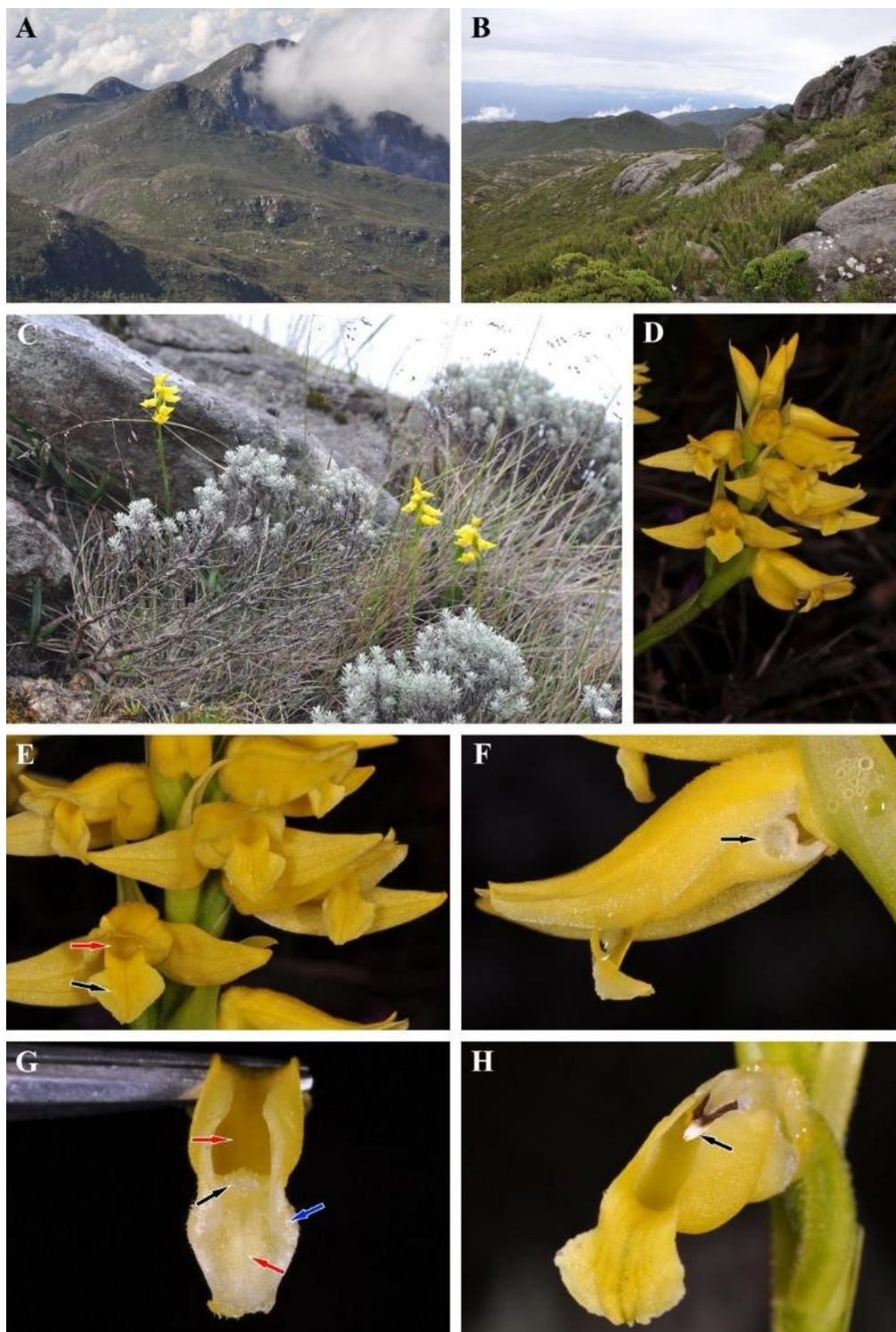
Tratamento	Flores (n)	Frutificação (%)	Viabilidade de sementes
Autopolinização	10	70%	82,63%
Cruzada (total)	30	60%	74,54%
Intrapopulacional	10	50%	74,64%
Bandeira x Cristal	10	60%	71,04%
Cristal x Bandeira	10	70%	77,94%



**Fig. 1** Cladogramas extraídos de Borba et al. (2014), mostrando as relações filogenéticas em Spiranthinae inferidas por análises de máxima parcimônia (MP) e máxima verossimilhança (ML) de sequências de DNA nucleares combinadas (ITS) e plastídios (matK – trnK, trnL – trnF). A posição de *Cotylobium lutzii* é marcada por um asterisco (\*) e destacado em amarelo. Gêneros contendo espécies factualmente ou provavelmente ornitófilas são destacados em vermelho (não necessariamente a espécie em questão). Veja detalhes em Borba et al. (2014) (<https://doi.org/10.1111/boj.12136>)



**Fig. 2** Imagem de satélite com vista geral do Parque Nacional do Caparaó, indicando os pontos de ocorrência de *C. lutzzi* amostrados durante o estudo. Também estão representados os picos de maior altitude dentro da unidade de conservação.

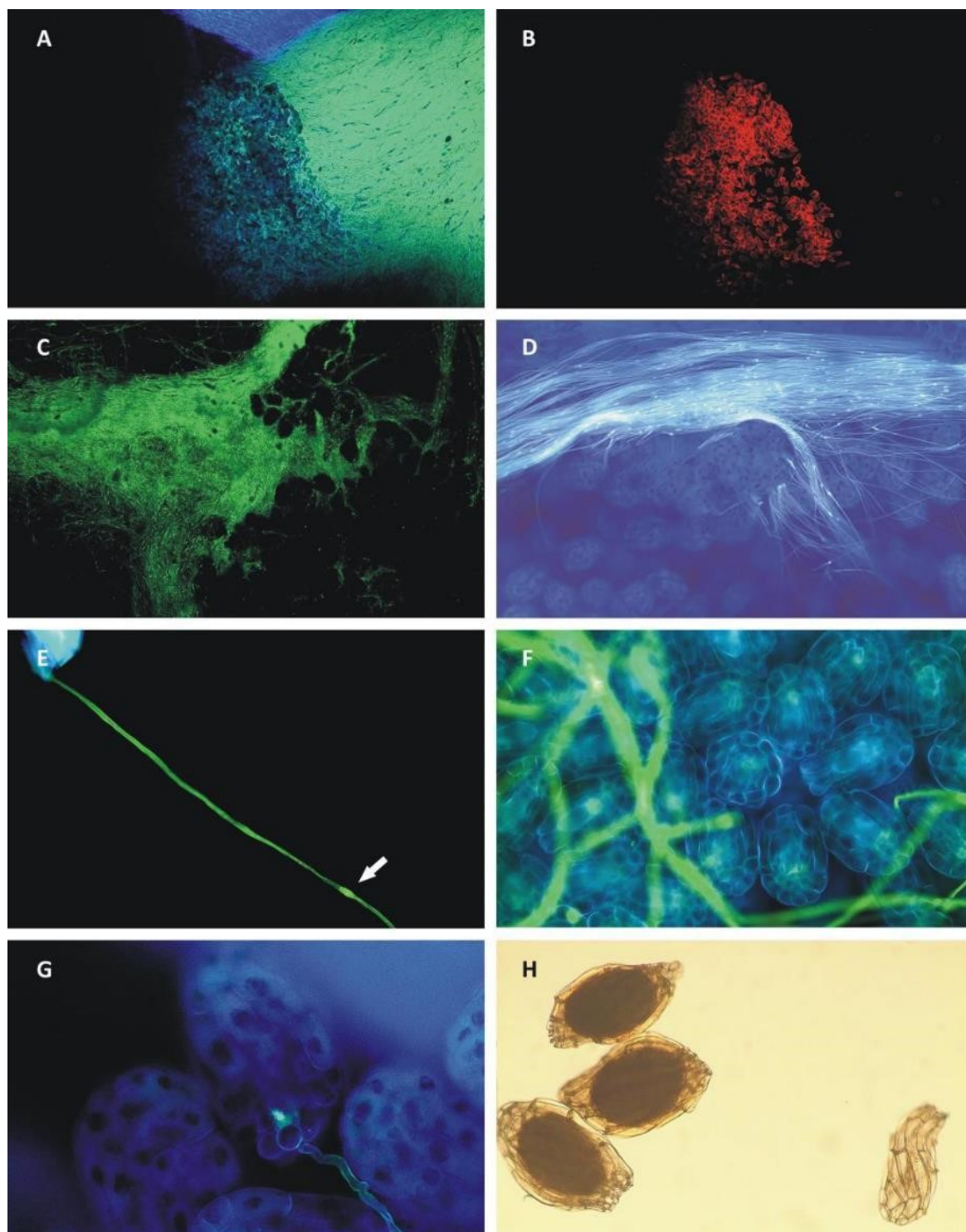


**Fig. 3** A- Vista geral da região de ocorrência das populações de *Cotylobium lutzii* no Parque Nacional do Caparaó, evidenciando a vegetação predominantemente campestre e, ao fundo, o Pico do Cristal; B- Formação de campo rupestre no local de ocorrência da população do Pico da Bandeira; C-F, H- Indivíduos (C), inflorescência e flores (E-F, H) de *C. lutzii*; E- Vista frontal da flor, com a seta preta indicando o lobo terminal patente/reflexo do labelo e a

seta vermelha a entrada do tubo floral; **F**- Vista lateral da flor com a sépala lateral removida, indicando um dos lóbulos carnosos onde se localizam os nectários (seta); **G**- Vista a partir da base do labelo, com a seta preta indicando a trabécula, as vermelhas indicando o epiquilo (superior) e o hipoquilo (inferior), e a azul o nectário; **H**- Flor com sépalas e pétalas removidas, indicando o viscido do rostelo no ápice da coluna

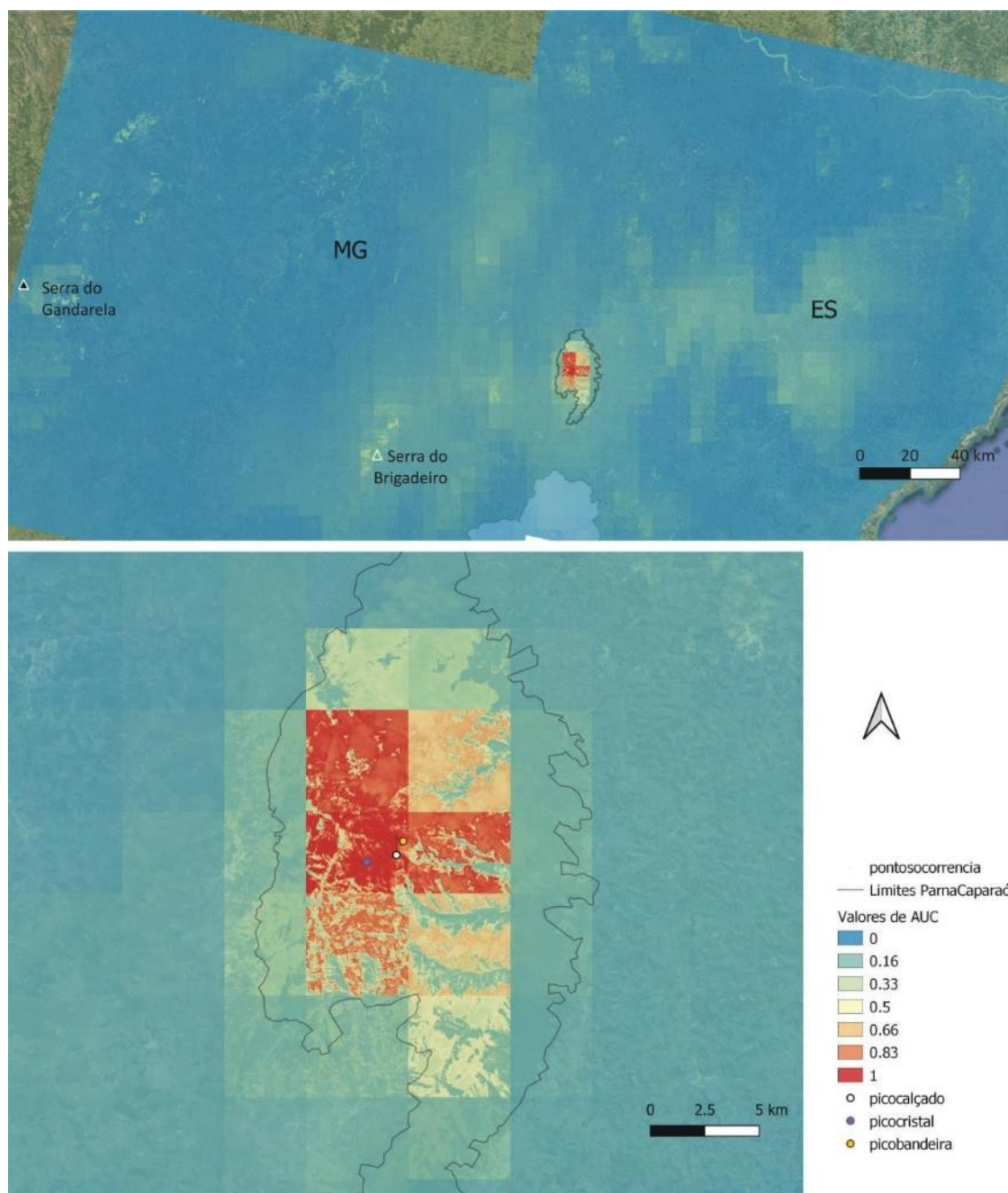


**Fig. 4** **A-** Montagem de indivíduo de *Bombus brasiliensis* em flor de *C. lutzii* cortada longitudinalmente, demonstrando a interação entre o polinizador e a flor. O inseto, ligeiramente maior do que a flor, força a entrada na cavidade da flor, passando a glossa entre a trabécula e a coluna; **B-** *Bombus brasiliensis* visitando inflorescência de Asteraceae junto à população de *C. lutzii*



**Fig. 5** Flores polinizadas de *C. lutzii* em microscopia de epifluorescência, utilizando filtro UV (exceto em **B**); **A**- Polinário aderido ao estigma, mostrando grãos de pólen germinados e tubos polínicos em desenvolvimento (autopolinização, 3 dias após polinização-DAP); **B**- Mesmo de **A**, sob filtro WG evidenciando os grãos de pólen e o polinário; **C**- Feixe de tubos polínicos dividindo-se em três feixes ao penetrar na porção distal do ovário (polinização cruzada 7 DAP); **D**- Feixe de tubos polínicos crescendo ao longo do ovário, apresentando

morfologia estreita e regular, com paredes finas e plugs de calose normais em intervalos mais ou menos regulares (polinização cruzada 7 DAP); **E**- Tubo polínico com desenvolvimento normal e plug de calose em destaque (seta) (polinização cruzada 7 DAP); **F**- Detalhe mostrando óvulos completamente desenvolvidos com tubos polínicos na região; **G**- Óvulos fecundados, evidenciando penetração do tubo polínico na micrópila (seta) (autopolinização 11 DAP)



**Fig. 6** Adequabilidade modelada por SVM para *C. lutzii*, áreas de maior adequabilidade (em vermelho) se concentram dentro do território do Parque Nacional do Caparaó (limites do Parque representado por uma linha preta contínua) nas áreas do entorno dos picos de maior altitude da unidade de conservação (Pico da Bandeira, Pico do Cristal e Pico do Calçado, Pedra Roxa, Pico do Cruz do Negro). Áreas fora dos limites do Parque em azul com valores de adequabilidade próximos ao zero

## 4 DISCUSSÃO

### Biologia floral

A comprovação da melitofilia em *Cotylobium lutzii*, através da polinização por *Bombus brasiliensis*, o posicionamento filogenético do gênero e a difusão desta síndrome de polinização em todos os demais clados de Spiranthinae indicam que esta é uma condição ancestral na subtribo (Borba et al. 2014; Salazar et al. 2018). Desta forma, todas as demais síndromes de polinização, notadamente a ornitofilia (Singer & Sazima 2000; Salazar et al. 2011) e psicofilia (e.g., Singer 2002; Pansarin & Ferreira 2015), são derivadas e surgiram independentemente várias vezes no grupo, especialmente a polinização por beija-flores (Salazar et al. 2011, 2018). Apesar de podermos definirmos com razoável grau de certeza a ancestralidade da melitofilia em Spiranthinae, é difícil determinarmos se esta é uma simpliomorfia ou sinapomorfia na subtribo, dado ao muito pouco conhecimento (e o pouco que pode ser inferido) sobre a biologia floral das Cranichidinae e Discyphinae, linhagem que constitui o grupo irmão das Spiranthinae, bem como de Manniellinae, ancestral do clado composto pelas três subtribos (Salazar et al. 2014; Chase et al. 2015)

Apesar de Borba et al. (2014) terem sugerido a possibilidade da polinização por abelhas em *C. lutzii*, esta comprovação não deixou de ser uma surpresa, e inclusive trabalhamos inicialmente com a hipótese de ornitofilia na espécie. Borba et al. (2014) destacaram a presença de alguns caracteres aparentemente mais associados à ornitofilia (e.g., formato tubular do perianto sem plataforma de pouso bem definida e rostelo longo e afilado) do que à melitofilia, e a coloração do perianto foi considerada uma ambígua, apesar de mais indicativa de ornitofilia nesta subtribo (como observado em *Svenkoeltzia congestiflora*; Salazar et al. 2011, 2018). Assim, a presença e as características do odor foram determinantes para sugestão de melitofilia feita por aqueles autores (Borba et al. 2014; E.L. Borba, comunicação pessoal). Essa dualidade de características poderia ser considerada como uma possível pré-adaptação (exaptação) que permitiria a adaptação a novos tipos de polinizadores, e pode ser interpretada como um reflexo da labilidade das síndromes de polinização na subtribo, ajudando a explicar a aparente tendência evolutiva da mudança da melitofilia para outros grupos de polinizadores, em especial a ornitofilia.

O remanescente longo e afilado do rostelo presente em *C. lutzii* (veja Fig. 1J em Borba et al. 2014) foi utilizado como característica morfológica importante na delimitação de grupos em Spiranthinae, tais como o gênero anteriormente polifilético *Stenorrhynchos* s.l., que

agrupou várias espécies com características morfológicas ornitófilas (Salazar et al. 2018). Esta característica também é observada em outros gêneros ornitófilos da subtribo, tais como *Dichromanthus*, *Svenkoeltzia* e *Coccineorchis* (Salazar et al. 2011). Talvez por isto tenha ocorrido uma associação desta característica morfológica do rostelo com a polinização por aves (Salazar et al. 2011), que pode ser na verdade apenas uma correlação indireta, estando ela mais associada ao local de deposição do polinário em polinizadores de maior tamanho (bicos de beija-flores e cabeça de grandes espécies de *Bombus* x abelhas pequenas/médias e lepidópteras). Catling (1983) notou diferenças no viscidio de espécies de *Spiranthes* polinizadas por *Bombus*, que são comparativamente mais longos e rígidos do que nas espécies polinizadas por abelhas menores (Halictidae). Em *Pelexia oestrifera*, espécie de Spiranthinae polinizada por *Bombus atratus*, espécie pouco menor do que *B. brasiliensis*, gênero de Spiranthinae que possui com morfologia bastante distinta do rostelo, o polinário é depositado nas partes bucais do polinizador (Singer & Sazima 1999), em contraste com a deposição no rostro da abelha em *C. lutzii*.

A convergência de caracteres florais específicos de vários clados distintos para a polinização por grupos de polinizadores específicos em Spiranthinae parece ser adaptativa e assimétrica, porém não podemos concluir de forma leviana que todas essas transições são decorrentes da seleção adaptativa direta a um novo polinizador, e cada caso deve ser avaliado de forma independente para considerar o papel de outros fatores evolutivos, como a deriva genética e efeitos pleiotrópicos dessas transições em cada caso (Rausher 2008). Apesar da grande convergência dessas adaptações em vários clados distintos ser uma evidência robusta de que essas transições são, pelo menos em sua maioria, guiadas por seleção adaptativa a um novo polinizador, em especial a ornitofilia, e é uma tendência evolutiva em Spiranthinae assim como já foi relatado para diversos outros grupos, em várias famílias de angiospermas (Rausher 2008).

Essas mudanças nos caracteres florais em Spiranthinae parecem ser simples de ocorrer em um contexto evolutivo, e ao que tudo indica pequenas modificações em alguns caracteres florais específicos como a morfologia do rostelo, a emissão ou não de fragrâncias, o volume e a concentração do néctar, o horário da antese e o tamanho das estruturas florais, juntamente com a transição na coloração da corola, promovem essas mudanças de polinizadores e provavelmente estão relacionadas a simples mudanças em poucos genes. Mas, são necessários estudos que demonstrem os passos moleculares dessas mudanças de caracteres (Thomson & Wilson 2008). Isto permitiria entender se esse conjunto de mudanças seguem uma mesma sequência específica dentro de cada linhagem e entre as diferentes

linhagens, e quais caracteres são os primeiros a modificar guiando a evolução na mudança das síndromes de polinização. Assim como determinar se as mudanças de síndrome seguem os mesmos passos ou se cada caso tem uma sequência de mudança específica com diferentes caminhos levando a um mesmo resultado (conversão para uma mesma síndrome) (Thomson & Wilson 2008).

Essas mudanças de síndromes parecem seguir um padrão unidirecional em *Spiranthinae*, sendo raríssimos os casos da reversão de ornitofilia ou psicofilia/fanelofilia para melitofilia dentro da subtribo, como observado em *Dichromanthus michuacanus* (Salazar et al. 2011, 2018). Porém, é necessário um maior entendimento dos processos que controlam essas transições a nível molecular, como mutações e rotas metabólicas, que indiquem se a reversibilidade é um processo mais complexo, que dependa de mais passos do que a transição melitofilia-ornitofilia o que explicaria essa tendência ou se ela se deve a fatores puramente ecológicos (Thomson & Wilson 2008). Mas, para tal, são necessários ainda muito mais estudos sobre a biologia da polinização em *Spiranthinae*, abordando gêneros e até mesmo clados ainda não estudados, para uma visão mais precisa e global da distribuição, frequência e variações das síndromes de polinização, juntamente com a comparação entre as estruturas florais relacionadas a polinização em espécies filogeneticamente próximas que possuem polinizadores diferentes. Aparentemente este é o caso do gênero *Skeptrosthachys*, dentro do qual pode ter havido retorno à condição melitófila dentro de um clado ornitófilo. Também sugerimos o estudo da biologia da polinização no clado *Lankesterela*\Eurystyles, que ainda é uma lacuna no conhecimento da subtribo.

A pequena área de ocorrência de *C. lutzii*, e conseqüentemente o relativamente baixo número de indivíduos, implica na necessidade de se estudar a diversidade genética da espécie, o grau de heterozigozidade e o fluxo gênico entre as possíveis populações (caso sejam encontradas novas populações, como indicado pela existência potencial dessas pelos nossos modelos).

De acordo com o que tem sido observado predominantemente em *Spiranthinae*, os resultados *C. lutzii* corroboram com a hipótese de que a autocompatibilidade é a condição ancestral na subtribo, ocorrendo a mudança desse padrão em alguns clados derivados com a presença de autoincompatibilidade e agamospermia (Catling 1982, 1987; Catling & Catling 1991; Salazar 2003; Salazar et al. 2018). A autogamia (autopolinização automática) em *Spiranthinae* ocorre em alguns clados mais derivados e foi associada a diferentes graus de estreitamento rostelar. Nesses casos, a secreção estigmática contacta passivamente as

polínias.

Apesar do baixo número de visitas observadas em *C. lutzii*, condição que é geralmente associada ao engodo do polinizador, ou seja, flores com características melitófilas que não possuem néctar e mimetizam características gerais de flores polinizadas por abelhas (Ackerman 1986), as flores de *C. lutzii* apresentam néctar em quantidade razoável. Neste caso, o baixo número de visitas pode ser explicado por *C. lutzii* ocorrer juntamente com diversas espécies de outras famílias (principalmente Asteraceae) que florescem em sincronia com *C. lutzii* e que parecem ser mais atrativas ao seu polinizador, provavelmente oferecendo melhores recursos e possuírem maiores densidades populacionais na área de estudo. Também devemos considerar os fatores sazonais e compreender que as taxas de visita podem variar de um ano para o outro, fato que só pode ser averiguado com observações em uma maior escala temporal, comparando as taxas de visitas em diferentes anos e diferentes populações. Além disto, o fato de a população estudada estar adjacente à trilha que leva diariamente diversos turistas ao Pico da Bandeira pode ser um sinal de alerta, como previamente destacado por Borba et al. (2014), especialmente devido à aparente especificidade de polinizador apresentada por *C. lutzii*. Esta especificidade é unidirecional, com a abelha utilizando recursos de várias outras plantas e parece não depender de *C. lutzii* para sua manutenção ou sobrevivência. A necessidade de um vetor para a polinização, juntamente com a tendência comportamental de *B. brasiliensis* de visitar apenas uma flor por inflorescência em *C. lutzii*, parece contribuir para aumentar a taxa de polinizações cruzadas, mas pode acarretar baixo sucesso reprodutivo.

### **Biogeografia e conservação**

Quando se fala de conservação, *Cotylolabium lutzii* claramente representa uma situação especial por diversos fatores: quase nada se conhece sobre a fisiologia e ecologia dessa espécie, com os trabalhos anteriores se limitando ao conhecimento de sua morfologia, taxonomia e posicionamento filogenético (Garay 1982; Borba et al. 2014), podendo-se considerar esse trabalho como os primeiros passos no entendimento das interações ecológicas dessa espécie e conhecimento mais refinado da sua distribuição. A espécie claramente possui uma distribuição espacial altamente restrita, limitada a algumas áreas de alta altitude dentro do Parque Nacional do Caparaó. Com o conhecimento atual, não podemos inferir quantas populações dessa espécie podem ser encontradas dentro da UC e qual a quantidade de indivíduos dentro dessas populações. Pouco se pode inferir também sobre a interação entre

as populações, se possuem fluxo gênico ou estão geneticamente isoladas, se elas são geneticamente diversas ou homogêneas. Na realidade, em uma visão mais conservadora, não podemos nem inferir se a espécie está dividida em populações ou se o seu padrão de ocorrência representa um contínuo com grupos de indivíduos em menor densidade conectando os pontos de maior densidade de indivíduos que representariam as condições ótimas dos requisitos fisiológicos da espécie. Nosso modelo tem o papel de guiar novas coletas de uma maneira mais embasada gerando um conhecimento preciso da distribuição e juntamente de ferramentas moleculares compreender a sua dinâmica populacional.

A sua distribuição altamente restrita, apenas em locais de altitude elevada (< 2.400m), além do padrão descontínuo desses ambientes como “ilhas de altitude”, demonstra a importância da conservação dessa espécie bem como o seu alto risco de extinção. Além disso, seu posicionamento filogenético peculiar dentro de *Spiranthinae* é um importante fator a ser considerado, uma vez que ela é a única representante de uma linhagem relictual dessa subtribo, possuindo uma maior distância filogenética das outras linhagens, o que reflete na conservação de fatores genéticos e morfológicos relictuais inexistentes no restante da subtribo que podem facilmente desaparecer devido ao seu potencial de extinção. Nas próximas décadas o impacto da mudança climática antropogênica sobre a perda de biodiversidade pode superar o causado pela mudança no uso da terra em algumas regiões, o que pode afetar também essa espécie. Mudanças na fenologia, abundância populacional, distribuição geográfica de espécies e comunidades, que são as respostas bióticas mais prováveis às mudanças ambientais, têm sido relatadas com bastante frequência (Pounds et al. 1999; McCarty 2001; Walther 2003; Walther et al. 2002; Wilson et al. 2005; Franco et al. 2006; Parmesan 2006; Thomas et al. 2006)

Nosso modelo de distribuição sugere outras áreas de potencial ocorrência para *C. lutzii*. Entretanto, a espécie possui a maior porcentagem dos seus indivíduos já amostrados em uma das trilhas de maior movimentação do Parque, onde existe grandes chances de pisoteio dos seus indivíduos pelos visitantes e compactação do solo. O estudo aponta outros pontos de ocorrência em áreas de menor impacto antrópico (veja Fig. 6), como o Pico do Cristal, que é de acesso mais difícil e recebe menos visitas, e que teoricamente serviria como um refúgio permitindo a manutenção da população. Além disso, a espécie parece não atrair coletores ilegais, diferentemente de outras espécies de *Orchidaceae*. Uma vez que seus indivíduos são pouco visíveis por considerável parte do ano por possuir hábito críptico, descartando suas partes aéreas fora do seu período reprodutivo, acreditamos que essa

característica lhe garante uma maior proteção. No entanto, não mensuramos o efeito do pisoteio do substrato em que se encontram enterradas as partes subterrâneas de seus indivíduos.

Além disso a espécie pode apresentar dificuldades de conservação ex-situ, devido à dependência de fatores muito específicos, como elevada altitude, o que destaca ainda mais a necessidade de sua preservação e do conhecimento mais preciso de suas áreas de ocorrência. É importante entender o efeito de mudanças climáticas em espécies montanas de curta distribuição e se faz necessária a projeção da sua distribuição para possíveis cenários futuros. Se fazem importantes novas incursões de validação do modelo e refinamento do conhecimento da distribuição de *C. lutzii*. A modelagem de distribuição preditiva é um importante mecanismo de auxílio, especialmente na ausência de uma quantidade maior de dados sobre a espécie ou na urgência para a tomada de decisões, mas deve ser utilizada como um meio e não um fim em si. O propósito deve ser mais focado na aquisição de mais informação sobre a ocorrência da espécie para que outras técnicas mais robustas também possam ser aplicadas (como o conhecimento do pool gênico e fluxo genético entre populações). A partir dos resultados do nosso modelo sugerimos que novas coletas sejam feitas em áreas cuja espécie ainda não foi encontrada dentro da UC, focando os esforços nas áreas acima de 2.400m e nos entornos do Pico Cruz do Negro, Pedra Roxa, Pico do Tesouro e Pico do Tesourinho com o recolhimento de material genético de indivíduos encontrados nessas novas áreas.

Os modelos são capazes de projetar simulações da distribuição das espécies no espaço geográfico, mas não oferecem uma descrição do nicho das espécies, pois, embora haja disponibilidade de dados relacionados com condições ambientais, os dados sobre interações ainda são escassos ou de difícil interpretação. Como resultado, a maioria dos exemplos na literatura tem utilizado apenas as variáveis abióticas em suas análises e, assim, a modelagem deve ser considerada como modelagem de distribuição e não de nicho (Araújo & Guisan 2006; Jiménez-Valverde et al. 2008; Phillips 2008; Elith & Leathwick 2009). Em duas revisões sobre modelagem preditiva de distribuição de espécies (Elith & Leathwick 2009; Soberón & Nakamura 2009), os autores sugeriram que entre os desafios ainda existentes para a modelagem está a inclusão de interações bióticas em seu processo. Levando esses fatos em consideração, acreditamos que seria de grande importância adicionar interações ecológicas em análises futuras de *C. lutzii* a fim de se refinar o modelo e gerar predições mais precisas para cenários futuros. Como *C. lutzii* tem registro de apenas uma espécie (*Bombus brasiliensis*) funcionando como sua polinizadora, a distribuição do polinizador como

parâmetro preditivo pode ser útil para novos modelos mais precisos para diferentes cenários futuros.

Respostas individualistas restringidas pela fisiologia e habilidades de dispersão podem interromper as interações biológicas promovendo rearranjos bióticos e, eventualmente, extinções. Espera-se que as espécies endêmicas de pequenas áreas, especialmente em altas latitudes e altitudes, sejam mais sensíveis às mudanças climáticas e sejam as primeiras a se extinguir (Parmesan 2006; Schwartz et al. 2006). Estratégias de conservação particularmente em áreas montanhosas tropicais precisam considerar a representação das espécies e questões ecológicas para antecipar cenários futuros em escalas locais e regionais para garantir agora a eficácia a longo prazo das áreas protegidas. Apesar das limitações e incertezas, os modelos produzidos podem ser projeções úteis para compreender o futuro dos campos de altitude.

As cadeias de montanhas tropicais são reconhecidas como grandes centros de endemismo e importantes refúgios para espécies sob as mudanças climáticas (Klorvuttimontara et al. 2011). Espécies com baixa capacidade de dispersão restritas a áreas estreitas em regiões anteriormente estáveis podem ser seriamente ameaçadas por mudanças climáticas rápidas (Sandel et al. 2011), o que pode ocorrer com *C. lutzii*. Disjunções representam uma barreira forte que provavelmente impede a maioria das espécies endêmicas de migrar entre as duas áreas (Bitencourt & Rapini 2013; Harley 1988; Rapini et al. 2008), e o ambiente onde *C. lutzii* ocorre pode ser visto como um sistema semelhante a um arquipélago composto por cumes de montanhas cercados por planícies. Esta situação geográfica geral apresenta um alto risco de extinção para a biodiversidade única da área de endemismo dos Campos de Altitude da Serra da Mantiqueira que parecem estar seriamente ameaçadas quando se leva em consideração os três componentes de vulnerabilidade apontados por Dawson et al. (2011): as espécies serão expostas a uma grande redução de habitat; elas serão sensíveis a esta perda devido à alta especialização; e não serão capazes de se adaptar ou migrar rapidamente, uma vez que a maioria das linhagens são caracterizadas por conservadorismo filogenético e baixa capacidade de dispersão. Para alguns grupos, esse ambiente parece representar um museu de plantas (Bitencourt & Rapini 2013) e, para alguns grupos de plantas, abriga uma diversidade filogenética altamente exclusiva.

## REFERÊNCIAS

- Ackerman JD (1986) Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* 1:108-113
- Allouche O, Tsoar A, Kadmon R (2006) Assessing the accuracy of species distribution models: prevalence, kappa and true skill statistic (TSS). *J Appl Ecol* 43:1223-1232
- Araújo MB, Guisan A (2006) Five (or so) challenges for species distribution modelling. *J Biogeogr* 33:1677-1688
- Araújo MB, Nogues-Bravo D, Reginster I, Rounsevell M, Whittaker RJ (2008) Exposure of European biodiversity to changes in human-induced pressures. *Environ Sci Policy* 11:38-45
- Araújo MB, Thuiller W, Pearson RG (2006) Climate warming and the decline of amphibians and reptiles in Europe. *J Biogeogr* 33:1712-1728
- Araújo MB, Williams P (2000) Selecting areas for species persistence using occurrence data. *Biol Conserv* 96:331-345
- Bean WT, Stafford R., Brashares JS (2011) The effects of small sample size and sample bias on threshold selection and accuracy assessment of species distribution models. *Ecography* 34:1-9
- Bitencourt C, Rapini A (2013) Centres of endemism in the Espinhaço Range, identifying cradles and museums of Asclepiadoideae (Apocynaceae). *Syst Biodiv* 11:525-536
- Borba EL, Shepherd GJ, Semir J (1999) Reproductive systems and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occurring in Brazilian 'campo rupestre' vegetation. *Pl Syst Evol* 217:205-214
- Borba EL, Salazar GA, Mazzoni-Viveiros S, Batista JAN (2014) Phylogenetic position and floral morphology of the Brazilian endemic, monospecific genus *Cotylolabium*: a sister group for the remaining Spiranthinae (Orchidaceae). *Bot J Linn Soc* 175:29-46
- Borba EL, Semir J, Shepherd GJ (2001) Self-incompability, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Ann Bot* 88:89-99
- Boser BE, Guyon IM, Vapnik VN (1992) A Training Algorithm for Optimal Margin Classifiers. In: Haussler D (ed) 5th Annual ACM Workshop on COLT. ACM Press, Pittsburg
- Breiman L (2003) Setting up, using, and understanding random forests V4.0. 2003. Disponível em: <[https://www.stat.berkeley.edu/~breiman/Using\\_random\\_forests\\_v4.0.pdf](https://www.stat.berkeley.edu/~breiman/Using_random_forests_v4.0.pdf)>.

- Brooks TM, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GAB, Rylands AB, Konstant WR, Flick P, Pilgrim J, Oldfield S, Magin G (2002) Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conserv Biol* 16:909-923
- Catling PM (1982) Breeding systems of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae). *Can J Bot* 60:3017-3039
- Catling PM (1983) Pollination of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae). *Can J Bot* 61:1080-1093
- Catling PM (1987) Notes on the breeding systems of *Sacoila lanceolata* (Aublet) Garay (Orchidaceae). *Ann Missouri Bot Gard* 74:58-68
- Catling PM, Catling VR (1991) A synopsis of breeding systems and pollination in North American orchids. *Lindleyana* 6:187-210
- Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar G, van den Berg C, Schuiteman A (2015) An updated classification of Orchidaceae. *Bot J Linn Soc* 177:151-174
- Costa GC., Nogueira C., Machado R.B, Colli GR (2010) Sampling bias and the use of ecological niche modeling in conservation planning: a field evaluation in a biodiversity hotspot. *Biodivers Conserv* 19:883-899
- Dawson TP, Jackson ST, House JI, Prentice IC, Mace GM (2011) Beyond predictions, biodiversity conservation in a changing climate. *Science* 332:53-58
- Dobson AJ, Barnett A (2008) An introduction to generalized linear models, 4th edn. CRC press, New York
- Dressler RL (1993) Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland
- Elith J, Leathwick JR (2009) Species distribution models: ecological explanation and prediction across space and time. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 40:677-97
- Engler R, Guisan A, Rechsteiner L (2004) An improved approach for predicting the distribution of rare and endangered species from occurrence and pseudo-absence data. *J Appl Ecol* 41:263-274
- Faith DP (1992) Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol Conserv* 61:1-10
- Faith DP (2002) Quantifying biodiversity: a phylogenetic perspective. *Conserv Biol* 16:248-252
- Feeley KJ, Silman MR (2011) The data void in modeling current and future distributions of tropical species. *Glob Chan Biol* 17:626-630

- Fielding AH, Bell JF (1997) A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. *Environ Conserv* 24:38-49
- Flora do Brasil (2020) Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> (acesso em 16-II-2021)
- Forest F, Grenyer R, Rouget M, Davies TJ, Cowling RM, Faith DP, Balmford A, Manning JC, Procheş S, Van Der Bank M, Reeves G, Hedderson TAJ, Savolainen V (2007) Preserving the evolutionary potential of floras in biodiversity hotspots. *Nature* 445(7129):757-60
- Franco AMA et al (2006) Impacts of climate warming and habitat loss on extinctions at species' low-latitude range boundaries. *Glob Chan Biol* 12:1545-1553
- Gaiarsa MP (2010) Definindo prioridades de conservação em grupos monofiléticos: um estudo de caso com uma linhagem de serpentes neotropicais. MSc Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo
- Garay LA. (1982) A generic revision of Spirantinae. *Bot Mus Leaf* 28:277-425
- Guisan A, Broennimann O, Engler R., Vust M., Yoccoz NG, Lehmann A, Zimmermann NE (2006) Using niche-based models to improve the sampling of rare species. *Conserv Biol* 20:501-511
- Guisan A, Edwards TC, Hastie T (2002) Generalized linear and generalized additive models in studies of species distributions: setting the scene. *Ecol Model* 157:89-100
- Guisan A, Thuiller W (2005) Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecol Lett* 8:993-1009
- Harley RM (1988) Evolution and distribution of Eriopneuste (Labiatae), and its relatives, in Brazil. In: Vanzolini PE, Heyer WR (eds), *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns*. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, pp 71-120
- Hastie T, Tibshirani R (1986) Generalized additive models. *Stat Sci* 1:297-318
- Hastie T, Tibshirani R, Buja A (1994) Flexible discriminant analysis by optimal scoring. *J Amer Stat Assoc* 89:1255-1270
- Heard SB, Mooers AØ (2000) Phylogenetically patterned speciation rates and extinction risks change the loss of evolutionary history during extinctions. *Proc Roy Soc London Ser B Biol Sci* 267:613-620
- Hernandez PA., Graham CH., Master LL, Albert DL (2006) The effect of sample size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography* 29:773-785

- Hortal, J, Jiménez-Valverde A., Gómez JF, Lobo JM., Baselga A (2008) Historical bias in biodiversity inventories affects the observed environmental niche of the species. *Oikos* 117:847-858
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (2019) Natureza Local. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/parnacaparao/naturezalocal.html>. Acesso em 01 de setembro, 2019
- IUCN (2001) IUCN Red List Categories and Criteria. Version 3.1. IUCN Species Survival Commission, Gland
- Jiménez-Valverde A, Lobo JM, Hortal J (2008) Not as good as they seem: the importance of concepts in species distribution modelling. *Divers Distrib* 14:885-890
- Kadmon R., Farber O, Danin A (2003) A systematic analysis of factors affecting the performance of climatic envelope models. *Ecol Appl* 13:853-867
- Kadmon R., Farber O, Danin A (2004) Effect of roadside bias on the accuracy of predictive maps produced by bioclimatic models. *Ecol Appl* 14:401-413
- Klorvuttimontara S, McClean CJ, Hill JK (2011) Evaluating the effectiveness of protected areas for conserving tropical forest butterflies of Thailand. *Biol Conserv* 144:2534-2540
- KÖPPEN W (1948) *Climatologia con un estudio de los climas de la Tierra* (Transl. Peres PRH). Fondo de Cultura Economica, Mexico
- Leoni LS, Souza VC (1999) Espécies endêmicas ocorrentes no Parque Nacional do Caparaó-Minas Gerais. *Pabstia* 10:1-5
- Mace GM, Gittleman JL, Purvis A (2003) Preserving the tree of life. *Science* 300(5626):1707-1709
- Madeira JA, Ribeiro KT, Oliveira MJR, Nascimento JS, Paiva CL (2008) Distribuição espacial do esforço de pesquisa biológica na Serra do Cipó, Minas Gerais: subsídios ao manejo das unidades de conservação da região. *Megadiversidade* 4:233-247
- Martin FW (1959) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technol* 34:125-128
- Martinelli G (2007) Mountain biodiversity in Brazil. *Rev Bras Bot* 30:587-597
- May RM (1990) Taxonomy as destiny. *Nature* 347:129-30
- McCarty JP (2001) Ecological consequences of recent climate change. *Conserv Biol* 15:320-331
- Oberhauser K, Peterson AT (2003) Modeling current and future potential wintering distributions of eastern North American monarch butterflies. *Proc Natl Acad Sci* 100:14063-14068

- Oliveira U, Soares-Filho B, Leitao R, Rodrigues H (2019) BioDinamica: a toolkit for analyses of biodiversity and biogeography on the Dinamica-EGO modelling platform PEERJ 7:E7213
- Owens IP, Bennett PM (2000) Quantifying biodiversity: a phenotypic perspective. *Conserv Biol* 14:1014-1022
- Pansarin ER, Ferreira AWC (2015) Butterfly pollination in *Pteroglossa* (Orchidaceae, Orchidoideae): a comparative study on the reproductive biology of two species of a Neotropical genus of Spiranthinae. *J Pl Res* 128:459-468
- Parmesan C (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Ann Rev Ecol Evol Syst* 37:637-669
- Pearson RG, Thuiller W, Araújo MB, Martinez-Meyer E, Brotons L, McClean C, Miles L, Segurado P, Dawson TC, Lees DC (2006) Model-based uncertainty in species range prediction. *J Biogeogr* 33:1704-1711
- Peterson AT, Ortega-Huerta MA, Bartley J, Sánchez-Cordero V, Soberón J, Buddemeier RH, Stockwell DRB (2002) Future projections for Mexican faunas under global climate change scenarios. *Nature* 416:626-629
- Peterson AT, Papes M, Reynolds MG, Perry ND, Hanson B, Regnery RL, Hutson CL, Muizniek B, Damon IK, Carroll DS (2006) Native-range ecology and invasive potential of *Cricetomys* in North America. *J Mammal* 87:427-432
- Phillips SJ (2008) Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. *Ecography* 31:161-175
- Phillips SJ, Anderson R, Schapire R (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecol Model* 190:231-259
- Pimm S, Jones H, Diamond J (1988) On the risk of extinction. *Amer Naturalist* 132:757-785
- Pounds J, Fogden M, Campbell J (1999) Biological response to climate change on a tropical mountain. *Nature* 398:611-615
- Proctor M, Yeo P, Lack A (1996) *The natural history of pollination*. Harper Collins Publishers, London
- Purvis A, Hector A (2000) Getting the measure of biodiversity. *Nature* 405(6783):212-9
- Rapini A, Ribeiro PL, Lambert S, Pirani JR (2008) A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4:16-24
- Rausher MD (2008) Evolutionary transitions in floral color. *Int J Plant Sci* 169:7-21
- Redding DW, DeWolff CV, Mooers AØ (2010) Evolutionary distinctiveness, threat status, and ecological oddity in primates. *Conserv Biol* 24:1052-1058

- Salazar GA (2003) Spiranthinae. In: Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W.; Rasmussen, F.N. (Eds.). *Genera Orchidacearum*, Vol. 3: Orchidoideae, Part 2, Vanilloideae. Oxford University Press, Oxford, pp 164-278
- Salazar GA, Chase MW, Soto-Arenas MA, Ingrouille M (2003) Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear dna sequences. *Amer J Bot* 90:777-795
- Salazar GA, Cabrera LI, Madriñán S, Chase MW (2009) Phylogenetic relationships of Cranichidinae and Prescottiinae (Orchidaceae, Cranichideae) inferred from plastid and nuclear DNA sequences. *Ann Bot* 104:403-416
- Salazar GA., Cabrera, LI, Figueroa C (2011) Molecular phylogenetics, floral convergence and systematics of *Dichromanthus* and *Stenorrhynchos* (Orchidaceae, Spiranthinae). *Bot J Linn Soc* 167:1-18
- Salazar GA, van den Berg C, Popovkin A (2014) Phylogenetic relationships of *Discyphus scopulariae* (Orchidaceae, Cranichideae) inferred from plastid and nuclear DNA sequences: evidence supporting recognition of a new subtribe, Discyphinae. *Phytotaxa* 173:127-139
- Salazar, GA, Batista, J A N, Cabrera, LI, Van Den Berg C, Whitten M, Smidt EC, Buzatto CR, Singer RB, Gerlach G, Jiménez-Machorro R, Radins JA, Insaurralde IS, Guimarães LRS, De Barros F, Tobar F, Linares JL, Mújica E, Dressler RL, Blanco MA, Chase MW (2018) Phylogenetic systematics of subtribe Spiranthinae (Orchidaceae: Orchidoideae: Cranichideae) based on nuclear and plastid DNA sequences of a nearly complete generic sample. *Bot J Linn Soc* 186:273-303
- Sandel B, Arge L, Dalsgaard B, Davies RG, Gaston KJ, Sutherland WJ, Svenning JC (2011) The influence of Late Quaternary climate-change velocity on species endemism. *Science* 334:660-664
- Sanguinetti A , Singer RB (2014) Invasive bees promote high reproductive success in Andean orchids. *Biol Conserv* 175:10-20
- Schwartz MW, Iverson LR, Prasad AM, Matthews SN, O'Connor RJ (2006) Predicting extinctions as a result of climate change. *Ecology* 87:1611-1615
- Segurado P, Araújo MB (2004) An evaluation of methods for modelling species distributions. *J Biogeogr* 31:1555-1568
- Singer RB (2002) The pollination biology of *Sauroglossum elatum* Lindl. (Orchidaceae: Spiranthinae): moth-pollination and protandry in neotropical Spiranthinae. *Bot J Linn Soc* 139:9-16
- Singer RB (2003) Orchid pollination: recent developments from Brazil. *Lankesteriana* 7:111-114

- Singer RB, Cocucci AA (1999) Pollination mechanisms in southern Brazilian orchids which are mainly or exclusively pollinated by halictid bees. *Pl Syst Evol* 217:101-117
- Singer RB, Sazima M (1999) The pollination mechanism in the 'Pelexia alliance' (Orchidaceae: Spiranthinae) *Bot J Linn Soc* 131:249-262
- Singer RB, Sazima M (2000) The pollination of *Stenorrhynchos lanceolatus* (Aublet) L. C. Rich. (Orchidaceae: Spiranthinae) by Hummingbirds in southeastern Brazil. *Pl Syst Evol* 223:221-227
- Siqueira MF, Peterson AT (2003) Consequences of global climate change for geographic distributions of cerrado tree species. *Biota Neotropica* 3:1-14
- Siqueira MF, Durigan G, De Marco Jr P, Peterson AT (2009) Something from nothing: using landscape similarity and ecological niche modeling to find rare plant species. *J Nat Conserv* 17:25-32
- Soberón J, Nakamura M (2009) Niches and distributional areas: concepts, methods, and assumption. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19644-19650
- Steel M, Mimoto A, Mooers AØ (2007) Hedging our bets: the expected contribution of species to future phylogenetic diversity. *Evol Bioinform* 2007:237-244
- Stockwell DRB, Peterson AT (2002) Effects of sample size on accuracy of species distribution models. *Ecol Modell* 148:1-13.
- Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, Collingham YC, Erasmus BFN, Siqueira MF, Grainger A, Hannah L, Hughes L, Huntley B, van Jaarsveld AS, Midgley GF, Miles L, Ortega-Huerta MA, Peterson AT, Phillips OL, Williams SE (2004) Extinction risk from climate change. *Nature* 427:145-148
- Thomas CD, Franco AMA, Hill JK (2006) Range retractions and extinction in the face of climate warming. *Trends Ecol Evol* 21:415-416
- Thomson JD, Wilson P (2008) Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence, and directionality. *Int J Plant Sci* 169:23-28
- Thuiller W (2003) BIOMOD - Optimizing predictions of species distributions and projecting potential future shifts under global change. *Glob Change Biol* 9:1353-1362.
- Thuiller W (2004) Patterns and uncertainties of species' range shifts under climate change. *Glob Change Biol* 10:2020-2027
- Van der Pijl L, Dodson CH (1966) *Orchid flowers: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables
- Vane-Wright RI, Humphries CJ, Williams PH (1991) What to protect? - Systematics and the agony of choice. *Biol Conserv* 55:235-254

- Walther GR (2003) Plants in a warmer world. *Persp Plant Ecol Evol Syst* 6:169-185
- Walther GR et al (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416:389-395
- Wiemer AP, Moré M, Benitez-Vieyra S, Cocucci AA, Raguso RA, Sérsic AN (2009) A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cyclopogon elatus* (Orchidaceae). *Pl Biol* 11:506-514
- Wiens JA, Stralberg D, Jongsomjit D, Howell CA, Snyder MA (2009) Niches, models, and climate change: assessing the assumptions and uncertainties. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:19729-19736
- Wilson P, Castellanos MC, Wolfe AD, Thomson JD (2006) Shifts between bee-and-bird-pollination among penstemons. In: Waser NM, Ollerton J (eds) *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. University of Chicago Press, Chicago, pp 47-68
- Wilson RJ, Gutiérrez D, Gutiérrez J, Martínez D, Agudo R, Monserrat VJ (2005) Changes to the elevational limits and extent of species ranges associated with climate change. *Ecol Lett* 8:1138-1146
- Wisz MS, Hijmans RJ, Li J, Peterson AT, Graham CH, Guisan A, NCEAS (2008) Predicting species distributions working group. Effects of sample size on the performance of species distribution models. *Divers Distrib* 14:763-773