

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal

Jacqueline Gomes Rodrigues

**BIOSISTEMÁTICA EM ESPÉCIES DE *BULBOPHYLLUM* (THOUARS) SEÇÃO
MICRANTHAE BARB.RODR. (ORCHIDACEAE)**

Belo Horizonte
2023

Jacqueline Gomes Rodrigues

**BIOSSISTEMÁTICA EM ESPÉCIES DE BULBOPHYLLUM (THOUARS) SEÇÃO
MICRANTHAE BARB. RODR. (ORCHIDACEAE)**

Versão final

Tese 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 Doutor em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Morfologia, Sistemática e Diversidade Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba
Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Cunha Resende Moreira
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2023

043

Rodrigues, Jacqueline Gomes.

Biosistemática em espécies de *Bulbophyllum* (Thouars) seção *Micranthae* Barb.Rodr. (Orchidaceae) [manuscrito] / Jacqueline Gomes Rodrigues. – 2023.
128 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Leite Borba. Coorientadora: Profa. Dra. Luciana Cunha Resende Moreira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal.

1. Sistemática. 2. Filogenia. 3. Reprodução. 4. *Bulbophyllum*. 5. Orchidaceae. I. Borba, Eduardo Leite. II. Moreira, Luciana Cunha Resende. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 581



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEFESA DE TESE

JACQUELINE GOMES RODRIGUES

DATA: 27/02/2023 ENTRADA: 2018/1 MAT 2018663547 CPF: 081006376-01

TÍTULO DA TESE:

"BIOSSISTEMÁTICA DE ESPÉCIES DE *BULBOPHYLLUM* (THOUARS) SEÇÃO *MICRANTHAE* BARB. RODR. (ORCHIDACEAE)"

Comissão Examinadora

Dr. Eduardo Leite Borba (UFMG)

Dr. Cassio Van den Berg (Universidade Estadual de Feira de Santana)

Dra. Isabel Aparecida da Silva Bonatelli (Universidade Federal de São Paulo)

Dra. Maria Bernadete Lovato (UFMG), Dr. João Aguiar Nogueira Batista (UFMG)

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2023.

Assinaturas dos membros da comissão examinadora:

Assinatura do coordenador:



Documento assinado eletronicamente por **Isabel Aparecida da Silva Bonatelli**, **Usuária Externa**, em 27/02/2023, às 19:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Aguiar Nogueira Batista**, **Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 19:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Bernadete Lovato**, **Professora do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 19:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Leite Borba**, **Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2023, às 19:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cassio Van Den Berg**, **Usuário Externo**, em 27/02/2023, às 19:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Rafael Mesquita Neves**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 28/02/2023, às 09:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2069137** e o código CRC **42B4C7A7**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao prof. Eduardo Leite Borba, meu orientador, por ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo desses anos e, principalmente, por ter feito parte da minha formação acadêmica.

À minha coorientadora, profa. Luciana Cunha Resende Moreira, por aceitar a parceria neste trabalho, por todo ensinamento, pela paciência e amizade.

As colegas do Laboratório de Biossistemática, Mariana Duarte, Cecília Fiorini e Gabriela Cruz por toda ajuda na bancada, análise dos dados. Com toda a certeza, meu caminho foi mais leve após vocês já terem trilhado o caminho anteriormente.

A todos que puderam me acompanhar no campo, Cecília Fiorini, Fernanda, Alex, Eduardo Borba, Márcio, Douglas (Guardiões do Cerrado), Vera Lúcia, Renato, Iago e tantos guias, sem vocês esse trabalho não seria possível.

Ao Museu de História Natural e Jardim Botânico, por ter me permitido conciliar meu trabalho e esta etapa importante na minha vida profissional. Gostaria de agradecer imensamente à Alessandra e Flávia que aguentaram as pontas quando não pude me dedicar interamente nas minhas funções.

À minha família, meus pais Leosmar e Josué, minha irmã Josiane, por fazerem parte da minha vida, me acompanhando e apoiando sempre. Obrigada pelo apoio incondicional.

Aos meus amigos com quem compartilhei angústias, dúvidas e também bons momentos, obrigada pelo apoio e incentivo.

Aos professores participantes da banca examinadora pela disponibilidade e interesse em contribuir com este trabalho.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UFMG, pela infraestrutura e apoio no desenvolvimento da tese.

A todos que de alguma forma se envolveram com esse trabalho.

RESUMO

A delimitação de espécies sempre foi um grande desafio para os taxonomistas. Alguns grupos de espécies são particularmente complexos, especialmente aquelas com espécies vegetativamente uniformes, nos quais a separação é apenas possível por pequenas características florais que são de difícil reconhecimento em materiais de herbário. A biosistemática, área que utiliza dados de diversos campos, é particularmente importante em pesquisa taxonômica de complexos de espécies, como os encontrados no gênero *Bulbophyllum* (Orchidaceae). Neste estudo, utilizamos uma ampla amostragem com marcadores moleculares genômicos, morfometria e dados do sistema reprodutivo inter- e intra-específico para compreender a dinâmica evolutiva das populações que compõem *B. sect. Micranthae*. Análises filogenômicas forneceram melhor resolução para as relações inferidas entre as espécies indicadas como pertencente a *B. sect. Micranthae*. Nem todas as espécies descritas para a seção foram recuperadas como monofiléticas. Dentro do complexo de espécies *B. epiphytum/ B. rupicola* há duas linhagens genéticas distintas para cada uma das espécies, não correspondendo à circunscrição morfológica atual. Algumas espécies demonstram um elevado nível de estruturação, provavelmente resultante dos diferentes padrões de ocupação e isolamento genético nos campos rupestres. As análises multivariadas empregadas nos dados morfométricos florais e vegetativos mostraram um padrão de sobreposição em algumas espécies da seção, especialmente nas amostras do complexo *B. epiphytum/ B. rupicola* sugerindo especiação críptica nas linhagens recuperadas com dados moleculares. Apenas na análise de variáveis canônicas foi possível recuperar estas duas espécies com alto grau de precisão. A seção é majoritariamente auto-incompatível, o que é raro em orquídeas. Os mecanismos pré-zigóticos são os principais contribuintes para o isolamento das espécies, mas as barreiras são permeáveis à troca de genes principalmente em espécies intimamente relacionadas. A alta diversidade de fenótipos de crescimento do tubo polínico observado neste pequeno grupo de Orquídea, ainda, oferece novos *insights* sobre a diversidade de sítios de reação de auto-incompatibilidade.

Palavras-chave: Complexo de espécies. Filogenômica. Morfometria. Biologia reprodutiva. Campos rupestres. *Bulbophyllum*. Orchidaceae.

ABSTRACT

Species delimitation has always been a major challenge for taxonomists. Some groups of species are particularly complex, specially those with vegetatively uniform species, in which separation is only possible because of small floral characters that are difficult to discern in herbariums. Biosystematics, a research area that uses data from multiple fields, has been particularly important in taxonomic research of species complexes such as those found in the genus *Bulbophyllum* (Orchidaceae). In this study, we used genomic molecular markers, morphometry and inter- and intraspecific reproductive system data to understand the evolutionary dynamics of *B. sect. Micranthae* populations. Phylogenomic analyses provided better resolution for the relationships inferred among species within *B. sect. Micranthae*. Not all species within for the section are monophyletic. Within the *B. epiphytum/B. rupicola* species complex there are two different genetic clades, which do not correspond to the current morphological circumscription. Some species display high population structuring, probably due to different patterns of genetic isolation and distribution in campos rupestres. The multivariate analyzes performed using floral and vegetative morphometric data showed an overlapping pattern in some species of the section, particularly in specimens from *B. epiphytum/B. rupicola* complex, suggesting cryptic speciation in the lineages identified by molecular data. Only in the analysis of canonical variables it was possible to recover these two species with a high degree of accuracy. The group is mostly self-incompatible, which is rare in orchids. Pre-zygotic mechanisms contribute significantly to species isolation, but barriers to gene exchange are permeable, especially in closely related species. Furthermore, the great diversity of pollen tube growth phenotypes observed in this small group of orchids provides new insights into the diversity of self-incompatibility reaction sites.

Keywords: Species complex. Phylogenomics. Morphometry. Reproductive biology. Campos rupestres. *Bulbophyllum*. Orchidaceae.

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	9
CAPÍTULO 1	14
DIVERSIFICAÇÃO DE UM GRUPO DE ORQUÍDEAS NOS CAMPOS RUPESTRES: DELIMITAÇÃO DE LINHAGENS DE <i>BULBOPHYLLUM</i> SEÇÃO <i>MICRANTHAE</i> (ORCHIDACEAE)	
Resumo	15
1. Introdução	16
2. Materiais e Métodos	19
2.1 Amostragem	19
2.2 Extração, montagem de biblioteca e sequenciamento	20
2.3 Processamento dos dados genômicos	20
2.4 Relações filogenéticas e estrutura genética	22
3. Resultados	23
4. Discussão	25
4.1 Relações filogenéticas	26
4.2 Biogeografia	29
Referências	32
CAPÍTULO 2	52
ANÁLISE MORFOMÉTRICA EM <i>BUBOPHYLLUM</i> SECT. <i>MICRANTHAE</i> (ORCHIDACEAE)	
Resumo	53
1. Introdução	54
2. Materiais e Métodos	56
2.1 Amostragem	56
2.2 Caracteres morfológicos	57
2.3 Análises	57
3. Resultados	58
4. Discussão	61
Referências	68
CAPÍTULO 3 VARIATION IN SELF-INCOMPATIBILITY AND INTERSPECIFIC COMPATIBILITY IN A LINEAGE OF THE MOSTLY SELF-COMPATIBLE GENUS <i>BULBOPHYLLUM</i> (<i>B.</i> SECT. <i>MICRANTHAE</i> - ORCHIDACEAE)	
Abstract	96
Introduction	97
Materials and methods	99
Plant material	99

Reproductive system and inter-compatibility	100
Pollen tube morphology	100
Results	101
Floral biology and phenology	101
Reproductive system	101
Inter-compatibility	102
Pollen tube morphology	102
Discussion	104
References	109
CONSIDERAÇÕES FINAIS	123
Referências	125

INTRODUÇÃO GERAL

A espécie é a unidade básica da biologia. Serve de base para comunicação no meio científico. É o seu entendimento que possibilita avaliação de biodiversidade de uma determinada área, proposições de legislações, gerenciamento, educação ambiental, etc. Apesar do papel central que as espécies representam dentro da biologia, a sua definição ainda é muito debatida. Linnaeus (1753) utilizou o termo espécie como uma representação de uma categoria, como uma unidade de classificação, assim como gênero, família, classe, ordem, filo e reino. Esta categoria é facilmente compreensível, entretanto ela representa uma unidade biológica que, ao ser considerada real, suscitou vários conceitos ao longo do tempo na tentativa de definir as características essenciais que todos os membros das espécies possuíam (Mayden, 1997).

O conceito morfológico de espécies foi tradicionalmente utilizado na identificação de táxons. As espécies são classificadas, nesse método, por meio de reconhecimento de características diagnósticas constantes (Cronquist, 1978). Este método é bastante útil, sendo aplicável para espécies sexuais e assexuais e para organismos fósseis, sendo muito utilizado no ramo da botânica tradicional. Entretanto, o conceito não leva em consideração o processo evolutivo na formação da espécie. Dessa forma, espécies crípticas (morfológicamente indistinguíveis) são passíveis de serem ignoradas e organismos com fenótipos distintos, resultantes de diferenças ambientais onde se desenvolvem, podem ser considerados como espécies distintas (Cracraft, 1989; Aldhebiani, 2017). Além disso, alguns caracteres morfológicos são subjetivos, dependendo de uma interpretação de um especialista, dificultando as classificações (Stace, 1989).

O conceito biológico de espécie baseia-se nas populações naturais intercruzantes que são isoladas reprodutivamente de outros grupos de organismos (Mayr, 2000). Este conceito não leva em consideração o processo evolutivo para a formação e manutenção da espécie e é pouco prático na classificação dos organismos. Além disso, muitos grupos botânicos diferentes são frequentemente intercruzáveis (Rieseberg & Willis 2007; Soltis & Soltis 2009), o que dificulta a sua aplicação.

Com a disseminação da cladística, houve um aumento de propostas incluídas dentro do conceito filogenético de espécie, no qual as espécies podem ou não apresentar diferenças

fenotípicas reconhecíveis, mas são linhagens que compartilham um ancestral comum (Cracraft, 1989). Entretanto, raramente é possível reconstruir com certeza o caminho evolutivo de um organismo. O surgimento de novas tecnologias de sequenciamento de DNA (também conhecidas como *Next Generation Sequencing*; NGS) têm auxiliado na reconstrução das relações evolutivas entre espécies especialmente para organismos não-modelo, que não possuem genomas de referência disponíveis (Davey et al., 2011; Andrews et al., 2016).

De Queiroz (2007) define espécies como segmentos de linhagens de metapopulações evoluindo separadamente, isto é, com história evolutiva própria e os diferentes conceitos de espécies propostos referem-se, na verdade, a critérios para a delimitação de espécies. A biosistemática, também chamada de taxonomia experimental, utiliza a análise de dados provenientes de diversos campos, tais como genético, citológico, morfológico e ecológico, como fontes de evidências para delimitar espécies, auxiliando na tomada de decisões taxonômicas (Stace, 1989). A biosistemática tem sido uma ferramenta bastante útil em pesquisa taxonômica, particularmente importante em complexos de espécies, como os encontrados no gênero *Bulbophyllum*.

O gênero *Bulbophyllum* é um dos maiores gêneros da família Orchidaceae com cerca de 2200 espécies (Gravendeel et al., 2014). Possui uma distribuição Pantropical com centro de diversidade na Ásia, seguido da África e por último a região Neotropical (Gamish et al., 2019; Smidt et al., 2011). O gênero surgiu no mioceno com origem na Ásia-Pacífico com progressivas dispersões para Madagascar, África e região Neotropical (Gamish et al., 2019). Na região Neotropical houve apenas um evento de colonização, formando um grupo monofilético, com cerca de 70 espécies no qual são formalmente reconhecidas 6 seções monofiléticas (Smidt et al., 2011): *Bulbophyllum* seção *Xiphizusa* (Rchb.f.) Cogn., *Didactyle* (Lindl.) Cogn., *Napelli* Rchb.f., *Furvescens* E. C. Smidt, Borba & Van den Berg, *Bulbophyllaria* (Rchb.f.) Griseb. e *Micranthae* Barb. Rodr.

Bulbophyllum sect. *Micranthae* compreende 12 espécies (*B. adiamantinum* Brade, *B. chloroglossum* Rchb. f. & Warm; *B. epiphytum* Barb.Rodr.; *B. insectiferum* Barb.Rodr.; *B. macroceras* Barb.Rodr.; *B. mentosum* Barb.Rodr.; *B. micranthum* Barb.Rodr.; *B. mucronifolium* Rchb. f. & Warm; *B. pitengoensis* Campacci; *B. rupicola* Barb.Rodr.; *B. tricolor* Smith e Harris; *B. uhl-gabrielianum* Chiron e V.P. Castro). São caracterizadas por pseudobulbos unifoliados, piriforme a fusiforme com folhas aciculadas ou planas, com flores arrançadas de forma espiralada

com labelo trilobado com lobos laterais dentiformes (Smidt et al., 2011; Nunes et al., 2017). São distribuídas pelo Brasil e chegam até a Bolívia, ocorrendo como pequenas populações em campos rupestres *sensu lato*, como epífitas de capões e florestas de galeria ou rupícolas em rochas associadas a campos rupestres *sensu stricto*. Estudos moleculares, combinando dados nucleares (*nrITS*) e plasmidiais (*psbA-trnH*, *trnS-trnG*), identificaram três linhagens dentro da seção (Smidt et al., 2011). O grupo basal composto por *B. mentosum*, possui uma posição controversa dentro da seção, pois embora os dados dados moleculares nucleares apontam sua posição como grupo irmão do restante da seção *Micranthae* (Smidt, 2007), não há similaridade morfológica com as outras espécies da seção, exceto a disposição espiralada das flores. A espécie apresenta características exclusivas, como escapo em fita e não cilíndrico. Vegetativamente aproxima-se da seção *Didactyle*, mas possui labelo inteiriço com margem ereta, espessa e ciliada como na seção *Furvescens*.

Um dos clados recuperados pelos dados moleculares dentro da seção *Micranthae* é composto por espécies de folhas cilíndricas formadas por *B. adiamantinum* e *B. insectiferum* e provavelmente também por *B. pitengoensis* (Smidt et al., 2013). Estas espécies são, a princípio, facilmente distinguíveis pela morfologia floral, apesar de serem muito similares vegetativamente, apresentando folhas totalmente teretes, o que as diferem das demais espécies de *Bulbophyllum* Neotropicais. As demais espécies constituem o *core* da seção formado por um clado com espécies muito proximamente relacionadas, para as quais não foi possível inferir as relações evolutivas com dados moleculares disponíveis (Smidt et al., 2011). São espécies que apresentam alto grau de similaridade tanto vegetativa quanto floral, tornando difícil a delimitação e identificação das espécies. A maioria das espécies é caracterizada por plantas pequenas (5-10 cm), geralmente rupícolas ou epífitas, apresentam flores brancas, com labelos amarelos e sépalas com uma venação (Smidt et al., 2011; Nunes et al., 2017).

Estudos conduzidos por Smidt et al. (2013) empregando anatomia foliar e dados moleculares (ITS) recuperaram uma topologia similar àquela encontrada por Smidt et al. (2011), entretanto com uma resolução ainda mais baixa dos táxons do *core* da seção *Micranthae*. Nunes et al. (2017), estudando a seção *Micranthae* por meio de anatomia micromorfológica, verificaram que a seção é homogênea para 48 caracteres. Entretanto, para 54 caracteres, houve variações que podem ser úteis para delimitação de algumas espécies. Um grupo de particular atenção dentro do *core* da seção *Micranthae* é composto por *B. rupicola*, que é muito próximo de *B. epiphytum*, do

qual pode ser distinguido pela morfologia do pseudobulbo (fusiforme x piriforme), pela forma do labelo (esguio x ovado), papilas no labelo (da base até a metade x base) e flores ligeiramente menores em *B. epiphytum* (Smidt, 2007). As duas espécies também possuem diferentes hábitos de vida. *Bulbophyllum epiphytum* ocorre em matas que compõem uma matriz vegetacional em torno dos afloramentos rochosos dos campos rupestres e matas de galeria, enquanto que *B. rupicola* ocorre como rupícola sobre as rochas expostas nos campos rupestres. Este par de espécies também é muito próximo vegetativamente de *Bulbophyllum mucronifolium*, principalmente *B. rupicola*, entretanto, ambas as espécies possuem dentes laterais no labelo que estão ausentes em *B. mucronifolium*.

Azevedo et al. (2007) incluíram em suas análises, com dados de isoenzimas, três espécies da seção *Micranthae*. Os resultados deste estudo indicam que podem ocorrer introgressão entre as amostras de populações de *B. epiphytum* e *B. rupicola*. Nunes et al. (2017), estudando micromorfologia floral, encontraram 21 caracteres que diferem as duas espécies, corroborando que se tratam de dois táxons distintos. Um exemplo de diferenças encontradas entre as espécies está a presença de labelo secretório em *B. epiphytum* (Verola 2002; Nunes et al., 2017) enquanto que em *B. rupicola* esta característica não foi encontrada. A semelhança morfológica entre as espécies pode estar relacionada à seleção pelo mesmo polinizador, sendo que *B. rupicola* pode ser engodo (Nunes et al., 2017).

Verola (2002) analisou a biologia reprodutiva de *B. epiphytum*, *B. insectiferum* e *B. adiamantinum*. As três espécies da seção analisadas apresentaram autoincompatibilidade, algo incomum para Orchidaceae e para o gênero *Bulbophyllum* (Van der Pijl & Dodson 1966; Dressler 1981). Esse tipo de auto-esterilidade geralmente contribui para a manutenção de uma alta variabilidade genética dentro das populações, principalmente por se tratar de espécies polinizadas por moscas, cujo comportamento de visita favorece a autogamia (Borba & Semir 2001; Borba et al., 2001).

Apesar dos avanços dos estudos na seção, muito ainda permanece incerto na delimitação e entendimento das espécies e suas relações. Sendo assim, nesta tese respondemos às seguintes questões associadas ao nosso modelo de estudo integrando diferentes abordagens metodológicas:

- a) Quais as relações filogenéticas entre as espécies de *Bulbophyllum* atualmente reconhecidas como pertencentes à seção *Micranthae*? (Capítulo 1)

- b) As populações de *B. rupicola* e *B. epiphytum* distribuídas ao longo dos campos rupestres da cadeia do espinhaço e planalto central representam duas linhagens geneticamente divergentes? (Capítulo 1)
- c) Os caracteres morfológicos são suficientes para identificação das unidades evolutivas independentes que compõem *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*? (Capítulo 2)
- d) Existem barreiras pré e pós-polinização entre os táxons válidos que compõem a seção *Micranthae*? (Capítulo 3)
- e) A auto-incompatibilidade pode ser uma característica amplamente difundida na seção *Micranthae*, ao contrário do observado para a proximamente relacionada seção *Didactyle*? (Capítulo 3)

Para responder essas questões, esta tese recorre à abordagem biosistemática. Inicialmente reconstruímos a história evolutiva de *B.* sect. *Micranthae* utilizando a genotipagem de centenas de SNPs das nove espécies mais representativas da seção, abarcando as três linhagens identificadas por Smidt et al. (2011), a fim de verificar as relações filogenéticas entre os táxons. A maioria das espécies da seção ocorre em ambientes de campos rupestres. Padrões de diversificação de espécies nos campos rupestres ainda são pouco conhecidos e o estudo de *B.* sect. *Micranthae* pode auxiliar no entendimento geral deste ambiente (Silveira et al., 2016). Além disso, fizemos uma análise morfométrica em oito espécies que compõem a seção a fim de verificar a utilidade dos caracteres utilizados na classificação dos táxons à luz dos conceitos de espécie. Por fim, utilizamos polinizações experimentais investigar o sistema reprodutivo das espécies, identificando as espécies potencialmente intercruzantes.

CAPÍTULO 1

DIVERSIFICAÇÃO DE UM GRUPO DE ORQUÍDEAS NOS CAMPOS RUPESTRES: DELIMITAÇÃO DE LINHAGENS DE *BULBOPHYLLUM* SEÇÃO *MICRANTHAE* (ORCHIDACEAE)

DIVERSIFICAÇÃO DE UM GRUPO DE ORQUÍDEAS NOS CAMPOS RUPESTRES: DELIMITAÇÃO DE LINHAGENS DE *BULBOPHYLLUM* SEÇÃO *MICRANTHAE* (ORCHIDACEAE)

Resumo

Os campos rupestres, ecossistema associado a paisagens antigas nos topos de montanhas da América do Sul, são uma importante área de endemismo para a flora Neotropical. Para ajudar no entendimento das dinâmicas que moldam a diversificação nesses ambientes analisamos uma linhagem recente de orquídeas que compõe *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*. Algumas espécies da seção apresentam alto grau de similaridade tanto vegetativa quanto floral, tornando sua taxonomia desafiadora. Nós geramos dados de genotipagem por sequenciamento (GBS) para nove espécies, compreendendo as três linhagens previamente identificadas para a seção. Nossa análise filogenômica, baseada em uma amostragem populacional para a maioria das espécies (121 indivíduos em 32 populações), evidenciou linhagens congruentes com a morfologia e taxonomia do grupo. Nesta abordagem obtivemos uma melhor resolução das relações entre as espécies que compõem *B.* sect. *Micranthae*. Nossos resultados sugerem que *B. uhl-gabrielianum* e *B. mentosum* não pertencem à seção. Foram recuperadas duas linhagens principais para o clado da seção: uma composta pelo par *B. insectiferum* e *B. adiamantinum*; e outra composta pelas espécies já reconhecidas como pertencentes ao grupo *core*. Dentro do grupo *core*, embora os resultados confirmem a coesão das espécies *B. chloroglossum* e *B. mucronifolium*, a relação dessas espécies com *B. micranthum* ainda é incerta e precisa ser melhor investigada. Além disso, os limites estabelecidos para *B. epiphytum* e *B. rupicola* são mais complexos do que se supunha, sendo recuperadas duas linhagens genéticas distintas que, entretanto, não correspondem à circunscrição morfológica.

Palavras-chave: Filogenômica. *Bulbophyllum*. Orchidaceae. Campos rupestres.

1. Introdução

O campo rupestre *sensu lato* é um mosaico vegetacional, herbáceo-arbustivo, com afloramentos rochosos entremeados com as vegetações de transição e outros tipos de vegetações, tais como cerrado, mata de galeria e florestas relictuais de topos de morro (Silveira et al., 2016; Miola et al., 2021). São encontrados principalmente acima de 900 m ao longo da Cadeia do Espinhaço e em outras regiões descontínuas, estando associados, principalmente, a afloramentos de quartzito, arenito e minério de ferro (Giulietti & Pirani, 1988; Fernandes et al., 2014; Silveira et al., 2016). Estas regiões representam somente 0,8% do território brasileiro, mas contêm 15% da flora brasileira, constituindo uma importante área de endemismo para a flora Neotropical (Silveira et al., 2016).

A grande diversidade encontrada nos campos rupestres tem sido explicada pela diversificação antiga das linhagens, persistência prolongada das espécies e taxas de extinção reduzidas devido ao ambiente antigo, infértil e climaticamente tamponado (OCBIL) (Silveira et al.; 2016, Hopper et al., 2021). Nesta teoria, devido à origem antiga do complexo de montanhas e sua estabilidade climática, as linhagens adaptadas aos ambientes frios e secos teriam se diversificado por dispersão à longa distância e vicariância ao longo do tempo, mas permaneceram em refúgios durante as oscilações climáticas do Quaternário (Barbosa et al., 2012; Collevatti et al., 2012; Bonatelli et al., 2014, Leal et al., 2016). Apesar dessas regiões atuarem como refúgio para algumas linhagens antigas, o padrão de diversificação na região neotropical foi um processo complexo (Rull, 2011; Antonelli et al., 2018) e as linhagens endêmicas dos campos rupestres resultam de diferentes histórias evolutivas, incluindo algumas com diversificação recente (Bitencourt & Rapini, 2013; Souza et al., 2013; Bonatelli et al., 2014, Fiorini et al., 2019; Vasconcelos et al., 2020). Análise comparativa da recente diversificação nos campos rupestres inferiu que a maior parte da diversidade dos grupos endêmicos investigados resulta de eventos de especiação ocorridos nos últimos 5 Ma (Vasconcelos et al. 2020). Esse período coincide com as flutuações climáticas do Plioceno e do Pleistoceno e sugere alguma influência da instabilidade climática (Vasconcelos et al., 2020). Por outro lado, Rapini et al. (2021) sugeriram que as oscilações climáticas do Pleistoceno tiveram um impacto limitado na diversificação do bioma, especialmente nas espécies edáfico–especialistas, e a maior parte da diversidade dos campos rupestres seria resultado de recorrentes extinções e eventos esporádicos de grande radiação

adaptativa. Dessa forma, investigar a evolução de grupos do campo rupestre que apresentam diversificação recente pode ajudar a compreender os processos relacionados com a grande diversidade presente nesse ecossistema.

O gênero *Bulbophyllum*, na região Neotropical, possui a maior riqueza de espécies nas montanhas do sudeste do Brasil, com vários representantes endêmicos dos campos rupestres, sendo um bom modelo para contribuir na compreensão da diversificação da flora nestes ambientes (Smidt et al., 2007). A recente diversificação da linhagem Neotropical (7,02-13,78 Ma; Gamisch & Comes 2019) ocupando ambientes fragmentados dos campos rupestres, que impõem barreiras ao fluxo gênico, aliado a eventos de hibridação, contribui para um complexo padrão de diversidade morfológica e genética dentro e entre espécies. Estes fatores geram uma taxonomia desafiadora para algumas espécies da linhagem Neotropical (Ribeiro et al., 2008; Smidt et al., 2011; Fiorini et al., 2023). Dentre as espécies do gênero que ocorrem nos campos rupestres, um interessante grupo é composto por *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* Barb. Rodr. Algumas espécies da seção apresentam alto grau de similaridade tanto vegetativa quanto floral, tornando difícil a delimitação e identificação, havendo também a possibilidade de hibridação entre algumas espécies (Azevedo et al., 2007; Smidt et al., 2011).

Análises moleculares, baseadas em dados nucleares (nrITS) e plastidiais (*psbA-trnH* e *trnS-trnG*), conduzidas por Smidt et al. (2011), e de anatomia foliar (Smidt et al., 2013) não foram suficientes para estabelecer as relações filogenéticas das espécies dentro da seção. Os dados nucleares apontam *B. mentosum* Barb. Rodr. como grupo irmão do restante da seção *Micranthae*, mas a sua posição é controversa, pois vegetativamente aproxima-se da seção *Didactyle*, mas possui labelo inteiriço com margem ereta, espessa e ciliada como na seção *B. sect. Furvescens*. Por outro lado, os dados moleculares de cloroplasto indicam que esta espécie está relacionada a espécies de *B. sect. Xiphizusa* (Smidt et al., 2011). Outra espécie de posição controversa na seção é *B. uhl-gabrielianum* Campacci, a qual ocupa uma posição basal na seção utilizando dados anatômicos, mas é recuperada como *outgroups* ao utilizar dados nucleares. Ainda encontramos em *B. sect. Micranthae* um clado formado por *B. insectiferum* Barb. Rodr. e *B. adiamantinum* Brade, que é irmão de outro clado (grupo *core*) composto pelas demais espécies da seção (*B. chloroglossum* Rchb.f. & Warm., *B. epiphytum* Barb. Rodr., *B. micranthum* Barb. Rodr., *B. mucronifolium* Rchb.f. & Warm. e *B. rupicola* Barb. Rodr.). Diferentemente dos outros clados da seção, o grupo *core* compreende plantas pequenas com flores brancas com labelo amarelo e

sépalas com uma venação (Smidt et al., 2011; Nunes et al., 2017, CAPÍTULO 2). Nas análises filogenéticas conduzidas por Smidt et al. (2011), não foi possível esclarecer a relação filogenética entre as espécies deste grupo.

Um grupo que merece particular atenção no *core* da seção é composto pelas espécies *B. epiphytum* e *B. rupicola*. As espécies são muito próximas morfologicamente, distinguindo-se principalmente pela morfologia do pseudobulbo e tamanho das flores (Azevedo et al., 2007; Smidt, 2007; Smidt et al., 2011). Além disso, as espécies possuem diferentes hábitos: *B. epiphytum*, ocorre como epífita em matas que compõem a matriz vegetacional em torno dos afloramentos rochosos dos campos rupestres e em matas ciliares, enquanto *B. rupicola* ocorre como rupícola sobre as rochas expostas nestes ambientes (Smidt, 2007; Smidt et al., 2011). Entretanto, eventualmente é bastante difícil diferenciar as espécies do par, sendo possível encontrar exemplares de *B. rupicola* crescendo sobre rocha e sobre as árvores na mesma localidade. Esse é o caso inclusive da localidade tipo das duas espécies, a região de Caldas no sul de Minas Gerais. Além disso, também foi observado plasticidade morfológica para caracteres vegetativos nas amostras coletadas e cultivadas em local comum, com alongamento das folhas e uniformidade entre amostras de diferentes hábitos (CAPÍTULO 2). Estudos anteriores, baseados em dados de isoenzimas, indicam que pode ocorrer introgressão entre as amostras de populações de *B. epiphytum* e *B. rupicola* (Azevedo et al., 2007). Por outro lado, Nunes et al. (2017), estudando micromorfologia floral, encontraram 21 caracteres que diferem entre as duas espécies, sugerindo que as espécies podem não ser tão proximamente relacionada como se pensava. Este par de espécies também é muito próximo vegetativamente de *B. mucronifolium*, principalmente *B. rupicola*. Entretanto, ambas as espécies possuem pequenos lobos laterais no labelo, ausentes em *B. mucronifolium* (Smidt, 2007). Apesar dos avanços dos estudos na seção, muito ainda permanece incerto na delimitação e no entendimento das relações entre as espécies.

O avanço das técnicas de biologia molecular e aumento de poder computacional nas últimas décadas permitiram uma maneira independente para testar hipóteses de delimitação de espécies com a incorporação de centenas de milhares de marcadores de maneira rápida e econômica, especialmente para organismos não-modelo, que não possuem genomas de referência disponíveis (Davey et al., 2011; Andrews et al., 2016). Dados gerados pelo uso de metodologias de sequenciamento de DNA em regiões associadas a sítios reconhecidos por enzimas de restrição (RAD-seq) já se mostraram bastante informativos na reconstrução da história evolutiva de grupos

de divergência recente (Fernández-Mazuecos et al., 2017; Vargas et al., 2017; Resende-Moreira et al., 2018; López de Heredia et al., 2020; Díaz et al., 2021), incluindo Orchidaceae (Roy et al., 2017; Wagner et al., 2021; Cruz-Lustre, 2021) e especialmente em *Bulbophyllum* (Fiorini et al., 2023).

Neste estudo utilizamos a metodologia RAD-seq em uma abordagem filogenômica para entender os padrões de diversificação de *B.* sect. *Micranthae*. Nós conduzimos análises filogenéticas, amostrando múltiplas populações para a maioria das espécies, a fim de verificar as relações entre as espécies, considerando especialmente o par *B. epiphytum*/*B. rupicola*. As relações filogenéticas bem sustentadas podem identificar padrões biogeográficos capazes de promover *insights* sobre os processos que moldaram a diversificação dos campos rupestres. Além disso, avaliamos se há concordância entre as estruturas genéticas e os limites morfológicos das espécies a fim de auxiliar na taxonomia e reconhecimento das espécies à luz do conceito filogenético de espécie.

2. Materiais e Métodos

2.1 Amostragem

Nós amostramos 121 indivíduos pertencentes a 32 populações, abrangendo nove espécies formalmente reconhecidas de *B.* sect. *Micranthae*, compreendendo as três linhagens da seção de acordo com Smidt et al. (2011): *B. mentosum*, *B. adiamantinum*, *B. insectiferum*, *B. chloroglossum*, *B. micranthum*, *B. mucronifolium*, *B. epiphytum* e *B. rupicola*, *B. uhl-gabrielianum*. Em geral, as espécies da seção *Micranthae* são raras localmente e menos frequente que as demais espécies do gênero (observação pessoal). Tentando abranger a distribuição geográfica e morfológica das espécies, amostramos quatro indivíduos por população (Tabela 1, Fig. 1). Nós coletamos os indivíduos observando uma separação espacial de no mínimo 10 metros, quando possível, a fim de prevenir amostragem de clones. A taxonomia adotada foi baseada nas características morfológicas dos indivíduos coletados, seguindo a classificação de Smidt (2007). Esse critério de classificação foi relevante especialmente no caso das espécies *B. epiphytum* e *B. rupicola*.

Incluimos na amostragem representantes de outras seções neotropicais proximalmente relacionadas com *B. sect. Micranthae* (Smidt et al., 2011); *B. regnellii* (sect. *Napelli*); *B. weddelli* (sect. *Didactyle*) e *B. plumosum* (sect. *Xiphizusa*), totalizando 125 amostras. Mantivemos todos os indivíduos coletados na coleção viva do Museu de História Natural e Jardim Botânico-UFMG. Os vouchers foram depositados em herbários (Tabela 1). Este estudo foi realizado de acordo com o Ministério do Meio Ambiente do Brasil (Licença 4830600) e registrado sob o número A00EC1C no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).

2.2 Extração, montagem de biblioteca e sequenciamento

Extraímos o DNA genômico das amostras frescas de tecido foliar utilizando o protocolo modificado de CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Doyle & Doyle, 1987). Avaliamos a qualidade do DNA por meio de visualização em gel de agarose 1% e mensuramos a quantidade utilizando o fluorômetro Qubit dsDNA (Invitrogen). Cerca de 200-500 ng de DNA de cada amostra foram enviados ao Centro de Biotecnologia da Universidade de Wisconsin-Madison para construção de bibliotecas genômicas GBS (genotype by sequencing; Elshire et al., 2011; Poland et al., 2012). Após a realização de testes com diferentes enzimas de restrição, foi realizada a digestão do DNA com a enzima ApeKI. Foram adicionados adaptadores customizados adequados para o sequenciamento paralelo massivo e para identificação única dos indivíduos (*barcode*). Foram selecionados os fragmentos gerados utilizando o Pippin Prep (Sage Science) para fragmentos de 250-450 pb. E o sequenciamento pareado (paired-end) de 150 pb foi realizado na plataforma Illumina NovaSeq 6000 (DNA Sequencing Facility UW-Madison Biotechnology Center, Madison, USA). Foram processados 190 indivíduos em duas bibliotecas distintas gerando 411.180.764 e 330.699.467 sequências em cada uma. Selecionamos 125 indivíduos para este estudo (Tabela 1).

2.3 Processamento dos dados genômicos

Realizamos as análises genômicas no Sagarana HPC cluster, CEPAD-ICB-UFMG. Avaliamos a qualidade do sequenciamento das bibliotecas genômicas usando FastQC versão 0.11.8 (Andrews, 2010). Filtramos as sequências pelo Trimmomatic v. 0.36 (Bolger et al., 2014) para descartar as sequências de adaptadores Illumina, as sequências com baixa qualidade e os dez últimos pares de base que apresentavam menor qualidade, totalizando 140 pb. Utilizamos o programa `process_radtags` no software Stacks v 2.54 (Catchen et al., 2011, 2013) para demultiplexar as *reads* e filtrá-las. Descartamos as *reads* que não apresentavam o *barcode* (sequência de identificação individual), corte da enzima ApeKI, que apresentaram baixa qualidade ou que não passaram no filtro de qualidade Illumina.

Como não há genoma de referência disponível para *Bulbophyllum*, realizamos a identificação dos *loci* sequenciados e a genotipagem dos sítios de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) por análise *de novo* utilizando-se o pipeline STACKS v 2.54 (Rochette & Catchen, 2019). Esse pipeline compila *loci* em 5 etapas: (1) *ustacks* forma conjunto de *reads* baseando-se em critérios de similaridade para identificar *loci* únicos para cada indivíduo; (2) *cstacks* gera um catálogo único de *loci* encontrados em todos os indivíduos baseado na saída de *ustacks*, agrupando *loci* provavelmente ortólogos; (3) o *sstacks* usa o catálogo de *cstacks* para mapear os *loci* presentes em cada indivíduo; (4) o *tsv2bam* reorganiza as amostras por *locus* e inclui as informações das sequências reversas e (5) *gstacks* constroi as sequências consenso para cada *locus*. Ao todo foram obtidos 4.023.421 *loci* com tamanho médio de 222,6 pb e cobertura média de 43x.

Empregamos o método descrito por Paris et al. (2017) para otimizar os principais parâmetros usados na chamada de variantes: o número de diferenças nas sequências (*mismatches*) que podem ser observados em um determinado *locus* dentro de um indivíduo (M) e o número de *mismatches* que podem ser observados em um determinado *locus* em diferentes indivíduos (n). Mantivemos o número mínimo de *reads* para identificar um alelo (m) em 3 (valor default do programa) e os valores de M e n variamos de 1 a 10. Plotamos o número total de *loci* presentes em pelo menos 80% dos indivíduos nos diferentes parâmetros testados (Fig. S1) e selecionamos os parâmetros usados na análise final (M5n6) seguindo as sugestões de Paris et al. (2017).

Uma vez que os SNPs foram genotipados, utilizamos o programa *populations* do pipeline STACKS para realizar filtragens adicionais e gerar os arquivos usados em análises posteriores. O conjunto de dados final manteve apenas os *loci* presentes em pelo menos duas populações e em

80% dos indivíduos analisados (máximo de 20% de dados faltantes), que apresentavam uma frequência mínima de 0,02 para o alelo mais raro (*minor allele frequency*) e máxima heterozigosidade observada de 0,5 excluindo *loci* com mais de dois alelos. Investigamos os sítios altamente polimórficos, sugestivos de erro de sequenciamento, através do parâmetro *theta* utilizando um script customizado no R 4.0.2 (R Core Team, 2020; Thomaz et al., 2017). Os *loci* com valores de *theta* superiores a 95% do quantil da variabilidade observada foram filtrados com auxílio de *populations* (Fig. S2). Os dados genômicos processados resultaram em 14.111 *loci* variáveis e um total de 135.295 SNPs.

2.4 Relações filogenéticas e estrutura genética

Verificamos a variação genética pela análise de componentes principais (PCA), utilizando os pacotes *adegenet* 2.1.1 (Jombart & Ahmed, 2011), *ade4* 1.7 (Dray & Dufour, 2007) implementados no R v. 4.1.0 (R Core Team, 2020). Para essa análise, utilizamos todos os SNPs e excluimos os grupos externos, pois sua inclusão foi pouco informativa para as relações dentro da seção (resultados não apresentados). Para reconstruir as relações filogenéticas entre as espécies, analisamos a matriz em três métodos distintos: baseado em máxima parcimônia (MP), máxima verossimilhança (ML, do termo em inglês, *maximum-likelihood*) e coalescência. Para a análise de MP utilizamos uma busca heurística com adição aleatória de táxons, com o algoritmo *tree bisection and reconnection* (TBR) para trocas de ramos e inferência de suporte de bootstrap com 1000 replicatas no programa PAUP4 (Swafford, 2003). A análise de ML utilizamos o programa RAxML-NG v 8.00 (Kozlov & Stamatakis, 2019) com a matriz concatenada, assumindo como melhor modelo de substituição TVM+G4, identificado em ambos os critérios BIC e AIC, provido pelo programa *jModeltest-NG* (Darriba et al., 2020). O número de replicatas de *bootstrap* foi determinado automaticamente pelo padrão do programa, resultando em 400 replicatas (Kozlov & Stamatakis, 2019). Realizamos a análise de coalescência por meio do algoritmo SVDquartets (Chifman & Kubatko, 2014), implementado no PAUP4 (Swofford, 2003), empregando uma amostragem exaustiva de quartetos. Utilizamos *Bootstrapping* não paramétrico para suporte dos agrupamentos, calculado com o algoritmo *fast bootstrap* com 1000 replicações. Enraizamos as árvores na espécie *B. regnellii*, a espécie sequenciada mais distante filogeneticamente de *B. sect.*

Micranthae baseado nos resultados de Smidt et al. (2011), e as visualizamos com programa Mesquite v. 3.7 (Maddison & Maddison, 2021).

Inferimos a estrutura populacional de *B. sect. Micranthae* utilizando o programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Para esta análise, retiramos os grupos externos e as espécies *B. ulh-gabrielianum* e *B. mentosum* devido a distância filogenética observada em relação as demais espécies analisadas (ver resultados). Foi estimada a proporção de ancestralidade de cada indivíduo variando o número de *clusters* genéticos (K), utilizando modelo de mistura entre as populações e somente um SNP por *locus*, totalizando 14.111 SNPs analisados. Foram testados de K=1 a K=10, com 10 réplicas independentes para cada valor de K, com 200.000 gerações de *burn-in* e 500.000 de randomização, coletadas através de Cadeias de Markov (MCMC). O valor mais provável de K foi determinada pela estatística delta K, proposta por Evanno et al. (2005), inferido por meio do software Structure Harvester (Earl & vonHoldt, 2012). Utilizamos o software Clumpak (Kopelman et al., 2015) para construir os gráficos com os resultados.

3 Resultados

A análise de componentes principais incluindo todas as espécies de *B. sect. Micranthae* revelou que os quatro primeiros eixos do PCA explicam 57% da variação observada (Fig. 2). Nos eixos 1 e 2 são separados os indivíduos das espécies *B. adiamantinum*, *B. insectiferum*, *B. mentosum* e *B. uhl-gabrielianum* (Fig. 2a). Por outro lado, as demais populações das diferentes espécies que compõem o grupo *core* de *B. sect. Micranthae* apresentaram grande sobreposição nos dois primeiros eixos. Entretanto, no eixo 4 observamos a segregação dos indivíduos de *B. mucronifolium* e também a separação dos indivíduos de *B. chloroglossum* e *B. micranthum* das demais populações, mas sem distinção clara entre as duas últimas espécies (Fig. 2b). As populações de *B. epiphytum* e *B. rupicola* permanecem sobrepostas nos quatro eixos considerados. Ao excluir as demais populações e analisarmos os componentes principais apenas deste par de espécies, os dois primeiros eixos explicam 25% da variação observada e evidenciam uma estruturação das populações (Fig. 2c). As populações de *B. epiphytum*, juntamente com as populações do extremo sul de distribuição de *B. rupicola* (RUCAL, RUSRC), são segregadas das outras populações de *B. rupicola* no eixo 1 (Fig. 2c). Ainda no eixo 1, observamos a segregação da população RUAP das demais populações de *B. rupicola* amostradas na região central do Brasil

(RUMO, RUPI1 e RUPI2). No eixo 2, é possível observar estruturação entre as populações de *B. epiphytum*. Observamos no extremo positivo a segregação da população localizada no extremo norte (EPTRI). As populações da Serra do Cipó (EPSR), da Serra do Cabral (EPJF) e da Chapada dos Veadeiros (EPAP) são encontradas sobrepostas no eixo 2, se segregando das demais populações. O mesmo ocorre com as populações da Bacia Hidrográfica do Rio Grande (EPSJ, EPI, EPCAR, EPST, EPBJ). No extremo negativo do eixo 2, observamos as populações de *B. rupicola* do sul de Minas Gerais, RUCAL e RUSRC, segregadas das demais populações de *B. epiphytum*.

As análises filogenéticas realizadas com diferentes metodologias, MP (Fig. S3), ML (Fig. S4) e coalescência (Fig. 3), apresentaram resultados similares. Na análise de MP houve menor suporte dos ramos internos (Fig. S3). Em todas as análises filogenéticas realizadas, as espécies que compõem *B. sect. Micranthae*, seguindo os critérios baseados em morfologia (Smidt, 2007; Smidt et al., 2013), não formam um grupo monofilético. A espécie *B. ulh-gabrielianum*, descrita como potencialmente pertencente à seção *Micranthae*, não aparece dentro do clado da seção. *Bulbophyllum mentosum* foi recuperado com *B. weddellii* (seção *Didactyle*), que aparece como grupo irmão das demais espécies de *B. sect. Micranthae*. As demais espécies analisadas formam um clado bem suportado nas análises filogenéticas (Bootstrap 100%) (Fig. 3). A maioria das espécies foram recuperadas em clados distintos, exceto *B. epiphytum* e *B. rupicola*. Os indivíduos de *B. adiamantinum* e *B. insectiferum* formam dois clados irmãos que formam uma linhagem irmã das demais espécies, todos com bom suporte. As relações filogenéticas entre *B. micranthum*, *B. chloroglossum* e *B. mucronifolium* no core da seção *Micranthae* é incerta. Nas análises de ML e de parcimônia, *B. micranthum* é grupo irmão de *B. chloroglossum* com bom suporte (Figs. S3 e S4), enquanto que na análise de coalescência *B. micranthum* aparece como grupo irmão de *B. mucronifolium*, mas com baixo suporte; BS= 91% (Fig. 3). As populações de *B. mucronifolium* formam um clado bem suportado em todas as análises (Bootstrap 100%) (Fig. 3).

Embora não monofiléticas, as espécies *B. epiphytum* e *B. rupicola* foram incluídas em um clado bem suportado (Bootstrap 100% Fig. 3). As populações de *B. rupicola* são recuperadas em dois clados. O clado *B. rupicola* 1 é composto pelas populações de Goiás e forma um grupo irmão de um clado bem suportado contendo todas as populações de *B. epiphytum* e as populações de *B. rupicola* do sul de Minas Gerais (RUCAL e RUSRC, clado *B. rupicola* 2) (Fig 3). O clado 2 de *B. rupicola* constitui o grupo irmão das populações de *B. epiphytum* da bacia do Rio Grande

no sul de Minas Gerais (Clado *B. epiphytum* 2), que juntas formam uma linhagem irmã das demais populações de *B. epiphytum* (clado *B. epiphytum* 1).

A análise de estrutura genética, verificada através da análise executada no programa Structure, indica que é mais provável a presença de dois grupos principais (K=2; Fig. S5). O grupo 1 é formado pelas populações de *B. adiamantinum* e *B. insectiferum*, que difere do *cluster* formado pelas demais espécies da seção (grupo 2) (Fig. 4). É observada baixa mistura entre estes dois *clusters*, e apenas um indivíduo de ADCAN e um de INT, ambos do grupo 1, apresentaram baixa ancestralidade comum ao grupo 2. É possível observar um segundo valor mais alto para o delta K em K=8 (Tabela S1), e o gráfico de Ln Pr (X/K) também estabiliza em K=8 (Fig S5), sugerindo uma sub-estruturação. Valores de K maiores que oito não foram informativos, uma vez que não acrescentaram ancestralidade predominante a nenhum agrupamento já encontrado com valores de K inferiores (dados não mostrados). Considerando K=8, seis dos oito grupos inferidos apresentaram grande correspondência com as espécies (Fig. 4). Entretanto, o grupo 2 inclui as populações de *B. epiphytum* e também as populações de *B. rupicola* do sul de Minas Gerais (RUCAL e RUSRC), enquanto o cluster 6 reúne as demais populações de *B. rupicola* (todas amostradas em Goiás - RUP1, RUP2, RUMO e RAP). Além disso, o único indivíduo de *B. micranthum* analisado nesse trabalho não corresponde a um grupo distinto, mas a uma mistura de três grupos, com predominância dos grupos 2 e 4, que equivalem a *B. epiphytum* e *B. chloroglossum*, respectivamente. Todavia, a grande diferença amostral pode enviesar os resultados para essa espécie. Também realizamos a análise separada no Structure para os dois principais clados inferidos pelas análises filogenéticas de *B. sect. Micranthae* (*B. adiamantinum* + *B. insectiferum* e grupo *core*), a fim de investigar sub-estruturações. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados na análise anterior (Figs. S6 e S7)

4 Discussão

O sequenciamento de nova geração empregando dados genômicos e amostragem populacional permitiu uma melhor resolução das relações filogenéticas entre as espécies que compõem *B. sect. Micranthae*. Nossos resultados evidenciaram linhagens congruentes com a morfologia e taxonomia do grupo, porém também revelaram que os limites estabelecidos para *B. epiphytum* e *B. rupicola* são mais complexos do que se supunha previamente. Além disso, nossos

resultados evidenciaram padrões de estruturação, principalmente em *B. epiphytum* que podem estar relacionados com as características de ocupação dos ambientes fragmentados.

4.1 Relações filogenéticas

A filogenia molecular baseada em dados genômicos não permite a confirmação da inclusão de *B. uhl-gabrielianum* em *B. sect. Micranthae*. A espécie apresenta morfologia discrepante entre as demais espécies da seção, apresentando inflorescência curta, pendente e uniflora (Chiron & Castro Neto, 2009). A posição de *B. uhl-gabrielianum* na seção *Micranthae* foi sugerida por Smidt et al. (2013) embora as análises realizadas, envolvendo marcadores nucleares e anatômicos, não fornecessem suporte para definir a posição filogenética da espécie no grupo. Gamisch et al. (2019), investigaram as relações entre *Bulbophyllum* de diferentes continentes com sequências ITS, e recuperaram *B. uhl-gabrielianum* como grupo irmão de *B. sect. Napelli*. Dessa forma, ainda são necessários estudos adicionais com marcadores informativos e amostragem adequada para esclarecer a real posição filogenética de *B. uhl-gabrielianum* no gênero.

Outra espécie de posicionamento controverso na seção *Micranthae* é *B. mentosum*. Com base em nossa amostragem genômica multilocus, obtida por meio da metodologia GBS, *B. mentosum* é recuperado como um grupo irmão de *B. weddellii* (sect. *Didactyle*). Vegetativamente *B. mentosum* é bastante próximo das espécies da seção *Didactyle* e apresenta flores em espiral como as demais espécies de *B. sect. Micranthae* (Smidt, 2007). Nas análises filogenéticas conduzidas por Smidt et al. (2011), *B. mentosum* é recuperado como grupo irmão de *B. sect. Micranthae* quando sequências nucleares são utilizadas. Já quando são utilizadas sequências plastidiais, a espécie é recuperada em *B. sect. Xiphyzusa*, o que também é observado nas análises utilizando marcadores moleculares de cloroplasto conduzidas por Zavala-Paez et al. (2020). Nas análises de biologia reprodutiva (CAPÍTULO 3), *B. mentosum* foi a única espécie de *B. sect. Micranthae* que não foi capaz de formar frutos em polinizações interespecíficas dentro da seção (em sete tratamentos como receptora de pólen e oito tratamentos como doadora de pólen). Além disso, também foi a única espécie que apresentou auto-compatibilidade na seção, característica que também é encontrada na seção *Didactyle* (Borba et al., 1999). Entretanto, a proximidade filogenética encontrada em nossos resultados entre *B. mentosum* e *B. weddellii* pode ser um

artefato devido à grande divergência das espécies basais das duas seções irmãs e nossa amostragem reduzida dos grupos externos de *B. sect. Micranthae*. Por outro lado, as evidências morfológicas (CAPÍTULO 2) e genéticas apontam uma grande divergência entre as populações de *B. mentosum* e as demais espécies de *B. sect. Micranthae*. De fato, a exclusão de *B. mentosum* em *B. sect. Micranthae* tornaria o grupo com maior similaridade morfológica evidenciaria uma possível sinapormorfia biológica de autoincompatibilidade, mas são necessários estudos taxonômicos adicionais, com amostragem adequada, para esclarecer o posicionamento dessa espécie no gênero.

As demais espécies de *B. sect. Micranthae* formam um clado coeso, com *B. adiamantinum* e *B. insectiferum* como grupo irmão do grupo *core*, o que também foi recuperado com outros marcadores (Smidt et al., 2011). A morfologia de *B. insectiferum* e *B. adiamantinum* é muito discrepante dos demais *Bulbophyllum* da região Neotropical, mas muito semelhante entre si, especialmente quando os indivíduos não apresentam flores. Acreditamos que por esta razão, alguns espécimes de *B. adiamantinum* foram erroneamente identificados como *B. insectiferum* em materiais de herbário, principalmente quando o material testemunho está apenas com frutos, já que esta última é amplamente conhecida por colecionadores (CAPÍTULO 2).

As análises morfológicas e moleculares anteriores falharam em inferir as relações filogenéticas das espécies que compõem o *core* de *B. sect. Micranthae* (Smidt et al., 2011, 2013). Os estudos filogenéticos prévios eram baseados em um limitado número de marcadores, o que resultou em uma baixa resolução entre as espécies. Este é o primeiro estudo que emprega um elevado número de marcadores distribuídos ao longo de todo o genoma (135.295 SNPs), obtidos por GBS. Esta metodologia permitiu identificar a relação entre os principais grupos deste clado, embora a posição de alguns deles, principalmente dos nós internos, permaneça incerta. O grupo *core* de *B. sect. Micranthae* apresenta grande similaridade genética em relação às outras espécies da seção, como observado em nossas análises de PCA. A separação incompleta de linhagens e hibridação são fenômenos que podem contribuir para a similaridade observada (Pease et al., 2016; Malinsky et al., 2018). Apesar de não haver o reconhecimento de híbridos naturais em *B. sect. Micranthae*, suas espécies possuem floração sincrônica e não há barreiras reprodutivas entre a maioria das espécies da seção (CAPÍTULO 3). Na análise de estruturação observamos alguns indivíduos com mistura genética, inclusive em populações simpátricas como RUAP e EPAP, podendo sugerir a ocorrência de hibridação. Além disso, o único indivíduo analisado de *B.*

micranthum apresentou uma mistura de dois dos grupos inferidos, embora esse resultado deva ser considerado com cautela já que pode ser um artefato devido à baixa amostragem de *B. micranthum*. Outros estudos estão sendo desenvolvidos para testar a hipótese de hibridação no grupo. Além da hipótese de hibridação, as misturas genéticas observadas também podem ser fruto da separação incompleta das linhagens de *B. sect. Micranthae*, que apresenta uma diversificação bastante recente (1 Ma; Gamisch & Comes 2019). Essa divergência recente pode também estar relacionada com a incongruência observada para o posicionamento de *B. micranthum*, *B. chloroglossum* e *B. mucronifolium* nas árvores filogenéticas obtidas por diferentes métodos de análise. Para as análises de MP e ML nós utilizamos dados concatenados, que ignora a possibilidade de ocorrência de diferentes histórias evolutivas nos diferentes *loci*, podendo levar a uma inferência incorreta da árvore de espécie especialmente em grupos com altas taxas de separação incompleta de linhagens (Kubatko & Degnan, 2007). O método de coalescência empregado na análise de SVDquartets tem se demonstrado mais eficiente nesses casos (Chou et al., 2015), entretanto ainda pode ser necessário utilizar outros métodos baseados em coalescência que consigam lidar com altas taxas de separação incompleta de linhagens, caso seja comprovado no grupo.

Não há problemas taxonômicos para delimitação de *B. chloroglossum*, espécie de folhas planas e não carnosas (CAPÍTULO 2). Na análise de SVDquartets este taxon é recuperado como grupo irmão das demais espécies do grupo *core* e o indivíduo de *B. micranthum*, espécie também com folha plana, é recuperado como irmão de *B. mucronifolium* que possui folhas carnosas subcilíndricas. Já nas análises de ML e MP, *B. mucronifolium* é a primeira linhagem do grupo *core* a divergir.

A taxonomia de *B. epiphytum* e *B. rupicola* constitui um longo e controverso debate (Smidt et al., 2011, Azevedo et al., 2007). Este é o primeiro estudo utilizando dados genômicos e amostragem populacional (58 indivíduos e 15 populações) na avaliação das suas relações evolutivas. Não foi possível recuperar, em nenhuma de nossas análises, a monofilia de *B. epiphytum* e *B. rupicola*. As populações de *B. rupicola* do estado Goiás (*B. rupicola* 1) formam um clado divergente do restante das populações da espécie que ocorrem no sul de Minas Gerais (*B. rupicola* 2), e estas estão inseridas no clado formado pelas populações de *B. epiphytum*. As duas espécies foram descritas por Barbosa Rodrigues para a mesma região geográfica, município de Caldas no sul de Minas Gerais. Apesar de não ter sido encontrado *B. epiphytum* na localidade

do tipo, todas as demais populações coletadas no Sul de Minas Gerais (EBJ, EPSJ, EPCAR, EPI, EPSJ, EPST) formam um clado consistente, irmão do clado *B. rupicola* 2. Estes resultados nos fornecem grandes desafios e oportunidade de entender o processo de especiação em táxons de divergência recente. A especiação pode ter ocorrido em alopatria, em que o clado *B. rupicola* 1 constitui uma espécie críptica e as demais populações constituem outra espécie. Neste cenário, houve uma convergência morfológica entre o clado *B. rupicola* 1 e *B. rupicola* 2, já que a análise de dados morfométricos não permite distinguir claramente os clados (CAPÍTULO 2). Alternativamente, o padrão genético observado neste estudo é congruente com um cenário de estágio recente de divergência em que a espécie *B. epiphytum*, amplamente distribuída, possa ter atuado como a progenitora de *B. rupicola* que se tornou adaptada a uma condição edáfica distinta (Rapini et al., 2021). A proximidade geográfica das populações do clado *B. rupicola* 2 em relação às populações de *B. epiphytum*, associada à ausência de barreiras pós-zigóticas ao fluxo gênico (CAPÍTULO 3), podem ter contribuído para a manutenção de fluxo gênico neste grupo, sem, entretanto, perder suas integridades morfológicas (Wu, 2001). Há algumas evidências de eventos de especiação com fluxo gênico em plantas, em que há similaridade genética entre espécies incipientes, mas com a ocorrência de seleção em *loci* adaptativos a diferentes condições ambientais, determinantes para a diferenciação morfológica observada (Papadopulos et al., 2019; Muniz et al., 2022). Uma taxonomia formal para classificação dos clados encontrados é desafiadora. Nas análises morfométricas conduzidas nas espécies da seção não foram observadas grandes descontinuidades morfológicas entre as espécies do grupo *core* e *B. epiphytum* e *B. rupicola* só foram recuperadas em análises de variáveis canônicas (CAPÍTULO 2). Elucidar essas questões será importante para compreender a história evolutiva da seção *Micranthae*, mas ainda são necessários estudos ecológicos e de introgressão a fim de entender o complexo processo de diferenciação das populações de *B. epiphytum* e *B. rupicola*.

4.2 Biogeografia

Na região de campo rupestre há uma alta heterogeneidade de condições edáficas e vegetacionais, e a maioria da sua flora endêmica compreende espécies edáfico-especialistas (Rapini et al., 2021). Os diversos micro-habitats isolados frequentemente promovem especiação devido a efetiva barreira ao fluxo gênico entre as populações (Mayr 1942). Este cenário pode ter

atuado na diversificação das linhagens de *B. sect. Micranthae*. Alguns grupos, porém, possuem distribuição além da Serra do Espinhaço, alcançando fragmentos disjuntos, como Chapada dos Veadeiros (*B. adiamantinum*, *B. rupicola* e *B. epiphytum*) e Serra da Canastra (*B. adiamantinum*), outras ainda se distribuem em regiões montanhosas do sudeste e sul do Brasil (*B. micranthum* e *B. chloroglossum*). Dentro da linhagem de *B. epiphytum*, observamos uma conexão genética entre a população da Chapada dos Veadeiros (EPAP) e as populações disjuntas da Serra do Cabral (EPJF) e a população da Serra do Espinhaço (EPSR). Este padrão de conexão entre estas áreas disjuntas também foi encontrado em *B. exaltatum* (Fiorini, 2023), podendo indicar uma conexão entre a vegetação de campo rupestres dessas regiões.

De acordo com Rapini et al. (2021), linhagens estritamente endêmicas de um fragmento, adaptadas a um substrato nos campos rupestres, podem divergir peripatricamente e ocupar novos habitats com diferentes substratos, expandindo sua distribuição. Este modelo pode ter atuado na transição dos hábitos rupícolas e epífitas no complexo *B. epiphytum/B.rupicola*. A colonização dos diferentes nichos, associada à distância geográfica, pode ter contribuído para especialização e gerado uma diferenciação genética entre as populações do clado *B. rupicola* 1 e as demais populações (Fig. 4). Na região do Sul de Minas Gerais, entretanto, em que há a presença de grupos rupícolas e epífitas não há uma divergência genética muito pronunciada entre as populações, possivelmente pela ausência de barreiras reprodutivas e pela proximidade geográfica entre populações de diferentes espécies. Por outro lado, populações de espécies distintas amostradas em Alto Paraíso (EPAP e RUAP) apresentam divergência marcante, que foi observada em todas as análises realizadas, possivelmente resultado de um contato secundário. A maior divergência entre o clado *B. rupicola* 1 das populações restantes pode resultar de processos históricos de ocupação dos ambientes, já que alguns outros grupos de plantas do cerrado ou endêmicas dos campos rupestres têm demonstrado uma divergência leste-oeste, tais como Cactaceae (*Pilosocereus aurestatus*), Fabaceae (*Hymenae stignocarpa*) e Asteraceae (*Lychnophora ericoides*) (Ramos et al., 2007; Collevatti et al., 2009; Bonatelli et al., 2014). Esses resultados reforçam a complexidade dos processos envolvidos na diversificação da flora dos campos rupestres, onde tanto processos demográficos quanto ecológicos parecem relevantes (Vasconcellos et al., 2020; Rapini et al., 2021; Fiorini et al., 2023).

Estudos conduzidos com diferentes grupos de organismos de campo rupestre vêm demonstrando uma disjunção importante entre a Chapada Diamantina e o Espinhaço (Rapini et

al., 2008; Ribeiro et al., 2014; Chaves et al., 2015; Colli-Silva et al., 2019; Dantas-Queiroz et al., 2021), inclusive observado em espécies que compõem *B. sect. Didactyle* (Fiorini et al., 2023). Nós não obtivemos sucesso na amostragem de populações do complexo *B. epiphytum/B. rupicola* na Chapada de Diamantina, dessa forma, nossa amostragem é insuficiente para notar essa barreira. Ainda assim, é possível notar uma forte estruturação norte-sul nas populações de *B. epiphytum* e *B. rupicola* que ocorrem no leste do Brasil, separando as populações da Bacia do Rio Grande (EPSJ, EPI, EPCAR, EPBJ, EPST) das demais.

Em *B. adiamantinum*, a princípio nenhuma estrutura geográfica evidente foi recuperada em nossas análises. *B. adiamantinum* forma um único *cluster* com pequena mistura genética em alguns indivíduos da Serra da Canastra (ADCAN) e as análises filogenéticas apresentaram baixo suporte dos ramos internos para inferências filogeográficas. A homogeneidade genética não é esperada para orquídeas miiófilas de populações disjuntas (Azevedo et al., 2007; Borba et al., 2001), como observado no grupo proximoamente relacionado, grupo *B. epiphytum/ B. rupicola*, e em populações de *B. sect. Didactyle* (Fiorini, 2023) que ocorrem nas mesmas regiões geográficas. Nosso grupo de pesquisa está trabalhando em análise filogeográfica deste grupo com uma amostragem mais ampla.

Organismos adaptados a ecossistemas negligenciados para conservação, como as espécies de *Bulbophyllum* nos campos rupestres, podem estar em maior risco de extinção pelas mudanças climáticas que espécies ecologicamente generalistas. Tendo em vista a rápida mudança climática antropogênica, são necessários maiores estudos para entender os processos que contribuíram para a presente distribuição da biodiversidade dos campos rupestres a fim de propor programas de conservação efetivos desses ambientes. Este é a segunda seção de *Bulbophyllum* estudada com marcadores genômicos, e embora a ampla amostragem geográfica e o uso de marcadores mais informativos tenha possibilitado esclarecer algumas relações filogenéticas e sugerir a relevância de processos biogeográficos e ecológicos na diversificação desse grupo, ainda há a necessidade de estudar outros grupos de ampla distribuição nos campos rupestres, preferencialmente grupos filogeneticamente distantes e com características ecológicas distintas, para delinear estratégias de conservação mais robustas.

Referências

- Andrews, S., Bielejec, F., Baele, G., Vrancken, B., Suchard, M. A., Raumbaut, A., & Lemey, P. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Publishing Group*, 17, 81–92.
- Antonelli, A., Zizka, A., Carvalho, F. A., Scharn, R., Bacon, C. D., Silvestro, D., & Condamine, F. L. (2018). Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, 6034–6039.
- Azevedo, M. T. A., Borba, E. L., Semir, J., & Solferini, V. N. (2007). High genetic variability in Neotropical myophilous orchids. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 153(1), 33–40. doi: 10.1111/j.1095-8339.2007.00589.x
- Barbosa, A. R., Fiorini, C. F., Silva-Pereira, V., Mello-Silva, R., & Borba, E. L. (2012). Geographical genetic structuring and phenotypic variation in the *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) ochlopecies complex. *American Journal of Botany*, 99(9), 1477–1488. doi: 10.3732/ajb.1200070
- Bitencourt, C. & Rapini, A. (2013). Centers of endemism in the Espinhaço range: identifying cradles and museums of Asclepiadoideae (Apocynaceae). *Systematics and Biodiversity*, 11, 525–536
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Bonatelli, I. A. S., Perez, M. F., Peterson, A. T., Taylor, N. P., Zappi, D. C., Machado, M. C., & Moraes, E. M. (2014). Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. *Molecular Ecology*, 23, 3044–3063. doi:10.1111/mec.12780
- Borba, E. L., Shepherd, G. J., & Semir, J. (1999). Reproductive systems and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occurring in Brazilian “campo rupestre” vegetation. *Plant Systematics and Evolution*, 217, 205–214. doi: 10.1007/BF00984366

- Borba, E. L., Felix, J. M., Solferini V. N., & Semir, J. (2001). Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany*, 88, 419-428.
- Catchen, J., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., & Postlethwait, J. (2011). Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 1, 171–182. doi:10.1534/g3.111.000240
- Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A. & Cresko, W. A. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22: 3124-3140. doi: 10.1111/mec.12354
- Chaves, A. V., G. H. S. Freitas, M. F. Vasconcelos, & F. R. Santos. (2015). Biogeographic patterns, origin and speciation of the endemic birds from eastern Brazilian mountaintops: a review. *Systematics and Biodiversity*, 13, 1–16. doi: 10.1080/14772000.2014.972477
- Chifman J. & Kubatko L. (2014). quartet inference from SNP data under the coalescent model. *Bioinformatics*, 30, 3317–3324. doi: 10.1093/bioinformatics/btu530
- Chiron, G. R., & Castro Neto, V. P. (2009). Contribution à la connaissance des orchidées du Brésil. XVI : Une nouvelle espèce de *Bulbophyllum* de l’Espírito Santo. *Richardiana*, IX (2).
- Chou, J., Gupta, A., Yaduvanshi, S., Davidson, R., Nute, M., Mirarab, S., & Warnow, T. (2015). A comparative study of SVDquartets and other coalescent-based species tree estimation methods. *BMC Genomics*, 16, S2. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S10-S2>
- Collevatti, R. G., Rabelo, S. G., & Vieira, R. F. (2009). Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. *Annals of Botany*, 104 (4), 655–664. doi: 10.1093/aob/mcp157
- Collevatti, R. G., de Castro, T. G., Lima, J. de S., & Telles, M. P. de C. (2012). Phylogeography of *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), an endangered tree species from rocky savannas, suggests bidirectional expansion due to climate cooling in the Pleistocene. *Ecology and Evolution*, 2, 1024–1035. doi: 10.1002/ece3.236
- Colli-Silva, M., Vasconcelos, T. N. C., & Pirani, J. R. (2019). Outstanding plant endemism levels strongly support the recognition of campo rupestre provinces in mountaintops of eastern South America. *Journal of Biogeography*, 46, 1723–1733. doi: 10.1111/jbi.13585

- Cruz-Lustre, G. M. (2021). Estudos biossistemáticos para a delimitação de linhagens e espécies no complexo *Habenaria parviflora* lindl. (Orchidaceae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Dantas-Queiroz, M. V., Cacossi, T. C., Leal, B. S. S., Chaves, C. J. N., Vasconcelos, T. N., Versieux, L. M. & Palma-Silva, C. (2021). Underlying microevolutionary processes parallel macroevolutionary patterns in ancient neotropical mountains. *Journal of Biogeography*, 48, 2312-2327. doi :10.1111/jbi.14154
- Darriba, D., Posada, D., Kozlov, A. M., Stamatakis, A., Morel, B., & Flouri, T. (2020). ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of dna and protein evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution*, 37 (1), 291–294, doi: 10.1093/molbev/msz189
- Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., & Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12, 499–510.
- Díaz, B. G., Zucchi, M. I., Alves-Pereira A., de Almeida C. P., Moraes A. C. L., & Vianna S. A. (2021). Genome-wide SNP analysis to assess the genetic population structure and diversity of *Acrocomia* species. *PLoS ONE*, 16(7), e0241025. doi:10.1371/journal.pone.0241025
- Doyle, J.J., & Doyle, J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Dray, S., & Dufour A. (2007). The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22 (4), 1–20. doi:10.18637/jss.v022.i04
- Earl, D. A. & vonHoldt, B. M. (2012) Structure harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., & Buckler, E. S. (2011) a robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6(5): e19379. doi:10.1371/journal.pone.0019379
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.

- Fernandes, G. W., Barbosa, N. P. U., Negreiros, D., & Paglia A. P. (2014). Challenges for the conservation of vanishing megadiverse rupestrian grasslands *Natureza e Conservação*, 2, 162-165. doi: 10.1016/j.ncon.2014.08.003
- Fernández-Mazuecos, M., Mellers, G., Vigalondo, B., Llorenç, S. Vargas P., & Glover B.J. (2017). Resolving recent plant radiations: power and robustness of genotyping-by-sequencing. *Systematic Biology*, 67, 250–268.
- Fiorini, C. F., Miranda, M. D., Silva-Pereira, V., Barbosa, A. R., Oliveira, U. D., Kamino, L. H. Y., Mota, N. F. D. O., Viana, P. L., & Borba, E. L. (2019). The phylogeography of *Vellozia auriculata* (Velloziaceae) supports low zygotic gene flow and local population persistence in the campo rupestre, a Neotropical OCBIL. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 191, 381–398.
- Fiorini, C. F., Borba, E. L., Resende-Moreira, L. C., Smidt, E. C., & Knowles, L. L. (2023). Geographic isolation alone does not explain divergence of a group of orchid across Brazil's campos rupestres sky-islands, *Evolution*, qpad010. doi: 10.1093/evolut/qpad010
- Gamisch, A., & Comes, H. P. (2019). Clade-age-dependent diversification under high species turnover shapes species richness disparities among tropical rainforest lineages of *Bulbophyllum* (Orchidaceae). *BMC Evolutionary Biology*, 19, 93. doi: 10.1186/s12862-019-1416-1
- Giulietti, A. M., & Pirani, J. R. (1988). Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. *Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns*, 39–69.
- Hopper, S. D., Lambers, H., Silveira, F. A. O., & Fiedler, P. L. (2021). OCBIL theory examined: reassessing evolution, ecology and conservation in the world's ancient, climatically buffered and infertile landscapes, *Biological Journal of the Linnean Society*, 133, 266–296. doi: 10.1093/biolinnean/blaa213
- Jombart, T., & Ahmed, I. (2011). adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27, 3070–3071. doi:10.1093/bioinformatics/btr521
- Kozlov, A & Stamatakis, A. (2019). Using RAxML-NG in Practice. *Preprints*, 2019050056. doi: 10.20944/preprints201905.0056.v1
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences

- across K. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1179–1191. doi: 10.1111/1755-0998.12387
- Kubatko, L. S. & Degnan, J. H. (2007). Inconsistency of phylogenetic estimates from concatenated data under coalescence. *Systematic Biology*, 56, 17–24. doi: 10.1080/10635150601146041.
- Leal, B. S. S., Palma-da-Silva, C., & Pinheiro, F. (2016). Phylogeographic studies depict the role of space and time scales of plant speciation in a highly diverse Neotropical region. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35, 215–230. doi: 10.1080/07352689.2016.1254494
- López de Heredia U., Mora-Márquez F., Goicoechea P.G., Guillardín-Calvo L., Simeone M.C., & Soto Á. (2020). ddRAD Sequencing-Based Identification of Genomic Boundaries and Permeability in *Quercus ilex* and *Q. suber* Hybrids. *Frontiers in Plant Science*, 11, 564414. doi: 10.3389/fpls.2020.564414.
- Maddison, W. P. & Maddison, D.R. (2021). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.70 <http://www.mesquiteproject.org>
- Malinsky, M., Svardal, H., Tyers, A. M., Miska, E. A., Genner, M. J., Turner, G. F., Durbin, R. (2018). Whole-genome sequences of Malawi cichlids reveal multiple radiations interconnected by gene flow. *Nature Ecology and Evolution*, 2, 1940–1955. doi: 10.1038/s41559-018-0717-x.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species*. New York: Columbia University Press.
- Miola, D.T.B., Ramos, V.D.V., & Silveira, F.A.O. (2021). A brief history of research in campo rupestre: identifying research priorities and revisiting the geographical distribution of an ancient, widespread Neotropical biome. *Biological Journal of the Linnean Society*, 133, 464–480. doi: 10.1093/biolinnean/blaa175.
- Muniz, A. C., Pimenta, R. J. G., Cruz, M. V., Rodrigues, J. G., Buzatti, R. S. D. O., Heuertz, M., Lemos-Filho, J. P., & Lovato, M. B. (2022). Hybrid zone of a tree in a Cerrado/Atlantic Forest ecotone as a hotspot of genetic diversity and conservation. *Ecology and Evolution*, 12, e8540. doi:10.1002/ece3.8540
- Nunes, E. L. P., Maldonado, P. E., Smidt, E.C., Stutzel T., & Coan A.I. (2017). Floral micromorphology and anatomy and its systematic application to Neotropical *Bulbophyllum* section *Micranthae* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 183, 294–315. doi: 10.1093/botlinnean/bow007

- Papadopulos, A. S. T., Igea, J., Smith, T. P., Hutton, I., Baker, W. J., Butlin, R. K. & Savolainen, V. (2019). Ecological speciation in sympatric palms: 4. Demographic analyses support speciation of *Howea* in the face of high gene flow. *Evolution*, 73, 1996-2002. doi: 10.1111/evo.13813
- Paris, J. R., Stevens, J. R., & Catchen, J. M. (2017). Lost in parameter space: a road map for stacks. *Methods in Ecology and Evolution*, 8, 1360–1373. doi:10.1111/2041210X.12775
- Pease, J. B., Haak., D. C. Haln, M. W., & Moyle, L. C. (2016). Phylogenomics reveals three sources of adaptive variation during a rapid radiation. *PLoS Biology*, 14: e1002379. doi: 10.1371/journal.pbio.1002379
- Poland, J. A., Brown, P. J., Sorrells, M. E., & Jannink, J.L. (2012). Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS ONE*, 7: e32253. doi: 10.1371/journal.pone.0032253
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- R Core Team. (2020). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>
- Ramos, A. C. S., Lemes-Filho, J. P., Ribeiro, R. A., Santos, F. R., & Lovato, M. B. (2007). Phylogeography of the Tree *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae) and the Influence of Quaternary Climate Changes in the Brazilian Cerrado. *Annals of Botany*, 100, 1219-1228. doi: 10.1093/aob/mcm221
- Rapini, A., P. L. Ribeiro, S. Lambert, & J. R. Pirani. (2008). A flora dos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade*, 4, 15–23.
- Rapini, A., Bitencourt, C., Luebert, F., & Cardoso, D. (2021). An escape-to-radiate model for explaining the high plant diversity and endemism in campos rupestre. *Biological Journal of the Linnean Society*, 133, 481-498.
- Resende-Moreira, L. C., Knowles, L. L., Thomaz A. T., Prado, J. R., Souto, A. P., Lemos-Filho, J., & Lovato, M. B. (2018). Evolving in isolation: genetic tests reject recent connections of Amazonian savannas with the central Cerrado. *Journal of Biogeography*, 46, 196-211. doi: 10.1111/jbi.13468
- Ribeiro, P. L., Borba, E. L., Smidt, E. de C., Lambert, S. M., Schnadelbach, A. S., & van den Berg, C. (2008). Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum*

- (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution*, 270(1–2), 109–137. doi:10.1007/s00606-007-0603-5
- Ribeiro, P. L., Rapini, A., Damascena, L. S., & van den Berg, C. (2014). Plant diversification in the Espinhaço Range: Insights from the biogeography of *Minaria* (Apocynaceae). *Taxon*, 63, 1253–1264
- Rochette, N. C., Rivera-Colón, A. G., & Catchen, J. M. (2019). Stacks 2: analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. *Molecular Ecology*, 28, 4737–4754. doi:10.1111/mec.15253
- Roy, S. C., Moitra, K., & De Sarker, D. (2017). Assessment of genetic diversity among four orchids based on ddRAD sequencing data for conservation purposes. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23, 169–183. doi: 10.1007/s12298-016-0401-z.
- Rull, V. (2011). Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 26, 508–513.
- Silveira, F. A. O., Negreiros, D., Barbosa, N. P. U., Buisson, E., Carmo, F. F., Carstensen, D. W., & Lambers, H. (2016). Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant and Soil*, 403, 129–152. doi: 10.1007/s11104-015-2637-8
- Souza, E. R., Lewis, G. P., Forest, F., Schnadelbach, A. S., van den Berg C., & Queiroz, L. P. (2013). Phylogeny of *Calliandra* (Leguminosae: Mimosoideae) based on nuclear and plastid molecular markers. *Taxon*, 62, 1200–1219.
- Smidt, E. C. (2007). Filogenia e revisão taxonômica de *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) ocorrentes no Neotrópico. PhD Dissertation. Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Smidt, E. C., Borba, E. L., Gravendeel, B., Fischer, G. A., & van den Berg, C. (2011). Molecular phylogeny of the Neotropical sections of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) using nuclear and plastid spacers. *Taxon*, 60(4), 1050–1064.
- Smidt, E. C., Gallo L. W., & Scatena, V. L. (2013). Leaf anatomical and molecular studies in *Bulbophyllum* section *Micranthae* (Orchidaceae) and their implications for systematics. *Brazilian Journal of Botany*, 36, 75–82.
- Swofford, D. L. (2003). PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland.

- Thomaz, A. T., Malabarba, L. R., & Knowles, L. L. (2017). Genomic signatures of paleodrainages in a freshwater fish along the southeastern coast of Brazil: genetic structure reflects past riverine properties. *Heredity*, 119, 287–294. doi:10.1038/hdy.2017.46
- Vasconcelos, T. N. C., Alcantara, S., Andriano, C. O., Forest, F., Reginato, M., Simon, M. F., & Pirani, J. R. (2020). Fast diversification through a mosaic of evolutionary histories characterizes the endemic flora of ancient Neotropical mountains. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 287, 20192933.
- Vargas, O. M., Ortiz E. M., & Simpson B. B. (2017). Conflicting phylogenomic signals reveal a pattern of reticulate evolution in a recent high-Andean diversification (Asteraceae: Astereae: *Diplostephium*). *New Phytology*, 214, 1736-1750. doi: 10.1111/nph.14530
- Wagner, N. D., Clements, M. A., Simpson, L., & Nargar, K. (2021). Conservation in the face of hybridisation: genome-wide study to evaluate taxonomic delimitation and conservation status of a threatened orchid species. *Conservation Genetics*, 22, 151-168. doi: 10.1007/s10592-020-01325-y
- Wu, C. I. (2001). The genic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 14, 851-865. doi: 10.1046/j.1420-9101.2001.00335.x
- Zavala-Páez, M., Vieira, L. D. N., de Baura, V. A., Balsanelli, E., de Souza E. M., Cevallos, M. C., Chase, M. W., & Smidt, E. C. (2020). Comparative plastid genomics of Neotropical *Bulbophyllum* (Orchidaceae; Epidendroideae). *Frontiers in Plant Science*, 11, 799. doi: 10.3389/fpls.2020.00799

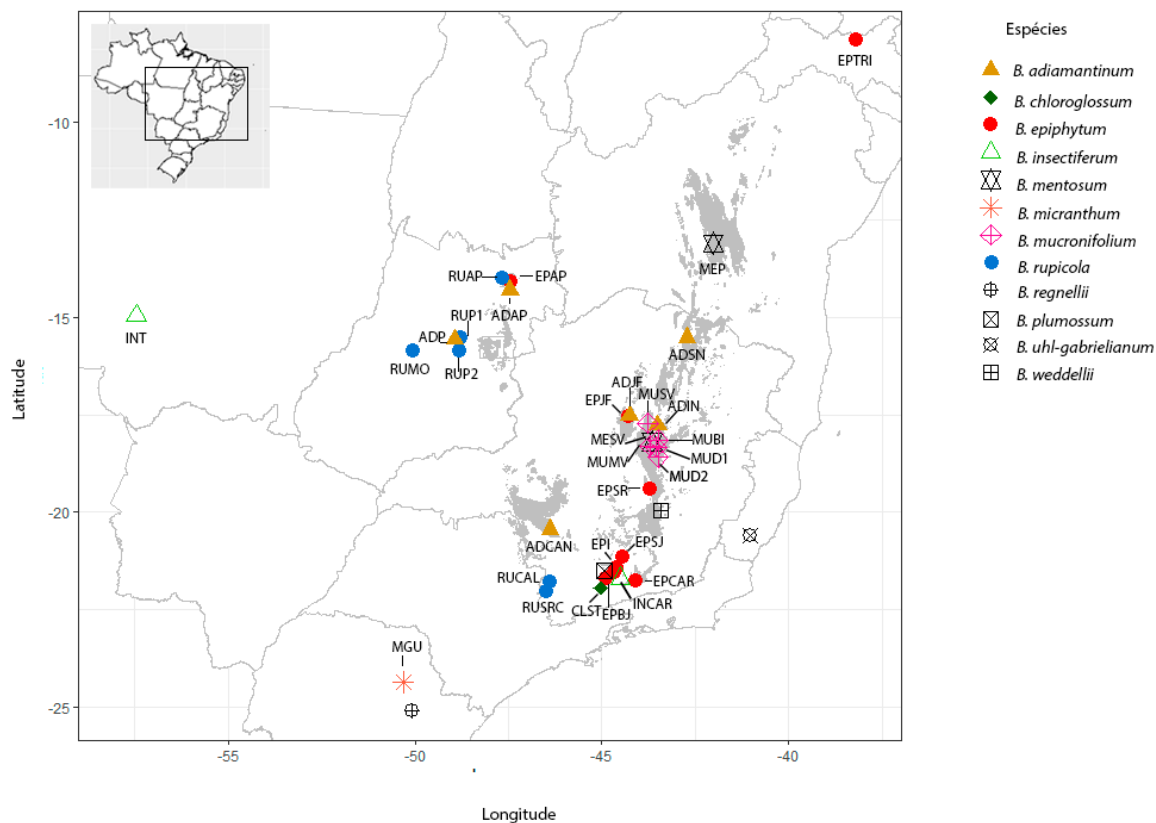


Figura 1. Localização geográfica das populações amostradas de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* e dos grupos externos. Os diferentes símbolos representam cada espécie incluída nas análises realizadas. Regiões de campos rupestres (baseado em Silveira et al., 2016) estão demarcada como manchas cinzas no mapa.

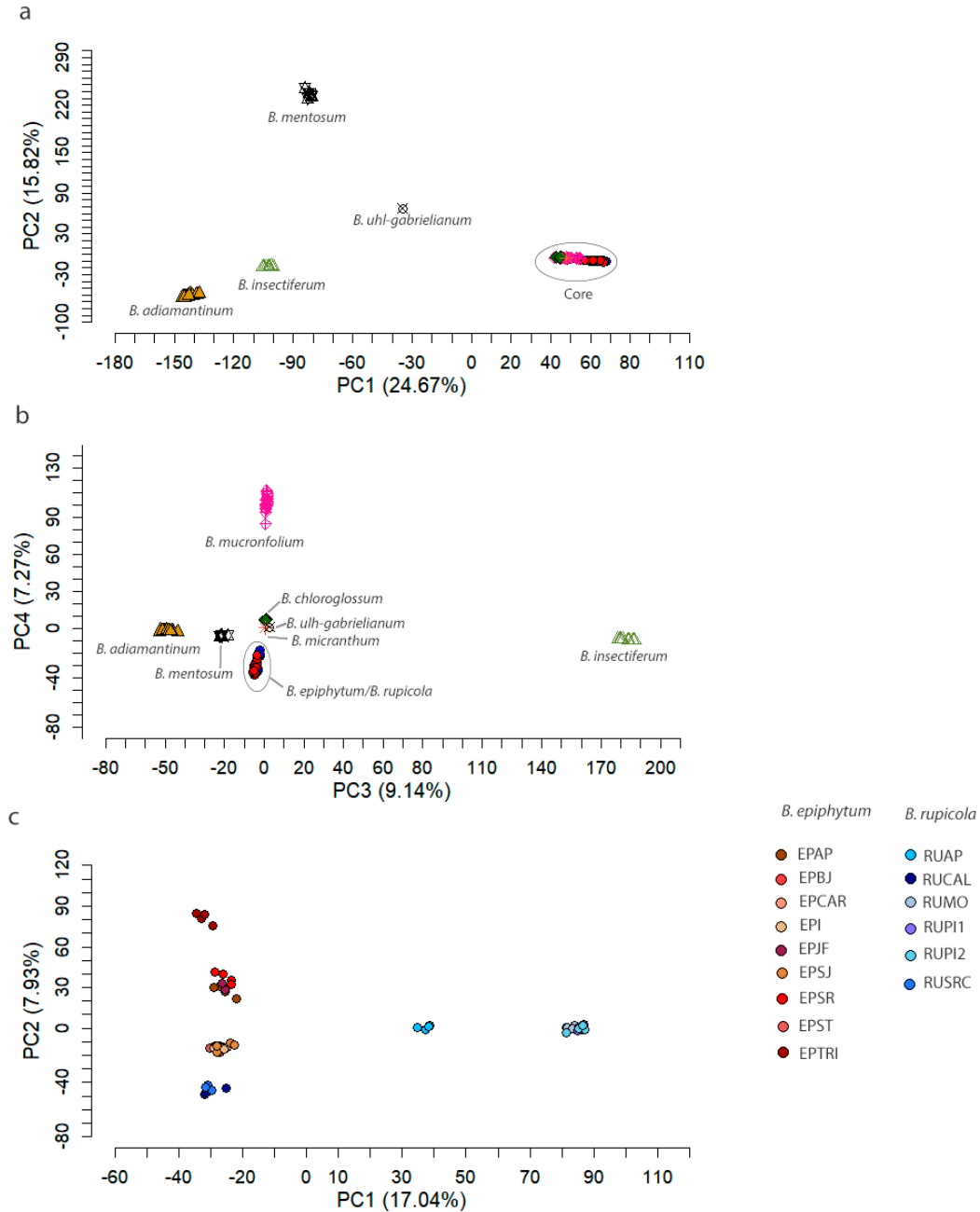


Figura 2. Análise de componentes principais (PCA) de 122 indivíduos de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*. Representação gráfica dos dois primeiros eixos (a) e do terceiro e quarto eixos (b) das análises realizadas utilizando todas as populações. PCA realizado apenas com as populações de *B. epiphytum* e *B. rupicola* (c). Diferentes cores representam espécies distintas em (a) e (b), ou populações distintas em (c). A quantidade de variação explicada por cada eixo da PCA é dada entre parênteses.

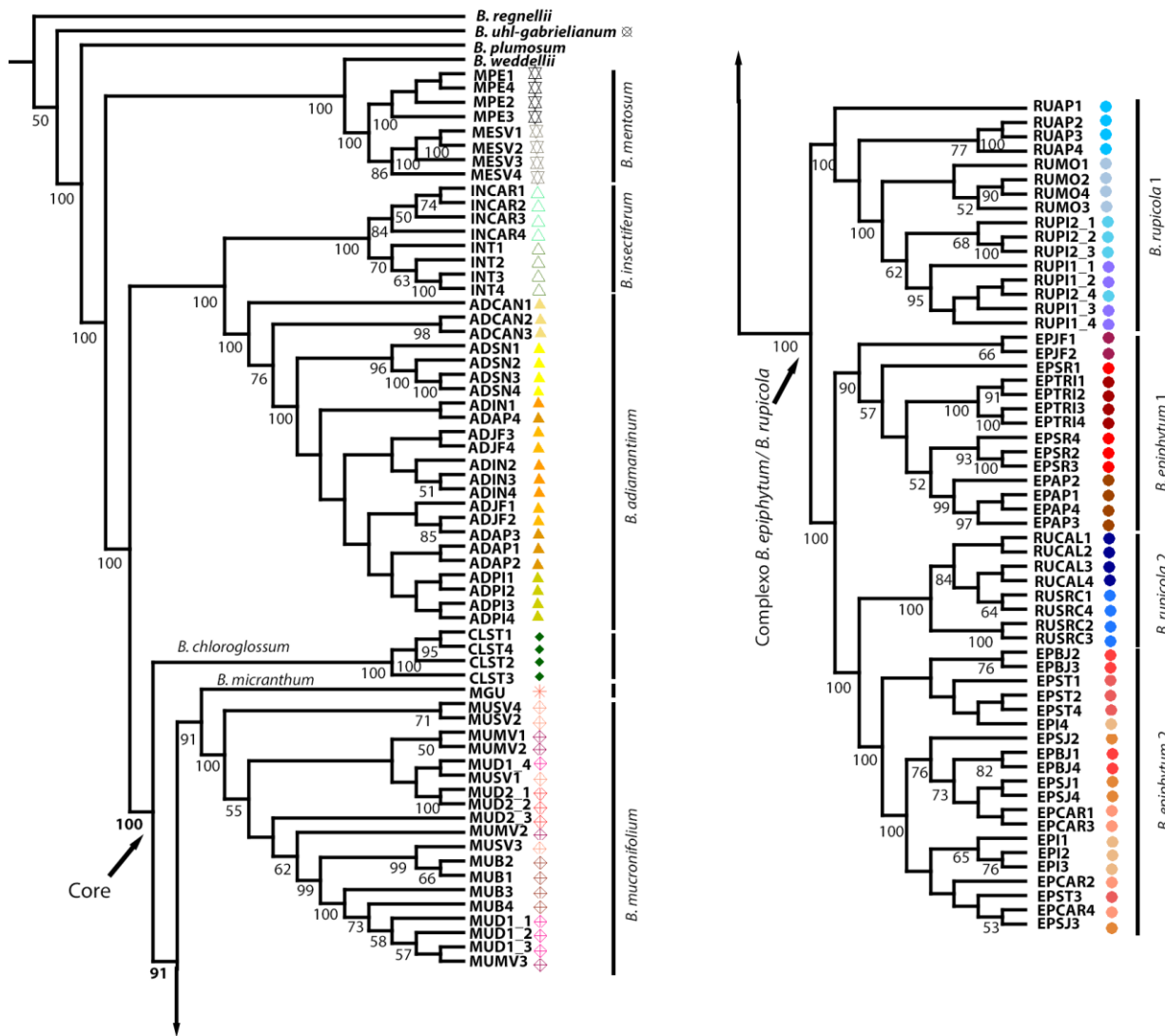


Figura 3. Relações filogenéticas das espécies de *Bulbophyllum* analisadas com SVDQuartets a partir de dados genômicos. Números abaixo dos ramos correspondem aos valores de suporte (bootstrap > 50%). Clados principais foram nomeados, diferentes espécies receberam símbolos distintos, cada cor representa uma população e os indivíduos estão discriminados nos terminais.

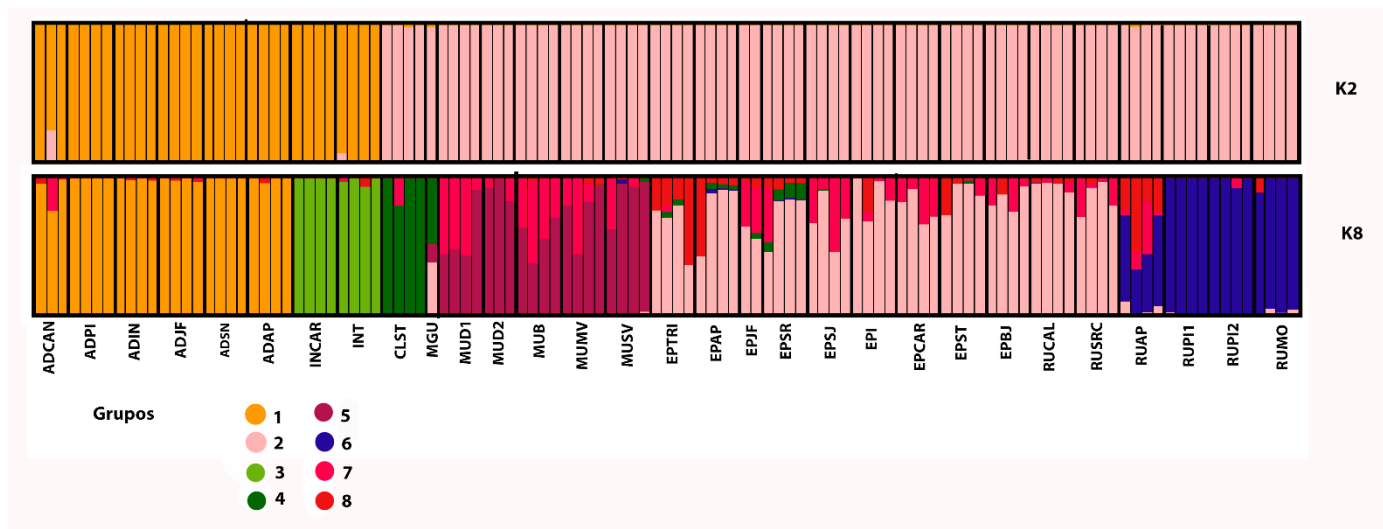


Figura 4. Análise de estruturação genética das populações de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* realizada no Structure. As cores em cada barra representam a proporção de ancestralidade para cada indivíduo para K=2 e K=8. Siglas abaixo de cada conjunto de indivíduos identificam a população analisada.

Tabela 1 Espécies e populações de *Bulbophyllum* amostradas. Acrônimos para os estados brasileiros: BA= Bahia, ES=Espírito Santo, GO=Goiás, MG=Minas Gerais, MT=Mato Grosso, PE=Pernambuco, PR=Paraná. Vouchers depositados no herbário BHCB.

Espécie/População (n)	Município	Coordenadas	Voucher
<i>B. adiamantinum</i>			
ADAP (4)	Alto Paraíso de Goiás-GO	14°4'32''S, 47°31'1''W	Rodrigues, JG 10
ADCAN (3)	São Roque de Minas-MG	20°13'31"S, 46°27'06"W	Fiorini, C 549
ADIN (4)	Inhaí-MG	17°59'33''S, 43°35'53''W	Rodrigues, JG 513
ADJF (4)	Joaquim Felício-MG	17°41'25''S, 44°19'96''W	Rodrigues, JG 49
ADPI (4)	Pirenópolis-GO	15°48'13''S, 48°50'11''W	Rodrigues, JG 292
ADSN (4)	Serra Nova-MG	15°38'47''S, 42°44'33''W	Rodrigues, JG 358
<i>B. chloroglossum</i>			
CLST (4)	São Thomé das Letras-MG	21°44'13''S, 45°01'12''W	Rodrigues, JG 204
<i>B. epiphytum</i>			
EPAP (4)	Alto Paraíso de Goiás-GO	13°54'12''S, 47°23'07''W	Rodrigues, JG 02
EPBJ (4)	Bom Jardim-MG	21°54'28"S, 44°10'49"W	Fiorini, C 02
EPCAR (4)	Carrancas-MG	21°28'16''S, 44°40'53''W	Rodrigues, JG 128
EPI (4)	Itutinga-MG	21°18'30"S, 44°38'36"W	Rodrigues, JG 540
EPJF (2)	Joaquim Felício-MG	17°41'29"S, 44°11'55"W	Fiorini, C 439
EPSR (4)	Santana do Riacho-MG	19°19'34''S, 43°33'43''W	Rodrigues, JG 520
EPSJ (4)	São João Del Rey-MG	21°08'37"S, 44°18'08"W	Rodrigues, JG 524
EPST (4)	São Thomé das Letras-MG	21°43'31''S, 45°00'27''W	Rodrigues, JG 177
EPTRI (4)	Triunfo-PE	7°50'00''S, 38°04'05''W	Fiorini, C 976
<i>B. insectiferum</i>			
INCAR (4)	Carrancas-MG	21°30'08''S, 44°36'10''W	Rodrigues, JG 123
INT (4)	Tangará da Serra-MT	14°43'09''S, 57°25'49''W	Rodrigues, JG 240
<i>B. mentosum</i>			
MEP (4)	Piatã-BA	13°04'14''S, 41°53'47''W	Rodrigues, JG 392
MESV (4)	São Joao da Chapada-MG	17°57'40"S, 43°47'10"W	Fiorini, C 314
<i>B. micranthum</i>			
MGU(1)	Tibagi-PR	24°33'22''S, 50°15'25''W	Fiorini, C 621
<i>B. mucronifolium</i>			
MUB (4)	Diamantina-MG	18°10'24"S, 43°31'47"W	Rodrigues, JG 549
MUD1 (4)	Diamantina-MG	18°12'24"S, 43°33'58"W	Rodrigues, JG 500
MUD2 (3)	Diamantina-MG	18°14'39"S, 43°38'22"W	Rodrigues, JG 502
MUMV (4)	Milho Verde-MG	18°26'41"S, 43°27'55"W	Rodrigues, JG 550
MUSV (4)	São Joao da Chapada-MG	18°12'24''S, 43°33'58''W	Fiorini, C 359
<i>B. rupicola</i>			
RUAP (4)	Alto Paraíso de Goiás-GO	14°4'32''S, 47°31'1''W	Rodrigues, JG 20

RUCAL (4)	Caldas-MG	21°58'43''S, 46°22'15''W	Rodrigues, JG 172
RUMO (4)	Mossâmedes-GO	16°04'44"S, 50°11'31"W	Rodrigues, JG 321
RUPI1 (4)	Pirenópolis-GO	15°48'13''S, 48°50'11''W	Rodrigues, JG 274
RUPI2 (4)	Pirenópolis-GO	15°42'44"S, 48°53'30"W	Rodrigues, JG 332
RUSRC (4)	Santa Rita de Caldas-MG	21°59'58.7", 46°22'40"W	Fiorini, C 190
<i>B. plumosum</i> (1)	São Thomé das Letras-MG	21°44'13"S, 45°01'12"W	Rodrigues, JG 197
<i>B. regnellii</i> (1)	Ponta Grossa-PR	25°14'48"S, 50°0'17"W	Fiorini, C 637
<i>B.uhl-gabrielianum</i> (1)	Castelo-ES	20°31'26"s, 41°05'44"W	Rodrigues, JG 600
<i>B. weddellii</i> (1)	Catas Altas-MG	20°05'01"S, 43°27'29"W	Fiorini, C 765

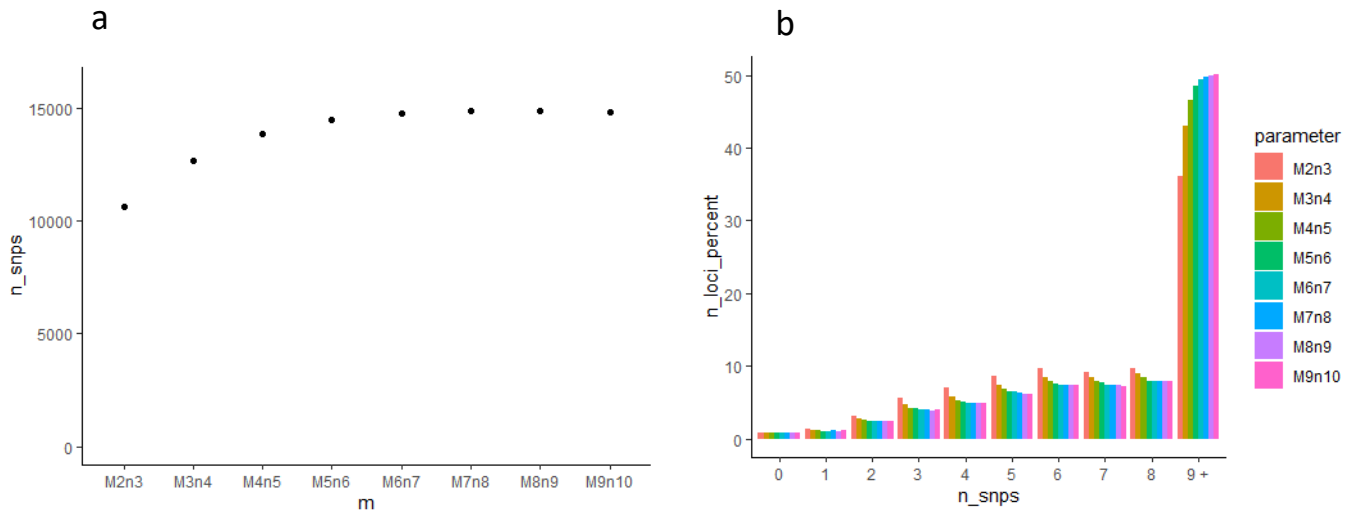


Figura S1: Seleção de parâmetros para análise *de novo* no Stacks para as amostras das espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* conjuntamente com os grupos externos seguindo recomendações de Rochette & Catchen (2017). A cobertura mínima utilizada nos testes foi de três *reads* por locus ($m=3$). Em a) número de SNPs retidos em pelo menos 80% dos indivíduos e b) porcentagem de *loci* obtidos com as diferentes combinações de parâmetros.

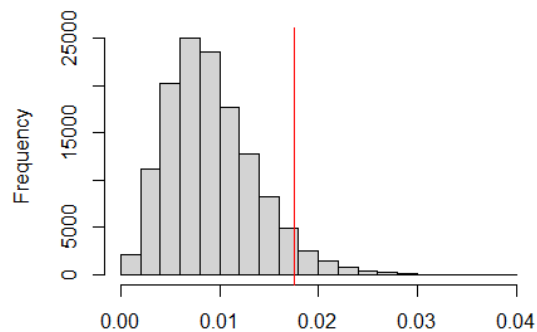


Figura S2. Histograma da frequência de *loci* com diferentes valores de variabilidade genética (baseada no valor estimado de theta) para as amostras de *Bulbophyllum*. sect. *Micranthae* conjuntamente com os grupos externos. A linha vermelha indica o quantil de variabilidade maior do que 95%.

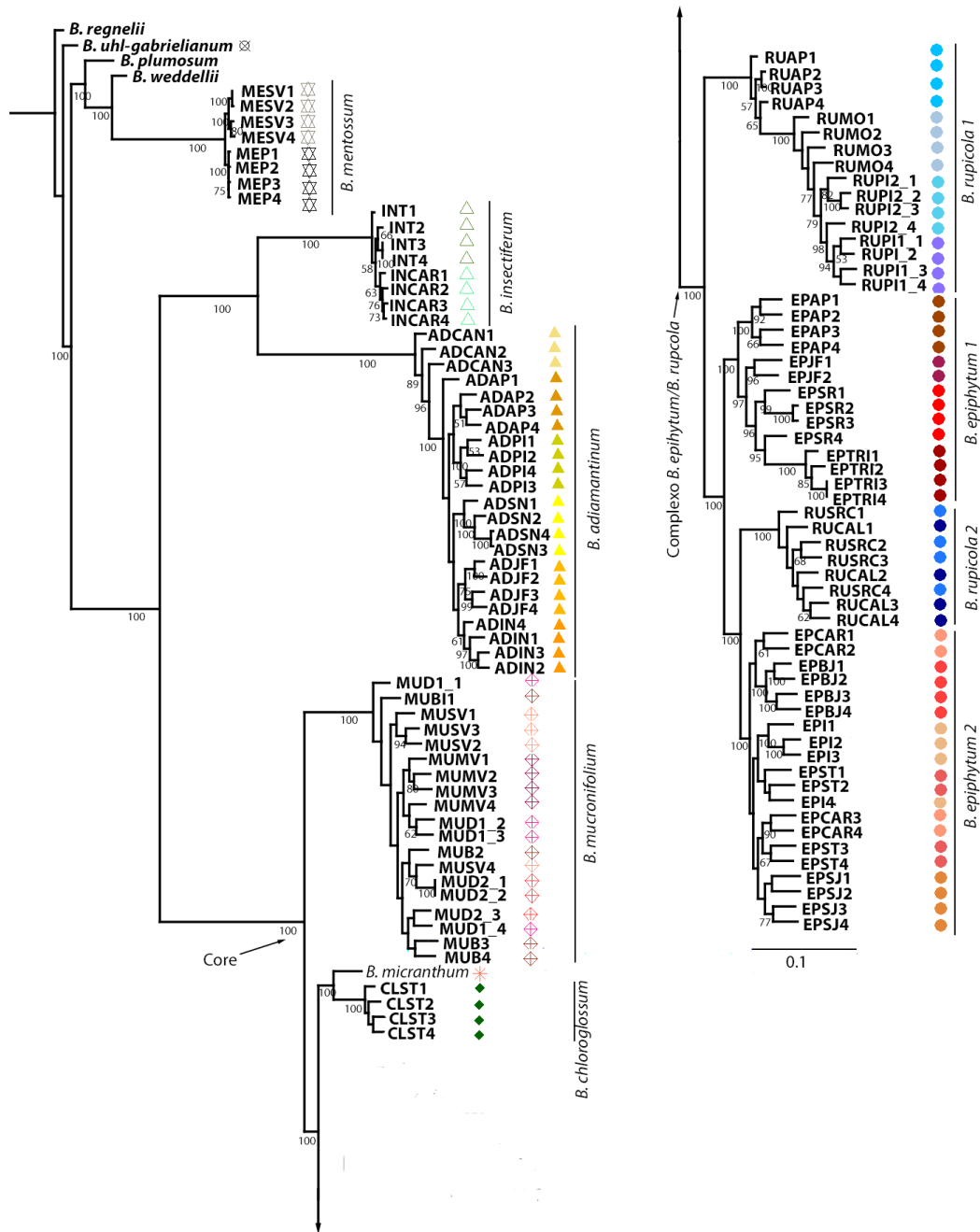


Figura S3. Árvore de máxima verossimilhança de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* inferida com RAxML à partir de dados genômicos concatenados. Os números abaixo dos ramos correspondem aos valores de suporte (bootstrap $\geq 50\%$). Clados principais foram nomeados, diferentes espécies receberam símbolos distintos, cada cor representa uma população e os indivíduos estão discriminados nos terminais.

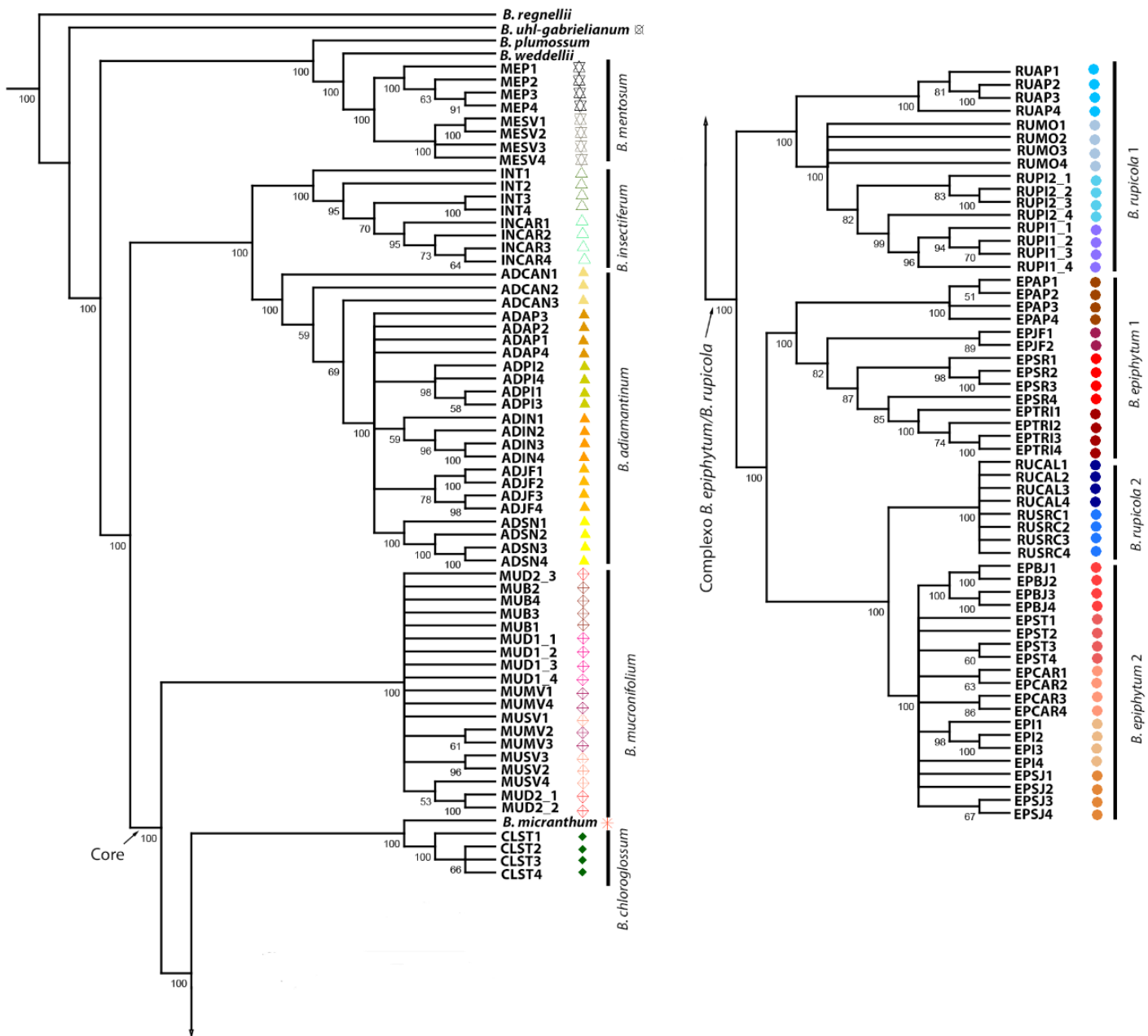


Figura S4. Árvore de consenso strito das árvores mais parcimoniosas de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* inferidos com PAUP à partir de dados genômicos concatenados. Números abaixo dos ramos correspondem aos valores de suporte (bootstrap > 50%). Clados principais foram nomeados, diferentes espécies receberam símbolos distintos, cada cor representa uma população e os indivíduos estão discriminados nos terminais.

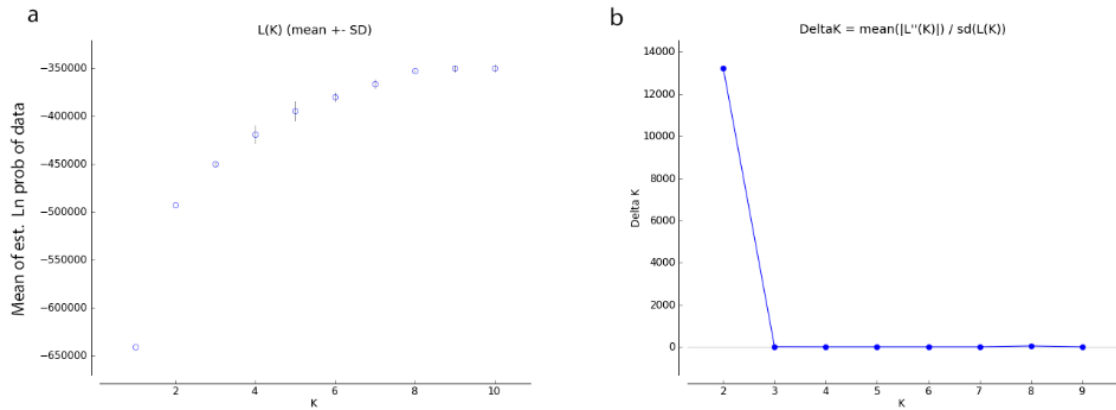


Figura S5. Gráficos com valores de (a) $L(K)$ e (b) ΔK gerados com o software STRUCTURE HARVESTER para as análises realizadas no Structure com todas as amostras de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*.

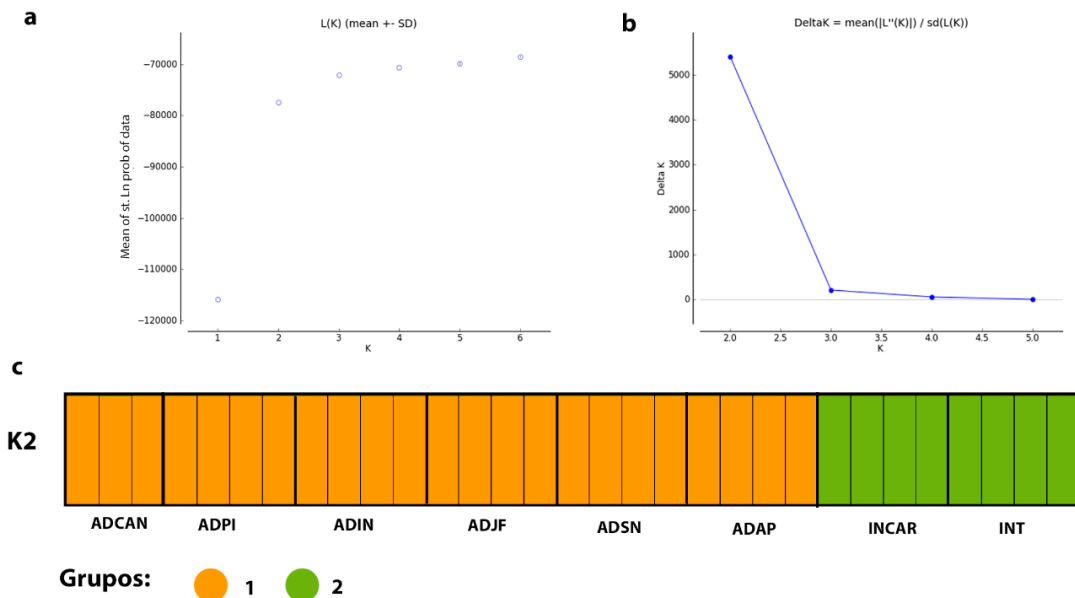


Figura S6. Análise de estruturação genética das populações de *Bulbophyllum adiamantinum* e *B. insectiferum*. a) valores de $L(K)$, b) ΔK , c) plots das análises de agrupamento bayesiano no STRUCTURE com a proporção de ancestralidade dos indivíduos para $K=2$. A proporção de cada cor em cada barra representa a probabilidade do indivíduo pertencer a cada cluster.

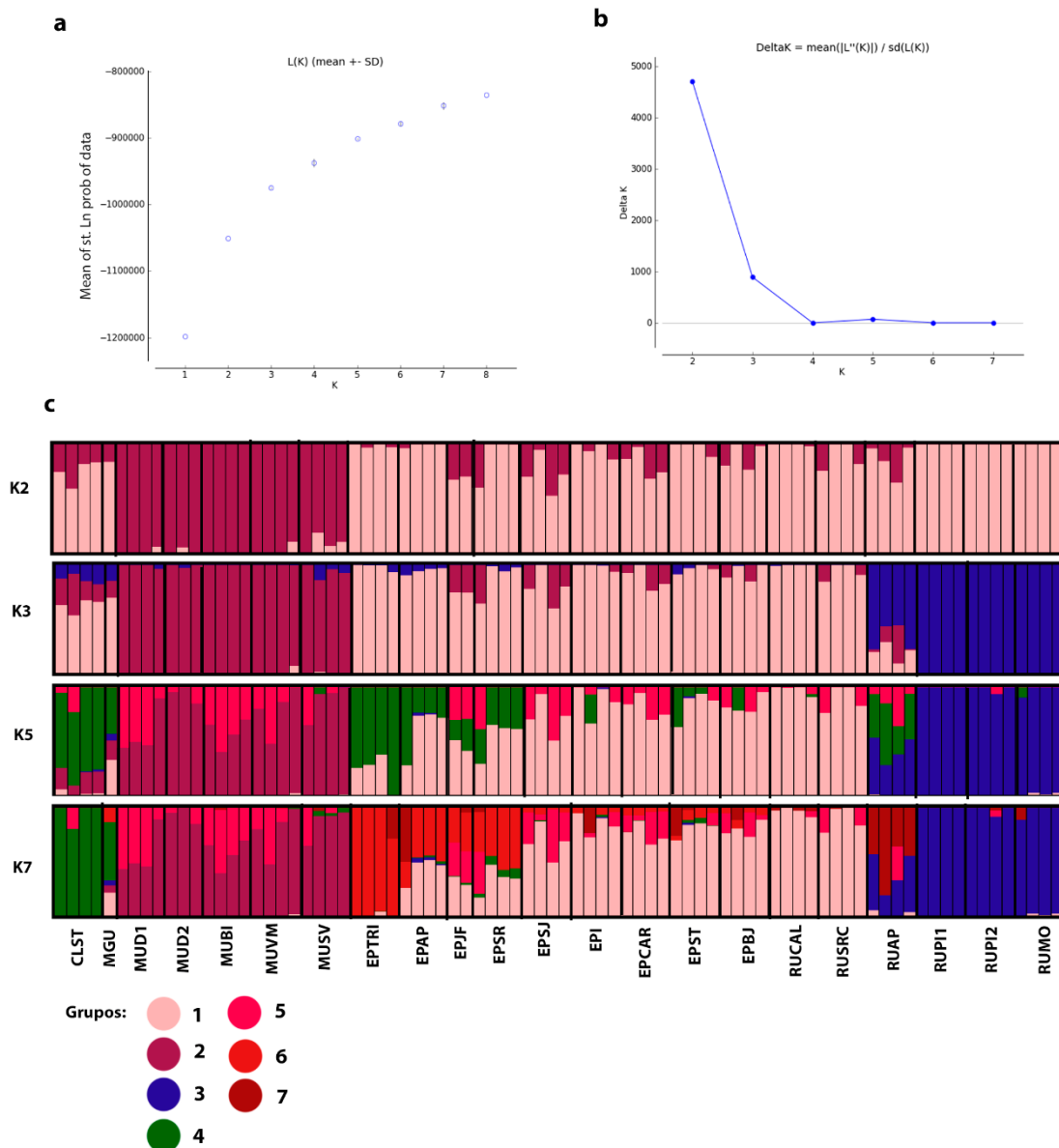


Figura S7. Análise de estruturação genética das populações do grupo *core* de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* (*B. chloroglossum*, *B. micranthum*, *B. mucronifolium*, *B. epiphytum* e *B. rupicola*). a) valores de L(K), b) DeltaK, c) plots das análises de agrupamento bayesiano no STRUCTURE com a proporção de ancestralidade dos indivíduos para K=2, K=3, K=5 e K=7. A proporção de cada cor em cada barra representa a probabilidade do indivíduo pertencer a cada cluster.

Tabela S1. Tabela output das análises conduzidas com o programa Structure geradas pelo software Structure Haverster. Observa-se que o maior valor de deltaK para *Bulbophyllum* sect. *Micranthea* é K=2 com segundo maior valor em K=8.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	10	-640466,150000	11,535477	—	—	—
2	9	-492876,888889	7,931180	147589,261111	104933,912222	13230,555410
3	10	-450221,540000	1792,741319	42655,348889	11532,218889	6,432729
4	10	-419098,410000	9455,883907	31123,130000	6676,160000	0,706032
5	10	-394651,440000	10008,568721	24446,970000	9787,990000	0,977961
6	10	-379992,460000	4173,129819	14658,980000	1080,580000	0,258938
7	10	-366414,060000	4562,221148	13578,400000	288,760000	0,063294
8	10	-353124,420000	249,416037	13289,640000	10645,740000	42,682660
9	10	-350480,520000	3383,595698	2643,900000	2295,600000	0,678450
10	10	-350132,220000	3298,971483	348,300000	—	—

CAPÍTULO 2

ANÁLISE MORFOMÉTRICA EM *BULBOPHYLLUM* SECT. *MICRANTHAE* (ORCHIDACEAE)

ANÁLISE MORFOMÉTRICA EM *BULBOPHYLLUM* SECT. *MICRANTHAE* (ORCHIDACEAE)

Resumo

Nós empregamos análises morfométricas, tanto provenientes de estruturas vegetativas quanto de estruturas florais, em espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*, a fim de entender a variação morfológica e auxiliar na identificação de caracteres taxonomicamente informativos. Nós utilizamos análise multivariadas em 26 caracteres morfológicos em 119 indivíduos de 26 populações representando oito espécies da seção. Os dados morfológicos combinados na análise de ordenação mostraram uma clara distinção da maioria das espécies descritas para a seção, exceto nas amostras do complexo *B. epiphytum*/*B. rupicola*. Quando utilizados conjuntamente os dados vegetativos e florais na análise de variáveis canônicas, utilizando as populações como variável categórica resposta, foi possível recuperar as espécies do complexo com alto grau de precisão. O valor taxonômico dos caracteres florais foi mais significativo que os caracteres vegetativos para distinção dos agrupamentos, além disso foi observado grande variação e plasticidade fenotípica nas estruturas foliares em todas as espécies analisadas da seção, o que pode tornar a taxonomia do grupo ainda mais árdua.

Palavras-chave: Morfometria. Complexo de espécies. Taxonômica. *Bulbophyllum*. Orchidaceae

1. Introdução

A especiação é um processo complexo pelo qual uma população ancestral se torna dois ou mais táxons distintos (Mayr, 1942). A delimitação de uma espécie é um dos grandes desafios para os sistematas, já que nem sempre há uma conexão entre o processo de especiação e diferenças morfológicas observadas entre as espécies. Isso se deve ao fato do fenótipo ser considerado como um produto das informações genéticas herdáveis, mas também da sua interação com ambiente (Prada et al., 2008). Há, entretanto, casos em que a morfologia não é suficiente para identificação de um táxon. Em casos de hibridação, algo relativamente comum nas plantas vasculares e que possui um papel importante na sua evolução (Ellstrand et al., 1996), os descendentes nem sempre são facilmente diferenciados morfologicamente dos parentais (Soltis & Soltis 2009). Espécies crípticas (morfologicamente indistinguíveis) também são passíveis de serem ignoradas se estivermos olhando apenas para os caracteres morfológicos para reconhecer uma espécie.

No gênero *Bulbophyllum* (Orchidaceae), algumas espécies possuem uma taxonomia desafiadora apresentando morfologia vegetativa uniforme, e a separação das espécies é apenas possível por pequenas características florais que são de difícil reconhecimento, especialmente em materiais de herbário. Dentre estes grupos de taxonomia complexa, há *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*, que compreende 12 espécies, distribuídas pelo Brasil e chega até a Bolívia ocorrendo em campos rupestres (Smidt, 2007). As espécies da seção são caracterizadas por serem plantas pequenas (5-10 cm), geralmente rupícolas ou epífitas apresentando flores pediceladas espiraladas, unifoliadas com pseudobulbos piriformes a fusiformes (Smidt et al., 2011). Nas análises moleculares conduzidas no clado Neotropical de *Bulbophyllum* (Smidt et al. 2011), foram utilizadas oito espécies de *B.* sect. *Micranthae*. Nesta análise *B. mentosum* Barb. Rodr. Foi recuperada como irmã das demais espécies da seção. As espécies restantes formam dois clados bem sustentados. O primeiro composto por espécies de folhas cilíndricas e flores púrpuras, formado por *B. adiamantinum* Brade e *B. insectiferum* Barb. Rodr., e outro clado (grupo *core*) com as demais espécies da seção (*B. chloroglossum* Rchb.f. & Warm., *B. epiphytum* Barb. Rodr., *B. micranthum* Barb. Rodr., *B. mucronifolium* Rchb.f. & Warm. e *B. rupicola* Barb. Rodr.).

Um grupo de particular atenção do grupo *core* é o composto por *B. rupicola*, que é muito próxima de *B. epiphytum*. As duas espécies são intimamente relacionadas e a distinção entre elas é problemática. Geralmente, as duas espécies são diferenciadas principalmente pelo hábito

(rupícola x preferencialmente epífita), além de algumas características morfológicas, tais como tamanho e forma da folha, forma do pseudobulbo, tamanho das flores e forma do labelo (Smidt, 2007; Smidt et al., 2011). Apesar da semelhança morfológica entre este par de espécies, Nunes et al. (2017) identificaram caracteres que as diferem, como o formato do estigma e padrões de deposição de cutícula. Nas análises filogenéticas conduzidas tanto com marcadores moleculares quanto com dados anatômicos foliares, as duas espécies se encontram em um clado colapsado (Smidt et al., 2011; 2013). Rodrigues et al. (CAPÍTULO 3) não observaram isolamento reprodutivo entre estas espécies em tratamentos de polinizações manuais. Este resultado concorda com a sugestão de Azevedo et al. (2007) que, trabalhando com dados isoenzimáticos, observaram que poderia haver introgressão entre *B. epiphytum* e *B. rupicola*. Rodrigues et al. (CAPÍTULO 1), utilizando dados moleculares genômicos, sugeriram que há duas linhagens distintas entre as amostras analisadas de cada uma das duas espécies, indicando uma ausência de congruência com os limites morfológicos observados.

Em alguns grupos de orquídeas, os caracteres florais apresentam convergência devido a mecanismos de polinização e os caracteres vegetativos nestes grupos demonstraram ser mais informativos para identificar a proximidade filogenética entre as espécies (Van den Berg et al., 2000; Borba et al., 2002; Chase et al., 2009). Smidt et al. (2011) sugeriram que, em *Bulbophyllum*, os caracteres vegetativos poderiam ser mais informativos que os caracteres florais para a identificar a semelhança genética entre as espécies. Alguns traços vegetativos tendem a mostrar variação contínua e são facilmente influenciáveis pelo ambiente (Mulanda et al., 2015). Notamos que as espécies de *B. sect. Micranthae* que ocorrem em áreas abertas, onde há maior incidência de luz solar, aparentemente apresentam folhas menores e mais largas que aquelas de hábito epifítico. Entretanto, quando cultivadas com menor incidência de radiação solar e maior umidade, estes exemplares passam a produzir folhas maiores, indicando a ocorrência de plasticidade fenotípica (observação pessoal). A plasticidade fenotípica decorrente da variação no hábito de algumas destas espécies (especialmente *B. epiphytum* e *B. rupicola*) pode ocasionar equívocos na determinação da identidade de alguns táxons, principalmente se os caracteres utilizados na identificação sofrem alterações ambientais. Assim, determinar a extensão desta plasticidade e buscar novos caracteres para a identificação destas espécies é importante para a taxonomia do grupo. Além disto, uma vez que análises genéticas não conseguiram recuperar todas as espécies como *pools* gênicos distintos em *B. sect. Micranthae*, verificar a existência de

congruência entre estes com grupos morfológicos também pode ajudar a delimitar melhor estas espécies.

Uma ferramenta muito utilizada no auxílio do entendimento da variação morfológica e a circunscrição de taxa no nível específico e infra-específico é a análise morfométrica multivariada (Rohlf, 1990; Borba et al., 2002; 2007; Henderson, 2006; Pinheiro & De Barros 2007, 2009; Ribeiro et al., 2008; Vogel Ely et al., 2018; Menini Neto et al., 2019; Cruz-Lustre et al., 2020). As análises multivariadas têm sido particularmente úteis para traçar as diferenças entre os táxons ou descobrir caracteres mais importantes nas suas diferenciações (Marhold, 2011).

Apesar dos avanços dos estudos na seção, muito ainda permanece incerto na delimitação e entendimento das espécies e suas relações. Neste estudo investigamos a variação morfológica em oito espécies de *B. sect. Micranthae* por meio de análises morfométricas multivariadas utilizando caracteres morfológicos tanto vegetativos quanto florais a fim de auxiliar na taxonomia e reconhecimento das espécies que compõe a seção, a luz dos conceitos morfológicos de espécie, relacionando estes dados com análises genéticas recentemente conduzidas nas mesmas populações aqui amostradas.

2. Materiais e Métodos

2.1 Amostragem

Nós coletamos oito espécies de *B. sect. Micranthae*: *B. mentosum*, *B. adiamantinum*, *B. insectiferum*, *B. epiphytum*, *B. chloroglossum*, *B. micranthum*, *B. mucronifolium* e *B. rupicola* (Fig. 1). Na tentativa de abranger a variação morfológica observada ao longo da distribuição geográfica de cada espécie, nós amostramos 26 populações (Tab. 1, Fig. 2). A identificação das espécies foi baseada em Smidt (2007). Devido ao baixo número de indivíduos por população na natureza, algumas populações apresentam número limitado de indivíduos. Depositamos um voucher de cada população no herbário BHCB (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais) e conservamos as primeiras flores das inflorescências em etanol 70%. Também mantivemos em cultivo clones (ramets) dos indivíduos de cada população no Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG.

2.2 Caracteres morfológicos

De acordo com a variação morfológica observada na seção, selecionamos 26 caracteres morfológicos contínuos, nos quais cinco vegetativos e 21 florais (Tab. 2). Observamos que os caracteres vegetativos apresentaram plasticidade fenotípica após o cultivo em casa vegetação. Para incorporar as variações observadas, nós mensuramos os caracteres vegetativos diretamente em folhas e pseudobulbos completamente desenvolvidos na natureza (*in situ*) e aqueles que se desenvolveram totalmente em casa de vegetação (*ex situ*). Nós analisamos as primeiras flores de cada inflorescência, a fim de padronizar as amostras analisadas. Devido à pequena dimensão das flores, nós dissecamos as peças florais e as posicionamos entre lâmina e lamínula e fotografamos todas as peças florais com uma câmera SC30 Olympus adaptada à um esteromicroscópio SZX7 Olympus. A partir das fotos, nós mensuramos os caracteres com auxílio do software ImageJ v. 1.44 (Schneider et al., 2012).

2.3 Análises

Primeiramente, nós realizamos análise de componentes principais (PCA) utilizando todos os caracteres mensurados padronizados a fim de verificar se as variáveis selecionadas estão correlacionadas no programa R versão 4.0.3 (R Core Team 2020) utilizando os pacotes *vegan* 2.6 (Oksanen et al., 2022) e *ggplot2* (Wickham, 2016). As variáveis largura e espessura do labelo; largura da sépala lateral na base e no ponto de inflexão; o comprimento da sépala dorsal e sépala lateral; largura da folha *ex situ* e *in situ* e diâmetro da folha *in situ* e *ex situ* apresentaram alta correlação (>90%). Retiramos as variáveis espessura do labelo; largura da sépala lateral no ponto de inflexão; comprimento da sépala lateral; largura da folha *in situ* e diâmetro da folha *ex situ* aleatoriamente das análises subsequentes. Após retirar as variáveis correlacionadas, realizamos a PCA novamente. Não foram observados outliers na análise.

Utilizamos o software Statistica v.12.0 (TIBCO Statistica) para realizar análise de discriminantes e variáveis canônicas utilizando as populações de *B. epiphytum*, *B. rupicola* e *B. mucronifolium* como variável resposta buscando maximizar a correlação entre os grupos que apresentaram maior sobreposição nas análises de PCA (ver resultados). Devido ao baixo número amostral em algumas das populações dessas espécies, principalmente as populações de *B.*

epiphytum, nós fundimos algumas populações baseado nos resultados obtidos da PCA (ver resultados) na morfologia e origem geográfica dos indivíduos (Tab. 1). Quando não foi possível fazer o agrupamento das populações com baixa amostragem com base nessas premissas, nós as retiramos da análise (Tab. 1). Realizamos análise de agrupamento utilizando a matriz de distância de Mahalanobis entre os centroides de cada população e utilizando o algoritmo de agrupamento hierárquico de ligação média (UPGMA) e neighbor-joining (NJ) utilizando o pacote ape v 5.0 (Paradis & Schliep, 2019). Nós analisamos os dois conjuntos de dados, florais e vegetativos, tanto conjuntamente quanto separadamente a fim de observar os caracteres que mais contribuem para diferenciação das espécies e populações.

3. Resultados

Na análise de PCA das 26 populações de *B. sect. Micranthae*, utilizando os 26 caracteres tanto florais quanto vegetativos não correlacionados, os cinco primeiros eixos apresentaram autovalores maiores que 1, resumindo 84,2% da variância encontrada (Tab. S1). O primeiro eixo resume 55,2% da variância e está principalmente correlacionado positivamente ao tamanho do ovário, tamanho da sépala dorsal, largura da bráctea e da sépala e comprimento da pétala. No eixo 1, há a separação dos indivíduos de *B. mentosum* no extremo positivo (Fig. 3). Já no extremo negativo encontramos a separação das populações de *B. epiphytum* e *B. rupicola*, que se encontram sobrepostas, das demais espécies. Há um encadeamento das populações de *B. rupicola* no eixo 1, em que é possível observar uma separação de RUPI das populações de RUAP e RUCAL, enquanto que a população RUMO encontra-se sobrepostas as demais. No eixo 1 há ainda uma separação discreta entre das populações de *B. adiamantinum* das de *B. insectiferum*. O eixo 2 resume 11,4% da variação encontrada e está principalmente correlacionado negativamente ao comprimento do labelo e do pseudobulbo desenvolvido *in situ*. Neste eixo é possível observar a separação das populações de *B. adiamantinum* e *B. insectiferum*, que se encontram na porção negativa do eixo, das demais populações, que se encontram, em sua maioria, na porção positiva. No eixo 3 da PCA é possível observar uma separação dos indivíduos de *B. mucronifolium* dos indivíduos de *B. rupicola*. Nos eixos 4 (Fig. 3) e no eixo 5 (dados não mostrados), todas as espécies se sobrepõem.

A análise de PCA utilizando apenas dados florais apresenta um panorama geral similar daquele encontrado com todos os caracteres (Fig. 4). No eixo 1 (65,7% da variância; Tab. S2), observamos uma separação maior entre as populações de *B. adiamantinum* das populações de *B. insectiferum* que se distanciam tanto no eixo 1 quanto no eixo 2, devido principalmente ao comprimento da pétala e tamanho da sépala (eixo 1) e comprimento do labelo (eixo 2) (Tab. S2). O mesmo ocorre com as populações de *B. mucronifolium* que se separam tanto no eixo 1 quanto no 2 das populações pertencentes a *B. epiphytum* e *B. rupicola*. Na associação dos eixos 1 e 3 podemos observar um gradiente entre as populações de *B. epiphytum* e *B. rupicola*, mas com alguma sobreposição (Fig. 4). Ao utilizarmos apenas os dados vegetativos, excetuando a separação evidente de *B. mentosum*, em nenhum dos eixos há a separação entre as espécies (Fig. S1; Tab. S3).

Na análise de discriminantes, utilizando tanto os caracteres vegetativos quanto florais, há diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre todas as populações interespecíficas. Entretanto, entre alguns pares de populações coespecíficas não houve discriminação estatisticamente significativa (EPSJ-EPSR, EPAP-EPSR, EAP-EPSJ, RUMO-RUPI, RUAP-RUCAL, RUAP-RUMO). Houve 93,2% de acertos na classificação dos indivíduos nas respectivas populações (Tab. 3). As cinco classificações “incorretas” (1 em *B. epiphytum*, 2 em *B. rupicola* e 1 em *B. mucronifolium*) foram discriminadas como mais próximos do centroide de populações da mesma espécie.

A análise de variáveis canônicas resultou em quatro eixos com autovalores maiores que 1 (Tab. S4). O eixo canônico 1 resume 76,6% da variância e está mais correlacionada principalmente com o comprimento da folha *in situ*, largura no primeiro terço da pétala e o ângulo formado pela curvatura da sépala. Este eixo separa as populações de *B. mucronifolium* das populações de *B. epiphytum* e *B. rupicola* (Fig. 5). O eixo canônico 2 explica 12% da variância encontrada e está principalmente relacionado ao comprimento da pétala e da sépala dorsal (Tab. S4). Este eixo separa as populações de *B. epiphytum* de *B. rupicola* (Fig. 5). Também é possível observar a separação da população RUPI de RUCAL. O eixo 3 resume 6,5% da variância encontrada e está principalmente relacionado a largura do labelo, largura da bráctea, largura da folha e ângulo formado pela curvatura da sépala. Este eixo separa as populações de *B. rupicola* com algumas sobreposições entre os indivíduos de RUCAL e RUAP (Fig. 5). Também observamos que as populações de *B. epiphytum* de EPSR se separa da população de EPAP, e em

B. mucronifolium observamos neste eixo uma separação das populações MUDI e MUMV com sobreposição de um indivíduo. No eixo 4 não foi possível a separação de nenhuma das populações (dados não mostrados).

Na análise de discriminantes utilizando apenas os dados florais houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre as populações interespecíficas e não houve diferença estatisticamente significativa entre as mesmas populações coespecíficas observadas na análise anterior (todos os caracteres) (EPSJ-EPSR, EPAP-EPSJ, EPAP-EPSR, RUMO-RUPI, RUAP-RUCAL, RUAP-RUMO). A matriz de classificação resultou na mesma porcentagem de acertos (93,2%), com todas as classificações incorretas ocorrendo também apenas entre populações coespecíficas. Entretanto, diferentemente da análise com todos os caracteres, a população de RUCAL teve todos os indivíduos classificados corretamente, enquanto a população de EPAP apresentou uma classificação incorreta (um indivíduo que está mais próximo do centroide da população EPSR) (Tab. 4). A análise canônica apresenta um ordenamento semelhante ao observado quando utilizamos todos os caracteres, entretanto não houve separação das populações coespecíficas (Fig. S2). Ao analisarmos apenas os dados vegetativos não há diferença estatisticamente significativa entre as populações de *B. epiphytum* e *B. rupicola*, além de também não haver diferença estatisticamente significativa entre as populações coespecíficas. Houve um alto número de incorretas classificações quando utilizado apenas os dados vegetativos, sendo 5 deles entre populações interespecíficas, principalmente entre *B. epiphytum* e *B. rupicola* (Tab. 5). Na análise de variáveis canônicas é possível identificar uma separação apenas no eixo 1 entre as populações de *B. mucronifolium* e *B. epiphytum* (Tab. S5; Fig. S3).

As análises de agrupamento utilizando a matriz de distância de Mahalanobis dos centroides de cada população, tanto com algoritmo de agrupamento UPGMA quanto neighbor-joining (NJ), utilizando todas as variáveis morfológicas, indicam a presença de três grupos correspondentes às três espécies (Fig. 6). A única diferença na estrutura obtida com os dois algoritmos é a população de Caldas-MG (RUCAL) se ligar externamente ao grupo formado pelas populações de Goiás no NJ, enquanto que no UPGMA a população RUPI se liga externamente as demais da espécie. Isto ocorre provavelmente pela maior diferencial desta última população, como pode ser observado pelo longo comprimento do seu ramo no NJ. A mesma estrutura é obtida quando utilizamos apenas os dados florais. Quando analisamos apenas os dados vegetativos, a estrutura também é semelhante, entretanto ocorrem diferenças na estrutura interna

de cada um destes grupos (Fig. S4). Neste caso, a população RUCAL sempre se liga externamente às demais populações de *B. rupicola*, com maior diferenciação entre ela e as demais.

4. Discussão

Todas as espécies puderam ser recuperadas a partir das análises morfométricas, especialmente *B. mentosum*, a mais distinta de todas, *B. insectiferum* e *B. adiamantinum* (que se aproximam) e *B. mucronifolium*. Apenas *B. epiphytum* e *B. rupicola* apresentaram uma distinção menor, mas puderam ser recuperadas, especialmente na análise de variáveis canônicas. Os três grupos de espécies observados, bem como as relações entre eles e entre as espécies, refletem as análises filogenéticas realizadas previamente (Smidt et al., 2011) e a mais recente, utilizando estes mesmos indivíduos e populações (Capítulo 1). Smidt et al. (2011), ao estabelecerem a filogenia do clado Neotropical de *Bulbophyllum* observaram caracteres únicos em *B. mentosum*, tal como o escapo em fita enquanto em todas outras espécies é cilíndrico. Rodrigues et al. (CAPÍTULO 3) observaram que *B. mentosum* é a única espécie das analisadas da seção *Micranthae* que possui a capacidade de formar frutos quando submetidas a autopolinizações manuais. Também foram demonstrados indícios de que *B. mentosum* não possui a capacidade de gerar frutos quando recebe pólen de outras espécies da seção, indicando que a distância genética entre essas espécies seja suficiente para gerar incompatibilidades. A distância genética entre *B. mentosum* e as demais espécies da seção foi observado por Rodrigues et al. (CAPÍTULO 1), em que foi observado um clado com alto suporte de *B. mentosum* com *B. weddelli*, espécie da seção *Didactyle*. Apesar da proximidade genética de *B. mentosum* e *B. weddelli* possa ser resultado de um viés causado pela grande divergência entre as espécies basais de ambas as seções, há uma similaridade vegetativa entre as espécies da seção *Didactyle* e *B. mentosum*. Além disso, as espécies da seção *Didactyle* também são auto-compatíveis, podendo ser uma sinapomorfia biológica para o grupo. A grande diferenciação morfológica, tanto em caracteres vegetativos (que a aproxima de *B. sect. Didactyle*) quanto reprodutivos, com suas características florais peculiares, a inter-incompatibilidade reprodutiva (CAPÍTULO 3) e o distanciamento genético de *B. mentosum* (CAPÍTULO 1) indicam que o seu posicionamento em *B. sect. Micranthae* é inadequado, necessitando de tratamento taxonômico.

Bulbophyllum insectiferum e *B. adiamantinum* são espécies muito próximas filogeneticamente, formando um clado bem suportado nas análises com dados moleculares (CAPÍTULO 1) e anatômicos (Smidt et al., 2013; Nunes et al., 2017). Esta proximidade também foi refletida nas análises de PCA. As duas espécies são muito próximas morfológicamente, possuem folhas inteiramente cilíndricas, estreitas e longas, constituindo um par de espécies muito distinto das demais espécies do gênero, mesmo quando comparado com outras espécies de folhas teretes, como *B. epiphytum*. Em geral, não há dificuldades em distinguir as espécies irmãs *B. adiamantinum* e *B. insectiferum* quando em floração. *Bulbophyllum insectiferum* apresenta flores maiores, pétalas móveis e estelídeos eretos, diferentemente de *B. adiamantinum* em que a pétala é fixa e os estelídeos são curvados. Entretanto, de forma vegetativa não é possível a separação das duas espécies. Observamos em dados de herbário que alguns exemplares de *B. adiamantinum* foram identificados equivocadamente como *B. insectiferum*, principalmente quando há apenas frutos no material testemunho. Acreditamos que o fato de *B. insectiferum* ser uma espécie mais conhecida, inclusive por colecionadores, e da morfologia vegetativa bastante peculiar, e por *B. adiamantinum* ter sido inicialmente conhecida como uma espécie endêmica e rara da região do planalto de Diamantina, em Minas Gerais, permitiram uma identificação menos minuciosa por parte de alguns botânicos. Nós coletamos *B. adiamantinum* em outras regiões geográficas (a partir da informação de coletas previamente identificadas como *B. insectiferum*), como no planalto central brasileiro (Alto Paraíso de Goiás e Pirenópolis), ampliando a distribuição conhecida da espécie. Já houve um registro de *B. adiamantinum* em Alto Paraíso por Santos e Silva (2019), confirmando a distribuição mais ampla da espécie. A análise de agrupamento não indicou claramente a formação de grupos relacionados à distribuição geográfica para *B. adiamantinum*, sem qualquer padrão detectado para Cadeia do Espinhaço e para as serras de Goiás. Nas análises filogenéticas utilizando as mesmas populações (CAPÍTULO 1), não foi possível observar estruturação genética nas populações, entretanto não foram empregadas análises apenas para esta espécie. Análises filogeográficas com uma maior amostragem de indivíduos serão realizadas na espécie para esclarecimento da sua história de ocupação dessas regiões e como isto poderia estar refletido na diversidade morfológica da espécie.

Nós não observamos grandes discontinuidades morfológicas nas espécies que compõem o grupo *core* de *B. sect. Micranthae*. As espécies apresentam flores pequenas predominantemente brancas, labelo amarelo (exceto *B. chloroglossum* com predominância de

labelo verde) e dimensões de toda a planta diminuta. A forma dos indivíduos é primariamente governada pelo seu arcabouço genético (Busov et al., 2008; Van der Knaap et al., 2014), assim uma morfologia similar é esperada em espécies filogeneticamente próximas. Entretanto, a adaptação a micro-habitats distintos pode gerar uma pressão de seleção que favorece a diferenciação de características florais e/ou fenológicas entre as espécies da seção. Essa diferenciação pode impedir a polinização interespecífica, ou pode levar à formação de barreiras genéticas pós-polinização que evitam a formação de indivíduos intermediários mal adaptados. De acordo com a hipótese proposta por Dobzhansky (1973), esse processo de reforço pode ser um mecanismo importante na especiação das espécies de *B. sect. Micranthae*. Rodrigues et al. (CAPÍTULO 3) observaram que as espécies do *core* de *B. sect. Micranthae* são inter-compatíveis quando submetidas a polinizações manuais, entretanto, há uma tendência de diferenciação do período de floração. Um dos motivos da coesão morfológica floral pode ser resultado do compartilhamento de polinizadores, como foi observado em outras orquídeas miofilas (Borba & Semir, 2001).

Tanto *B. chloroglossum* quanto *B. micranthum* são diferenciadas sem grandes dificuldades das demais já que ambas apresentam folhas planas. Já a espécie *B. mucronifolium* tem sido identificada eventualmente como *B. rupicola* por não especialistas. Smidt (2007) observou que *B. mucronifolium* se assemelhava de vegetativamente com *B. rupicola*, com folhas carnosas conduplicada, entretanto, não apresenta lóbulos laterais no labelo como presente em *B. rupicola*. Na análise canônica observamos outras características que distinguem *B. mucronifolium* de *B. rupicola* como largura da pétala e ângulo interno da sépala (Tab. S4). Além disso, a análise discriminante classificou corretamente os indivíduos de *B. mucronifolium* dentro da espécie quando utilizados todos os caracteres morfológicos. Entretanto, ao se utilizar apenas os caracteres vegetativos houve um indivíduo de *B. mucronifolium* (MUD1) classificado como *B. rupicola* (RCAL). No CAPÍTULO 1 foi notada uma mistura genética nos indivíduos amostrados de *B. mucronifolium*. Smidt (2007), na revisão do grupo Neotropical de *Bulbophyllum*, incluiu uma espécie para a seção *Micranthae* (*B. tricolor*) que apresenta caracteres vegetativos semelhantes a *B. mucronifolium*, entretanto, apresentava a presença de dois diminutos lobos laterais do labelo (Smidt 2007). *Bulbophyllum tricolor* era considerado endêmico da Bolívia, e a sua ocorrência para o Planalto de Dimantina, distante 2.500 km do único local conhecido para a espécie, é bastante inusitada. A procura pela população da espécie no local indicado em Diamantina-MG, e

várias localidades próximas, indicou apenas a ocorrência de *B. mucronifolium* na região. A variação observada na morfologia do labelo desta espécie indica que o material originalmente referido como *B. tricolor* para esta região esteja com a identificação equivocada. São necessárias análises genéticas populacionais com maior amostragem em *B. mucronifolium* para entendimento da história evolutiva do grupo, onde não podemos descartar a ocorrência de hibridização.

Em nossas análises de ordenação, *B. epiphytum* e *B. rupicola* formaram um contínuo morfológico, não sendo possível a separação das populações destas espécies (veja Fig. 3), apesar de na análise de variáveis canônicas ter sido possível a recuperação de ambas. As diferenças morfológicas que separam este par de espécies são sutis, como comprimento da pétala, sépala dorsal e comprimento da folha *in situ*. Nunes et al. (2017) também observaram caracteres anatômicos relevantes que as diferenciam. As análises do CAPÍTULO 1 demonstraram que há diferenciação genética em duas linhagens distintas dentro de cada uma das duas espécies. Naquelas análises, as populações de *B. rupicola* de Minas Gerais (incluindo a população onde o tipo foi originalmente coletado, RUCAL, analisada neste estudo) estão geneticamente mais relacionadas com as populações de *B. epiphytum* também de Minas Gerais do que com as demais populações *B. rupicola* (estado de Goiás). Há uma dificuldade em acomodar uma classificação formal para este grupo em que seja congruente simultaneamente aos dados morfológicos e genéticos. Um padrão muito similar, e até mais complexo, foi observado recentemente nas espécies de *Bulbophyllum* sect. *Didactyle* ocorrentes nestas mesmas áreas de campos rupestres (Fiorini et al., 2023). Análises morfométricas geralmente são uma abordagem efetiva na delimitação de complexos de espécies em Orchidaceae (Borba et al., 2002; Ribeiro et al., 2008; Lau et al., 2021, Cruz-Lustre et al., 2020). Entretanto, a morfologia pode ser confusa em casos de variação críptica ou hibridação (Borba et al., 2002; Pinheiro & Barros, 2009; Bateman, et al., 2021; Bateman, et al., 2023).

No complexo *B. epiphytum/B. rupicola*, todo o processo de diversificação das linhagens provavelmente ocorreu durante o Pleistoceno (Gamish & Comes, 2019). O recente processo de especiação pode ainda não ter permitido o acúmulo de variação morfológica suficiente para o reconhecimento inequívoco das diferentes linhagens. Entretanto, é esperado grandes variações genéticas em populações alógamas com autoincompatibilidade, como em *B. sect. Micranthae* (CAPÍTULO 3). Um dos processos que pode estar atuando no grupo é a ocorrência de uma separação incompleta das linhagens ou uma mistura ancestral que ocorre

durante a divergência dos complexos (Futuyma, 2010). Algumas espécies de plantas demonstraram especiação com fluxo gênico entre as espécies (Roberts & Roalson, 2018; Muniz et al., 2022; Tavares et al., 2022). Nestes casos, a especiação pode resultar no acúmulo de divergência genética em poucos loci entre espécies incipientes. Nas análises genéticas conduzidas no CAPÍTULO 1, foi observada a proximidade genética população RUCAL com as demais populações de *B. epiphytum* do sul de Minas Gerais que pode indicar uma especiação com fluxo gênico neste grupo. Para averiguação desta hipótese, nosso grupo de pesquisa irá estimar o fluxo gênico no processo de divergência entre as populações das duas espécies com a comparação de diferentes cenários no processo de especiação.

Os caracteres morfológicos florais foram mais congruentes com as relações filogenéticas entre as espécies do grupo do que os caracteres vegetativos. Alguns dos caracteres vegetativos analisados estão ligados a demandas funcionais, que respondem a demandas ambientais (Chazdon, 1996; Krause et al., 2001; Valladares et al., 2006). Como exemplo, temos a variação na forma das folhas na planta uma importante característica que influencia o seu *fitness*, já que está diretamente relacionado a absorção suficiente de energia e trocas gasosas (Tsukaia, 2005). Entretanto, em alguns grupos de Orchidaceae os caracteres morfológicos vegetativos se mostraram melhores indicadores das relações filogenéticas que os caracteres florais, devido principalmente a convergências ou radiações conduzidas pela adaptação aos seus polinizadores (van den Berg et al., 2000; Chase et al., 2009), inclusive em espécies ocorrendo nos campos rupestres com adaptações morfológicas vegetativas similares (folhas carnosas cilíndricas) a estes ambientes (Borba et al., 2002). Nos nossos resultados observamos a presença de caracteres vegetativos sobrepostos, pouco discriminantes do ponto de vista taxonômico, que pode ser devido ao baixo número de caracteres vegetativos mensurados. Entretanto, a baixa variação morfológica vegetativa também é encontrada em *B. sect. Didactyle*, na qual seus representantes são distinguidos apenas devido a morfologia floral, principalmente do labelo (Ribeiro et al., 2008).

Além da baixa informação contida nos dados vegetativos mensurados, também foi observada variação significativa de alguns caracteres após o cultivo. Respostas a diferentes condições ambientais, tais como efeitos de diferentes luminosidades (Pigliucci & Kolodynska, 2002), nutrientes (Portsmuth & Niinemets, 2007) e água (Geng et al., 2006) já foram documentadas em plantas. A plasticidade fenotípica é bastante variável nas populações naturais e é geralmente interpretada como uma resposta adaptativa a ambientes heterogêneos como uma

consequência da imobilidade das plantas (Pigliucci & Kolodynska, 2002; Dorken & Barrett, 2004). No cultivo *ex situ* de *B. sect. Micranthae* observamos o aumento do tamanho das estruturas vegetativas dos indivíduos em resposta à um ambiente menos iluminado e com maior disponibilidade de água e nutrientes se comparado com as condições ambientais dos locais de coleta. De la Rosa-Manzano et al. (2017) observou que orquídeas epífitas de árvores decíduais possuem maior plasticidade que aquelas epífitas de florestas úmidas, já que o nível de radiação solar é dependente da fenologia do forófito. Em nossos resultados, as diferenças mais marcantes em tamanho das folhas foram observadas em indivíduos coletados de forma rupícola (como *B. mucronifolium* e *B. rupicola*) que passaram a desenvolver folhas mais longas e mais finas em casa de vegetação. Pires et al. (2012) observaram que orquídeas tropicais adaptadas a sol pleno (*Miltonia flavescens* e *Miltonia spectabilis*) eram capazes de se ajustar, via mudanças morfofisiológicas a disponibilidade de luz, apresentando boa adaptação quando submetidas a sombreamento de 75%. Pinheiro & Barros, (2007) estudando Orchidaceae de campo rupestre e de Mata Atlântica, também observaram aumento das estruturas das plantas cultivadas em relação aquelas mensuradas diretamente do campo, entretanto, a variação observada em cultivo era similar a do campo, indicando um componente genético em sua resposta. A habilidade de expressar morfologias alternativas em resposta a diferentes condições ambientais pode representar uma inovação chave que desencadeia especiação, uma vez que pode haver seleção para fenótipos alternativos especializados a diferentes recursos (West-Eberhard, 2005; Pigliucci, 2005; Pfennig et al., 2010). Para aumentar nosso entendimento do papel da plasticidade na dinâmica evolutiva de *B. sect. Micranthae* é necessário identificar como a variação fenotípica resultante da plasticidade influencia o sucesso ecológico das populações.

Apesar da plasticidade fenotípica ser limitada pela constituição genética do indivíduo, o valor taxonômico dos caracteres envolvidos com tamanho de folha e de pseudobulbo deve ser considerado com cautela, pois estes traços podem estar condicionados as características do ambiente coletado. Como mencionado, folhas de *B. rupicola* (especialmente) e *B. mucronifolium* tiveram alterações significativas na morfologia foliar quando em cultivo, se assemelhando às folhas de *B. epiphytum*. Da mesma forma, observamos que folhas de alguns indivíduos de *B. epiphytum* eventualmente ocorrentes como rupícolas em áreas mais abertas apresentaram morfologia similar a de *B. rupicola*. Tais fatores podem estar contribuindo para algumas confusões na identificação de espécimes de herbários. Quando possível, salientamos que é

necessário analisar conjuntamente diferentes fontes de evidências (incluindo morfometria, análises filogenéticas moleculares, anatômicos) para auxílio da delimitação de espécies bem suportada (De Queiroz, 2007; Wiens, 2007).

Referências

- Bateman, R. M., Rudall, P. J., & Denholm, I. (2021). In situ morphometric survey elucidates the evolutionary systematics of the orchid genus *Gymnadenia* in the British Isles. *Systematics and Biodiversity*, 19, 571-600. doi: 10.1080/14772000.2021.1877848
- Bateman, R. M., & Rudall, P. (2023). Morphological continua make poor species: genus-wide morphometric survey of the European bee orchids (*Ophrys* L.). *Biology*, 12, 136. doi: 10.3390/biology12010136
- 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. doi: 10.1006/anbo.2001.1434
- Borba, E. L., Shepherd, G. J., van den Berg, C., & Semir, J. (2002). Floral and vegetative morphometrics of five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. *Annals of Botany*, 90, 209-230. doi: 10.1093/aob/mcf168
- Borba, E. L., Funch, R. R., Ribeiro, P. L., Smidt, E. C., & Silva-Pereira, V. (2007). Demografia, variabilidade genética e morfológica e conservação de *Cattleya tenuis* (Orchidaceae), espécie ameaçada de extinção da Chapada Diamantina. *Sitientibus, Série Ciências Biológicas*, 7, 211-222.
- Busov, V. B., Brunner, A. M. & Strauss, S. H. (2008). Genes for control of plant stature and form. *New Phytologist*, 177, 589-607. doi: [10.1111/j.1469-8137.2007.02324.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02324.x)
- Chase, M. W., Williams, N. H., Faria, A. D., Neubig, K. M., Amaral, M. C. E. & Whitten, W. M. (2009). Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. *Annals of Botany*, 104, 387–401. doi: 10.1093/aob/mcp067
- Chazdon, R. L., Pearcy, R. W., Lee, D. W., & Fetcher, N. (1996). Photosynthetic responses of tropical forest plants to contrasting light environments. In: Mulkey, S.S., Chazdon, R.L., Smith, A.P. (Eds.), *Tropical Forest Plant Ecophysiology*. Chapman and Hall, New York, pp. 5-55
- Cruz-Lustre, G., Batista, J. A. N., Radins, J. A., González, A., & Borba, E. L. (2020). Morphometric analysis of the *Habenaria parviflora* complex (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 306, 37. doi:10.1007/s00606-020-01634-2

- de la Rosa-Manzano, E., Andrade, J. L., Zotz, G., Reyes-García, C. (2017). Physiological plasticity of epiphytic orchids from two contrasting tropical dry forests. *Acta Oecologica*, 85, 25-32. doi: 10.1016/j.actao.2017.09.006.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879–886. doi: [10.1080/10635150701701083](https://doi.org/10.1080/10635150701701083)
- Dobzhansky T. (1937). Genetics and the origin of species. New York: Columbia University Press.
- Dorken, M. E., & Barrett, S. C. H. (2004). Phenotypic plasticity of vegetative and reproductive traits in monoecious and dioecious populations of *Sagittaria latifolia* (Alismataceae): a clonal aquatic plant. *Journal of Ecology*, 92, 32–44. doi: 10.1111/j.1365-2745.2004.00857.x
- Ellstrand, N. C., Whitkus, R., & Rieseberg, L. H. (1996). Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 5090–5093
- Ely, C. V., Andrade, B. O., Iganci, J. R. V., & Boldrini, I. I. (2018). Integrative taxonomy improves delimitation in *Hypericum* subspecies. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 34, 68-76. doi: 10.1016/j.ppees.2018.08.005
- Fiorini, C. F., Borba, E. L., Resende-Moreira, L. C., Smidt, E. C., Knowles, L. L. (2023). Geographic isolation alone does not explain divergence of a group of orchid species across Brazil's campos rupestres sky-islands, *Evolution*, qpad010. doi: 10.1093/evolut/qpad010
- Futuyma, D. J. (2010). Evolutionary constraint and ecological consequences. *Evolution*, 64, 1865-1884. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.00960.x>
- Gamisch, A. & Comes, H. P. (2019). Clade-age-dependent diversification under high species turnover shapes species richness disparities among tropical rainforest lineages of *Bulbophyllum* (Orchidaceae). *BMC Evolutionary Biology*, 19, 93. doi: 10.1186/s12862-019-1416-1
- Geng, Y. P., Pan, X. Y., Xu, C. Y., Zhang, W. J., Li, B., Chen, J. K. (2006). Phenotypic plasticity of invasive *Alternanthera philoxeroides* in relation to different water availability, compared to its native congener. *Acta Oecologica*, 30, 380–385. doi: 10.1016/j.actao.2006.07.002
- Henderson, A. (2006). Traditional morphometrics in plant systematics and its role in palm systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151, 103-111. doi: 10.1111/j.1095-8339.2006.00526.x

- Krause, G. H., Koroleva, O. Y., Dalling J. W., & Winter, K. (2001). Acclimation of tropical tree seedlings to excessive light in simulated tree-fall gaps. *Plant, Cell and Environment*, 24, 1345–1352. doi: 10.1046/j.0016-8025.2001.00786.x
- Lau, B. L., Batista, J. A. N., Massensini Junior, A., Whitten, W. M., & Borba, E. L. (2021). Unravelling the *Habenaria repens* (Orchidaceae) complex in Brazil: a biosystematic and molecular phylogenetic approach. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 197, 229-249. doi: 10.1093/botlinnean/boab022
- Marhold, K. (2011). Multivariate morphometrics and its application to monography at specific and infraspecific levels. In: Stuessy, T. F. y H. W. Lack (eds). Monographic plant systematics: Fundamental assessment of plant biodiversity. A.R.G. Gantner Verlag K.G., FL-9491 Ruggell. Vienna, Austria. pp. 75-101
- Mayr, E. (1942). Systematics and the origin of species (Columbia Univ. Press, New York).
- Menini Neto L., van den Berg C., & Forzza R. C. (2019). Linear and geometric morphometrics as tools to resolve species circumscription in the *Pseudolaelia vellozicola* complex (Orchidaceae, Laeliinae). *Plant Ecology and Evolution*, 152, 53–67. doi: 10.5091/plecevo.2019.1531
- Mulanda, E. S., Chuhila, Y., Awori, R. M., Adero, M. O., Amugune, N. O., Akund, E., & Kinyamario, J. I. (2015). Morphological and RAPD-marker characterization off *Melia volkensii* (Gurke) *in vitro* plants regenerated via direct and indirect somatic embryogenesis. *African Journal of Biotechnology*, 14, 261-1274. doi: 10.5897/AJB2014.14372
- Muniz, A. C., Pimenta, R. J. G., Cruz, M. V., Rodrigues, J. G., Buzatti, R. S. D. O., Heuertz, M., Lemos-Filho, J. P., & Lovato, M. B. (2022). Hybrid zone of a tree in a Cerrado/Atlantic Forest ecotone as a hotspot of genetic diversity and conservation. *Ecology and Evolution*, 12, e8540. doi: 10.1002/ece3.8540
- Nunes, E. L. P., Maldonado, P. E., Smidt, E.C., Stutzel T., & Coan A. I. (2017). Floral micromorphology and anatomy and its systematic application to Neotropical *Bulbophyllum* section *Micranthae* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 183, 294–315. doi: [10.1093/botlinnean/bow007](https://doi.org/10.1093/botlinnean/bow007)
- Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P., O'Hara, R., Solymos, P., Stevens, M., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B.,

- Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., De Caceres, M., Durand, S., Evangelista, H., FitzJohn, R., Friendly, M., Furneaux, B., Hannigan, G., Hill, M., Lahti, L., McGlenn, D., Ouellette, M., Ribeiro Cunha, E., Smith, T., Stier, A., Ter Braak, C., & Weedon J. (2022). *vegan*: community ecology package. R package version 2.6-4, disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Paradis, E., & Schliep, K. (2019). Ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35, 526–528. doi: 10.1093/bioinformatics/bty633
- Pfennig, D. W., & McGee, M. (2010). Resource polyphenism increases species richness: a test of the hypothesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 365, 577–591. doi: 10.1098/rstb.2009.0244.
- Pigliucci, M., & Kolodnynska, A. (2002). Phenotypic plasticity to light intensity in *Arabidopsis thaliana*: invariance of reaction norms and phenotypic integration. *Evolutionary Ecology*, 16, 27–47. doi: 10.1023/A:1016073525567
- Pigliucci, M. (2005). Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology e Evolution*, 20, 481–486. doi: 10.1016/j.tree.2005.06.001
- Pinheiro, F., & De Barros, F. (2007). Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany*, 25, 129–136. doi: [10.1111/j.0107-055X.2007.00010.x](https://doi.org/10.1111/j.0107-055X.2007.00010.x)
- Pinheiro, F. & De Barros, F. (2009). Morphometric analysis of the *Brasiliorchis picta* complex (Orchidaceae). *Brazilian Journal of Botany*, 32, 11–21. doi: 10.1590/S0100-84042009000100003
- Pires, M. V., de Almeida, A. A. F., Abreu, P. P., & Costa Silva, D. (2012). Does shading explain variation in morphophysiological traits of tropical epiphytic orchids grown in artificial conditions?. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34, 2155–2164. doi: 10.1007/s11738-012-1016-9
- Portsmouth, A., & Niinemets, U. (2007). Structural and physiological plasticity in response to light and nutrients in five temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. *Functional Ecology*, 21, 61–77. doi:10.1111/j.1365-2435.2006.01208.x

- Prada, C., Schizas, V. N., & Yoshioka, P. M. (2008). Phenotypic plasticity or speciation? A case from a clonal marine organism. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 47. doi:10.1186/1471-2148-8-47
- R Core Team. (2020). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org>
- Ribeiro, P. L., Borba, E. L., Smidt, E. de C., Lambert, S. M., Schnadelbach, A. S., & van den Berg, C. (2008). Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution*, 270, 109–137. doi: [10.1007/s00606-007-0603-5](https://doi.org/10.1007/s00606-007-0603-5)
- Rohlf, F. J. (1990). Morphometrics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21, 299–316.
- Roberts, W. R., & Roalson, E. H. (2018). Phylogenomic analyses reveal extensive gene flow within the magic flowers (Achimenes). *American Journal of Botany*, 105, 726–740. doi: 10.1002/ajb2.1058.
- Santos, I. S., & Silva, M. J. (2019). O gênero *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae, Epidendroideae) no Parque Nacional Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil. *Hoehnea*, 46, e872018. doi: 10.1590/2236-8906-87/2018
- Schneider, C., Rasband, W., & Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089
- Smidt, E. C. (2007). Filogenia e revisão taxonômica de *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) ocorrentes no Neotrópico. Tese. Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Smidt, E. C., Borba, E. L., Gravendeel, B., Fischer, G. A., & van den Berg, C. (2011). Molecular phylogeny of the Neotropical sections of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) using nuclear and plastid spacers. *Taxon*, 60, 1050–1064.
- Smidt, E. C., Gallo L. W., & Scatena, V. L. (2013). Leaf anatomical and molecular studies in *Bulbophyllum* section *Micranthae* (Orchidaceae) and their implications for systematics. *Brazilian Journal of Botany*, 36, 75–82.
- Soltis, P. S. & Soltis, D. E. (2009). The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 561–588. doi: 10.1146/annurev.arplant.043008.092039

- Tavares, M. M., Ferro, M., Leal, B. S. S., & Palma-Silva, C. (2022). Speciation with gene flow between two Neotropical sympatric species (*Pitcairnia* spp.: Bromeliaceae). *Ecology and Evolution*, 12, e8834. <https://doi.org/10.1002/ece3.8834>
- Tsukaia H. (2005). Leaf shape: genetic controls and environmental factors. *International Journal of Developmental Biology*, 49, 547–555. doi: 10.1387/ijdb.041921ht
- Valladares, F., Sanchez-Gomez, D., & Zavala, M. A. (2006). Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology*, 94, 1103–1116. doi: [10.1111/j.1365-2745.2006.01176.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01176.x)
- van den Berg C., Higgins, W. E., Dressler, R. I., Whitten, W. M., Soto-Arenas, M. A., Culhaam, A., Chaase, & M. W. (2000). A phylogenetic analysis of *Laeliinae* (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana*, 15, 96-114.
- van der Knaap E., Chakrabarti M., Chu Y. H., Clevenger J. P., Illa-Berenguer E., Huang Z., Keyhaninejad N., Mu Q., Sun L., Wang Y., & Wu S. (2014). What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. *Frontiers in Plant Science*, 27, 5-227. doi: 10.3389/fpls.2014.00227.
- West-Eberhard, M. J. (2005). Developmental plasticity and the origin of species differences. *PNAS*, 102, 6543-6549. doi: 10.1073/pnas.0501844102.
- Wickham H. (2016). *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Wiens, J. J. (2007). Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology*, 56, 875–878. doi: [10.1080/10635150701748506](https://doi.org/10.1080/10635150701748506)

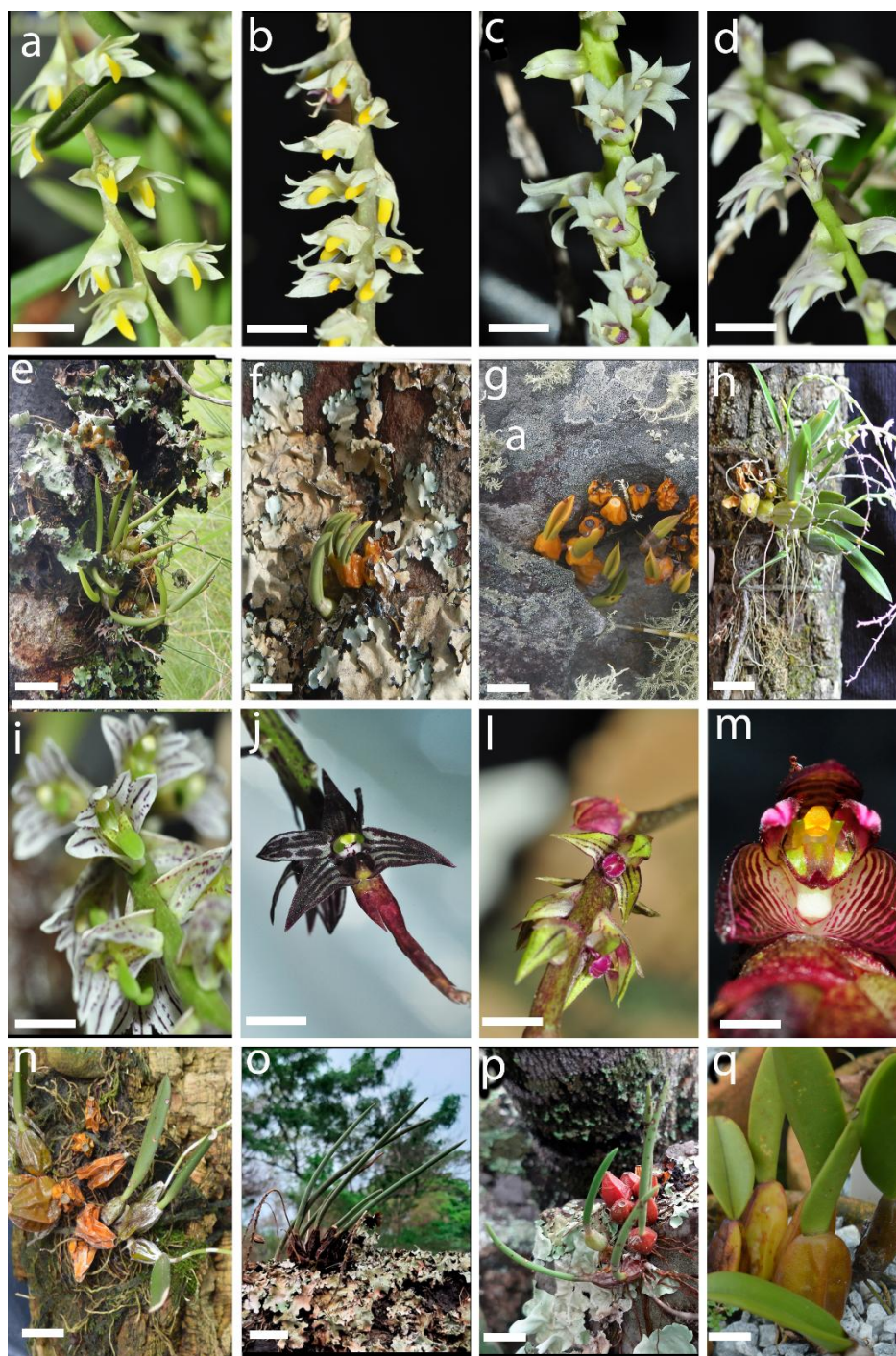


Figura 1. Flores e hábito das espécies de *Bubophyllum* sect. *Micranthae* analisadas. (a, e) *B. epiphytum*; (b, f) *B. rupicola*; (c, g) *B. mucronifolium*; (d, h) *B. micranthum*; (i, n) *B. chloroglossum*; (j, o) *B. insectiferum*; (l, p) *B. adiamantinum*; (m, q) *B. mentosum*. As barras nas imagens das inflorescências (a, b, c, d, i, j, l, m) representam 0,5 cm; enquanto que nas imagens de estruturas vegetativas (e, f, g, h, n, o, p, q) representam 1 cm.

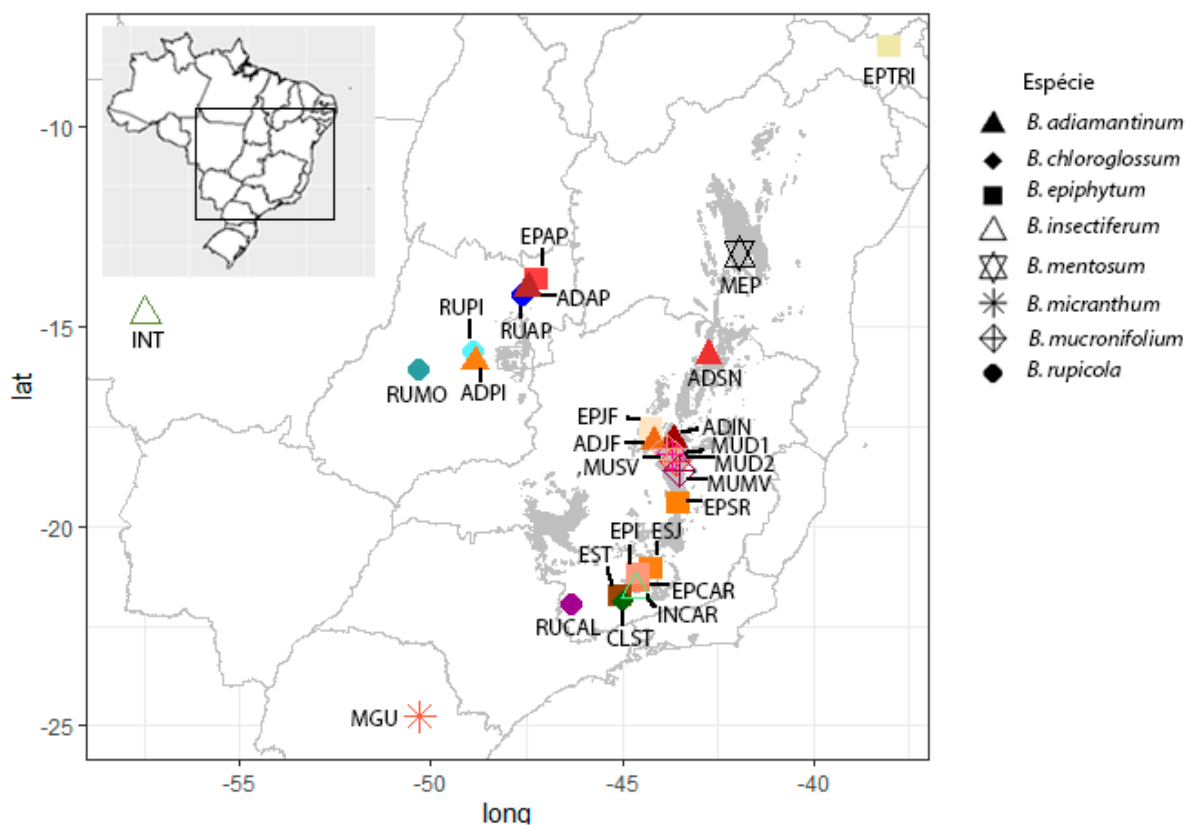


Figura 2. Localização geográfica das 26 populações de *Bulbophyllum* sect *Micranthae* analisadas. Os diferentes símbolos representam cada espécie coletada, enquanto que a cor representa a população. Regiões de campos rupestres são demarcadas como manchas cinza no mapa.

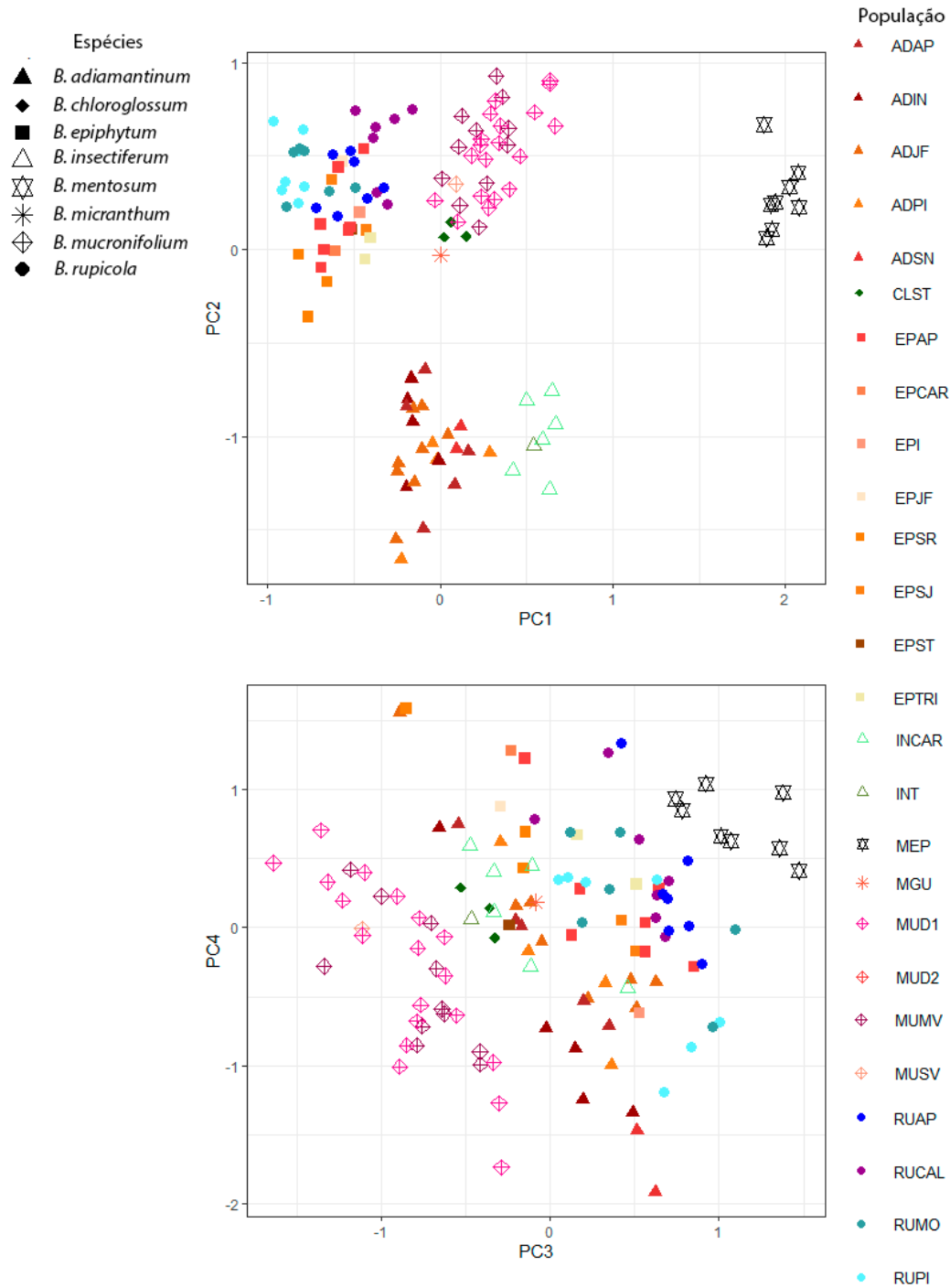


Figura 3. Representação gráfica dos quatro primeiros eixos da análise de componentes principais das oito espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* utilizando caracteres tanto florais quanto vegetativos na análise. A porcentagem de variância acumulada para os quatro primeiros eixos = 80% (eixo 1= 55%, autovalor =14,3; eixo 2= 11,4%, autovalor= 2,9; eixo 3= 9,2%, autovalor=2.39; eixo 4= 4,5%, autovalor= 1,16)

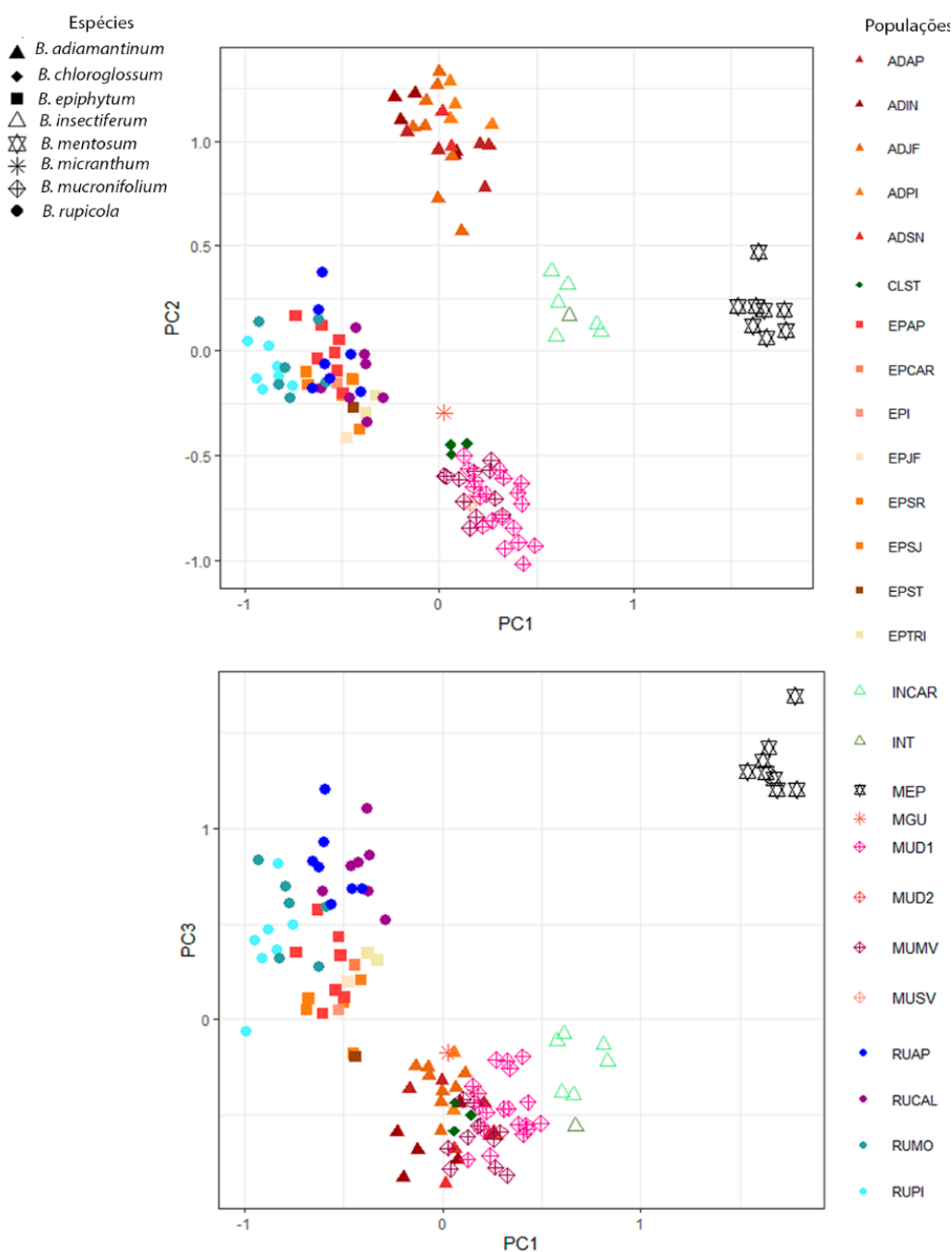


Figura 4. Representação gráfica dos três primeiros eixos da análise de componentes principais (PCA) baseado em 21 caracteres morfológicos florais de 26 populações de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*. A porcentagem de variância acumulada para os três primeiros eixos = 85% (eixo 1= 66%, autovalor =11,8; eixo 2= 10,4%, autovalor= 1,86; eixo 3= 9,2%, autovalor=1,66).

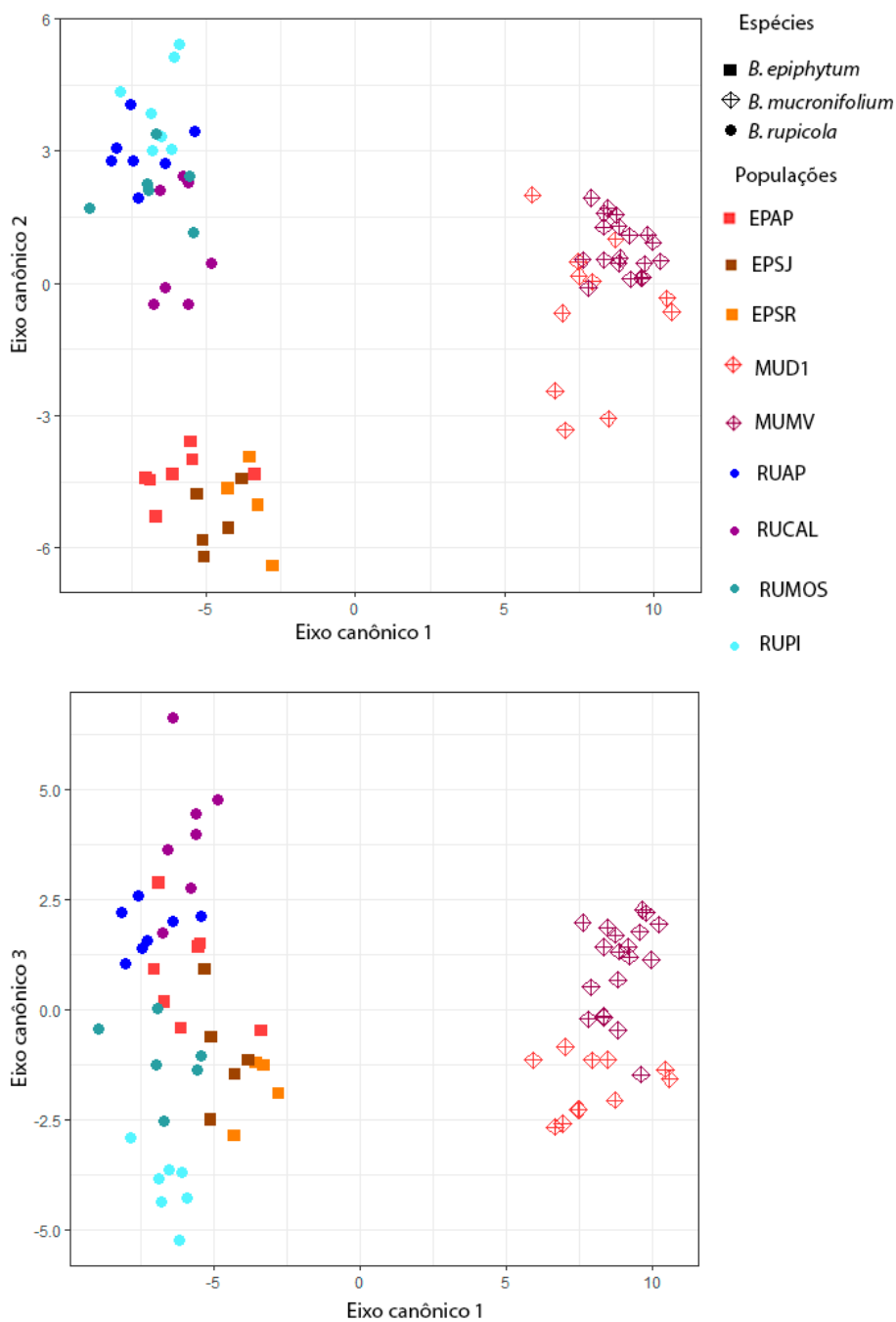


Figura 5. Representação dos três primeiros eixos da análise de variável canônica (CVA) baseado em 26 caracteres morfológicos em nove populações de *B. epiphytum*, *B. mucronifolium* e *B. rupicola* estabelecidas por regiões geográficas e semelhanças morfológicas (ver metodologia). A porcentagem de variância acumulada para os três primeiros eixos = 95% (eixo 1= 76,6%, autovalor =60,7; eixo 2= 12,4%, autovalor= 9,8; eixo 3= 6,54%, autovalor=5,18).

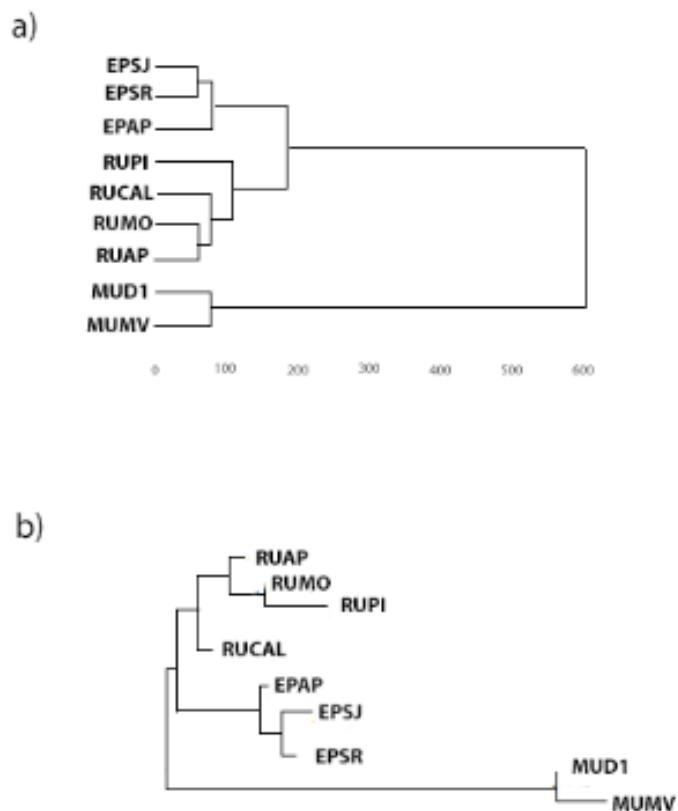


Figura 6. Dendrograma obtido por meio do método UPGMA (a) e neighbor-joining (b) a partir das distâncias de Mahalanobis dos centroides das populações de nove populações de *B. epiphytum*, *B. mucronifolium* e *B. rupicola* utilizando 26 caracteres morfológicos na análise, tanto vegetativos quanto florais.

Tabela 1. Espécies de *Bulbophyllum* analisadas nas análises morfométricas e localização geográfica. Acrônimos para os estados brasileiros: BA=Bahia, GO=Goiás, MG=Minas Gerais, MT=Mato Grosso, PE=Pernambuco, PR=Paraná. *Populações fundidas com outras populações baseado na localização geográfica e resultados do PCA devido ao pequeno tamanho amostral (ver Materiais e Métodos).

Espécie/Município	Código PCA (n)	Código CA (n)	CA coordenada	Voucher
<i>B. adiamantinum</i>				
Alto Paraíso de Goiás (GO)	ADAP(5)	-	14°4'32''S 47°31'1''W	Rodrigues, JG 10 (BHCB)
Inhaí (MG)	ADIN(5)	-	17°59'33''S 43°35'53''W	Rodrigues, JG 513 (BHCB)
Joaquim Felício (MG)	ADJF(8)	-	17°41'25''S 44°19'96''W	Rodrigues, JG 49 (BHCB)
Pirinópolis (GO)	ADPI(4)	-	15°48'13''S 48°50'11''W	Rodrigues, JG 292 (BHCB)
Serra Nova (MG)	ADSN(2)	-	15°38'47''S 42°44'33''W	Rodrigues, JG 358 (BHCB)
<i>B. chloroglossum</i>				
São Thomé das Letras (MG)	CLST(3)	-	21°44'13''S 45°01'12''W	Rodrigues, JG 204 (BHCB)
<i>B. epiphytum</i>				
Alto Paraíso de Goiás (GO)	EPAP(7)	EPAP(7)	13°54'12''S 47°23'07''W	Rodrigues, JG 02 (BHCB)
Carrancas (MG)	EPCAR(1)	EPSJ(1)*	21°28'16''S 44°40'53''W	Rodrigues, JG 128 (BHCB)
Itutinga (MG)	EPI(1)	EPSJ(1)*	21°18'30''S 44°38'36''W	Rodrigues, JG 540 (BHCB)
Joaquim Felício (MG)	EPJF(1)	EPSR(1)*	17°41'29''S 44°11'55''W	Rodrigues, JG 50 (BHCB)
Santana do Riacho (MG)	EPSR(3)	EPSR(3)	19°19'34''S 43°33'43''W	Rodrigues, JG 520 (BHCB)
São João Del Rey (MG)	EPSJ(2)	EPSJ(2)	21°08'37''S 44°18'08''W	Rodrigues, JG 524 (BHCB)
São Thomé das Letras (MG)	EPST(1)	EPSJ(1)*	21°43'31''S 45°00'27''W	Rodrigues, JG 177 (BHCB)
Triunfo (PE)	EPTRI(2)	-	7°50'00''S 38°04'05''W	Fiorini, C 976 (BHCB)
<i>B. insectiferum</i>				
Carrancas (MG)	INCAR(6)	-	21°30'08''S 44°36'10''W	Rodrigues, JG 123 (BHCB)
Tangará da Serra (MT)	INT(1)	-	14°43'09''S 57°25'49''W	Rodrigues, JG 240 (BHCB)
<i>B. mentosum</i>				
Piatã (BA)	MEP(8)	-	13°04'14''S 41°53'47''W	Rodrigues, JG 460 (BHCB)

<i>B. micranthum</i>				
Tibagi (PR)	MGU(1)	-	24°33'22''S 50°15'25''W	Fiorini, C 621 (BHCB)
<i>B. mucronifolium</i>				
Diamantina(MG)	MUD1(17)	MUD1(17)	18°12'24''S 43°33'58''W	Rodrigues, JG 500 (BHCB)
Diamantina(MG)	MUD2(2)	MUD1(2)*	18°14'39''S 43°38'22''W	Rodrigues, JG 502(BHCB)
Milho Verde (MG)	MUMV(11)	MUMV(11)	18°26'41''S 43°27'55''W	Rodrigues, JG 550(BHCB)
São Joao da Chapada(MG)	MUSV(1)	-	17°53'30''S 43°43'54''W	Fiorini, C 359 (BHCB)
<i>B. rupicolum</i>				
Alto Paraíso de Goiás (GO)	RUAP(7)	RUAP(7)	14°4'32''S 47°31'1''W	Rodrigues, JG 20 (BHCB)
Caldas (MG)	RUCAL(7)	RUCAL(7)	21°58'43''S 46°22'15''W	Rodrigues, JG 172 (BHCB)
Mossamedes (GO)	RUMO(6)	RUMO(6)	16°04'44''S 50°11'31''W	Rodrigues, JG 332 (BHCB)
Pirinópolis (GO)	RUPI(7)	RUPI(7)	15°48'13''S 48°50'11''W	Rodrigues, JG 274 (BHCB)

Tabela 2. Caracteres utilizados nas análises morfométricas em 26 populações de oito espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*

Variável	Caracter
Folha	
1	Comprimento da folha completamente desenvolvida <i>in situ</i>
2	Comprimento da folha completamente desenvolvida <i>ex situ</i>
3	Largura da folha completamente desenvolvida <i>in situ</i>
4	Largura da folha completamente desenvolvida <i>ex situ</i>
5	Espessura, medida da região mediana da folha <i>in situ</i> em corte transversal
6	Espessura, medida da região mediana da folha <i>ex situ</i> em corte transversal
Pseudobulbo	
7	Comprimento do pseudobulbo completamente desenvolvido <i>in situ</i>
8	Comprimento do pseudobulbo completamente desenvolvido <i>ex situ</i>
9	Largura do pseudobulbo completamente desenvolvido <i>in situ</i>
10	Largura do pseudobulbo completamente desenvolvido <i>ex situ</i>
Bráctea	
11	Comprimento
12	Maior largura da bráctea
Sépalas	
13	Comprimento da sépala lateral
14	Largura da base da sépala lateral
15	Largura no ponto de inflexão da sépala lateral
16	Ângulo interno formado entre eixo vertical da sépala lateral e seu ponto terminal
17	Comprimento da sépala dorsal
18	Largura da sépala dorsal em 1/3 do comprimento
19	Largura da sépala dorsal em 2/3 do comprimento
Pétalas	
20	Comprimento
21	Largura em 1/3 do comprimento
22	Largura em 2/3 do comprimento
23	Ângulo interno formado entre eixo vertical da pétala e seu ponto terminal
Labelo	
24	Comprimento
25	Maior largura do labelo
26	Espessura, medida da região mediana do labelo em visão lateral
Ovário	
27	Comprimento
28	Largura da região mediana
Coluna	
29	Comprimento incluindo a região estigmática
30	Largura da maior região da coluna

31 Comprimento do estelídio

Tabela 3. Classificação dos indivíduos pela análise de discriminantes das populações de *B. epiphytum*, *B. mucronifolium* e *B. rupicola* utilizando dados florais e vegetativos. A porcentagem de acerto corresponde a classificação do indivíduo na população definida a priori, de acordo com a discriminação na Tab. 1.

Pop.	% Acerto	EPSJ	EPSR	EPAP	RUPI	RUCAL	RUMO	RUAP	MUD1	MUMV
EPSJ	80,00	4	-	1	-	-	-	-	-	-
EPSR	100,00	-	4	-	-	-	-	-	-	-
EPAP	100,00	-	-	7	-	-	-	-	-	-
RUPI	100,00	-	-	-	7	-	-	-	-	-
RUCAL	85,71	-	-	-	-	6	-	1	-	-
RUMO	83,33	-	-	-	1	-	5	-	-	-
RUAP	100,00	-	-	-	-	-	-	7	-	-
MUD1	94,74	-	-	-	-	-	-	-	18	1
MUMV	90,91	-	-	-	-	-	-	-	1	10
Total	93,15	4	4	8	8	6	5	8	19	11

Tabela 4. Classificação dos indivíduos pela análise de discriminantes das populações de *B. epiphytum*, *B. mucronifolium* e *B. rupicola* utilizando apenas os dados florais. A porcentagem de acerto corresponde a classificação do indivíduo na população definida a priori, de acordo com a discriminação na Tab. 1.

População	% Acertos	EPSJ	EPSR	EPAP	RUPI	RUCAL	RUMO	RUAP	MUD1	MUMV
EPSJ	80,00	4	-	1	-	-	-	-	-	-
EPSR	100,00	-	4	-	-	-	-	-	-	-
EPAP	85,71	-	1	6	-	-	-	-	-	-
RUPI	100,00	-	-	-	7	-	-	-	-	-
RUCAL	100,00	-	-	-	-	7	-	-	-	-
RUMO	83,33	-	-	-	1	-	5	-	-	-
RUAP	100,00	-	-	-	-	-	-	7	-	-
MUD1	94,74	-	-	-	-	-	-	-	18	1
MUMV	90,91	-	-	-	-	-	-	-	1	10
Total	93,15	4	5	7	8	7	5	7	19	11

Tabela 5. Classificação dos indivíduos pela análise de discriminantes das populações de *B. epiphytum*, *B. mucronifolium* e *B. rupicola* utilizando apenas os dados vegetativos. A porcentagem de acerto corresponde a classificação do indivíduo na população definida a priori, de acordo com a discriminação na Tab. 1.

População	% Acertos	EPSJ	EPSR	EPAP	RUPI	RUCAL	RUMO	RUAP	MUD1	MUMV
EPSJ	60,00	3	1	1	-	-	-	-	-	-
EPSR	75,00	-	3	-	-	-	1	-	-	-
EPAP	71,43	1	-	5	-	1	-	-	-	-
RUPI	42,86	-	-	-	3	1	2	1	-	-
RUCAL	85,71	-	-	1	-	6	-	-	-	-
RUMO	66,67	-	-	-	1	-	4	1	-	-
RUAP	42,86	1	-	-	-	1	2	3	-	-
MUD1	68,42	-	-	-	-	1	-	-	13	5
MUMV	54,55	-	-	-	-	-	-	-	5	6
total	63,01	5	4	7	4	10	9	5	18	11

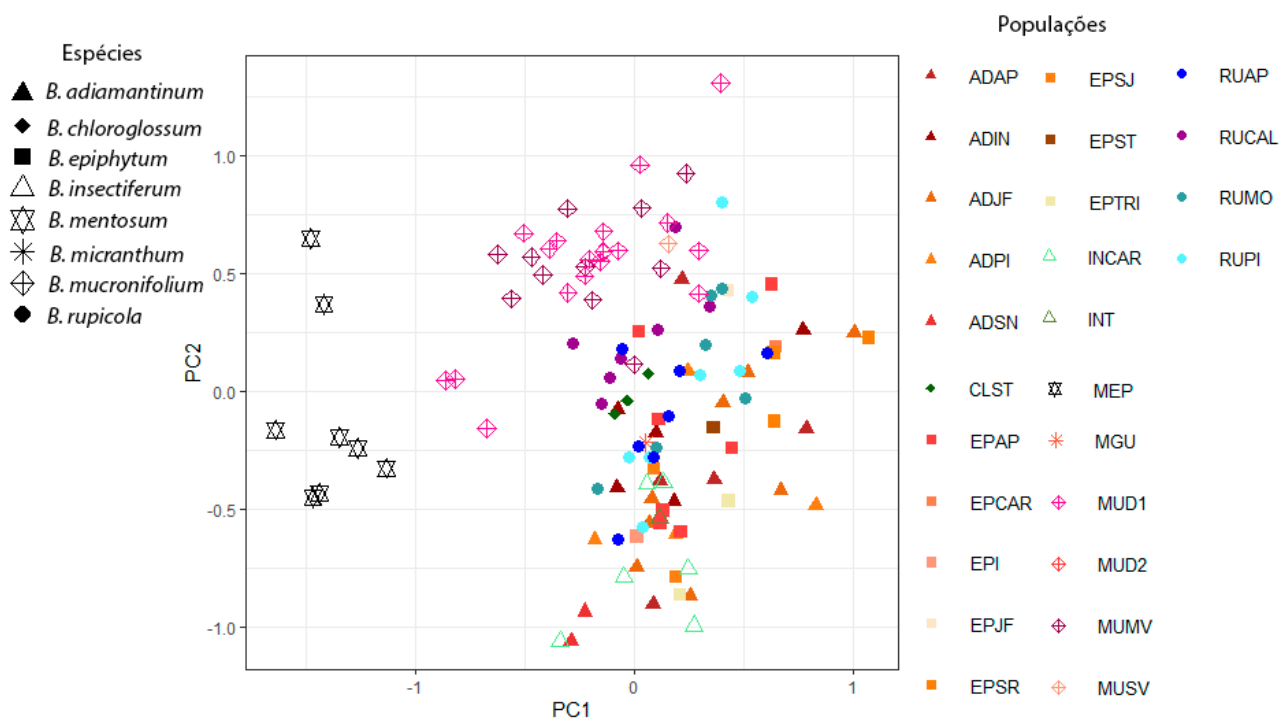


Figura S1. Representação gráfica dos dois primeiros eixos da análise de componentes principais das oito espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* utilizando caracteres vegetativos na análise. A porcentagem de variância acumulada para os dois primeiros eixos = 74% (eixo 1= 56,2%, autovalor =4,5; eixo 2= 17,7%, autovalor= 1,42).

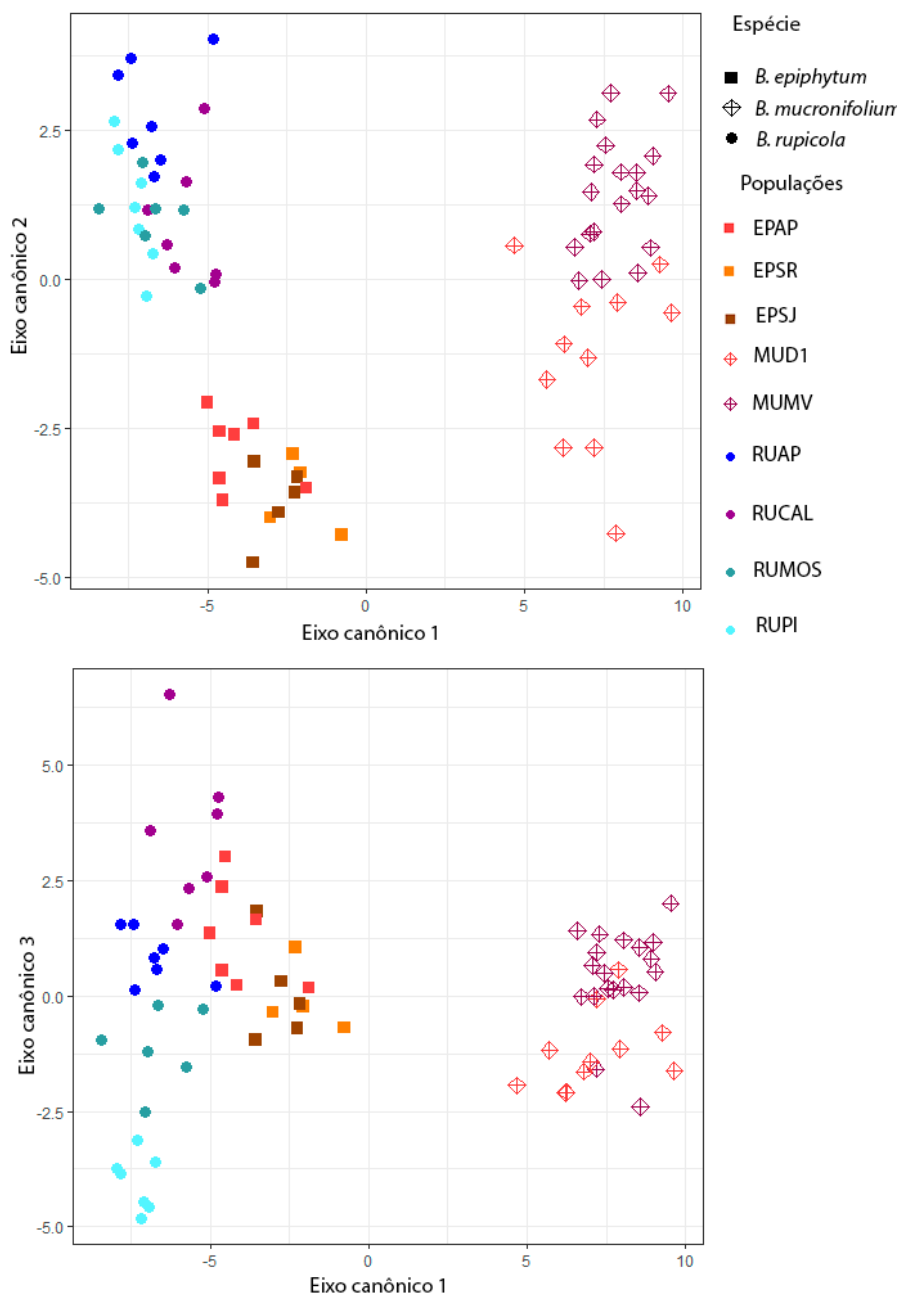


Figura S2. Representação dos três primeiros eixos da análise de variável canônica (CVA) baseado em 21 caracteres morfológicos florais em nove populações de *B. epiphytum*, *B. mucronifolium* e *B. rupicola* estabelecidas por regiões geográficas e semelhanças morfológicas (ver metodologia). A porcentagem de variância acumulada para os três primeiros eixos = 96% (eixo 1= 81,7%, autovalor =48,4; eixo 2= 8,3%, autovalor= 4,93; eixo 3= 6,52%, autovalor=3,84).

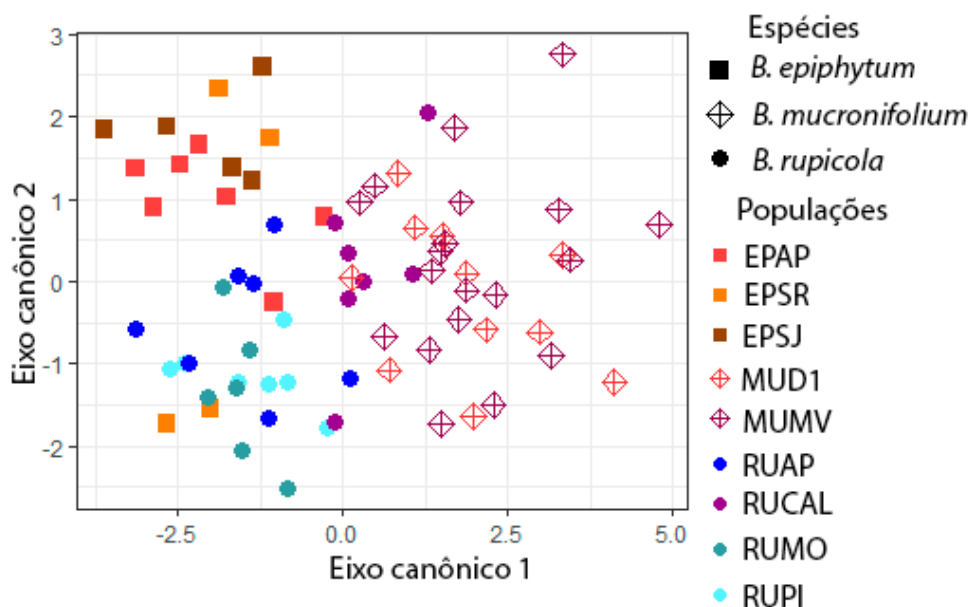
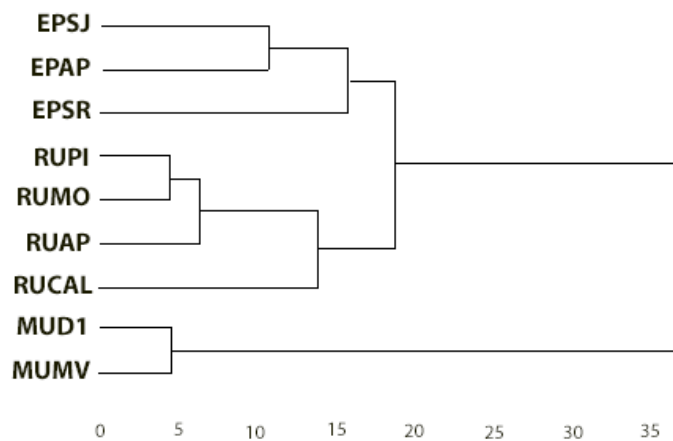


Figura S3. Representação dos dois primeiros eixos da análise de variável canônica (CVA) baseado em caracteres morfológicos vegetativos em nove populações de *B. epiphytum*, *B. mucronifolium* e *B. rupicola* estabelecidas por regiões geográficas e semelhanças morfológicas (ver metodologia). A porcentagem de variância acumulada para os dois primeiros eixos = 81% (eixo 1= 67,4%, autovalor =3,56; eixo 2= 14,33%, autovalor= 0,76).

a)



b)

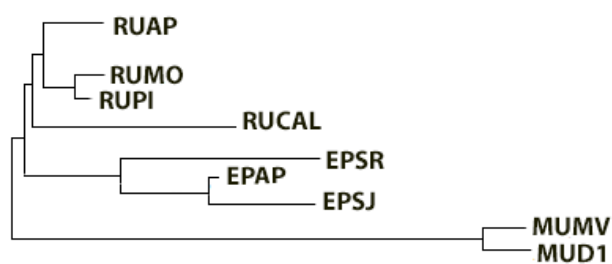


Figura S4. Dendrograma obtido por meio do método UPGMA (a) e neighbor-joining (b) partir das distâncias de Mahalanobis dos centroides das populações de nove populações de *B. epiphytum*, *B. mucronifolium* e *B. rupicola* utilizando caracteres morfológicos vegetativos na análise.

Tabela S1. Componentes principais, autovalores e porcentagem da variância explicada pelos componentes para as oito espécies de *Bulbophyllum* seção *Micranthae* analisadas

Variável	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Folha <i>in situ</i> comprimento	0,63082	0,22019	-0,84944	0,50285	-0,53535
Folha <i>ex situ</i> comprimento	0,51229	0,36868	-0,89805	0,48235	-0,49027
Folha <i>ex situ</i> largura	1,08358	-0,75003	-0,17904	0,17367	0,21529
Folha <i>in situ</i> diâmetro	0,82358	-0,6208	0,16794	0,601	0,52655
Pseudobulbo <i>in situ</i> comprimento	1,1071	-0,62438	-0,12784	0,27946	-0,176
Pseudobulbo <i>ex situ</i> comprimento	0,81935	-0,91694	-0,13575	0,02582	-0,34866
Pseudobulbo <i>in situ</i> largura	1,04567	-0,34844	-0,50057	0,31897	0,42776
Pseudobulbo <i>ex situ</i> largura	0,95404	-0,48154	-0,55039	0,20391	0,19702
Bráctea comprimento	1,17234	-0,2557	0,36684	-0,03648	0,3249
Bráctea largura	1,34338	-0,01862	0,15823	-0,06316	0,22258
Sépala lateral largura base	1,29758	-0,12316	-0,13387	-0,42429	-0,24431
Sépala lateral ângulo	0,73943	0,15462	0,87476	0,5583	-0,31629
Sépala dorsal comprimento	1,28243	0,03213	-0,24203	-0,25173	0,1211
Sépala dorsal largura 1/3	1,30789	0,53209	0,10711	0,01679	0,19685
Sépala dorsal largura 2/3	1,29674	0,34432	0,07095	-0,06044	0,1492
Pétala comprimento	1,32966	0,25339	0,20662	-0,15066	-0,06045
Pétala largura 1/3	1,19027	0,25452	0,59002	0,1486	-0,06332
Pétala largura 2/3	1,21042	0,3894	0,41984	0,08158	-0,21939
Pétala ângulo	0,99948	0,21354	0,7169	0,29171	-0,32274
Labelo comprimento	0,03585	-1,08506	0,62753	-0,23282	-0,47043
Labelo largura	1,17866	0,4278	-0,48711	-0,3903	-0,13235
Ovário comprimento	1,30349	-0,0282	0,1419	-0,13843	0,06326
Ovário largura	1,25063	-0,04907	-0,38681	-0,41199	0,08472
Coluna comprimento	1,02859	0,77671	-0,01176	-0,05088	0,08694
Coluna largura	1,2704	0,48677	0,03668	-0,13145	-0,04545
Estelídeo comprimento	0,86421	-0,76367	-0,08144	-0,51488	-0,31407
Autovalores	14,3548	2,9746	2,3866	1,16424	1,00153
Variância explicada	0,5521	0,1144	0,09179	0,04478	0,03852
Variância acumulada	0,5521	0,6665	0,75831	0,80309	0,84161

Tabela S2. Componentes principais, autovalores e porcentagem da varância explicada pelos componentes para as oito espécies de *Bulbophyllum* seção *Micranthae* utilizando apenas caracteres florais na análise.

Variável	PC1	PC2	PC3
Bráctea comprimento	1,28033	-0,46528	-0,04107
Bráctea largura	1,46251	-0,14062	0,114726
Sépala lateral largura base	1,40297	-0,21536	0,49074
Sépala lateral ângulo	0,88652	-0,3734	-1,09718
Sépala dorsal comprimento	1,40635	0,042442	0,452059
Sépala dorsal largura 1/3	1,49965	0,4036	-0,18227
Sépala dorsal largura 2/3	1,4587	0,264885	-0,06368
Pétala comprimento	1,51386	-0,01126	-0,10255
Pétala largura 1/3	1,37185	-0,17762	-0,53631
Pétala largura 2/3	1,39991	0,002452	-0,43373
Pétala ângulo	1,20052	-0,33035	-0,73993
Labelo comprimento	-0,01937	-1,51523	0,022923
Labelo largura	1,31045	0,496179	0,558452
Ovário comprimento	1,42343	-0,14239	0,115699
Ovário largura	1,33064	0,09196	0,722668
Coluna comprimento	1,21915	0,689584	-0,19964
Coluna largura	1,45743	0,265677	-0,00229
Estelídeo comprimento	0,85495	-0,92414	0,78948
Autovalores	11,841	1,8625	1,65837
Variância explicada	0,6578	0,1035	0,09213
Variância acumulada	0,6578	0,7613	0,85344

Tabela S3. Componentes principais, autovalores e porcentagem da varância explicada pelos componentes para as oito espécies de *Bulbophyllum* seção *Micranthae* utilizando apenas caracteres vegetativos na análise.

Váriaveis	PC1	PC2
Folha <i>in situ</i> comprimento	-1,0459	-1,42785
Folha <i>ex situ</i> comprimento	-0,8579	-1,56816
Folha <i>ex situ</i> largura	-1,701	0,473571
Folha <i>in situ</i> diâmetro	-1,3783	0,673836
Pseudobulbo <i>in situ</i> comprimento	-1,7147	0,235594
Pseudobulbo <i>ex situ</i> comprimento	-1,4842	0,465776
Pseudobulbo <i>in situ</i> largura	-1,6807	-0,00406
Pseudobulbo <i>ex situ</i> largura	-1,638	0,009826
Autovalores	4,4978	1,4187
Variância explicada	0,5622	0,1773
Variância acumulada	0,5622	0,7396

Tabela S4. Correlação entre os eixos das variáveis canônicas padronizados e as variáveis tanto vegetativas quanto florais utilizando as populações como variável categórica a priori das espécies *B. epiphytum*, *B. rupicola* e *B. mucronifolium*.

Variável	CVA1	CVA2	CVA3	CVA4
Folha <i>in situ</i> comprimento	-0,83004	-0,84255	0,165488	0,078598
Folha <i>ex situ</i> comprimento	0,34020	0,11654	0,004205	0,667997
Folha <i>ex situ</i> largura	-0,03414	0,61844	0,666217	-0,454515
Folha <i>in situ</i> diâmetro	0,33991	-0,31350	-0,489221	0,451439
Pseudobulbo <i>in situ</i> comprimento	0,01586	0,71441	-0,059457	-0,013350
Pseudobulbo <i>ex situ</i> comprimento	-0,08869	-0,68774	0,458667	-0,244668
Pseudobulbo <i>in situ</i> largura	0,00764	-0,42900	-0,544550	-0,421659
Pseudobulbo <i>ex situ</i> largura	0,36864	0,71679	0,255613	-0,101029
Bráctea comprimento	0,14507	0,41077	0,386336	-0,327926
Bráctea largura	-0,05543	0,46890	0,703036	-0,021595
Sépala lateral largura base	-0,36087	-0,22171	0,478430	-0,521239
Sepala lateral ângulo	0,60105	-0,37216	-0,632492	-0,137935
Sépala dorsal comprimento	-0,29645	1,18318	-0,241157	-0,004809
Sépala dorsal largura 1/3	0,34232	0,33870	-0,274236	0,615636
Sépala dorsal largura 2/3	0,02135	0,39375	0,262857	0,230693
Pétala comprimento	0,43908	-1,33847	0,247272	0,151045
Pétala largura 1/3	0,68696	-0,06194	0,249400	0,245590
Pétala largura 2/3	0,27543	-0,47955	-0,395563	0,070560
Pétala ângulo	0,40862	0,06681	-0,429371	-0,090097
Labelo comprimento	0,38236	-0,12579	-0,621372	0,686122
Labelo largura	-0,45173	-0,67875	0,804292	-0,461456
Ovário comprimento	-0,02033	0,07507	-0,224607	-0,110171
Ovário largura	-0,08078	0,20968	0,267054	0,309266
Coluna comprimento	0,02138	-0,07056	0,458277	-0,346262
Coluna largura	-0,04318	-0,07488	-0,371306	-0,693011
Estelídeo comprimento	0,38879	0,11688	0,112391	-0,472695
Autovalores	60,75568	9,85270	5,183202	1,345509
Variância acumulada	0,76622	0,89048	0,955851	0,972820

Tabela S5 Correlação entre os eixos das variáveis canônicas padronizados e as variáveis vegetativas utilizando as populações como variável categórica a priori das espécies *B. epiphytum*, *B. rupicola* e *B. mucronifolium*.

Váriaveis	CVA1	CVA2
Folha <i>in situ</i> comprimento	0,823114	0,161026
Folha <i>ex situ</i> comprimento	0,130671	0,097878
Folha <i>ex situ</i> largura	-0,505596	-0,205629
Folha <i>in situ</i> diâmetro	-0,299076	-0,026733
Pseudobulbo <i>in situ</i> comprimento	-0,892529	0,554572
Pseudobulbo <i>ex situ</i> comprimento	-0,019996	0,547275
Pseudobulbo <i>in situ</i> largura	0,219500	-0,855552
Pseudobulbo <i>ex situ</i> largura	-0,211300	-0,241384
Autovalores	3,559504	0,756434
Variância acumulada	0,674335	0,817638

CAPÍTULO 3

VARIATION IN SELF-INCOMPATIBILITY AND INTERSPECIFIC COMPATIBILITY IN A LINEAGE OF THE MOSTLY SELF-COMPATIBLE GENUS *BULBOPHYLLUM* (*B.* SECT. *MICRANTHAE* - ORCHIDACEAE)

Rodrigues, JG; Borba, EL.

doi: 10.1007/s00606-023-01846-2

(Publicado na *Plant Systematic and Evolution*)

Variation in self-incompatibility and interspecific compatibility in a lineage of the mostly self-compatible genus *Bulbophyllum* (*B. sect. Micranthae* - Orchidaceae)

Jacqueline Gomes Rodrigues^{1,2}, Eduardo Leite Borba¹

Abstract

A vast majority of Orchidaceae species are self-compatible, and many present mechanical or temporal barriers that prevent self-pollination. Self-incompatibility is present in some orchid groups pollinated by insects that pay long visits to a flower, in addition to visiting many flowers of the same plant, as observed in Diptera. The genus *Bulbophyllum*, despite being pollinated by flies, predominantly comprises self-compatible species, and some of them present pre-pollination selfing barriers. However, there are some reports of the *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* presenting self-incompatibility. This section comprises 12 species, some of which show complex taxonomy possibly due to introgression. Here, we analyzed the morphology and development of pollen tube following intra- and interspecific experimental pollinations in eight species of *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* to understand their reproductive system and isolation. All species in the section are self-incompatible, except for the species sister to the remaining sections, *Bulbophyllum mentosum*, and need vectors for pollination. Epifluorescence microscopy revealed that the major site of incompatibility is present at the beginning of the column whilst in some others the pollen grains did not germinate. However, in some species with partial self-incompatibility, pollen tubes turned tortuous and anomalous upon reaching the ovary. We believe that this self-incompatibility reaction in the ovary is an extended gametophytic self-incompatibility reaction, as reported in other myophilous orchids, but diallelic crossing experiments are necessary to confirm our hypotheses. In the studied species of *B. sect. Micranthae*, reproductive isolation is mainly due to pre-pollination barriers, and fruit set is possible in most interspecific crossings, except for those involving the basal most species *B. mentosum*.

Keywords: Breeding system. Gametophytic self-incompatibility. Interspecific reproductive barrier. Prezygotic barriers. Reproductive biology.

Introduction

Cross-pollination increases genetic variability and decreases inbreeding depression in natural populations (Govidaraju 1989). In Orchidaceae, most species are capable of self-fertilization, although these events are avoided mainly through pre-pollination barriers (ethological, mechanical and temporal barriers, among others) and occasionally through post-pollination barriers (i.e., self-incompatibility) (Dressler 1981). Self incompatibility is a process leading to recognition and rejection of own or related pollen and it is rare in orchids (De Nettancourt, 1977; Van der Pijl and Dodson 1966). Although self-incompatibility has been reported in some orchids groups, mainly in the subfamily Epidendroideae such as Dendrobiinae (i.e., *Dendrobium*), Pleurothallidinae, Oncidiinae (Johansen 1990; Borba et al. 2011; Castro et al. 2019) it is more often present in species that are pollinated by Diptera, insects which pay long visits to a flower, in addition to visiting many flowers of the same plant (Borba and Semir 1998b, 2001; Borba et al. 2001a, 2011). This pollinator behavior may promote self-pollination, leading to autogamy in the absence of mechanical or genetic barriers (Borba and Semir 1999; Borba et al. 2001b). This phenomenon has been observed in the Neotropical subtribe Pleurothallidinae (nearly 4,100 species), in which self-incompatibility is a main trait of the group (Borba et al. 2011). *Bulbophyllum* and Pleurothallidinae are the two largest plant groups pollinated by Diptera (Van der Pijl and Dodson 1966).

Bulbophyllum is one of the largest genera of Orchidaceae (with nearly 1,900 known species), widely distributed in Asia, Africa, and the Neotropics (Sieder et al. 2007; Pridgeon et al. 2014). In orchids, major factor in species richness is the specialization in pollinator (Schiestl and Schluter 2009). Despite some studies on the pollination biology of *Bulbophyllum* species (e.g., Jones and Gray 1976; Sazima 1978; Bartareau 1994; Borba and Semir 1998a,b; Teixeira et al. 2004; Tan et al. 2006; Humeau et al. 2011), our knowledge on the reproductive biology of this group remains limited considering its species diversity. Most *Bulbophyllum* species studied thus far are predominantly self-compatible, with plants adapted to Diptera-mediated cross-pollination (Van der Pijl and Dodson 1966; Borba and Semir 1998b; Borba et al. 1999; Van der Cigel, 2001; Nishida et al. 2004). Conversely, some *Bulbophyllum* species present the ability to automatic self-pollination, as observed in some species from Madagascar and adjacent islands (Gamish et al. 2014).

The nearly 60 species of *Bulbophyllum* occurring in the Neotropical region constitute a clade, which is divided into six monophyletic sections (Smidt et al. 2011). Species in the Neotropical section *Didactyle* are self-compatible (Borba et al. 1999). However, *B. involutum* and *B. exaltatum*, which belong to this section, possess an unusual mechanism preventing self-pollination; specifically, this system presents a temporal limitation of the pollinarium size with the stigmatic cavity (Borba and Semir 1999). This strategy prevents pollination by insects that spend long visitation time on a same plant (Borba and Semir 1999). This strategy prevents pollination by insects that spend long visitation time on a same plant (Borba and Semir 1999). Two other species from the Neotropical sections *Xiphizusa* (*B. jamaicense*) and *Napelli* (*B. granulatum*) present cleistogamous flowers (Smidt 2007). Meanwhile, self-incompatibility was mentioned for species from sections *Napelli*, *Xiphizusa*, and *Micranthae* (Verola 2002).

The phylogenetic relationship between the Neotropical sections *Didactyle*, *Micranthae* and *Xiphizusa* is unclear. Analyses performed by Smidt et al. (2011) using chloroplast and nuclear molecular markers indicate that the self-compatible section *Didactyle* is a sister group of section *Xiphizusa* (but presenting low support), however analyses performed by Gamish et al. (2019) using only nuclear DNA offered a high support for section *Didactyle* as a sister group to sect. *Micranthae*. The Neotropical *B.* sect. *Micranthae* comprises 12 species, constituting a monophyletic group distributed in three main lineages in molecular phylogenetic analyses: *B. mentosum* as sister to the rest of the section, a lineage including *B. insectiferum* and *B. adiamantinum*, and another lineage forming the core of the section, with a collapsed clade of closely related nine species (Smidt et al. 2011). The section is characterized by ovate-to-fusiform unifoliate pseudobulbs, typically aggregated; fleshy leaves, ranging from flat to acicular; inflorescence with thin rachis; pedicelled and spirally arranged flowers; labellum trilobed and fleshy, with dentiform lateral lobes; and column with the rostellum and a broad stigma (Smidt 2007). White flowers, yellow labellum, and sepal with a vein are the synapomorphies of the core clade of this section (Smidt 2011). Although molecular studies using nuclear internal transcribed spacer sequences and chloroplast molecular markers could not resolve the phylogenetic relationships at the core of the section, studies on floral anatomy and micromorphology have highlighted unique characteristics at the specific level in this section (Nunes et al. 2017).

Interspecific-compatibility and gene flow barriers between species in the section *Micranthae* are little known, and data on alloenzymes have indicated the possibility of

introgression between *Bulbophyllum epiphytum* and *B. rupicola* (Azevedo et al. 2007). The investigation of reproductive barriers among related species may provide clues to understand the reproductive isolation and evolutionary pathways associated with species establishment. In sympatric species of *B. sect. Didactyle* species identity is maintained by a series of pre- and post-pollination barriers (Borba and Semir 1998b). Partial inter-incompatibility to natural hybridization is present in species possessing pollinarium that do not decrease in size (*Bulbophyllum weddellii*) as well as in species that possess pollinarium with temporal size variation (*B. involutum*); eventually, however, hybridization to some extent is possible between these species (Borba and Semir 1998a; Borba et al. 1999).

Bulbophyllum sect. Micranthae provides an attractive opportunity to study self-compatibility in a largely self-compatible genus and inter-compatibility between closely related species. Thus, the present study investigates the reproductive systems of eight *B. sect. Micranthae* species, including representatives of the three lineages of the section, evaluating their implications in group systematics and the transition between self-compatible and self-incompatible systems in *Bulbophyllum* through the course of evolution.

Materials and methods

Plant material

We studied eight species representing three phylogenetically and morphologically distinct lineages of *Bulbophyllum sect. Micranthae*: *B. adiamantinum*, *B. chloroglossum*, *B. epiphytum*, *B. insectiferum*, *B. mentosum*, *B. micranthum*, *B. mucronifolium*, and *B. rupicola* (Fig. 1). Species in this section are rupicolous or epiphytic, distributed in central South America, mainly in the *campos rupestres* (rocky fields) regions of Brazil. A total of 6 to 20 individuals of each species from different populations were sampled, except for *B. micranthum*, *B. chloroglossum* and *B. mucronifolium*, for which only one, three and four specimens were sampled from a single population, respectively (Table 1). We cultivated the specimens in a greenhouse at the Museum of Natural History and Botanical Garden of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, for at least 6 months before experimental pollinations. Vouchers are deposited

at the BHCB herbarium (Federal University of Minas Gerais). Controlled experimental pollinations were performed in three successive years (2019-2021).

Reproductive system and inter-compatibility

Before the anthesis of the flowers, we closed the specimens in organza bags to avoid natural pollinators. We marked at least five flowers of each species and left untreated to verify spontaneous self-pollination and/or agamospermy. We performed manual self-, intra- and inter-population cross-pollinations in flowers of each of the eight species on the first day of anthesis. Additional crosses were carried out to accompany the development of the pollen tube, interrupting at regular times (every 24 hours for the first 20 days) the development of flowers after pollination. In species presenting synchronous flowering (see Results), we also performed interspecific pollinations.

Ripe fruits from each pollination treatment were collected and fixed in 37% formaldehyde, acetic acid, and 50% ethyl alcohol (1:1:18, v/v) (50% FAA) solution.

In orchids, it is difficult to evaluate the viability of the seeds due to their obligate association with mycorrhizal fungi. This way, we examine the morphology of approximately 300 seeds per fruit using light microscopy as an indication of viability. Seeds without or with reduced or rudimentary embryos were considered unviable, and seeds with well-developed embryos were considered viable, as described by Borba et al. (2001b). The effects of pollination treatments on fruit set and the viable embryo formation rate were analyzed using chi-square and Kruskal-Wallis tests in R version 4.1.0 (R core Team 2020).

Pollen tube morphology

The inflorescences were monitored daily throughout the flowering period. Aborted flowers from each treatment as well as those collected at regular intervals after pollination (three flowers every 24 hours for the first 20 days of development) were fixed in 50% FAA solution. Subsequently, the fixed pistils and ovaries were isolated and treated with 10N NaOH solution at 60°C for approximately 20 min. After washing the material with distilled water, 1% aqueous aniline blue solution was added. The samples were observed under an ultraviolet epifluorescence microscope

to investigate pollen grain germination and pollen tube morphology (modified from Martin 1959). All pistils from flowers removed at regular times; those aborted after pollination in *B. chloroglossum*, *B. insectiferum*, *B. mentosum* and *B. micranthum* and those aborted after interspecific crossing were examined using epifluorescence microscopy. Twenty samples of *B. adiamantinum*, *B. epiphytum*, and *B. rupicola* per treatment per species were randomly selected for microscopic observation. The pollen tubes with normal morphology and development were considered compatible, and those with abnormal and interrupted growth were considered incompatible.

Results

Floral biology and phenology

Field incursions to natural populations and records from vouchers deposited in herbaria (Reflora Database; Reflora 2021) confirmed that the flowering period of the cultivated specimens was synchronous with that of the wild ones. The eight species of *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* flowered from late winter to early summer, with most species flowering in spring (Fig. 2). Species generally possessed one to three inflorescences, each containing 6 to 50 flowers; in *B. mentosum* there are fewer flowers (6–10) per inflorescence. All species have small flowers (0.5–1 cm), except *B. mentosum* (1.5–2 cm). The flowers opened mainly in the morning, with simultaneous opening of most flowers within the inflorescence, except in *B. mentosum* and *B. adiamantinum*, in which one to three antheses per day per inflorescence were recorded. The flowers remained available for approximately 7–10 days in the core species of the section, emitting a sweet scent throughout the day. In the other lineages of the section, scent perception is weak and the flowers remained available for approximately 6 days in *B. mentosum* and 15 days in *B. adiamantinum* and *B. insectiferum*. Fruits developed and reached maturity at approximately four (*B. epiphytum*, *B. rupicola*, *B. chloroglossum*, *B. micranthum*, and *B. mucronifolium*) to six (*B. adiamantinum*, *B. insectiferum*, and *B. mentosum*) months after pollination.

Reproductive system

A total of 812 experimental pollinations were performed. Unpollinated flowers did not produce fruit in any species. Self-pollinated flowers produced little or no fruits, except in *B. rupicola*, and *B. mentosum* (Table 2). In *B. mentosum*, fruit set was higher in self than in cross-pollinations (55% and 29%, respectively). However, chi-square test revealed no difference between the two treatments ($p = 0.37$). Only 2 of the 16 individuals of *B. epiphytum* formed fruits in self-pollinations. A similar result was found in *B. adiamantinum*. As such, fruit set in self-pollinations (7%) was much lower than that in cross-pollinations (66%). In the self-pollination treatments, only three of the 22 individuals sampled produced fruits, totaling just four fruits collectively. Furthermore, seven of the 15 *B. rupicola* individuals sampled developed fruits in self-pollinations, although fruit set through selfing was significantly lower from that in cross-pollinations ($p < 0.005$). There were no significant differences between fruit set in interpopulation and in intrapopulation cross-pollinations in *B. epiphytum* ($p = 0.43$) and *B. adiamantinum* ($p = 0.19$). Similarly, there were no significant differences in the viable embryo formation rate among different treatments in the eight species (Fig. 3).

Inter-compatibility

All species subjected to interspecific crosses formed fruits, except those involving *B. mentosum* and *B. chloroglossum* as the pollen donor for *B. rupicola* (Table 3). Crosses between the sister species *B. adiamantinum* and *B. insectiferum* yielded high fruit set (75% with *B. insectiferum* as the pollen donor and 85% with *B. adiamantinum* as the pollen donor) (Table 3). However, seed viability was statistically higher with *B. adiamantinum* as the pollen receptor (78% versus 39%, Fig. 4). Even though *B. epiphytum* showed high fruit set in interspecific crosses, seed viability remained low, as observed in fruits from intraspecific crosses.

Pollen tube morphology

Following cross-pollination, most of the pollen grains deposited on the stigma germinated in all species. Pollen grain germination and pollen tube morphology were similar among species, except in timing of pollen tube development. In *B. epiphytum*, *B. rupicola*, and *B. chloroglossum*, pollen grains germinated 24 hours after pollination. Meanwhile, in *B. adiamantinum*, *B.*

insectiferum, *B. mucronifolium*, and *B. micranthum*, pollen grains germinated 4–7 days after pollination in most of the analyzed samples. The pollen grains of *B. mentosum* required the longest time to germinate, at 9 days after pollination.

Pollen tubes grew uniformly through the stylar canal, presenting regular diameter and callose plug deposition (Fig. 5a, c). After approximately 10 days of pollination, the pollen tubes reached the ovary, where they remained until the ovules differentiated, except in *B. chloroglossum* and *B. mentosum*, in which the pollen tubes required approximately 5 and 20 days, respectively, to penetrate into the ovary.

In *B. adiamantinum* and *B. micranthum*, most pollen grains did not germinate following self-pollinations. In some flowers that withered after 7–9 days of self-pollination, only a few pollen grains germinated. In *B. adiamantinum*, the germinated pollen tubes from self-pollination presented a rather tortuous anomalous morphology and thinner than the ones formed by cross-pollination in the same group. In *B. chloroglossum*, *B. insectiferum*, *B. epiphytum*, *B. rupicola*, and *B. mucronifolium*, although most pollen grains germinated following self-pollination, they exhibited delayed development compared to pollen grains that germinated following cross-pollination. Furthermore, the pollen tubes developed from self-pollination were restricted to the stigmatic cavity, becoming very thin upon in contact with the beginning of the stylar canal (Fig. 5d) or showing apex dilatation and anomalous deposition of callose (Fig. 5e).

Some pollen tubes could grow up to the ovary region in self-pollinated flowers of *B. epiphytum* and *B. rupicola*, exhibiting morphology similar to that observed after cross-pollination. However, upon penetrating the ovary, these pollen tubes turned tortuous with anomalous morphology (Fig. 5f). This phenomenon was observed in respectively 10% and 20% of senescent *B. epiphytum* and *B. rupicola* flowers after self-pollination, respectively. One individual of *B. rupicola* presenting pollen tubes in the ovary region set fruits after self-pollinations (n = 9 fruits from 19 self-pollinated individuals); however, this was also observed in other individuals that did not set fruits in self-pollinations. There were no differences in pollen tube development between self- and cross-pollinations in *B. mentosum*.

Pollen grains from interspecific crossings germinated normally. However, most flowers that withered after interspecific crosses presented pollen tubes restricted to the stigmatic region, exhibiting similar morphology to that observed after self-pollinations (Fig. 5b). Only *B.*

epiphytum × *B. rupicola* and *B. rupicola* × *B. chloroglossum* crossings presented homogeneous growth of the pollen tube in aborted flowers, reaching the ovary region.

Discussion

According to our results, all eight species of *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* studied depend on pollinators to set fruits, and cannot develop fruit through spontaneous self-pollination. All species showed some degree of self-incompatibility, except *B. mentosum* - the most basal species of this section. Studies involving *Bulbophyllum* species have demonstrated that the genus is largely self-compatible (Gamish et al. 2014). In the Neotropical region, there is no information on the reproductive systems of the basal sections *Bulbophyllaria* and *Furvescens*, and all studied species in *B.* sect. *Didactyle* are self-compatible (Smidt 2007). Self-incompatibility may have emerged early in *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*, following the divergence of *B. mentosum* from the other species. Alternatively, self-incompatibility may have emerged earlier in the Neotropical lineage of the genus, since self-incompatible species were already recorded in sections *Napelli* and *Xiphizusa* (Verola 2002). Therefore, studies on the reproductive systems of the Neotropical *Bulbophyllum* clade using an evolutionary approach are warranted to ascertain the presence of homoplasies in the origin of the characteristics of these mating systems.

Self-incompatibility is rather rare in Orchidaceae in general, it was observed in *Dendrobium* (Johansen, 1990), Oncidiinae (Castro et al 2019) and in dipteran-pollinated orchid groups, such as the Pleurothallidinae (Borba et al. 2011). Overall, *Bulbophyllum* and Pleurothallidinae present floral convergence due to similar pollination systems (Dressler 1993). As such, both groups are visited by flies of several Dipteran families (e.g., Milichiidae, Phoridae, and Chloropidae; Christensen 1994) that pay long visits on flowers and fly short distances between plants (Borba and Semir 1998b, 2001). Although there are few studies on pollination in *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*, self-incompatibility may have emerged in the group under the evolutionary pressure of the behavior of pollinators that visit their flowers as a strategy able to maintain genetic variability. Verola (2002) observed that Milichiidae flies (*Pholeomyia* sp.) that pollinated *B. insectiferum* visited several flowers of the same inflorescence, which may result in geitonogamous pollinations in the absence of a genetic barrier; conversely, *B. epiphytum* was visited by dipterans of the family Sciaridae (*Bradysia* spp.), which may leave immediately after

pollinarium removal and visit other inflorescences of different plants, reducing the probability of self-pollination even in the absence of self-incompatibility (Verola 2002).

Associated with long pollinator visits, the species in the section *Micranthae* present clonal growth and simultaneous anthesis with most of the inflorescence flowers available to the pollinator. Presumably, increased floral display (size and number of available flowers per inflorescence) increases the number of floral visitors and the rate of self-pollination due to visitation of flowers from the same plant (geitonogamy) in the absence of self-incompatibility (Geber 1985; Robertson 1985; Williams 2007, Christopher et al. 2021). Thus, there may be an evolutionary pressure to maintain self-incompatibility in the species in the section. Our hypothesis is supported by the absence of self-incompatibility in *B. mentosum* in which anthesis are sequential in the inflorescence, with one to two flowers available to the pollinator at a time. But this feature alone is not enough to explain the presence of self-compatibility since sequential anthesis was also observed in *B. adiamantinum* which showed strong self-incompatibility.

Apparently, in the species of *B. sect. Micranthae*, including *B. epiphytum*, *B. rupicola*, *B. insectiferum*, and *B. adiamantinum*, self-incompatibility is efficient in maintaining high genetic variability (Azevedo et al. 2007). Consistent with observations in the myophilous species of *Acianthera* (Borba et al. 2001), genetic variability values for these *Bulbophyllum sect. Micranthae* species using allozymes as the molecular markers were amongst the highest ever recorded in plants (Azevedo et al. 2007). Despite the high variability observed, however, a high inbreeding coefficient was also detected in these *Bulbophyllum* populations, due perhaps to the very small size of their populations leading to biparental inbreeding (Azevedo et al. 2007).

The self-incompatibility reaction sites of *B. sect. Micranthae* were located in the stigmatic cavity (when pollen grains do not germinate) or at the beginning of the stylar canal (interrupted pollen tube growth in the column), corroborating the findings of Verola (2002) in some species of this group. Although most species show self-incompatibility reactions in the stigma or column, we identified another self-incompatibility reaction site in the ovary of *B. epiphytum* and *B. rupicola*. In these species, pollen tubes reached the placentas in the ovary, but they were obstructed before penetrating the ovules. The shared self-incompatibility sites detected in these two species may result from their phylogenetic proximity.

Early-acting self-rejection, when pollen germination is inhibition on the stigma, is often a response to sporophytic self-incompatibility, however it is rarely observed in monocots

(Baumann et al. 2000; Sage et al. 2001; Gontijo et al. 2010; Ren et al. 2019). The occurrence inhibition of pollen germination in the stylar canal is frequently observed in gametophytic self-incompatibility (De Nettancourt 1997). At this time, with our results, we cannot conclude that there is a true sporophytic or gametophytic self-incompatibility in *B.* sect *Micranthae*. Another mechanism observed in some angiosperm families is the late-acting self-incompatibility system, characterized by the reaction occurring in the ovary, with the possibility of ovule penetration and even fertilization; eventually, however, the ovules, seeds, and, ultimately, fruits from self-pollinated flowers abort (Seavey and Bawa 1986). Self-incompatibility reaction sites have been observed in the genus *Hypoxis*, a close relative of Orchidaceae (Ren et al. 2019), in *Dendrobium* (Niu et al. 2018) and in the subtribe Pleurothallidinae. In Pleurothallidinae, it was observed inhibition reaction in the stigma, where pollen grain germination does not occur (Barbosa et al. 2009; Gontijo et al. 2010); in the stylar canal, where pollen tube development is interrupted (Borba et al. 2001b, 2011); and in the ovary, where the pollen tube penetration in the ovule is blocked (Borba et al. 2011). The same pollen tube growth phenotypes were observed in self-incompatible species in *Dendrobium* (Niu et al. 2018). Here, the same self-incompatibility reaction sites were observed in *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*. Therefore, investigation of other self-incompatibility orchid species with pollen tube observation experiments is needed, which may reveal more than one molecular mechanism of self-incompatibility or different phenotypes of the same mechanism.

In their study on *Acianthera johannensis*, a partially self-incompatible species of the subtribe Pleurothallidinae, Duarte et al. (2020) suggested that the self-incompatibility site in the ovary results from the extension of the gametophytic self-incompatibility recognition system that acts in the column, differing from the late-acting self-incompatibility system present in other plant groups. Similar to that in *A. johannensis*, we believe that the recognition site in the ovary of *B. epiphytum* and *B. rupicola* differs from the typical late self-incompatibility system considering the uniform morphology of pollen tubes at both reaction sites. The occurrence of self-incompatibility reaction extended to the ovary region in another group of orchids (e.g., Pleurothallidinae) as well as other plant families (e.g., Theaceae, Zhang et al. 2016) indicates that the reaction site of the self-incompatible pollen tube may be labile, and it is impossible to determine whether self-incompatibility is conferred solely by this incompatibility site. Further

studies involving diallelic crosses between full siblings in self-incompatible species are essential to test this hypothesis.

Although few interspecific crosses could be performed, our results indicate that hybridization is prevented mainly due to pre-pollination barriers. In Orchidaceae, pre-pollination barriers, such as floral morphological differences, pollinator specificity, temporal separation of the flowering period, and geographic separation, are the major factors ensuring the reproductive isolation of closely related species (van der Pijl and Dodson 1966; Dressler 1981). The flowering period of the lineage of the section containing *B. adiamantinum* and *B. insectiferum* differs from the core of the section, preventing hybridization in sympatric pairs of species occurring at several locations (e.g., *B. adiamantinum* and *B. rupicola*; *B. insectiferum* and *B. epiphytum*, *B. adiamantinum* and *B. epiphytum*). The flowering period of *B. mentosum*, the basalmost species of *B. sect. Micranthae*, overlaps with the most other species of the section, and this species co-occurs with *B. mucronifolium*. However, its floral morphology is rather different from that of the other species, rendering natural hybridization between this and other species of the group unlikely even when they share pollinators. Interspecific pollination with *B. mentosum* as the pollen donor is rather difficult due to the greater size of its pollinarium (~0.8 mm versus 0.4 mm in the other species) relative to the size of the stigmatic cavity (~1.1 mm versus 0.5 mm in the other species). Unidirectional isolation due to the size of the pollinarium was also observed in *B. weddellii* and *B. involutum*, which are sympatric species with synchronous flowering and share pollinators (Borba and Semir 1999).

The correlation between genetic distance and seed production in interspecific crosses was observed in *Dendrobium* (Pinheiro et al 2015a), indicating a gradual evolution of reproductive isolation. This pattern was also observed in *B. sect. Micranthae*. The phylogenetically close species *B. insectiferum* and *B. adiamantinum* exhibit overlapping phenology and, according to our results, are bidirectionally inter-fertile, presenting a high fructification rate and seed production when intercrossed indicate that post-pollination and pre-zygotic barriers between species are weak, at least at the early stages. Natural hybridization is widespread in the family, and usually the species lack of complete reproductive barriers (Mallet 2005). A high level of reproductive inter-compatibility with weak pre-pollination barriers has been observed in subtribe Laeliinae and hybridization has been increasingly documented in genus *Epidendrum* (Pinheiro et al. 2010, 2015b, 2016). Natural hybridization between *Bulbophyllum* species has been reported

for species of *B. sect. Didactyle* (Borba and Semir 1998a; Azevedo et al. 2006). However, reduced fertility has been noted in interspecific crosses of these species, in addition to mechanical pre-pollination barriers associated with pollinarium size incompatibility. Thus far, there has been no unequivocal evidence of natural hybridization between *B. adiamantinum* and *B. insectiferum*, which could result from insufficient collection or the action of post-zygotic barriers.

A high fruiting rate is also observed in crosses between *B. epiphytum* and *B. rupicola*, with a uniform morphology of the pollen tubes reaching the ovary similar to that observed in intraspecific crosses. The greatest taxonomic problems in *B. sect. Micranthae* are found mainly in these two species. Azevedo et al. (2007) observed a clear phylogenetic proximity between these species using alloenzymes, suggesting the possibility of introgression or cospecificity. We are currently conducting research to confirm taxonomic identity and to verify the occurrence of eventual gene flow between these morphologically similar species. Knowledge of breeding systems of this species provide valuable information for evolutionary interpretation. However, in order to understand the dynamics of this group, it is necessary to go a long way towards studies on survival and fitness of the individuals submitted to the experimental crosses performed. The nature of these studies on orchids, which in nature must form symbiotic relationships with fungi for germination and early development, remains a challenge.

Although there was fruit set in most interspecific crosses performed, no pollen grain germination or inhibition of the pollen tube in the stigma cavity was observed in most aborted flowers - a mechanism similar to that observed at the site of self-incompatibility detection. In *Solanum* the interspecific incompatibility and self-incompatibility were shown to be linked, such that pollen from self-incompatible species was rejected by related species showing self-incompatibility, although in reciprocal crosses pollen in which pollen from self-incompatible species were deposited on self-compatible species, pollen grains were not rejected (Lewis and Crowe 1958).

Overall, this work provides an understanding of the reproductive system in *B. sect. Micranthae*, group mostly self-incompatible, which is rare in orchids and is a recovered trait mainly found in the subfamily *Epidendroideae*. The high diversity of pollen tube growth phenotypes observed in this small group of Orchid offers new insights into the diversity of self-incompatibility reaction sites, but experiments should be carried out with diallelic crosses in self-

incompatible species are needed to fill gaps in our knowledge about genetic control of the system of incompatibility. Finally, our results indicate that pre-zygotic mechanisms are the main contributors to the isolation of species in *B. sect. Micranthae*, but barriers are permeable to gene exchange mainly in closely related species. Our data not only informs about reproductive barriers in *Bubophyllum* species, but also contains important information for understanding the evolution and diversification of this extraordinarily species-rich group of plants.

Acknowledgments

We thank Mariana Oliveira Duarte, Denise Maria Trombert Oliveira, Paulo Eugênio Macedo de Oliveira and the anonymous reviewers for comments and suggestions in the manuscript. We also thank the Museu de Historia Natural e Jardim Botânico da Universidade Federal de Minas Gerais for all support in the cultivation and maintenance of specimens. Samples were collected under SISBIO sampling permit number: 62328-5

Declarations

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Azevedo MTA, Borba EL, Semir J, Solferini VN (2007) Very high genetic variability in Neotropical myophilous orchids. *Bot J Linn Soc* 153: 33–40. doi: [10.1111/j.1095-8339.2007.00589.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2007.00589.x)
- Barbosa AR, Melo MC, Borba EL (2009) Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Pl Syst Evol* 283: 1–8. doi: [10.1007/s00606-009-0212-6](https://doi.org/10.1007/s00606-009-0212-6)
- Bartareau T (1994) Pollination *Bulbophyllum macphersonii* Rupp by a midge fly (*Forcipomyia sauteri*). *The Orchadian* 11: 255–258.
- Baumann U, Juttner J, Bian XY, Langridge P (2000) Self-incompatibility in the grasses. *Ann Bot (Oxford)* 85:203–209. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.1056>
- Borba EL, Semir J (1998a) *Bulbophyllum ×cipoense* (Orchidaceae), a new natural hybrid from the Brazilian campos rupestres: description and biology. *Lindleyana* 13: 113-120.

- Borba EL, Semir J (1998b) Wind-assisted fly pollination in three *Bulbophyllum* (Orchidaceae) species occurring in the Brazilian Campos Rupestres. *Lindleyana* 13: 203-218.
- Borba EL, Semir J (1999) Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Pl Syst Evol* 217: 197–204. doi: [10.1007/BF00984365](https://doi.org/10.1007/BF00984365)
- Borba EL, Semir J (2001) Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Ann Bot* 88: 75-87. doi: [10.1006/anbo.2001.1434](https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1434)
- 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. doi: [10.1007/BF00984366](https://doi.org/10.1007/BF00984366)
- Borba EL, Felix JM, Solferini VN, Semir J (2001a) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *Amer J Bot* 88: 419–428. doi: [10.2307/2657106](https://doi.org/10.2307/2657106)
- Borba EL, Semir J, Shepherd GJ (2001b) Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Ann Bot* 88: 89–99. doi: [10.1006/anbo.2001.1435](https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1435)
- Borba EL, Barbosa AR, Melo MC, Gontijo SL, Oliveira OH (2011) Mating systems in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): evolutionary and systematic implications. *Lankesteriana* 11(3): 207-221. doi:[10.15517/lank.v11i3.18275](https://doi.org/10.15517/lank.v11i3.18275)
- Castro JB, Singer RB (2019). A literature review of the pollination strategies and breeding systems in Oncidiinae orchids. *Acta Bot Bras* 33: 618–643. Doi: 10.1590/0102-33062019abb0111
- Chen LL, Gao JY (2011) Reproductive ecology of *Bulbophyllum ambrosia* (Orchidaceae). *Chin J Plant Ecol* 35: 1202–1208. Doi: 10.3724/SP.J.1258.2011.01202
- Chen LJ, Zhang GQ, Li LQ, Zhang YT, Rao WH, Liu ZJ (2014) Development and maintenance of a cross-mixed mating system in the orchid *Bulbophyllum orientale*. *J Phylogenetics Evol Biol* 2:124. doi: 10.4172/2329-9002.1000124
- Christensen DE (1994) Fly pollination in the Orchidaceae. In: Arditti J (ed) *Orchid biology: reviews and perspectives VI*, John Wiley & Sons, New York, pp 415–454

- Christopher DA, Karron JD, Semski WR, Smallwood PA, Trapnell DW, Mitchell RJ (2021) Selfing rates vary with floral display, pollinator visitation and plant density in natural populations of *Mimulus ringens*. *J Evol Biol* 34:803–815. doi: 10.1111/jeb.13781
- De Nettancourt D (1997) Incompatibility in angiosperms. *Sex. Plant. Reprod.* 10: 185–199. doi: 10.1007/s004970050087
- Dressler RL (1981) *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Dressler RL (1993) *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Duarte MO, Oliveira DMT, Borba EL (2020) Two self-incompatibility sites occur simultaneously in the same *Acianthera* Species (Orchidaceae, Pleurothallidinae). *Plants* 9: 1758. doi: [10.3390/plants9121758](https://doi.org/10.3390/plants9121758)
- Gamish A, Fischer GA, Comes HP (2014) Recurrent polymorphic mating type variation in Madagascan *Bulbophyllum* species (Orchidaceae) exemplifies a high incidence of auto-pollination in tropical orchids. *Bot. J. Linn. Soc.* 175: 242–258. doi: [10.1111/boj.12168](https://doi.org/10.1111/boj.12168)
- Gamish A, Comes, HP (2019). Clade-age-dependent diversification under high species turnover shapes species richness disparities among tropical rainforest lineages of *Bulbophyllum* (Orchidaceae). *BMC Evol Biol.* 19:93. doi: <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1416-1>
- Geber MA (1985) The relationship of plant size to self-pollination in *Mertensia ciliata*. *Ecology.* 66: 762–772.
- Gontijo SL, Barbosa AR, Melo MC, Borba EL (2010) Occurrence of different sites of self-incompatibility reaction in four *Anathallis* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Pl Spec Biol* 25: 129–135. doi:[10.1111/j.1442-1984.2010.00277.x](https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2010.00277.x)
- Govidaraju DR (1989) Variation in gene flow levels among predominantly self-pollinated plants. *J Evol Biol* 2:173-181. doi: [10.1046/j.1420-9101.1989.2030173.x](https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1989.2030173.x)
- Humeau L, Micheneau C, Jacquemyn H, Gauvin-Bialecki A, Fournel J, Pailler T (2011) Sapromyophily in the native orchid, *Bulbophyllum variegatum*, on Réunion (Mascarene Archipelago, Indian Ocean). *J Trop Ecol* 27: 591–599. doi: [10.1017/S0266467411000411](https://doi.org/10.1017/S0266467411000411)
- Johansen B (1990) Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). *Bot J Linn Soc* 103: 165–196. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1990.tb00183.x>

- Jones DL, Gray B (1976) The pollination of *Bulbophyllum longiflorum* Thouars. Amer Orchid Soc Bull 45:15–17.
- Lewis D, Crowe LK (1958) Unilateral interspecific incompatibility in flowering plants. Heredity 12: 233-256. doi:10.1038/hdy.1958.26
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. Trends Ecol Evol, 20: 229-237. doi:10.1016/j.tree.2005.02.010.
- Martin FW (1959) Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. Stain Technol. 34: 125–128. doi : 10.3109/10520295909114663
- Nishida R, Tan KH, Wee SL, Hee AKW, Toong YC (2004) Phenylpropanoids in the fragrance of the fruit fly orchid, *Bulbophyllum cheiri*, and their relationship to the pollinator, *Bactrocera papayae*. Biochem Syst Ecol 32:245-252. doi:10.1016/S0305-1978(03)00179-0
- Niu S-C, Huang J, Xu Q, Li P-X, Yang H-J, Zhang Y-Q, Zhang G-Q, Chen L-J, Niu Y-X, Luo Y-B, Liu Z-J (2018) Morphological type identification of self-incompatibility in *Dendrobium* and its phylogenetic evolution pattern. Int J Mol Sci. 19: 2595. doi:10.3390/ijms19092595
- Nunes ELP, Maldonado PE, Smidt EC, Stutzel T, Coan AI (2017) Floral micromorphology and anatomy and its systematic application to Neotropical *Bulbophyllum* section *Micranthae* (Orchidaceae). Bot J Linn Soc 183: 294–315. doi: http://dx.doi.org/10.1093/botlinnean/bow007
- Pakum W, Kongbangkerd A, Srimuang KO, Gale SW, Watthana S (2019) Reproductive biology of a rare, fly-pollinated orchid, *Bulbophyllum nipondhii* Seidenf., in Thailand. Flora 260: 151467. https://doi.org/10.1016/j.flora.2019.151467
- Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Meyer D, Fay MF, Susuki RM, Lexer C, Cozzolino S (2010) Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). Molec. Ecol. 19: 3981-3994. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04780.x.
- Pinheiro F, Cafasso D, Cozzolino S, Scopece G (2015a) Transitions between self-compatibility and self-incompatibility and the evolution of reproductive isolation in the large and diverse tropical genus *Dendrobium* (Orchidaceae). Ann Bot 116: 457-467. doi:10.1093/aob/mcv057

- Pinheiro F, Cardoso-Gustavson P, Suzuki RM, Abrao MCR, Guimaraes LR, Draper D, Moraes AP (2015b) Strong postzygotic isolation prevents introgression between two hybridizing Neotropical orchids, *Epidendrum denticulatum* and *E. fulgens*. *Evol Ecol* 29:229–248. <https://doi.org/10.1007/s10682-015-9753-z>
- Pinheiro F, de Melo e Gouveia TMZ, Cozzolino S, Cafasso D, Cardoso-Gustavson P, Suzuki RM, Palma Silva C (2016) Strong but permeable barriers to gene exchange between sister species of *Epidendrum*. *Am J Bot* 103:1472–1482. doi: 10.3732/ajb.1600064
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (2014) *Genera Orchidacearum*, Vol. 6, Epidendroideae (Part 3). Oxford: Oxford University Press.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org/>. September 2021
- Reflora (2021) Reflora - Virtual Herbarium. Available at: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/> September 2021
- Ren ZX, Bernhardt P, Edens-Meier R, Zweck J, Arduser M, Li HD, Wang H (2019). Comparative pollen–pistil interactions and insect pollination in two *Hypoxis* species (Hypoxidaceae) in China and North America. *Plant Syst Evol* 305:115-126
- Robertson AW (1992) The relationship between floral display size, pollen carryover and geitonogamy in *Myosotis colensoi* (Kirk) *Macbride* (Boraginaceae). *Biol J Linn Soc* 46:333–349.
- Sage TL, Griffin SR, Pontieri V, Drobac P, Cole WW, Barrett SCH (2001) Stigmatic self-incompatibility and mating patterns in *Trillium grandiflorum* and *Trillium erectum* (Metanthiaceae). *Ann Bot (Oxford)* 88:829–841. doi: <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1517>
- Sazima M (1978) Polinização por moscas em *Bulbophyllum warmingianum* Cogn. (Orchidaceae) na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasil Bot* 1: 133-138.
- Seavey SR, Bawa KS (1986) Late-acting self-incompatibility in angiosperms. *Bot Rev (Lancaster)* 52: 195-219. doi: [10.1111/nph.12874](https://doi.org/10.1111/nph.12874)
- Sieder A, Rainer H, Kiehn M. (2007) CITES orchid checklist. Volume 5. CITES checklist for *Bulbophyllum* and allied taxa (Orchidaceae). Kew: Kew Publishing.

- Smidt EC (2007) Filogenia e revisão taxonômica de *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) ocorrentes no Neotrópico. PhD thesis, Federal University Feira de Santana, Brazil.
- Smidt EC, Borba EL, Gravendeel B, Fischer GA, Van den Berg C (2011) Molecular phylogeny of the Neotropical sections of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) using the nuclear and plastid spacers. *Taxon* 60: 1050–1064. doi: [10.1002/tax.604009](https://doi.org/10.1002/tax.604009)
- Tan KH, Tan LT, Nishida R (2006) Floral phenylpropanoid cocktail and architecture of *Bulbophyllum vinaceum* orchid in attracting fruit flies for pollination. *J Chem Ecol* 32: 2429–2441. doi: [10.1007/s10886-006-9154-4](https://doi.org/10.1007/s10886-006-9154-4)
- Teixeira SD, Borba EL, Semir J (2004) Lip anatomy and its implications for the pollination mechanisms of *Bulbophyllum* species (Orchidaceae). *Ann Bot* 93: 499–505. doi: [10.1093/aob/mch072](https://doi.org/10.1093/aob/mch072)
- Van der Pijl L, Dodson CH (1966) Orchid flowers, their pollination and evolution. Coral Gables: University of Miami Press.
- Van der Cingel NA (2001) An atlas of orchid pollination: America, Africa, Asia and Australia. Rotterdam: A. A. Balkema.
- Verola CF (2002) Biologia floral e sistemas de reprodução em espécies de *Bulbophyllum* (Orchidaceae) ocorrentes em mata de galeria, campo rupestre e floresta estacional. Master dissertation, Federal University of Campinas, Brazil.
- Williams CF (2007) Effects of floral display size and biparental inbreeding on outcrossing rates in *Delphinium barbeyi* (Ranunculaceae). *Amer J Bot* 94: 1696–1705. <https://doi.org/10.3732/ajb.94.10.1696>
- Zhang CC, Wang LY, Wei K, Wu LY, Li HL; Zhang F, Cheng H, Ni DJ (2016) Transcriptome analysis reveals self-incompatibility in the tea plant (*Camellia sinensis*) might be under gametophytic control. *BMC Genomics* 17: 1-15. doi: [10.1186/s12864-016-2703-5](https://doi.org/10.1186/s12864-016-2703-5)

Table 1 Species and populations of eight *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* used in the experimental pollinations. Acronyms for the Brazilian states: BA=Bahia, GO=Goiás, MG=Minas Gerais, MT=Mato Grosso, PE=Pernambuco, PR=Paraná.

Specie/populations	Location	Voucher
<i>Bulbophyllum adiamantinum</i>		
Brade		
Inhaí (MG)	17°59'33''S 43°35'53''W	Rodrigues, JG 513 (BHCB)
Joaquim Felicio (MG)	17°41'25''S 44°19'96''W	Rodrigues, JG 49 (BHCB)
Alto Paraíso de Goiás (GO)	14°4'32''S 47°31'1''W	Rodrigues, JG 10 (BHCB)
Pirenópolis (GO)	15°48'13''S 48°50'11''W	Rodrigues, JG 292 (BHCB)
Porteirinha (MG)	15°38'47''S 42°44'33''W	Rodrigues, JG 358 (BHCB)
<i>Bulbophyllum chloroglossum</i> Rchb.f		
São Thomé das Letras (MG)	21°44'13''S 45°01'12''W	Rodrigues, JG 204 (BHCB)
<i>Bulbophyllum epiphytum</i>		
Barb.Rodr.		
Carrancas (MG)	21°28'16''S 44°40'53''W	Rodrigues, JG 128 (BHCB)
Joaquim Felicio (MG)		
Alto Paraíso de Goiás (GO)	13°54'12''S 47°23'07''W	Rodrigues, JG 02 (BHCB)
Santana do Riacho (MG)	19°19'34''S 43°33'43''W	Rodrigues, JG 520 (BHCB)
São Thomé das Letras (MG)	21°43'31''S 45°00'27''W	Rodrigues, JG 177(BHCB)
Triunfo (PE)	7°50'00''S 38°04'05''W	Fiorini, C 976 (BHCB)
<i>Bulbophyllum insectiferum</i> Barb.Rodr.		
Carrancas (MG)	21°30'08''S 44°36'10''W	Rodrigues, JG 123 (BHCB)
Tangará (MT)	14°43'09''S 57°25'49''W	Rodrigues, JG 240 (BHCB)
<i>Bulbophyllum mentosum</i> Barb.Rodr.		
Piatã (BA)	13°04'14''S 41°53'47''W	Rodrigues, JG 460 (BHCB)
<i>Bulbophyllum micranthum</i> Barb.Rodr		
Tibagi (PR)	24°33'22''S 50°15'25''W	Fiorini, C 621

		(BHCB)
<i>Bulbophyllum mucronifolium</i> Rchb. & e Warm.		
Diamantina (MG)	18°12'24.2''S 43°33'58'' W	Rodrigues, JG 500 (BHCB)
<i>Bulbophyllum rupicola</i> Barb.Rodr.		
Caldas (MG)	21°58'43''S 46°22'15''W	Rodrigues, JG 172 (BHCB)
Alto Paraíso (GO)	14°4'32''S 47°31'1''W	Rodrigues, JG 20 (BHCB)
Pirenópolis (GO)	15°48'13''S 48°50'11''W	Rodrigues, JG 274 (BHCB)

Table 2 Fruit-set rates under different experimental pollination treatments in species of the *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*. The values correspond to the percentage of fruit (number of pollinations carried out-number of individuals sampled)

Species	Self	Intrapop	Interpop
<i>B. adiamantinum</i>	7*(61-22)	66(25-21)	52(56-15)
<i>B. chloroglossum</i>	0*(17-3)	86(7-2)	
<i>B. epiphytum</i>	8*(125-16)	53(72-11)	63(35-9)
<i>B. insectiferum</i>	0*(14-6)	50(10-5)	
<i>B. mentosum</i>	55(11-7)	29(14-6)	
<i>B. micranthum</i>	0*(13-1)		
<i>B. mucronifolium</i>	0*(10-4)	59(17-5)	
<i>B. rupicola</i>	29*(102-15)	73(37-11)	

Interpop, interpopulation intraspecific cross-pollination; Intrapop, intrapopulation cross pollination; Self, self-pollination. Asterisk indicates statistical significance of self from crosspollination treatment.

Table 3. Number of pollinated flowers and fruits formed after artificial interspecific pollination in species of the *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* and number of plants used in analyses.

Donor \ Receptor	<i>B. adi</i>	<i>B. chlor</i>	<i>B. epi</i>	<i>B. insec</i>	<i>B. ment</i>	<i>B. micra</i>	<i>B. mucro</i>	<i>B. rupi</i>
<i>B. adiamantinum</i>			25(4-1)	78(9-7)	0(4-4)	86(6-4)	22(9-2)	
<i>B. chloroglossum</i>								100(1-1)
<i>B. epiphytum</i>	86(7-2)	100(1-1)			0(2-1)			52(34-10)
<i>B. insectiferum</i>	78(9-3)				0(2-1)			
<i>B. mentosum</i>	0(3-3)		0(2-1)	0(2-1)				
<i>B. micranthum</i>	43(7-4)							
<i>B. mucronifolium</i>	88(8-4)							
<i>B. rupicola</i>		0(2-1)	61(38-8)			100(1-1)		

% percentage of fruit (number of fruits formed-number of plants used). *B. adi*=*B. adiamantinum*; *B. chlor*=*B. chloroglossum*; *B. epi*= *B. epiphytum*; *B. insec*= *B. insectiferum*; *B. ment*= *B. mentosum*; *B. micra*= *B. micranthum*; *B. mucro*=*B. mucronifolium*; *B. rupi*= *B. rupicola*

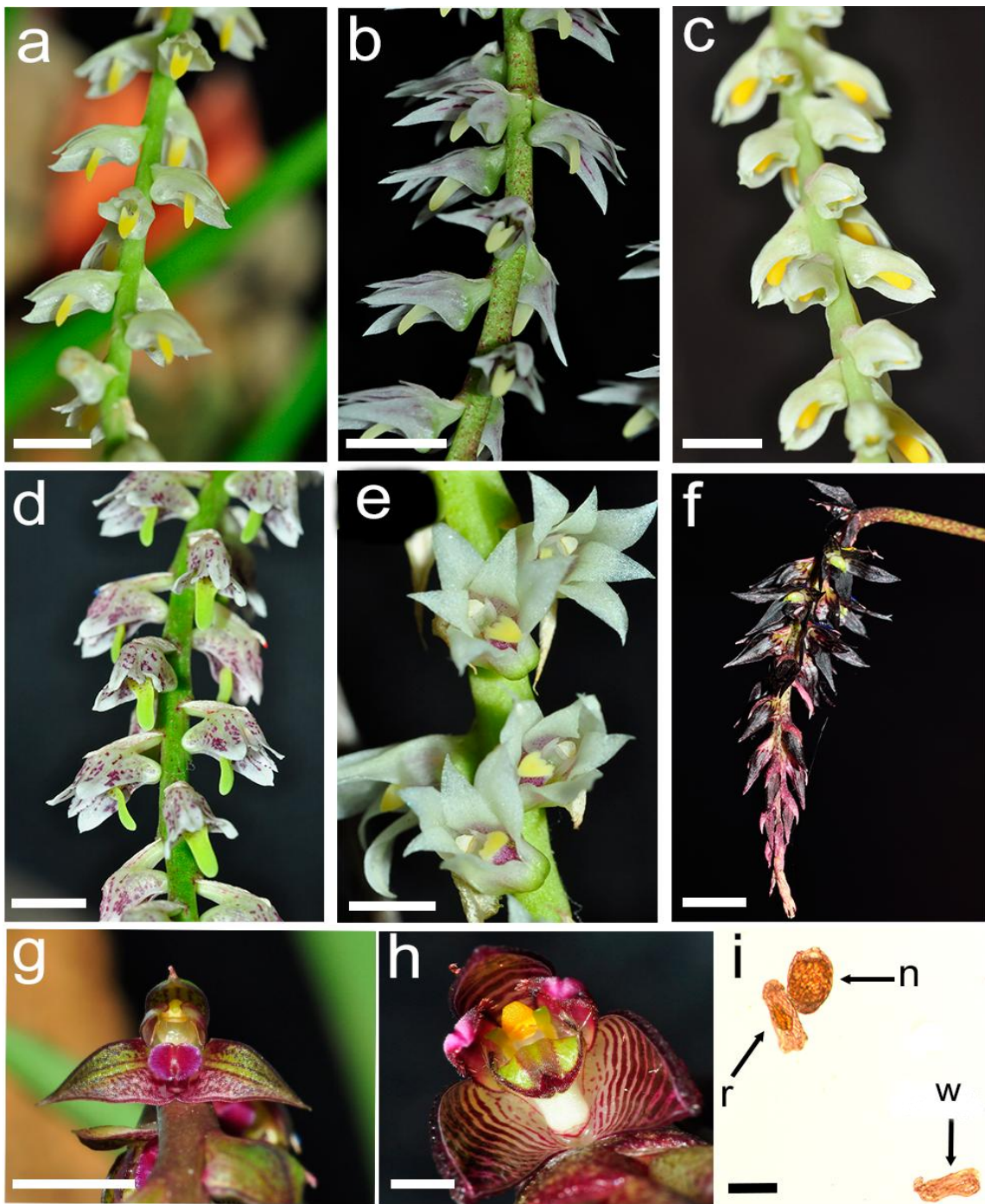


Figure 1 Flowers and seeds of *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* **a** *Bulbophyllum epiphytum*; **b** *B. micranthum*; **c** *B. rupicola*; **d** *B. chloroglossum*; **e** *B. mucronifolium*; **f** *B. insectiferum*; **g** *B. adiamantinum*; **h** *B. mentosum*; **i** Seeds without (w), with reduced and with normal embryo (n) of *B. rupicola*. Scale bars= 0.5cm (**a-h**) and 100 μ m (**i**)

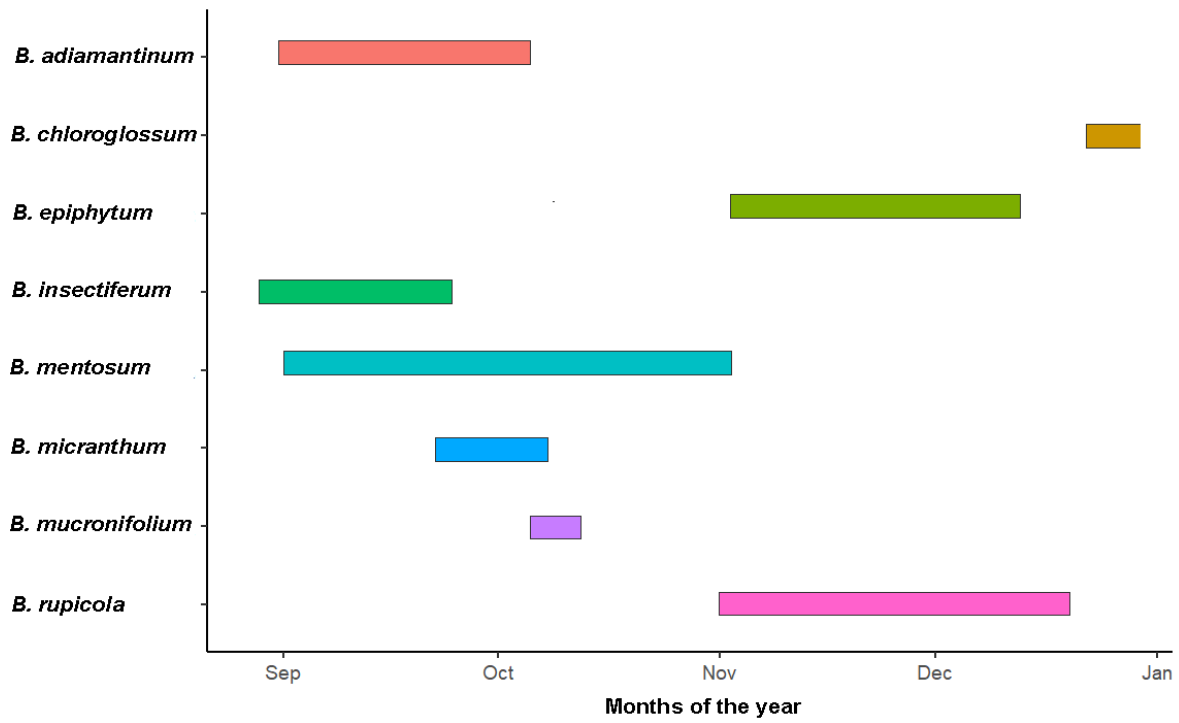


Figure 2 Range of flowering months for each species of *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* analyzed.

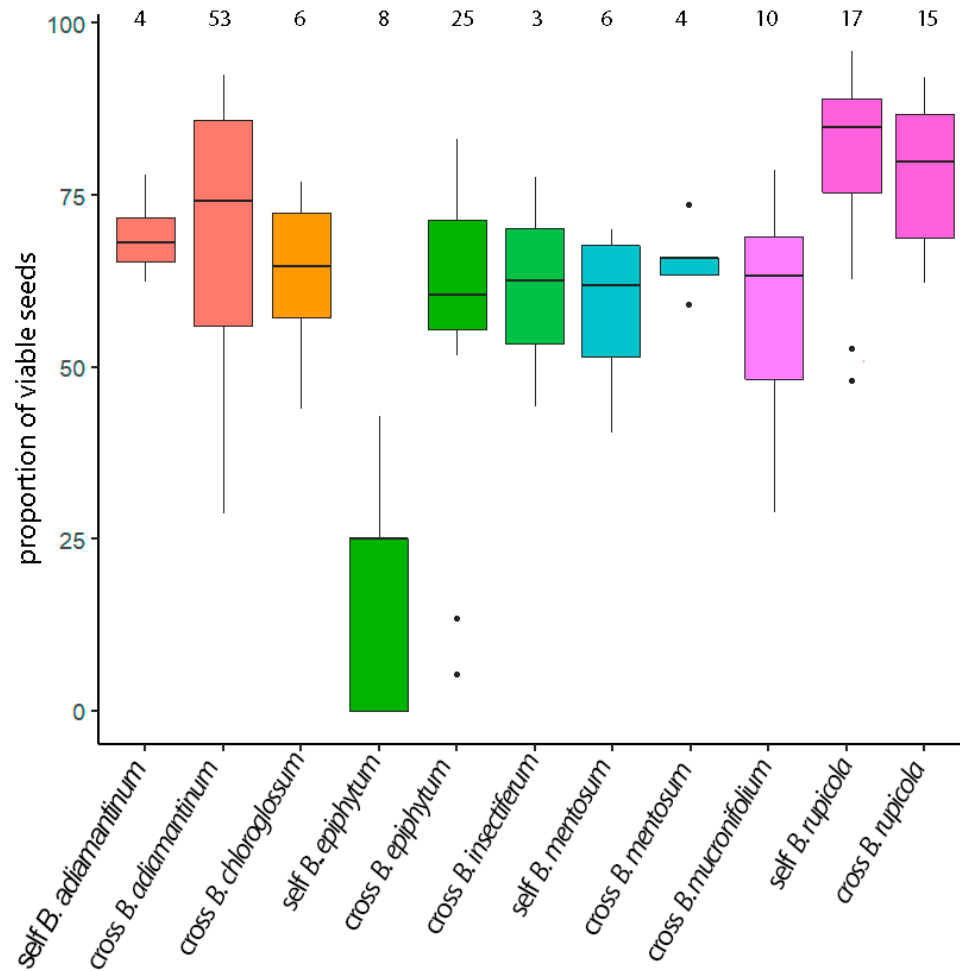


Figure 3 Box plot of seed viability per fruit (n=300) in experimental self-pollination (self) and cross-pollinations (cross) in species of *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*. The number of fruits sampled is shown on the upper x-axis. The box comprises 50% of the data and the central line marks the median. Inner and outer fences are defined by interquartile ranges. Outliers are represented as individual points in the chart

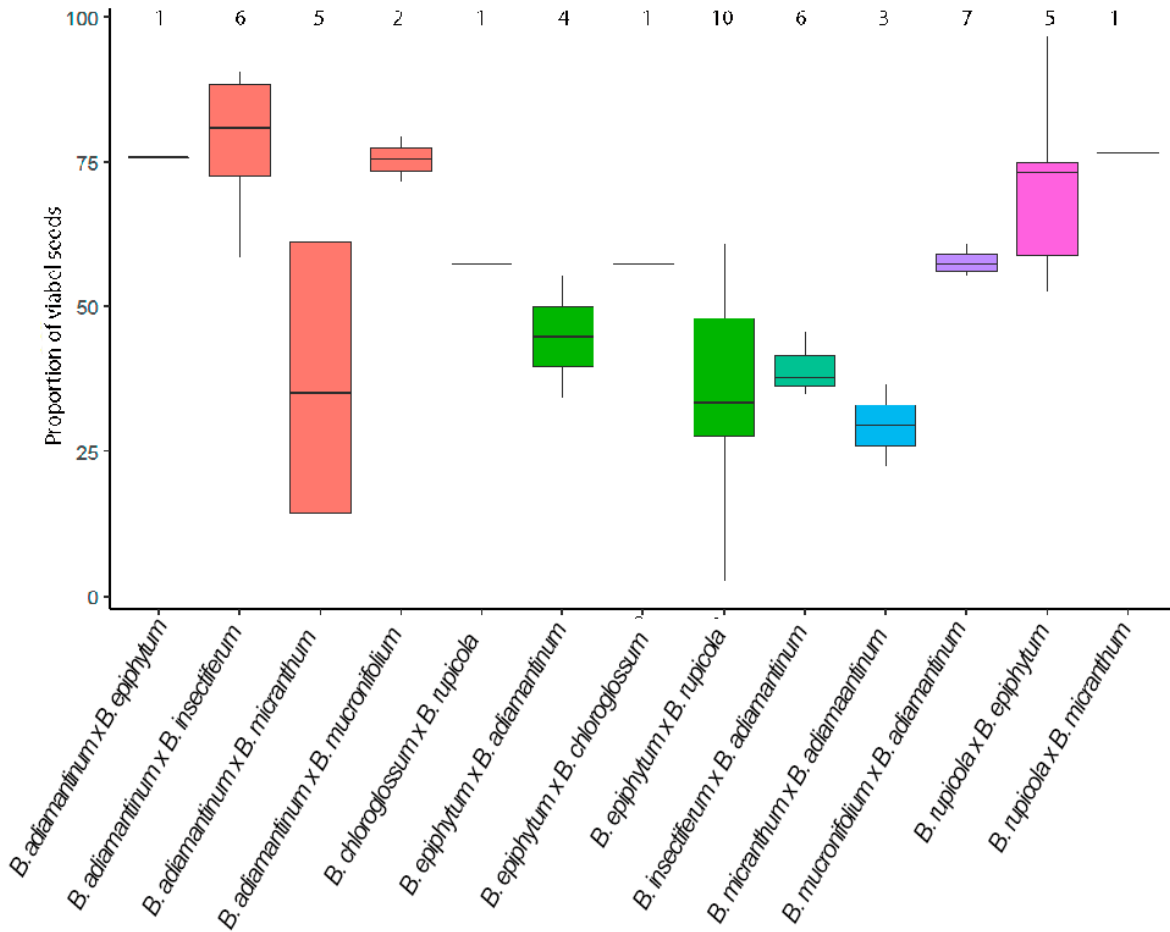


Figure 4 Box plot of seeds viability per fruit (n=300) in interspecific experimental pollinations in *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*. The box comprises 50% of the data and the central line marks the median. Inner and outer fences are defined by interquartile ranges.. Outliers are represented as individual points in the chart

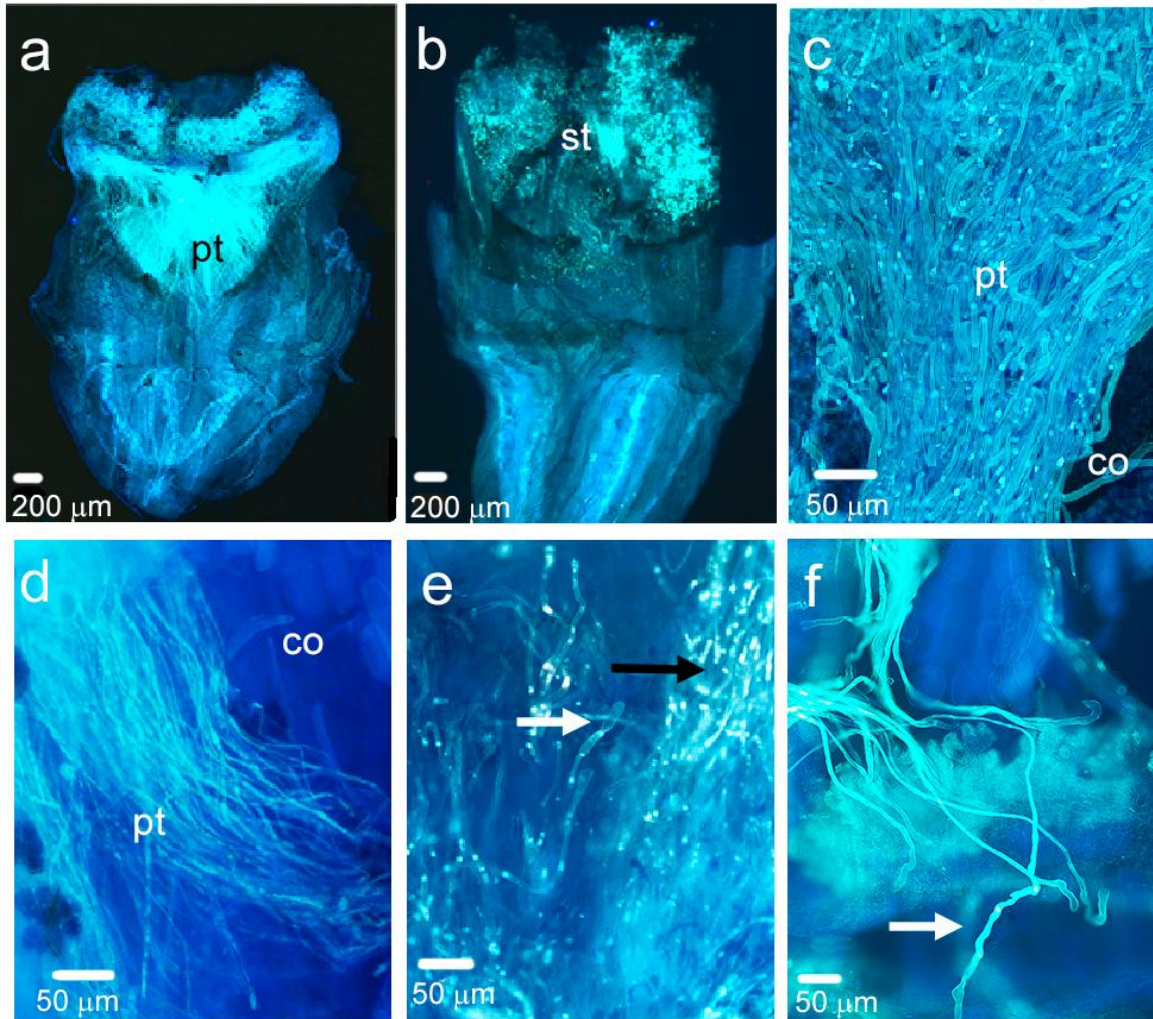


Figure 5 Pollen tube growth in flowers of *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* observed with an epifluorescence microscope. **a** General view of pollen tubes (pt) with normal morphology growing in stylar canal in cross-pollination of *B. epiphythum* (10 days after pollination- DAP). **b** Pollen tubes restricted to the stigmatic cavity (st) in interspecific pollination between *B. micranthum* and *B. adiamantinum* (16 DAP). **c** Pollen tubes (pt) with regular growth in the stylar canal inside the column (co) in self-pollination in *B. mentosum* (14 DAP). **d** Incompatible pollen tubes (pt) inside the column (co) with low callose deposition and stopped growing in self-pollination in *B. chloroglossum* (7 DAP). **e** Pollen tubes with irregular callose deposition (black arrow) and dilated tip (white arrow) in self-pollination *B. mucronifolium*. **f** Irregular morphology (arrow) of a pollen tube reaching the ovary region in a partially self-incompatible individual of *B. rupicola* (19 DAP)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos biossistemáticos são essencialmente úteis em complexo de espécies em que a taxonomia clássica não foi suficiente para distinção dos táxons. Este estudo empregou diversas técnicas para maior compreensão da diversidade que compõem *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*. Através do sequenciamento massivo de amostras populacionais obtivemos um elevado número de caracteres informativos que possibilitaram uma maior resolução das relações filogenéticas entre as espécies que os estudos realizados anteriormente que empregaram marcadores plastidiais e nucleares. Não foram observadas grandes discontinuidades morfológicas entre *B. epiphytum* e *B. rupicola*. Apensar de ser possível recuperar os dois táxons nas análises canônicas, as análises genômicas revelaram outras linhagens que não puderam ser recuperadas nas análises morfológicas. É necessário realizar estudos adicionais para propor um tratamento taxonômico apropriado para o grupo e para desenvolver estratégias distintas de conservação e manejo para cada linhagem identificada.

Além da análise dos dados apresentados, nós também sequenciamos um maior número de indivíduos por população, especialmente do complexo *B. epiphytum/ B. rupicola*, *B. adiamantinum* e *B. mucronifolium*. Com base nos resultados apresentados, temos a expectativa de conduzir uma série de estudos adicionais sobre diversidade genética, filogeografia e hibridação, a fim de aprimorar a nossa compreensão dos processos associados à complexidade taxonômica e evolução das diferentes espécies da seção *Micranthae*. Além de fornecer informações taxonômicas, nossa pesquisa visa contribuir de para a compreensão dos padrões de diversificação dos diferentes ambientes em que as espécies ocorrem, em particular nos campos rupestres, que muitas vezes são negligenciados. Acreditamos que os resultados desses estudos ajudarão a elucidar como as espécies se adaptam e evoluem em resposta às condições ambientais, bem como a identificar medidas de conservação mais eficazes para esses ecossistemas únicos. Além disso, nosso grupo de pesquisa também está explorando dados de outra seção do gênero *Bulbophyllum* (*B. sect. Didactyle*), que é endêmica dos campos rupestres. Dessa forma, *Bulbophyllum* pode se tornar um modelo potencialmente informativos para estudos evolutivos nesses ambientes.

Por fim, este projeto teve um impacto significativo na ampliação da coleção de plantas vivas do Museu de História Natural e Jardim Botânico da UFMG. Além disso, foi fundamental para fortalecer a colaboração entre as instituições da UFMG, contribuindo para a capacitação da

equipe técnica do Museu de História Natural e Jardim Botânico por meio da qualificação de sua funcionária e aprimoramento de suas habilidades para conduzir pesquisas de alta qualidade.

Referências

- Aldhebiani, A. Y. (2017). Species concept and speciation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25, 437–440.
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17, 81–92. doi: 10.1038/nrg.2015.28.
- Azevedo, M. T. A., Borba, E. L., Semir, J., & Solferini, V. N. (2007). Very high genetic variability in neotropical myophilous orchids. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 153, 33–40. doi: 10.1111/j.1095-8339.2007.00589.x.
- Borba, E. L., & Semir, J. (2001). Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany*, 88, 75–87. doi: <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1434>
- Borba, E. L., Felix, J. M., Solferini, V. N., & Semir, J. (2001). Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany*, 88, 419–428. doi:10.2307/2657106
- Cracraft, J. (1989). Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and process of differentiation. In: *Speciation and its consequences* (eds D. Otte and J.A. Endler), Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA. 28–59
- Cronquist, A. (1978). Once again, what is a species? In: Knutson L.V., editor. *Biosystematics in Agriculture*. Allenheld Osmin; Montclair, New Jersey, U.S.A. pp. 3–20.
- Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., & Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12, 499–510. doi: 10.1038/nrg3012
- DE QUEIROZ, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879–886. doi: 10.1080/10635150701701083
- Dressler, R. L. (1981). *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Gamisch, A., & Comes, H. P. (2019). Clade-age-dependent diversification under high species turnover shapes species richness disparities among tropical rainforest lineages of

- Bulbophyllum* (Orchidaceae). *BMC Evolutionary Biology*, 19, 93. doi: 10.1186/s12862-019-1416-1
- Gravendeel, B., Smidt, E. C., Fischer, G. A., Vermeulen, J. J., & Schuiteman, A. (2014). *Bulbophyllum*. Distribution. In: Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W., Rasmussen, F. N., eds. *Genera orchidacearum*, Vol. 6 (Part three). Oxford: Oxford University Press, 7
- Linnaeus, C. (1753). *Species Plantarum*. In: Facsimile (Ed.), 1957, London, Ray Society, British Museum.
- Mayden, R. L. (1997). A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. Pp. 381–424 in M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson, eds. *Species: The units of biodiversity*. London: Chapman and Hal
- Mayr, E. (2000). The Biological Species Concept. In: Wheeler, Q.D; Meier, R. (Ed.). *Species concepts and phylogenetic theory: a debate*. pp. 17-29.
- Nunes, E. L. P., Maldonado, P. E., Smidt, E. C., Stutzel, T., & Coan, A. I. (2017). Floral micromorphology and anatomy and its systematic application to Neotropical *Bulbophyllum* section *Micranthae* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 183, 294–315.
- Rieseberg, L. H., Willis, J. H. (2007). Plant speciation. *Science*, 317, 910-914.
- Silveira, F. A. O., Negreiros, D., Barbosa N. P. U., Buisson, E., Carmo, F. F., Carstensen, D. W., Conceição, A. A., Cornelissen, T. G., Echternacht, L., Fernandes, G. W., Garcia, Q. S., Guerra, T. J., Jacobi, C. M., Lemos-Filho, J. P., Stradic, S. L., et al. (2016). Ecology and evolution of plant diversity in the endangered campo rupestre: a neglected conservation priority. *Plant and Soil*, 403, 129–152.
- Smidt, E. C. (2007). Filogenia e revisão taxonômica de *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) ocorrentes no Neotrópico. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Feira de Santana, Brasil.
- Smidt, E. C., Borba, E. L., Gravendeel, B., Fischer, G. A., & van den Berg, C. (2011). Molecular phylogeny of the Neotropical sections of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) using the nuclear and plastid spacers. *Taxon*, 60, 1050–1064.
- Smidt, E. C., Gallo, L. W., & Scatena, V. L (2013) Leaf anatomical and molecular studies in *Bulbophyllum* section *Micranthae* (Orchidaceae) and their implications for systematics. *Brazilian Journal of Botany*, 36, 75–82.

- Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (2009). The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 561-588.
- Stace, C. A. (1989). *Plant taxonomy and biosystematics*. Edward Arnold: London, Melbourne, Auckland.
- van der Pijl, L., & Dodson, C. H. (1966). *Orchid flowers, their pollination and evolution*. Coral Gables: University of Miami Press.
- 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*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Campinas, Brasil.