

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

LUDMILA MICKELIUNAS

**“BIOLOGIA FLORAL E REPRODUTIVA E ANATOMIA
DO LABELO DE *CYRTOPODIUM POLYPHYLLUM* VELL.
(ORCHIDACEAE, CYRTOPODIINAЕ)”**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre
em Biologia Vegetal, na área de
Botânica .

Orientadora: Profa. Dra. Marlies Sazima

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

M583b

Mickeliunas, Ludmila

Biologia floral e reprodutiva e anatomia do labelo de
Cyrtopodium polyphyllum Vell. (Orchidaceae,
Cyrtopodiinae) / Ludmila Mickeliunas . – Campinas, SP:
[s.n.], 2007.

Orientador: Marlies Sazima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Orchidaceae . 2. *Cyrtopodium*. 3. Biologia floral.
4. Biologia - Reprodução. 5. Anatomia. I. Sazima, Marlies.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

(scs/lb)

Título em inglês: Floral and reproductive biology and lip anatomy of *Cyrtopodium polyphyllum* Vell. (Orchidaceae, Cyrtopodiinae).

Palavras-chave em inglês: Orchidaceae; *Cyrtopodium*; Floral biology; Reproductive biology; Anatomy.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Marlies Sazima, Silvana Buzato, Mardione Tanara Pinheiro dos Santos, Eliana Regina Forni Martins, Ângela Borges Martins.

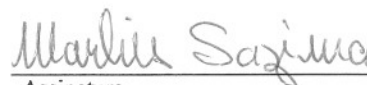
Data da defesa: 13/02/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

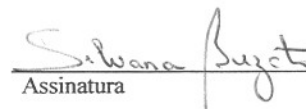
BANCA EXAMINADORA

Campinas, 13 de Fevereiro de 2007.

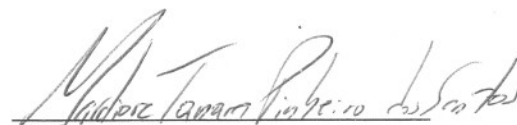
Profa. Dra. Marlies Sazima (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Silvana Buzato


Assinatura

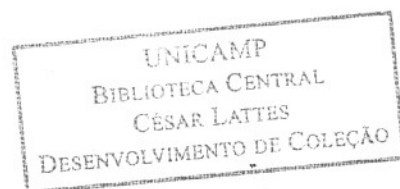
Dra. Mardiore Tanara Pinheiro dos Santos.


Assinatura

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins


Assinatura

Dra. Julie Henriette Antoinette Dutilh


Assinatura

2007/14619

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Marlies Sazima, pela dedicada orientação.

À Fapesp (processo 04/12531-1) pelo financiamento, tornando viável o desenvolvimento desse projeto e ao assessor, que muito contribuiu para a melhoria do presente trabalho.

Aos meus pais, Elena e Leandro, que sempre me apoiaram e me incentivaram, com muito amor e carinho. À Lucila, vovó Tetê e Gabriel, que também fazem parte do meu grupo de amor e apoio familiar.

Ao meu co-orientador “extra-oficial” Emerson Ricardo Pansarin, pelo companheirismo, paciência, dedicação e imensurável auxílio durante todo o desenvolvimento do projeto.

Às minhas amigas-irmãs, Juliana e Tarcila, pelos quatro anos de convivência em Campinas, e às caçulas, LÍlian e Ravena, pelas longas conversas, conselhos e momentos de descontração.

Às amigas Ana Cristina e Rosina, pela força no laboratório de Anatomia Vegetal e pela companhia nos almoços.

À professora Marília de Moraes Castro, por ter me ensinado, com afeição e paciência, as técnicas de anatomia vegetal.

Aos professores Dra. Maria do Carmo Estanislau do Amaral, Dra. Eliana Regina Forni -Martins e Dra, Isabel Alves dos Santos, pela leitura crítica e sugestões na pré-banca (exame de qualificação).

A todos os docentes do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Unicamp, que muito contribuíram para a minha formação.

Aos técnicos do Departamento de Botânica, Tião, João Carlos e Gastão, que sempre foram muito prestativos e atenciosos.

Aos colegas de departamento, pela convivência agradável e harmoniosa.

À Isabel Alves dos Santos, pelo auxílio na identificação das abelhas.

Ao Ricardo Lourenço, pela elaboração das ilustrações.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa de Picinguaba – Ubatuba, que sempre nos receberam muito bem para os trabalhos de campo.

E a todos os demais colegas que, de alguma forma, contribuíram nesse projeto.

SUMÁRIO	PÁGINA
RESUMO	6
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO GERAL	10
OBJETIVOS	17
CAPÍTULO 1. Reproductive biology of <i>Cyrtopodium polyphyllum</i> (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit.	18
CAPÍTULO 2. Facultative autogamy in <i>Cyrtopodium polyphyllum</i> (Orchidaceae) through a rain-assisted pollination mechanism.	40
CAPÍTULO 3. Anatomia das estruturas secretoras do labelo de duas Cyrtopodiinae: <i>Cyrtopodium polyphyllum</i> Vell. e <i>Grobya amherstiae</i> Lindl. (Orchidaceae).	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

RESUMO

O gênero *Cyrtopodium* Schltr. apresenta cerca de 42 espécies, sendo que 28 delas ocorrem no Brasil. Entre essas espécies *Cyrtopodium polyphyllum* Vell. (Sinônimo: *Cyrtopodium paranaense* Schltr.) ocorre, principalmente, na região litorânea do sul e sudeste brasileiros. As duas populações estudadas ocorrem na planície litorânea de Picinguaba e Praia da Fortaleza, Ubatuba-SP. Em ambas as regiões foram estudadas a fenologia, a morfologia floral, a anatomia do labelo, bem como observados os visitantes florais e identificados os mecanismos de polinização de *C. polyphyllum*. Também foram feitos experimentos para verificar o sistema reprodutivo da espécie. A quantidade de sementes potencialmente viáveis obtidas em cada tratamento, bem como a taxa de frutificação em ambiente natural foram determinadas para avaliar o sucesso reprodutivo. Os resultados dos estudos anatômicos foram comparados com os de outra espécie de Cyrtopodiinae, *Grobya amherstiae* Lindl.

Cyrtopodium polyphyllum não oferece recursos aos seus polinizadores, que são atraídos às flores por engano. *Cyrtopodium polyphyllum* ocorre simpatricamente e, aparentemente, mimetiza flores de outras espécies que oferecem recursos, como *Crotalaria incana* (Fabaceae) e *Stigmaphyllon* sp. (Malpigiaceae). Além da polinização por fator biótico, algumas flores de *C. polyphyllum* são autopolinizadas por gotas de chuva, um mecanismo que até então não havia sido descrito para Cyrtopodiinae. *Cyrtopodium polyphyllum* é autocompatível, mas dependente de polinizadores para a transferência de pólen. O grau de autocompatibilidade varia bastante entre as populações estudadas. Os frutos formados através das autopolinizações manuais, das polinizações cruzadas, assim como os desenvolvidos em condições naturais, apresentam alta taxa de sementes potencialmente viáveis e algumas exibem poliembrionia.

Um estudo anatômico das glândulas florais presentes no labelo de *Cyrtopodium polyphyllum* e *Grobya amherstiae* foi efetuado com o propósito de relacionar a função desempenhada por estas estruturas com o processo de polinização. Ambas as espécies apresentam osmóforos, estruturas responsáveis pela produção dos odores característicos de cada espécie. *Cyrtopodium polyphyllum* possui dois tipos de osmóforos: um composto por papilas unicelulares, distribuídas pela superfície adaxial do labelo, e outro composto por emergências pluricelulares, presentes na região do calo do labelo. Em *G. amherstiae*

os osmóforos são compostos por uma única camada de células epidérmicas, e ocorrem em toda a superfície abaxial do labelo. *Grobya amherstiae* apresenta, ainda, elaióforos, sendo um no ápice do labelo e outro na base da coluna. O elaióforo do ápice do labelo é de estrutura mista, composto por tricomas unicelulares glandulares e epiderme em paliçada, enquanto o da base da coluna é tricomáceo, apresentando apenas tricomas glandulares. Além de osmóforos e elaióforos, *G. amherstiae* apresenta também um guia de óleo na superfície adaxial do labelo formado por células papilosas.

ABSTRACT

The genus *Cyrtopodium* comprises about 42 species, with 28 occurring in Brazil. Among these species, *Cyrtopodium polyphyllum* (Synonym: *Cyrtopodium paranaense* Schltr.) occurs mainly on sandy soils in “restinga” vegetation along the coast of south and southern of Brazil. Large populations are found in the Natural Reserve of Picinguaba and at Praia da Fortaleza, municipality of Ubatuba, State of São Paulo, regions where this specie was studied. In both study sites were studied the phenology, floral morphology, lip anatomy, as well as recorded the floral visitors and identified the pollination mechanisms of *C. polyphyllum*. Also were performed treatments to verify the reproductive system of this specie. The quantity of potentially viable seeds obtained in each treatment, as well as the fruit set in natural habitat was recorded in order to evaluate the reproductive success. The results of the anatomic studies were compared with other Cyrtopodiinae specie, *Grobya amherstiae* Lindl.

Cyrtopodium polyphyllum offers none reward to their pollinators, which are attracted to flowers by deceit. *Cyrtopodium polyphyllum* occur sympatrically and apparently mimicry flowers of other reward producing species, as *Crotalaria incana* (Fabaceae) and *Stigmaphyllon* sp. (Malpigiaceae). Besides of the pollination by a biotic factor, some flowers of *C. polyphyllum* are pollinated by raindrops, a pollination mechanism not described to Cyrtopodiinae yet. *Cyrtopodium polyphyllum* is self-compatible but pollinator-dependent. The tax of self-incompatibility is different between the two studied populations. The fruits formed from manual self-pollinations, cross-pollinations, as well as developed under natural conditions, show an elevated tax of potentially viable seeds and sometimes present poliembryony.

An anatomical study of the floral glands gifts in lip of *Cyrtopodium polyphyllum* and *Grobya amherstiae* were performed with the intention to relate the function played for these structures with the pollination process. Both species presents osmophores, structures responsible by the production odors, which are characteristic of each species. *Cyrtopodium polyphyllum* presents two types of elaiophores: one is composed by unicellular papillae, distributed along adaxial surface of the lip, and other composed by multicellular papillae arranged on the lip callous. In *G. amherstiae* the osmophores are composed by a singular layer of epidermic cells, and occurs along of all abaxial surface

of the labellum. *Grobya amherstiae* also presents an elaiophore on the lip apices and on column basis. The elaiophore of the lip apices is a mixed structure, composed by unicellular glandular trichomes and a palisade epidermis, although the elaiophore of the column basis is trichomatic, presenting only glandular trichomes. Besides of osmophores and elaiophores, *G. amherstiae* also presents an oil guide on adaxial surface of the labellum made by papillose cells.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Orchidaceae

A família Orchidaceae abrange cerca de 7% das Angiospermas, sendo considerada uma das maiores famílias desse grupo (Sanford 1974), ao lado de Poaceae e Asteraceae (Arditti 1982). Originaram-se no período Cretáceo, na área geográfica que atualmente compreende a Malásia, no período em que as angiospermas começaram a se diversificar (Dressler 1981). Segundo Atwood (1986), estima-se que a família possua, aproximadamente, 20.000 espécies distribuídas por todo o mundo, mas apresentando sua maior diversidade nos trópicos. Segundo Pabst & Dungs (1975) o Brasil possui cerca de 2.300 espécies distribuídas em 191 gêneros.

A maioria das espécies é epífita, porém, existem orquídeas rupícolas, terrícolas, palustres e saprofíticas (Dressler 1993). Segundo Hoehne (1949), espécies de orquídeas podem ser encontradas em todas as formações vegetais brasileiras. Esta grande capacidade adaptativa pode ser explicada, em parte, pelas várias formas vegetativas presentes na família, as quais podem representar diferentes estratégias relacionadas, basicamente, com a obtenção e reserva de água e nutrientes. Caules intumescidos formando pseudobulbos, folhas carnosas, raízes dotadas de velame e o próprio crescimento em touceiras, permitindo o acúmulo de matéria orgânica, são algumas destas estratégias.

Ao contrário dos órgãos vegetativos, que têm grande diversidade estrutural, as flores das orquídeas são relativamente uniformes quanto ao número e arranjo das partes, possuindo três sépalas, três pétalas (uma destas diferenciada em labelo) e sua simetria, geralmente, é zigomorfa. Os órgãos reprodutivos são fundidos em uma estrutura, a coluna, com uma ou mais raramente duas ou três anteras e uma região estigmática formada pela fusão dos três estigmas (Dressler 1981). Apesar da construção floral ser uniforme quanto ao número e arranjo de suas partes, há variação em detalhes estruturais, na forma e tamanho dos componentes básicos, levando ao surgimento de estruturas muito complexas em orquídeas (van der Pijl & Dodson 1966). Na maioria das Orchidaceae os grãos de pólen são reunidos em duas ou mais polínias, e estas, em conjunto com o viscidio (e estipe, em alguns gêneros), que é a extremidade adesiva responsável pela

fixação ao polinizador, formam o polinário. O polinário é separado do estigma por uma região denominada rostelo (Dressler 1993).

Polinização em Orchidaceae

A importância dos polinizadores na evolução da família Orchidaceae é refletida na complexidade das características dos mecanismos de polinização (Garay 1960, van der Pijl & Dodson 1966). Alguns autores afirmam que as relações entre orquídeas e seus polinizadores tem resultado em grande especialização e diversidade da morfologia floral (Dressler 1981). Pabst & Dungs (1975) acreditam numa co-evolução entre orquídeas e seus polinizadores, em que qualquer modificação em determinada planta trás conseqüências para seu polinizador e vice-versa. Com isso, mudanças significativas na estrutura floral e caracteres químicos ou fenotípicos nas plantas parecem ser catalisadas por esses polinizadores (van der Pijl & Dodson 1966). A especialização floral para polinizadores específicos e a limitação da diversidade dos polinizadores são interpretadas como propiciando redução do custo de energia da planta no sucesso da transferência de pólen entre indivíduos (Tremblay 1992). Segundo Herrera (1989) a abundância de polinizadores não especializados raramente é eficiente no sucesso da polinização em Orchidaceae.

Nos últimos anos tem sido crescente o número de trabalhos sobre biologia floral e polinização de numerosas espécies de Angiospermas, principalmente da família Orchidaceae (van der Pijl & Dodson 1966, Dressler 1993, Endress 1994). Esses estudos mostram que a diversidade de polinizadores está, habitualmente, relacionada com a complexidade floral e aos diferentes tipos de recursos produzidos pelas flores.

A maioria das espécies de orquídeas que apresentam recursos é polinizada por abelhas, que exploram diferentes recursos ou são atraídas por engano às flores (van der Pijl & Dodson 1966). Entre as espécies que oferecem algum tipo de recurso aos polinizadores o néctar é o mais comum (van der Pijl & Dodson 1966, Nilsson 1992) e explorado por diversos grupos de abelhas sociais e solitárias (revisão em van der Pijl & Dodson 1966). Outros tipos de recursos podem ser explorados por abelhas na família, como óleos voláteis (fragrâncias) que são produzidos em estruturas chamadas osmóforos (Vogel 1963a, b). Óleos florais, pseudopólen e tricomas comestíveis também são alguns tipos de recursos que podem ser encontrados em alguns grupos de orquídeas (van der Pijl

& Dodson 1966, Williams 1982). O oferecimento de pólen como recurso é raro na família, pois a maioria das orquídeas apresenta grãos de pólen formando polínias. No entanto, o oferecimento de pólen como recurso tem sido observado em alguns grupos mais basais que apresentam pólen livre, como em *Apostasia* e *Neuwiedia*, ambos os gêneros pertencentes à subfamília Apostasioideae (Kocyan & Endress 2001).

Apesar das abelhas serem os polinizadores mais freqüentes, as orquídeas também podem ser polinizadas por outros grupos de insetos e até mesmo pássaros (revisão em van der Pijl & Dodson 1966). Borboletas podem atuar como polinizadores de espécies de *Epidendrum* (Pansarin 2000, 2003). Apesar de serem pouco comuns, besouros são polinizadores de *Pteroglossaspis* (Singer & Cocucci 1997b) e de *Grobya amherstiae*, na qual uma espécie de *Montella* realiza autopolinizações, oviposita no ovário e posteriormente, suas larvas se alimentam das sementes (Mickeliunas *et al.* 2006). Beija-flores também podem polinizar espécies de Orchidaceae (van der Pijl & Dodson 1966). As mariposas habitualmente realizam polinizações noturnas, como ocorre, por exemplo, em *Platanthera* (Maad & Nilsson 2004) e algumas espécies de *Habenaria* (Singer & Cocucci 1997a). Algumas orquídeas também podem ser polinizadas por certos grupos de moscas (van der Pijl & Dodson 1966), como tem sido documentado para espécies de *Bulbophyllum* (Borba & Semir 1998) e *Pleurothallis* (Borba & Semir 2001).

Cerca de um terço das orquídeas são polinizadas por engano (van der Pijl and Dodson 1966, Ackerman 1986, Nilsson 1992). Essas flores sem recursos podem atrair seus visitantes de várias maneiras, incluindo o engano de alimento, no qual as flores mimetizam outras que possuem recursos ou simulam estruturas que servem como alimento (Dafni 1984, Ackerman 1986, Nilsson 1992).

Anatomia floral

Estudos de anatomia floral são extremamente raros para Orchidaceae, devido às dificuldades na obtenção de material, pois habitualmente as orquídeas florescem apenas uma vez ao ano e, em algumas espécies, as flores duram apenas um dia.

Dentre as estruturas secretoras presentes nas flores das Angiospermas estão os elaióforos, que secretam óleo fixo, e os osmóforos, responsáveis pela liberação de fragrâncias. Os óleos florais foram primeiramente documentados por Vogel (1969) em

diversas famílias de plantas. Em Orchidaceae a presença de óleos foi registrada nas subtribos Ornithocephaliinae e Oncidiinae (Vogel 1974).

Vogel (1974) descreveu dois tipos de elaióforos: epidermais e tricomáceos. Nos elaióforos epidermais as células epidérmicas em paliçada são secretoras, sendo o tipo de elaióforo predominante nas angiospermas e encontrado em Malpighiaceae, Krameriaceae e algumas espécies de Orchidaceae. Por outro lado, o tipo de elaióforo tricomáceo consiste de tricomas glandulares, que podem ser unicelulares (Iridaceae e algumas Orchidaceae) ou multicelulares (Solanaceae, Cucurbitaceae, Scrophulariaceae, Primulaceae e Orchidaceae) (Buchmann 1987, Endress 1994).

Os odores, que podem ou não estar associados à atração de polinizadores, são produzidos nos osmóforos e são compostos, principalmente, por óleos voláteis (Vogel 1963 a, b). Os osmóforos são habitualmente formados por uma única camada de células epidérmicas, ou podem apresentar papilas secretoras (Curry *et al.* 1991, Ascensão *et al.* 2005).

Cyrtopodium

O gênero *Cyrtopodium* (Epidendreae: Cymbidieae: Cyrtopodiinae) é neotropical e inclui cerca de 42 espécies, distribuídas desde o sudeste da Flórida até o nordeste da Argentina (Batista & Bianchetti 2004). O centro de diversidade do gênero é o cerrado brasileiro, onde ocorrem cerca de 28 espécies (Hoehne 1942). A distribuição de espécies terrícolas de *Cyrtopodium* está, habitualmente, correlacionada com as características do solo, e com o tipo de vegetação local (Barros *et al.* 2003). Muitas espécies podem ser rupícolas ou epífitas, no entanto, a maioria delas ocorre como terrícola (Hoehne 1942). A importância do fogo no desenvolvimento de orquídeas terrícolas tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores. Schelpe (1970) notou que as orquídeas da África do Sul permanecem ilesas após incêndios naturais, e que algumas espécies florescem com mais intensidade após a passagem do fogo, enquanto outras apenas florescem se forem previamente queimadas. Na Austrália, o fogo também induz a floração de algumas espécies de orquídeas (Stoutamire 1974). O fenômeno é conhecido não apenas em relação às orquídeas, mas também em um grande número de espécies de plantas carnívoras, como *Darlingtonia*, *Dionaea*, *Drosera* e *Sarracenia* (Braem 1992), bem como para espécies de outras famílias. Segundo Kricher (1989) o fogo é essencial, porque fertiliza o solo pobre

de regiões como o cerrado, liberando os nutrientes da cobertura vegetal que as plantas necessitam para florescer. Huggins (1991) registrou que espécies de *Cyrtopodium* são encontradas apenas em áreas que sofrem incêndios regulares e explica essa situação com o fato do fogo queimar a vegetação dominante (gramíneas) que cresce ao redor dessas espécies, sufocando-as e impedindo que floresçam.

Segundo Chase & Hills (1992) espécies de *Cyrtopodium* não oferecem recurso aos polinizadores, sendo polinizadas por engano por abelhas fêmeas e machos da tribo Euglossini (Hymenoptera: Apidae). Dressler (1993) sugere polinização por *Euglossa* para espécies de *Cyrtopodium*. Machos de abelhas euglossine são conhecidos por coletarem fragrâncias em espécies de várias famílias, incluindo Orchidaceae (para uma revisão ver Williams 1982). Nas orquídeas, as fragrâncias florais são produzidas pelos osmóforos localizados quase que exclusivamente no labelo (Vogel 1963 a, b). Há muito se conhece o papel dos machos de abelhas da tribo Euglossini como polinizadores de orquídeas (Dressler 1967). Orquídeas das subtribos Catasetinae, Stanhopeinae e algumas espécies de Zygopetalinae, Lycastinae, Maxillariinae, Ornithocephalinae e Oncidiinae não produzem néctar e são visitadas exclusivamente pelos machos destas abelhas, que são primariamente atraídos à flor por substâncias aromáticas voláteis, principalmente terpenóides e ácidos aromáticos, totalizando aproximadamente 60 compostos conhecidos (Braga 1976, Williams & Dodson 1972). Conforme a composição da substância odorífera ocorrerá atração de uma a muitas espécies de abelhas Euglossini. Essa especificidade tem grande importância nos mecanismos de isolamento e especiação das orquídeas (Williams & Dodson 1972). As substâncias odoríferas permitem a orientação do inseto na flor, a qual apresenta regiões de maior ou menor número de osmóforos. No ato da coleta desses óleos aromáticos, o polinário se fixa na abelha. As abelhas Euglossini são capazes de voar grandes distâncias, o que permite dispersão bastante efetiva dos genes das espécies que polinizam (Janzen 1971, Williams & Dodson 1972).

Cyrtopodium polyphyllum Vell. Pabst ex F. Barros (Barros *et al.* 2003), ocorre como terrícola ou mais raramente rupícola, sendo encontrada, principalmente, na região litorânea do sul e sudeste brasileiro (Hoehne 1942). A espécie apresenta pseudobulbos fusiformes com 6 a 8 folhas. A inflorescência é paniculada e apresenta numerosas flores ressupinadas, predominantemente de cor amarelada. As sépalas são verde-amareladas e as pétalas, amarelas. O labelo é trilobado, amarelado e apresenta calosidades semelhantes

às encontradas em espécies de *Oncidium* (Singer & Cocucci 1999) e *Grobya amherstiae* (Mickeliunas *et al.* em preparação), nas quais estas calosidades contêm glândulas de óleo, sendo o óleo a substância procurada pelos polinizadores. O termo óleos florais vem sendo usado para designar óleos não voláteis que são secretados pelos elaióforos (Vogel 1974, Simpson & Neff 1981).

Área de estudo

O estudo com *Cyrtopodium polyphyllum* foi desenvolvido na planície litorânea de Picinguaba (Ubatuba-SP). Essa região apresenta pouca variação em seu relevo, tendo como ponto mais alto o Morro do Corsário com aproximadamente 50 m de altitude. O clima é quente e super úmido, com temperaturas médias superiores a 18 °C, não apresentando estação seca invernal (Nimer 1977). Estudos realizados pela Estação Experimental de Ubatuba constataram que, no período entre os anos de 1961 a 1990, ocorreu diminuição da pluviosidade apenas no inverno, enquanto os verões foram muito úmidos. Neste período, as médias anuais de precipitação pluviométrica foram de 2624 mm, e as médias mensais de temperatura foram de 21,2 °C, com época mais quente e chuvosa entre dezembro e março (médias de 24,1 °C e 331,7 mm de precipitação), e a mais fria e seca entre dezembro e agosto (médias de 18,1 °C e 97,6 mm de precipitação). A vegetação predominante é a de restinga, atualmente designada como planície litorânea, de acordo com Suguio & Martin (1990). A fisionomia dessa restinga apresenta árvores altas (15-20 m) até nas proximidades da praia. O solo arenoso e úmido encontra-se geralmente coberto por uma camada de serapilheira, sendo em diversas áreas sazonalmente inundado, enquanto em outras áreas a inundação pode ser permanente, onde ocorrem os chamados cachetais (formações com predominância de *Tabebuia cassinoides* DC.). Ao longo dos rios, algumas áreas estão sujeitas a inundações diárias, conforme o movimento das marés (Moraes 1997). Na região da planície de Picinguaba foi feito um minucioso levantamento das Orchidaceae, tendo sido registradas 77 espécies distribuídas em 45 gêneros (Ribeiro 1992).

Embora sejam crescentes os estudos sobre biologia da polinização, reprodução e anatomia floral em Orchidaceae nos últimos anos no Brasil, ainda são muito escassos em relação à importância e à quantidade de espécies da família. Sobretudo em relação aos

gêneros que ocorrem no Brasil, como é o caso de *Cyrtopodium*, não existem informações sobre a biologia reprodutiva, mecanismos de polinização ou anatomia das estruturas secretoras dessas espécies.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

1. Estudar a fenologia e a biologia floral de *Cyrtopodium polyphyllum* na região de Ubatuba, SP.
2. Relacionar a morfologia floral com os atributos morfológicos dos polinizadores e o mecanismo de polinização.
3. Observar em condições naturais os tipos de visitantes, sua frequência e o comportamento de visita.
4. Realizar experimentos para determinar o sistema reprodutivo; quantificar as sementes potencialmente viáveis obtidas em cada tratamento e registrar a taxa de frutificação em condições naturais para verificar o sucesso reprodutivo desta espécie.
5. Realizar estudos anatômicos das áreas secretoras do labelo e comparar os resultados com os obtidos em *Grobya amherstiae*.

CAPÍTULO 1

(Formatado de acordo com as normas da Plant Biology)

Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit.

L. Mickeliunas^{1, 3}, E. R. Pansarin² and M. Sazima¹

¹Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil.

²Universidade Estadual Paulista, FCAV, Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

Running title: Pollination by deceit of *Cyrtopodium polyphyllum*

³Corresponding author:

L. Mickeliunas

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

e-mail: colax@pop.com.br

Key words: Centridini, *Cyrtopodium*, Cyrtopodiinae, floral biology, Orchidaceae, pollination by deceit, reproductive biology

Abstract: The genus *Cyrtopodium* comprises about 42 species distributed from southern Florida to northern Argentina. *Cyrtopodium polyphyllum* occurs on rocks or in sandy soils in “*restinga*” vegetation along the Brazilian coast. The lateral and paniculate inflorescence produces up to 130 resupinate yellow-greenish flowers, which are visited by several species of Anthophorid bees, although only two small *Centris* species act as pollinators. *Cyrtopodium polyphyllum* offers no rewards to its pollinators, but mimics reward producing flowers of the nearby growing *Stigmaphyllon* sp. (Malpighiaceae) and *Crotalaria incana* (Leguminosae) individuals. Visits to flowers of *C. polyphyllum* are scarce and, as a consequence, low fruit set is recorded under natural conditions. Such low fruit production contrasts with the number of fruits each plant bears after manual pollinations, suggesting deficient pollen transference among plants. *Cyrtopodium polyphyllum* is self-compatible and presents high fruit set in both manual self- and cross-pollinated flowers. Furthermore, fruits (2.2%) are formed by automatic self-pollinations assisted by rainfall. This facultative self-pollination mechanism is an important strategy to provide reproductive assurance to *C. polyphyllum*, as rainfall restricts the foraging activity of its pollinating bees. Fruits derived from treatments and under natural conditions presented a similar high rate of potentially viable seeds. Moreover, these seeds showed a low rate of polyembryony, which did not exceed 5%.

Introduction

The Neotropical genus *Cyrtopodium* (Epidendroideae, Cymbidieae, Cyrtopodiinae) comprises about 42 species distributed from southern Florida to northern Argentina (Batista and Bianchetti, 2004). The center of diversity of the genus is the Brazilian “*cerrado*” (Batista and Bianchetti, 2004). However, some species as *Cyrtopodium polyphyllum* (Vell.) Pabst *ex* F. Barros (i.e., *Cyrtopodium paranaense* Schltr.) occur in sandy soils or on rocks along the Brazilian coast, mainly from south to southeastern Brazil (Hoehne, 1942).

Most of the orchid species are pollinated by Hymenoptera that explore different rewards or are attracted by deceit (van der Pijl and Dodson, 1966; Dressler, 1981). About one third of all Orchidaceae are deceptive (van der Pijl and Dodson, 1966; Ackerman, 1986; Nilsson, 1992). Non-rewarding orchids attract their pollinators through a variety of manners, including food-frauds (Dafni, 1984; Ackerman, 1986; Nilsson, 1992). Out of the rewards species present to their pollinators, nectar is the most common and spread in Orchidaceae (van der Pijl and Dodson, 1966; Nilsson, 1992), and it is explored by several groups of social and solitary bees (see van der Pijl and Dodson, 1966 for a review). Other rewards collected by bees in the Orchidaceae are volatile oils, pollen, food-hairs, pseudopollen and edible oils (van der Pijl and Dodson, 1966; Williams, 1982).

The Cyrtopodiinae *Grobya amherstiae* Lindl. is pollinated by the *Paratetrapedia fervida* Smith (Anthophoridae) bees that collect floral oils produced by trichomatic and epidermic elaiophores at the apex of their lip and at their column basis (Mickeliunas et al., 2006). The offering of floral oils as a reward has been studied by Vogel (1974) for some species of subtribes Ornithocephalinae and Oncidiinae. According to more recent studies on the pollination biology of *Oncidium* species, the floral oil produced by elaiophores is collected by *Tetrapedia* bees (Anthophoridae: Tetrapediini) (Schlindwein, 1995; Singer and Cocucci, 1999). However, data on the floral biology and pollination mechanisms of Cyrtopodiinae are very scarce. According to Chase and Hills (1992), the species of *Cyrtopodium* offer no reward to their pollinators, and thus attract Centridini and Euglossini bees by deceit. Orchid species pollinated by deceit generally present low reproductive success under natural conditions, mainly due to the low frequencies of effective pollinators (e.g., Montalvo and Ackerman, 1987; Ackerman, 1989; Zimmerman

and Aide, 1989). The variation in the probability of a given flower setting fruit is influenced by a certain number of factors. Phenology, inflorescence type, habitat, plant density, population size, and temporal variation (Kindlmann and Balounová, 2001) may affect the reproductive success as well as the composition of the surrounding plant community (Tremblay et al., 2005).

The present study reports on the pollination mechanism and reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* occurring in the “*restinga*” vegetation of the Atlantic rainforest in southeastern Brazil. The purpose of the present report is thus two-fold: (1) to describe the pollination by deceit and the association with co-blooming species with similar visual signals; (2) to present and discuss its reproductive success in relation to this type of pollination mechanism.

Material and methods

Study sites

The floral and reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* were studied at two different sites in Ubatuba (approx. 23° 22'S, 44° 50'W; 0 – 50 m a.s.l.), in the State of São Paulo, south-eastern Brazil. Observations were made at the Natural Reserve of Picinguaba, and at Praia da Fortaleza, two areas composed mainly by Atlantic rain forest. Climate is tropical-humid ('Af. '; see Köppen, 1948), with an annual rainfall of up to 2600 mm, an average annual temperature of 21 °C and no well-defined dry-cold season, even during the so called dry months (from May to September); the wet season occurs from October to March (data source: Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, Brazil). Both studied populations occur in “*restinga*” vegetation, growing on rocks or in sandy soils. At the Picinguaba study site, model plants of the nectar-producing *Crotalaria incana* L. (Fabaceae) predominate together with *C. polyphyllum*, whereas at the Fortaleza site, plants of the oil-producing *Stigmaphyllon* sp. (Malpighiaceae) are more abundant. Three widely scattered individuals of *C. polyphyllum* (seven inflorescences) without model plants nearby were studied in forest margins.

Plant and flower features

Fieldwork was carried out during two *Cyrtopodium polyphyllum* flowering seasons, from August 2004 to December 2006. Data on phenology; the production of pseudobulbs,

leaves and inflorescences, as well as features of flower anthesis, pollinators and fruit dehiscence were recorded.

Morphological features of fresh and FAA preserved flowers collected in the field ($n = 30$) were recorded and drawn under a binocular stereomicroscope equipped with a “camera lucida”. Measurements were made from drawings and directly from floral structures using a caliper rule. Fresh flowers were immersed in neutral red to localize osmophores (Dafni, 1992). Plant voucher: Ubatuba, XI.2005, *L. Mickeliunas* and *E.R. Pansarin* 48, is deposited at the Herbarium of the Universidade Estadual de Campinas (UEC).

Pollination mechanism and pollinators

Detailed observations of the pollination process, visitation frequencies, visitors and capture of pollinators on flowers of *C. polyphyllum* were carried out from 26 to 29 November, 2004, from 15 to 16 November, 28 November to 1 December, 8 to 9 and 12 to 14 December, 2005, and from 23 to 24 November and 6 December, 2006, totaling 95 h. The daily observation period was from 08:00 to 14:00 h. Immediately after this period, flowers were tagged and examined in the early morning, at about 07:30 h, to detect possible visits after the observation period and nocturnal pollination. Additional observations were made on the three individuals located in forest margins from 13 to 14 December, 2005 and 23 to 24 November, 2006, totaling 11 h observation. The insects were collected, identified and vouchers are deposited at the Museu de História Natural of the Universidade Estadual de Campinas (ZUEC).

Breeding system, natural fruit set and seed viability

The experimental treatments to investigate the breeding system of *Cyrtopodium polyphyllum* were performed in natural habitat, and included manual self- and cross-pollinations and emasculations. They involved thirty flowers (three inflorescences) per treatment in Picinguaba and 30 flowers (three inflorescences) in Praia da Fortaleza. Treatments were randomly applied to each inflorescence, using flowers at their first day of anthesis. Eighty-seven flowers (one inflorescence) and 1359 flowers (30 inflorescences) were used as control (untouched flowers) in Picinguaba and at Praia da Fortaleza, respectively. The fruit set under natural conditions of 2380 flowers (30

inflorescences) in Picinguaba and 2028 flowers (30 inflorescences) at Praia da Fortaleza was recorded when fruits were dehiscent.

A test of potentially viable seeds was performed on fruits obtained through manual pollinations, untouched flowers (control) and on 60 fruits that developed under natural conditions (30 fruits from each study site). Fresh seeds were placed in a 1% solution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, and all well-developed embryos stained red, indicating viable seeds while none of the rudimentary embryos stained. Given these results, samples of 200 seeds per fruit were scored for viability in which seeds with well-developed embryos were considered viable, and those with rudimentary or without embryo were considered unviable. During seed examination, the occurrence of polyembryony was recorded.

Results

Plant and flower features

Cyrtopodium polyphyllum occurs on rocks at Praia da Fortaleza and in sandy soils in Picinguaba. In October, each plant develops a new fusiform pseudobulb (ca. 10 – 15 cm) and sometimes, simultaneously, a lateral and paniculate, mostly erect, inflorescence that produces until about 130 resupinate flowers. The main flowering period occurs in November, but several flowering plants were recorded until the end of December. Flowers are yellow-greenish (Fig. **1A**). Sepals (1.4 x 0.9-1 cm) are ovate-lanceolate and present undulate margins and petals are obovate and measure about 1.4 x 1.2 cm. The 3-lobed and yellow lip presents a central callous similar to an elaiophor. The arched column (ca. 8 x 3 mm; Fig. **2D**) is green-yellowish and presents a concave and transversally disposed oval stigmatic cavity (Fig. **2C**). The pollinarium presents two oval, yellow and waxy pollinia (Fig. **2B**), and the viscidium (ca. 0.5 mm) is cordiform and white-hyaline. The pollinarium is separated from the stigmatic surface by a thick rostellum. The osmophores occur on the adaxial surface of the lip, but are more evident on the callous. Flowers open in the morning hours and produce a sweet fragrance, which is perceptible at short distances mainly during the hottest hours of the day (11:00 – 14:00 h). Untouched flowers last about 21 days, but pollinated ones fade quickly. Fruits are ripe from July to September.

Pollination process and pollinators

Flowers of one of the widely scattered individuals of *Cyrtopodium polyphyllum* were visited by a *Xylocopa* species once. The bee approached a flower hovering in front of it and most of the observed approaches did not terminate by landing on the flower. In five observations, the bee actually landed on the flower but looked disoriented, although, in some flowers, it tried to probe for nectar or any other reward at the column basis. No pollinia were removed or deposited. No other visitors were recorded on these individuals that develop only two fruits after automatic self-pollination by rain (Mickeliunas *et al.*, unpubl. data, Cap. 2). At the other sites, individuals of *C. polyphyllum* grow intermingled with or nearby individuals of *Stigmaphyllon* sp. (Malpighiaceae) (Figs. 1B-D) or *Crotalaria incana* L. (Fabaceae) (Fig. 1C) and their flowerings overlap to a large extent. The three species have showy, yellow flowers and are similar in size. Flowers of *Stigmaphyllon* sp. and *Crotalaria incana* were frequently visited by Centridini bees, which collected floral oil and nectar, respectively. Visits to flowers of *C. polyphyllum* were fairly low, one to four/day, and occurred at irregular intervals, but mainly between 10:00 – 14:00 h and only in sunny days, as precipitation and cloud cover restrict the bee foraging activity. On flowers of *C. polyphyllum* the bees landed directly on the central callous of the lip (Fig. 2A), searched for a reward, but as there is none, visits were very quick, lasting about 1 – 2 sec. While landing or when the bees abandoned the flower, the viscidium contacted their head, where the pollinarium was deposited (Fig. 2E-F). Pollinaria were removed alone or, sometimes, with their anther cap. Only two small species of *Centris* (Anthophoridae, Centridini) succeeded in removing the pollinarium, as their size matched fairly well the flower morphology and size (Fig. 2A). Additionally, some other species, like *Xylocopa* sp., behaved in a manner similar to the one described above on flowers of the scattered individuals. Flowers of *C. polyphyllum* attracted a wide array of solitary native bees, with the exception of euglossine. Bee species and their respective visitation numbers are presented in Table 1.

Breeding systems, natural fruit set and seed viability

Cyrtopodium polyphyllum is self-compatible. Fruit set in self-pollinated flowers was 16.66% and 63.33% and in cross-pollinated flowers it was 63.33% and 76.6% in Picinguaba and Praia da Fortaleza, respectively. No fruits developed after emasculations.

Untouched flowers (control) were self-pollinated through rainfall resulting in 2.3% of dehiscent fruits in Picinguaba and 2.2% at Praia da Fortaleza. Under natural conditions, fruit set was low, with 1.34% and 2.42%, in Picinguaba and at Praia da Fortaleza, respectively. It is worth mentioning that the highest fruit set (2.42%) occurred at the site where *Stigmaphyllon* sp. was the model plant. On *C. polyphyllum* individuals from the forest margins, no biotic pollinations occurred at all. The results of fruit set are summarized in table 2.

Fruits obtained in treatments and under natural conditions presented a high percentage of viable seeds, over 90%, on average (Table 2). There was little difference in seed viability among fruits derived from treatments and those developed in natural conditions. Most of the seeds had well-developed embryos: less than 10% of them presented rudimentary embryos (Fig. 1E). Seeds with polyembryony (two embryos; Fig. 1F) were recorded in fruits from treatments as well as in those developed in natural conditions. These embryos were similar in size to those of seeds with one embryo. Moreover, these seeds showed a low rate of polyembryony, which did not exceed 5% (Table 2).

Discussion

Plant and flower features

Although the center of diversity of the genus is the Brazilian “*cerrado*” (Batista & Bianchetti, 2004), a few species, such as reported here for *Cyrtopodium polyphyllum*, occur in sandy soils or on rocks along the Brazilian coast (Hoehne, 1942), a habitat that differs drastically from that of the “*cerrado*” as for climatic features. Spring flowering, the presence of fusiform pseudobulbs and large and paniculate lateral inflorescences of *C. polyphyllum* are common characteristics for several species of the genus (see Hoehne, 1942). The main flowering of *C. polyphyllum* coincides with long periods of rainfall, which may result in automatic self-pollination by rain (Mickeliunas *et al.* *subm.*).

Anatomical studies of the lip of *Cyrtopodium polyphyllum* revealed that, although it presents similarity with the elaiophor of other Cyrtopodiinae, as *Grobya amherstiae* Lindl. (Mickeliunas *et al.*, 2006), species of Ornithocephalinae (Vogel, 1974) and Oncidiinae (Vogel, 1974; Schlindwein, 1995; Singer and Cocucci, 1999), the central callous also presents a high occurrence of multi-cellular osmophores (Mickeliunas *et al.*

unpubl. data) that produce a sweet fragrance. Perfume collecting bees of tribe Euglossini, which have been reported as pollinators of *Cyrtopodium* (Chase and Hills, 1992), were not recorded here for *C. polyphyllum*.

As reported for other species of the genus (Chase and Hills, 1992), it was expected that flowers of *C. polyphyllum* would produce no reward to their pollinators, and would therefore be pollinated by deceit. The pollination process of this orchid includes plant species of different families and their different flower features. The similarity between orchid flowers and oil-producing Malpighiaceae flowers has already been recorded by Nieremberg (1972), but that between orchid flowers and nectar-producing flowers of Leguminosae had never been reported. The size and color similarity between *C. polyphyllum* flowers and those of the co-occurring reward producing species *Stigmaphyllon* sp. and *Crotalaria incana* shows evidence of mimicry, as is the case of several other orchid species, as reported by Bierzychudek (1981a), Dafni (1984), Ackerman (1986), and Nilsson (1992). Nutritive deception is the most common among the deceptive mechanisms and has been documented for about 30 species (Dafni, 1984).

Pollination process and pollinators

The results presented here shows that the pollinators of *C. polyphyllum* and those of the co-occurring oil producing *Stigmaphyllon* sp. and nectar-producing *Crotalaria incana*, as well as those of the elaiophor-bearing Cyrtopodiinae *Grobya amherstiae* Lindl. (Mickeliunas et al., 2006), species of Ornithocephalinae (Vogel, 1974) and Oncidiinae (Vogel, 1974; Schlindwein, 1995; Singer and Cocucci, 1999) follow a same behavioral pattern.

The pollination rates under natural conditions observed at different sites (Table 2), lead to the conclusion that this orchid species imitates a general search image of yellow flowers, like those of *Stigmaphyllon* sp. and *Crotalaria incana*. The pollinator (small *Centris* species) attempts to collect a reward on the callous indicate that such reward is recognized as oil or nectar.

Deception may be achieved through the flower resemblance to larval food or to the nectariferous flowers of other families or even to female individuals of the pollinator, but in Orchidaceae food deception is more frequent (see Dafni, 1984; Ackerman, 1986; Nilsson, 1992 for reviews). Food deception (i.e., Batesian mimics) occurs when a rare

species providing no reward mimics flowers of a more abundant species that offers a reward (see Dafni, 1984 for a review). In nutritive deception systems, optical cues are decisive and are based on the learned signals (Dafni, 1984). Thus, the efficiency of the mimicry widely depends on the pollinator's acquired experience. Several authors argued that pollinator's naiveté is a precondition for the effective pollination of non-rewarding flowers. After a while, the pollinator recognizes the deception and learns to avoid it. As a result, the fruit production is better at the beginning of the flowering season or when the pollinators have just emerged (see Dafni, 1984 for a review). Among orchids, several model mimics have been proposed (see Ackerman, 1986 for a review). A similar model to the one recorded here for *C. polyphyllum* has already been reported between *Oncidium lucayanum* Nash ex Britton & Millsp. and flowers of Malpighiaceae species in the Bahamas, to deceive oil-collecting females of *Centris* (Nieremberg, 1972).

Scarcity of bee visits, as reported here for *C. polyphyllum*, is common in non-rewarding flowers pollinated by deceit (see Ackerman, 1986, 1989; Montalvo and Ackerman, 1987; Zimmerman and Aide, 1989). Besides, climatic factors such as cloud cover and precipitation, wind speed, air temperature, solar radiation and humidity exert a strong influence on the bee activity (including Centridini bees in Neotropical regions), and consequently on their foraging behavior and visitation to flowers (see Roubik, 1992 for a review). Some rewardless species can cause reduced visitation and consequently a low reproductive success in relation to reward-producing orchids (e.g., Ackerman, 1981; Dafni, 1984; Ackerman, 1986; Johnson and Nilsson, 1999; Salguero-Farías and Ackerman, 1999; Johnson, 2000; Smithson, 2002).

Breeding systems, natural fruit set and seed viability

Although *C. polyphyllum* and the Cyrtopodiinae *Grobya amherstiae* are self-compatible, both depend on pollen vectors for pollination. While in the latter pollen transference is made exclusively by biotic pollinators (Mickeliunas et al., 2006), in *C. polyphyllum* it is made by biotic (i.e., Centridini bees) and abiotic vector, namely water from rainfall (Mickeliunas et al. subm.). Since precipitation is high in the region of Ubatuba, and rain may persist for one week or more during the wet season, the occurrence of facultative self-pollination through rainfall presented by *C. polyphyllum* can be an important strategy promoting fruit set in the absence of biotic pollinators.

Facultative autogamy may occur in a number of species (see Catling, 1990 for review) and may be an appropriate strategy when pollination frequency is habitually low. An occasional crossing event may be sufficient to infuse enough genetic variability to diminish any effects of inbreeding depression from frequent self-pollination (see Tremblay, 2005 for a review).

In *C. polyphyllum*, the low level of fruit set under natural conditions is clearly a consequence of pollen limitation, since these data contrast with hand pollinations. Broad surveys reveal that deceptive orchids invariably have lower levels of pollination success and fruit set than their rewarding counterparts (e.g., Johnson and Bond, 1997; Neiland and Wilcock, 1998; Johnson, 2000). This raises questions about what kind of selective pressures have driven the evolution of deception. Johnson and Nilsson (1999) have argued that the loss of fruit quantity resulting from a shift from reward to deception could be compensated for by a gain in fruit quality and the efficiency of pollen export. The basis of this argument is that pollinators will visit fewer flowers on the inflorescences of deceptive orchids and that a consequence of this behavior will be to reduce the level of geitonogamous self-pollination (Dafni and Ivri, 1979; Dressler, 1981).

In Orchidaceae, the production of fruits per inflorescence is still the most used parameter to determine the reproductive success (e.g., Montalvo and Ackerman, 1987; Ackerman, 1989; Zimmerman and Aide, 1989; Ackerman and Montalvo, 1990). The natural fruit set of *C. polyphyllum* is low when compared with that of each inflorescence in self- and cross-pollinations. As presented here, other studies show that, in experimental conditions, an increase of fruit set occurs when compared with the natural condition of several orchid species (Ackerman and Oliver, 1985; Montalvo and Ackerman, 1987; Ackerman and Montalvo, 1990; Zimmerman and Aide, 1989). The fruit set of non-obligatorily autogamous orchids, as is the case of *C. polyphyllum*, is low as a consequence of a deficient pollen transference between plants where the scarcity of efficient pollinators seems to be a limiting factor (e.g., Janzen et al., 1980; Schemske, 1980; Bierzychudek, 1981b; Ackerman and Montalvo, 1990; Calvo, 1990; Calvo and Horvitz, 1990; Garwood and Horvitz, 1985; Burd, 1994, and references therein). However, other factors can exert a strong influence on the reproductive success of orchid species, such as phenology, inflorescence size, habitat, plant density, population size, and temporal variation (see Kindlmann and Balounová, 2001; Tremblay et al., 2005 for

reviews). Regulation of maternal investment occurs through abortion of flowers and immature fruits (Lloyd, 1980; Stephenson, 1981), as documented here for *C. polyphyllum* in many self-pollinations, which may also be a mechanism for regulating seed quality (e.g., Lee and Bazzaz, 1982; Bookman, 1984). The hypothesis that resources are the ultimate limiting factor in angiosperm reproduction has gained widespread acceptance because levels of fruit maturation remain unchanged following supplementary pollination, and experimental reduction of resource availability causes elevated levels of fruit abortion (see Tremblay et al., 2005). Thus, according to this view, the variation in reproductive success should be closely tied to the severity of resource constraints. Flowers that fail to become fruits are not always wasted as they may function to enhance plant fitness through pollen donation (Willson and Rathcke, 1974). Furthermore, fruit set varies according to the pollinator group (Tremblay et al., 2005).

The occurrence of a high percentage of potentially viable seeds after manual and automatic self-pollination and in cross-pollinations of *C. polyphyllum* is uncommon in Epidendroideae, whose species present a great number of seeds without embryos (Lock and Profita, 1975; Stort and Martins, 1980; Stort and Galdino, 1984; Borba et al., 2001; Borba and Braga, 2003). As reported here for *C. polyphyllum*, *Grobya amherstiae* (Mickeliunas et al., 2006) and the Maxillarieae, *Xylobium squalens* (Lindl.) Lindl. (Pintaúdi et al., 1990) produce an elevated incidence of potentially viable seeds. While fruit production is assured under self-fertilization, there are trade-offs involved. Inbreeding depression, the loss in offspring fitness due to the expression of deleterious recessive alleles and other causes (Charlesworth and Charlesworth, 1979, 1987; Dudash, 1990) can offset increases in seed production. However, since offsprings from self-pollination possess two copies of the parental genome compared to one in outcrossed offsprings, the critical level of inbreeding depression determining the evolution of autogamy is assumed to be 50% (Tremblay et al., 2005 for a review).

Polyembryony has been reported in Orchidaceae generally associated with apomixy, the embryo being formed from the inner integument. In all the cases, a higher percentage of polyembryony has been recorded (Catling, 1982, 1987; Catling and Catling, 1991). Pintaúdi et al. (1990) and Borba et al. (2001) reported the presence of a few rare two-embryo seeds between intra-specific crosses. In both cases, the second embryo originated from a division of the zygote. These characteristics lead us to suppose that the supra-

numerary embryos found in *C. polyphyllum* may have a similar origin to those of *Xylobium squalens* (Pintaúdi et al., 1990) and species of *Pleurothallis* (Borba et al., 2001).

Acknowledgements

We thank the Núcleo Picinguaba, Instituto Florestal, for granted permissions for the field work, Alain François for improving our English, Isabel Alves dos Santos for bee identification and Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi for *Crotalaria* identification. This study is part of the Master's degree dissertation of ML at the Departamento de Botânica, Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil. This research was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) as part of the Thematic Project Functional Gradient (Process Number 03/12595-7), within the BIOTA/FAPESP Program – The Biodiversity Virtual Institute (<http://www.biota.org.br>), as well as by FAPESP (grant 04/12531-1) and CNPq.

References

- Ackerman, J. D. (1981) Pollination biology of *Calypso bulbosa* var. *occidentalis* (Orchidaceae): a food-deception system. *Madroño* 28, 101-110.
- Ackerman, J. D. (1986) Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* 1, 108-113.
- Ackerman, J. D. (1989) Limitations to sexual reproduction in *Encyclia krugii* (Orchidaceae). *Systematic Botany* 14, 101-109.
- Ackerman, J. D. and Oliver, J. C. (1985) Reproductive biology of *Oncidium variegatum*: moon phases, pollination, and fruit set. *American Orchid Society Bulletin* 54, 326-329.
- Ackerman, J. D. and Montalvo, A. M. (1990) Short- and long-term limitations to fruit production in a tropical orchid. *Ecology* 71, 263-272.
- Batista, J. A. N. and Bianchetti, L. B. (2004) Three new taxa in *Cyrtopodium* (Orchidaceae) from central and southeastern Brazil. *Brittonia* 56, 260-274.
- Bierzzychudek, P. (1981a) *Asclepias*, *Lantana* and *Epidendrum*: a floral mimicry complex? *Reproductive Botany* (suppl.), 54-58.

- Bierzychudek, P. (1981b) Pollinator limitation of plant reproductive effort. *American Naturalist* 117, 838–840.
- Bookman, S. S. (1984) Evidence for selective fruit production in *Asclepias*. *Evolution* 38, 72-86.
- Borba, E. L., Semir, J. and Shepherd, G. J. (2001) Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* 88, 89-99.
- Borba, E. L. and Braga, P. I. S. (2003) Biologia reprodutiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. *Revista Brasileira de Botânica* 26, 541-549.
- Burd, M. (1994) Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. *Botanical Review* 60, 63-139.
- Calvo, R. N. (1990) Four-year growth and reproduction of *Cyclopogon cranichoides* (Orchidaceae) in South Florida. *American Journal of Botany* 77, 736-741.
- Calvo, R. N. and Horvitz, C. C. (1990) Pollinator limitation, cost of reproduction, and fitness in plants: a transition matrix demographic approach. *American Naturalist* 136, 499-516.
- Catling, P. M. (1982) Breeding systems of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* 60, 3017-3039.
- Catling, P. M. (1987) Notes on the breeding systems of *Sacoila lanceolata* (Aublet) Garay (Orchidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 74, 58-68.
- Catling, P.M. (1990) Auto-pollination in the Orchidaceae. *In* *Orchid Biology, reviews and perspectives* (J. Arditti, ed.). Timber Press, Oregon, v.5, p.121-158.
- Catling, P. M. and Catling, V. R. (1991) A synopsis of breeding systems and pollination in North American orchids. *Lindleyana* 6, 187-210.
- Chase, M. W. and Hills, H. G. (1992) Orchid phylogeny, flower sexuality, and fragrance-seeking – Evidence from variation in chloroplast DNA among subtribes Catasetinae and Cyrtopodiinae. *BioScience* 42, 43-49.
- Charlesworth, D. and Charlesworth, B. (1979) The evolutionary genetics of sexual systems in flowering plants. *Proceedings of the Royal Society of London B* 205, 511-530.

- Charlesworth, D. and Charlesworth, B. (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 237–268.
- Dafni, A. (1984) Mimicry and deception in pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15, 259-278.
- Dafni, A. (1992) *Pollination ecology: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press.
- Dafni, A. and Ivri, Y. (1979) Pollination ecology of, and hybridization between, *Orchis coriophora* L. and *O. collina* Sol. Ex Russ. (Orchidaceae) in Israel. *New Phytologist* 83, 181-187.
- Dressler, R. L. (1981) *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Dudash, M. R. (1990) Relative fitness of selfed and outcross progeny in a self-compatible, protandrous species, *Sabatia angularis* L. (Gentianaceae). a comparison in three environments. *Evolution* 44, 1129-1139.
- Garwood, N. C. and Horvitz, C. C. (1985) Factors limiting fruit and seed production of a temperate shrub, *Staphylea trifolia* L. (Staphyleaceae). *American Journal of Botany* 72, 453-466.
- Hoehne, F. C. (1942) Orchidaceae. In *Flora Brasílica* (Hoehne, F. C., ed.), Vol. 12. Fasc. 1., São Paulo: Instituto de Botânica, pp. 1-254, tab. 1-153.
- Janzen, D. H., DeVries, P., Gladstone, D. E., Higgins, M. L. and Lewinsohn, T. M. (1980) Self- and cross-pollination of *Encyclia cordigera* (Orchidaceae) in Santa Rosa National Park, Costa Rica. *Biotropica* 12, 72-74.
- Johnson, S. D. (2000) Batesian mimicry in the non-rewarding orchid *Disa pulchra*, and its consequences for pollinator behavior. *Biological Journal of the Linnean Society* 71, 119-132.
- Johnson, S. D. and Bond, W. J. (1997) Evidence for widespread pollen limitation of fruiting success in Cape wildflowers. *Oecologia* 109, 530-534.
- Johnson, S. D. and Nilsson L. A. (1999) Pollen carryover, geitonogamy, and the evolution of deceptive pollination systems in orchids. *Ecology* 80, 2607-2619.
- Kindlmann, P. and Balounová, Z. (2001) Irregular flowering patterns in terrestrial orchids: theories vs empirical data. *Web Ecology* 2, 75-82.

- Lee, T. D. and Bazzaz, F. A. (1982) Regulation of fruit and seed production in an annual legume, *Cassia fasciculata*. *Ecology* 63, 1363-1373.
- Lloyd, D. G. (1980) Sexual strategies in plants. I. A hypothesis of serial adjustment of maternal investment during one reproductive session. *New Phytologist* 86, 81-92.
- Lock, J. M. and Profita, J. C. (1975) Pollination of *Eulophia cristata* (Sw.) Steud. (Orchidaceae) in Southern Ghana. *Acta Botanica Neerlandica* 24, 135-138.
- Mickeliunas, L., Pansarin, E. R. and Sazima, M. (2006) Biologia floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucesso reprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). *Revista Brasileira de Botânica* 29, 251-258.
- Montalvo, A. M. and Ackerman, J. D. (1987) Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Biotropica* 19, 24-31.
- Neiland, M. R. M. and Wilcock, C. C. (1998) Fruit set, nectar reward and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 85, 1657-1671.
- Nieremberg, L. (1972) The mechanism for the maintenance of species integrity in sympatrically occurring equitant oncidiums in the Caribbean. *American Orchid Society Bulletin* 41, 873-882.
- Nilsson, L. A. (1992) Orchid pollination biology. *TREE* 7, 255-259.
- Pijl, L. van der and Dodson, C. H. (1966) Orchid flowers: their pollination and evolution. Coral Gables, Florida: University of Miami.
- Pintaúdi, C. A., Stort, M. N. S. and Marin-Morales, M. A. (1990) Polinizações naturais e artificiais de *Xylobium squalens* Lindl. (Orchidaceae). *Naturalia, São Paulo* 15, 67-80.
- Roubik, D. W. (1992) Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge University Press, Cambridge.
- Salguero-Farías, J. A. and Ackerman, J. D. (1999) A nectar reward: is more better? *Biotropica* 31, 303-311.
- Schemske, D. W. (1980) Evolution of floral display in the orchid *Brassavola nodosa*. *Evolution* 34, 489-493.
- Schindwein, C. (1995) Wildbienen und ihre Trachtpflanzen in einer sudbrasilianischen Buschlandschaft: Fallstudie Guaritas, Bestäubung bei Kakteen und Loasaceen. Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.

- Singer, R. B. and Cocucci, A. A. (1999) Pollination mechanisms in four sympatric southern Brazilian Epidendroideae orchids. *Lindleyana* 14, 47-56.
- Smithson, A. (2002) The consequences of rewardlessness in orchids: reward-supplementation experiments with *Anacamptis morio* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 89, 1579-1587.
- Stephenson, A. G. (1981) Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 12, 253-279.
- Stort, M. N. S. and Martins, P. S. (1980) Autopolinização e polinização cruzada em algumas espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). *Ciência e Cultura* 32, 1080-1084.
- Stort, M. N. S. and Galdino, G. L. (1984) Self- and cross-pollination in some species of the genus *Laelia* Lindl. (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Genética* 7, 671-676.
- Tremblay, R. L., Ackerman, J. D., Zimmerman, J. K. and Calvo, R. N. (2005) Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 1-54.
- Vogel, S. (1974) Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Akademie der Wissenschaften und der Literatur Tropische und subtropische Pflanzenwelt* 7, 1-267.
- Williams, N. H. (1982) The biology of orchids and euglossine bees. In *Orchid biology and perspectives* (Arditti, J., ed.), Ithaca: Cornell University Press.
- Willson, M. F. and Rathcke, B. J. (1974) Adaptive design of the floral display in *Asclepias syriaca* L. *American Midland Naturalist* 92, 47-57.
- Zimmerman, J. K. and Aide, T. M. (1989) Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. *American Journal of Botany* 76, 67-73.

Tabela 1 Bee species and their respective number of visits on flowers of *Cyrtopodium polyphyllum* recorded at Picinguaba and Praia da Fortaleza (Ubatuba – SP).

Bee species	Visitation number
<i>Centris (Paremisia) similis</i> Fabricius, 1804	8
<i>Centris (Melanocentris)</i> sp.	4
<i>Centris (Centris)</i> sp.	3
<i>Centris (Ptilotopus)</i> cf. <i>scopipes</i>	9
<i>Centris (Hemisiella)</i> cf. <i>laripes</i>	5
<i>Epicharis (Epicharis) flava</i> Friese, 1900	12
<i>Augochloropsis</i> sp.	4
<i>Oxaea (Oxaea) flavescens</i> Klug, 1807	4
<i>Xylocopa (Neoxylocopa)</i> sp.	2
<i>Xylocopa</i> sp.	3
<i>Centris</i> sp. 1	7
<i>Centris</i> sp. 2	5

Tabela 2 Percentage of fruit set, of viable seeds and of polyembryony of *Cyrtopodium polyphyllum* among treatments and under natural conditions in Picinguaba and at Praia da Fortaleza, Ubatuba – SP. Figures in brackets indicate the number of fruits/flowers, viable seeds/seeds and seeds with two embryo/seeds.

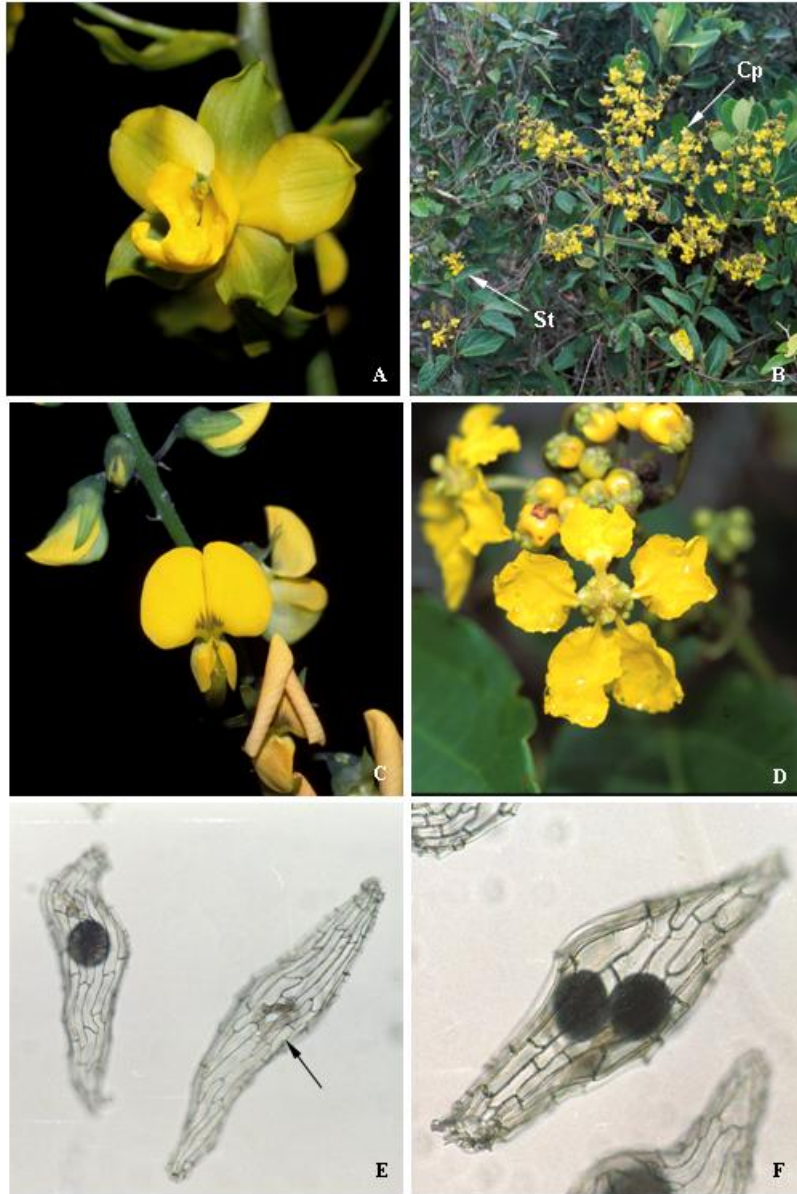
Treatments	Fruit set	Seeds	Polyembryony
Self-pollination	16.66% (5/30) ^a	91.8% (918/1000) ^a	3.1% (31/1000) ^a
	63.33% (19/30) ^b	96.65% (3673/3800) ^b	1.37% (52/3800) ^b
Cross-pollination	63.33% (19/30) ^a	94.6% (3595/3800) ^a	4.66% (177/3800) ^a
	76.6% (23/30) ^b	96.6% (4444/4600) ^b	2.4% (110/4600) ^b
Emasculation	0 (0/30) ^{a, b}	-	-
Control (untouched flowers)	2.3% (2/87) ^a	93.25% (373/400) ^a	2.25% (9/400) ^a
	2.2% (30/1359) ^b	92.1% (5526/6000) ^b	3.96% (238/6000) ^b
Natural conditions	1.34% (32/2380) ^a	94.2% (5653/6000) ^a	3.8% (229/6000) ^a
	2.42% (49/2028) ^b	93.2% (5592/6000) ^b	4.1% (246/6000) ^b

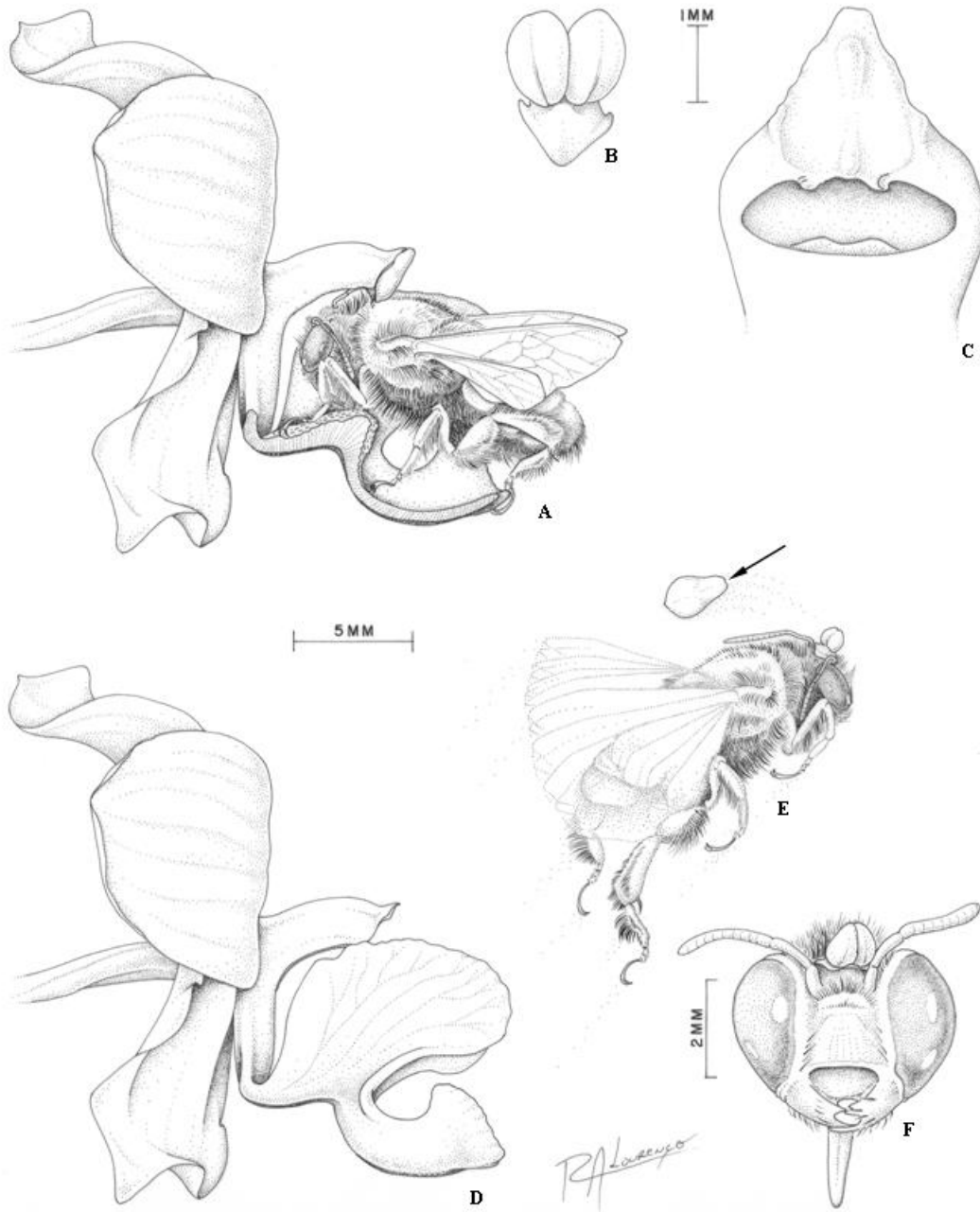
^a Picinguaba

^b Praia da Fortaleza

Fig. 1 (A) Flower of *Cyrtopodium polyphyllum*, a rewardless orchid. (B) *Cyrtopodium polyphyllum* co-occurring with *Stigmaphyllon* sp. (C) Flower of *Crotalaria incana* that offers nectar as a reward. (D) Flower of *Stigmaphyllon* sp. that offers floral oil as a reward. (E) Seed of *Cyrtopodium polyphyllum* with a well-developed embryo and seed with a rudimentary embryo (arrow). (F) Seed of *C. polyphyllum* with two embryos.

Fig. 2 Floral features and pollination mechanism in *Cyrtopodium polyphyllum*. (A) Longitudinal section of a flower of *C. polyphyllum* with *Centris* sp. 1 landed on the central callous of the lip. Note that the bee size matches well flower morphology and size (B) Detached pollinarium. (C) Detail of the column showing anther and stigmatic cavity. (D) Flower in lateral view. Compared with (A), there are almost no position changes of the labellum during visits. (E) *Centris* sp. with a pollinarium on its head. Note the removed anther cap (arrow). (F) Detail in front view of the head of *Centris* sp. with an attached pollinarium.





CAPÍTULO 2

(Formatado de acordo com as normas da Biological Journal of the Linnean Society)

Facultative autogamy in *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae) through a rain-assisted pollination mechanism

LUDMILA MICKELIUNAS^{1*}, EMERSON R. PANSARIN² and MARLIES SAZIMA¹

¹*Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil*

²*Universidade Estadual Paulista, FCAV, Departamento de Biologia Aplicada, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil*

Running title: Facultative autogamy in *Cyrtopodium polyphyllum*

*Corresponding author:

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

E-mail for correspondence: colax@pop.com.br

Cyrtopodium includes about 42 species, among which is *C. polyphyllum* that occurs on rocks and sandy soils of the Brazilian coast. Their non-rewarding flowers attract Centridini bees by deceit. In addition, flowers are automatically self-pollinated by rain, a phenomenon not yet documented in South American orchids. Besides, self-pollination has never been reported in Cyrtopodiinae and data for South American orchids are scarce. Populations of *C. polyphyllum* were studied in a Southeastern Brazil rainforest. Flowers were observed at different times of the day, in either sunny or rainy days, when the floral morphology, the visitors and the effects of rainfall on flowers were recorded. In rainy days, water accumulates on the stigma and dissolves the adhesive substance of the stigmatic surface. A viscous drop thus forms, which contacts the pollinarium. When evaporation makes it shrink, the drop moves the pollinarium with the anther onto the stigmatic surface and promotes automatic self-pollination. The fruit set in natural habitat was low, with 2.4% at Praia da Fortaleza. A similar value (2.2%) was recorded in self-pollinated flowers by rain. Plants collected in study sites and maintained in the greenhouse developed no fruit at all. In *C. polyphyllum*, facultative self-pollination assisted by rain is an important strategy that guarantees fruit set in the scarcity of pollinators, which is common in species pollinated by deceit.

ADDITIONAL KEYWORDS: Cyrtopodiinae – floral biology – rain-pollination – self-pollination.

INTRODUCTION

Orchid flowers are pollinated mostly by biotic vectors (van der Pijl & Dodson, 1966). Pollination through abiotic factors occurs more rarely in Orchidaceae and has been reported mainly for automatically self-pollinated species (van der Pijl & Dodson, 1966; Catling & Catling, 1991). Autogamy has been documented for many different genera of Orchidaceae via a variety of mechanisms (van der Pijl & Dodson, 1966; Catling & Catling, 1991). According to van der Pijl & Dodson (1966), about 200 orchid species are autogamous. In both self-compatible *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. and *Liparis loeselii* (L.) Rich., autogamy through automatic self-pollination is caused by a physical disturbance of the anther through the action of raindrops (González-Díaz & Ackerman, 1988; Catling, 1980), although the mechanisms differ for each species. Catling (1980) suggested that, although rainfall may be important since it improves the chances of autogamy in cloud forest orchids, this phenomenon has never been documented in South American rain forests species. Furthermore, although autogamy is well known for North-American orchids (Catling & Catling, 1991), conclusive data for South-American species have only been presented for *Polystachya estrellensis* Rchb. f. in Southeastern Brazil (Pansarin & Amaral, 2006).

The Neotropical genus *Cyrtopodium* (Epidendroideae: Cymbidieae: Cyrtopodiinae) comprises about 42 species distributed from southern Florida to northern Argentina (Batista & Bianchetti, 2004). The center of diversity of the genus is the Brazilian “cerrado” (Batista & Bianchetti, 2004). Nevertheless, some species, such as *Cyrtopodium polyphyllum* (Vell.) Pabst ex F. Barros (i.e., *Cyrtopodium paranaense* Schltr.), occur in sandy soils or on rocks along the Brazilian coast, mainly from South to Southeastern Brazil (Hoehne, 1942). As all other *Cyrtopodium* species (Chase & Hills, 1992), *C. polyphyllum* offers no reward to its pollinators, and attracts Centridini bees by deceit (Mickeliunas *et al.*, unpubl. data).

This paper aims to report the first case of rain-assisted pollination in Cyrtopodiinae and the pioneer evolving a South American species occurring in the Atlantic rain forests. For this reason, field and cultivated plants of *Cyrtopodium polyphyllum* were manipulated to test the occurrence of rain-assisted autogamy and to investigate the mechanism involved in automatic self-pollination. The influence of rain-assisted self-pollination in

the increase of natural fruit set and, consequently, in the reproductive success of this Brazilian species is discussed.

MATERIAL AND METHODS

Populations of *Cyrtopodium polyphyllum* were studied at two different sites in Ubatuba (approx. 23° 22'S, 44° 50'W; 0-50 m a.s.l.), State of São Paulo, south-eastern Brazil. Observations were made in the Natural Reserve of Picinguaba, and at the Praia da Fortaleza. Both study areas are mainly composed by Atlantic rain forest. Climate is tropical-humid ('Af. '; see Köppen, 1948), with a maximum annual rainfall of 2600 mm, an average annual temperature of 21 °C and no well-defined dry-cold season, even during the so-called dry months (from May to September); the wet season occurs from October to March (Data source: Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, Brazil). Both studied populations occur in "restinga" vegetation, and grow on rocks or on sandy soils.

Data about pollination were obtained at both study sites during the 2005 flowering period, from 15 to 21 Nov., 28 Nov. to 1 Dec., 8 to 9 Dec. and 12 to 14 Dec. Flowers were observed at different times of the day, from 0800 h to 1400 h, totaling 90 h, in either sunny or rainy days.

Floral morphology and the effects of rainfall on flowers were recorded through field notes and photographs on 30 inflorescences (30 plants; 1359 flowers) at Praia da Fortaleza and one inflorescence (87 flowers) in Picinguaba. At the end of each day of observation, the inflorescences were bagged to exclude potential pollinators. Details of flower and column morphology were observed under binocular stereomicroscope. Plant voucher: Ubatuba, XI.2005, L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 48, is deposited at the Herbarium of the Universidade Estadual de Campinas (UEC).

Treatments to investigate the breeding system of *Cyrtopodium polyphyllum* were performed in the natural habitat. The experimental treatments included manual self- and cross-pollinations, and emasculations. Thirty flowers (three inflorescences), per treatment were used at each study site. In addition, six plants for experimental manipulations were collected at both study sites and cultivated in a greenhouse in Jundiaí (about 23°11'S, 46°52'W, 800 m a.s.l.), in the State of São Paulo, where annual rainfall is about 1500 mm, and annual mean temperature is ca. 17.5 °C (Pinto, 1992). Three of these plants, which produced one inflorescence each (n = 243 flowers), were sheltered from rain and

used as control. The three other plants with an inflorescence each ($n = 204$ flowers) were sprayed daily, once a day, in the morning hours during five minutes, simulating rainfall. These experiments and observations were made during the flower's lifetime (about 21 days). Data on flower production, occurrence of self-pollination through rain and otherwise natural fruit set were recorded for all the studied plants (either in the field or in the greenhouse). Treatments were randomly applied to each inflorescence, with flowers of different ages.

Natural fruit set (open pollination) of *Cyrtopodium polyphyllum* was recorded for both study sites. At Praia da Fortaleza, 30 plants (30 inflorescences; 2028 flowers) were sampled in August 2005 while, in Picinguaba, 30 plants (30 inflorescences; 2380 flowers) were sampled in July 2006. Fruit set was recorded when fruits were dehiscent. The number of flowers/fruits sampled varied and depended on the total production of each year.

RESULTS

Cyrtopodium polyphyllum occurs on rocks at the Praia da Fortaleza and on sandy soil in Picinguaba. In October, each plant develops a new pseudobulb and, sometimes, simultaneously, a lateral, paniculate and erect inflorescence which produces up to about 130 resupinate flowers. The main flowering period occurs in November. The flowers are yellow-greenish and present a central callous on the lips, similar to an elaiophore. The arched column presents a concave and transversally disposed oval stigma (**Figs. 1A-B**). The pollinarium is separated from the stigmatic surface by a thick rostellum. In rainy days, water accumulates in the stigma cavity and dissolves the adhesive substance of the stigmatic surface. A viscous drop thus forms, which contacts the pollinarium (**Figs. 1C-D**). When evaporation makes it shrink, this drop moves the swollen pollinarium with the anther onto the stigmatic surface, promoting automatic self-pollination (**Figs. 1E-F**). From the beginning of rainfall, which may last weeks, to drop (a very viscous one) evaporation it takes 7 to 9 days. This self-pollination process occurred in 89 (6.5%) of the 1359 flowers at Praia da Fortaleza. No automatic self-pollination occurred in the 447 flowers in the greenhouse, in either control or water-sprayed inflorescences, and no fruits at all developed. Apart from the watering, no rainy days occurred and air humidity is quite low at this site.

Although no potential pollinators of *C. polyphyllum* were recorded in activity in rainy and cloudy days, in sunny days, flowers were pollinated by small species of the genus *Centris* (Apidae: Anthophoridae), whose visits were scarce since they were attracted to the non-rewarding flowers by deceit (Mickeliunas *et al.*, unpubl. data). *Cyrtopodium polyphyllum* is self-compatible and presents high fruit set in both self- or cross-pollinated flowers. Fruit set in self-pollinated flowers was 16.66% and 63.33% and in cross-pollinated flowers it was 63.33% and 76.6% in Picinguaba and Praia da Fortaleza, respectively. No fruits developed after emasculations. Fruit set through self-pollination by rain was 2.25% and 2.2% in Picinguaba and at Praia da Fortaleza, respectively. Under natural conditions (open pollination, through rain and/or bees) the fruit set was low, with 1.34% and 2.42%, at Picinguaba and at Praia da Fortaleza, respectively. If we take for example the fruit set under natural conditions (2.42%) at Praia da Fortaleza and assume that from these 2.2% was self-pollinated by rain, only 0.2% was induced by biotic vectors, which mainly perform cross-pollinations.

DISCUSSION

Autogamy can occur in different ways among Orchidaceae (see van der Pijl & Dodson, 1966; Catling, 1990; Catling & Catling, 1991, for reviews). An uncommon mechanism of automatic self-pollination, as the one reported here for *Cyrtopodium polyphyllum*, had already been reported for *Oeceoclades maculata* (González-Díaz & Ackerman, 1988) and *Liparis loeselii* (Catling, 1980), is the occurrence of autogamy assisted by rainfall. In *O. maculata* self-pollination through raindrops occurs after anther disturbance followed by its dehiscence. The stipe then dries and bends down so that pollinia hang near the stigma (González-Díaz & Ackerman, 1988), and in *L. loeselii* the pollinaria fall out and remain suspended from the edge of the rostellum, until a raindrop hits the raised and hinged anther causing it in turn to hit the suspended pollen masses pushing and rotating around the ridge of the rostellum onto the stigmatic surface (Catling, 1980). In *L. loeselii*, simulated rain increases fruit set in cultivated plants by a factor of four (Catling, 1980). In *C. polyphyllum*, however, rain increases fruit set by a factor of 12 when compared to fruit set by biotic vectors. Furthermore, plants kept as control in the greenhouse produced no fruits, indicating that self-pollination by rain in *C. polyphyllum*

occur only under high incidence of precipitation, which is common in Ubatuba during the summer.

Liparis loeselii and *Oeceoclades maculata* are naturally autogamous and rainfall increases the incidence of automatic self-pollination (Catling, 1980; González-Díaz & Ackerman, 1988). *Cyrtopodium polyphyllum*, however, is pollinated by Centridini bees (Mickeliunas *et al.*, unpubl. data), in a similar way to what happens with the Cyrtopodiinae *Grobya amherstiae* Lindl. (Mickeliunas *et al.*, 2006), and species of Ornithocephalinae (Vogel, 1974) and Oncidiinae (Vogel, 1974; Schlindwein, 1995; Singer & Cocucci, 1999), which have elaiophores and are pollinated by oil-collecting bees of the genus *Tetrapedia* and *Paratetrapedia* (Apidae: Anthophoridae). Although studies about reproductive biology of species of Cyrtopodiinae are scarce, as presented here for *C. polyphyllum*, *Grobya amherstiae* is also self-compatible, however, in this species a biotic pollinator is necessary for pollen transference (Mickeliunas *et al.*, 2006). Still, in plants of *C. polyphyllum* occurring at Praia da Fortaleza and Picinguaba the presence of prolonged periods of rainfall promotes facultative self-pollination of 2.2% and 2.25% of flowers, respectively, being an important strategy in the periods when pollinators are scarce or absent (Mickeliunas *et al.*, unpubl. data). Scarcity of bee visits, as is the case with *C. polyphyllum*, may be a rule in non-rewarding flowers pollinated by deceit (Ackerman, 1986, 1989; Montalvo & Ackerman, 1987; Zimmerman & Aide, 1989). Besides, climatic factors such as cloud cover and precipitation, wind speed, air temperature, solar radiation and humidity exert strong influences on bee activity (including Centridini bees in Neotropical regions) and, consequently, on their foraging behavior and visitation to flowers (see Roubik, 1992 for a review). Since precipitation is a frequent phenomenon in the region of Ubatuba, and rain may persist for one week or more during the wet season, the occurrence of facultative self-pollination through raindrops presented by *C. polyphyllum* can be an important strategy promoting fruit set in the absence of biotic pollinators. Furthermore, autonomous self-pollination [i.e., autogamy that does not require pollen transfer by insects or other animal vectors (Lloyd & Schoen, 1992)], may be an extreme adaptation to provide reproductive assurance in pollinator-poor habitats. Self-compatibility and autogamy are hypothesized to be particularly advantageous when population sizes are small and the probability of pollen

transfer between plants is low (Baker, 1955; Stebbins, 1957; Cox, 1989; Holsinger, 1996; Moeller & Geber, 2005).

Although the process of autogamy assisted by rainfall of *Cyrtopodium polyphyllum* occurs in a similar mechanism described for *Liparis loeselii* (Catling, 1980) and *Oeceoclades maculata* (González-Díaz & Ackerman, 1988), in the former species self-pollination is facultative, occurring only in wet days, when biotic pollinators (i.e., Centridini bees) are absent in the ambient (Roubik, 1992; Mickeliunas *et al.*, unpubl. data). *Liparis loeselii* and *O. maculata*, however, are naturally autogamous species and rainfall increases the incidence of automatic self-pollination. As pointed out by Catling (1980), it is worth paying more attention to the significance of rain as an auxiliary agent of autogamy, especially in forests with high rainfall and richness of orchid species as has been reported for the study sites (Ribeiro, 1994).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Núcleo Picinguaba, Instituto Florestal, for granting permissions for the field work, Leonardo Galetto for their suggestions and Alain François for improving our English. This study is part of the Master's Degree dissertation of ML at the Departamento de Botânica, Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil. This research was supported by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP) as part of the Thematic Project Functional Gradient (Process Number 03/12595-7), within the BIOTA/FAPESP Program - The Biodiversity Virtual Institute (<http://www.biota.org.br>), as well as by FAPESP (grant 04/12531-1) and CNPq.

REFERENCES

- Ackerman JD. 1986.** Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* **1**: 108-113.
- Ackerman JD. 1989.** Limitations to sexual reproduction in *Encyclia krugii* (Orchidaceae). *Systematic Botany* **14**: 101-109.
- Baker HG. 1955.** Self-compatibility and establishment after "long-distance" dispersal. *Evolution* **9**: 347-349.

- Batista JAN, Bianchetti LB. 2004.** Three new taxa in *Cyrtopodium* (Orchidaceae) from central and southeastern Brazil. *Brittonia* **56**: 260–274.
- Catling PM. 1980.** Rain-assisted autogamy in *Liparis loeselii* (L.) L.C. Rich. (Orchidaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **107**: 525-529.
- Catling PM, Catling VR. 1991.** A synopsis of breeding systems and pollination in North American orchids. *Lindleyana* **6**: 187-210.
- Chase MW, Hills HG. 1992.** Orchid phylogeny, flower sexuality, and fragrance-seeking - Evidence from variation in chloroplast DNA among subtribes *Catasetinae* and *Cyrtopodiinae*. *BioScience* **42**: 43-49.
- Cox PA. 1989.** Baker's law, plant breeding systems and island colonization. In: J. H. Bock and Y. B. Linhart (eds.). *The evolutionary ecology of plants*. Westview Press, Boulder, Colorado, p. 209-224.
- González-Díaz N, Ackerman JD. 1988.** Pollination, fruit set, and seed production in the orchid, *Oeceoclades maculata*. *Lindleyana* **3**: 150-155.
- Hoehne FC. 1942.** Orchidaceae. In: Hoehne FC, ed. *Flora Brasílica*. Vol. 12. Fasc. 1, p. 1 – 254, tab. 1-153. São Paulo: Instituto de Botânica.
- Holsinger KE. 1986.** Dispersal and plant mating systems: the evolution of self-fertilization in subdivided populations. *Evolution* **40**: 405-413.
- Köppen W. 1948.** Climatologia: com um estudo de los climas de la tierra. México: Fondo de Cultura Económica.
- Lloyd DG, Schoen DJ. 1992.** Self- and cross-fertilization in plants I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences* **153**: 358–369
- Mickeliunas L, Pansarin ER, Sazima M. 2006.** Biologia floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucesso reprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). *Revista Brasileira de Botânica* **29**: 251-258.
- Montalvo AM, Ackerman JD. 1987.** Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Biotropica* **19**: 24-31.
- Moeller DA, Geber MA. 2005.** Ecological context of the evolution of self-pollination in *Clarkia xantiana*: population size, plant communities, and reproductive assurance. *Evolution* **59**: 786-799.
- Nimer E. 1997.** Climatologia da região sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Geografia* **34**: 3-48.

- Pansarin ER, Amaral MCE. 2006.** Biologia reprodutiva e polinização de duas espécies de *Polystachya* no sudeste do Brasil: evidência de pseudocleistogamia em Polystachyeae. *Revista Brasileira de Botânica* **26**:
- Pinto HS. 1992.** O clima da Serra do Japi. In *História natural da Serra do Japi* (Morellato, L. P. C., ed.), Campinas: Editora da Unicamp/Fapesp, pp. 30 - 38.
- Ribeiro JELS. 1994.** Distribuição de espécies de Orchidaceae na planície litorânea (restinga) da Praia da Fazenda, município de Ubatuba (SP). *Arquivos de. Biologia e Tecnologia* **37**: 515-526.
- Roubik DW. 1992.** *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Schlindwein C. 1995.** Wildbienen und ihre Trachtpflanzen in einer sudbrasilianischen Buschlandschaft: Fallstudie Guaritas, Bestäubung bei Kakteen und Loasaceen. Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.
- Simpson BB, Neff JL. 1981.** Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **68**: 301-322.
- Singer RB, Cocucci AA. 1999.** Pollination mechanisms in four sympatric southern Brazilian Epidendroideae orchids. *Lindleyana* **14**: 47-56.
- Stebbins GL. 1957.** Self-fertilization and population variability in the higher plants. *The American Naturalist* **91**: 337-354.
- van der Pijl L, Dodson CH. 1966.** *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Miami: University of Miami Press.
- Vogel S. 1974.** Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Akademie der Wissenschaften und der Literatur Tropische und subtropische Pflanzenwelt* **7**: 1-267.
- Zimmerman JK, Aide TM. 1989.** Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. *American Journal of Botany* **76**: 67-73.

Figure 1. Flowers of *Cyrtopodium polyphyllum* in frontal and lateral views. A, Flower showing the concave and oval stigmatic surface. B, The pollinarium is prevented to contact the stigma by the rostellum. No raindrops are retained in the stigmatic cavity of these flowers. C-D, Flowers with a great, viscous drop on their stigma. Note the swollen pollinarium. E-F, Flowers whose pollinarium and anther were disturbed. The drop shrank through evaporation and the pollinarium and anther were moved onto the stigma. Remains of the drop stay in the stigmatic cavity (arrows).



Figure 1

CAPÍTULO 3

(Formatado de acordo com as normas da Hoehnea)

Estruturas secretoras do labelo de duas Cyrtopodiinae: *Cyrtopodium polyphyllum* Vell. e *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae)

Ludmila Mickeliunas^{1*}, Marília de Moraes Castro¹ e Marlies Sazima¹

¹*Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Botânica, Caixa Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brasil*

* Autor para correspondência: colax@pop.com.br

Título resumido: Glândulas do labelo de *Cyrtopodium polyphyllum* e *Grobya amherstiae*.

Abstract (Secretory structures of the lip of two Cyrtopodiinae: *Cyrtopodium polyphyllum* Vell. and *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae)). An anatomical study of the glands of the lip of *Cyrtopodium polyphyllum* and *Grobya amherstiae* were performed in the intention to relate the function played by these structures in the pollination process. Both species present osmophores. *Cyrtopodium polyphyllum* has two types of secretory structures (osmophores): papillous epidermis and pluricellular emergencies. In *G. amherstiae* the osmophores are composed of a unique layer of epidermic cells. Just *G. amherstiae* presents elaiophores that are of two types: one at the apex of the lip, which presents a mixed structure, composed of unicellular and epidermic cells, and another at the column basis composed of glandular trichomes. These elaiophores secrete a heterogeneous substance, composed of both oil (greasy acid of short chain) and mucilage. Beside osmophores and elaiophores, *G. amherstiae* presents an oil guide in the adaxial surface of the lip, formed by papillae-like cells, which probably guide the bees to the elaiophore of the column basis. The presence of this oil guide is essential to complete the pollination mechanism.

Key words: floral glands, elaiophore, oil guide, osmophore

Resumo (Estruturas secretoras do labelo de duas Cyrtopodiinae: *Cyrtopodium polyphyllum* Vell. e *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae)). Um estudo anatômico das glândulas florais presentes no labelo de *Cyrtopodium polyphyllum* e *Grobya amherstiae* foi efetuado com o propósito de relacionar a função desempenhada por estas estruturas com o processo de polinização. Em *C. polyphyllum* há dois tipos de estruturas secretoras (osmóforos): epiderme papilosa e emergências pluricelulares. Em *G. amherstiae*, os osmóforos são compostos por uma única camada de células epidérmicas. Apenas *G. amherstiae* apresenta elaióforos, sendo o do ápice do labelo de estrutura mista, composto de tricomas unicelulares glandulares e epiderme em paliçada, e o da base da coluna é tricomáceo, composto apenas de tricomas glandulares. Esses elaióforos secretam uma substância heterogênea, composta de material lipofílico (ácidos graxos de cadeia curta) e mucilagem. Além de osmóforos e elaióforos, *G. amherstiae* apresenta um guia de óleo na superfície adaxial do labelo formado por células papilosas que orienta as abelhas ao elaióforo da base da coluna. A presença desse guia de óleo é essencial para completar o mecanismo de polinização.

Palavras-chave: glândulas florais, elaióforos, guia de óleo, osmóforos

Introdução

Nos últimos anos, o número de trabalhos sobre biologia floral e polinização de numerosas espécies de Angiospermas tem sido crescente, principalmente da família Orchidaceae (Van der Pijl & Dodson 1966, Dressler 1993, Endress 1994). Esses estudos mostram que a diversidade de polinizadores está, habitualmente, relacionada com a complexidade floral e aos diferentes tipos de recursos das flores. Dentre esses recursos, o néctar e o pólen têm sido os mais estudados (Simpson & Neff 1981, Buchmann 1987), sendo bem conhecidas sua importância na sobrevivência de abelhas e reprodução de muitas plantas (Kevan & Baker 1983). Entretanto, há outros tipos de recursos produzidos pelas plantas, como os “óleos florais”, que foram primeiramente documentados por Vogel (1969) em algumas famílias de plantas. Em Orchidaceae, a presença de óleos foi registrada nas subtribos Ornithocephaliinae e Oncidiinae (Vogel 1974). O termo “óleos florais” vem sendo usado para designar óleos não voláteis que são secretados por glândulas especiais denominadas de elaióforos (Vogel 1974, Simpson & Neff 1981). Vogel (1974) descreveu dois tipos de elaióforos: epidermais e tricomáceos.

Nos elaióforos epidermais, as células epidérmicas em paliçada são secretoras, sendo o tipo de elaióforo predominante nas angiospermas e encontrado em Malpighiaceae, Krameriaceae e algumas espécies de Orchidaceae. Por outro lado, o tipo de elaióforo tricomáceo consiste de tricomas glandulares, que podem ser unicelulares (Iridaceae e algumas Orchidaceae) ou multicelulares (Solanaceae, Cucurbitaceae, Scrophulariaceae, Primulaceae e Orchidaceae) (Buchmann 1987, Endress 1994).

Flores que possuem óleo como recurso são visitadas e polinizadas por espécies de abelhas altamente especializadas da família Apidae (Michener 2000). Os gêneros de abelhas que compreendem os maiores números de espécies coletoras de óleo são *Centris*, *Ptilotopus* e *Epicharis*, além de outros menos representativos, como *Monoeca* e *Tetrapedia*.

Em Orchidaceae, o oferecimento de óleos florais como recurso tem sido documentado apenas recentemente em espécies de *Oncidium*, polinizadas por espécies de *Tetrapedia* (Tetrapediini) (Schlindwein 1995, Singer & Cocucci 1999; A.D. Faria com. pess.) e de *Centris* (Centridini) (A.D. Faria com. pess.). Até então, espécies de *Oncidium*

eram consideradas como sendo mímicas de flores de Malpighiaceae e polinizadas por abelhas *Centris* que eram atraídas por engano às flores (Van der Pijl & Dodson 1966, Ackerman 1986). Em *Oncidium* a produção de óleos é feita em elaióforos epidérmis concentrados, principalmente, no labelo (Singer & Coccuci 1999, A.D. Faria com. pess.).

Algumas flores emitem odores, que podem ou não estar associados à atração de polinizadores. Esses odores são produzidos em estruturas chamadas osmóforos e são compostos, principalmente, por óleos voláteis (Vogel 1963 a, b). Os osmóforos são habitualmente formados por uma única camada de células epidérmicas, ou podem apresentar papilas secretoras (Curry *et al.* 1991, Ascensão *et al.* 2005).

A subtribo Cyrtopodiinae (Orchidaceae: Epidendroideae: Cymbidieae) abrange cerca de 12 gêneros, incluindo *Cyrtopodium* e *Grobya* (Dressler 1993). *Cyrtopodium* (Epidendreae: Cymbidieae: Cyrtopodiinae) é neotropical e inclui cerca de 42 espécies, distribuídas desde o sudeste da Flórida até o nordeste da Argentina (Batista & Bianchetti 2004). O centro de diversidade do gênero é o cerrado brasileiro, onde ocorrem cerca de 28 espécies (Hoehne 1942). *Cyrtopodium polyphyllum* é encontrado principalmente, na região litorânea do sul e sudeste brasileiro (Hoehne 1942). O labelo dessa espécie é trilobado e apresenta uma calosidade na região mediana muito semelhante aos elaióforos de algumas espécies de *Oncidium* (A.D. Faria com. pess.) e de *Grobya amherstiae*. Apesar de ser semelhante a um elaióforo, essa calosidade não produz óleo fixo (ácidos graxos) e é composta por osmóforos que secretam odor suave, levemente desagradável e semelhante ao odor de “baratas”, percebido com maior intensidade nos horários mais quentes do dia.

Grobya apresenta cinco espécies distribuídas entre as regiões sul, sudeste e nordeste do Brasil (Barros & Lourenço 2004). *Grobya amherstiae* Lindl. possui a distribuição mais ampla dentre as cinco espécies (Barros & Lourenço 2004), ocorrendo em regiões de mata semidecídua e Atlântica da maior parte do leste do Brasil (Morrison 1997). O labelo dessa espécie é cordiforme e apresenta na sua região apical um elaióforo predominantemente tricomáceo. Há outro elaióforo tricomáceo na base da coluna. Os osmóforos dessa espécie emitem odor adocicado que se assemelha ao do mel, principalmente nas horas mais quentes do dia (Mickeliunas *et. al.* 2006).

Para a subtribo Cyrtopodiinae, não há estudos sobre anatomia floral das espécies, principalmente em relação aos gêneros brasileiros, como *Cyrtopodium* e *Grobya*. Não há

dados sobre as estruturas secretoras dessas orquídeas e nem sobre sua importância e relação com a polinização. O presente trabalho tem por objetivo o estudo comparado das estruturas secretoras do labelo de duas espécies de Cyrtopodiinae (*Cyrtopodium polyphyllum* e *Grobya amherstiae*), relacionando a sua função com o processo de polinização.

Material e Métodos

Os estudos anatômicos foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica da Unicamp, sob orientação da Profa. Dra. Marília de Moraes Castro. Flores em antese de *Grobya amherstiae* foram coletadas em março/2005 (Figura 1A) e de *Cyrtopodium polyphyllum* em dezembro/2005 (Figura 2A).

Os materiais testemunha de *Grobya amherstiae* Lindl. e *Cyrtopodium polyphyllum* Vell. (*L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 47* e *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 48*, respectivamente) foram depositados no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC).

As flores das duas espécies foram fixadas em FAA (Johansen 1940) e em Formalina neutra tamponada (Clark 1973). Para o controle de substâncias lipofílicas, flores de ambas as espécies foram previamente estocadas em uma mistura de metanol/clorofórmio/água/ácido clorídrico (66:33:4:1) por 48h, antes de sua fixação em formalina neutra tamponada.

Os labelos foram isolados e desidratados em série butílica (álcool butílico terciário). Os materiais fixados em FAA foram incluídos em parafina (Sass 1951) e os materiais fixados em formalina neutra tamponada em paraplast (Johansen 1940). Os materiais de ambos os fixadores foram emblocados e seccionados longitudinalmente em micrótomo rotativo, com espessura de 10-12 µm. Posteriormente, os cortes foram desparafinados com xilol e hidratados com álcool etílico. O material de *C. polyphyllum* e parte do material de *G. amherstiae* fixados em FAA foram corados com azul de astra e safranina (Gerlach 1969) e montados em resina sintética. A outra parte do material de *G. amherstiae* fixada em FAA foi utilizada para a aplicação dos testes histoquímicos para a detecção de mucilagem - Vermelho de rutênio (Gregory & Baas 1989) e Ácido tânico/Cloreto férrico (Pizzolato & Lillie 1973) - e montada em gelatina glicerínada. Os materiais fixados em FNT de ambas as espécies foram utilizados para a aplicação de

testes histoquímicos para a detecção de material lipofílico – Preto de Sudão B (Pearse 1968) e Azul de Nilo (Cain 1947) - e montados em gelatina glicerizada. As fotomicrografias foram obtidas a partir de máquina fotográfica acoplada ao microscópio Olympus BX 51, a partir de filmes para slides asa 100.

Resultados

Cyrtopodium polyphyllum apresenta dois tipos de estruturas secretoras (osmóforos) na face adaxial do labelo: epiderme papilosa (Figura 1B) e emergências pluricelulares (Figura 1C-1F).

As células dos osmóforos papilares possuem ápice acuminado e núcleo bem desenvolvido, típico de células em alta atividade metabólica (Figura 1B). As papilas não apresentam o citoplasma fortemente corado, pois o material é proveniente de flores fixadas em FAA. O tecido subjacente é composto por células parenquimáticas, que não estão envolvidas na produção do odor.

As emergências pluricelulares (Figura 1C-1D) apresentam várias camadas de células secretoras, com núcleo bem desenvolvido e citoplasma denso (Figura 1D). No material fixado em formalina neutra tamponada, ideal para a fixação de material lipofílico, as substâncias mantiveram-se no interior da célula, evidenciando o citoplasma fortemente corado pela safranina. As camadas subjacentes são compostas por células parenquimáticas, que não participam da produção do odor. Há alguns idioblastos com cristais e ráfides de oxalato de cálcio espalhados ao longo do corpo do labelo, entre as células parenquimáticas (Figura 1D, setas).

Através do teste histoquímico utilizando o corante Preto de Sudão B (Pearse 1968), ficou confirmada a natureza lipídica da secreção das células papilares (região do calo), uma vez que as células apresentaram-se coradas de castanho-escuro, coloração que indica resultado positivo para o teste (Figura 1E-F).

Grobya amherstiae (Figuras 2A-B) também apresenta osmóforos, mas por toda a face abaxial do corpo do labelo. Esses osmóforos são epidermais, formados por uma única camada de células epidérmicas (Figura 2C, seta). Pelo teste histoquímico, utilizando Preto de Sudão B, constatou-se que, de fato, trata-se de secreção de natureza lipofílica, preservado pela formalina neutra tamponada, pois se apresentou corada de castanho escuro, resultado positivo para o teste (Figura 2D, seta).

No ápice do labelo (Figura 2B), há um elaióforo do tipo misto, formado tanto por tricomas, como por uma epiderme em paliçada (Figuras 2E-F), ambos secretores da mesma substância. Os tricomas glandulares são unicelulares e digitiformes (Figuras 2F, 3A, 3C). As células subepidérmicas apresentam o citoplasma denso, fortemente corado e com núcleo bem desenvolvido (Figuras 3A), características de células metabolicamente ativas, que provavelmente também estão envolvidas na produção do recurso floral. A epiderme em paliçada também apresenta citoplasma denso, fortemente corado e núcleo relativamente grande (Figura 3B). Em determinadas regiões, essa epiderme apresenta-se com leves projeções e reentrâncias, o que pode aumentar a superfície de produção da secreção (Figura 3B, seta). As células parenquimáticas subjacentes não possuem características de células secretoras, não estando envolvidas na produção da secreção. Ao longo de todo o corpo do labelo também há idioblastos com cristais de oxalato de cálcio, como em *C. polyphyllum*, entre as células parenquimáticas.

Na base da coluna de *G. amherstiae*, há outro elaióforo semelhante ao do ápice do labelo; porém, composto apenas por tricomas glandulares unicelulares, não havendo epiderme em paliçada secretora. A secreção dos elaiofóros dessa orquídea apresenta a porção lipofílica composta basicamente por ácidos graxos de cadeia curta, sendo o mais abundante o ácido graxo octadecanóico (Mickeliunas *et al.* in prep.)

Através dos testes histoquímicos para evidenciar mucilagem, verificou-se que, no material fixado em FAA (que preserva substâncias hidrofílicas), a secreção também contém polissacarídeos, resultado positivo para o teste com o Ácido tânico/Cloreto férrico (Figuras 3C), e rosa escuro, resultado positivo para o teste com o Vermelho de rutênio (Figura 3D). Assim, as glândulas de *G. amherstiae*, além de secretarem óleo fixo (ácidos graxos), também secretam pequena fração de mucilagem, tornando a secreção heterogênea.

Na superfície adaxial do labelo, essa espécie apresenta um guia de óleo formado por uma única camada de células papilosas, que produzem secreção semelhante à que ocorre nos elaióforos (Figura 3E, seta). A natureza lipofílica dessa secreção foi evidenciada através do teste histoquímico com Preto de Sudão B, que apresentou coloração castanha escura, indicando resultado positivo (Figura 3F, seta).

Discussão

As duas espécies de Cyrtopodiinae apresentam osmóforos em seus labelos. Essas estruturas são responsáveis pela produção da fragrância desagradável em *Cyrtopodium polyphyllum* e adocicada em *Grobya amherstiae*. A forma das papilas unicelulares no corpo do labelo em *C. polyphyllum* é muito semelhante às encontradas em algumas espécies de *Bulbophyllum* (Teixeira *et al.* 2004) e *Psilochilus modestus* Barb. Rodr. (Pansarin 2000). Por outro lado, as emergências pluricelulares da região do calo de *C. polyphyllum* assemelham-se às de algumas espécies de *Stanhopea* (Pansarin 2000). Por outro lado, o osmóforo epidérmico de *G. amherstiae* é semelhante ao de duas espécies de *Ophrys* (Ascensão *et al.* 2005) e ao de outras espécies de orquídeas (Curry & Stern 1991, Curry *et al.* 1991, Stpiczynska 1993).

A ocorrência de elaióforos do tipo misto em *Grobya amherstiae*, ou seja, formados tanto por tricomas unicelulares como por epiderme em paliçada é um dado inédito, uma vez que não há registros da ocorrência desse tipo de estrutura numa mesma flor. Segundo Vogel (1969), nas orquídeas ocorrem os dois tipos de elaióforos, tricomáceos ou epidérmicos, mas ambos não ocorrem na mesma estrutura da flor. Elaióforos com tricomas unicelulares ocorrem em outros gêneros de orquídeas como, por exemplo, em algumas espécies de *Oncidium* e em outras famílias de Angiospermas, como Iridaceae e Scrophulariaceae (Vogel 1974). Em outras espécies de *Oncidium*, a produção de óleos é feita em elaióforos epidérmicos concentrados, principalmente, em áreas do labelo (Singer & Coccuci, 1999; A. D. Faria, com. pess.).

No caso de *Grobya amherstiae*, não apenas ácidos graxos são produzidos nos elaióforos. Ficou evidenciado que tanto os tricomas como a epiderme em paliçada secretam mucilagem ácida, uma substância hidrofílica. Esse tipo de secreção heterogênea, envolvendo mucilagem e material lipofílico, foi primeiramente descrito por Joel & Fahn (1980) para frutos de *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae), mas não há relato para flores de Orchidaceae. Joel & Fahn (1980) propuseram que essa porção mucilagínosa seja secretada pela própria célula que secreta o óleo, contradizendo Juniper *et al.* (1977), que afirmaram que a mucilagem é apenas um produto de degradação das paredes celulares. Essa adição de pequena quantidade de mucilagem ao óleo fixo pode tornar a secreção um pouco mais fluida e facilitar sua coleta por parte das abelhas. Acredita-se que essas abelhas utilizem o óleo, altamente energético, para diferentes fins: algumas o utilizam em

substituição ou adição ao néctar em suas provisões de pólen oferecidas às larvas; outras, além do suprimento larval, também o usam para a impermeabilização de seus ninhos e, eventualmente, até para sua própria alimentação (Buchmann 1987, Frankie et al. 1990).

Em *G. amherstiae*, fêmeas de *Paratetrapedia fervida* Smith visitam as flores em busca do óleo oferecido pela flor (Mickeliunas *et. al.* 2006), que é utilizado para alimentação das larvas ou para revestimento dos ninhos (Buchmann 1987). Em *C. polyphyllum*, várias espécies de abelhas coletoras de óleo visitam a flor por engano, quando estão forrageando em busca de néctar em outras espécies nas proximidades como, *Crotalaria incana* L. (Leguminosae) ou de óleo em *Stigmaphyllon* sp. (Malpighiaceae) (Mickeliunas *et. al.* in prep. Cap. 1).

Além de osmóforos e elaióforos, *Grobya amherstiae* também possui um guia de óleo na face adaxial do labelo e que liga o elaióforo do ápice do labelo ao da base da coluna. Esse guia, composto por papilas unicelulares secretoras do mesmo material heterogêneo presente nos elaióforos, é de extrema importância para completar o processo de polinização. Uma vez que a abelha se encontra na flor o guia orienta-a até o elaióforo da base da coluna, sequência essencial para que a abelha se encontre na posição adequada e seja arremessada em direção à antera e remova o polinário ou deposite as polínias no estigma (Mickeliunas *et. al.* 2006).

Osmóforos, elaióforos e guais de néctar são estruturas secretoras de extrema importância e possuem alta relação com os processos de polinização de muitas plantas. Assim, estudos envolvendo a anatomia e a histoquímica dessas estruturas adiciona informações importantes para o entendimento da biologia das espécies, devendo ser ampliados a mais membros das Angiospermas, principalmente em relação às Orchidaceae, na qual esses estudos são muito escassos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Pós-Graduação da Universidade Estadual de Campinas, ao técnico do laboratório Sebastião Henrique Militão Jr., pelo auxílio na preparação dos cortes histológicos, e às agências de fomento (Fapesp e Cnpq) pelo financiamento do projeto. Este trabalho é parte da dissertação de mestrado da primeira autora e está vinculado ao Projeto Temático Gradiente Funcional (processo nº 03/12595-7), dentro do

Programa BIOTA/FAPESP – The Biodiversity Virtual Institute (<http://www.biota.org.br>), e foi financiado pela FAPESP (processo nº 04/12531-1) e CNPq.

Referências Bibliográficas

- Ackerman, J. D.** 1986. Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* 1: 108-113.
- Ascensão, L.; Francisco, A.; Cotrim, H. & Pais, M.S.** 2005. Comparative structure of the labellum in *Ophrys fusca* and *O. lutea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 92: 1059-1067.
- Barros, F. & Lourenço, R.A.** 2004. Synopsis of the Brazilian orchid genus *Grobya*, with the description of two new species. *Botanical Journal of the Linnean Society* 145: 119-127.
- Batista, J.A.N. & Bianchetti, L.B.** 2004. Three new taxa in *Cyrtopodium* (Orchidaceae) from central and southeastern Brazil. *Brittonia* 56: 260-274.
- Buchmann, S.L.** 1987. The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematic* 18: 343-369.
- Cain, A.J.** 1947. Use of Nile Blue in the examination of lipoids. *Quartely Journal of Microscopical Science*. In Gahan, P.B. 1984. *Plant histochemistry and cytochemistry*. Londod: Academic Press.
- Clark, G.** 1981. *Staining procedures* Baltimore. The Williams & Wilkins Co.
- Curry, K.J. & Stern, W.L.** 1991. Osmophore development in *Kegeliella houtteana* (Stanhopeinae-Orchidaceae). *Amererican Journal of Botany* 78 (Supplement): 22-23.
- Curry, K.J.; McDowell, L.M.; Judd, W.S. & Stern, W.L.** 1991. Osmophores, floral features, and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 78: 610-623.
- Dressler, R.L.** 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Endress, P.K.** 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 385-386.

- Frankie, G.W.; Vinson, S.B.; Newstrom, L.E.; Barthell, J.F.; Haber, W.A. & Frankie, J.K.** 1990. Plant phenology, pollination ecology, pollinator behavior and conservation of pollinators in neotropical dry forests. In: Reproductive ecology of tropical forest plants. Bawa, K.S. & Hadley, M. (eds.), pp. 37-47. Paris: The Parthenon Publishing Group.
- Gerlach, D.** 1969. Botanische Mikrotechnik: Eine Einführung. Stuttgart, Georg Thieme.
- Gregory, M. & Baas, P.** 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany 38: 125-174.
- Hoehne, F.C.** 1942. Flora Brasílica. Fasc. 5, vol. XII, VI: 8.
- Joel, D.M & Fahn, A.** 1980. Ultrastructure of the resin ducts of *Mangifera indica* L. (Anacardiaceae). 3. Secretion of the protein-polysaccharide mucilage in the fruit. Annals of Botany 46: 785-790.
- Johansen, D.A.** 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co., New York, p. 132.
- Juniper, B.E.; Gilchrist, A.J & Robins, R.J.** 1977. Some features of secretory cells in plants. Histochem. J. 9: 659-680.
- Kevan, P.G. & Baker, H.G.** 1983. Insects as flower visitors and pollinators. Annual Review of Entomology 28: 407-453.
- Michener, C.D.** 2000. The bees of the world. London: The Johns Hopkins University Press.
- Mickeliunas, L.; Pansarin, E.R. & Sazima, M.** 2006. Biologia floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucesso reprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). Revista Brasileira de Botânica 29: 251-258.
- Morrison, A.** 1997. *Cyrtopodium*. In The illustrated encyclopedia of orchids (A. Pridgeon, ed.). Timber Press, Oregon.
- Pansarin, E.R.** 2000. Biologia Reprodutiva e morfologia floral de espécies de Orchidaceae em diferentes ambientes no Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Pearse, A.G.E.** 1968. Histochemistry: theoretical and applied. 3rd ed., 2 v., London: Churchill Livingstone.
- Pizzolato, T.D. & Lillie, R.D.** 1973. Mayer's tannic acid – ferric chloride stain for mucins. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 21: 56-64.

- Sass, J.E.** 1951. Botanical microtechnique. 2nd ed., The Iowa State College Press.
- Schindwein, C.** 1995. Wildbienen und ihre Trachtpflanzen in einer sudbrasilianischen Buschlandschaft: Fallstudie Guaritas, Bestäubung bei Kakteen und Loasaceen. Verlag Ulrich E. Grauer, Stuttgart.
- Simpson, B.B. & Neff, J.L.** 1981. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68: 301-322.
- Singer, R.B. & Cocucci, A.A.** 1999. Pollination mechanisms in four sympatric southern Brazilian Epidendroideae orchids. *Lindleyana* 14: 47-56.
- Stpiczynska, M.** 1993. Anatomy and ultrastructure of osmophores of *Cymbidium tracyanum* Rolfe (Orchidaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 70: 91-96.
- Teixeira, S.P.; Borba, E.L. & Semir, J.** 2004. Lip anatomy and its implications for the pollination mechanisms of *Bulbophyllum* species (Orchidaceae). *Annals of Botany* 93: 499-505.
- Van der Pijl, L. & Dodson, C.H.** 1966. Orchid flowers: their pollination and evolution. Miami: University of Miami Press.
- Vogel, S.** 1963a. Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung: Über Bau und Funktion der Osmophoren. *Akad. Wiss. Lit. (Mainz), Abh. Math.-Naturwiss. Kl., Jahrgang* 1962: 599-763.
- Vogel, S.** 1963b. Das sexuelle Anlockungsprinzip der Catasetinen- und Stanhopeen-Blüten und die wahre Funktion ihres sogenannten Futtergewebes. *Osterreichische Botanische Zeitschrift* 100: 308-337.
- Vogel, S.** 1969. Flowers offering fatty oil instead of nectar. XI Int. Botanical Congress Abstract. 229p.
- Vogel, S.** 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Akademie der Wissenschaften und der Literatur Tropische und subtropische Pflanzenwelt* 7: 1-267.

Figura 1: A-F: *Cyrtopodium polyphyllum* Vell. **A.** Detalhe da flor. **B-F.** Cortes longitudinais das flores em antese. **B.** Osmóforos papilares unicelulares na face adaxial. **C** e **E.** Emergências pluricelulares. **D** e **F.** Detalhe da emergência da região do calo. Coloração: **B-D** = Azul de Astra e Safranina, **E-F:** Preto de Sudão B. (Setas = cristais e ráfides de oxalato de cálcio)

Figura 2: A-F: *Grobya amherstiae* Lindl. **A.** Detalhe da flor. **B.** Elaióforo no ápice do labelo **C-D.** Corte longitudinal do labelo, mostrando os osmóforos epidermais na face abaxial (seta). **E.** Ápice do labelo, mostrando o elaióforo misto, formado por tricomas (seta TR) e epiderme em paliçada (seta EP). **F.** Tricomas glandulares (seta TR) e epiderme em paliçada (seta EP). Coloração: **C, E** e **F** = Azul de Astra e Safranina, **D** = Preto de Sudão B.

Figura 3: A-F: *Grobya amherstiae* Lindl. **A.** Tricomas unicelulares digitiformes do elaióforo do ápice do labelo. **B.** Epiderme em paliçada, mostrando as projeções formadas (seta) no elaióforo. **C-D.** Elaióforo misto do ápice do labelo evidenciando a secreção heterogênea. **E-F.** Guia de óleo na face adaxial do labelo, formado por papilas unicelulares (seta). Coloração: **A, B** e **E** = Azul de Astra e Safranina, **C** = Ácido tânico/Cloreto férrico, **D** = Vermelho de rutênio, **F** = Preto de Sudão B.

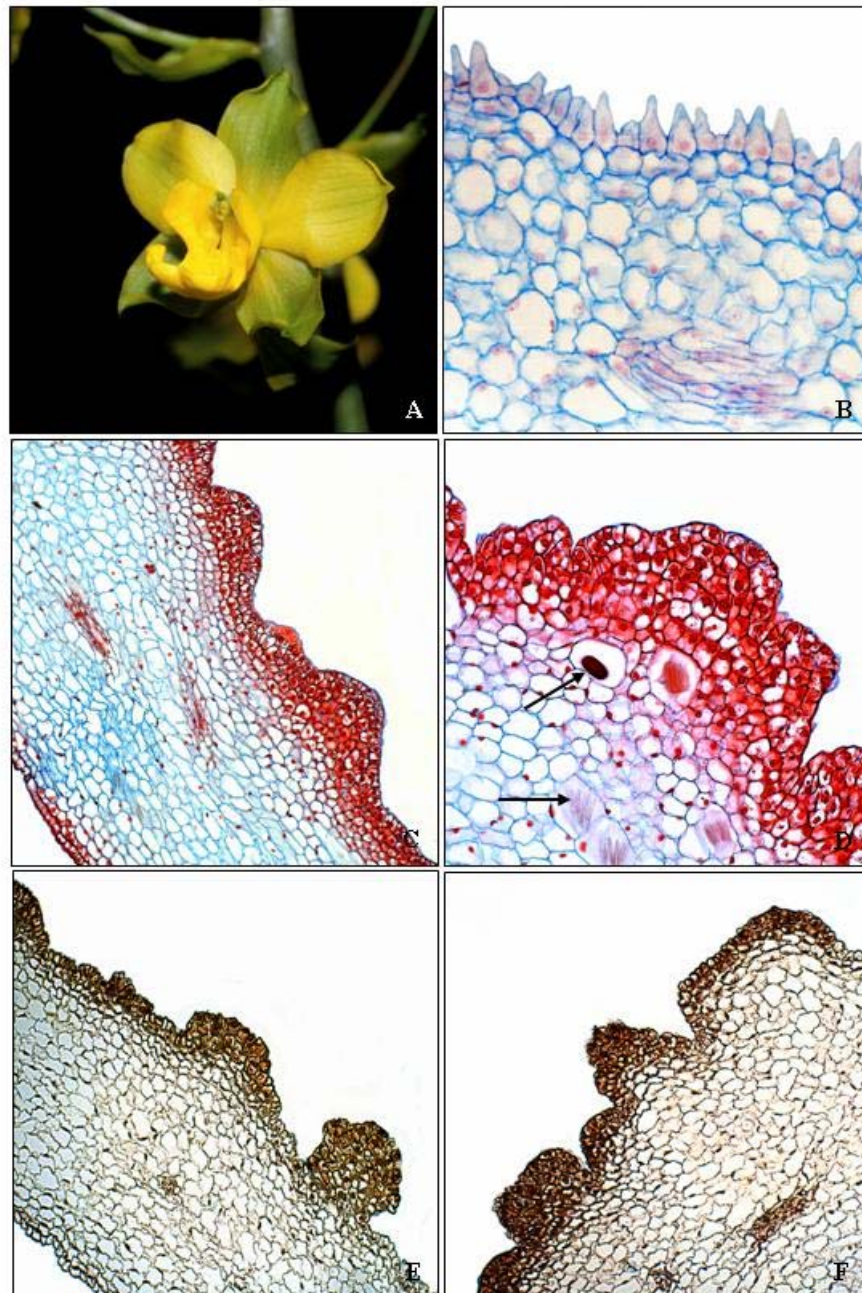


Figura 1

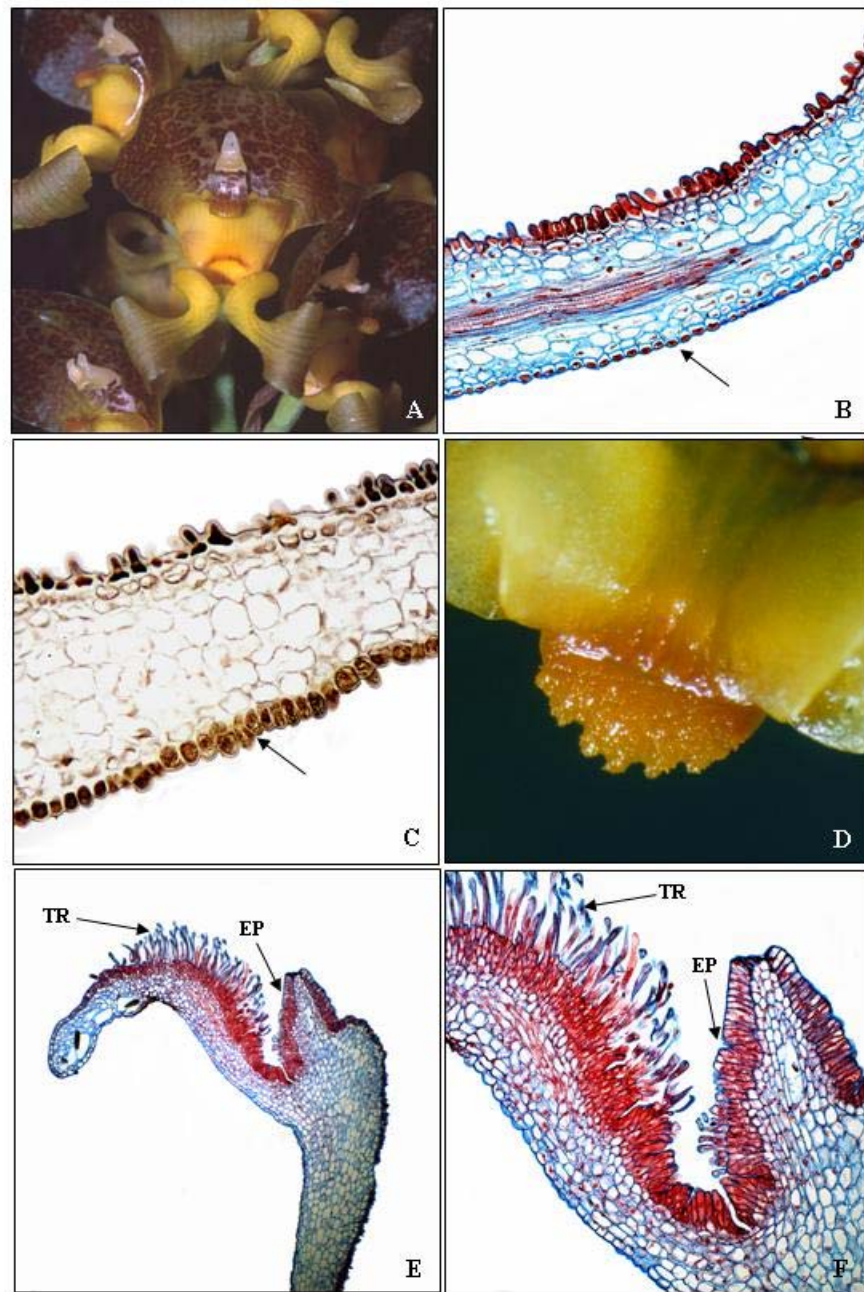


Figura 2

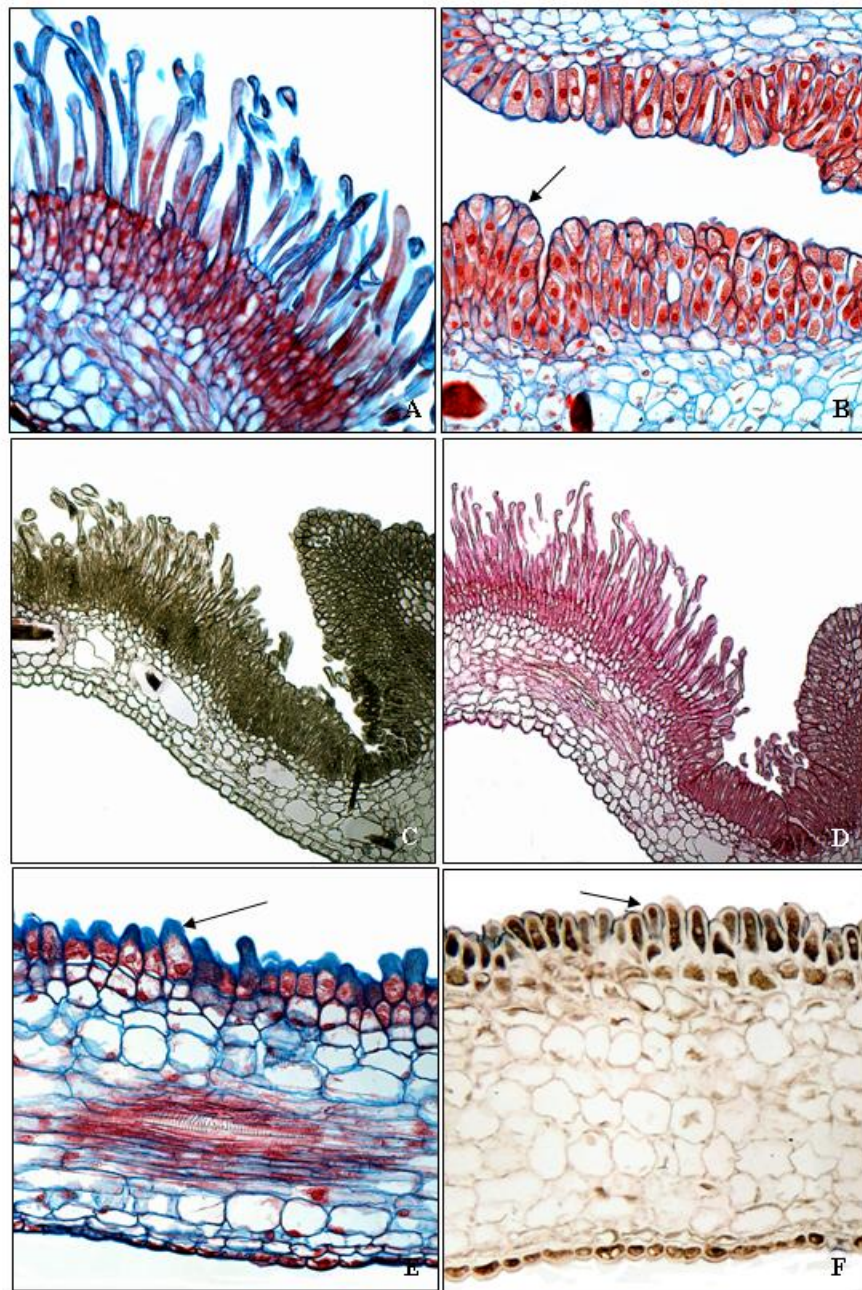


Figura 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos estudos de morfologia, biologia floral e reprodutiva verificou-se que *Cyrtopodium polyphyllum*, assim como é estimado para um terço ou mais das Orchidaceae (Ackerman 1986), não oferece recursos florais aos polinizadores.

Os indivíduos de *C. polyphyllum* ocorrem, nas áreas estudadas, simpatricamente com *Stigmaphyllon* sp. (Malpighiaceae) e *Crotalaria incana* L. (Fabaceae), e seus períodos de floração se sobrepõem. As três espécies apresentam flores amarelas e de tamanhos similares. As flores de *Stigmaphyllon* sp. e *Crotalaria incana* são freqüentemente visitadas por abelhas Centridini, que coletam óleo e néctar, respectivamente. Entretanto, as visitas às flores de *C. polyphyllum* são raras, já que não oferecem recursos aos seus polinizadores. Esse tipo de interação é conhecido como polinização por engano e tem sido documentado em várias Orchidaceae (Ackerman 1986, Montalvo & Ackerman 1987, Ackerman & Montalvo 1990, Calvo 1990). Apesar de serem visitadas por varias espécies de abelhas, apenas duas espécies do gênero *Centris* (Apidae: Anthophoridae) polinizam as flores de *C. polyphyllum* nas duas áreas estudadas. As visitas ocorrem apenas em dias quentes e ensolarados, sendo que períodos chuvosos afetam negativamente a visitação. Pequenas espécies de abelhas Centridini que habitam regiões neotropicais geralmente não forrageiam sob condições adversas, como nevoeiros, ventos fortes, chuvas intensas e baixas temperaturas (Roubik 1992). Essa baixa taxa de visitação é comum em flores polinizadas por engano que não oferecem recursos (Ackerman 1986, 1989, Montalvo and Ackerman 1987, Zimmerman and Aide 1989).

Além da polinização por fator biótico (abelhas), *Cyrtopodium polyphyllum* apresenta um tipo de polinização abiótica, isto é, assistida pela água da chuva, aspecto ainda não descrito para Cyrtopodiinae. Nesse tipo de polinização abiótica, em dias com alto índice de precipitação, em mais de 2% das flores, a água acumula na cavidade estigmática e dissolve a secreção do estigma. Consequentemente, uma viscosa gota se forma e contacta o polinário. Com a evaporação, essa gota move o polinário e a antera para o interior do estigma, promovendo autopolinização.

Como *Cyrtopodium polyphyllum* é autocompatível, a ocorrência dessa autopolinização facultativa pelas gotas da chuva pode ser uma importante estratégia para promover a formação de frutos na ausência de polinizadores bióticos.

A taxa de frutificação de *C. polyphyllum* em ambiente natural é baixa quando comparada com a capacidade de formação de frutos mostradas nos tratamentos de autopolinização manual e polinização cruzada. Esse fato é comum para outras espécies de orquídeas polinizadas por engano (Neiland & Wilcock 1998, Johnson 2000).

Apesar do baixo número de frutos, a porcentagem de sementes potencialmente viáveis foi alta, tanto nos frutos formados em ambientes naturais quanto nos provenientes dos tratamentos manuais. Essa alta taxa (cerca de 90%) de sementes viáveis é incomum em Epidendroideae, cujas espécies apresentam um grande número de sementes sem embrião. Também foram observadas sementes com mais de um embrião (poliembrionia) em menos de 5% dos frutos (naturais/tratamentos).

Através dos estudos anatômicos verificou-se que *Cyrtopodium polyphyllum* e uma outra Cyrtopodiinae, *Grobya amherstiae*, apresentam osmóforos em seus labelos. Essas estruturas são responsáveis pela produção das fragrâncias dessas espécies, adocicada e levemente desagradável, respectivamente. Foram feitos testes histoquímicos que comprovaram a natureza lipofílica das substâncias (óleos voláteis) secretadas por esses osmóforos.

Grobya amherstiae também apresenta elaióforo, no ápice do labelo e na base da colna. No ápice do labelo o elaióforo é do tipo misto, formado tanto por tricomas, como por uma epiderme em paliçada, ambos secretores da mesma substância. Na base da colna de *G. amherstiae* há outro elaióforo semelhante ao do ápice do labelo, porém, composto apenas por tricomas glandulares unicelulares, não havendo epiderme em paliçada secretora. A ocorrência de elaióforos do tipo misto, formados tanto por tricomas unicelulares como por epiderme em paliçada é um dado inédito, uma vez que não há registros da ocorrência desse tipo de estrutura em uma mesma flor.

Através dos testes histoquímicos verificou-se que a secreção liberada pelos elaióforos é heterogênea, ou seja, além de secretarem óleo fixo (ácidos graxos), também secretam pequena fração de mucilagem. Essa adição de pequena quantidade de mucilagem ao óleo fixo pode tornar a secreção um pouco mais fluida e facilitar sua coleta por parte das abelhas.

Além dos osmóforos e elaióforos, *Grobya amherstiae* também possui um guia de óleo na face adaxial do labelo, que liga o elaióforo do ápice do labelo ao da base da coluna. Esse guia, ainda não descrito na literatura, é de extrema importância para completar o processo de polinização (veja Mickeliunas *et. al.* 2006), uma vez que ele serve como orientação para que a abelha chegue até o elaióforo da base da coluna.

As informações obtidas com o presente estudo são importantes para fornecer uma visão mais abrangente dos mecanismos de polinização em Cyrtopodiinae, uma vez que *Cyrtopodium* é o maior gênero em número de espécies pertencente a essa subtribo no Brasil. O conhecimento da biologia da reprodução, fenologia e morfologia floral de espécies de *Cyrtopodium* é de extrema importância, não apenas do ponto de vista científico, mas também porque espécies deste gênero são muito importantes economicamente, por serem utilizadas como plantas ornamentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerman, J.D. 1986. Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* 1: 108-113.
- Ackerman, J.D. 1989. Limitations to sexual reproduction in *Encyclia krugii* (Orchidaceae). *Systematic Botany* 14: 101-109.
- Ackerman, J.D. & Montalvo, A.M. 1990. Short- and long-term limitations to fruit production in a tropical orchid. *Ecology* 71: 263-272.
- Arditti, J. 1982. Orchid biology, reviews and perspectives, II. Cornekk University Press. Ithaca and London. 4: 146-170.
- Ascensão, L.; Francisco, A.; Cotrim, H. & Pais, M.S. 2005. Comparative structure of the labellum in *Ophrys fusca* and *O. lutea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 92: 1059-1067.
- Atwood, J.T. 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9: 171-186.
- Barros, F., Batista, J.A.N. & Bianchetti, L.B. 2003. Epitypification and taxonomic elucidation of some Brazilian taxa of *Cyrtopodium* R. Br. (Orchidaceae). *Taxon* 52: 841-849.
- Batista, J.A.N. & Bianchetti, L.B. 2004. Three new taxa in *Cyrtopodium* (Orchidaceae) from central and southeastern Brazil. *Brittonia* 56: 260-274.
- Borba, E.L. & Semir, J. 1998. Wind-assisted fly pollination in three *Bulbophyllum* (Orchidaceae) species occurring in the Brazilian campos rupestres. *Lindleyana* 13: 203-218.
- 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.
- Braem, G.J. 1992. Fleischfreesend Pflanzen. Carnovourous Plants. Naturbuch Verlag, Augsburg, Germany.
- Braga, P.I. 1976. Estudos da flora orquidológica do Estado do Amazonas: I- Descrição e observação da biologia flora de *Stanhopea candida* Barb. Rodr. *Acta Amazonica* 6: 433-438.

- Buchmann, S.L. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematic* 18: 343-369.
- Calvo, R.N. 1990. Four-year growth and reproduction of *Cyclopogon cranichoides* (Orchidaceae) in South Florida. *American Journal of Botany* 77: 736-741.
- Chase, M.W. & Hills, H.G. 1992. Orchid phylogeny, flower sexuality, and fragrance-seeking - Evidence from variation in chloroplast DNA among subtribes *Catasetinae* and *Cyrtopodiinae*. *BioScience* 42: 43-49.
- Curry, K.J.; McDowell, L.M.; Judd, W.S. & Stern, W.L. 1991. Osmophores, floral features, and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 78: 610-623.
- Dafni, A. 1984. Mimicry and deception in pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 259-278.
- Dressler, R.L. 1967. Why do euglossine bees visit orchid flowers? *Atlas Simp. Biota Amazônica* 5: 171-180.
- Dressler, R.L. 1981. *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Dressler, R.L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Endress, P.K. 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 385-386.
- Garay, L.A. 1960. On the origin of the Orchidaceae. *Botanical Museum Leaflets Harvard University* 19: 57-96.
- Herrera, C. 1989. Pollinator abundance, morphology, and flower visitation rate: analysis of the "quantity" component in plant - pollinator system. *Oecologia* 80: 241-148.
- Hoehne, F.C. 1942. *Flora Brasílica*. Fasc. 5, vol. XII, VI: 8.
- Hoehne, F.C. 1949. *Iconografia das Orchidáceas do Brasil*. São Paulo, Secretaria da Agricultura. p. 18-42.
- Huggins, C.C. 1991. Stalking orchids in the lost world. *American Orchid Society Bulletin* 60: 437-447.
- Janzen, D.H. 1971. Euglossine bees as long distance pollinators of tropical plants. *Science* 171: 203-205.

- Johnson, S.D. 2000. Batesian mimicry in the non-rewarding orchid *Disa pulchra*, and its consequences for pollinator behavior. *Biological Journal of the Linnean Society* 71: 119-132.
- Kocyan, A. & Endress, P.K. 2001. Floral structure and development of *Apostasia* and *Neuwiedia* (Apostasioideae) and relationships to the other Orchidaceae. *International Journal of Plant Sciences* 164: 847-867.
- Kricher, J.C. 1989. *A Neotropical Companion*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Maad, J. & Nilsson, L.A. 2004. On the mechanism of floral shifts in speciation: gained pollination efficiency from tongue- to eye-attachment of pollinia in *Platanthera* (Orchidaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 83: 481-495.
- Mickeliunas, L., Pansarin, E. R. & Sazima, M. 2006. Biologia floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucesso reprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). *Revista Brasileira de Botânica* 29: 251-258.
- Montalvo, A.M. & Ackerman, J.D. 1987. Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Biotropica* 19: 24-31.
- Moraes, M.D. 1997. A família Asteraceae na planície litorânea de Picinguaba, município de Ubatuba - São Paulo. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas. Área de Biologia Vegetal). Universidade Estadual de Campinas. Campinas. UNICAMP. 154p.
- Neiland, M.R.M. & Wilcock, C.C. 1998. Fruit set, nectar reward and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 85: 1657-1671.
- Nilsson, L.A. 1992. Orchid pollination biology. *Tree* 7: 255-259.
- Nimer, E. 1977. Clima. In *Geografia do Brasil - Região Sudeste*. IBGE. 3: 51-89.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1975. *Orchidaceae Brasilienses* v. 1, Hildesheim, Kurt Schmiersow 408p.
- Pansarin, E.R. 2000. Biologia Reprodutiva e morfologia floral de espécies de Orchidaceae em diferentes ambientes no Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. UNICAMP. 133p.
- Pansarin, E.R. 2003. Biologia reprodutiva e polinização em *Epidendrum paniculatum* Ruiz & Pavón (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26: 203-211.

- Ribeiro, J.E. 1992. Florística e padrões de distribuição da família Orchidaceae na planície litorânea do núcleo de desenvolvimento Picinguaba, município de Ubatuba, Parque Estadual da Serra do Mar, SP. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas. Área de Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro. UNESP. 200p.
- Roubik, D.W. 1992. Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sanford, W.W. 1974. The ecology of orchids. In Withner, C.L. (ed.) The orchids, scientific studies. New York: John Wiley & Sons, 1-100.
- Schelppe, E. 1970. Fire-induced flowering among indigenous South African orchids. South African Orchid Journal 1: 21-22.
- Simpson, B.B. & Neff, J.L. 1981. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. Annals of Missouri Botanical Garden 68: 301-322.
- Singer, R. & Cocucci, A.A. 1997a. Eye attached hemipollinaria in the hawkmoth and settling moth pollination of *Habenaria* (Orchidaceae): a study on functional morphology in 5 species from subtropical South America. Botanica Acta 110: 328-337.
- Singer, R.B. & Cocucci, A.A. 1997b. Pollination of *Pteroglossaspis ruwenzoriensis* (Rendle) Rolfe (Orchidaceae) by beetles in Argentina. Botanica Acta 110: 338-342.
- Singer, R.B. & Cocucci, A.A. 1999. Pollination mechanisms in four sympatric southern Brazilian Epidendroideae orchids. Lindleyana 14: 47-56.
- Stoutamire, W.P. 1974. Terrestrial orchid seedlings. The Orchids: Scientific Studies. Ed. C. Chromosome L. Withner. John Wiley & Sons, Inc., New York. 101-128.
- Suguio, K. & Martin, L. 1990. Geomorfologia das restingas. In Anais do II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileiro. ACIESP, Águas de Lindóia. 3: 185-206.
- Tremblay, R.L. 1992. Trends in pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. Canadian Journal of Botany 70: 642-650.
- van der Pijl, L. & Dodson, C.H. 1966. Orchid flowers, their pollination and evolution. Florida, University of Miami Press.

- Vogel, S. 1963a. Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung: Über Bau und Funktion der Osmophoren. Akad. Wiss. Lit. (Mainz), Abhandlugen Math. - Naturwiss Klasse, Jahrgang 1962: 599-763.
- Vogel, S. 1963b. Das sexuelle Anlockungsprinzip der Catasetinen- und Stanhopeen-Blüten und die wahre Funktion ihres sogenannten Futtergewebes. Österreichische Botanische Zeitschrift 100: 308-337.
- Vogel, S. 1969. Flowers offering fatty oil instead of nectar. XI Int. Botanical Congress Abstract. p. 229.
- Vogel, S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. Akad. Wiss. Math. - Naturwiss. Klasse. Trop. Pflanzenwelt 7: 1-267.
- Williams, N.H. 1982. The biology of orchids and euglossine bees. In Orchid biology and perspectives (Arditti, J., ed.), Ithaca: Cornell University Press.
- Williams, N.H. & Dodson, C.H. 1972. Selective attraction of male euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long distance pollen flow. Evolution 28: 84-95.
- Zimmerman, J.K.; Aide, T.M. 1989. Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. American Journal of Botany 76: 67-73.