



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**CARLOS EDUARDO PEREIRA NUNES**

**“BIOLOGIA DA POLINIZAÇÃO E REPRODUÇÃO DE  
ELLEANTHUS C.PRESL. (ORCHIDACEAE) NA MATA  
ATLÂNTICA DO PARQUE ESTADUAL DA SERRA DO MAR,  
SÃO PAULO”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Carlos Eduardo Pereira Nunes*  
*Marlies Sazima*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Marlies Sazima

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**N922b**

Nunes, Carlos Eduardo Pereira

Biologia da polinização e reprodução de *Elleanthus* C.Presl. (Orchidaceae) na Mata Atlântica do Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo / Carlos Eduardo Pereira Nunes. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Marlies Sazima.

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

1. Beija-flor. 2. *Elleanthus brasiliensis*. 3. *Elleanthus crinipes*. 4. Mata Atlântica. 5. Orquídea. 6. Plantas - Histoquímica. I. Sazima, Marlies, 1944-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Pollination and reproductive biology of *Elleanthus* C.Presl. (Orchidaceae) in the Atlantic Forest of the Serra do Mar State Park, São Paulo.

**Palavras-chave em inglês:** Hummingbird; *Elleanthus brasiliensis*; *Elleanthus crinipes*; Atlantic rainforest; Orchids; Plant histochemistry.

**Área de concentração:** Biologia Vegetal.

**Titulação:** Mestre em Biologia Vegetal.

**Banca examinadora:** Marlies Sazima, Leonardo Galetto, Wellington Forster.

**Data da defesa:** 16/05/2011.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Vegetal.

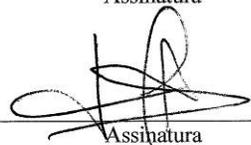
**Campinas, 16 de maio de 2011**

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Marlies Sazima (Orientadora)

  
Assinatura

Prof. Dr. Leonardo Galetto

  
Assinatura

Dr. Wellington Forster

  
Assinatura

Prof. Dr. Fábio de Barros

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Marília de Moraes Castro

\_\_\_\_\_  
Assinatura

À família e aos professores de toda minha vida, que construíram as bases para que eu pudesse chegar até aqui.

## AGRADECIMENTOS

Especialmente à Marlies Sazima, por sua orientação paciente e pelas várias luzes que acendeu em minha trilha durante este trabalho.

Ao co-orientador, Felipe Wanderley Amorim, por dividir a tarefa de me orientar e me acompanhar e ajudar com sua empolgação tanto no campo como no laboratório.

À Profa. Marília, por doar seu tempo, mesmo depois da aposentadoria, para me orientar e ajudar nos trabalhos de anatomia e histoquímica.

Ao Prof. Leonardo Galetto, por gentilmente coletar e analisar amostras de néctar de *Elleanthus* e ajudar no trabalho com preciosas sugestões.

Ao João Semir e ao Wellington Forster, pelas valiosas dicas e sugestões para o texto final.

À CNPq, pelos recursos financeiros.

Aos amigos Aline, Vinícius e Maurício, pelas dicas e pela companhia em vários momentos importantes do trabalho e do lazer.

Aos colegas dos laboratórios de Anatomia Vegetal e Biossistemática pela ajuda com as técnicas e macetes, além das dicas e sugestões para o trabalho.

Aos técnicos de laboratório, Iara e Sebastião, por serem sempre prestativos e ajudarem com a preparação para o campo e os trabalhos no laboratório.

Aos funcionários e ao diretor do Núcleo Santa Virgínia do Parque Estadual da Serra do Mar, aos primeiros, pela companhia nos trabalhos de campo e por me guiarem na mata, ao segundo, pelo interesse e confiança no presente trabalho.

À minha mãe, pela compreensão por minhas ausências e pela força dada principalmente via telefone.

À Lina, a namorada Érika Ferreira Moura, pela paciência, compreensão e necessárias broncas, que muito me ajudaram a completar as tarefas a tempo e priorizar o que deveria ser priorizado.

Enfim, a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a completar esta etapa da minha vida, ajudando no meu amadurecimento científico, profissional e pessoal.

## ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
BIBLIOGRAFIA DA INTRODUÇÃO GERAL.....	5
CAPÍTULO 1: “Biologia da reprodução e polinização de duas espécies de <i>Elleanthus</i> C.Presl. (Orchidaceae: Sobralieae) na Mata Atlântica do Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo”.....	7
RESUMO.....	8
INTRODUÇÃO.....	10
METODOLOGIA.....	12
RESULTADOS.....	20
DISCUSSÃO.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	45
CAPÍTULO 2: “Calos nectaríferos no labelo de <i>Elleanthus brasiliensis</i> (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae: Sobralieae)”.....	53
RESUMO.....	54
INTRODUÇÃO.....	55
METODOLOGIA.....	57
RESULTADOS.....	59
DISCUSSÃO.....	66
BIBLIOGRAFIA.....	69
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73

## ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1. Mapa indicando os locais de estudo no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo.....	14
FIGURA 2. Inflorescências de <i>Elleanthus brasiliensis</i> e <i>E. crinipes</i> .....	22
FIGURA 3. Alterações na abertura do tubo floral e exposição da superfície estigmática em <i>E. brasiliensis</i> .....	24
FIGURA 4. Variação no volume de néctar das flores de <i>E. brasiliensis</i> .....	25
FIGURA 5. Resultados de massa fresca e massa seca de frutos de <i>E. brasiliensis</i> .....	30
FIGURA 6. Visitantes florais de <i>E. brasiliensis</i> .....	35
FIGURA 7. Visitas de beija-flores às flores de <i>E. brasiliensis</i> e <i>E. crinipes</i> .....	36
TABELA 1. Fenofases de <i>E. brasiliensis</i> e <i>E. crinipes</i> .....	21
TABELA 2. Dados sobre o néctar de <i>E. brasiliensis</i> e <i>E. crinipes</i> .....	27
TABELA 3. Resultados de polinizações controladas e formação de frutos em condições naturais de <i>E. brasiliensis</i> e <i>E. crinipes</i> .....	29
TABELA 4. Frequências e número de indivíduos visitados por observação em <i>E. brasiliensis</i> .....	34

### CAPÍTULO 2

FIGURA 1. Inflorescência <i>in situ</i> e labelo de <i>E. brasiliensis</i> .....	60
FIGURA 2. Nectários no labelo de <i>E. brasiliensis</i> .....	63
FIGURA 3. Detalhes do calo no labelo de <i>E. brasiliensis</i> .....	64
FIGURA 4. Secções transversais do par de calos no labelo de <i>E. brasiliensis</i> .....	65
TABELA 1. Volume, concentração e composição de açúcares do néctar em <i>E. brasiliensis</i> .....	61

## RESUMO

Neste trabalho foi estudada a biologia da polinização e da reprodução de duas espécies de orquídeas do gênero *Elleanthus*. A fenologia reprodutiva de *Elleanthus brasiliensis* e *E. crinipes* é anual. As flores de *E. brasiliensis* apresentam sépalas de coloração rosada, pétalas e labelo brancos com duas manchas lilases no labelo, ao passo que as de *E. crinipes* possuem pétalas e labelo de coloração creme e a antera operculada lilás - ambas abrem seqüencialmente e duram de dois a quatro dias. O néctar destas espécies é produzido nos calos do labelo em volumes que variam de 1 a 6 µL, a concentração de açúcares é de ca. de 20% e a análise do néctar mostrou a presença de sacarose, glicose e frutose, com predominância de sacarose. Estas espécies apresentam protandria caracterizada pela mudança de posição dos elementos reprodutivos, são autocompatíveis, mas dependem de polinizadores para reprodução. Os principais polinizadores são os beija-flores *Ramphodon naevius* e *Thalurania glaucopis*. Vários dos atributos florais destas espécies são característicos para polinização por beija-flores. Em *E. brasiliensis*, estudos histológicos evidenciaram a natureza secretora dos calos apresentando uma epiderme papilosa secretora com uma cutícula fina e um parênquima também secretor. Os estudos histoquímicos mostraram a presença de pré-néctar nas células da epiderme e do parênquima dos calos. É interessante ressaltar que a histologia desses nectários não é conhecida para a tribo Sobralieae e se distingue da de nectários de orquídeas polinizadas por aves. É sugerido que demais espécies ornitófilas desta tribo apresentem glândulas nectaríferas com histologia semelhante. Além disso, a ocorrência de calos nectaríferos é pouco conhecida em Orchidaceae, não havendo registros para espécies ornitófilas.

**Palavras chave:** beija-flor, histoquímica, Mata Atlântica, orquídea, polinização.

## ABSTRACT

This study presents the pollination biology and the breeding system of two *Elleanthus* (Orchidaceae) species from the Atlantic Forest in southeastern Brazil. The flowering phenology of the species is annual; its flowers open sequentially and last two to four days. *Elleanthus brasiliensis* flowers present pinkish sepals, while the petals and the lip, which has two lilac spots, are white; in *E. crinipes* flowers, besides the rose-colored sepals, the petals and the lip are creamy and the operculate anther is lilac. The nectar of these species is produced in the lip calli in volumes ranging from 1 to 6  $\mu\text{L}$  and sugar concentration is approx. 20%. Nectar analysis detected the presence of sucrose, glucose and fructose, with sucrose prevailing. The species are protandrous which is characterized by the different positions of the reproductive elements during anthesis time. Both are self-compatible, but depend on pollinators for reproduction. The main pollinators are the hummingbirds *Ramphodon naevius* and *Thalurania glaucopis*. Several floral traits of these species are characteristic for plants pollinated by hummingbirds. In *E. brasiliensis*, histological studies revealed the secretory nature of the calli, which is composed of a secretory papillous epidermis with a thin cuticle and a secretory parenchyma. Histochemical studies showed the presence of pre-nectar in the epidermis and parenchyma cells. It is worth mentioning that the histology of these nectaries is not known for the tribe Sobralieae and it is different from nectaries of other bird pollinated orchids. It is suggested that nectar glands of other ornithophilous species of this tribe present similar histology. Furthermore, the occurrence of nectariferous calli is little known in Orchidaceae, with no records for ornithophilous species.

**Keywords:** Atlantic Rainforest, histochemistry, hummingbird, orchid, pollination

## INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica é um dos ecossistemas mais ameaçados do mundo (Prance & Campbell 1988) a despeito de sua elevada biodiversidade com diversas possibilidades para geração de conhecimento e tecnologia. O complexo ecossistema das matas é, em grande parte, composto por flora epífita que, por sua vez, constitui importante componente florístico, estrutural e funcional das florestas tropicais de terras baixas e de montanhas (Gentry & Dodson 1987; Benzing 1998; Anselvam 2001; Gradstein 2008).

O conhecimento sobre a biologia reprodutiva das espécies ocorrentes na Mata Atlântica adquire importância cada vez maior. Trata-se de um bioma de grande complexidade biológica, que ocupava 12% do território nacional, restando, hoje, apenas 7,5% de sua cobertura original, espalhadas na forma de fragmentos florestais (Costa 1992; Morellato & Haddad 2000). Portanto, é considerado um dos biomas prioritários para a preservação pela União Internacional para a Conservação da Natureza (Davis *et al.* 1986).

A família Orchidaceae é uma das mais diversificadas entre as angiospermas. Existem cerca de 24.500 espécies de orquídeas (Dressler 2005), sendo que 1257 espécies, ou 5%, ocorrem no bioma Mata Atlântica. Estes números colocam a família Orchidaceae como a maior entre as monocotiledôneas e um importante componente da flora deste bioma, compondo 8% das espécies de plantas vasculares (Stehman *et al.* 2009). Em Orchidaceae, a tribo Sobralieae (Epidendroideae, Sobralieae *sensu* Pridgeon *et al.*, 2006) constitui um grupo bem distribuído pelos trópicos do Novo Mundo (Van Der Pijl & Dodson 1966), contendo os gêneros: *Elleanthus*, *Epilyna*, *Sertifera* e *Sobralia* (Govaerts 2003; Pridgeon *et al.* 2006).

O gênero *Elleanthus* constitui-se de 111 espécies (Govaerts 2003; Dressler 2006) distribuídas pela América Tropical, concentradas na cadeia montanhosa dos Andes. Barros *et al.* (2010) atribuem nove espécies ao Brasil, sendo que Stehmann *et al.* (2009) atribuem três espécies ao Bioma Mata Atlântica: *Elleanthus brasiliensis*, *E. crinipes* e *E. graminifolius*.

*Elleanthus brasiliensis* (Lindl.) Rchb.f. apresenta distribuição da Guiana Francesa ao sul do Brasil (Govaerts 2003), ocorrendo na floresta atlântica do litoral brasileiro e em matas úmidas do interior, em altitudes que variam do nível do mar a 1000 m. Até o momento, tem-se apenas uma vaga noção sobre a polinização de *E. brasiliensis*. Em observações ocasionais foram avistados beija-flores *Phaethornis pretrei* (Singer & Sazima 2000; Singer 2003), borboletas e abelhas em

visitas às flores (Miller *et al.* 1996), mas dados referentes à importância destes polinizadores e suas interações com *E. brasiliensis* não estão disponíveis.

*Elleanthus crinipes* Rchb.f. é uma espécie endêmica do bioma Mata Atlântica (Stehman *et al.* 2009), ocorrendo preferencialmente a altitudes acima de 800 m, onde pode ocorrer junto a *E. brasiliensis*. Não há estudos ou quaisquer informações sobre os visitantes e polinizadores de *E. crinipes*, o que torna importante o estudo desta espécie restrita às regiões altas da Serra do Mar, frente à situação atual de perda de habitat seja por fragmentação seja por efeito das mudanças climáticas (Benzing 1998).

Sendo a destruição de habitat uma das maiores causas de extinção e redução de populações de orquídeas no planeta (Wong & Sun 1999; Alcock 2006), os estudos sobre biologia reprodutiva dessas plantas tornam-se imprescindíveis para sua conservação (Cropper & Calder 1990), principalmente em habitats cada vez mais reduzidos e fragmentados como a Mata Atlântica. Estudos sobre a anatomia floral relacionados com a atuação dos polinizadores completam os estudos de biologia reprodutiva e propiciam um entendimento mais amplo das interações responsáveis pela manutenção das espécies no ecossistema (Stpiczynska *et al.* 2003, 2005).

O presente trabalho teve por objetivo estudar a biologia da polinização e reprodução de *E. brasiliensis* e de *E. crinipes* para fornecer informações sobre as interações entre essas espécies e seus polinizadores, gerar subsídios para estudos mais detalhados (por ex. genética de populações) e para programas de conservação. Os objetivos específicos do estudo são:

- Estudar a fenologia, a biologia floral destas espécies de orquídeas e suas interações com polinizadores;
- Determinar o sistema reprodutivo das espécies através de experimentos de polinizações controladas;
- Determinar a dependência destas espécies em relação aos polinizadores, tendo em vista o sucesso reprodutivo;
- Estudar a histologia do labelo em especial as estruturas secretoras do néctar de *E. brasiliensis*.

## BIBLIOGRAFIA DA INTRODUÇÃO GERAL

- Alcock J. 2006.** Orchids and Conservation. In: Alcock J. *An Entusiasm on Orchids – Sex and Deception in Plant Evolution*. New York: Oxford University Press, 215-251.
- Annaselvam J, Parthasarathy N. 2001.** Diversity and distribution of herbaceous vascular epiphytes in a tropical evergreen forest at Varagalaiar, Western Ghats, India. *Biodiversity and Conservation* **10**: 317-329.
- Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN. 2010.** Orchidaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB011488>).
- Benzing DH. 1998.** Vulnerabilities of tropical forests to climate change: the significance of resident epiphytes. *Climatic Change* **39**: 519-540.
- Costa JPO, ed. 1992.** Plano de Ação para a Mata Atlântica. *Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica – MaB – UNESCO*, **6**. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica.
- Cropper SC, Calder DM. 1990.** The floral biology of *Thelymitra epipactoides* (Orchidaceae), and the implications of pollination by deceit on the survival of this rare orchid. *Plant Systematics and Evolution* **170**: 11-27.
- Davis SD, Droop SJM, Gregerson P, Henson L, Leon CJ, Villa-Lobos JL, Syngé H, Zantovska J. 1986.** *Plants in danger: what do we know?* Gland: International Union for the Conservation of Nature – IUCN.
- Dressler RL. 2005.** How many orchid species? *Selbyana* **26**: 155-158.
- Dressler RL. 2006.** *Elleanthus*. In: Pridgeon AM, Cribb P, Chase MW, Rasmussen FN, eds. 2006. *Genera Orchidacearum Volume 4: Epidendroideae (Part 1)*. Oxford: Oxford University Press, 598.
- Gentry AH, Dodson CH. 1987.** Diversity and biogeography of neotropical vascular epiphytes. *Annals Missouri Botanical Garden* **74**: 205–233.

- Govaerts R. 2003.** *World Checklist of Monocotyledons Database in ACCESS: 1-71827*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Gradstein SR. 2008.** Epiphytes of tropical montane forests - impact of deforestation and climate change. In: Gradstein SR, Homeier J, Gansert D, eds. *Biodiversity and Ecology Series: The Tropical Mountain Forest – Patterns and Processes in a Biodiversity Hotspot* Göttingen Centre for Biodiversity and Ecology. Göttingen: Universitätsverlag Göttingen, 51-65.
- Miller D, Warren R, Miller I. 1996.** *Orquídeas do Alto da Serra da Mata Atlântica Pluvial do Sudeste do Brasil*. Rio de Janeiro: Salamandra Consultoria Editorial.
- Morellato LPC, Haddad CFB. 2000.** Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. *Biotropica* **32**: 786–792.
- Prance GT, Campbell DC. 1988.** The present state of tropical floristic. *Taxon* **37**: 519-548.
- Pridgeon AM, Cribb P, Chase MW, Rasmussen FN, eds. 2006.** *Genera Orchidacearum Volume 4: Epidendroideae (Part 1)*. Oxford: Oxford University Press.
- Singer RB, Sazima M. 2000.** The pollination of *Stenorrhynchus lanceolatus* (Aublet) L. C. Rich (Orchidaceae: Spiranthinae) by hummingbirds in south-eastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **223**: 221-227.
- Singer RB. 2003.** Orchid pollination: recent developments from Brazil. *Lankesteriana* **7**:111-114.
- Stehmann JR, Forzza RC, Salino A, Sobral M, Costa DP, Kamino LH, eds. 2009.** *Plantas da Floresta Atlântica*. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A. 2003.** Nectary Structure and Nectar Secretion in *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae). *Annals of Botany* **93**: 87-95.
- Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A. 2005.** Comparative Account of Nectary Structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **95**: 749-756.
- Van der Pijl L, Dodson CH. 1966.** *Orchid flowers: their pollination an evolution*. Coral Gables: University of Miami Press.
- Wong KC, Sun M. 1999.** Reproduction Biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **86**: 1406-1413.

## **CAPÍTULO 1**

**Biologia da polinização e reprodução de duas espécies de *Elleanthus* C.Presl. (Orchidaceae: Sobralieae) na Mata Atlântica do Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo.**

## RESUMO

Foi estudada a biologia da polinização e reprodução de *Elleanthus brasiliensis*, de ampla distribuição nas matas úmidas do Brasil e de *E. crinipes*, endêmica das florestas de altitude do sudeste brasileiro. Os indivíduos estudados de *E. brasiliensis* ocorrem em áreas de Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas em Ubatuba, SP e os de *E. crinipes* em áreas de Floresta Ombrófila Densa Montana entre os municípios de São Luiz do Paraitinga e Natividade da Serra, SP. Neste local, ambas as espécies ocorrem em simpatria. Visitas mensais foram realizadas para o levantamento de dados fenológicos. Em várias etapas do período de floração foram realizados estudos sobre a biologia floral, o sistema reprodutivo, os visitantes e determinados os polinizadores. As duas espécies apresentam desenvolvimento contínuo de novos caules e folhas ao longo do ano, ao passo que a floração e frutificação ocorrem uma vez ao ano. As flores de *E. brasiliensis* apresentam sépalas de coloração rosada, pétalas e labelo brancos com duas manchas lilases no labelo, ao passo que as de *E. crinipes* possuem pétalas e labelo de coloração creme e a antera operculada lilás - ambas abrem seqüencialmente e duram de dois a quatro dias. Nestas espécies o néctar é produzido nos calos do labelo, em volumes que variam de 1 a 6  $\mu$ L e concentração de açúcares de ca. de 20%. O estigma está receptivo desde a fase de botão à senescência, mas somente a partir do segundo dia de antese floral o estigma se torna acessível devido à mudança de formato da coluna. Portanto, nessas espécies ocorre protandria caracterizada por mudança de posição dos elementos reprodutivos. Estas espécies são autocompatíveis, mas dependem dos polinizadores como vetores de pólen. Frutos de *E. brasiliensis* de polinizações cruzadas e de condições naturais apresentam massa seca maior do que os resultantes de autopolinizações manuais, evidenciando as vantagens da polinização cruzada. Os cruzamentos interespecíficos não resultaram em frutos, o que indica a existência de uma barreira molecular. As flores de *E. brasiliensis* foram visitadas por abelhas *Trigona spinipes* (Meliponini), beija-flores *Ramphodon naevius* (Phaethornithinae) e *Thalurania glaucopis* (Trochilinae) e todos removeram polinários e, portanto, podem ser polinizadores. Entretanto, o beija-flor *R. naevius* é o principal polinizador devido a sua freqüência e alto deslocamento entre os indivíduos desta Orchidaceae. *E. crinipes* foi visitada pelo beija-flor *Thalurania glaucopis* (Trochilinae) que removeu polinários, sendo considerado polinizador. Em *E. brasiliensis*, a fixação dos polinários nos bicos dos beija-flores ocorre graças a um mecanismo de alavanca relacionado com a coluna, enquanto que em *E.*

*crinipes* a fixação ocorre devido à abertura estreita do tubo floral. Em ambas as espécies a abertura sequencial das flores a protandria, além da produção de néctar em baixa quantidade, parecem ser mecanismos que reduzem a geitonogamia e promovem o fluxo polínico entre os indivíduos mantendo altas taxas de frutificação, uma vez que as pressões de limitação de polinizadores e de depressão endogâmica parecem ser atuantes na evolução destas espécies.

## INTRODUÇÃO

A Mata Atlântica é um *hotspot* de biodiversidade prioritário para conservação em todo planeta (Myers *et al.* 2000) e pouco se conhece acerca da biologia da reprodução da maioria de suas espécies, especialmente de orquídeas epífitas. No entanto, estudos com este grupo, que compõe a maioria das espécies de Orchidaceae, são pouco frequentes e não aprofundados, a despeito dessas espécies estarem mais suscetíveis a degradação antrópica, seja por coleta ilegal (Flores-Palacios & Valencia-Díaz 2007) seja pela fragmentação do hábitat ou por alterações no clima (Benzing 1998).

A literatura sobre a família Orchidaceae vem crescendo nas últimas décadas, com o crescente acúmulo de conhecimentos sobre sua reprodução, genética e sistemática (Chase *et al.* 2003; Fay & Chase 2009; Chase *et al.* 2009). Apesar dos estudos sobre biologia da polinização realizados até o momento, ainda não é possível ter uma completa noção da importância dos diversos sistemas de polinização do grupo ante sua imensa diversidade (Van der Pijl & Dodson 1966; Singer 2003; Schiestl & Schlüter 2009). Dessa maneira, pouco é conhecido sobre as interações da maioria das espécies com seus polinizadores, sendo os estudos de campo importantes para se confirmar as especulações feitas a partir de caracteres morfológicos desde o século XIX (Darwin 1877; Fay & Chase 2009).

Com relação aos recursos florais, a família Orchidaceae pode ser dividida entre espécies que oferecem algum tipo de recurso ao polinizador (majoritariamente néctar) e espécies que são polinizadas por engano, não oferecendo recurso algum. Exemplos de recursos florais oferecidos por orquídeas aos seus polinizadores são: néctar, compostos aromáticos (Van der Pijl & Dodson 1966), pseudo-pólen (Pansarin & Amaral 2006), óleos (Steiner 1998) e, raramente, pólen (Tremblay *et al.* 2005). Assim como nas Angiospermas em geral, a maioria das espécies de Orchidaceae apresenta melitofilia (polinização por abelhas) como sistema de polinização (Van der Pijl & Dodson 1966; Raven *et al.* 2007, entre outros), sendo a miofilia, provavelmente, o segundo sistema mais comum na família (Borba & Semir 2001).

A polinização por aves, ou ornitofilia, não figura entre os sistemas de polinização mais frequentes em Orchidaceae, entretanto nos trópicos existe um grande número de espécies com características ornitófilas (Van der Pijl & Dodson 1966). Este sistema de polinização evoluiu

independentemente em diferentes grupos de Orchidaceae do Neotrópico, onde os beija-flores assumem grande importância como polinizadores. Assim, *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. e *Rodriguezia bahiensis* Rchb.f. (Cymbidieae, Oncidiinae), apesar de apresentarem características de um sistema de polinização generalista, oferecem néctar e são efetivamente polinizadas por beija-flores (Ackerman *et al.* 1994; Carvalho & Machado 2006), por outro lado, *Ornithidium coccineum* (Jacq.) Salisb. ex R.Br. (Cymbidieae, Maxillariinae) e *Scaphyglottis imbricata* (Lindl.) Dressler (Epidendreae, Laeliinae) produzem néctar e apresentam coloração vermelha característica de plantas polinizadas por aves (Stpiczynska *et al.* 2003, 2005).

O gênero *Elleanthus* C.Presl constitui-se de 111 espécies (Govaerts 2003) distribuídas pela América Tropical e concentradas na cadeia montanhosa dos Andes (Dressler 2006). Ocorrem nove espécies no Brasil (Barros *et al.* 2010), sendo atribuídas três espécies à Mata Atlântica (Stehmann *et al.* 2009).

*Elleanthus brasiliensis* (Lindl.) Rchb.f. apresenta distribuição da Guiana Francesa ao sul do Brasil (Govaerts 2003), ocorrendo na área de floresta atlântica do litoral brasileiro e em matas úmidas do interior, em altitudes que variam do nível do mar a 1000 m. Estudos anteriores revelaram uma vaga noção sobre a polinização de *E. brasiliensis*. Singer & Sazima (2000) e Singer (2003) avistaram beija-flores *Phaethornis pretrei* em visita às flores, enquanto Miller *et al.* (1996) observaram borboletas e abelhas. Entretanto, não existem dados referentes à importância destes visitantes e suas interações com *E. brasiliensis*, que possibilitem saber se estes agentes são realmente os polinizadores efetivos.

*Elleanthus crinipes* Rchb.f. é uma espécie endêmica da Mata Atlântica (Stehman *et al.* 2009), ocorrendo preferencialmente a altitudes acima de 800 m, onde ocorre em simpatria com *E. brasiliensis*. Não há estudos ou quaisquer informações sobre os visitantes e polinizadores de *E. crinipes*, o que torna importante o estudo desta espécie restrita a regiões altas e de difícil acesso da Serra do Mar ante à situação atual de perda de hábitat seja por fragmentação seja por efeito das mudanças climáticas (Benzing 1998).

O presente trabalho teve por objetivo geral estudar a biologia da polinização e reprodução de *E. brasiliensis* e de *E. crinipes* para fornecer informações sobre as interações dessas espécies e seus polinizadores, gerar subsídios para estudos mais detalhados (por ex. genética de populações) e para programas de conservação (Wong & Sun 1999).

Os objetivos específicos foram estudar a fenologia, a biologia floral, os sistemas de polinização e de reprodução dessas espécies, com maior ênfase e detalhe em *E. brasiliensis*, mais abundante e freqüente. Neste estudo, foi possível elucidar as seguintes questões: (1) quais são os principais atributos morfológicos e da biologia floral relacionados ao tipo de polinizador? (2) quais são as características do néctar que favorecem o deslocamento dos polinizadores entre os indivíduos? (3) qual é o papel da mucilagem na inflorescência de *E. brasiliensis*? (4) qual é o sistema de reprodução e há dependência dos polinizadores? (5) quais são os principais polinizadores e qual é a eficiência no fluxo polínico?

## **METODOLOGIA**

### **Áreas de estudo: locais e caracterização**

O estudo foi desenvolvido no Parque Estadual da Serra do Mar (Figura 1A). A vegetação nas áreas é do tipo Floresta Ombrófila Densa (Veloso *et al.* 1991) ou Floresta Atlântica Úmida (Oliveira-Filho & Fontes 2000).

*Elleanthus brasiliensis* foi estudada no Núcleo Picinguaba (Figura 1A), localizado ao norte do município de Ubatuba, Estado de São Paulo. O clima do local é classificado como tropical chuvoso, com precipitação alta durante todos os meses do ano (tipo Af *sensu* Köppen 1948). As médias anuais de precipitação e temperatura são de 2154 mm e 22,6 °C, respectivamente (Miranda *et al.* 2008). O sítio de estudo de *E. brasiliensis* encontra-se próximo à Casa da Farinha, às margens do Rio da Fazenda (Figura 1B), sendo estudadas plantas em três locais ao longo do rio (próximos a 23°20'21,9''S e 44°50'14,5''W). A formação vegetal do local é a Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas (Veloso *et al.* 1991, Figura 1B). Entretanto *E. brasiliensis* é também encontrada em áreas de Floresta Ombrófila Densa Montana próximas ao núcleo Santa Virgínia, ocorrendo em simpatria com *E. crinipes*.

*E. crinipes* foi estudada no Núcleo Santa Virgínia, bases Santa Virgínia e Vargem Grande, situadas respectivamente nos municípios de São Luiz do Paraitinga e de Natividade da Serra no Estado de São Paulo. O clima dos locais é classificado como tropical temperado (Cwa *sensu*

Köppen). As médias anuais de precipitação e temperatura são de 1230 mm e 20,3 °C (média dos dois municípios), respectivamente (Miranda *et al.* 2008). A área de estudo de *E. crinipes* reside em Natividade da Serra, próxima ao Rio do Calçado, na Trilha do Corcovado (próximo a 23°26'08''S e 45°13'22,5''W, Figura 1D). Também foi estudado um indivíduo na trilha do Rio Ipiranga (23°19'55''S e 45°05'49''W), Núcleo Santa Virgínia, município de São Luiz do Paraitinga. A vegetação predominante é Floresta Ombrófila Densa Montana (Velooso *et al.* 1991, Figura 1D).



**Figura 1.** Mapa indicando os locais de estudo no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. **(A)**, hábitat e hábito das espécies estudadas **(B-E)**. **A.** Localização dos sítios de estudo de *Elleanthus brasiliensis* e *E. crinipes* em relação aos municípios adjacentes. **B.** Floresta Ombrófila Densa de Terras Baixas às margens do Rio da Fazenda, Núcleo Picinguaba, Ubatuba, área de ocorrência de *E. brasiliensis*. **C.** Touceiras de *E. brasiliensis* em tronco às margens do rio. **D.** Floresta Ombrófila Densa Montana, na Trilha do Corcovado, Núcleo Santa Virgínia, Natividade da Serra, área de ocorrência de *E. crinipes* e de *E. brasiliensis*. **E.** Touceira de *E. crinipes* (seta) em meio a outras ervas no solo da floresta.

## Fenologia

Foram feitas visitas mensais para definir o padrão fenológico de floração *sensu* Newstrom *et al.* (1994). Foram marcados e numerados 21 indivíduos de *E. brasiliensis* e seis indivíduos de *E. crinipes* para registrar os seguintes estados fenológicos: emissão de caules, emissão de folhas, senescência foliar, floração e frutificação seguindo metodologia em Borba & Braga (2003). Foram considerados indivíduos as touceiras formadas por um determinado conjunto de caules fixado ao forófito ou ao solo. O reduzido número de indivíduos de *E. crinipes* utilizado foi devido às dificuldades logísticas de acesso aos sítios de estudo e a baixa densidade populacional da espécie.

Os indivíduos de *E. brasiliensis* foram acompanhados mensalmente entre abril de 2007 e julho de 2008, enquanto os de *E. crinipes* o foram entre outubro de 2009 e setembro de 2010. Foram feitas observações de campo adicionais em *E. brasiliensis* nos anos de 2009 e 2010 para confirmar a sazonalidade da floração. Também foram consultadas exsicatas de ambas as espécies com material reprodutivo no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC). Para estimar a sincronia da fenofase de floração foi utilizado o índice de atividade, que avalia a presença ou ausência de determinado evento fenológico nos indivíduos, demonstrando a proporção de indivíduos em percentagem de uma população que está manifestando determinado evento fenológico (Bencke & Morellato 2002). O pico de intensidade do evento foi considerado como o período em que o número máximo de indivíduos da amostra apresentou determinada fenofase.

## Biologia floral

Em ambas as espécies o horário, sequência e duração da antese, presença de odor e receptividade do estigma foram determinados diretamente no campo (Dafni *et al.* 2005; Borba & Braga 2003).

Para a detecção de células em ativas na superfície do labelo, 20 flores de dois indivíduos de *E. brasiliensis* (10 de cada indivíduo) e 10 flores de um indivíduo de *E. crinipes* foram mergulhadas em solução de vermelho neutro, diluído em água na proporção de 1g.L<sup>-1</sup> (Vogel 1983), durante cinco minutos. A seguir, as flores foram lavadas em água corrente para verificar as regiões coradas, que indicam a presença de osmóforos.

A fim de verificar a presença de açúcares na mucilagem de *E. brasiliensis in situ* foi utilizado refratômetro manual. Botões e flores em todas as fases de antese foram coletados e fixados em etanol 70% para estudos de morfologia floral.

Em flores de ambas as espécies, previamente ensacadas na fase de botão com sacos de organza de náilon, o volume total de néctar foi quantificado com auxílio de micro-seringas em 72 flores distribuídas em sete indivíduos em *E. brasiliensis* e 10 flores distribuídas em dois indivíduos em *E. crinipes*. A concentração de açúcares no néctar foi aferida com auxílio de refratômetro manual (*E. brasiliensis*, n = 66 e *E. crinipes*, n = 7) (Dafni *et al.* 2005, Borba & Braga 2003). Ainda, em flores ensacadas de *E. brasiliensis* (n = 72) e classificadas, com base na abertura e na turgescência das fimbrias do labelo, como flores de primeiro dia (n = 29), segundo (n = 39) e terceiro (n = 4), foram feitas medidas para verificar diferenças na produção de néctar. Não foi possível medir a produção de néctar de uma mesma flor ao longo de sua vida funcional, pois as retiradas do néctar com micro-seringas danificam a flor e provocam a sua senescência. Em flores não ensacadas o volume e a concentração do néctar *standing-crop* foi medido (*E. brasiliensis*, n = 10 e n = 6, respectivamente) em horários diferentes para obter os valores da disponibilidade de néctar mediante condições naturais, ou seja, mediante sua utilização pelos visitantes florais (Pleasants & Zimmerman 1983). O número de medidas de concentração foi menor que o de medidas de volume, pois algumas vezes o volume de néctar coletado não era suficiente para a leitura com o refratômetro.

Os resultados foram analisados utilizando o pacote estatístico Minitab (Alin 2010). Para analisar os dados de volume e concentração, foi utilizada análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de Tukey com um intervalo de confiança (IC) de 95%.

O néctar de ambas as espécies foi analisado a fim de se obter a composição química dos açúcares (Galletto & Bernardello 2005). A proporção de açúcares ( $r$ ) e de hexoses ( $hr$ ) foi calculada como segue, de acordo com Baker & Baker (1983a):

$$r = \text{sacarose}/(\text{glicose} + \text{frutose})$$

$$hr = \text{glicose}/\text{frutose}$$

A quantidade de açúcares aproximada (em mg de sacarose) disponível nas amostras analisadas foi obtida através do cálculo do produto do volume pela concentração e pelo fator de correção determinado pela equação:

$$y = 0,00226 + (0,00937x) + (0,0000585x^2)$$

onde o valor de  $x$  é igual a concentração obtida pelo refratrômetro. A partir da quantidade de açúcar foi possível calcular a energia contida no néctar (Galletto & Bernardello 2005).

### **Sistema reprodutivo e compatibilidade interespecífica**

O sistema reprodutivo foi determinado em campo com a realização de testes de polinizações controladas (conforme Radford *et al.* 1974; Borba & Braga 2003; Pansarin & Amaral 2006). Os testes realizados foram: *agamospermia* – flores tiveram as polínias retiradas e foram ensacadas; *polinização cruzada manual*- polínias provenientes de flores de indivíduos diferentes foram transferidas para o estigma de flores emasculadas, de outros indivíduos; *autopolinização manual* – polínias foram depositadas no estigma da própria flor; *autopolinização espontânea* - botões florais foram ensacados sem tratamento posterior; *controle* - foram marcados botões destinados a verificar a formação de frutos sob condições naturais.

Em *E. brasiliensis*, cada um dos tratamentos correspondentes aos testes foram distribuídos em diversos indivíduos como segue: *agamospermia* – três; *polinização cruzada manual* – três; *autopolinização manual* – dois; *autopolinização espontânea* – dois; *controle* (condições naturais) – nove indivíduos. No entanto, em *E. crinipes*, devido à dificuldade de acesso às plantas no campo, todos os tratamentos foram feitos em dois indivíduos.

Cerca de cinco meses após a realização dos tratamentos, os frutos de *E. brasiliensis* resultantes foram coletados e sua massa fresca foi pesada em uma balança de precisão AND® HR-200. Os frutos foram secos em estufa (circulação de ar forçada, a 60° C por 48 h) e a seguir sua massa seca também foi pesada. Os dados de massa fresca e seca foram testados para sua normalidade através do teste de Ryan-Joiner. Para detectar e analisar, respectivamente, as diferenças nos pesos dos frutos de acordo com o tratamento dos experimentos de polinização, comparando os valores centrais de massa fresca e seca foi utilizado o teste para dados com distribuição livre de Kruskal-Wallis (*H*) e o teste do sinal. As análises estatísticas foram rodadas com o pacote estatístico Minitab (Alin 2010).

Para avaliar a possibilidade de cruzamentos interespecíficos, no local de co-ocorrência das duas espécies foram realizados cruzamentos entre três indivíduos de *E. crinipes* e um de *E. brasiliensis*. Foram feitas deposições de polínias de *E. crinipes* em estigmas de *E. brasiliensis* (n=11) e deposições de polínias de *E. brasiliensis* em estigmas de *E. crinipes* (n=10).

### **Eficiência na transferência de pólen**

Em *E. brasiliensis* as taxas de remoção e deposição de polinários foram anotadas de acordo com o seguinte: polinário intacto, polinário removido e polinário depositado na superfície estigmática. Durante o período de pico de floração, no mês de fevereiro de 2008, foram observadas todas as flores de três indivíduos de uma população totalizando 62 flores. Este estudo foi feito em dois dias com um intervalo de uma semana entre os dias de observação, para evitar repetir observações na mesma flor. Assim, foi possível estimar o sucesso reprodutivo feminino (SRF) e o sucesso reprodutivo masculino (SRM), como também a eficiência na transferência de pólen (ETF) ou a eficiência do serviço de polinização. Para as estimativas, foram utilizadas as seguintes fórmulas (modificado de Peter & Johnson 2009):

$$\text{SRF} = (\text{polinários depositados}/\text{total de flores}) \times 100$$

$$\text{SEM} = (\text{polinários removidos}/\text{total de flores}) \times 100$$

$$\text{ETF} = (\text{polinários depositados}/\text{polinários removidos}) \times 100$$

Foram contabilizados como tendo polinários depositados, apenas as flores que continham polinários inteiros visivelmente fixados ao estigma.

### **Visitantes florais e polinizadores**

As observações dos visitantes florais foram feitas periodicamente, durante os meses de floração, abrangendo o período diurno e crepuscular da antese floral. Foram observados grupos de três ou mais indivíduos, pois as espécies ocorrem em manchas. *E. brasiliensis* foi observada durante os períodos de floração de 2008 (janeiro a março), 2009 (janeiro) e 2009/2010 (dezembro a janeiro). *E. crinipes* foi observada somente em janeiro de 2010. Foram totalizadas 64 horas de observações, das 06:00h às 18:00h, para *E. brasiliensis* e 12 horas, das 9:00h às 15:00h para *E. crinipes*. Em *Elleanthus brasiliensis*, também foram realizadas observações crepusculares, das 18h às 19h. Os visitantes florais que removeram polínias foram considerados polinizadores (Borba & Braga 2003). As horas de observações em *E. crinipes* foram menores devido ao difícil acesso às plantas (três horas de caminhada para chegar às populações) e às condições adversas do clima como, ameaça de chuva e intensa cerração pela neblina impedindo a continuidade dos estudos.

As frequências relativas dos visitantes foram estimadas a partir das observações, contando quantos minutos do tempo de observação determinados visitantes estavam presentes, uma vez que não era possível estimar o número exato de visitas das abelhas *Trigona* sp. que, em determinados dias, permaneciam dezenas de minutos em um único indivíduo, com várias abelhas visitando o mesmo indivíduo simultaneamente. Assim sendo, uma visita longa por abelhas, contabilizava várias unidades, uma para cada minuto em que foram observadas abelhas nas flores. No caso dos outros visitantes (beija-flores e borboletas, por exemplo) as visitas duravam menos de um minuto, e cada visita era registrada como uma unidade. Além disso, foram contados quantos indivíduos do grupo de *E. brasiliensis* e de *E. crinipes* eram visitados a cada observação de visitante. Também foi verificada a ação da mucilagem que envolve as flores de *E. brasiliensis* sobre as atividades dos visitantes florais.

O comportamento dos visitantes foi interpretado através de observação visual direta ou da análise de imagens digitais. Os insetos visitantes foram capturados com rede entomológica, sacrificados em câmaras mortíferas com acetato de etila e devidamente registrados com o nome ou

número da planta visitada, assim como o horário de coleta. Após este processo os espécimes foram montados e etiquetados para posterior identificação. Visitantes florais não capturados foram fotografados para posterior identificação, feita com auxílio de literatura especializada e através de comparações com coleções de referência do Museu de Zoologia da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC) ou com auxílio de especialistas quando necessário. Após a identificação, os insetos foram depositados na coleção do referido museu. Os materiais testemunhos das plantas foram depositados no Herbário UEC.

## RESULTADOS

### Hábito e Fenologia

As espécies *E. brasiliensis* e *E. crinipes* possuem hábito cespitoso (Figura 1C e E). Os indivíduos de *E. brasiliensis* são epifíticos, enquanto os de *E. crinipes* podem ser epifíticos ou terrícolas. Com relação à fenofase vegetativa estas espécies apresentam crescimento durante todo o ano com desenvolvimento contínuo de novos caules (não sendo possível a distinção de uma época de pico de crescimento) e constante renovação das folhas, uma vez que a emissão e queda também ocorrem ao longo do ano (Tabela 1). Por outro lado, as fenofases reprodutivas, de floração e frutificação, ocorrem uma vez ao ano, quando os caules maduros de uma touceira produzem flores em seu ápice. Cada caule produz apenas uma inflorescência.

A floração de ambas as espécies ocorre de janeiro a março, com um pico de fevereiro a março em *E. brasiliensis* e em fevereiro o de *E. crinipes* (Tabela 1). A fase de frutificação destas espécies se estende de fevereiro a setembro e o pico de deiscência dos frutos ocorre de junho a agosto (Tabela 1).

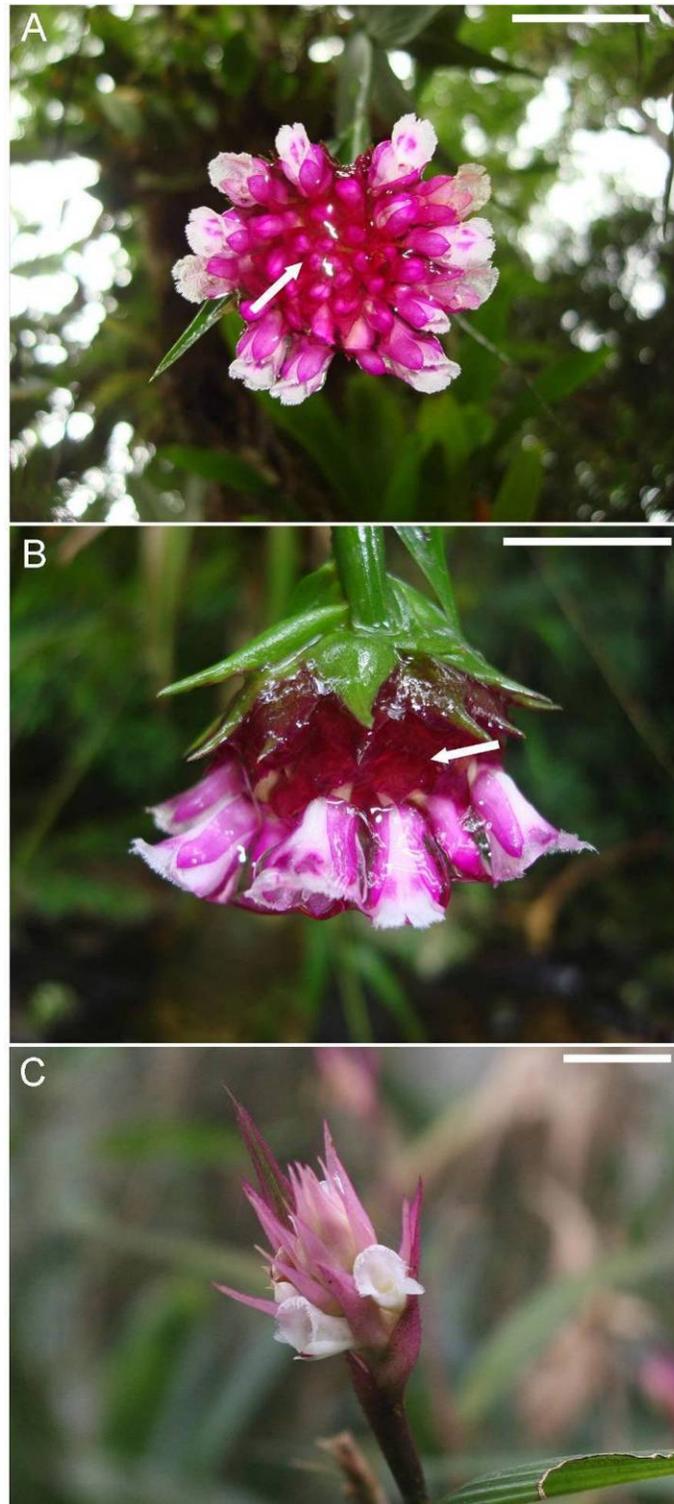
**Tabela 1.** Fenofases de *Elleanthus brasiliensis* e *E. crinipes* (entre parêntesis) no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. - indica a ocorrência do evento fenológico e X indica o pico de intensidade do evento (no caso de frutificação, indica o pico de deiscência dos frutos). Por fenofases vegetativas entenda-se emissão de caules, de folhas e senescência foliar.

Evento	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez
Fenofases vegetativas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Floração	- (-)	X(X)	X(-)									
Frutificação		- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	X(X)	X(X)	- (-)			

## Biologia floral

Ambas as espécies possuem inflorescências espiciformes: em *E. brasiliensis* a espiga é congesta e globuliforme e em *E. crinipes* a espiga é laxa e alongada. Os caules com inflorescências são pendentes em *E. brasiliensis* e eretos em *E. crinipes* com as flores em disposição espiralada. As brácteas florais são pouco desenvolvidas, não ultrapassando as flores, e avermelhadas em *E. brasiliensis*. Estas são bem desenvolvidas, ultrapassando o comprimento das flores, de coloração levemente rosada em *E. crinipes* (Figura 2A-C).

A presença de uma espessa camada de substância gelatinosa recobrindo as brácteas florais, a base das flores abertas e os botões florais, chamou a atenção nas inflorescências de *E. brasiliensis* (Figura 2A-B, setas), sendo uma característica distintiva entre as duas espécies.



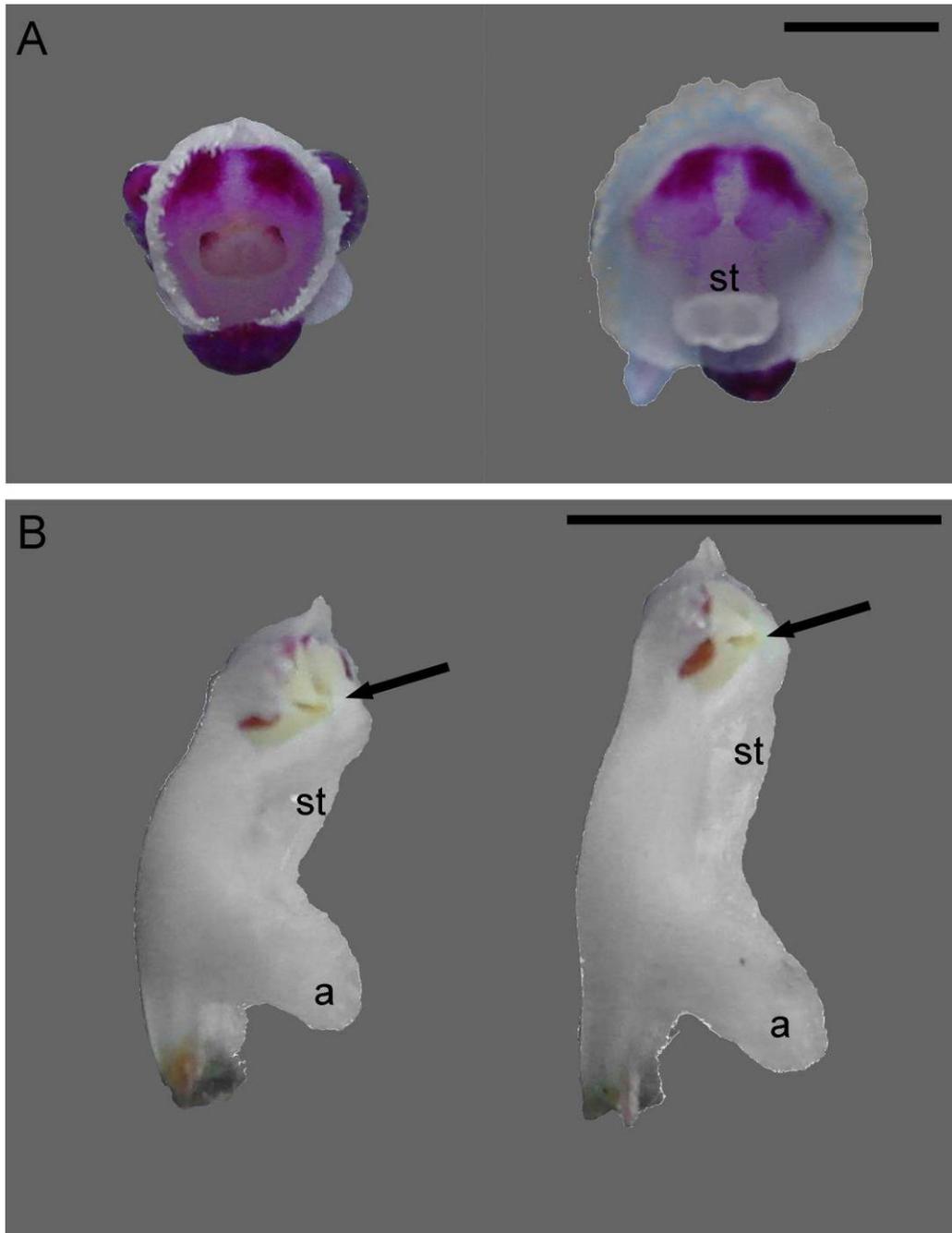
**Figura 2.** Inflorescências de *Elleanthus brasiliensis* e *E. crinipes* (A-C) no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. **A.** Inflorescência de *E. brasiliensis* com botões encobertos pela mucilagem (seta). **B.** Vista lateral da inflorescência de *E. brasiliensis* evidenciando a mucilagem na base das flores (seta). **C.** Inflorescência de *E. crinipes* com brácteas vistosas e sem mucilagem. Barras de escala: A = 3 cm, B = 2 cm, C= 1 cm.

As inflorescências de *E. brasiliensis* são cobertas por mucilagem, mas por ocasião da antese as flores são expostas acima da mucilagem (Figura 2A e B, setas). O teste com refratômetro manual não detectou açúcares dissolvidos na mucilagem. As flores são ressupinadas de maneira que o labelo se encontra na parte superior da flor e a coluna na parte inferior (Figuras 2A e B, 8A), as sépalas possuem coloração rosada com pétalas e labelo brancos com duas manchas lilases no labelo (Figuras 2A, 3A). O labelo apresenta um calo na base (Figura 7A) que é responsável pela secreção do néctar. Além disso, a coluna possui um apêndice que se projeta em direção ao labelo (Figura 3B, 8A), protegendo o calo e formando uma câmara nectarífera (Figura 7A). A antera é operculada, de cor branca e violácea, e porta um polinário composto por oito polínias de cor branca.

Em *E. brasiliensis*, as flores abrem seqüencialmente da parte basal para a parte apical da inflorescência e são produzidas 12-55 flores por inflorescência (n=18) que, por sua vez, pode portar de 1 a 10 flores abertas simultaneamente. Não há horário predominante para a ocorrência da abertura completa da flor, havendo flores disponíveis em diferentes estágios de antese durante todas as horas do dia. As flores têm duração de dois a quatro dias, sendo que durante o primeiro dia da antese apresentam o labelo enrolado simulando um tubo estreito (ca. 7 mm de diâmetro) que se torna mais amplo (ca. 11 mm de diâmetro) a partir do segundo dia (Figura 3A). Ao longo do primeiro dia ocorre um tipo de protandria que consiste na apresentação apenas das polínias e a partir do segundo dia ocorre o crescimento e alongamento da coluna expondo a superfície estigmática (Figura 3A, B).

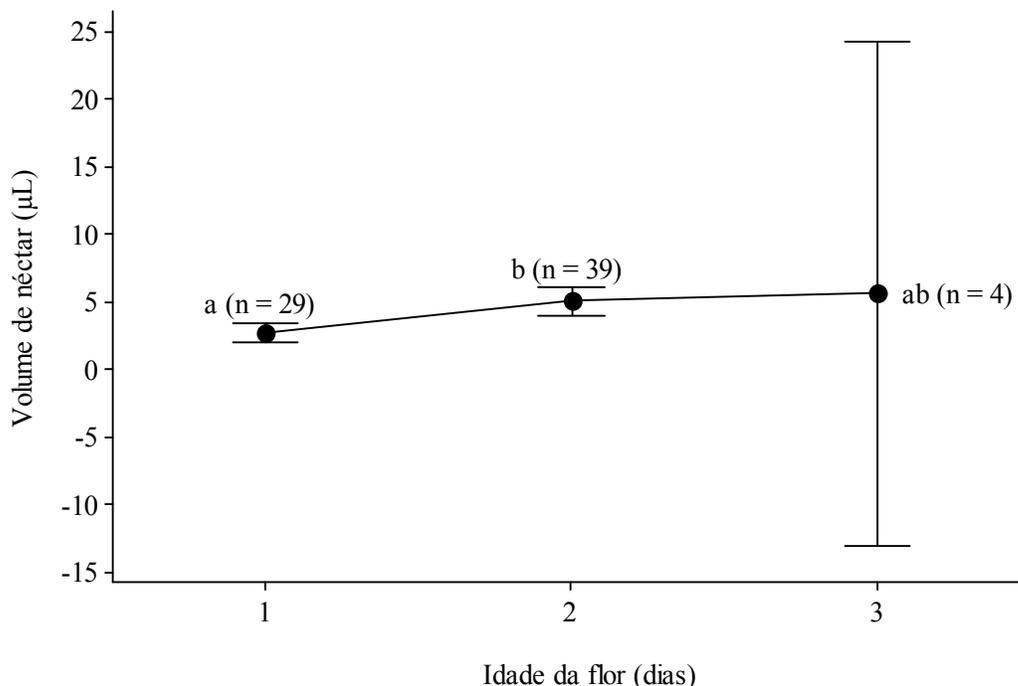
A região estigmática, embora receptiva desde a fase de botão até a de senescência, não está acessível aos visitantes no primeiro dia, pois esta fica voltada para o labelo, impedindo a deposição de pólen pelos visitantes. Ao segundo dia, a coluna se alonga e expõe a superfície estigmática aos visitantes florais. No final do terceiro dia inicia-se o processo de fenecimento que se caracteriza pela perda de turgidez das fimbrias do labelo. Quando não fertilizadas, as flores fenecidas podem se desprender ou permanecer presas às brácteas florais.

As flores de *E. brasiliensis* imersas em solução de vermelho neutro tiveram apenas a superfície interna do labelo corada, indicando a existência de células em atividade. Entretanto, não foi detectado odor, que poderia resultar dessa atividade, em qualquer período da vida da flor.



**Figura 3.** Alterações na abertura do tubo floral e exposição da superfície estigmática em *Elleanthus brasiliensis* no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. **A.** Flores em vista frontal evidenciando mudanças no diâmetro da abertura do tubo floral e exposição da superfície estigmática. **B.** Colunas em vista lateral mostrando alterações no formato (curvatura) e comprimento da coluna. Setas indicam o viscido; a = apêndice da coluna; st = superfície estigmática. Direita, flor de primeiro dia; esquerda, segundo dia. Barras de escala: A = B = 5 mm.

As flores de *E. brasiliensis* apresentam volume total de néctar de  $4,15 \pm 2,93 \mu\text{L}$  ( $n = 72$ ) com concentração de açúcares de  $21,11 \pm 5,27 \%$  ( $n = 66$ ) (Tabela 2). Houve variação significativa no volume de néctar entre flores de primeiro e segundo dia, sem diferenças entre as de segundo e terceiro dia (Tukey, IC = 95%) (Figura 4). Portanto, pode-se dizer que há uma tendência de produção contínua seguida de uma estabilização no final da antese da flor, sem reabsorção de néctar, uma vez que o volume de néctar aumentou até o segundo dia de antese e se estabilizou ao terceiro dia (Figura 4). Não houve variações significativas na concentração do néctar entre flores de primeiro e segundo ou terceiro dia (Tukey, IC = 95%). O volume *standing crop* foi pouco menor,  $3,05 \pm 2,09 \mu\text{L}$  ( $n = 10$ ) que o volume total, mas a concentração de açúcares foi bastante semelhante,  $21,27 \pm 6,35\%$  ( $n = 6$ ). Ambos os valores não diferiram significativamente dos valores de flores ensacadas ( $t = 1,48$ ;  $g.l. = 14$ ;  $P = 0,16$ ;  $t = -0,06$ ;  $g.l. = 5$ ;  $P = 0,95$ ; respectivamente). A composição química de açúcares evidenciou um néctar dominado por sacarose (mais de 90%). O restante dos solutos é composto por frutose e glicose (menos de 10%), sendo a concentração de frutose um pouco maior que a de glicose (Tabela 2).



**Figura 4.** Variação no volume de néctar das flores de *Elleanthus brasiliensis* com diferentes idades inferidas pelas características do labelo, no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. Médias com intervalos de confiança (IC) de 95%. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa no teste de Tukey (IC = 95%).

As inflorescências de *E. crinipes* não apresentam mucilagem evidente. As flores não são ressupinadas e estão dispostas em diversas posições, com seus labelos voltados para o eixo da inflorescência, às vezes formando um círculo de flores em torno deste eixo (Figura 2C). As flores são menores que as de *E. brasiliensis*, com ca. de 1,2 cm de comprimento, e parcialmente envolvidas por brácteas de cor rosa claro (Figura 2C) e têm a forma de um pequeno tubo com ca. de 6 mm de diâmetro não havendo alterações no diâmetro perceptíveis no decorrer da antese. As pétalas e o labelo apresentam coloração creme, as oito polínias apresentam coloração branca ou creme e o restante da antera operculada é violeta, formando uma mancha que indica a entrada do tubo. O labelo possui o calo nectarífero na base, entretanto, a coluna não apresenta o apêndice (Figura 7E) característico de *E. brasiliensis*, e o néctar se acumula em gotículas ao redor do calo. Também ocorre protandria e o estigma se apresenta receptivo desde a fase de botão até o fim da antese, mas é acessível aos visitantes apenas a partir do segundo dia de antese, devido ao alongamento da coluna. A abertura das flores dá-se em seqüência da parte basal para a parte apical da inflorescência e são produzidas 12-29 flores/inflorescência (n=13). As flores têm duração de dois a quatro dias e uma inflorescência pode conter de 1 a 8 flores em antese simultaneamente. Não foi observada a presença de regiões com células em atividade através do teste do vermelho e não foi detectado odor em qualquer fase de vida da flor.

Foi registrado volume total de néctar de  $3,00 \pm 2,12 \mu\text{L}$  ( n = 10) e concentração de açúcares de  $20,41 \pm 7,34 \%$  (n = 7) (Tabela 2). Portanto, o néctar tem volume e concentração semelhantes aos de *E. brasiliensis* ( $t = 1,53$ ;  $g.l. = 14$  ;  $P = 0,15$ ;  $t = 0,24$  ;  $g.l. = 6$ ;  $P = 0,82$ ; respectivamente; Tabela 2), caracterizando um recurso escasso. Nesta espécie a composição química de açúcares do néctar é semelhante à de *E. brasiliensis* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Volume do néctar e concentração de açúcares em *Elleanthus brasiliensis* e *E. crinipes* no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. Valores médios seguidos do desvio padrão. Entre parêntesis, quantidade de flores. Para volume e concentração de néctar, valores seguidos de letras iguais, na linha ou na coluna, não diferiram significativamente pelo teste *t*. A proporção de açúcares é dada por *r* e *a* de hexoses por *hr*.

Espécie	Volume de néctar (µL)	Concentração de açúcares (%)	Volume <i>standing crop</i> (µL)	Concentração <i>standing crop</i> (%)	Glicose (%)	Frutose (%)	Sacarose (%)	Massa de açúcares (mg)	Energia (cal)	<i>r</i>	<i>hr</i>
<i>E. brasiliensis</i>	4,15±2,93(72)ac	21,11±5,27(66)bd	3,05±2,09(10)c	21,27±6,35(6)d	1,46±3,03(3)	2,00±2,25(3)	96,55±5,28(3)	0,52	2,10	27,93	0,73
<i>E. crinipes</i>	3±2,12(10)a	20,41±7,34(7)b	-	-	2,13±1,93(2)	2,25±1,96(2)	95,63±3,89(2)	0,32	1,30	21,88	0,95

## Sistema reprodutivo e compatibilidade interespecífica

Quanto ao sistema de reprodução de *Elleanthus brasiliensis* e *E. crinipes* os resultados indicam que não ocorre agamospermia e nem autopolinização espontânea em ambas. As duas espécies são autocompatíveis, uma vez que formam frutos por autopolinização manual (Tabela 3). É interessante notar que a formação de frutos em condições naturais (controle) é bem mais baixa que a formação de frutos por polinização cruzada manual (Tabela 3).

Em *E. brasiliensis* houve maior formação de frutos no tratamento de autopolinização manual, seguida por polinização cruzada manual e controle, ao passo que em *E. crinipes*, maior formação de frutos ocorreu no tratamento de polinização cruzada manual, seguida por autopolinização manual e controle (Tabela 3). Contudo, em ambas as espécies, os tratamentos de autopolinização manual e polinização cruzada manual não apresentaram relação com a maior taxa de frutificação quando submetidos ao teste qui-quadrado (*E. brasiliensis*:  $\chi^2=1,16$ ; g.l. = 1;  $P = 0,28$ ; *E. crinipes*:  $\chi^2 = 2,06$ ; g.l. = 1;  $P = 1,15$ ). Por outro lado, nas duas espécies, os tratamentos mencionados acima mostraram relação com os maiores valores de frutificação, quando analisados junto ao controle, condições naturais (*E. brasiliensis*:  $\chi^2=105,92$ ; g.l. = 2;  $P < 0,001$ ; *E. crinipes*:  $\chi^2=28,39$ ; g.l. = 2;  $P < 0,001$ ).

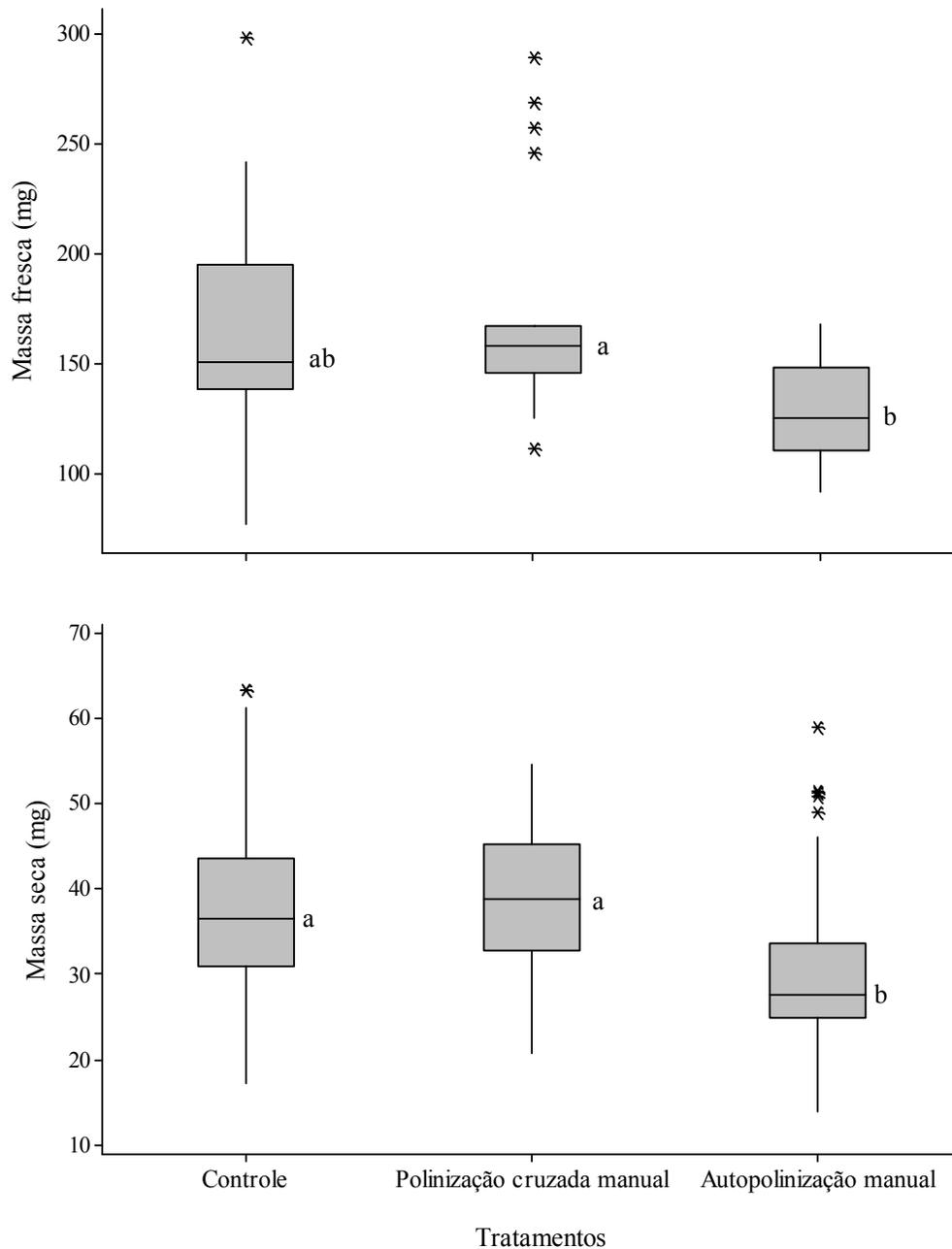
Ainda em *E. brasiliensis*, diferenças significativas foram encontradas entre os valores de massa fresca ( $H = 13,08$ ; g.l. = 2;  $P = 0,001$ ) e massa seca ( $H = 31,65$ ; g.l. = 2;  $P < 0,001$ ) dos diferentes tratamentos realizados. Especificamente com relação à massa fresca, frutos resultantes de condições naturais não diferiram significativamente nem dos de polinização cruzada manual nem dos de autopolinização manual, enquanto houve diferença significativa entre os valores destes dois últimos tratamentos pelo teste do sinal

IC = 95%). Por outro lado, a massa seca de frutos resultantes de condições naturais (controle) e de polinização cruzada manual apresentou valores significativamente maiores em relação aos resultantes de autopolinização manual, estes primeiros não diferindo entre si pelo referido teste (Figura 5).

As duas espécies co-ocorrem nas áreas acima de 800 m de altitude, com épocas de floração sobreposta e são expostas ao mesmo tipo de polinizador (beija-flores). Entretanto, cruzamentos interespecíficos experimentais entre as duas espécies não resultaram em híbridos (Tabela 3), tampouco foram observados indivíduos com características híbridas nas áreas estudadas.

**Tabela 3.** Resultados dos experimentos de polinizações controladas e formação de frutos em condições naturais (controle) de *Elleanthus brasiliensis* e *E. crinipes* no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. Os valores fora dos parênteses representam a percentagem da razão de frutos formados sobre flores tratadas. Entre parênteses consta o número de flores utilizadas em cada tratamento. Nos tratamentos “x *E. brasiliensis*” e “x *E. crinipes*” as espécies indicadas com (\*) foram receptoras de pólen para os cruzamentos interespecíficos.

Espécie	Tratamentos						
	Agamospermia (emasculadas e ensacadas)	Autopolinização espontânea (ensacadas)	Autopolinização manual	Polinização cruzada manual	Controle (condições naturais)	x <i>E.</i> <i>crinipes</i>	x <i>E.</i> <i>brasiliensis</i>
<i>E.</i> <i>brasiliensis</i> *	0(66)	0(160)	83,33(66)	75,76(66)	30,39(510)	0(11)	-
<i>E. crinipes</i> *	0(20)	0 (32)	42,31(26)	64,71(17)	16,73(245)	-	0(10)



**Figura 5.** Massa fresca e massa seca (mg) de frutos resultantes de *condições naturais* (controle, n=20 e n=153, respectivamente) e dos tratamentos de *polinização cruzada manual* (n=20 e n=44, idem) e *autopolinização manual* (n=20 e n=49, idem) de *Elleanthus brasiliensis* no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. De baixo para cima no eixo Y: valores mínimo, máximo, 1º quartil, mediana, 3º quartil. Asteriscos indicam valores discrepantes. Letras iguais indicam que não há diferenças entre os tratamentos e letras distintas que há diferenças significativas pelo teste do sinal com IC a 95%.

## Eficiência na transferência de pólen

Durante o período de pico de floração de *E. brasiliensis* foi observado um sucesso reprodutivo feminino de 12,9%, e masculino de 53,23% o que gerou uma eficiência na transferência de pólen de 24,24%, ou seja, esta é a proporção de polinários removidos que foram efetivamente transportados para os estigmas durante o período citado.

## Visitantes florais e polinizadores

Durante as observações às flores de *E. brasiliensis* foram registrados os seguintes visitantes (por ordem de maior frequência de visitação): abelhas *Trigona spinipes* (Meliponini, Figura 6A e B), beija-flores *Ramphodon naevius* (Phaethornithinae, Figura 6C) e *Thalurania glaucopsis* (Trochilinae, fêmea: Figura 6D, macho: Figura 6E), borboleta *Astraptes fulgerator* (Hesperiidae, Figura 6F) e a mosca-da-fruta (Tephritidae) (Tabela 4).

Também foram avistadas outras espécies de borboletas Hesperiidae e outros beija-flores *Florisuga fusca* e *Amazilia versicolor* (Trochilinae) como visitantes ocasionais e menos frequentes. Além destes, foram observadas formigas nas flores de algumas plantas que, devido ao seu diminuto tamanho (menor que 3 mm) foram descartadas como vetores capazes de remover e depositar polínias.

Entre os visitantes que realizaram visitas legítimas e contataram as partes reprodutivas as abelhas *Trigona spinipes*, embora bastante frequentes, foram observadas removendo polínias apenas durante um único dia, no início do período de floração (Tabela 4). Estas abelhas percorrem diversas partes da flor (Figura 6A) e ao entrar no tubo floral para tomar néctar contatam o viscidio e as polínias podem aderir na parte superior do tórax. Os indivíduos podem permanecer vários minutos em uma touceira, tendo um deslocamento lento entre flores e entre indivíduos (Tabela 4). Apesar disso, durante o pico de floração, foi observado que essas pequenas abelhas visitavam apenas as flores de segundo dia, cujo tubo possui maior abertura que as de primeiro dia, dessa forma não contatavam o viscidio e conseqüentemente não removiam o polinário em consequência do seu diminuto tamanho (Figura 6B). A atividade destas abelhas ocorria principalmente no período da manhã, mas se estendia ao longo do dia.

Por sua vez, os colibris efetuaram a remoção e/ou deposição de polínias no decorrer de todo o período de floração. *Ramphodon naevius* e *Thalurania glaucopsis* (Figura 6C, D, E) foram

avistados com frequência removendo polinários que aderem na ponta da mandíbula inferior do bico (Figura 7B).

A frequência de visitas dessas aves é relativamente baixa (Tabela 4), mas as visitas são curtas (não mais que 30 seg.) e resultam em um deslocamento rápido entre flores, inflorescências e indivíduos. Não foi notada preferência de visitas a flores em diferentes fases. As visitas se concentravam no período da manhã, sendo esparsas nas horas quentes do dia e à tarde aumentavam ligeiramente. De modo geral as visitas de *R. naevius* ocorriam em linhas de captura e foram comuns repetidas visitas ao mesmo grupo de indivíduos no mesmo dia. Nenhuma das espécies apresentou comportamento territorial, mesmo em indivíduos com mais de 20 inflorescências (Figura 1C). Ocasionalmente, alguns beija-flores, após uma série de visitas, pousavam em um ramo e tentavam limpar o bico, que carregava vários polinários, esfregando-o repetidamente contra o ramo. Entretanto, na maioria das visitas o beija-flor parecia não se incomodar nem interrompia uma série de visitas, devido à presença de polinários em seu bico.

A remoção dos polinários de *E. brasiliensis* pelos colibris é decorrente de um mecanismo de alavanca da coluna e ocorre quando a ponta de seu bico empurra o apêndice para trás (Figura 7A), fato que ocasiona o deslocamento da parte anterior da coluna, com o viscidio e o polinário, em direção à parte inferior do bico do beija-flor, ocasião em que os polinários aderem ao bico. Como a inflorescência é pendente e as flores estão dispostas em círculo, os beija-flores têm que contorná-la para visitar cada uma delas, o que ocasiona um mesmo tipo de abordagem às flores e, portanto, ocasiona a aderência dos polinários sempre na parte inferior do bico. A deposição de polínias na superfície estigmática também ocorre pelo mecanismo de alavanca. Este mecanismo só é possível graças à existência de um estreitamento da coluna entre a região do apêndice e sua ligação com o ovário. Em flores conservadas em etanol 70%, essa região mais estreita se mostrou mais flexível do que as demais partes da coluna, possibilitando o movimento da coluna.

Todos os visitantes avistados acessavam o néctar por vias legítimas, isto é, através do tubo floral formado pelo labelo e não foi observado interesse dos visitantes pela mucilagem, a qual sempre evitavam. No entanto, as cores vistosas das inflorescências refratadas pela mucilagem brilhante provavelmente atraíram aves frugívoras, pois foram encontradas inflorescências completamente destruídas, isto é, flores e botões arrancados.

Em *E. crinipes* foi observada uma visita do beija-flor *T. glaucopsis* (Figura 7D), o qual efetivamente removeu polínias, visitando as flores de várias inflorescências de um indivíduo. A

remoção dos polinários não ocorre pelo mecanismo de alavanca, uma vez que a coluna não apresenta o apêndice, apresentando a superfície adaxial plana e contínua em relação à superfície estigmática. A remoção de polinários é decorrente do fato do tubo floral ser estreito (mais do que em *E. brasiliensis*), mas com espaço suficiente para caber o bico do beija-flor que contata os polinários (Figura 7E). A deposição de polínias no estigma ocorre de modo semelhante ao da sua retirada.

Dependendo do comportamento na abordagem do beija-flor à inflorescência, a aderência dos polinários ocorre na parte superior do bico (Figura 7F) uma vez que a flor não é ressupinada. Entretanto, como a inflorescência é ereta e relativamente pequena, os beija-flores não necessitam contorná-la o que resulta em uma abordagem diferencial das flores e também a deposição diferencial dos polinários que pode ser na parte lateral ou inferior do bico.

Além de *T. glaucopsis*, foram observados na área de estudo os beija-flores *Clytolaema rubricauda*, *F. fusca*, *Leucochloris albicollis* (Trochilinae), outros possíveis polinizadores de *E. crinipes* e de *E. brasiliensis* que também ocorre nessa área. Nas áreas de maior altitude, não foram observadas visitas por abelhas e borboletas em *E. crinipes* e nem em *E. brasiliensis*. Aliás, nessa área não foram observadas abelhas do gênero *Trigona*, apenas abelhas de maior porte que visitavam flores de outras espécies.

Nas áreas de estudo de ambas as espécies, foi observado que os colibris avistados quando próximos a outras plantas ornitófilas, principalmente bromélias (*Nidularium* spp. e *Vriesia* spp., por exemplo) preferiam estas às *Elleanthus*.

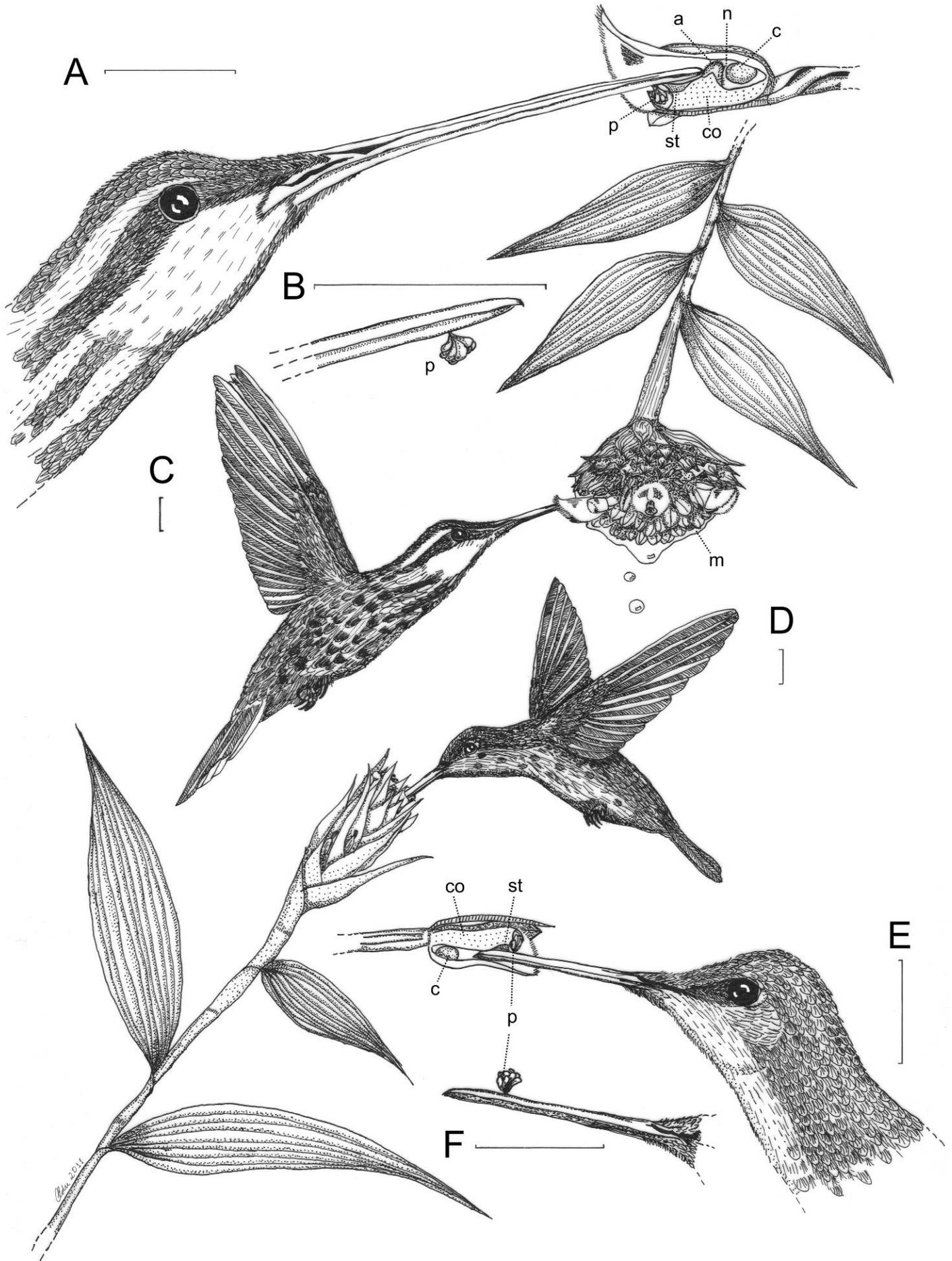
**Tabela 4.** Frequências relativas e número de indivíduos visitados por observação (média  $\pm$  desvio padrão) em *Elleanthus brasiliensis* no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo.

<b>Visitante</b>	<b>Frequência relativa de visitas (%)</b>	<b>Indivíduos visitados/observação</b>
<i>Trigona spinipes</i>	93,53	1
<i>Ramphodon naevius</i> *	3,45	1,31 $\pm$ 0,63
<i>Thalurania glaucopis</i> *	2,16	1,17 $\pm$ 0,41
Tephritidae	0,65	1
Hesperiidae	0,22	1

Os polinizadores atuantes durante todo o período de floração estão assinalados com \*, sendo *R. naevius* o principal polinizador. Visitantes que não apresentam desvio padrão da média de indivíduos visitados foram observados em apenas um indivíduo durante todas as observações de campo.



**Figura 6.** Visitantes florais de *Elleanthus brasiliensis* (A-E) no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. **A.** Abelhas *Trigona spinipes* em várias partes das flores. **B.** Detalhe da posição de *T. spinipes* para tomar néctar. **C.** Beija-flor *Ramphodon naevius* visitando inflorescência. **D e E.** Beija-flores *Thalurania glaucopsis* fêmea e macho, respectivamente em visitas às inflorescências. **F.** Borboleta *Astraptes fulgerator* em visita à flor. Barras de escala: A = B = 1 cm; C = D = E = 10 cm; F = 2 cm.



**Figura 7.** Visitas de beija-flores às flores de *Elleanthus brasiliensis* e *E. crinipes*, detalhes das relações dos bicos com as flores (em cortes longitudinais) e das polínias aderidas aos bicos (**A-F**) no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. **A.** Relação do bico de *Ramphodon naevius* com a flor de *E. brasiliensis*: notar o contato da ponta do bico com o apêndice do labelo. **B.** Detalhe do bico de *R. naevius* com polínias aderidas na parte inferior do bico. **C.** Visita de *Thalurania glaucopis* (fêmea) à flor de *Elleanthus brasiliensis*. **D.** Visita de *T. glaucopis* (macho) à flor de *E. crinipes*. **E.** Relação do bico de *T. glaucopis* com a flor de *E. crinipes*: notar que não há apêndice na coluna e o tubo floral é estreito. **F.** Detalhe do bico de *T. glaucopis* com polínias aderidas na parte superior do bico. Barras de escala de 1 cm, a = apêndice da coluna, c = calo do labelo, n = câmara nectarífera, co = coluna, p = polinário, m = mucilagem, st = superfície estigmática.

## DISCUSSÃO

### Fenologia

Temperaturas amenas e a disponibilidade de água, como é o caso na Mata Atlântica do litoral norte do estado de São Paulo, permitem uma fenofase vegetativa contínua de *E. brasiliensis* e *E. crinipes* ao longo do ano. Além disso, o hábito cespitoso dessas espécies favorece o desenvolvimento de ramos em várias fases da planta, de modo que durante o período de floração há ramos com flores e outros em crescimento. A floração do tipo anual (no conceito de Newstrom *et al.* 1994) de ambas as espécies é uma característica comum à maioria das espécies de Orchidaceae (Dressler 1993; Pridgeon *et al.* 2006).

A fenologia reprodutiva das duas espécies ocorre no verão, quando a estação, com dias mais longos, propicia maior incidência de luz e maiores índices de umidade atmosférica e de pluviosidade. Esta estratégia, de acordo com Miller *et al.* (1996) e Pansarin & Pansarin (2008), coincide com a da maioria das espécies de Orchidaceae na Mata Atlântica que floresce na estação chuvosa, que abrange a primavera e o verão.

### Biologia floral

As brácteas vistosas, avermelhadas em *E. brasiliensis* e rosadas em *E. crinipes*, contrastam com a cor das flores e, de acordo com Van der Pijl & Dodson (1966) atuam na atração

de aves, visitantes visualmente orientados. Nas duas espécies, o padrão de cores, assim como sua forma e disposição na inflorescência assemelham-se aos de bromélias ornitófilas (*Tillandsia stricta*, *Nidularium* spp., por exemplo) e são características associadas à polinização por beija-flores. Com exceção de espécies polinizadas por engano, a curta duração das flores em Orchidaceae é comum como na maioria das plantas (Primack 1985) e pode ser influenciada pelos eventos de polinização que tem o efeito de acelerar a senescência (Strauss & Arditti 1984).

Em ambas as espécies a protandria influencia na remoção e deposição de polinários, uma vez que em flores de primeiro dia, há maior probabilidade da retirada em detrimento da deposição e nas de segundo dia, são maiores as chances de deposição dos polinários no estigma.

Este tipo de protandria, caracterizado pela mudança de formato da coluna e conseqüente exposição da superfície estigmática a partir do segundo dia, já foi descrito por Singer (2003) para *E. brasiliensis*, mas não era conhecido para *E. crinipes*. Não se trata de um mecanismo comum em orquídeas. Estudos apontam que não só a protandria, como também a abertura em seqüência das flores, além de outros mecanismos, seriam características que favoreceriam a polinização cruzada em orquídeas autocompatíveis (Johnson & Edwards 2000; Tremblay *et al.* 2006).

O local de fixação dos polinários de *E. brasiliensis* na parte inferior do bico do beija-flor pode ser vantajoso, pois provavelmente torna a visualização dos polinários mais difícil evitando que os beija-flores limpem o bico. Contudo, os animais podem perceber a presença dos polinários em seus bicos de outra forma que não a visual, o que os levaria a pousar para limpar o bico. No entanto, os beija-flores geralmente visitam certo número de flores antes de limpar o bico (Sick 1984; Canela & Sazima 2003). Por outro lado, em *E. crinipes* a fixação dos polinários - com exceção de deposições na parte inferior e lateral do bico - ao ocorrer na parte superior do bico do beija-flor a limpeza do bico pode estar interferindo no sucesso reprodutivo da espécie.

Os resultados de volume de néctar e formação de frutos e suas prováveis implicações na evolução dessas plantas podem ser interpretados de pelo menos duas maneiras, de acordo com a literatura sobre produção de néctar e frutificação em Orchidaceae (Ackerman *et al.* 1994; Galetto *et al.* 1997; Rodríguez-Robles *et al.* 1992; Smithson & Gigord 2001).

A primeira interpretação seria a de que o pouco volume de néctar dos *Elleanthus* estudados - um recurso escasso, segundo Ackerman *et al.* (1994) - seria responsável por baixas freqüências de visitação pelos polinizadores que ocasionariam uma produção de frutos muito

abaixo (cerca de 50%) da potencial (obtida por polinizações manuais). Isto ocorreria porque, durante o período de floração, muitas outras plantas produtoras de néctar (Bromeliaceae, Lobeliaceae e Heliconiaceae, por exemplo) estão em flor oferecendo recursos muito mais ricos em energia que o oferecido por *Elleanthus* (ver apêndice de Buzato *et al.* 2000). Os polinizadores prefeririam então visitar outras plantas na maior parte do tempo de seu forrageamento, deixando *Elleanthus* em segundo plano. De fato, foi observada uma preferência dos beija-flores por bromélias: quando estas se localizavam ao lado de *E. brasiliensis* e *E. crinipes*, estas últimas eram ignoradas na maioria das visitas dos animais ao local observado.

A segunda alternativa seria a de que o volume de néctar de ambas as espécies, mesmo baixo, mas contínuo até o final da antese, atrairia visitantes o bastante para garantir uma produção de frutos abaixo do potencial para aquela estação, mas garantindo o máximo potencial reprodutivo ao longo de toda a vida da planta. Isto poderia ocorrer porque, em outras orquídeas Epidendroideae, que sobrevivem em habitats com uma grande limitação de nutrientes, a produção de frutos representa um gasto muito grande de energia, que ocasionaria um atraso no crescimento e uma menor floração e frutificação nos anos subseqüentes (Montalvo & Ackerman 1987; Zimmerman & Aide 1989; Ackerman & Montalvo 1990; Salguero-Farías & Ackerman 1999). Esta interpretação condiz com a idéia de que o melhor ajustamento seria obtido quando a planta produzisse o volume mínimo de néctar que atraísse seus polinizadores, presente no trabalho de Lanza *et al.* (1995). Além disso, comparada com a de outras orquídeas Epidendroideae, a percentagem de frutificação é relativamente alta em condições naturais: mais de 15% nas duas espécies, valores comparáveis aos que Ackerman *et al.* (1994) obteve em *Comparettia falcata*, uma orquídea epífita polinizada por beija-flores e que oferece volumes de néctar diários de 3,3-4,0  $\mu\text{L}$  (Rodríguez-Robles *et al.* 1992).

Em termos de evolução, as duas alternativas acima são plausíveis tendo em conta que existem outros gargalos no sucesso reprodutivo de orquídeas além do serviço de polinização ou da produção de frutos e sementes, como germinação e estabelecimento das plântulas (Ackerman *et al.* 1996; Bidartondo & Read 2008). Entretanto são necessários mais estudos – como estudos de adição de néctar e acompanhamento das populações por um maior período (pelo menos dois anos) – para aceitar ou refutar qualquer das hipóteses para explicar o volume de néctar e as taxas de frutificação nas espécies estudadas.

Ademais, a apresentação de néctar escasso característica de ambas as espécies deste estudo também pode ser encontrada em outras orquídeas ornitófilas como, por exemplo,

*Comparettia falcata* (Rodríguez-Robles *et al.* 1992; Ackerman *et al.* 1994), mas não se trata de uma regra para Orchidaceae pois outra orquídea ornitófila, *Sacoila lanceolata* (Aubl.) Garay, produz néctar em quantidades muito maiores (Galetto *et al.* 1997). Entretanto, o reduzido volume de néctar nas espécies de *Elleanthus* estudadas pode ser considerado uma característica favorável, pois: (1) induz os beija-flores a visitar diversas flores e diferentes indivíduos e, (2) não favorece comportamento territorial; estes aspectos contribuem para o fluxo de pólen entre indivíduos resultando em maiores taxas de xenogamia ao invés de geitonogamia. Resultado semelhante foi obtido em estudos de adição de néctar em espécies de orquídeas polinizadas por engano, nas quais a apresentação de pouco ou nenhum recurso pode ser vantajoso, aumentando a xenogamia e reduzindo a geitonogamia (Johnson & Nilsson 1999; Johnson *et al.* 2004; Smithson & Gigord 2001; Jersáková *et al.* 2006).

Os resultados de concentração de néctar nas espécies estudadas confirmam os de estudos anteriores (Bernardello *et al.* 1991; Buzato *et al.* 2000; McDade 2004; Leal *et al.* 2006) nos quais uma concentração de néctar de 15 a 30% e a predominância de sacarose é considerada uma característica de plantas polinizadas por beija-flores, diferente do que ocorre em plantas polinizadas por outras aves (Johnson & Nicolson 2008). Com relação à composição, o néctar destas espécies de orquídeas pode ser classificado como ‘dominado por sacarose’ ou ‘*sucrose dominated*’, segundo Baker & Baker (1983b, 1990). Ainda de acordo com estes autores, este tipo de néctar é característico de plantas polinizadas por grandes abelhas, beija-flores e/ou borboletas.

Apesar das evidências de glândulas em atividade secretora no labelo de *E. brasiliensis*, a presença de odor, mesmo imperceptível ao olfato humano, é pouco provável, uma vez que apenas foram observados visitantes florais visualmente orientados (beija-flores) ou insetos generalistas e oportunistas, que também se orientam visualmente, como as abelhas do gênero *Trigona* (Villa & Weiss 1990) e borboletas Hesperiiidae (Wiesenborn 2010), por exemplo. Além disso, características como tubo floral relativamente curto (18 mm) e largo (até 11 mm) e a presença de néctar tornam as flores de *E. brasiliensis* atrativas e acessíveis a essa diversidade de visitantes. No entanto, segundo Van der Pijl & Dodson (1966), outras características como, ausência de plataforma de pouso, cor avermelhada e contrastante e novamente o odor imperceptível apontam para a existência de adaptação à ornitofilia.

## Sistema reprodutivo compatibilidade interespecífica

A formação de frutos em condições naturais (*E. brasiliensis* = 30,39%; *E. crinipes* = 16,73%) não difere muito daquela observada em outras espécies de orquídeas tropicais que oferecem néctar como recurso aos visitantes, apresentando em média 24,9% de formação de frutos, podendo variar de 17 a 41% (Neiland & Wilcock 1998).

Por outro lado, os tratamentos de autopolinizações e polinizações cruzadas manuais tiveram maiores percentagens de frutificação em relação ao de condições naturais (cerca de 50% mais frutos) em ambas as espécies, o que evidencia a existência de recursos para produzir mais frutos do que o naturalmente produzido no ano do estudo e indica uma provável limitação no serviço de polinização. Situação semelhante ocorreu na orquídea *Comparettia falcata* (Meléndez-Ackerman *et al.* 2000), que apresentou taxas de frutificação em polinizações manuais maiores que as de condições naturais em um ano, mas não manteve as mesmas taxas no ano seguinte (tratamentos repetidos nos mesmos indivíduos), mostrando que a limitação de recursos pode ser refletida no sucesso reprodutivo futuro dessa orquídea.

A maior percentagem de formação de frutos de *E. brasiliensis* pode estar relacionada à fixação dos polinários na parte inferior do bico. Este local é menos susceptível à limpeza do bico e, portanto, há maior possibilidade dos polinários serem depositados no estigma. Por outro lado, em *E. crinipes* a limpeza do bico com polinários na sua parte superior pode ser um dos fatores da menor percentagem de formação de frutos. Além disso, o clima (temperaturas baixas, neblina) adverso resulta em menor diversidade de visitantes e também em menor frequência de visitação às plantas, sendo outro fator que pode influenciar no sucesso reprodutivo de *E. crinipes*.

Outro fator que poderia influenciar negativamente a formação de frutos nos *Elleanthus* estudados seria a preferência dos beija-flores polinizadores por outras plantas que ocorrem no mesmo hábitat e que oferecem um recurso mais energético, como exemplos dessas plantas temos diversas espécies de Bromeliaceae, Lobeliaceae e Heliconiaceae (ver apêndice de Buzato *et al.* 2000). Portanto, esses fatores podem influenciar a eficiência do serviço de polinização de *E. crinipes*, sendo possíveis responsáveis pelo menor sucesso na formação de frutos em condições naturais em relação a *E. brasiliensis*.

As massas maiores dos frutos de *E. brasiliensis*, tanto fresca quanto seca, resultantes das polinizações cruzadas do que os oriundos de autopolinizações manuais são esperadas, sendo

um aspecto mencionado para Orchidaceae, pois os frutos de polinizações cruzadas contém maior número de sementes (Peter & Johnson 2009). É interessante notar que os resultados de massa fresca e seca de frutos de condições naturais de *E. brasiliensis* se assemelham aos valores encontrados para polinizações cruzadas manuais, indicando que os polinizadores provavelmente estão realizando polinizações cruzadas em sua maioria. A massa menor dos frutos provenientes de autopolinizações sugere a existência de depressão endogâmica como ocorre em outras espécies de Orchidaceae (Smithson 2006). Com os efeitos negativos da endogamia, a alogamia torna-se uma vantagem, uma vez que proporciona uma maior e melhor formação de sementes, mesmo com taxas de formação de frutos das polinizações cruzadas semelhantes a das autopolinizações.

A formação de híbridos de orquídeas co-genéricas é algo raro em condições naturais, uma vez que há barreiras pré-zigóticas que separam essas espécies: os polinizadores, época de floração e/ou barreiras geográficas. No entanto, cruzamentos interespecíficos podem ocorrer se, eventualmente, alguma dessas barreiras for rompida, sendo uma prática muito comum a produção de híbridos artificiais na floricultura. Entretanto, aparentemente, estas três barreiras não atuam sobre as espécies estudadas, ou seja, possuem polinizadores em comum, florescem na mesma época e ocorrem em simpatria. Uma barreira entre *E. brasiliensis* e *E. crinipes* seria a localização dos polinários no bico dos beija-flores, entretanto mesmo essa não seria totalmente segura, uma vez que essa localização pode variar.

Em Orchidaceae, apesar de incontáveis híbridos descritos e comercializados, a ocorrência de zonas híbridas na natureza é um evento surpreendentemente raro. Portanto, a não ocorrência de híbridos nestas espécies indica a existência de barreiras pós-polinização que impedem a troca de genes como, por exemplo, diferenças nos cariótipos que impedem a formação ou o desenvolvimento dos híbridos (Cozzolino *et al.* 2004).

Cozzolino & Widmer (2005) destacam a importância de cruzamentos testes para esclarecer as seguintes questões: existem outras barreiras ao cruzamento interespecífico em orquídeas simpátricas compartilhando época de floração e polinizadores? Caso existam, quais seriam? As respostas a essas perguntas ajudariam a explicar como tanta diversidade de Orchidaceae se mantém e evolui na Mata Atlântica, uma vez que a especiação através do surgimento de barreiras genéticas a partir de alterações na ploidia é bem conhecida para as Angiospermas (Lowry *et al.* 2008).

## Eficiência na transferência de pólen

O sucesso reprodutivo feminino de *E. brasiliensis* ( $8/62 = 12,9\%$ ) não se diferencia significativamente da proporção de frutos formados em condições naturais ( $155/510 = 30,39\%$ ) ( $\chi^2 = 5,18$ ;  $P = 0,02$ ). Estes resultados indicam que a ETP não difere muito do que ocorre naturalmente ao longo do período de floração, entretanto, pode haver diferenças devido ao pequeno tamanho amostral e a não abrangência de todo o período de floração.

O valor calculado para ETP (24,24%) se aproxima de valores de orquídeas melitófilas que oferecem néctar como as espécies de *Acrolophia* Pfitzer (38,5 e 39,2%) (Peter & Johnson 2009), mas é aquém da taxa encontrada por Micheneau *et al.* (2006) na orquídea ornitófila *Angraecum striatum* Thouars (76,2%). Entretanto, Peter & Johnson (2009, Figura 2) apontam para a existência de grande variação na eficiência na transferência de pólen (ETP) ao longo do período de floração. Assim, um estudo abrangendo todo o período de floração seria mais esclarecedor.

## Visitantes florais e polinizadores

Apesar da alta frequência relativa de visitas a *E. brasiliensis*, as abelhas não têm papel importante na reprodução desta orquídea como os beija-flores, que removeram e transferiram polínias entre diferentes indivíduos ao longo de todo o período de floração. Sendo assim, considera-se *Ramphodon naevius* o principal polinizador de *E. brasiliensis* devido a sua relativamente alta frequência de visitas e alto deslocamento entre os indivíduos.

Embora *R. naevius* seja considerado um beija-flor que explora flores com recursos ricos (altos volumes e concentrações de néctar) e em linhas de captura (Feinsinger & Cowell 1978; Stiles & Freeman 1993, Sazima *et al.* 1995), não é raro o registro de visitas a flores cujos recursos são relativamente pobres (Tabela 2 em Sazima *et al.* 1995; Singer 2003), como é o caso de *E. brasiliensis*. A julgar pela frequência de visitas *Thalurania glaucopis* também é um polinizador importante, ao passo que *Florisuga fusca* é um polinizador ocasional. Os demais visitantes atuam como pilhadores, assim como as formigas observadas em algumas flores. Com relação a *E. crinipes*, *Thalurania glaucopis* foi considerado o principal polinizador, entretanto, mais observações são necessárias, visto que na região ocorrem outras espécies de beija-flores que também podem atuar como polinizadores dessa orquídea, como *Calliphlox amethystina*, *Clytolaema rubricauda*, *Leucochloris albicollis* e *Florisuga fusca* (Buzato *et al.* 2000).

Tremblay *et al.* (2005) caracterizam as orquídeas polinizadas por aves e as generalistas, isto é, as polinizadas por diversos tipos de agentes, como possuidoras das maiores percentagens de frutificação. Assim sendo, espera-se encontrar percentagens de formação de frutos relativamente altas em ambiente natural, como foi encontrado em ambas as espécies (*E. brasiliensis*, 30,39%; *E. crinipes*, 16,73%). Portanto, pode-se afirmar que a presença de néctar tem papel realmente importante na atração de visitantes, na polinização e na resultante frutificação, pois as percentagens de frutificação para orquídeas dependentes de polinizadores que não oferecem recursos tendem a ser bem menores do que as que os oferecem, em média 11,5% variando entre 0,4 e 43% (Neiland & Wilcock 1998). No entanto, nas espécies estudadas as percentagens altas nos tratamentos com polinizações manuais, mostram a existência de limitação no serviço de polinização oferecido pelos visitantes.

A mucilagem na inflorescência de *E. brasiliensis* parece ser eficiente contra a pilhagem de néctar por vias ilegítimas, uma vez que não houve flores danificadas na base, como ocorre em numerosas espécies de plantas oferecedoras de néctar (Barrows 1976; Young 1983). Além disso, a mucilagem (não contém açúcares), provavelmente funciona como barreira para a maioria das formigas, protegendo assim botões e flores. Esta substância também pode ser uma proteção contra a proliferação de fungos e microrganismos, caso contenha alguma substância antimicrobiana. Outra função dessa mucilagem pode ser a atração de visitantes visualmente orientados, uma vez que ela reflete a cor das flores e brácteas florais, tornando a inflorescência mais vistosa (Figuras 2B, 7A), ao refletir a cor das flores a inflorescência torna-se mais vistosa. Em *E. crinipes*, onde a mucilagem é ausente, as brácteas mais desenvolvidas e rígidas podem exercer o papel de proteção contra pilhadores, uma vez que também não houve pilhagem nas flores em *E. crinipes*.

O mecanismo de alavanca da coluna observado em *E. brasiliensis* é semelhante ao de uma espécie melitófila de *Salvia*, descrito por Faegri & Van der Pijl (1979). Apesar de haver consideráveis diferenças entre a forma das flores e dos polinizadores, ambos os mecanismos funcionam com uma alavanca que, ao ser empurrada pelo polinizador, empurra o pólen (ou polinário) na direção do animal. Esse interessante mecanismo, entretanto, não havia sido descrito em Orchidaceae.

## BIBLIOGRAFIA

- Ackerman JD, Montalvo AM. 1990.** Short- and long-term limitations to fruit production in a tropical orchid. *Ecology* **71**: 263-272.
- Ackerman JD, Rodríguez-Robles JA, Meléndez EJ. 1994.** A Meager Nectar Offering by an Epiphytic Orchid is Better than Nothing. *Biotropica* **26**: 44-49.
- Ackerman JD, Sabat A, Zimmerman JK. 1996.** Seedling establishment in an epiphytic orchid: an experimental study of seed limitation. *Oecologia* **106**: 192-198.
- Alin A. 2010.** Minitab. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics* **2**: 723–727.
- Baker HG, Baker I. 1983a.** A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: Bentley B, Elias TS, eds. *The Biology of Nectaries*. New York: Columbia University Press, 126-152.
- Baker HG, Baker I. 1983b.** Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones CE, Little RJ, eds. *Handbook of Experimental Pollination Biology*, New York: Van Nostrand Reinhold Co., 117-141.
- Baker HG, Baker I. 1990.** The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator type. *Israel Journal of Botany* **39**: 157-166.
- Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN. 2010.** Orchidaceae. In: *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB011488>).
- Barrows EM. 1976.** Nectar Robbing and Pollination of *Lantana camara* (Verbenaceae). *Biotropica* **8**: 132-135.
- Bencke CC, Morellato PLC. 2002.** Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica* **25**: 269-275.
- Benzing DH. 1998.** Vulnerabilities of tropical forests to climate change: the significance of resident epiphytes. *Climatic Change* **39**: 519-540.
- Bernardello LM, Galetto L, Juliani HR. 1991.** Floral Nectar, Nectary Structure and Pollinators in Some Argentinean *Bromeliaceae*. *Annals of Botany* **67**: 401-411.

- Bidartondo MI, Read DJ. 2008.** Fungal specificity bottlenecks during orchid germination and development. *Molecular Ecology* **17**: 3707–3716.
- Borba EL, Semir J. 2001.** Pollinator Specificity and Convergence in Fly-pollinated Pleurothallis (Orchidaceae) Species: A Multiple Population Approach. *Annals of Botany* **88**: 75-88.
- Borba EL, Braga PIS. 2003.** Biologia Reprodutiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autoincompatibilidade em uma Laeliinae basal. *Revista Brasileira de Botânica* **26**: 541-549.
- Buzato S, Sazima M, Sazima I. 2000.** Hummingbird-Pollinated Floras at Three Atlantic Forest Sites. *Biotropica* **32**: 824-841.
- Canela MBF, Sazima M. 2003.** *Aechmea pectinata*: a hummingbird-dependent bromeliad with inconspicuous flowers from the rainforest in south-eastern Brazil. *Annals of Botany* **92**: 731-737.
- Carvalho R, Machado IC. 2006.** *Rodriguezia bahiensis* Rchb. f.: biologia floral, polinizadores e primeiro registro de polinização por moscas Acroceridae em Orchidaceae. *Revista Brasileira de Botânica* **29**: 461-470.
- Chase MW, Cameron KM, Barrett RL, Freudenstein JV. 2003.** DNA Data and Orchidaceae Systematics: A New Phylogenetic Classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ, eds. *Orchid Conservation*. Kota Kinabalu: Natural History Publications, 69-89.
- Chase MW, Williams NH, Faria AD, Neubig KM, Amaral MCE, Whitten WM. 2009.** Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae, Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. *Annals of Botany* **104**: 387-402.
- Cozzolino S, D'Emérico S, Widmer A. 2004.** Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **271**: 259–262.
- Cozzolino S, Widmer A. 2005.** Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 487-494.
- Dafni A, Kevan PG, Husband BC, eds. 2005.** *Practical Pollination Ecology*. Cambridge: Enviroquest.

- Darwin C. 1877.** *The Various Contrivances by Which Orchids are Fertilised by Insects*. 2<sup>nd</sup> ed. London: William Clowes and Sons.
- Dressler RL. 1993.** *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Portland: Diacorides Press.
- Dressler RL. 2006.** *Elleanthus*. In: Pridgeon AM, Cribb P, Chase MW, Rasmussen FN, eds. 2006. *Genera Orchidacearum Volume 4: Epidendroideae (Part 1)*. Oxford: Oxford University Press, 598.
- Faegri K, Van der Pijl L. 1979.** *The principles of pollination ecology*. 3<sup>rd</sup> Ed. New York: Pergamon Press.
- Fay MF, Chase MW. 2009.** Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. *Annals of Botany* **104**: 359-364.
- Feinsinger P, Colwell RK. 1978.** Community organization among neotropical nectar-feeding birds. *American Zoologist* **18**: 779-795.
- Flores-Palacios A, Valencia-Díaz S. 2007.** Local illegal trade reveals unknown diversity and involves a high species richness of wild vascular epiphytes. *Biological Conservation* **136**: 372-387.
- Galetto L, Bernardello G. 2005.** Rewards in flowers - Néctar. In: Dafni A, Kevan PG, Husband BC, eds. *Practical Pollination Biology*. Cambridge: Enviroquest, 261-313.
- Govaerts R. 2003.** *World Checklist of Monocotyledons Database in ACCESS: 1-71827*. Kew: Royal Botanic Gardens.
- Jersáková J, Johnson SD, Kindlmann P. 2006.** Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews* **81**: 219-235.
- Johnson SD, Edwards TJ. 2000.** The structure and function of orchid pollinaria. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 243-269.
- Johnson SD, Nicolson SW. 2008.** Evolutionary associations between nectar properties and specificity in bird-pollination systems. *Biology Letters* **4**: 49-52.
- Johnson SD, Nilsson LA. 1999.** Pollen carryover, geitonogamy, and the evolution of deceptive pollination systems in orchids. *Ecology* **80**: 2607-2619.

- Johnson SD, Peter CI, Agren J. 2004.** The effects of nectar addition on pollen removal and geitonogamy in the non-rewarding orchid *Anacamptis morio*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **271**: 803-809.
- Köppen W. 1948.** *Climatologia: con un estudio de los climas de la Tierra*. México DF: Fondo de Cultura Econômica.
- Lanza J, Smith GC, Sack S, Cash A. 1995.** Variation in nectar volume and composition of *Impatiens capensis* at individual, plant and population levels. *Oecologia* **102**: 113–119.
- Leal FC, Lopes AV, Machado IC. 2006.** Polinização por beija-flores em uma área de caatinga no Município de Floresta, Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* **29**: 379-389.
- Lowry DB, Modliszewski JL, Wright KM, Wu C, Willis JH. 2008.** Review: The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological sciences* **363**: 3009-3021.
- McDade, LA. 2004.** Nectar in Hummingbird-pollinated Neotropical Plants I: Patterns of Production and Variability in 12 Species. *Biotropica* **36**: 196–215.
- Meléndez-Ackerman EJ, Ackerman JD, Rodríguez-Robles JA. 2000.** Reproduction in an Orchid Can Be Resource-Limited over its Lifetime. *Biotropica* **32**: 282-290.
- Micheneau C, Fournel J, Paillet T. 2006.** Bird pollination in an angraecoid orchid on Reunion Island (Mascarene Archipelago, Indian Ocean). *Annals of Botany* **97**: 965-974.
- Miller D, Warren R, Miller I. 1996.** *Orquídeas do Alto da Serra da Mata Atlântica Pluvial do Sudeste do Brasil*. Rio de Janeiro: Salamandra Consultoria Editorial.
- Miranda MJ, Pinto HS, Zullo Júnior J, Fagundes RM, Fonseca DB, Calve L, Pellegrino GQ. 2008.** Clima dos Municípios Paulistas. *CEPAGRI – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura*. (<http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>).
- Montalvo AM, Ackerman JD. 1987.** Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). *Biotropica* **19**: 24-31.

- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier C G, da Fonseca GAB, Kent J. 2000.** Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853-858.
- Neiland MRM, Wilcock CC. 1998.** Fruit Set, Nectar Reward, and Rarity in Orchidaceae. *American Journal of Botany* **85**: 1657–1671.
- Newstrom LE, Frankie GW, Baker HG. 1994.** A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland Tropical Rain Forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* **26**: 141-159.
- Oliveira-Filho AT, Fontes MA. 2000.** Patterns of floristic differentiation among Atlantic forests in South-eastern Brazil, and the influence of climate. *Biotropica* **32**: 793-810.
- Pansarin ER, Amaral MCE. 2006.** Reproductive biology and pollination of two species of *Polystachya* Hook. in southeastern Brazil: evidence of pseudocleistogamy in Polystachyae (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **29**: 423-432.
- Pansarin ER, Pansarin LM. 2008.** A família Orchidaceae na Serra do Japi, São Paulo, Brasil. *Rodriguésia* **59**: 99-111.
- Peter CI, Johnson SD. 2009.** Reproductive biology of *Acrolophia cochlearis* (Orchidaceae): estimating rates of cross-pollination in epidendroid orchids. *Annals of botany* **104**: 573-81.
- Pleasants JM, Zimmerman M. 1983.** The distribution of standing crop of nectar: what does it really tell us? *Oecologia* **57**: 412-414.
- Pridgeon AM, Cribb P, Chase MW, Rasmussen FN, eds. 2006.** *Genera Orchidacearum Volume 4: Epidendroideae (Part 1)*. Oxford: Oxford University Press.
- Primack RB. 1985.** Longevity of individual flowers. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 15-37.
- Radford AE, Dickison WC, Massey JR, Bell CR. 1974.** *Vascular plant systematics*. New York: Harper & Row.
- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE. 2007.** *Biologia Vegetal*. 7<sup>th</sup> Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- Rodríguez-Robles J, Meléndez EJ, Ackerman JD. 1992.** Effects of display size, flowering phenology, and nectar availability on effective visitation frequency in *Compartmentia falcata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **79**: 1009-1017.
- Salguero-Farías JA, Ackerman JD. 1999.** A Nectar Reward: Is More Better? *Biotropica* **31**: 1744-7429.
- Sazima I, Buzato S, Sazima M. 1995.** The saw-billed hermit, *Ramphodon naevius*, and its flowers in southeastern Brazil. *Journal für Ornithologie* **136**:195-206.
- Schiestl FP, Schlüter PM. 2009.** Floral isolation, specialized pollination, and pollinator behavior in orchids. *Annual review of entomology* **54**: 425-446.
- Sick H. 1984.** *Ornitofilia brasileira: uma introdução*. Brasília: Ed. Universidade de Brasília.
- Singer RB, Sazima M. 2000.** The pollination of *Stenorrhynchus lanceolatus* (Aublet) L. C. Rich (Orchidaceae: Spiranthinae) by hummingbirds in south-eastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **223**: 221-227.
- Singer RB. 2003.** Orchid pollination: recent developments from Brazil. *Lankesteriana* **7**:111-114.
- Smithson A, Gigord LD. 2001.** Are there fitness advantages in being a rewardless orchid? Reward supplementation experiments with *Barlia robertiana*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **268**: 1435-41.
- Smithson A. 2006.** Pollinator limitation and inbreeding depression in orchid species with and without nectar rewards. *New Phytologist* **169**: 419-430.
- Stehmann JR, Forzza RC, Salino A, Sobral M, Costa DP, Kamino LH, eds. 2009.** *Plantas da Floresta Atlântica*. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Steiner, KE. 1998.** The evolution of beetle pollination in a South African orchid. *American Journal of Botany* **85**: 1180–1193.
- Stiles FG, Freeman CE. 1993.** Patterns in floral nectar characteristics of some bird-visited plant species from Costa Rica. *Biotropica* **25**: 191-205.
- Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A. 2003.** Nectary Structure and Nectar Secretion in *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae). *Annals of Botany* **93**: 87-95.

- Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A. 2005.** Comparative Account of Nectary Structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **95**: 749-756.
- Strauss MS, Arditti J. 1984.** Postpollination Phenomena in Orchid Flowers. XII. Effects of Pollination, Emasculation, and Auxin Treatment on Flowers of *Cattleya Porcia* 'Cannizaro' and the Rostellum of *Phalaenopsis*. *Botanical Gazette* **145**: 43-49.
- Tremblay RL, Ackerman JD, Zimmerman JK, Calvo RN. 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.
- Tremblay RL, Pomalez-Hernández G, Méndez-Cintrón ML. 2006.** Flower Phenology and Sexual Maturation : Partial Protandrous Behavior in Three Species of Orchids. *Caribbean Journal of Sciences* **42**: 75-80.
- Van der Pijl L, Dodson CH. 1966.** *Orchid flowers: their pollination an evolution*. Coral Gables: University of Miami Press.
- Veloso HP, Rangel-Filho ALR, Lima JCA. 1991.** *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE.
- Villa JD, Weiss MR. 1990.** Observations on the use of visual and olfactory cues by *Trigona* spp. foragers. *Apidologie* **21**: 541-545.
- Vogel S. 1983.** Ecophysiology of zoophilic pollination. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H, eds. *Physiological plant ecology III*. Berlin: Springer-Verlag.
- Wiesenborn WD. 2010.** Attraction of *Hesperopsis graciellae* (Lepidoptera: Hesperiiidae) Skippers to *Heliotropium curassavicum* Inflorescence Model. *Journal of the Kansas Entomological Society* **83**: 288-296.
- Wong KC, Sun M. 1999.** Reproduction Biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **86**: 1406-1413.
- Young AM. 1983.** Nectar and Pollen Robbing of *Thunbergia grandiflora* by *Trigona* Bees in Costa Rica. *Biotropica* **15**: 78-80.

**Zimmerman JK, Aide TM. 1989.** Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. *American Journal of Botany* **76**: 67-73.

## CAPÍTULO 2

### Calos nectaríferos no labelo de *Elleanthus brasiliensis* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae: Sobralieae)

“Orchids manufacture their intricate devices from the common components of ordinary flowers, parts usually fitted for very different functions. If God had designed a beautiful machine to reflect his wisdom and power, surely he would not have used a collection of parts generally fashioned for other purposes. Orchids were not made by an ideal engineer; they are jury-rigged from a limited set of available components. Thus, they must have evolved from ordinary flowers.”

— Gould, S.J. 1980. *The Panda's Thumb*. New York: W. W. Norton p. 20.

## RESUMO

Relacionar estruturas morfológicas e histológicas a processos fisiológicos e ecológicos, como a secreção do néctar e as interações planta-polinizador, é relevante para ampliar o entendimento da biologia floral e reprodutiva das plantas e o comportamento dos polinizadores. Além disso, esse tipo de conhecimento pode fornecer subsídios para a conservação dos organismos em florestas tropicais. Este estudo tem por objetivo apresentar a histologia das glândulas do labelo de *Elleanthus brasiliensis* e a composição da sua secreção, relacionando estes aspectos aos dados de biologia da polinização. O material previamente fixado em FAA e FNT foi incluído em Paraplast® e as secções seriadas foram submetidas à dupla coloração e a testes histoquímicos. Amostras da secreção foram submetidas à cromatografia gasosa para determinar os seus componentes. A composição da secreção é sacarose dominante, sendo que glicose e frutose se apresentam em pequenas concentrações, possibilitando identificá-la como néctar e os calos que a liberam como nectários. O par de calos nectaríferos é coberto por epiderme papilosa secretora com uma cutícula fina e constituído por parênquima também secretor; o conteúdo de natureza hidrofílica destas células secretoras corresponde ao pré-néctar. Células colenquimatosas, com paredes intensamente coradas pelo vermelho de rutênio, foram detectadas em diversas regiões do interior dos calos, entremeando as células do parênquima secretor. Neste tecido também foram evidenciados cristais. Elementos condutores não foram encontrados nos calos e a vascularização restringe-se a outras partes do labelo, sendo que a região próxima aos calos apresenta feixes vasculares de maior calibre. Os valores da composição de açúcares do néctar condizem com resultados observados para plantas polinizadas por beija-flores, aspecto confirmado para *E. brasiliensis*. A ocorrência de calos nectaríferos é pouco conhecida em Orchidaceae, não havendo registros para espécies ornitófilas. Além disso, a histologia desses calos não é conhecida para a tribo Sobralieae. É sugerido que demais espécies ornitófilas desta tribo apresentem glândulas nectaríferas com histologia semelhante.

## INTRODUÇÃO

A maioria das plantas com flores oferece recursos florais aos seus polinizadores sendo o néctar e o pólen os principais recursos oferecidos aos animais (Proctor *et al.* 1996). Entretanto, o néctar assume uma importância ainda maior tendo em vista sua ampla distribuição como recurso floral nas famílias de angiospermas (Smets 1986). Em Orchidaceae, estima-se que dois terços de suas espécies ofereçam recursos a visitantes florais, sendo as demais espécies polinizadas por engano, isto é, não oferecem recompensa a seus polinizadores, majoritariamente insetos (Schiestl 2005). Entre as orquídeas que apresentam recursos, como óleo, resina, fragrância e pólen, o néctar é o mais comum e de grande importância na atração de polinizadores e no sucesso reprodutivo dessas plantas (Van der Pijl & Dodson 1966; Dressler 1993; Ackerman 1994; Neiland & Wilcock 1998).

Entre os animais que polinizam orquídeas, figuram no papel principal os insetos como, moscas, vespas e principalmente abelhas (Van der Pijl & Dodson 1966; Dressler 1993). Entretanto, aves (Rodríguez-Robles *et al.* 1992; Singer & Sazima 2000) e, muito raramente, mamíferos (Wang *et al.* 2008), também atuam como polinizadores. Em ecossistemas tropicais, as aves exercem importante papel polinizando várias espécies de Orchidaceae (Van der Pijl & Dodson 1966; Rodríguez-Robles *et al.* 1992; Dressler 1993, Singer & Sazima 2000; Stpiczynska *et al.* 2003, 2005; Micheneau *et al.* 2006).

Nos últimos 20 anos, uma série de estudos tem abordado a histologia de glândulas florais relacionadas à polinização em diferentes espécies de orquídeas. Dentre as glândulas descritas estão elaióforos e osmóforos (Stpiczynska *et al.* 2007; Aliscioni *et al.* 2009; Davies & Stpiczynska 2009; Pansarin *et al.* 2009), tricomas secretores (Davies & Stpiczynska 2006); nectários em forma de esporões (Figueiredo & Pais 1992; Galetto *et al.* 1997; Stpiczynska *et al.* 2005), superfícies nectaríferas (Stpiczynska *et al.* 2003), em forma de calo ou outras estruturas no labelo (Galetto *et al.* 1997; Davies *et al.* 2005). São raros os trabalhos descrevendo glândulas nectaríferas em orquídeas ornitófilas. Entretanto, a diversidade dos mecanismos de evolução dessas estruturas fica evidente no fato de que esses trabalhos nos mostram a produção de néctar por glândulas com diversas formas e origens na flor. Por exemplo, em *Ornithidium coccineum* (Jaq.) Salisb. ex R.Br. o nectário é uma protuberância na face ventral da coluna (Stpiczynska *et al.* 2003), e em *Scaphyglottis imbricata* (Lindl.) Dressler, o nectário assume a forma de um esporão formado pela

fusão entre a base da coluna e parte do labelo (Stpiczynska *et al.* 2005).

Os poucos estudos sobre a produção e composição do néctar em orquídeas ornitófilas mostram um volume de néctar que pode variar de 3 a 50  $\mu\text{L}$ , com concentrações variando de 10 a 50% (massa/massa total) (Johnson 1996; Galetto *et al.* 1997; Singer & Sazima 2000; Johnson & Brown 2004; Micheneau *et al.* 2006). Os principais solutos presentes no néctar dessas plantas são os açúcares sacarose (dissacarídeo), glicose e frutose (hexoses), podendo haver predominância de sacarose (Johnson & Brown 2004) ou quantidades semelhantes dos três açúcares como em *Sacoila lanceolata* (Aubl.) Garay (Galetto *et al.* 1997).

Relacionar estruturas morfológicas e histológicas a processos fisiológicos e ecológicos, como a secreção do néctar e as interações planta-polinizador, é relevante para ampliar o entendimento da biologia floral e reprodutiva das plantas e o comportamento dos polinizadores. Ademais esse conhecimento é importante para entender a manutenção dos organismos em florestas tropicais, que se tornam cada vez mais ameaçadas, como é o caso da Mata Atlântica brasileira (Davis *et al.* 1986). Portanto, estudos sobre a polinização de orquídeas e suas glândulas florais envolvidas na produção de recursos são importantes para fornecer informações sobre as adaptações envolvidas nas interações planta-animal e a diversidade de mecanismos envolvidos, podendo contribuir com subsídios para programas de conservação de espécies (Costa 1992).

Orquídeas do gênero *Elleanthus* C.Presl. são tipicamente tropicais, se distribuindo pelo Neotrópico (Dressler 2006). No Brasil, são encontradas nove espécies, sendo três na Mata Atlântica. *E. brasiliensis* (Lindl.) Rchb.f. se distribui por todas as florestas úmidas brasileiras, ocorrendo em manchas nas diferentes fisionomias da Mata Atlântica do Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. Diversas espécies deste gênero são consideradas ornitófilas (Dressler 1993, Dressler 2006) o que significa que, durante a evolução dessas plantas, os beija-flores assumiram o papel de principal polinizador, havendo, portanto, adaptações a este sistema de polinização que se expressam no desenvolvimento de estruturas e mecanismos para adequar a forma da flor ao comportamento de forrageamento e o recurso oferecido (Schiestl & Schlüter 2009) às necessidades nutricionais do animal (Baker & Baker 1983a, 1990).

No entanto, não há estudos sobre a histologia floral ou de nectários da tribo Sobralieae à qual pertence *Elleanthus* (*sensu* Pridgeon *et al.* 2006) e tampouco sobre a polinização de espécies de *Elleanthus* para confirmar a atuação de beija-flores como polinizadores. Existem somente observações pontuais sobre a polinização de *Elleanthus brasiliensis* pelo beija-flor *Phaethornis*

*petrei* (Trochilidae: Phaethorninae) no sudeste brasileiro e de espécies andinas sendo polinizadas por outros beija-flores (Van der Pijl & Dodson 1966; Singer & Sazima 2000; Singer 2003). O capítulo 1 do presente trabalho traz um estudo mais detalhado sobre a polinização de *Elleanthus* na Mata Atlântica do Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo.

É interessante ressaltar que a maioria dos estudos sobre histologia de glândulas florais em Orchidaceae não é devidamente relacionada a dados de fisiologia e ecologia dessas espécies, uma vez que não vêm acompanhados de estudos ecológicos e/ou são com espécies sobre as quais se conhece pouco da biologia da polinização e da reprodução. Dessa maneira, o presente estudo tem por objetivo caracterizar a histologia das glândulas do labelo e a composição do néctar em *E. brasiliensis*, associando esses resultados às informações sobre biologia da polinização.

## **METODOLOGIA**

### **Locais de coleta**

As flores e as amostras do néctar, acumulado sob a forma de gotículas sobre o par de calos, de *Elleanthus brasiliensis* foram coletadas de indivíduos localizados às margens do Rio da Fazenda(23°20'22,13"S e 44°50'14,54"W), Núcleo Picinguaba, Município de Ubatuba no Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo (Capítulo 1, figura 1).

### **Análise da secreção**

A secreção de três flores em antese completa de três diferentes indivíduos foi coletada diretamente no campo, com registro do volume ( $\mu\text{L}$ ) utilizando micro-seringas graduadas e da concentração de açúcares (% massa/massa total) utilizando refratômetro manual. A composição do néctar foi determinada no Laboratório do Instituto Multidisciplinar de Biologia Vegetal, Córdoba, Argentina de acordo com metodologia de Galetto & Bernardello (2005). As amostras foram colocadas sobre papel cromatográfico Whatman #1 e secadas a seguir. A separação e a determinação dos açúcares foram feitas através de cromatografia gasosa. As amostras foram liofilizadas e silicadas de acordo com Sweeley *et al.* (1963). Os produtos foram então injetados em um cromatógrafo de gás Konik KNK 3000-HRGS equipado com um integrador de dados Spectra-Physics SP 4290, um detector de ionização de chama e uma coluna capilar OV 101 3% (com 2 m

de comprimento) sobre um filme 100-120 Cromosorb G/AW-DMCS. O gás carregador utilizado foi o Nitrogênio (30 mL/min) e o programa de temperatura foi o seguinte: 208°C por um minuto, 1°C por minuto até 215°C, 10°C por minuto até 280°C ao longo de 5 minutos. Os padrões de carboidratos (Sigma Chem.) foram preparados utilizando o mesmo método. A proporção de açúcares (r) e de hexoses (hr) foi calculada como segue, seguindo Baker & Baker (1983b):

$$r = \text{sacarose}/(\text{glicose} + \text{frutose})$$

$$\text{hr} = \text{glicose}/\text{frutose}$$

A quantidade de açúcares (em mg) disponível nas amostras analisadas foi obtida através do cálculo do produto do volume pela concentração e pelo fator de correção determinado pela equação:

$$y = 0,00226 + (0,00937x) + (0,0000585x^2)$$

onde o valor de x é igual a concentração obtida pelo refratômetro (Galetto & Bernardello 2005).

### **Estudos morfológicos e histológicos**

Para a caracterização morfológica e estudos histológicos das glândulas florais, botões e flores recém abertas de *Elleanthus brasiliensis* foram previamente fixadas em formalina – ácido acético – etanol 50% (FAA) por 24h (Johansen 1940) e formalina neutra tamponada (FNT) por 48h (Lillie 1965) e colocadas sob vácuo para garantir a penetração dos fixadores. Posteriormente, foram conservadas em etanol 70%. Os materiais testemunhos das plantas depositados no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC). As peças florais passaram por desidratação em série butílica (Johansen 1940), foram incluídas em Paraplast® e então seccionadas. Secções seriadas longitudinais e transversais, com espessura de 12 µm, foram obtidas em micrótomo rotativo e coradas com safranina e azul de astra (Gerlach 1969). As secções foram examinadas sob luz polarizada para verificar a ocorrência de elementos traqueais e de grãos de amido.

Alguns procedimentos histoquímicos foram realizados para detectar as principais classes de compostos químicos produzidos pelas glândulas florais. Em amostras fixadas em FAA, foram aplicados os testes: ácido periódico – reagente de Schiff (reação PAS) para polissacarídeos totais (McManus 1948) e vermelho de rutênio para mucilagens ácidas (Gregory & Baas 1989). Nas amostras fixadas em FNT, foram aplicados os testes: preto de Sudão B (Pearse 1985) para lipídios totais, cloreto férrico para compostos fenólicos totais (Johansen 1940) e acetato de cobre – ácido

rubeânico para ácidos graxos livres (Ganter & Jolles 1969). Para todos os testes histoquímicos aplicados, controles foram realizados simultaneamente.

As imagens da inflorescência e de detalhes do labelo foram obtidas no campo com uma câmera digital (Canon EOS20D) e no laboratório em microscópio estereoscópico Leica M80 com câmera acoplada (DFC295). Imagens digitais das secções histológicas foram obtidas com câmera DP72 acoplada ao microscópio Olympus BX51 e programa de captura de imagens DP2-BSW. As pranchas foram elaboradas utilizando o programa editor de imagens GNU Image Manipulation Program (GIMP, versão 2.6.6). Os estudos morfológicos e histoquímicos foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, São Paulo.

## **RESULTADOS**

### **Morfologia floral**

As flores de *Elleanthus brasiliensis* ocorrem em densas inflorescências, são tubulosas (18 mm de compr.), as sépalas são de coloração rosa-escuro, as pétalas são brancas e o labelo é branco com duas manchas lilases na face adaxial (Figura 1A). O labelo possui, em sua porção proximal, um par de calos esbranquiçados e carnosos, de formato ovóide medindo 1,8 mm de comprimento e 1,5 de largura (Figura 1B, Figura 7A do Capítulo 1), apresentam a superfície coberta por papilas. Nesta superfície foi constatado acúmulo de gotículas de néctar. Os calos encontram-se protegidos pelo labelo e a coluna+apêndice, que juntos formam uma câmara onde se acumula o néctar (Figura 2A, Figura 7A do Capítulo 1).



**Figura 1.** Inflorescência *in situ* no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo, e labelo de *Elleanthus brasiliensis*. **A.** Inflorescência *in situ* mostrando posição das flores ressupinadas, com o labelo na parte superior. **B.** Labelo conservado em etanol 70%; notar a posição do par de calos (setas). Barras de escala: A = B = 1 cm.

## Análise da secreção

As gotículas acumuladas sobre os calos são produzidas em baixas quantidades, cerca de 4 $\mu$ L de secreção total, e consistem de uma solução aquosa de açúcares com concentração de 21%. Esta solução então caracterizada como néctar é composta principalmente por sacarose (96,55%), sendo que glicose e frutose ocorrem em baixas concentrações (2% e 1,46%, respectivamente) (Tabela 1). Quantidades significativas de aminoácidos ou lipídios não foram encontradas.

**Tabela 1.** Volume do néctar, concentração e composição de açúcares em *Elleanthus brasiliensis* no Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. Valores médios seguidos do desvio padrão. Entre parêntesis, quantidade de flores.

Vol. de néctar ( $\mu$ L)	Conc. de açúcares (%)	Sacarose (%)	Frutose (%)	Glicose (%)
4,15 $\pm$ 2,93 (72)	21,11 $\pm$ 5,27 (66)	96,55 $\pm$ 5,28 (3)	2,00 $\pm$ 2,25 (3)	1,46 $\pm$ 3,03 (3)

## Estrutura dos calos nectaríferos

Os calos são massas ovóides (Figura 1B) constituídas por células secretoras e células não secretoras (Figuras 2-4). Tanto as células da epiderme papilosa como as do parênquima subjacente apresentam núcleo volumoso e citoplasma denso intensamente corado pela safranina; o conteúdo destas células é de natureza hidrofílica, bem preservado nas amostras fixadas em FAA (Figuras 2B,D; 3A-C). Sendo assim, estes tecidos são considerados glandulares, ou seja, envolvidos na síntese do pré-néctar, isto é, o conjunto de substâncias que constituirá o néctar, assim denominado somente após sua eliminação pelas células secretoras.

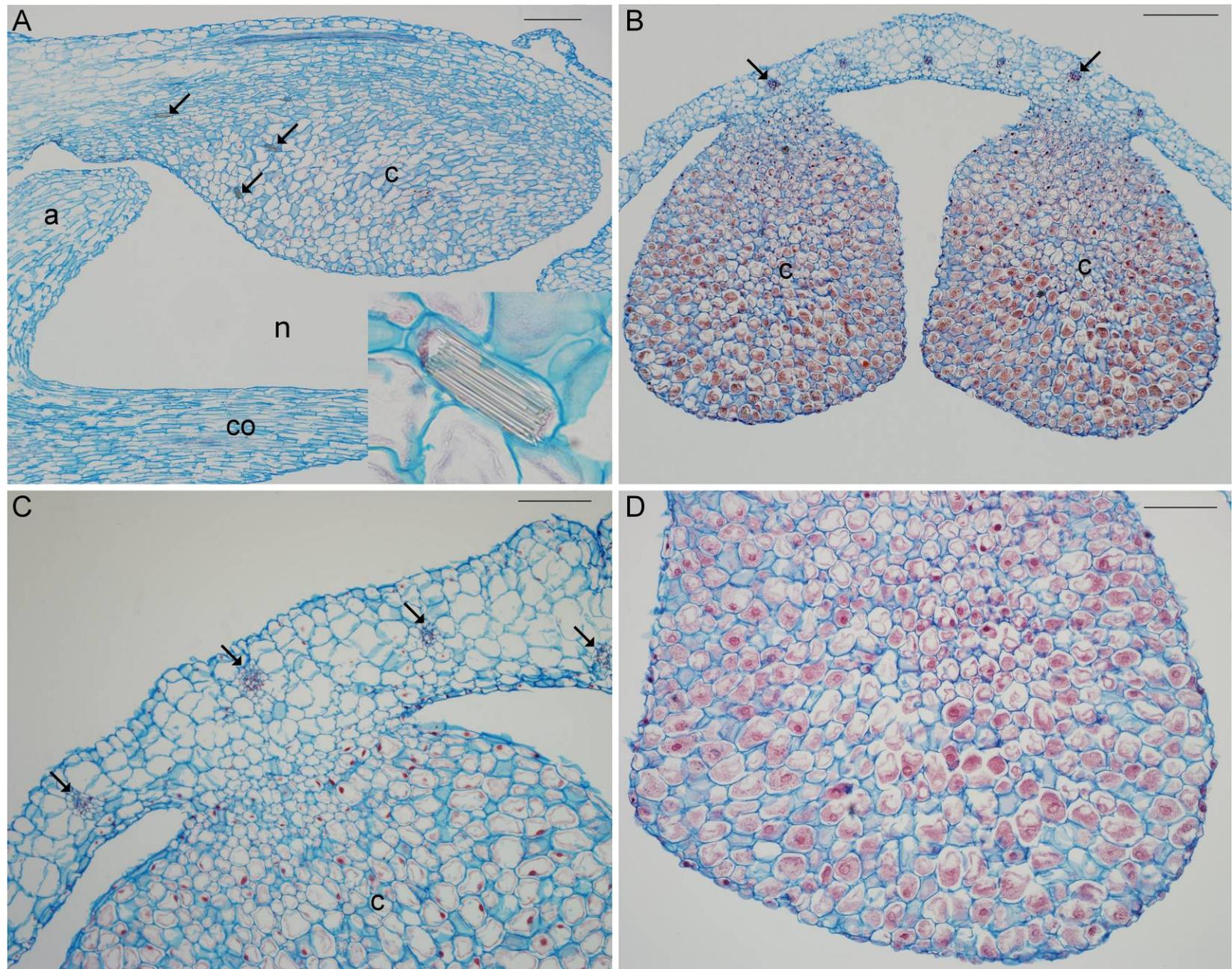
A epiderme papilosa secretora é composta por células pavimentosas em sua maior extensão com protuberâncias ocupando a posição central (Figura 3A,C). Estômatos não foram encontrados e a cutícula delgada, corada em azul marinho nas secções tratadas com preto de Sudão B, não se distende ou se rompe por ocasião da liberação do néctar (Figura 4C-D).

As células do parênquima secretor, volumosas e isodiamétricas, possuem citoplasma denso, paredes delgadas e com um relativamente volumoso núcleo (Figuras 2B,D; 3A-B). Este tipo de parênquima ocupa as porções centrais e apicais dos calos, onde foram observadas as células com mais conteúdo citoplasmático (Figuras 2B,D), sendo a porção basal formada por células com pouco conteúdo citoplasmático e, portanto, não secretoras (Figuras 2C, 3D). Entre as células do parênquima são encontrados idioblastos contendo ráfides em abundância (pelo menos três em cada secção da porção secretora de cada calo) (Figura 2A, setas e *inset*).

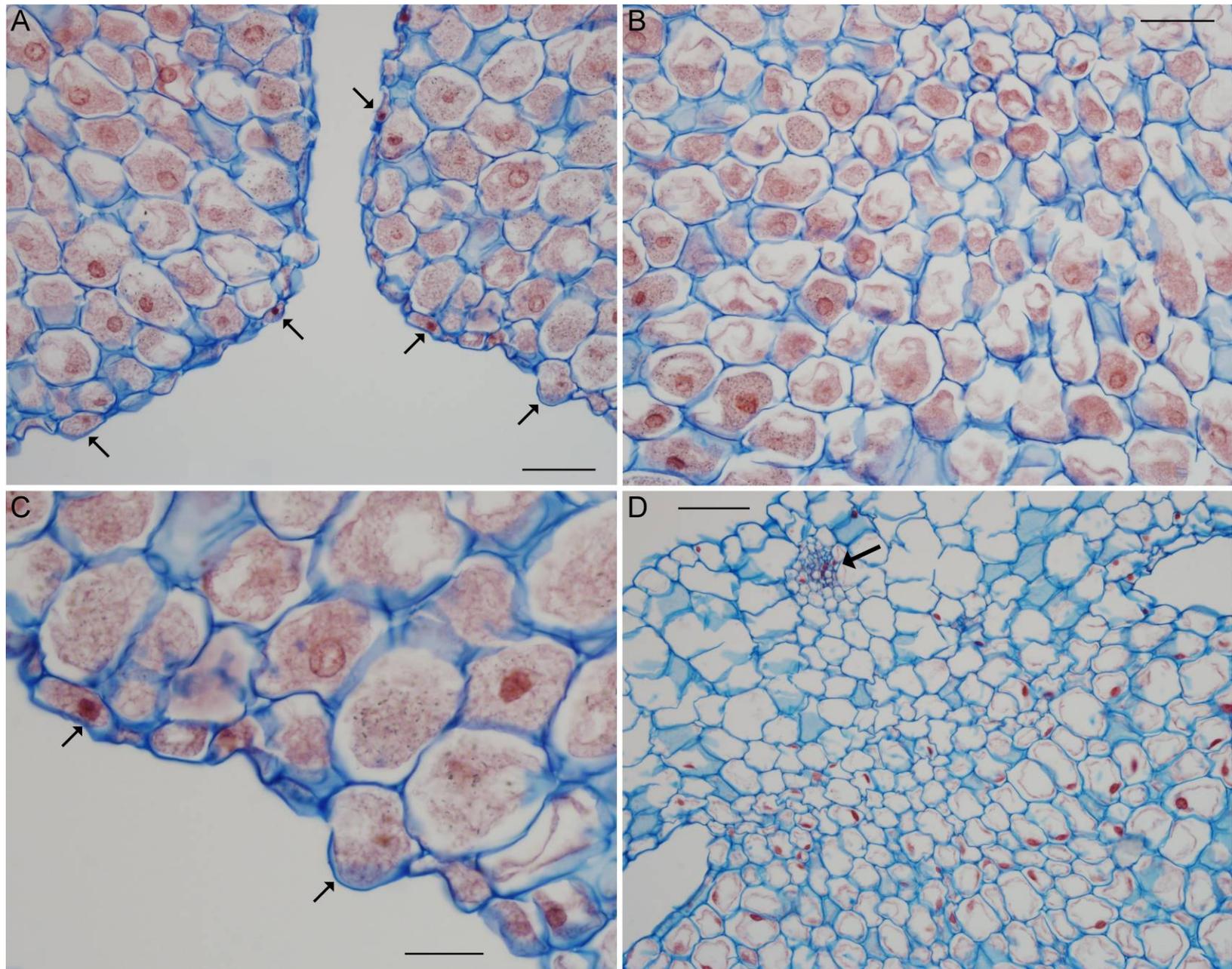
A reação PAS não evidenciou a presença de polissacarídeos no interior das células secretoras. Os testes com acetato de cobre – ácido rubeânico e cloreto férrico resultaram negativos; portanto, ácidos graxos e compostos fenólicos também não foram detectados no interior das células nectaríferas nos calos de *E. brasiliensis*.

O vermelho de rutênio evidenciou células estreitas com paredes celulósicas espessadas, ricas em substâncias pécticas (Figura 4A-B). Estas células diferem das demais por seu formato alongado e sua disposição em cordões ao longo do maior comprimento do calo, sendo denominadas colenquimatosas. Além disso, essas células não apresentaram conteúdo corado pela safranina da dupla coloração como ocorreu com as células do parênquima adjacente.

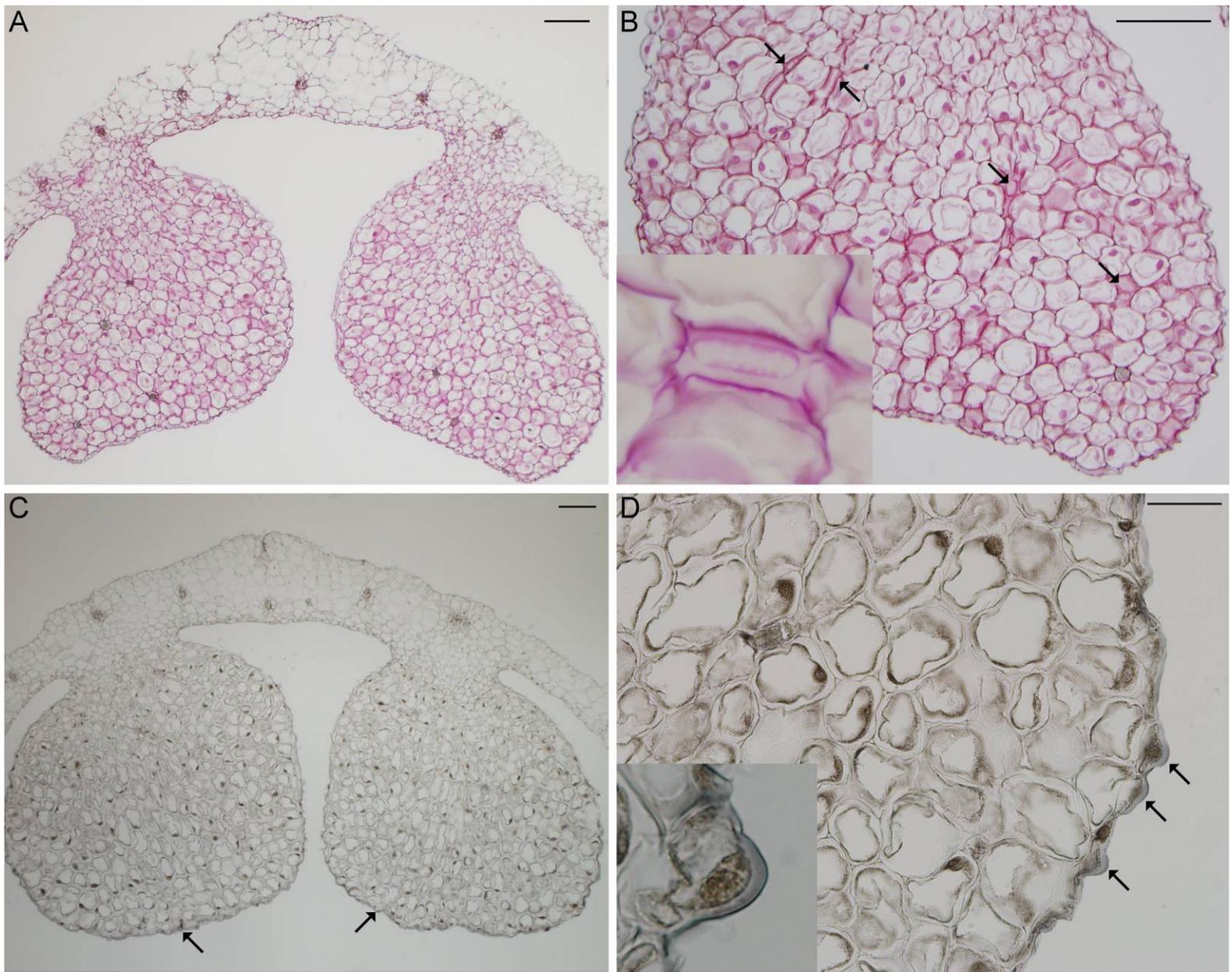
Vários feixes vasculares (cerca de 13) percorrem o labelo no sentido longitudinal e os feixes mais próximos aos calos nectaríferos possuem calibre maior (Figura 2B-C setas); entretanto, estes calos não são vascularizados (Figuras 2A,C; 3D).



**Figura 2.** Nectários no labelo de *Elleanthus brasiliensis*. **A.** Secção longitudinal no nível do calo (c) e da coluna (co) com apêndice (a); notar câmara nectarífera (n) e ráfides (setas e inset). **B.** Secção transversal mostrando o par de calos e vascularização evidente (setas). **C.** Detalhe dos feixes vasculares do labelo (setas). **D.** Detalhe do calo com células repletas de conteúdo hidrofílico (pré-nectar), corado pela safranina. Barras: A = B = 200 µm; C = D = 100 µm.



**Figura 3.** Detalhes do calo no labelo de *Elleanthus brasiliensis*. **A,C.** Epiderme nectarífera, papilas com conteúdo hidrofílico (pré-nectar) corado pela safranina. **B.** Parênquima nectarífero, notar células volumosas com pré-nectar. **D.** Feixe vascular (seta) no labelo, ausência de vascularização adentrando o calo. Barra das secções transversais: A = B = D 50  $\mu$ m; C = 20  $\mu$ m.



**Figura 4.** Secções transversais do par de calos no labelo de *Elleanthus brasiliensis*. **A.** Células colenquimatosas (setas) evidenciadas pelo vermelho de rutênio. **B.** Notar paredes intensamente coradas (setas); detalhe da célula colenquimatoso no *inset*. **C, D.** Secções tratadas com preto de Sudão B. **D.** Lipídios não detectados no interior das células nectaríferas; papila com cutícula delgada corada em azul marinho no *inset*. Barras: A = C = 200  $\mu\text{m}$ ; B = 50  $\mu\text{m}$ ; D = 20  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSÃO

### Morfologia floral

A morfologia das flores de *Elleanthus brasiliensis* apresenta diversas características ornitófilas (*sensu* Faegri & Van Der Pijl 1979), sendo beija-flores os seus polinizadores (Capítulo 1). Nectários florais como os de *E. brasiliensis*, representados por um par de calos na base do labelo, são estruturas pouco conhecidas em Orchidaceae e até o momento, sabe-se que estão presentes somente em outras espécies do gênero *Elleanthus*. Calos nos labelos de outras orquídeas podem secretar néctar (Davies *et al.* 2005) ou outras substâncias, como óleo (Stpiczynska *et al.* 2007) e fragrância (Dodson 1962), ou atuar como imitação de um recurso, como pólen (Cheng *et al.* 2009), características relacionadas à atração de polinizadores. Entretanto, a despeito da diversidade morfológica das estruturas florais e do enorme número de espécies, são poucos os estudos morfológicos e histológicos com a família. Os resultados deste estudo são importantes na medida em que fornecem uma melhor visão da diversidade de formas e estruturas florais em Orchidaceae.

### Néctar

Devido à alta percentagem de sacarose, o néctar de *E. brasiliensis* é tido como “dominado por sacarose” de acordo com a classificação de Baker & Baker (1983b). Segundo Baker & Baker (1983b, 1990), plantas polinizadas por beija-flores geralmente apresentam néctar com altas percentagens (acima de 60%) de sacarose. Portanto, os resultados da composição do néctar de *E. brasiliensis* corroboram observações anteriores sobre os polinizadores dessa espécie (Singer 2003), cujo principal polinizador é o beija-flor *Ramphodon naevius* (Trochilidae: Phaethornithinae) (ver Capítulo 1). Estes resultados apontam para mais uma adaptação das flores estudadas à polinização por beija-flores, aspecto sugerido por Van der Pijl & Dodson (1966) para diversas outras espécies do gênero.

Esta composição de açúcares também é típica de plantas polinizadas por mariposas noturnas. Entretanto, não foram observados visitantes durante as observações das 18h às 19h em *E. brasiliensis*. Observações noturnas, cobrindo períodos mais longos, seriam necessárias para confirmar a possibilidade de que a planta liberaria algum odor atuante na atração de mariposas e de que esses polinizadores também atuariam como polinizadores de *Elleanthus*. Entretanto, essa

possibilidade parece pouco provável, uma vez que não foi detectado odor ao fim do dia nas flores.

Com relação ao volume de néctar, os valores encontrados são considerados baixos em relação aos de outras plantas (orquídeas ou não) ornitófilas (Galletto *et al.* 1997; Buzato *et al.* 2000). Contudo, os dados de Ackerman *et al.* (1994) sobre outra orquídea ornitófila que produz néctar em baixas quantidades, *Comparettia falcata* Poepp. & Endl., e as observações sobre os polinizadores de *E. brasiliensis* (ver Capítulo 1) mostram que o oferecimento de pouco néctar ainda pode ser suficiente para atrair os beija-flores. Ademais, a polinização por aves, ou ornitofilia, apresenta grande diversidade de mecanismos em Orchidaceae, que se expressa de maneira igualmente diversa nas características morfológicas e histológicas das inflorescências e flores dessas plantas (Rodríguez-Robles *et al.* 1992; Johnson 1996; Johnson & Brown 2004; Micheneau *et al.* 2006).

### **Estrutura dos calos nectaríferos**

A análise das secções seriadas dos calos em fase de síntese do pré-néctar possibilitou detectar células ricas em conteúdo citoplasmático na epiderme e no parênquima, caracterizando células com intensa atividade citoplasmática, como é o caso de células secretoras. O conteúdo visível destas células – designado pré-néctar – é de natureza hidrofílica e ácida, uma vez que é bem preservado pelo FAA e cora intensamente pela safranina, respectivamente (Figuras 2B,D e 3A-C). Estes resultados permitem identificar os calos de *E. brasiliensis* como nectários estruturados, ou seja, glândulas secretoras de néctar macroscopicamente distinguíveis nas quais o local da síntese do pré-néctar (de acordo com Fahn 1979) é conhecido.

A epiderme papilosa secretora é uma característica incomum em nectários florais de orquídeas. Até então, a secreção de néctar floral foi observada ocorrendo por meio de estômatos em calos, por poros na cutícula de uma superfície nectarífera glabra ou por tricomas secretores na epiderme do interior de esporões em orquídeas (Davies *et al.* 2005; Stpiczynska *et al.* 2003, 2005, Stpiczynska *et al.* 2010). É sugerido que a cutícula delgada encontrada em *E. brasiliensis* possua microporos ou microcanalículos pelos quais o néctar extravase, uma vez que sinais de rompimento ou de acúmulo de secreção sob a cutícula não foram observados. Tampouco foram detectados estômatos pelos quais o néctar possa ser liberado como é descrito para os nectários de outras espécies de orquídeas (Stpiczynska *et al.* 2003, 2005; Davies *et al.* 2005). O baixo volume de néctar (2-6  $\mu$ L) produzido pelos calos de *E. brasiliensis* poderia explicar a ausência de estruturas

especializadas para sua liberação.

Diferente da maioria dos nectários até então descritos, constituídos por células pequenas densamente agrupadas (Fahn 1979; Durkee 1983), o nectário de *E. brasiliensis* apresenta células volumosas e isodiamétricas formando o parênquima secretor, entremeadas por células colenquimatosas. A presença deste último tipo de células nos calos nectaríferos pode conferir maior resistência mecânica a essas estruturas, podendo ser uma característica importante em nectários de flores visitadas por aves. Células colenquimatosas também são encontradas nos nectários de outras orquídeas ornitófilas dos gêneros *Ascocentrum* Schltr. (Stpiczynska *et al.* 2010), *Ornithidium* Salisb. ex R.Br. (Stpiczynska *et al.* 2003) e *Scaphyglottis* Poepp. & Endl. (Stpiczynska *et al.* 2005).

Os resultados dos testes histoquímicos confirmam os da análise da composição química da secreção. Polissacarídeos (incluindo mucilagem), ácidos graxos e compostos fenólicos não são detectados no interior das células secretoras. Estes compostos químicos estão ausentes no pré-néctar, assim como no néctar.

A presença de idioblastos com ráfides no calo é digna de nota, uma vez que tantas células desse tipo não são facilmente observáveis em outras regiões do labelo ou na coluna de *E. brasiliensis*. A provável composição das ráfides é de oxalato de cálcio, também encontradas em nectários de outras orquídeas (Stpiczynska *et al.* 2003), assim como em nectários florais e extraflorais (Nepi 2007). De acordo com Nepi (2007), o íon cálcio ( $Ca^{2+}$ ) inibe a ação da ATPase, proteína envolvida no transporte da sacarose via membrana nas plantas e a formação de cristais de oxalato de cálcio seria uma maneira de imobilizar esses íons e permitir o transporte de açúcares no parênquima nectarífero. Outra possível função desses cristais seria a defesa contra a herbivoria, pois danificam as partes bucais de insetos herbívoros mastigadores (Nepi 2007).

A estrutura histológica dos nectários - sem vascularização e sem estruturas especializadas na liberação do néctar – condiz com fato de que o néctar é produzido em baixo volume. Dessa maneira, é possível estabelecer uma relação direta entre a histologia dessas glândulas e a utilização de outros recursos pelos visitantes, assim como a curta duração das visitas às flores de *Elleanthus brasiliensis*. Esses resultados corroboram as teorias de Pacini *et al.* (2003) de que há uma correlação entre a produção de determinado volume de néctar e o tipo de polinizador e seu comportamento (ver Capítulo 1).

## BIBLIOGRAFIA

- Ackerman JD, Rodríguez-Robles JA, Meléndez EJ. 1994.** A Meager Nectar Offering by an Epiphytic Orchid is Better than Nothing. *Biotropica* **26**: 44-49.
- Aliscioni SS, Torretta JP, Bello ME, Galati BG. 2009.** Elaiophores in *Gomesa bifolia* (Sims) M.W. Chase, N.H. Williams (Oncidiinae: Cymbidieae: Orchidaceae): structure and oil secretion. *Annals of Botany* **104**: 1141-1149.
- Baker HG, Baker I. 1983a.** A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: Bentley B, Elias TS, eds. *The Biology of Nectaries*. New York: Columbia University Press, 126-152.
- Baker HG, Baker I. 1983b.** Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones CE, Little RJ, eds. *Handbook of Experimental Pollination Biology*, New York: Van Nostrand Reinhold Co., 117-141.
- Baker HG, Baker I. 1990.** The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator type. *Israel Journal of Botany* **39**: 157-166.
- Buzato S, Sazima M, Sazima I. 2000.** Hummingbird-Pollinated Floras at Three Atlantic Forest Sites. *Biotropica* **32**: 824-841.
- Cheng J, Shi J, Shanguan F-Z, Dafni A, Deng Z-H, Luo Y-B. 2009.** The pollination of a self-incompatible, food-mimic orchid, *Coelogyne fimbriata* (Orchidaceae), by female *Vespula* wasps. *Annals of botany* **104**: 565-571.
- Costa JPO, ed. 1992.** Plano de Ação para a Mata Atlântica. *Cadernos da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica – MaB – UNESCO*, **6**. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica.
- Davies KL, Stpiczynska M, Gregg A. 2005.** Nectar-secreting Floral Stomata in *Maxillaria anceps*. *Annals of Botany* **96**: 217-227.
- Davies KL, Stpiczynska M. 2006.** Labellar micromorphology of Bifrenariinae Dressler (Orchidaceae). *Annals of botany* **98**: 1215-1231.
- Davies KL, Stpiczynska M. 2009.** Comparative histology of floral elaiophores in the orchids *Rudolfiella picta* (Schltr.) Hoehne (Maxillariinae sensu lato) and *Oncidium ornithorhynchum*

- H.B.K. (Oncidiinae sensu lato). *Annals of Botany* **104**: 221-234.
- Davis SD, Droop SJM, Gregerson P, Henson L, Leon CJ, Lamlein Villa-Lobos J, Synge H, Zantovska J. 1986.** *Plants in danger: what do we know?* Gland: International Union for the Conservation of Nature – IUCN.
- Dodson CH. 1962.** Pollination and variation in the subtribe Catasetinae (Orchidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **49**: 35-56.
- Dressler RL. 1993.** *Phylogeny and Classification of the Orchid Family*. Portland: Diacorides Press.
- Dressler RL. 2006.** *Elleanthus*. In: Pridgeon AM, Cribb P, Chase MW, Rasmussen FN, eds. 2006. *Genera Orchidacearum Volume 4: Epidendroideae (Part 1)*. Oxford: Oxford University Press, 598.
- Durkee LT. 1983.** The Ultrastructure of Floral and Extrafloral Nectaries. In: Bentley B & Elias T, eds. *The Biology of Nectaries*. New York: Columbia University Press, 1-29.
- Fahn A. 1979.** *Secretory tissues in plants*. London: Academic Press.
- Faegri K, Van der Pijl L. 1979.** *The principles of pollination ecology*. 3<sup>rd</sup> Ed. New York: Pergamon Press.
- Figueiredo ACS, Pais MS. 1992.** Ultrastructural Aspects of the Nectary Spur of *Limodorum abortivum* (L) Sw. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **70**: 325-331.
- Galetto L, Bernardello G, Rivera GL. 1997.** Nectar, Nectaries, Flower Visitors, and Breeding System in Five Terrestrial Orchidaceae from Central Argentina. *Journal of Plant Research* **110**: 393-403.
- Galetto L, Bernardello G. 2005.** Rewards in flowers - Néctar. In: Dafni A, Kevan PG, Husband BC, eds. *Practical Pollination Biology*. Cambridge: Enviroquest, 261-313.
- Ganter P, Jollés G. 1969.** *Histochemie normale et pathologique*. Paris: Gauthier-Villars.
- Gerlach G. 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.

- Johnson SD. 1996.** Bird pollination in South African species of *Satyrium* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **203**: 91-98.
- Johnson SD, Brown M. 2004.** Transfer of pollinaria on bird's feet: a new pollination system in orchids. *Plant Systematics and Evolution* **244**: 181-188.
- Johansen DA. 1940.** *Plant Microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co.
- Lillie RD. 1965.** *Histopathologic technic and practical histochemistry*, 3<sup>rd</sup> Ed. New York: McGraw-Hill Book Co.
- McManus JFA. 1948.** Histological and histochemical uses of periodic acid. *Biotechnic & Histochemistry* **23**: 99-108.
- Micheneau C, Fournel J, Paillet T. 2006.** Bird pollination in an angraecoid orchid on Reunion Island (Mascarene Archipelago, Indian Ocean). *Annals of Botany* **97**: 965-974.
- Neiland MRM, Wilcock CC. 1998.** Fruit Set, Nectar Reward, and Rarity in Orchidaceae. *American Journal of Botany* **85**: 1657-1671.
- Nepi M. 2007.** Nectary Structure and Ultrastructure. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E, eds. *Nectaries and Nectar*. Dordrecht: Springer, 129-166.
- Pacini E, Nepi M, Vesprini JL. 2003.** Nectary biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution* **238**: 7-21.
- Pansarin LM, Castro MM, Sazima M. 2009.** Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. *Botanical Journal of the Linnean Society* **159**: 408-415.
- Pearse AGE. 1985.** *Histochemistry: theoretical and applied*. 4<sup>th</sup> ed. Edinburgh: C. Livingstone.
- Pridgeon AM, Cribb P, Chase MW, Rasmussen FN, eds. 2006.** *Genera Orchidacearum Volume 4: Epidendroideae (Part 1)*. Oxford: Oxford University Press.
- Proctor M, Yeo P, Lack A. 1996.** *The natural history of pollination*. Portland: Collins, London and Timber Press.
- Rodríguez-Robles J, Meléndez EJ, Ackerman JD. 1992.** Effects of display size, flowering phenology, and nectar availability on effective visitation frequency in *Comparettia falcata*

- (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **79**: 1009-1017.
- Schiestl FP, Schlüter PM. 2009.** Floral isolation, specialized pollination, and pollinator behavior in orchids. *Annual review of entomology* **54**: 425-446.
- Schiestl FP. 2005.** On the success of a swindle: pollination by deception in orchids. *Die Naturwissenschaften* **92**: 255-64.
- Singer RB, Sazima M. 2000.** The pollination of *Stenorrhynchus lanceolatus* (Aublet) L. C. Rich (Orchidaceae: Spiranthinae) by hummingbirds in south-eastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **223**: 221-227.
- Singer RB. 2003.** Orchid pollination: recent developments from Brazil. *Lankesteriana* **7**:111-114.
- Smets E. 1986.** Localization and systematic importance of floral nectaries in the Magnoliatae (Dicotyledons). *Bulletin du Jardin Botanique National de Belgique* **56**:51-76.
- Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A. 2003.** Nectary Structure and Nectar Secretion in *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae). *Annals of Botany* **93**: 87-95.
- Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A. 2005.** Comparative Account of Nectary Structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **95**: 749-756.
- Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A. 2007.** Elaiophore diversity in three contrasting members of Oncidiinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of The Linnean Society* **155**: 135-148.
- Stpiczynska M, Davies KL, Kaminska M. 2010.** Comparative anatomy of the nectary spur in selected species of Aeridinae (Orchidaceae). *Annals of botany* first published online December 22, 2010 doi:10.1093/aob/mcq246.
- Sweeley EC, Bentley R, Makita M, Wells WW. 1963.** Gas liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *Journal of the American Chemical Society* **85**: 2497-2507.
- Van der Pijl L, Dodson CH. 1966.** *Orchid flowers: their pollination an evolution*. Coral Gables: University of Miami Press.
- Wang Y, Zhang Y, Ma X, Dong L. 2008.** The unique mouse-pollination in an orchid species. *Nature Precedings* (hdl:10101/npre.2008.1824.1).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho mostrou que há evidências de limitação no serviço de polinização de ambas as espécies e de possíveis efeitos negativos da depressão endogâmica no sucesso reprodutivo de *E. brasiliensis*, fenômeno que provavelmente se estende a *E. crinipes*. Outros trabalhos apontam para uma relação positiva entre oferecimento de néctar e produção de frutos e uma relação negativa entre oferecimento de néctar e a ocorrência de xenogamia. Ao produzir pouco ou nenhum néctar a planta reduziria substancialmente o serviço dos polinizadores, mas ao produzi-lo em relativa abundância, os polinizadores se movimentariam pouco entre os indivíduos, realizando um serviço de baixa qualidade. Provavelmente, há nas espécies estudadas um conflito entre a demanda pelo serviço de polinização e a demanda pela movimentação dos polinizadores entre diferentes indivíduos. Tais demandas conflitantes teriam forjado a evolução de um sistema de polinização em que é produzido néctar o suficiente para garantir determinadas taxas de formação de frutos, mas nem tanto que ocasione altas taxas de endogamia por visitas repetidas a um mesmo indivíduo.

Entretanto, não se pode excluir a possibilidade de limitações nos recursos de produção de néctar e de frutos, não em uma estação, mas ao longo do tempo de vida da planta, atuarem como forças evolutivas sobre a biologia floral de *E. brasiliensis* e *E. crinipes*, tendo em vista que isso não foi abordado no curto período de estudo do presente trabalho. A protandria atua reduzindo o número de flores aptas a receber pólen de flores de segundo e terceiro dia e a abertura sequencial evita que todas as flores da inflorescência estejam disponíveis simultaneamente. Esses atributos associados ao mecanismo de polinização (alavanca/tubo estreito) são essenciais para a remoção e deposição de polínias nas espécies estudadas.

Além disso, existe a influência da altitude na polinização dessas orquídeas à medida que o clima, mais frio e nebuloso e outras diferenças de habitat excluem das maiores altitudes os visitantes que freqüentam *E. brasiliensis* em altitudes menores.

Então, pode-se dizer que as espécies estudadas apresentam um longo histórico de evolução tendo estas aves como principais polinizadores, que garantiriam o melhor ajustamento, graças à promoção da polinização cruzada e do intercâmbio de genes entre diferentes indivíduos, que parece ser vantajoso para *E. brasiliensis*. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho corroboram as afirmações, com base em observações prévias no Brasil e em outros países, de que os beija-flores seriam os polinizadores da maior parte das espécies de *Elleanthus*, com um papel

crucial na evolução do gênero. Entretanto, visto que algumas espécies do gênero não apresentam características ornitófilas (*E. graminifolius* por exemplo), e a polinização da maioria delas ainda não foi estudada, não se pode colocar a ornitofilia como único cenário possível ao longo da evolução deste grupo. Além disso, verificou-se que a apresentação de um volume baixo de néctar, a protandria e a presença de mucilagem (em *E. brasiliensis*) são características que influenciam a polinização, algo que a literatura até então não havia abordado.

Com o incremento no número de estudos sobre este interessante sistema de polinização de orquídeas, a ornitofilia, os diversos mecanismos envolvidos e suas implicações estão sendo cada vez mais bem entendidos. Os resultados obtidos com este estudo e outros trabalhos recentes aqui citados mostram que os nectários em Orchidaceae, especialmente as polinizadas por aves, podem variar muito em sua morfologia e histologia. Portanto, a diversidade de espécies e habitats da família se reflete na diversidade de estruturas florais relacionadas à polinização. Será que a presença de células colenquimatosas nos nectários, que seria uma adaptação, que garantiria maior resistência dessas estruturas ante o impacto do bico das aves durante as visitas, pode ser uma característica histológica comum a orquídeas ornitófilas? São necessários mais estudos do tipo em orquídeas para esclarecer essa questão.

Por outro lado, a morfologia da flor das espécies estudadas é muito distinta da de outras orquídeas ornitófilas estudadas até o momento, uma vez que, por exemplo, um par de calos nectaríferos ainda não havia sido descrito para orquídeas polinizadas por aves.

Conclui-se que os atributos morfológicos e histológicos florais, néctar e mucilagem se correlacionam com determinados tipos de polinizadores. Nestas espécies de orquídeas há uma série de características que constituem adaptações à polinização por beija-flores: brácteas de cores avermelhadas e contrastantes com a cor das flores, ausência de plataforma de pouso, flores tubulares e néctar rico em sacarose.

Este estudo, junto a uma tímida - mas crescente - lista de estudos sobre a polinização de orquídeas tropicais ornitófilas, vem revelando uma diversidade de mecanismos e estruturas proporcional à diversidade de espécies da família e uma importante contribuição dos polinizadores presentes nos trópicos para a evolução e diversificação das espécies de Orchidaceae.