



**“Estudos biossistemáticos em três espécies de *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) ocorrentes nos campos rupestres brasileiros”**

**Eduardo Leite Borba**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Vegetal.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) Eduardo Leite Borba  
Aprovada pela Comissão Julgadora.

07/04/97 João Semir

**Orientador: Profa. Dra. Graziela Maciel Barroso**

**Coorientador: Prof. Dr. João Semir**

Campinas

1997

B664e  
34978/BC

UNICAMP  
SECRETARIA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	B664e
V. Ex	
TOMBO BC/	34978
PROC.	395/98
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	10/09/98
N.º CPO	

CM-00116087-5

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

**Borba, Eduardo Leite**

B645e Estudos biossistemáticos em três espécies de *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) ocorrentes nos campos rupestres brasileiros / Eduardo Leite Borba. -- Campinas, SP:[s.n.], 1997. 134f. ilus.

Orientadores: Graziela Maciel Barroso e João Semir  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Orquídea. 2. Polinização. 3. Botânica sistemática.  
4. Biologia - Reprodução. I. Barroso, Graziela Maciel. II. Semir, João. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

**LOCAL E DATA: Campinas, 07 de abril de 1997**

**BANCA EXAMINADORA:**

**TITULARES:**

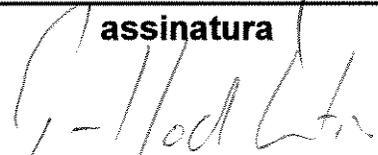
**Prof. Dr. João Semir**

  
\_\_\_\_\_  
**assinatura**

**Prof. Dr. George John Shepherd**

  
\_\_\_\_\_  
**assinatura**

**Prof. Dr. Paulo Soderio Martins**

  
\_\_\_\_\_  
**assinatura**

**SUPLENTE:**

**Dra. Julie Henriette Antoinette Dutilh**

\_\_\_\_\_  
**assinatura**

*Durante a realização deste curso tive a oportunidade de trabalhar junto a várias pessoas, dentre as quais algumas me marcaram muito pela competência, seriedade, ética, humildade e capacidade de ensinar e ajudar. Sou muito grato por ter tido contato com estes excelentes pesquisadores, e a eles dedico esta tese:*

João Semir

George John Shepherd

Eliana Regina Forni Martins

João Renato Stehmann

Ary Gomes da Silva

## DEDICATÓRIA II

*Aos grandes amigos que aqui encontrei, Dri e Carlos, e aos que lá deixei, Nei e Valéria.*

## AGRADECIMENTOS

- Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos durante estes dois anos;
- Ao IBAMA pela licença para desenvolver parte do trabalho no Parque Nacional da Serra do Cipó;
- À FAEP/UNICAMP pelo auxílio financeiro concedido;
- À prof. Dra. Graziela Maciel Barroso e ao prof. Dr. João Semir pela orientação neste trabalho;
- Aos professores Dr. George John Shepherd, Dra. Maria do Carmo Estanislau do Amaral e Dra. Eliana Regiana Forni Martins pela leitura cuidadosa durante a pré-banca, com excelentes críticas, sugestões e comentários feitos acerca do trabalho, que foram de grande auxílio para melhorá-lo;
- A todos os professores do Departamento de Botânica da UNICAMP, que em muito contribuíram na minha formação, em especial Dr. João Semir, Dr. George John Shepherd, Dra. Eliana Regina Forni Martins, Dra. Marlies Sazima e Dr. Flávio Antônio Maes dos Santos, que atuaram diretamente neste trabalho;
- Ao prof. Ângelo Pires do Prado, do Departamento de Parasitologia da UNICAMP, que foi de uma enorme paciência ao tentar me ensinar alguma coisa sobre os Milichiidae, e que ajudou a identificá-los;
- Ao Dr. Curtis W. Sabrosky, do USA National Museum, que gentilmente recebeu os Milichiidae e confirmou as identificações;
- Aos funcionários do Depto. de Botânica, especialmente Renato (Pezão), João Carlos, Lara, Sebastião (Tião), Ana Lúcia, Isabel, Maria Lúcia e Josênia, que sempre tiveram muito boa vontade em me ajudar (e como me ajudaram!);
- A todos os amigos e colegas do Departamento de Botânica e Departamento de Zoologia da UNICAMP, sem mencionar nomes para não incorrer no erro de esquecer alguns (mas especialmente à Janete, João Renato, Julie, Ary, Marta, e superespecialmente à Cláudia);
- Ao amigo e companheiro de “orquideologias” Cássio Van Den Berg, pelas nossas boas discussões e pelo seu companheirismo e ajuda, e aos seus pais, Ian e Malba, pela amável hospitalidade durante o trabalho de campo em Lavras;
- Ao amigo e grande orquidólogo Fábio de Barros, que muito me ensinou e me ajudou nestes anos;
- Ao amigo Júlio Lombardi, diretamente responsável por eu ter vindo parar aqui na UNICAMP;
- E por último, mas com muito carinho, a duas pessoas que tiveram o dom especial de me tranquilizar com apenas poucas palavras quando eu aparecia desesperado com um “grande” problema: George Shepherd e João Semir.

# CONTEÚDO

	<b>página</b>
<b>RESUMO</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO 1 -</b> Biologia floral e fenologia de três espécies de <i>Bulbophyllum</i> Thouars (Orchidaceae) ocorrentes nos campos rupestres brasileiros: pode um sistema baseado na ineficiência do polinizador ser adaptativo.	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO 2 -</b> Variação temporal no tamanho do polinário após a sua remoção em espécies de <i>Bulbophyllum</i> Thouars: um diferente mecanismo de se evitar a autopolinização em Orchidaceae.	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO 3 -</b> Sistemas de reprodução e potencialidade de hibridização em três espécies de <i>Bulbophyllum</i> Thouars (Orchidaceae) ocorrentes nos campos rupestres brasileiros.	<b>62</b>
<b>CAPÍTULO 4 -</b> <i>Bulbophyllum involutum</i> Borba, Semir & F. Barros (Orchidaceae), uma nova espécie dos campos rupestres do Brasil.	<b>91</b>
<b>CAPÍTULO 5 -</b> <i>Bulbophyllum xcipoense</i> Borba & Semir (Orchidaceae), novo híbrido natural dos campos rupestres brasileiros: descrição e biologia.	<b>101</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>124</b>
<b>BIBLIOGRAFIA GERAL</b>	<b>128</b>

## RESUMO

Foram estudadas a biologia floral e a fenologia das orquídeas *Bulbophyllum weddellii* (Lindl.) Rchb. f. e *B. involutum* Borba, Semir & F.Barros (inéd.), na Serra do Cipó, Santana do Riacho-MG, e *B. ipanemense* Hoehne, na Serra de Camargos, Nazareno-MG. As três espécies são polinizadas exclusivamente por fêmeas de *Pholeomyia* (Diptera: Milichiidae) com um alto grau de especificidade, provavelmente atraídas por instinto de oviposição. Nas três espécies investigadas, ventos com velocidade entre 1,5 e 2,0m/s são necessários para que ocorra a polinização, balançando o labelo e prendendo o inseto na coluna. Este mecanismo parece ter evoluído em áreas abertas, tais como os campos rupestres onde elas ocorrem. A taxa de frutificação é muito baixa, variando entre 3 a 8%, devido à falta de constância destas moscas, apesar da taxa de remoção de políneas ser alta. Herbivoria elevada e infrequência na floração também contribuem para o baixo sucesso reprodutivo destas espécies. Porém, como elas estão sob escassez de recursos, baixa frutificação pode ser adaptativa por garantir sobrevivência e reprodução futura, existindo mecanismos assegurando que os raros casos de reprodução sexuada sejam através de polinização cruzada.

Logo após o polinário ser removido da antera de *B. involutum* e *B. ipanemense*, espécies estreitamente relacionadas, este possui aproximadamente o dobro do diâmetro da entrada da cavidade estigmática. São necessários de 105 a 135 minutos em média para que o polinário diminua em tamanho e possa ocorrer a polinização, com apenas a largura reduzindo significativamente. Como os polinizadores destas espécies permanecem alguns minutos na mesma flor após a remoção das políneas, este mecanismo, ainda não conhecido nas Orchidaceae, é muito importante em evitar a autopolinização. Em *B. weddellii*, este mecanismo não ocorre, e o polinizador não possui este comportamento de permanecer na flor após a remoção das políneas. O menor diâmetro da cavidade estigmática em *B. involutum* diminui em 50% as chances de polinizações interespecíficas com *B. weddellii*, podendo o cruzamento ocorrer em apenas uma direção. Isto é importante em ajudar a assegurar o isolamento entre estas duas espécies, que são simpátricas, florescem no mesmo período e possuem os mesmos polinizadores.

Foram realizadas, experimentalmente, autopolinizações, polinizações cruzadas intraespecíficas e interespecíficas nas três espécies. Todas elas são autocompatíveis, sendo necessária a ocorrência de polinização por um vetor para o desenvolvimento de frutos. Em todos os tipos de cruzamentos ocorre uma elevada taxa de aborto de frutos e formação de sementes sem embrião, sendo estes mais elevados nos cruzamentos interespecíficos envolvendo *B. weddellii*. Cruzamentos entre as espécies próximas, *B. involutum* e *B. ipanemense*, fornecem valores de frutificação e viabilidade de sementes semelhantes aos cruzamentos intraespecíficos. Estes resultados concordam com hipóteses correntes sobre potencialidade de cruzamento interespecífico representando filogenia das espécies envolvidas. Exame dos tubos polínicos e dos frutos abortados

indicam que uma série de fatores podem estar envolvidos no grande número de aborto de frutos e sementes sem embrião. A baixa fertilidade entre *B. weddellii* e *B. involutum* é importante para a manutenção do isolamento entre estas espécies.

Os dados obtidos de biologia reprodutiva fornecem subsídios para a separação de *Bulbophyllum involutum* como uma espécie própria, que é aqui descrita pela primeira vez. Comparações com as espécies proximalmente relacionadas, *B. warmingianum* Cogn. e *B. ipanemense*, são apresentadas.

*Bulbophyllum xcipoense* Borba & Semir, um híbrido natural entre *B. weddellii* e *B. involutum*, ocorrente na Serra do Cipó, é descrito e sua biologia reprodutiva estudada. Uma série de barreiras fracas entre estas duas espécies, que quando somadas fornecem um forte isolamento, contribui para a extrema raridade do híbrido e conseqüentemente para a manutenção do status das espécies parentais. O híbrido atrai os mesmos polinizadores dos parentais e se localiza dentro da população de *B. weddellii*, o que pode causar introgressão. Porém, o híbrido possui um alto grau de esterilidade ou autoincompatibilidade, e características do labelo fazem com que a polinização seja ineficiente. Devido à localização do híbrido e à apenas unidirecionalidade do cruzamento entre os parentais, presume-se que este híbrido tenha-se originado pela doação de pólen de um indivíduo de *B. involutum*. As possíveis conseqüências deste evento de hibridização nas espécies parentais e no estabelecimento de uma nova espécie são discutidas.

## ABSTRACT

The floral biology and phenology of the orchids *Bulbophyllum weddellii* (Lindl.) Rchb. f. and *B. involutum* Borba, Semir & F.Barros (unpubl.), in Serra do Cipó, Santana do Riacho, and *B. ipanemense* Hoehne, in Serra de Camargos, Nazareno, both located in Minas Gerais state, Southeastern Brazil, were studied. The three species are pollinated exclusively by females of *Pholeomyia* (Diptera: Milichiidae) with a high degree of specificity, probably attracted by oviposition instincts. In all species, a successful pollination requires winds with a speed of 1.5 to 2.0m/s to shake the labellum until the insect is glued to the column. This mechanism is known in the genus only for these species, and seems to have evolved in open areas such as the “campos rupestres” where they occur. In spite of the high rate of pollinia removal, fruit set is very low (3 to 8%) due to the lack of constancy of the flies. High levels of herbivory and infrequent flowering also contribute to the low reproductive success of these species. This stated, reduced fructification could be interpreted as adaptive, granting survival and future reproduction in their resource-poor environment. In the few cases where sexual reproduction occurs, cross pollination is practically granted through specific mechanisms.

Immediately after its removal from the anther, the pollinarium of the closely related species *B. involutum* and *B. ipanemense* has approximately double the width of the stigmatic cavity entrance. The pollinarium takes about 105 to 135 minutes to reduce in size enough for pollination to occur, and only the width is reduced significantly. Because the flies stay for up to 12 minutes in the flower after removing the pollinia, this previously unknown mechanism in Orchidaceae is very important in preventing self-pollination. In *B. weddellii* this mechanism does not occur, and the pollinator does not remain in the flower after pollinia removal. The smaller diameter of the stigmatic cavity in *B. involutum* reduces in 50% the chances of interspecific pollination with *B. weddellii*, so that crossing is unidirectional. This is important to help ensure the isolation between these two species, which are sympatric, bloom at the same time and share the same pollinators.

Experiments of self-pollination, intra and interspecific cross-pollination were done for the three species. All of them proved to be self-compatible, and the occurrence of pollinator is necessary for fruit development. All crossings are characterized by a high rate of fruit abortion and development of seeds without embryo, and they are highest in the interspecific crossings involving *B. weddellii*. Crossings between the related species *B. involutum* and *B. ipanemense* result in values of fruit set and seed viability similar to intraspecific crossings. These results agree with current hypotheses on interspecific crossings potential reflecting the phylogeny of the species involved. Examination of pollen tubes and aborted fruits show that a series of factors such as low pollen germination, incompatibility reactions, and embryo abortion because of lethal recessive alleles may be the cause

of the great number of fruit abortions and seeds lacking embryos. The low fertility of crossings between *B. weddellii* and *B. involutum* is important to maintain the isolation of these species.

The reproductive biology data provide support for the separation of *B. involutum* as a good species, which is described here for the first time. Comparisons with the closely related species *B. warmingianum* Cogn. and *B. ipanemense* are made.

A natural hybrid between *B. weddellii* and *B. involutum* occurring in Serra do Cipó, *B. xcipoense* Borba & Semir, is described and its reproductive biology studied. A system of filters, in which a combination of weak barriers between these two species result in a strong isolation, contributes to the extreme rarity of the hybrid and consequently to the status maintenance of the parental species. The hybrid attracts the same pollinators as the parents and is located within the *B. weddellii* population, which may cause introgression. However, the hybrid has a high level of sterility or self-incompatibility, and labellum characteristics make pollination inefficient. Due to the location of the hybrid and the unidirectional crossing between the parents it is assumed that this hybrid has originated from pollen donation by *B. involutum*. The possible consequences of this hybridization event for the parental species and in the establishment of a new species are discussed.

## INTRODUÇÃO GERAL

De distribuição cosmopolita, Orchidaceae com aproximadamente 19.500 espécies é uma das maiores famílias de vegetais (Dressler, 1993). A rápida evolução das orquídeas e seu extremo padrão de variação têm, sem dúvida, sido facilitado por algumas das características intrínsecas da família. A vida longa do indivíduo, a transferência de pólen em massas compactas (políneas), a produção de enorme número de óvulos, a ausência de endosperma nas sementes e as leves sementes levadas pelo vento a longas distâncias podem ter fortemente afetado o curso da evolução da família (Pijl & Dodson, 1966). Porém, as adaptações morfológicas especiais a polinizadores específicos para assegurar a polinização cruzada são considerados os fatores mais importantes no desenvolvimento do grande número de espécies na família (Dodson, 1962).

As flores das Orchidaceae geralmente são zigomorfas, possuindo três sépalas, três pétalas, sendo uma destas diferenciada (labelo), e os órgãos reprodutivos fundidos em apenas uma estrutura, a coluna, com uma ou mais raramente duas anteras e uma região estigmática formada pela fusão dos três estigmas (Dressler, 1981). Apesar da construção floral das orquídeas ser uniforme em número e arranjo das partes, há grande variação em detalhes estruturais e na forma e tamanho dos componentes básicos), levando ao surgimento de estruturas muito complexas (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1993).

Se surgem adaptações dentro de um grupo de orquídeas para polinizadores específicos que são fundamentalmente distintos entre si, a estrutura geral da flor pode mudar radicalmente, tornando-se morfológicamente muito diferente. Isto, algumas vezes, faz parecer adequada a separação em espécies, gêneros ou mesmo subtribos distintos baseado em critérios de taxonomia clássica. O mesmo é verdade em relação a grupos distintos que apresentam convergência devido a sistemas de polinização similares. Isto tem levado à quebra de vários grupos aparentemente monofiléticos ou à formação de grupos parafiléticos. Casos clássicos são os problemas envolvendo *Cattleya/Laelia/Sophranitis/Brassavola*, *Sophranitis/Constantia*, *Encyclia/Epidendrum*, e o certamente polifilético gênero *Oncidium*, além de inúmeros outros. Por isto, vários autores, principalmente Dodson (1962), Dressler (1968, 1981, 1993) e Pijl & Dodson (1966) têm enfatizado a importância de se conhecer a biologia reprodutiva das Orchidaceae, especialmente da polinização, para entendermos melhor as causas da variação e a filogenia deste grupo, e então conseguirmos elaborar uma taxonomia e um sistema de classificação mais natural.

A maioria das orquídeas mais evoluídas tendem a ser polinizadas por uma ou poucas espécies particulares de insetos (Dodson, 1962; Pijl & Dodson, 1966; Tremblay, 1992). Esta especificidade é efetuada por uma combinação de mecanismos de polinização e atrativos. O odor das orquídeas tem sido considerado como o fator crítico na atração de polinizadores, e o principal mecanismo de isolamento entre espécies simpátricas (Dressler, 1968; Paulus & Gack 1990).

Segundo Dressler (1968), relações de polinização não específicas em Orchidaceae normalmente não conduzem à especiação, ao passo que relações específicas podem levar à especiação simpátrica, e seleção pode impor relações mais específicas onde espécies próximas estão ocorrendo juntas. Isto faz com que espécies muito relacionadas possuam polinizadores muito distintos quando ocorrendo juntas e florescendo ao mesmo tempo. Esta distinção de polinizadores é gerada por um tipo de especiação denominado por Dodson (1962) como “leap-frog speciation”, estudado principalmente em orquídeas polinizadas por abelhas euglossine. Este tipo de especiação, baseado em relações de especificidade, parece fornecer um melhor modelo para especiação simpátrica do que constância floral pelo polinizador, uma vez que constância pode ser quebrada quando o número de flores é baixo, como seria de se esperar em uma espécie incipiente surgindo por mutação (Dressler, 1968; Paulus & Gack, 1990).

Como o desenvolvimento de barreiras à hibridização pela adaptação a polinizadores específicos não necessariamente afeta a compatibilidade genética entre grupos, muitas espécies de orquídeas diferenciaram-se muito rapidamente, ocorrendo poucas mudanças a nível cromossômico e mantendo a compatibilidade entre elas (Sanford, 1964, 1967; Pijl & Dodson, 1966; Stort, 1972, 1986; Illg, 1975; Scacchi et al., 1990). Desta forma, isolamento reprodutivo em Orchidaceae é principalmente efetuado por barreiras pré-polinização (Dodson, 1962; Dressler, 1968, 1981; Paulus & Gack, 1990). Assim, se estas barreiras pré-polinizações são quebradas, a consequência normalmente é a produção de híbridos. Estes eventos podem por sua vez resultar em uma nova espécie, obscurecer diferenças entre duas entidades através de introgressão, ou apenas causar dificuldades para taxonomistas quando estes híbridos são introduzidos em uma coleção limitada de um herbário (Pijl & Dodson, 1966; Sundermann, 1977; Schrenk, 1978, 1984; Linder, 1990; Romero & Carnevali, 1990, 1991a, 1991b, 1992; Rossi et al., 1992; Steiner et al., 1994).

Em Orchidaceae, a compatibilidade não apenas entre espécies próximas é normalmente mantida. A maioria das orquídeas são autocompatíveis, mas a estrutura da flor favorece fortemente a polinização cruzada (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981; Catling & Catling, 1991). Este é um sistema bastante flexível, onde uma planta isolada ainda tem, a princípio, a possibilidade de autopolinização e conseqüentemente reprodução sexuada. Isto pode ser muito importante na dispersão à longa distância e em eventos de especiação, seja por mutação ou hibridização.

Cerca de um quarto ou mais das espécies de orquídeas não oferece recompensa aos polinizadores, formando um sistema de engodo (Dressler, 1993). Estas espécies têm desenvolvido várias estruturas, odores e cores que mimetizam elementos importantes no ciclo de vida do inseto e que o atraem: parceiro sexual, competidor ou inimigo, lugar de oviposição e alimento, sendo este último o mais comum (Pijl & Dodson, 1966). Entre os vários mecanismos de polinização conhecidos em Orchidaceae, sistemas de engodo parecem oferecer melhor isolamento reprodutivo, maior fidelidade, polinização sobre maiores distâncias e maior taxa de polinização cruzada (Dressler, 1981,

1993; Nilsson, 1992). Em contraposição, menor taxa de frutificação é alcançada nestes sistemas, uma vez que devido a capacidade de aprendizado, normalmente o polinizador tenderia a não retornar nas flores da espécie que o enganou. Devido a esta consequência, alguns autores têm enfatizado que estes sistemas não são evolutivamente estáveis e sofreriam uma forte seleção contrária. Porém, uma outra tendência recente é acreditar que estes sistemas de engodo que acarretam baixa frutificação podem ser adaptativos, uma vez que elevada frutificação em uma estação pode comprometer o crescimento, a reprodução e até a sobrevivência a curto ou longo prazo (Schemske, 1980; Montalvo & Ackerman, 1987; Ackerman, 1989; Zimmerman & Aide, 1989).

De todos os sistemas de engodo encontrados em Orchidaceae, mimetismo do local de oviposição de moscas (sapromiiofilia) é o único difundido em outras famílias de angiospermas, tais como Araceae, Aristolochiaceae e Asclepiadaceae, e também é o menos estudado nas orquídeas. Sapromiiofilia é um caráter derivado, tendo surgido independentemente várias vezes nas Orchidaceae (Pijl & Dodson, 1966). A subtribo exclusivamente neotropical Pleurothallidinae (ca. 3.000 espécies) e o gênero pantropical *Bulbophyllum* Thouars (ca. 1.000 espécies) são os dois maiores grupos miiófilos da família, formando um dos mais interessantes casos de convergência morfológica na estrutura floral devido à polinização encontrados entre as orquídeas (Dressler, 1993). Várias famílias de moscas são encontradas realizando polinização em Orchidaceae, principalmente Mycetophilidae, Sciaridae, Syrphidae e Drosophilidae (Christensen, 1994). Mas, infelizmente os estudos são ainda muito escassos para entendermos a influência destes insetos na evolução da família, e para podermos verificar a existência de alguma relação de especificidade entre grupos destes polinizadores e grupos de orquídeas.

*Bulbophyllum* é um dos maiores gêneros da família e concentra-se principalmente nos trópicos do Ásia e Oceania, com um número bem inferior de espécies na África e nas Américas, devido a uma disjunção ocorrida provavelmente em meados do período Terciário (Dressler, 1981; Vermeulen, 1991). No Brasil são encontradas cerca de 55 espécies (Pabst & Dungs, 1977). A inexistência de revisões recentes sobre o gênero no Brasil e no restante das Américas tem causado grandes dificuldades na identificação das espécies, principalmente em materiais de herbário. A escassez de coletas neste grupo, gerando amostragens descontínuas da variação existente, tem levado algumas vezes à uma profusão de sinônimos. Por outro lado, a falta de estudos de biologia reprodutiva tem feito com que taxonomistas negligenciem pequenas variações morfológicas por desconhecerem o seu significado biológico e consequentemente sua importância taxonômica.

Das espécies neotropicais de *Bulbophyllum*, apenas duas tiveram sua polinização estudada, sendo ambas brasileiras. Braga (1977) encontrou uma mosca Milichiidae polinizando *B. correae* Pabst, uma espécie epífita na Floresta Amazônica. Neste trabalho, Braga relatou o mesmo mecanismo de polinização encontrado em todas as outras espécies do gênero, que também eram epífitas em florestas tropicais da Ásia, África e Oceania: a mosca, ao pousar no labelo

extremamente móvel, faz com que este se mova para baixo devido ao seu peso, e caminhando nele ela passa do ponto de equilíbrio, voltando o labelo à posição natural e pressionando o inseto contra a coluna. Trabalhando com uma espécie de áreas abertas, rupícola em campos rupestres, Sazima (1978) descreveu um diferente mecanismo em *B. involutum* Borba, Semir & F. Barros (identificado como *B. warmingianum* Cogn.), onde o peso do inseto não desloca o labelo, e o vento é necessário para pressionar a mosca, também Milichiidae, contra a coluna. Estes são os dois únicos casos conhecidos de polinização por Milichiidae em orquídeas até o presente.

Estes fatos apresentados já são suficientes para formularmos algumas perguntas interessantes:

- Existe alguma relação a nível de grupo entre os *Bulbophyllum* neotropicais e a família Milichiidae?
- Existe especificidade entre espécies neotropicais de *Bulbophyllum* e espécies de Milichiidae?
- Existe relação de áreas fechadas (florestas) e áreas abertas (campos rupestres) com os dois mecanismos de polinização descritos para o gênero?
- Se moscas conhecidamente têm o comportamento de permanecer por longos períodos na flor, existem barreiras especiais à autogamia em orquídeas miiófilas?
- Assim como nos sistemas de alta especificidade, como polinização por abelhas euglossine ou sistemas de pseudocópula, estudos de polinização em orquídeas miiófilas podem ser de auxílio na taxonomia do grupo?
- E por último, como são os mecanismos de isolamento reprodutivo entre espécies de orquídeas miiófilas?

Objetivando tentar responder estas perguntas, foram escolhidas três espécies de *Bulbophyllum* ocorrentes nos campos rupestres brasileiros: *B. weddellii* (Lindl.) Rchb. f., *B. ipanemense* Hoehne e *B. involutum* Borba, Semir & F. Barros, esta última descrita no presente trabalho. *Bulbophyllum ipanemense* e *B. involutum* são muito semelhantes morfológicamente, sendo várias vezes confundidas entre si e com outras espécies deste complexo em coleções de herbário, como *B. warmingianum* Cogn. *Bulbophyllum weddellii* é bastante distinta das outras duas espécies, sendo simpátrica com *B. involutum*. E por fim, as três possuem várias características intermediárias entre si, formando um grupo interessante para os estudos aqui propostos.

# CAPÍTULO 1

**Biologia floral e fenologia de três espécies de *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) ocorrentes nos campos rupestres brasileiros: pode um sistema baseado na ineficiência do polinizador ser adaptativo?**

We are less ready to accept apparent “waste” of flowers, but in some situations that may be the price for getting the “right” number of pollinations and producing the “right” amount of seed.

*Michael Proctor, Peter Yeo & Andrew Lack, “The natural history of pollination”, 1996.*

<b>CONTEÚDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>RESUMO</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>12</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>14</b>
<b>Tabelas</b>	<b>22</b>
<b>Figuras</b>	<b>24</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>42</b>

## **RESUMO**

Foram estudadas a biologia floral e fenologia das orquídeas *Bulbophyllum weddellii* (Lindl.) Rchb. f. e *B. involutum* Borba, Semir & F.Barros, na Serra do Cipó, Santana do Riacho-MG, e *B. ipanemense* Hoehne, na Serra de Camargos, Nazareno-MG. As três espécies são polinizadas exclusivamente por fêmeas de *Pholeomyia* (Diptera: Milichiidae) atraídas por instinto de oviposição, com um relativamente alto grau de especificidade. Nas três espécies investigadas, ventos com velocidade entre 1,5 e 2,0m/s são necessários para que ocorra a polinização, balançando o labelo e prendendo o inseto na coluna. Este mecanismo parece ter evoluído em áreas abertas, tais como os campos rupestres onde elas ocorrem. A taxa de frutificação é muito baixa, variando entre 3 a 8%, devido a falta de constância destas moscas, apesar da taxa de remoção de políneas ser elevada. Elevada herbivoria e infrequência na floração também contribuem para o baixo sucesso reprodutivo destas espécies. Porém, como elas aparentemente estão sob escassez de recursos, baixa frutificação pode ser adaptativa por garantir sobrevivência e reprodução futura, existindo mecanismos assegurando que os raros casos de reprodução sexuada sejam através de polinização cruzada.

## INTRODUÇÃO

*Bulbophyllum* Thouars é um dos maiores gêneros de Orchidaceae, compreendendo cerca de 1000 espécies. O gênero apresenta distribuição pantropical, concentrando o maior número de espécies na Ásia, sendo menos representado na América do Sul (Vermeulen, 1991). No Brasil, ocorrem cerca de 55 espécies (Pabst & Dungs, 1977).

Flores de espécies de *Bulbophyllum* são tipicamente polinizadas por moscas, formando junto com a subtribo neotropical Pleurothallidinae os dois maiores grupos miiófilos da família (Pijl & Dodson, 1966). O mecanismo básico de polinização no gênero foi descrito primeiramente por Ridley (1890) em *B. macranthum* Lindl., uma espécie epífita das florestas tropicais do sudeste asiático. Este autor relatou que a mosca, ao pousar no labelo, faz com que este se mova para baixo, e ao se deslocar nele o inseto ultrapassa o ponto de equilíbrio, voltando o labelo à posição original e pressionando o inseto contra a coluna. Este mecanismo foi observado novamente em outras espécies também ocorrentes em interior de florestas (Pijl & Dodson, 1966; Jones & Gray, 1976; Braga, 1977). Posteriormente, outro mecanismo de polinização, onde é necessária a presença do vento para mover o labelo contra a coluna, foi descrito por Sazima (1978) em *B. involutum* Borba, Semir & F. Barros (identificado como *B. warmingianum* Cogn.), uma espécie ocorrente em áreas abertas de campos rupestres no sudeste do Brasil. Nestes dois mecanismos, a extrema mobilidade do labelo devido à uma fina membrana que o une ao pé da coluna, uma das características diagnósticas do gênero (Vermeulen, 1991), desempenha um papel primordial para que ocorra a polinização.

Orquídeas miiófilas tipicamente produzem poucos frutos (e.g. Christensen, 1992; Bänziger, 1996), devido principalmente à ineficiência do polinizador (Pijl & Dodson, 1966). Paralelamente, espécies que enganam o polinizador não oferecendo recompensa também possuem taxas de frutificação muito baixas (Zimmerman & Aide, 1989). A baixa taxa de frutificação nestas espécies que não oferecem recompensa tem algumas vezes sido explicada como adaptativa devido a escassez de recursos, uma vez que elevada produção de frutos em uma estação pode comprometer o crescimento vegetativo, a reprodução e até a sobrevivência futura (Nilsson, 1992). Por outro lado, Tremblay (1992) tem sugerido que, devido ao empacotamento de todo pólen em unidades (políneas) que são retiradas normalmente por apenas um visitante, as orquídeas evoluíram para atrair eficientes polinizadores. Então, sistemas onde espécies de orquídeas atraem polinizadores ineficientes, que acarretam em baixa produção de frutos devido à perda de políneas, estariam sofrendo forte seleção contrária.

*Bulbophyllum weddellii* (Lindl.) Rchb.f., *B. involutum* Borba, Semir & F. Barros (iné.) e *B. ipanemense* Høehne são espécies auto-compatíveis, e não formam frutos por agamosperma ou autopolinização espontânea (CAPÍTULO 3), sendo estas duas últimas espécies muito relacionadas

(CAPÍTULO 4). Estas espécies frequentemente ocorrem nos campos rupestres ao longo da Cadeia do Espinhaço, Brasil, e crescem diretamente sobre rochas, locais onde recursos são fatores limitantes. Este trabalho objetivou estudar o mecanismo de polinização e o sucesso reprodutivo associado a este nestas espécies, procurando relacionar os dados obtidos a estas hipóteses enunciadas anteriormente.

## METODOLOGIA

### Área de estudo

Este trabalho foi conduzido em áreas de campo rupestre pertencentes à Cadeia do Espinhaço no estado de Minas Gerais, na região sudeste do Brasil. As populações de *Bulbophyllum weddellii* (19°14'50"S; 43°30'40"W; ca. 1400m alt.) e *B. involutum* (19°19'30"S; 43°33'50"W; ca. 1100m alt.) se localizam na Serra do Cipó, município de Santana do Riacho e distam cerca de 10km uma da outra. A população de *B. ipanemense* estudada situa-se na Serra de Camargos, município de Nazareno (21°20'05"S; 44°34'30"W; ca. 1050m alt.), a aproximadamente 250km das populações das espécies anteriores, em local de transição entre campo rupestre e cerrado.

O clima em ambas regiões é do tipo Cwb na classificação de Köppen, clima mesotérmico com verões brandos e estação chuvosa no verão, com estação seca de 3 a 4 meses coincidindo com o inverno e período úmido de 7 a 8 meses.

Estas áreas são caracterizadas por possuírem uma vegetação aberta e de baixo porte, com espécies herbáceas crescendo sobre solo areno-pedregoso, e espécies herbáceas, subarbustivas e arbustivas crescendo em "ilhas" de afloramentos rochosos de quartzito (serrotes). Nestes locais, todas as três espécies crescem em área aberta, diretamente sobre rochas (Fig. 1). Eventualmente, alguns indivíduos de *B. involutum* e *B. ipanemense* são encontrados crescendo sobre árvores em pequenos trechos de mata adjacentes aos afloramento rochosos.

Observações complementares foram realizadas em material cultivado em casa de vegetação do Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campinas, estado de São Paulo (22°49'22"S; 47°05'59"W; ca. 700m alt.), situando-se a aproximadamente 540km da Serra do Cipó e 310km da Serra de Camargos.

## Biologia reprodutiva

As três espécies crescem através da emissão de um novo pseudobulbo a cada ano. Como os eixos das inflorescências permanecem secos nos pseudobulbos antigos por alguns anos, examinando os cinco últimos pseudobulbos de uma ramificação foi possível estimar a frequência de indivíduos florescendo e o número de vezes que cada indivíduo ("genet") floresceu nos anos de 1992 a 1996. Para isto, foram utilizados 50 indivíduos de cada espécie.

A fenologia floral e a taxa de frutificação das populações de *B. weddellii* e *B. involutum* foram acompanhadas através de visitas mensais, de janeiro a julho de 1996 (exceto junho), em 66 e 134 plantas que floresceram respectivamente, escolhidas de maneira aleatória. Apenas duas visitas foram realizadas à população de *B. ipanemense*, em março e abril de 1996, sendo a produção de flores e a taxa de frutificação baseadas no exame de 32 plantas que floresceram, escolhidas aleatoriamente. Foram também verificados os danos nas inflorescências destas populações causados por herbívoros cortadores e sugadores.

As observações da atividade dos visitantes florais foram realizadas no ano de 1996 em todas as espécies. Em *B. weddellii* estas observações foram realizadas em 23/janeiro, 23-25/fevereiro, 23 e 26/março, totalizando 30,5 horas. As observações em *B. involutum* ocorreram nos dias 21-22/janeiro, 27-28/fevereiro, 27-28/março, em um total de 34 horas. Em *B. ipanemense* foram feitas 30,5 horas de observações, nos dias 13-14/março, 3-4/abril. Estas observações foram realizadas dentro do intervalo das 7:00 às 17:00, sendo todas as flores disponíveis marcadas ao final do dia e examinadas no início da manhã para verificar a ocorrência de polinização fora do horário de observação. Como as populações ocorrem em diferentes localidades, para verificar se ocorre alguma relação de especificidade de visitantes, foram realizadas observações complementares em indivíduos das três espécies cultivados em casa de vegetação, florescendo simultaneamente. Devido à dificuldade de reconhecimento dos visitantes em campo, para se calcular a abundância relativa das visitas realizadas por cada espécie, foram feitas amostragens destes através de coletas em dias e horários variados, sendo os números extrapolados para o número de visitas total. Os visitantes coletados encontram-se na coleção particular do autor e serão posteriormente depositados no Museu de Zoologia da UNICAMP (ZUEC). Neste período de observação de visitantes, medições de temperatura e umidade relativa do ar, utilizando higrômetro seco/úmido, e velocidade do ar, utilizando anemômetro de palhetas Veb Anemometerbau Dresden, foram realizadas a cada intervalo de uma hora. Para se estimar a frequência de remoção de polinários nas populações das três espécies, foi verificado se flores em fenescimento tinham as suas políneas retiradas ou não.

Materiais testemunho das espécies foi depositado no herbário UEC (*B. weddellii*, E.L. Borba 151; *B. involutum*, E.L. Borba 150; *B. ipanemense*, E. L. Borba 177).

## RESULTADOS

### Fenologia

Todas as espécies apresentaram uma baixa frequência na floração, com apenas aproximadamente metade dos indivíduos da população florescendo a cada ano (Fig. 2A). Este percentual é ainda um pouco menor para *B. weddellii*. Entre os indivíduos, esta espécie possuiu uma maior homogeneidade, com a grande maioria destes florescendo apenas uma ou duas vezes nos últimos cinco anos. Já nas populações das outras duas espécies ocorreu uma maior desigualdade entre os indivíduos, sendo semelhante o número destes florescendo uma, duas, três ou quatro vezes neste período (Fig. 2B).

*Bulbophyllum weddellii* e *B. involutum* apresentaram um ciclo de fenologia floral bastante semelhante, caracterizado por um período de floração longo que coincide com o período úmido, apresentando um pico bem definido e poucos indivíduos florescendo ao longo de vários meses (Fig. 3). Apesar de não ter sido quantificada, a fenologia de *B. ipanemense* foi também muito semelhante à das duas outras espécies. Os indivíduos começaram a emitir inflorescências no início de janeiro, com as primeiras flores aparecendo ainda neste mês, com a floração estendendo-se até o final de julho. O pico de floração ocorreu de fevereiro a meados de abril. Ao longo de todo o período de floração foram observados indivíduos portando frutos, sendo o maior número destes ocorrendo durante ou logo após o pico de floração. Em todas as espécies, a maturação dos frutos demora 90 a 120 dias para ocorrer.

### Biologia floral

#### **Temperatura, umidade relativa e velocidade do ar**

Nos locais de ocorrência das três populações, a temperatura aumentou ao longo do dia, ultrapassando os 25°C por volta das 10 horas, e atingindo o máximo diário entre 12 e 14 horas (Fig. 4A-C). Os valores de temperatura foram inversamente proporcionais à altitude dos locais, com as temperaturas mais baixas medidas na população de *B. weddellii* e as mais altas na de *B. ipanemense*.

Nas populações de *B. involutum* e *B. ipanemense*, a umidade relativa do ar decresceu ao longo do dia, assumindo valores inferiores a 60% no período da tarde (Fig. 4A-C). Esta diminuição é menos perceptível na população de *B. weddellii* devido a chuvas de até 1 minuto de duração, muito frequentes às 12 e 16 horas aproximadamente, mantendo assim a umidade relativa valores superiores ao das outras populações.

Ventos leves com velocidade de 1 a 1,5m/s foram frequentes durante todo o dia, iniciando a ocorrência quando a temperatura começa a se elevar no início da manhã. A velocidade do ar oscilou bastante ao longo do dia, comportando-se diferentemente nos três locais (Fig. 4D-F). Porém, pode ser notado uma baixa comum a todos os locais por volta de 12 ou 13 horas, e algumas vezes no meio da manhã e início e final da tarde. No início da manhã e meio da tarde costumam ocorrer ventos fortes nas áreas de ocorrência das populações na Serra do Cipó. Já na Serra de Camargos, estes são menos comuns, raramente excedendo a 2,0m/s, provavelmente devido ao maior porte da vegetação, com grande número de árvores e arbustos.

### **Morfologia floral**

*Bulbophyllum weddellii* (Fig. 5) produz inflorescências basais com 30-40 cm de altura, eretas, genuflexas, de coloração amarela, com 10-34 flores. Em vista superior, a disposição das sépalas confere alguma radialidade à inflorescência. Flores ressupinadas devido ao curvamento da raque; sépalas ca. 15-20mm comprimento, oblongo-lanceoladas, amarelas com ápice branco e pontuações e manchas púrpuras internamente na base, as laterais patentes e falcadas e a dorsal ereta. Pétalas 3-6mm comprimento, lineares, patentes, fortemente falcadas, brancas com pontos purpúreos. Labelo 12-15mm comprimento, pendente em ângulo de 90° e articulado com a coluna e bastante móvel, base carnosa púrpura com dois pequenos lobos laterais eretos e longo limbo membranáceo branco com manchas púrpuras. Coluna com dois longos braços arqueados (estelídias) e dois dentes falcados na face ventral. Antera com dois pares de políneas.

As inflorescências de *B. involutum* (Fig. 6A) possuem pedúnculos de 29-48cm de comprimento, purpúreos, e raque de 11-22cm curvada em direção horizontal, com 11-27 flores. Flores consideravelmente menores do que as de *B. weddellii*, ressupinadas por torção do pedicelo, possuindo uma ligeira radialidade devido ao reduzido tamanho das pétalas e labelo em relação às sépalas. Sépalas 10-13mm comprimento, oval-triangulares com a face dorsal púrpura e a ventral verde com manchas e pontuações púrpuras, as laterais patentes e a dorsal ereta. Pétalas ovadas, 3-5mm comprimento, patentes, ciliadas na margem, púrpuras manchadas de verde-claro ou branco. Labelo 6-8mm de comprimento, formando ângulo de 45° e articulando-se com a coluna e também bastante móvel, com dois lobos laterais na base auriculares, eretos, ciliados, atropurpúreos, e longitudinalmente formando um grande calo oblongo, também atropurpúreo. Limbo do labelo curto em comparação com *B. weddellii*, possuindo as margens laterais involutas, sendo de coloração púrpura com o ápice branco. Coluna também com dois longos estelídias e dois dentes na face ventral. Polinário formado por dois pares de políneas.

A inflorescência e as flores de *B. ipanemense* (Fig. 6B) são bastante similares às de *B. involutum*. A inflorescência possui eixo com 10-27 de comprimento verde-amarelado e raque de 4-27cm com 8-36 flores. Estas flores diferem das de *B. involutum* basicamente pela cor amarelo-

claro-esverdeada com pontuações púrpuras das sépalas, pétalas triangulares brancas com pontuações púrpuras e labelo púrpuro com ápice branco possuindo margens convexas. São também um pouco menores, tendo as sépalas 7-9mm, pétalas 3-5mm e labelo 5-6mm comprimento.

### **Antese**

Em *B. weddellii*, podem ser abertas até três flores por dia em uma mesma inflorescência, ocorrendo antese de ao menos uma flor quase todos os dias. Como estas flores duram cerca de oito dias, as inflorescências possuem aproximadamente dez ou mais flores disponíveis simultaneamente. As flores podem iniciar a antese entre 7 e 14 horas, sendo mais frequente no período da manhã. O processo de separação e distensão das sépalas dura até 45 minutos, sendo que imediatamente após a separação destas, o labelo torna-se pendente e o estigma já possui uma abundante secreção, presente em todo período de permanência da flor, mostrando-se inteiramente receptivo. Um odor adocicado levemente ácido torna-se perceptível por volta de 30 minutos após completada a antese, com duração ao longo de todo o dia, se tornando mais fraco e cessando ao final da tarde .

Com as flores de *B. involutum* ocorre um processo diferente. Apenas uma flor se abre por dia, e sempre no início da manhã, entre 7 e 9 horas. As flores senescem ao final da tarde do terceiro dia, e quando uma flor está aberta nunca ocorre a antese de outra. Assim, existe sempre apenas uma flor disponível em cada inflorescência. A antese ocorre mais lentamente do que em *B. weddellii*, podendo demorar até 4 horas para se completar. No período entre a separação e a distensão das sépalas, estas mantêm o labelo suspenso, formando um pequeno espaço entre a coluna e o calo deste. Os odores, semelhantes a matéria orgânica vegetal em decomposição, foram percebidos apenas no primeiro dia de permanência da flor.

Com *B. ipanemense* ocorre algo intermediário às duas espécies anteriores. Podem abrir uma ou duas flores por dia e em dias seguidos, ocorrendo três a cinco flores na mesma inflorescência em antese simultânea. A duração da abertura e do período de disponibilidade da flor são muito semelhantes aos de *B. involutum*. Os odores, perceptíveis entre 9 e 16 horas, são ligeiramente ácidos e lembram um pouco os de *B. involutum*.

### **Visitantes**

Nenhuma flor das três espécies marcada ao final do dia teve o polinário removido ou recebeu políneas de outra flor no período noturno (das 17 às 7 horas).

### **MILICHIIDAE**

Dípteros da família Milichiidae foram os principais visitantes e os únicos polinizadores das três espécies de *Bulbophyllum* estudadas, sendo que todos os indivíduos coletados eram fêmeas. Estas moscas de coloração negra possuem tamanho bastante reduzido, variando de 1,5 a 3,0mm de comprimento e 0,7 a 1,5mm de altura (Tab. 1). Devido à dificuldade de identificação de fêmeas de

Milichiidae, especialmente as espécies do sudeste brasileiro (Dr. Curtis W. Sabrosky, USA National Museum, comunicação pessoal), os insetos foram identificados apenas a nível de gênero e agrupados em morfoespécies

### *Bulbophyllum weddellii*

Na Serra do Cipó, durante as 30,5 horas de observação ocorreram 37 visitas de Milichiidae às flores de *B. weddellii* (Tab. 1). Estas foram realizadas por duas espécies não identificadas de *Pholeomyia*. Deste total, 89% pertenceram à *Pholeomyia* sp.3, ao passo que *Pholeomyia* sp.1 teve uma baixa frequência. Nos indivíduos cultivados, *Pholeomyia* sp.3 novamente foi o principal visitante, ocorrendo também algumas visitas por *Pholeomyia* sp.4, uma espécie de menor tamanho.

As visitas de *Pholeomyia* sp.3 e *Pholeomyia* sp.1 começaram a ocorrer por volta de 8 horas, quando a temperatura ultrapassa os 22°C e as flores começam a emitir odores. Entre 10 e 12 horas, momento onde a fragrância está mais forte, as visitas foram mais numerosas, decrescendo então em frequência a partir deste horário (Fig. 7A). Entre 14 e 16 horas voltou a ocorrer um grande número de visitas, cessando completamente após este período, que coincide com a diminuição da emissão de odores. Durante todo o dia, e principalmente coincidindo quando o número de visitas é menor, ocorreram aproximações destes insetos às flores sem contudo pousarem, através de sobrevôos de vários segundos a poucos centímetros de distância, indo então embora (Fig. 7A). Puderam ser observadas 28 destas aproximações. Esta queda na frequência de visitas associada ao maior número de apenas aproximações ocorreu normalmente no mesmo período onde a velocidade do ar é muito alta (Fig. 4D).

Estas espécies de moscas tiveram o comportamento semelhante. As visitas ocorrem com aproximações através de vôos erráticos, às vezes com o inseto sobrevoando por alguns segundos a flor. Com ventos acima de 2,0m/s a inflorescência balança muito, impedindo o pouso do inseto, que sobrevoa a flor e vai embora. Aparentemente, as visitas são mais comuns nas flores mais novas, abertas no mesmo dia ou no dia anterior, apesar de todas as outras flores disponíveis estarem emitindo odores, porém muito mais adocicados. A mosca quase sempre pousa no ápice branco das sépalas laterais, podendo ficar neste local por vários minutos. Posteriormente, caminha até a base da sépala, saltando então para o calo do labelo. Rapidamente vai em direção à base do labelo e fica lambendo na fenda formada entre os lobos laterais, onde concentra-se uma pequena quantidade de néctar. Nesta posição, a mosca encontra-se exatamente sob a coluna. Porém, existe um espaço grande entre esta e o dorso do inseto, de modo que em nenhum momento ele a toca, uma vez que o peso ou a atividade deste não são capazes de alterar a posição do labelo (Fig. 8A). As frequentes rajadas de vento movimentam o labelo, e normalmente o inseto se "assusta", indo em direção ao limbo deste, ou podendo voltar à sepala lateral, mudar para outra flor da mesma inflorescência ou mesmo ir embora com ventos mais fortes, acima de 2,0m/s. Quando a mosca não vai embora, logo

após, ela retorna à base do labelo e continua alimentando-se, quando novas rajadas lançam o labelo contra a coluna aprisionando-a, ficando colada no viscidio, o que pode demorar de 1 a 13 minutos para ocorrer desde o início da visita (Fig. 8B). Ventos com velocidade entre 1,0 e 1,5m/s foram necessários para que isto aconteça. Uma vez presa, ela se segura ao labelo e força sua saída para trás, que é única direção por onde ela pode ir, já que os estelídios a impedem de sair pelos lados. Devido ao grande esforço que a mosca faz para escapar da flor, quando ela se desprende da coluna o labelo desce rapidamente, tendo uma ação de catapultar o inseto, que sai voando com os dois pares de políneas aderidas na região dorsal do tórax (Fig. 8C), sem nunca permanecer na flor. Este escape pode demorar de 10 a 60 minutos para acontecer, não tendo sido visto o retorno do mesmo inseto à flor da qual ele retirou as políneas. Tanto *Pholeomyia* sp.3 quanto *Pholeomyia* sp.1 foram capazes de remover o polinário de *B. weddellii*. A maioria das visitas durou menos de 1 minuto, não chegando o inseto a atingir o labelo nestas ocasiões. Quando o vento não é eficiente, ele fica se alimentando por até 10 minutos no labelo, raramente mais, indo embora em seguida (Fig. 7D).

No período, as políneas de 6 (15%) das 40 flores observadas foram removidas, sendo visto a deposição de polinário na cavidade estigmática em apenas uma flor. Para depositar o polinário, a mosca ficou presa por um período maior do 1,3 horas até conseguir se livrar das políneas. O polinário de 51,5% das flores fenescidas amostradas foi removido (Tab. 2).

#### *Bulbophyllum involutum*

Os visitantes de *B. involutum* na Serra do Cipó foram duas espécies de *Pholeomyia* e uma de *Desmometopa*, podendo ser verificadas 24 visitas e 39 aproximações sem pouso nas 34 horas de observação (Tab. 1). Estas espécies de *Pholeomyia* foram as mesmas que visitaram *B. weddellii*, porém, inversamente ao caso anterior, *Pholeomyia* sp.1 realizou o maior número de visitas (50%). A menor das três espécies, *Desmometopa* sp., visitou apenas 4 vezes as flores de *B. involutum*. Em casa de vegetação, *Pholeomyia* sp.2, *Pholeomyia* sp.3, *Pholeomyia* sp.4 e *Desmometopa* sp. visitaram as flores, com esta última espécie em menor frequência.

As visitas ocorreram principalmente nas flores em primeiro dia de antese. No campo, o padrão do número de visitas às flores de *B. involutum* ao longo do dia foi muito semelhante ao de *B. weddellii*, mas com uma frequência menor (Fig. 7B). A maior diferença deu-se com o grande número de aproximações sem o pouso do inseto ocorrido entre 11 e 13 horas. Este é o horário de maior velocidade do vento dentro do período de emissão de odores, coincidindo com o horário de chuvas no local da população de *B. weddellii*, no período de observação.

A aproximação das moscas é feita de maneira similar ao que ocorre em *B. weddellii*, porém o pouso do inseto quase sempre ocorre no ápice branco do labelo, e mais raramente no ápice da sépala dorsal. Ventos acima de 2,0m/s balançam fortemente a inflorescência, impedindo o seu pouso. Uma vez na flor, elas dirigem-se rapidamente à uma cavidade formada entre os lobos laterais

na base do labelo, onde se acumula uma pequena quantidade de néctar, e ficam se alimentando. Frequentemente elas saem e percorrem as outras partes da flor, às vezes permanecendo paradas ou se limpando, ou abandonam a flor por alguns segundos, sobrevoando-a e retornando em seguida à base do labelo. Nesta posição o inseto não chega a tocar a coluna, e tanto o seu peso quanto a sua atividade não são suficientes para deslocar o labelo (Fig. 9A). O espaço formado entre labelo e inseto é menor do que em *B. weddellii* devido ao menor ângulo entre labelo e coluna. Assim como descrito anteriormente, ventos de 1,0 a 1,5m/s balançam o labelo comprimindo a mosca contra a coluna e a aprisionam. Ventos mais fortes que 2,0m/s normalmente a espantam. Este aprisionamento pode acontecer rapidamente ou pode demorar até 30 minutos a partir do início da visita. Quando o inseto se liberta com o polinário aderido à região dorsal do tórax, o que acontece em até 10 minutos, ele permanece na flor, voltando a realizar o comportamento anterior (Fig. 9B,C). A autopolinização porém não ocorre, devido à grande largura do polinário após a sua retirada, que não passa através da entrada da cavidade estigmática, necessitando de vários minutos (acima de 100) para sua diminuição em tamanho. Metade do polinário possui a largura necessária para passar pela entrada da cavidade, podendo a princípio ser depositado apenas um par de políneas no estigma. Isto porém não acontece devido à forma compacta do polinário, à forma da entrada da cavidade e presença dos dentes na face abaxial da coluna. Após cerca de 7 minutos o inseto vai embora carregando o polinário. Normalmente, as visitas destes Milichiidae tiveram curta duração (menos de 1 minuto), com o inseto pousando e indo embora antes de alcançar a base do labelo, ou se estenderam por um longo período, com ele permanecendo além de 25 minutos se alimentando na flor (Fig. 7E).

Todas as espécies de *Pholeomyia* conseguiram remover as políneas de *B. involutum*, o mesmo não acontecendo com *Desmometopa* sp., devido ao seu reduzido tamanho. Em casa de vegetação, *Pholeomyia* sp.4, a menor das quatro espécies do gênero observadas, não demonstrou ser um visitante muito eficiente na remoção de políneas. Em indivíduos com flores menores foram necessários ventos fortes para comprimir moscas desta espécie contra a coluna, o que algumas vezes nem chega a ocorrer em indivíduos que possuíam flores maiores.

No campo, foi observado por três vezes a deposição de polinários em flores de *B. involutum*, com o inseto demorando de 15 minutos a 3,4 horas para se libertar. Das 11 flores com políneas observadas, 3 (27%) tiveram o polinário removido. A taxa de remoção na população foi de 39,3% (Tab. 2).

#### *Bulbophyllum ipanemense*

Indivíduos de *Pholeomyia* sp.4 foram os únicos Milichiidae que visitaram as flores de *B. ipanemense*, tanto na população da Serra de Camargos quanto em casa de vegetação (Tab. 1).

Nas 30,5 horas de observação foram registradas 407 visitas, um número bem superior ao levantado para *B. weddellii* e *B. involutum*. Proporcionalmente, o número de aproximações sem o pouso do inseto foi inferior ao das espécies anteriores, ocorrendo apenas 28. Estas visitas tiveram dois picos de frequência, entre 10 e 13 horas e entre 14 e 16 horas, diminuindo quando a temperatura se eleva muito e a umidade relativa do ar está abaixo de 60% (Fig. 7C). A velocidade do ar, que raramente superou 2,0m/s, aparentemente não influenciou negativamente o número de visitas.

Todo o comportamento dos visitantes e mecanismo de polinização são muito semelhantes ao que ocorre em *B. involutum*. Uma diferença básica está em *B. ipanemense* ter várias flores disponíveis simultaneamente. A princípio, o inseto pousa preferencialmente nas duas flores mais novas, mas durante a visita ele pode percorrer muitas vezes todas as flores. Aparentemente, apenas estas flores recém abertas emitem odores. Comparativamente às espécies anteriores, as visitas tiveram uma duração bastante variável, e cerca de 60% delas demoraram até 5 minutos (Fig. 7F). Demorou de 1 a 3 minutos para *Pholeomyia* sp.4 ser comprimido contra a coluna e ficar preso, libertando-se após 5 a 22 minutos com o polinário aderido ao dorso do tórax (Fig. 10A,B). Ao contrário do que foi observado em relação a *B. involutum*, *Pholeomyia* sp.4 foi perfeitamente capaz de remover os polinários e efetuar a polinização em *B. ipanemense*. Em indivíduos de *B. ipanemense* localizados entre fendas de rochas ou na presença de outras barreiras ao vento, este mecanismo de polinização foi em parte ineficiente, com o inseto algumas vezes não ficando preso na coluna e conseqüentemente não removendo o polinário.

Das 13 flores com políneas observadas, 9 (69%) tiveram seus polinários removidos. Em 6 (67%) destes casos, o inseto permaneceu na flor de 1 a 14 minutos ou a abandonou por poucos minutos, voltando em seguida. Apesar disto, devido ao mesmo mecanismo observado em *B. involutum*, nenhuma autopolinização ocorreu. Foi observada a deposição de apenas um polinário na cavidade estigmática de flor de *B. ipanemense*, com o inseto demorando 10 minutos para se livrar das políneas. Baseado no exame de flores fenescidas, estimou-se em cerca de 92% a frequência de remoção de políneas na população de *B. ipanemense* (Tab. 2).

## OUTROS VISITANTES

No campo, pequenas moscas da espécie *Liohippellates* cf. *pusio* (Chloropidae) frequentemente foram encontradas pousadas no escapo ou mais raramente no ápice da sépala dorsal de *B. weddellii*, sem contudo explorarem outras partes da flor. Cinco indivíduos de uma espécie do gênero *Appalates* (Chloropidae) foram observados alimentando-se na base do labelo de *B. ipanemense* em casa de vegetação, entretanto sem conseguirem retirar as políneas da flor por causa de seu tamanho bastante reduzido (cerca de 1,5mm). Um indivíduo desta mesma espécie e

de outra também deste gênero foram observadas com o mesmo comportamento em flores de *B. involutum* em casa de vegetação.

Aranhas Tomisidae foram frequentes nas inflorescências das três espécies, especialmente em *B. weddellii* e *B. ipanemense*. Estas assumem uma coloração amarelo-esverdeada, semelhante à das flores destas duas espécies, e predam os visitantes quando estes pousam (Fig. 10C). Comportamento semelhante foi observado em aranhas Salticidae, de coloração escura, presentes nas flores de *B. involutum*.

Patrulhamento por formigas de uma espécie pertencente ao grupo *gracilis* do gênero *Pseudomyrmex* (Pseudomyrmecinae) foi bastante comum em inflorescências de *B. ipanemense*. Estas formigas capturam os indivíduos de Milichiidae e os jogam para fora da flor. Estas formigas não exploraram o néctar formado na base do labelo, e nenhum nectário extrafloral foi encontrado.

### **Produção de flores e taxa de frutificação**

Em *B. weddellii* e *B. ipanemense*, 10 a 20% das inflorescências que iniciaram o seu desenvolvimento não chegaram a produzir flores, devido a herbivoria. Já em *B. involutum* estes valores foram bem superiores, chegando a 65% das inflorescências morrerem antes da antese (Tab. 3). *Bulbophyllum ipanemense* possui em média um maior número de flores por inflorescência, seguido por *B. weddellii* (Fig. 11A-C)

Das inflorescências onde chegou a ocorrer a antese de alguma flor, 40 a 80% iniciaram a frutificação. Porém, cerca de 35% destas perderam todos os seus frutos antes da maturidade. De todas as espécies, *B. ipanemense* foi quem teve a parcela mais elevada da população produzindo frutos.

O número de frutos inicialmente desenvolvidos foi muito baixo em todas as espécies, variando de 5 a 10% em relação ao número total de flores. Além disso, como vários destes frutos não chegaram à maturidade, a taxa efetiva de frutificação caiu para 3 a 8%, tendo em média apenas 0,1 a 1,6 frutos por inflorescência. Cada inflorescência produziu normalmente apenas de 1 a 3 frutos, raramente mais (Fig. 11D-F). Somente as inflorescências de *B. ipanemense* que eventualmente chegaram a desenvolver um número maior, com até 6 ou 8 frutos. Não existiu nenhuma correlação entre número de flores e número de frutos desenvolvidos por inflorescência nas três espécies.

A maior taxa de frutificação foi observada em *B. ipanemense*, e a menor em *B. involutum*. Mesmo com diferença entre taxas de frutificação, em todas espécies o número de políneas retiradas por fruto formado foi muito semelhante. Um sumário dos dados de produção de flores e frutos encontra-se na Tabela 3.

## Herbivoria

Foi observada a presença de afídeos em inflorescências de *B. involutum* e *B. weddellii*, com maior incidência nesta última espécie (Fig. 12). Estes se encontravam principalmente nos botões florais ou no ovário das flores, sendo mais frequentes no início e no pico da floração. Pode ser verificado que várias flores foram perdidas devido à ação destes insetos, com os botões murchando ou secando anteriormente à antese ou estas tendo seu período de disponibilidade reduzido.

A perda por herbivoria mais significativa deu-se através da ação de insetos cortadores, provavelmente formigas (Fig. 3,12; Tab. 3). Estas perdas foram menores em *B. ipanemense* (10%) e *B. weddellii* (20%). Já a maioria das inflorescências de *B. involutum* foram totalmente (64%) ou parcialmente (15%) cortadas ainda no início de seu desenvolvimento. Examinando inflorescências produzidas em estações anteriores e que permanecem secas na planta por um longo período, pode ser constatado que este tipo de ação de herbívoros cortadores tem ocorrido frequentemente nestas populações.

Em 34% das inflorescências de *B. ipanemense* ocorreu predação de partes florais, principalmente do labelo. Estas flores foram na maioria das vezes funcionalmente inutilizadas devido a esta herbivoria.

Além disto, 15 a 20% das inflorescências de *B. involutum* e *B. weddellii* secaram ou murcharam inteiramente no início ou durante o desenvolvimento. Porém, apesar de indícios da ação de algum herbívoro, supostamente afídeos, a causa não pode ser confirmada.

Tabela 1- Número de visitas realizadas e espécies de Milichiidae visitantes às flores de *B. weddellii*, *B. involutum* e *B. ipanemense*, no campo. São fornecidos o comprimento e altura dos insetos (comp. $\pm$ desv.pad. x alt. $\pm$ desv.pad.); CV indica a presença de visitas pela espécie em indivíduos cultivados em casa de vegetação.

espécie	<i>Pholeomyia</i> sp.1 (2,9 $\pm$ 0,2X1,3 $\pm$ 0,1)	<i>Pholeomyia</i> sp.2* (2,8 $\pm$ 0,2X1,3 $\pm$ 0,3)	<i>Pholeomyia</i> sp.3 (2,4 $\pm$ 0,1X1,1 $\pm$ 0,1)	<i>Pholeomyia</i> sp.4 (1,9 $\pm$ 0,2X0,8 $\pm$ 0,1)	<i>Desmometopa</i> sp. (1,5X0,7)	total
<i>B. weddellii</i>	4 (11,1%)	—	33 (88,9%) +CV	CV	—	37
<i>B. involutum</i>	12 (50,0%)	CV	8 (33,3%) + CV	CV	4 (16,7%) +CV	24
<i>B. ipanemense</i>	—	—	—	407 (100%) + CV	—	407

\**Pholeomyia* sp.1 e *Pholeomyia* sp.2 são morfologicamente muito semelhantes, e podem representar apenas variação de uma mesma espécie.

Tabela 2- Número de polinários removidos em flores de *B. weddellii*, *B. involutum* e *B. ipanemense*. Obtido a partir de flores fenescidas coletadas aleatoriamente nas populações.

espécie	flores examinadas	polinários removidos
<i>B. weddellii</i>	33	17 (51,5%)
<i>B. involutum</i>	61	24 (39,3%)
<i>B. ipanemense</i>	78	72 (92,3%)

Tabela 3- Produção de flores e de frutos em condições naturais em *B. weddellii*, *B. involutum* e *B. ipanemense* no ano de 1996.

espécie	<i>B. weddellii</i>	<i>B. involutum</i>	<i>B. ipanemense</i> *
nº inflorescências inicial	66	134	32
infloresc. floresceram (antese ocorrida em ao menos uma flor)	62,12%	34,33%	90,93%
infloresc. iniciaram frutificação	31,82%	13,43%	68,75%
razão nº infloresc. inic. frutif./ floresceram	51,22%	39,13%	75,86%
infloresc. completaram frutif.	24,24 %	9,70 %	—
razão nº infloresc. completaram frutif./floresceram	39,02%	28,26%	—
razão nº infloresc. completaram frutif./inic. frutif.	76,19%	72,22%	—
nº flores	798	504	661
flores por infloresc. (média±dp; min-max)	19,46±6,78; 3-34	10,96±6,71; 1-27	22,79±10,87; 1-36
frutos iniciaram desenvolvimento	5,64%	5,36%	10,22%
frutos completaram desenv.	80,00%	70,37%	—
razão nº frutos complet. desenv./nº flores	4,51%	3,77%	<10,22%
média de políneas removidas por fruto formado	11,4	10,4	11,7
razão nº frutos/inflorescência	0,55	0,14	≤1,63

\* devido ao não acompanhamento mensal de *B. ipanemense*, alguns números são estimados. Nº de flores = 509 flores onde já havia ocorrido a antese + 152 botões. Taxa de frutificação baseada apenas nas 509 flores.



Figura 1- População de *B. weddellii* (A) e *B. involutum* (B) crescendo sobre rochas em campos rupestres da Serra do Cipó, Santana do Riacho-MG.

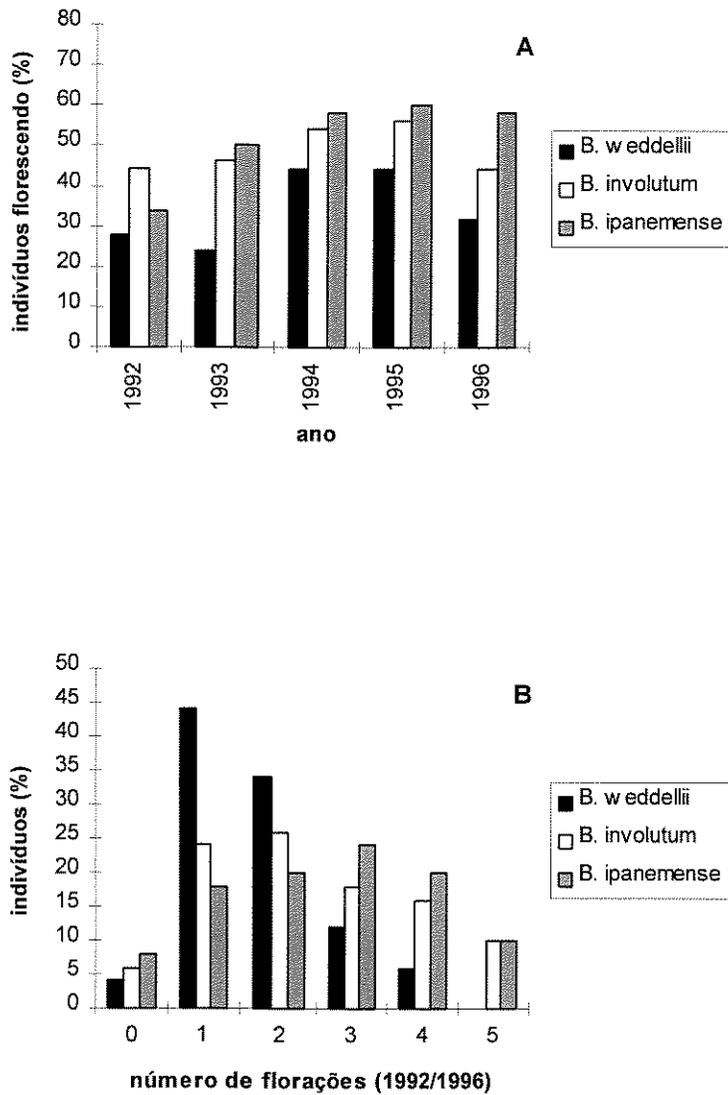


Figura 2- Percentual de indivíduos de *B. weddellii*, *B. involutum* e *B. ipanemense* florescendo (A) e número de florações por indivíduo (B) nos anos de 1992 a 1996. Estimado a partir de 50 indivíduos por espécie.

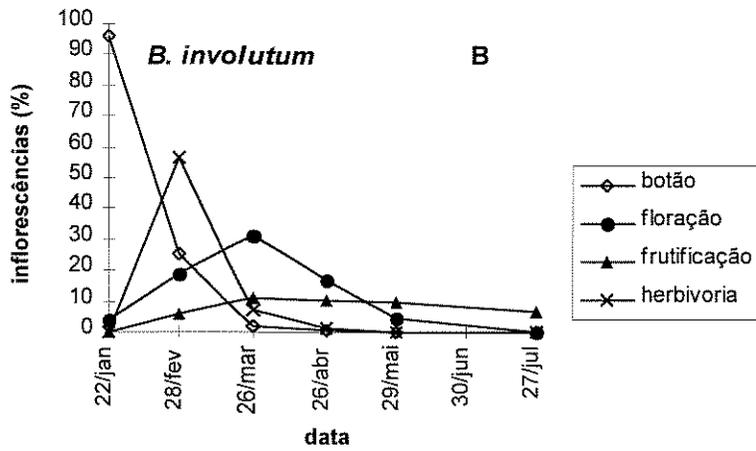
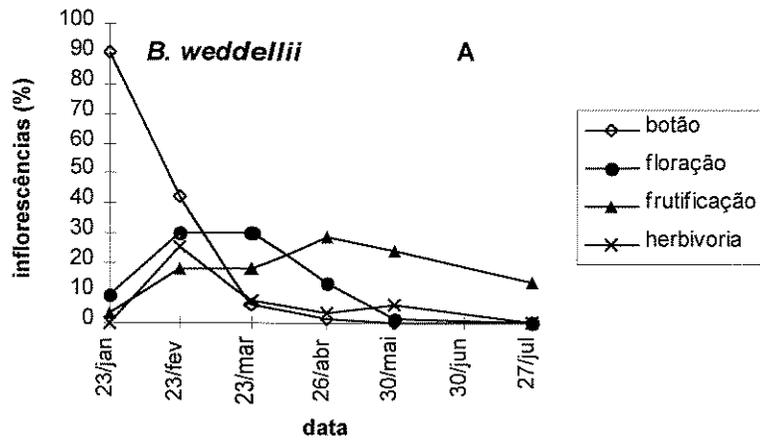


Figura 3- Fenologia e perdas totais por herbivoria em inflorescências de *B. weddellii* (n=66) (A) e *B. involutum* (n=134) (B) de janeiro a julho de 1996.

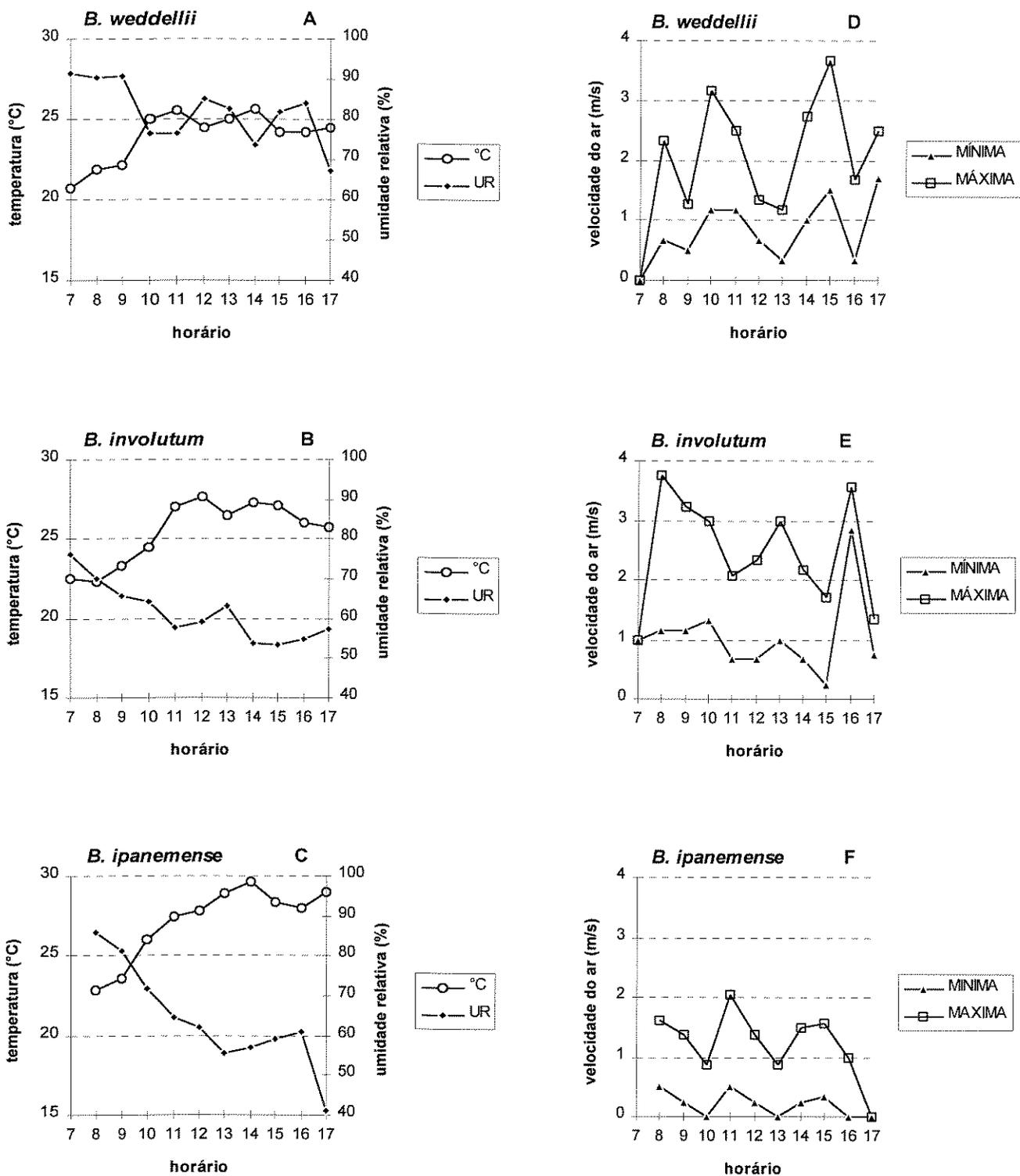


Figura 4- Dados médios de temperatura e umidade relativa do ar (A-C) e de velocidade do ar máxima e mínima (D-F) nas populações de *B. weddellii* (A,D), *B. involutum* (B,E) e *B. ipanemense* (C,F) durante o período de observação de visitantes.

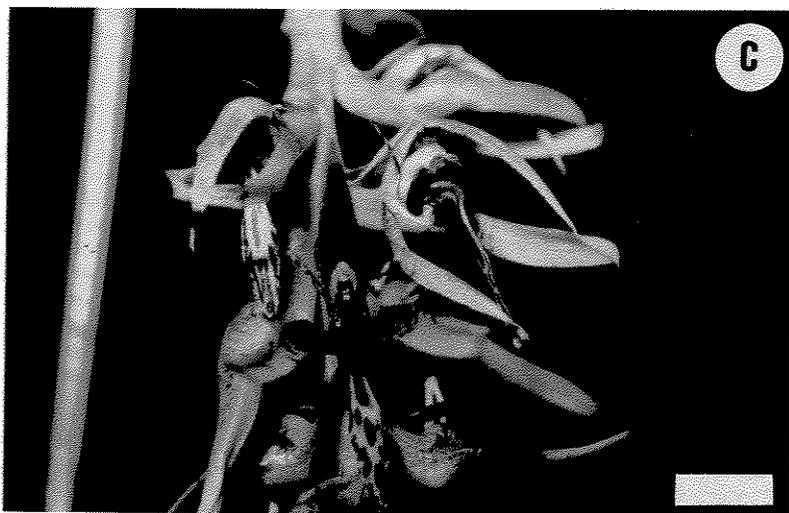


Figura 5- *B. weddellii*. A-Inflorescência. B- Inflorescência em vista superior. C- Flor. Barras de escala = 2,0cm (A) e 1,0cm (B, C).



Figura 6- A- Flor de *B. involutum*. B- Flor de *B. ipanemense*. Barras de escala = 1,0cm.

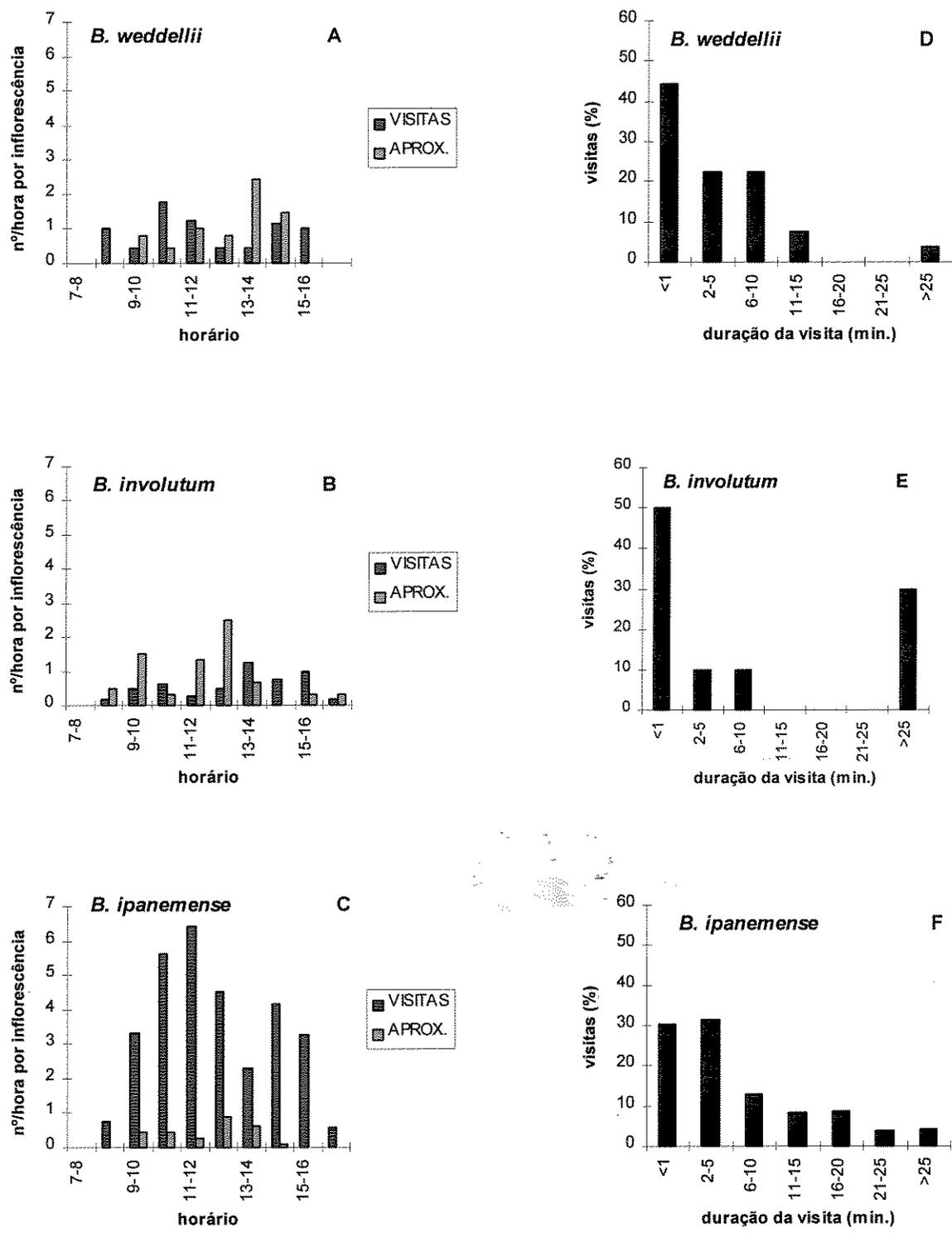


Figura 7- Frequência de visitas e aproximações sem pouso por hora por inflorescência (A-C) e duração das visitas (D-F) em flores de *B. weddellii*, *B. involutum* e *B. ipanemense* no campo.

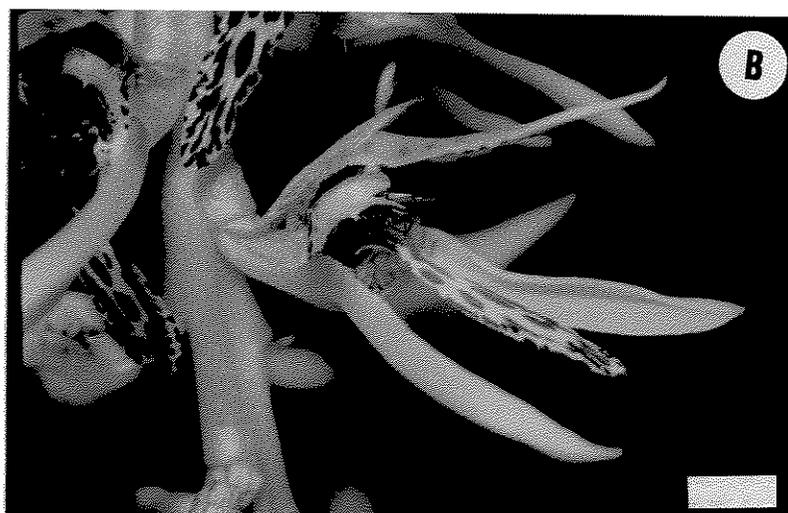


Figura 8- A- *Pholeomyia* sp.3 alimentando-se na base do labelo de flor de *B. weddellii*. Note que o inseto não toca a coluna. B- *Pholeomyia* sp.3 presa na coluna, colada ao viscidium da flor de *B. weddellii*. Observe que apenas o labelo da flor com o polinizador permanece ereto, devido ao inseto estar se segurando a ele forçando a sua saída para trás. C- *Pholeomyia* sp.3 com polinário de *B. weddellii* aderido à região dorsal do tórax. Barras de escala = 0,5cm (A, B) e 0,5mm (C).

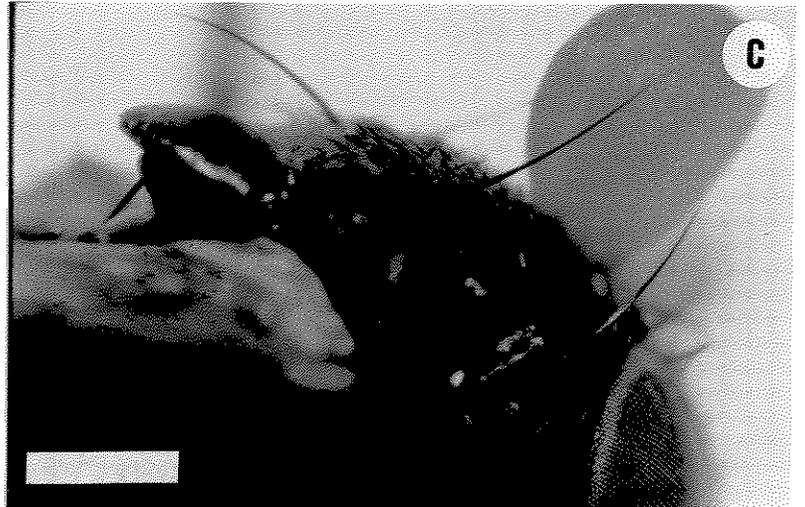
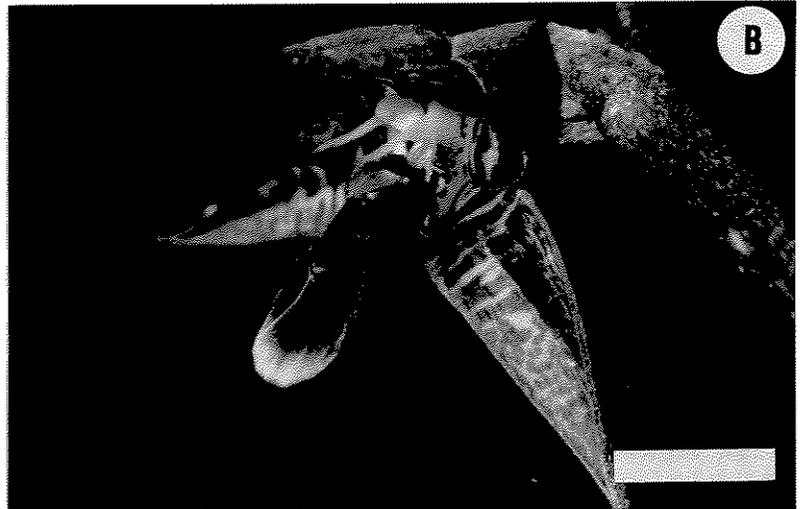


Figura 9- A- *Pholeomyia* sp.1 alimentando-se na base do labelo de flor de *B. involutum*. Note que o inseto não toca a coluna. B- *Pholeomyia* sp.1 com polinário de *B. involutum* logo após sua remoção, permanecendo na mesma flor. C- *Pholeomyia* sp.1 com polinário de *B. involutum* aderido à região dorsal do tórax. Barras de escala = 0,5cm (A, B) e 0,5mm (C).

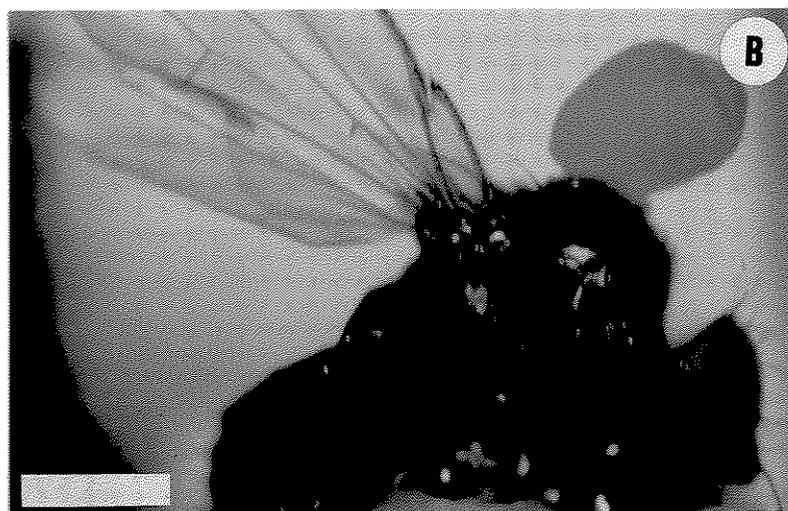


Figura 10- A- *Pholeomyia* sp.4 com polinário de *B. ipanemense* logo após sua remoção, permanecendo na mesma flor. B- *Pholeomyia* sp.4 com polinário de *B. ipanemense* aderido à região dorsal do tórax. C- Aranha Tomisidae em flor de *B. ipanemense* capturando indivíduo de *Pholeomyia* sp.4. Barras de escala = 0,5cm (A, C) e 0,5mm (B).

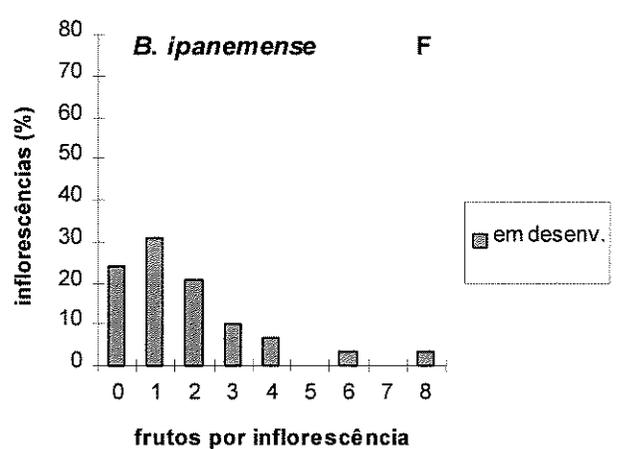
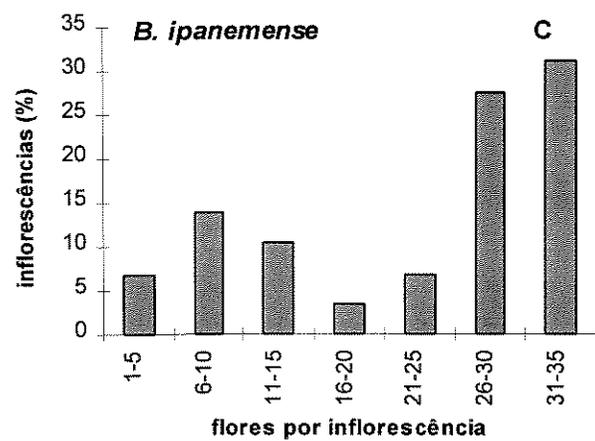
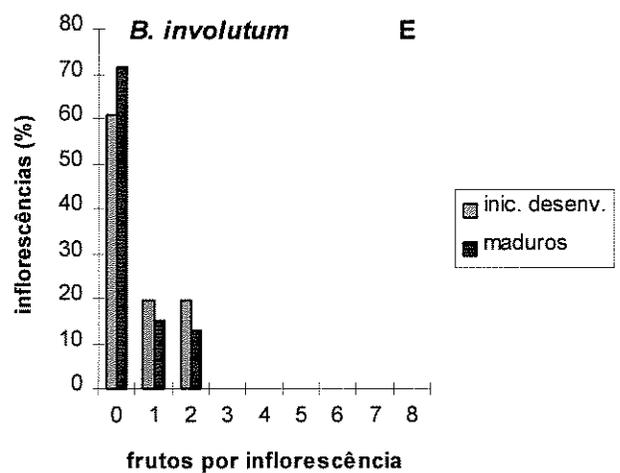
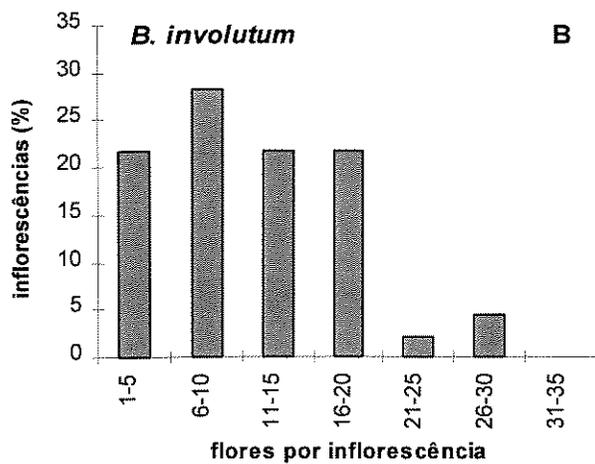
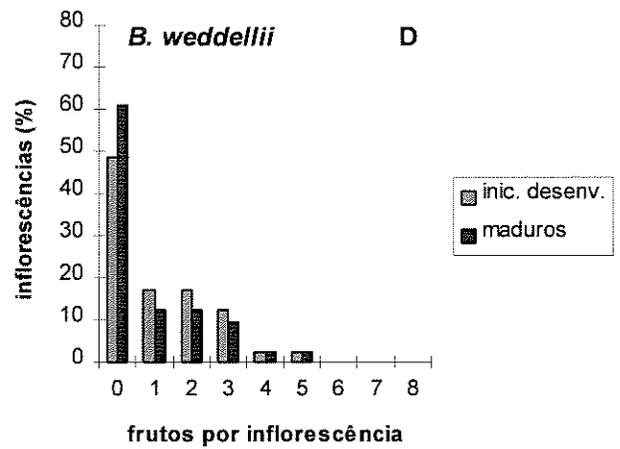
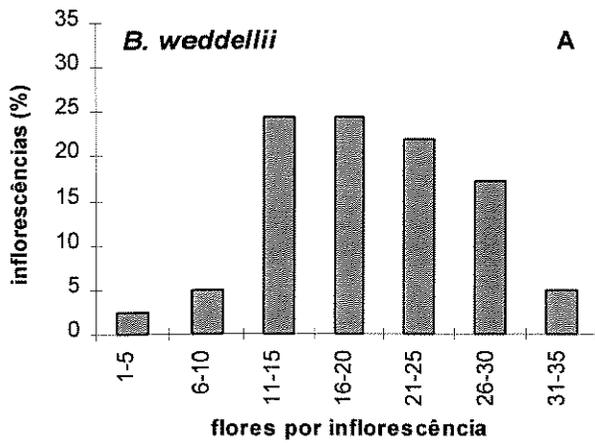


Figura 11- Frequência de formação de flores (A-C) e de frutos (D-F) por inflorescência sob condições naturais em *B. weddellii* (n=66), *B. involutum* (n=134) e *B. ipanemense* (n=32).

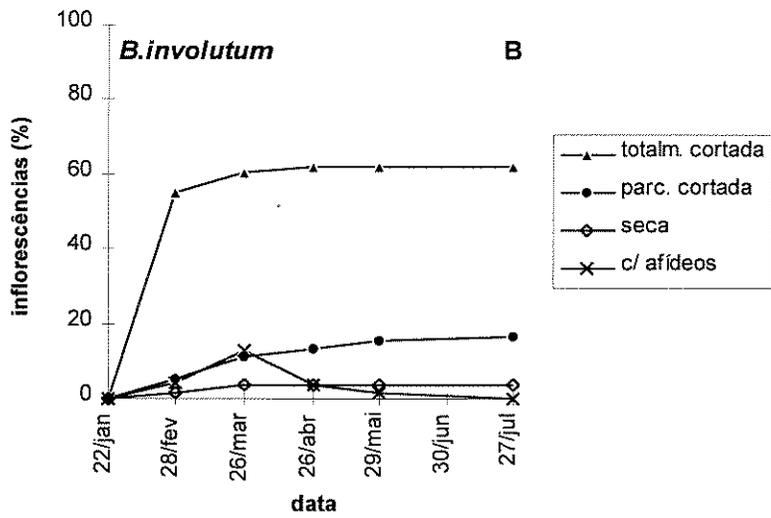
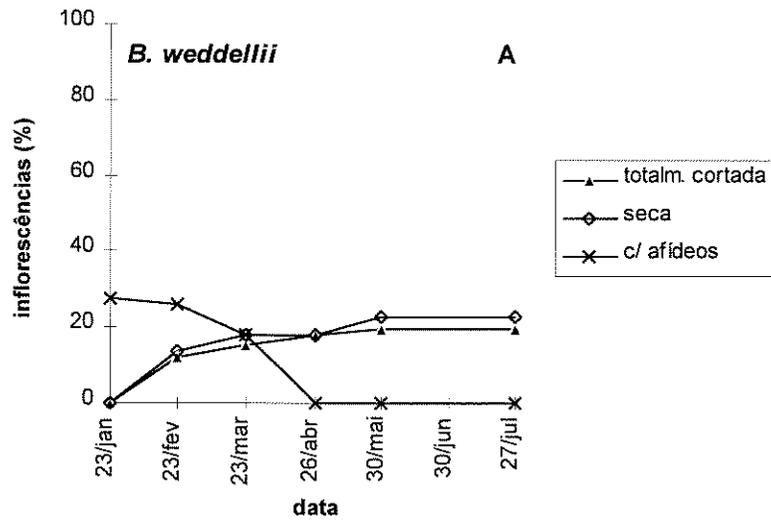


Figura 12- Ocorrência de herbivoria no campo em inflorescências de *B. weddellii* (n=66) (A) e *B. involutum* (n=134) (B) no período de janeiro a julho de 1996. Dados cumulativos, exceto para presença de afídeos.

## DISCUSSÃO

### Polinização

A família Milichiidae compreende cerca de 225 espécies de pequenas e inconspícuas moscas de 1 a 5mm de comprimento, distribuídas em 19 gêneros, muitos deles cosmopolitas (Sabrosky, 1987a). As larvas de Milichiidae vivem em fezes ou em material vegetal e animal em decomposição, e os adultos são mirmecófilos, facultativamente antófilos e comensais de predadores de insetos (Sabrosky, 1959, 1973, 1987a; Netto, 1989; Peeters et al., 1994). Além de Orchidaceae, polinização por Milichiidae tem sido reportada em *Aristolochia* (Brantjes, 1980; Wolda & Sabrosky, 1986) e vários gêneros de Asclepiadaceae (Vogel, 1961; Sabrosky, 1987b; Meve & Liede, 1994).

A miofilia em Orchidaceae está principalmente associada às famílias Mycetophilidae, Sciaridae, Syrphidae e Drosophilidae (e.g., Pijl & Dodson, 1966; Ackerman & Mesler, 1979; Reeves & Reeves, 1984; Chase, 1985; Dafni & Calder, 1987; Pedersen, 1995; Bänziger, 1996) ou mais raramente a outras famílias (e.g., Patt et al., 1989). Para uma revisão do assunto, veja Christensen (1994). Polinização por Milichiidae na família foi mencionada apenas para duas espécies neotropicais de *Bulbophyllum*, *B. correae* Pabst (Braga, 1977) e *B. involutum* (Sazima, 1978; como *B. warmingianum* Cogn.). Jones & Gray (1976) reportam moscas Lonchaeidae como polinizadoras de *B. longiflorum* Thouars, Smythe (1969) cita *Strumeta* (Tephritidae) polinizando *B. baileyi* F. Muell., Jones (1985) menciona *Calliphora tibialis* (Calliphoridae) como polinizador de *B. weinthalii* R. Rogers, sendo todas estas espécies australianas. Infelizmente, os outros trabalhos sobre polinização de espécies deste gênero não designam a identidade dos polinizadores, citando apenas que são moscas (e.g., Ridley, 1890; Pijl & Dodson, 1966).

Apesar de escassos os estudos de miofilia em Orchidaceae, é interessante notar a exclusividade, até o presente, da polinização por Milichiidae em espécies de *Bulbophyllum* neotropicais, sendo estas, distintas morfológicamente, não relacionadas (exceto *B. involutum* e *B. ipanemense*, que são muito próximas) e que ocorrem em ambientes diversos e distantes geograficamente (*B. correae* é epífita na Floresta Amazônica). Um maior número de estudos de caso de polinização na família, principalmente em *Bulbophyllum*, tanto neotropicais quanto do Velho Mundo, e nas Pleurothallidinae, que apresentam grande convergência com este gênero devido a sistemas de polinização similares (Dressler, 1981, 1993), será de grande importância para definir se realmente existe alguma especificidade na polinização por este grupo de moscas. Isto certamente ajudará a esclarecer as idéias sobre tendências evolutivas, filogenia e natureza da grande

diversidade morfológica em *Bulbophyllum*, um dos mais complexos gêneros de Orchidaceae (Vermeulen, 1991).

Independente da existência de especificidade de polinizadores a nível de maiores grupos, a relação a nível de espécies observada neste trabalho é notável. A ocorrência das mesmas espécies de Milichiidae visitando as flores das espécies de *Bulbophyllum* no campo e em casa de vegetação é surpreendente, principalmente devido à distância (310 e 540km) e diferença entre estes ambientes.

Sabe-se pouco sobre especificidade entre moscas e orquídeas (Dressler, 1981), mas o odor tem sido citado como desempenhando o principal papel na atração destes insetos, e a base para uma possível especificidade destes visitantes (Pijl & Dodson, 1966; Jones & Gray, 1976; Proctor et al., 1996). Este parece ser o caso da relação entre as espécies de *Bulbophyllum* e Milichiidae observadas. O deslocamento errático dos visitantes em direção à flor e visitas principalmente nas flores mais novas indicam uma atração olfatória e não visual, pelo menos a curtas distâncias (Jones & Gray, 1976; Faegri & Pijl, 1979).

O fato de *Pholeomyia* sp.4 ter sido o único visitante de *B. ipanemense* no campo (n=407) e em casa de vegetação (n>100; exceto 5 indivíduos de *Apallates*, Chloropidae) sugere uma forte relação entre estas duas espécies, que também pode estar ocorrendo em outras populações desta orquídea. *Pholeomyia* sp.4 provavelmente responde a um diferente espectro de odores do que as outras espécies do gênero observadas. Isto pode ser evidenciado pelas visitas desta espécie às flores de *B. weddellii* e *B. involutum*, enquanto as outras espécies de *Pholeomyia* (sp.1, sp.2, sp.3) que visitaram estes *Bulbophyllum* no campo e em casa de vegetação não foram observados em flores de *B. ipanemense*. Isto é bastante intrigante, principalmente devido à semelhança morfológica e proximidade entre *B. involutum* e *B. ipanemense* (CAPÍTULO 4).

Em orquídeas, os limites entre as síndromes da miofilia (s.s.) e sapromiofilia são bastante imprecisos (Pijl & Dodson, 1966; Sazima, 1978). A presença de néctar, a coloração com mistura de amarelo e púrpura, presença de apêndice móvel (labelo) associados a odor desagradável atraindo moscas saprófugas frustram qualquer tentativa de enquadrar *B. ipanemense* dentro de exatamente uma destas duas síndromes. A princípio, *B. weddellii* seria mais facilmente enquadrado na síndrome tipicamente miofílica (flores principalmente amarelas, odor adocicado e presença de néctar), e *B. involutum* na síndrome da sapromiofilia (odor desagradável e flores púrpuras) apesar da presença de néctar. Mas o fato destas duas espécies compartilharem as mesmas espécies de polinizadores deixa dúvidas quanto ao posicionamento destas duas espécies em síndromes e levanta a questão se realmente existem limites entre miofilia e sapromiofilia em Orchidaceae.

Proctor et al. (1996) têm argumentado que independente da flor oferecer néctar, moscas saprófugas são atraídas pelo instinto de reprodução (oviposição), sendo caracterizado um engodo ao visitante. A alta taxa de remoção de políneas associada à baixa frutificação indica que estes visitantes não possuem tendência a retornar às flores destas espécies, caracterizando o engodo.

Desta forma, apesar de facultativamente antófilas, estas moscas provavelmente não estão sendo atraídas às flores destas orquídeas pela possibilidade delas representarem recursos alimentares.

Na presença de odores adocicados, algumas moscas saprófugas preferem flores amarelas em relação às púrpuras, ao passo que se ambas possuem odor putrescente elas preferem flores púrpuras em relação às amarelas (Barth, 1985). Isto pode explicar a atração dos mesmos polinizadores a flores diferentes em vários aspectos (cor predominante, odor e forma) como as de *B. weddellii* e *B. involutum*.

Este compartilhamento de polinizadores, associado à floração no mesmo período e ocorrência em mesmo habitat, favorece a hibridização entre estas duas espécies, que foi realmente observada (CAPÍTULO 5). Porém ela é minimizada devido a fatores como a diferente hierarquia de visitas entre os dois polinizadores e baixo grau de fertilidade entre as espécies (CAPÍTULO 3). Além disto, a possibilidade de apenas a unidirecionalidade da polinização, uma vez que as políneas de *B. weddellii* não se encaixam na cavidade estigmática de *B. involutum* reduz em 50% as chances de polinização interespecífica (CAPÍTULO 2). Desta forma, e por causa do elevado grau de autoesterilidade do híbrido (CAPÍTULO 5), a identidade entre estas duas espécies é mantida, o que é refletido na ausência de problemas taxonômicos entre elas quando se examinam materiais de herbário ou populações no campo (obs. pess.).

Em espécies de orquídeas mais próximas, como *B. involutum* e *B. ipanemense*, onde estas barreiras à formação e estabelecimento de híbridos são menores (CAPÍTULOS 2 e 3), a atração de diferentes polinizadores é um fator preponderante para a manutenção da identidade das espécies (Dodson, 1962; Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1968). Em casa de vegetação, as flores de *B. ipanemense* não atraíram os polinizadores de *B. involutum*, mas as flores desta última espécie atraíram o polinizador de *B. ipanemense*, que foi ineficiente em efetuar a polinização. Este sistema, onde a ação seletiva de odores específicos é apenas parcialmente responsável pela especificidade com barreiras mecânicas produzindo adicional seletividade é relativamente comum em Orchidaceae (Dodson, 1962), e também foi observado em espécies de *Aristolochia* polinizadas por Milichiidae (Brantjes, 1980).

Porém, estas barreiras entre *B. involutum* e *B. ipanemense* são aparentemente frágeis. Estas espécies florescem sincronicamente e ocupam o mesmo tipo de habitat, podendo ocorrer juntas devido à ampla distribuição ao longo da Cadeia do Espinhaço. Nesta situação, os indivíduos de *B. involutum* com flores menores podem ser polinizados pelos pequenos polinizadores de *B. ipanemense* e ocorrer a hibridização. Isto explicaria as dificuldades taxonômicas encontradas no grupo ao qual estas duas espécies pertencem (CAPÍTULO 4).

Radialidade, presença de apêndices móveis e coloração púrpura ou amarelada com manchas púrpuras são características comuns em plantas polinizadas por moscas, relacionadas também na atração destes polinizadores (Pijl & Dodson, 1966; Faegri & Pijl, 1979; Proctor et al.,

1996). A inflorescência de *B. weddellii* apresenta um tipo de radialidade diferente ao das outras espécies, desenvolvida a partir da disposição das flores lembrando um capítulo de Asteraceae, comum em *Bulbophyllum* sect. *Cirrhopetalum* (Koehler & Davenport, 1983). O outro tipo de radialidade, devido ao menor tamanho das pétalas e labelo em relação às sépalas, também aparece em muitas Pleurothallidinae. Estas características têm sido interpretadas como um retorno à radialidade em decorrência da miofilia.

A presença de apêndices móveis associada à polinização por moscas está relacionada ao instinto de agregação destes insetos, que possuem tendência a serem mutuamente atraídos opticamente (Meve & Liede, 1994). O labelo destes *Bulbophyllum* vibra muito facilmente ao vento, chamando a atenção dos polinizadores para as flores. O vento, apesar de afetar positivamente a atração a distâncias maiores pela movimentação do labelo, compromete a atração olfativa nestas áreas abertas (Barth, 1985), o que pode explicar o menor número de visitas nos horários e locais onde este foi mais forte. O maior número de visitas muito curtas e de aproximações sem o inseto pousar nestes mesmos horários e locais também mostra que o vento pode agir negativamente espantando ou prejudicando o pouso do visitante. Estes efeitos também foram observados em outras orquídeas polinizadas por moscas (Jones & Gray, 1976; Dafni & Calder, 1987). Apesar destes aspectos negativos, o vento é absolutamente essencial para o processo de polinização destas espécies de *Bulbophyllum*, devendo então haver um balanço ótimo entre estes fatores que são influenciados positivamente e negativamente. Este balanço pode ser expresso simplesmente na velocidade do ar onde foi possível ocorrer a polinização, entre 1,0 e 1,5m/s.

Em espécies de *Bulbophyllum* ocorrentes em florestas, o mecanismo de polinização sempre observado foi o de desequilíbrio do labelo pelo peso do inseto (Ridley, 1890; Pijl & Dodson, 1966; Jones & Gray, 1976; Braga, 1977). Este outro mecanismo, onde é necessária a ação do vento, restringe-se até o momento a espécies de campo rupestre. Isto sugere que este mecanismo deve ter evoluído associado a áreas abertas, onde barreiras ao vento são menores ou inexistentes, sendo favorecido em locais com ventos mais fracos, de até 2,0m/s durante maior parte do horário de visitas dos polinizadores.

A autopolinização nas três espécies é dificultada por diferentes maneiras. O mecanismo que ocorre em *B. weddellii*, onde o inseto, devido ao esforço em sair da flor, associado ao peso do labelo é praticamente arremessado da flor, é aparentemente menos eficiente, uma vez que ele pode retornar logo em seguida, embora este retorno não tenha sido observado. Já o mecanismo apresentado por *B. involutum* e *B. ipanemense* é mais "refinado". A necessidade de diminuição do tamanho das políneas evita a autopolinização mesmo que o inseto permaneça na flor por quase duas horas (CAPÍTULO 2). Este sistema é mais frágil em *B. ipanemense*, porque mesmo com o inseto permanecendo menos tempo em média em cada flor do que em *B. involutum*, ele percorre as várias flores em antese na mesma inflorescência, aumentando as chances de geitonogamia. Em

*B. involutum*, onde duas flores não coexistem temporalmente na mesma inflorescência, isto não se torna possível. Mesmo não sendo ausentes de falhas, os dois mecanismos parecem resolver em grande parte o problema da tendência destas moscas permanecerem por um longo período na flor, o que acarretaria em menor frequência de polinização cruzada.

### **Sucesso reprodutivo**

A taxa de frutificação nas três espécies (3,8 a 7,9%) foi muito baixa. Em Orchidaceae, baixa produção de frutos é encontrada principalmente em espécies polinizadas por moscas (e.g., Dafni & Calder, 1987; Christensen, 1992; Pedersen, 1995; Bänzinger, 1996) e em espécies cujas flores não oferecem recompensa ao polinizador (e.g., Dafni & Calder, 1987; Montalvo & Ackerman, 1987; Ackerman, 1989; Zimmerman & Aide, 1989), sendo, ambos os casos, sistemas baseados no engodo do polinizador. Por outro lado, espécies com flores que oferecem recompensa têm normalmente taxas de frutificação mais elevadas (e.g., Thien & Utech, 1970; Patt et al., 1989; Rodríguez-Robles et al., 1992; Pleasants & Moe, 1993; Ackerman et al., 1994). Apesar da semelhante baixa frutificação em espécies miiófilas e espécies que não oferecem recompensa, as primeiras possuem um maior número de políneas removidas por fruto desenvolvido.

Por causa destas características, Diptera têm sido considerados frequentemente como polinizadores ineficientes, caracterizados por falta de constância e comportamento casual, realizando polinização irregular e insegura (Pijl & Dodson, 1966; Faegri & Pijl, 1979; Bierzychudek, 1981; Chase, 1985; Christensen, 1994). Tremblay (1992) tem argumentado que em orquídeas, devido ao "empacotamento" de todo o pólen de uma flor em poucas unidades, polinizadores eficientes são necessários, e plantas atraindo polinizadores ineficientes estariam sofrendo forte seleção contrária, já que ocorreria uma perda substancial do esforço reprodutivo.

Em muitos casos, uma elevada produção de frutos em uma estação pode afetar o crescimento vegetativo, a reprodução sexuada no futuro ou até mesmo a sobrevivência a longo prazo, de maneira que as vantagens a curto-prazo são obscurecidas, caracterizando uma limitação de recursos (Schemske, 1980; Montalvo & Ackerman, 1987; Zimmerman & Aide, 1989). Isto faz com que populações de algumas espécies de Orchidaceae tenham predominantemente indivíduos apresentando inflorescências com menor número de flores, a despeito do maior sucesso reprodutivo, medido através da produção de frutos, obtido por um maior display floral (Schemske, 1980; Zimmerman & Aide, 1989; Rodríguez-Robbles et al., 1992).

O aborto de frutos, a floração infrequente e apenas após a estação seca e a baixa proporção da população florescendo nas três espécies estudadas são indicativos de limitação de recursos, o que é esperado em plantas vivendo diretamente sobre rochas (Montalvo & Ackerman, 1987; Ackerman, 1989; Zimmerman & Aide, 1989). Nestas condições, estas espécies estão vivendo

constantemente uma “barganha” entre a reprodução presente e o crescimento, reprodução e sobrevivência futura (Zimmerman & Aide, 1989). Assim, a produção de frutos pode não medir o “fitness” real, e representatividade na próxima geração depende não apenas da produção de sementes, mas também da longevidade das plantas parentais. Em muitas situações, “fitness” neste último sentido é maximizado sob moderados ou baixos níveis de frutificação, o que implica em também baixos níveis de polinização (Montalvo & Ackerman, 1987; Calvo, 1990; Proctor et al., 1996).

Isto deve ser particularmente adaptativo em plantas com reprodução vegetativa, como *B. weddellii*, *B. involutum* e *B. ipanemense*. Clones podem viver centenas de anos (Harberd, 1961) e a formação de novos indivíduos por reprodução sexuada pode ser importante para a reprodução da espécie apenas a longo prazo ou para colonizar novos locais (Pijl & Dodson, 1966; Proctor et al., 1996).

Então, nestes casos onde a limitação de recursos está presente, é mais importante a existência de mecanismos assegurando que estes escassos casos de reprodução sexuada sejam através de polinização cruzada do que uma produção massiva de frutos em apenas uma estação. Neste aspecto, especificidade de polinizadores e a presença de barreiras mecânicas em *B. involutum* e *B. ipanemense* (CAPÍTULO 2) e comportamentais evitando que o polinizador permaneça na flor após a remoção das políneas em *B. weddellii* estão desempenhando um importante papel. Estes tipos de barreiras são mais interessantes do que barreiras genéticas, como autoincompatibilidade, no sentido que eles evitam uma perda de pólen ou de óvulos em polinizações que envolvem baixa variabilidade ou hibridação.

*Bulbophyllum* (ca. 1000 spp.; pantropical) e *Pleurothallis* (ca. 1200 spp.; neotropical), os dois maiores gêneros da família, e caracterizados por uma grande diversidade morfológica, são polinizados por ineficientes Diptera. Além disso, miofilia é um caráter derivado e que surgiu várias vezes nas Orchidaceae (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981, 1993). Isto indica o sucesso da miofilia na família e destes grupos em particular. Todas estas características demonstram que a miofilia (não fazendo distinção à sapromiofilia) e outros sistemas de engodo que acarretam em baixa frutificação podem ser adaptativos e evolucionariamente estáveis sob certas condições.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerman, J. D. 1989. Limitations to sexual reproduction in *Encyclia krugii* (Orchidaceae). **Syst. Bot.** 14(1): 101-109.
- Ackerman, J. D. & Mesler, M. R. 1979. Pollination biology of *Listera cordata* (Orchidaceae). **Amer. J. Bot.** 66(7): 820-824.
- Ackerman, J. D.; Rodríguez-Robles, J. A. & Meléndez, E. J. 1994. A meager nectar offering by an epiphytic orchid is better than nothing. **Biotropica** 26(1): 44-49.
- Bänziger, H. 1996. The mesmerizing wart: the pollination strategy of epiphytic lady slipper orchid *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein (Orchidaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 121(1): 59-90.
- Barth, F. G. 1985. **Insects and flowers: the biology of a partnership**. Traduzido por M. A. Biederman-Thorson. Princeton University Press, Princeton.
- Bierzychudek, P. 1981. Pollinator limitation of plant reproductive effort. **Am. Nat.** 117: 838-840.
- Braga, P. I. S. 1977. Aspectos biológicos das Orchidaceae de uma campina na Amazônia Central. **Acta Amazônica** 7(2, Suplemento): 1-89.
- Brantjes, N. B. M. 1980. Flower morphology of *Aristolochia* species and the consequences for pollination. **Acta Bot. Neerl.** 29: 212-213.
- Calvo, R. N. 1990. Inflorescence size and fruit distribution among individuals in three orchid species. **Amer. J. Bot.** 77(10): 1378-1381.
- Chase, M. W. 1985. Pollination of *Pleurothallis endotrachys*. **Am. Orchid. Soc. Bull.** 54(4): 431-434.
- Christensen, D. E. 1992. Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. **Lindleyana** 7(1): 28-33.
- Christensen, D. E. 1994. Fly pollination in the Orchidaceae. In J. Arditti, ed. **Orchid biology: reviews and perspectives VI**. John Wiley & Sons, 415-454.
- Dafni, A. & Calder, D. M. 1987. Pollination by deceit and floral mimicry in *Thelymitra antennifera* (Orchidaceae). **Pl. Syst. Evol.** 158(1): 11-22.
- Dodson, C. H. 1962. The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America. **Am. Orchid Soc. Bull.** 31(7): 525-534, (8):641-649, (9): 731-735.
- Dressler, R. L. 1968. Observations on orchids and euglossinae bees in Panama and Costa Rica. **Revista Biol. Trop.** 15: 143-183.

- Dressler, R. L. 1981. **The orchids: natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R. L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Dioscorides Press, Portland.
- Faegri, K. & Pijl, L. van der. 1979. **The principles of pollination ecology**, 3<sup>a</sup> ed. Pergamon Press, Oxford.
- Harberd, D. J. 1961. Observations on population structure and longevity of *Festuca rubra* L. **New Phytol.** 60: 184-206.
- Jones, D. L. 1985. Pollination of *Bulbophyllum weinthalii* Rogers. **Victorian Naturalist** 103: 99-101.
- Jones, D. L. & Gray, B. 1976. The pollination of *Bulbophyllum longiflorum* Thouars. **Am. Orchid. Soc. Bull.** 45(1): 15-17.
- Koehler, D. L. & Davenport, D. 1983. Ultraviolet mimicry by *Bulbophyllum lepidum*? **Am. Orchid. Soc. Bull.** 52(4): 359-363.
- Meve, U. & Liede, S. 1994. Floral biology and pollination in stapeliads - new results and a literature review. **Pl. Syst. Evol.** 192(1): 99-116.
- Montalvo, A. M. & Ackerman, J. D. 1987. Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). **Biotropica** 19(1): 24-31.
- Netto, P. G. 1989. Análise comparativa da fauna associada a depósitos de guano de morcegos cavernícolas no Brasil. Primeira aproximação. **Revta. bras. Ent.** 33(2): 183-192.
- Nilsson, L. A. 1992. Orchid pollination biology. **TREE** 7(8): 255-259.
- Pabst, G. F. J. & Dungs, F. 1977. **Orchidaceae Brasiliensis, Vol. 2**. Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Patt, J. M.; Merchant, M. W.; Williams, D. R. E. & Meeuse, B. J. D. 1989. Pollination biology of *Platanthera stricta* (Orchidaceae) in Olympic National Park, Washington. **Amer. J. Bot.** 76(8): 1097-1106.
- Pedersen, H. A. 1995. Anthecological observations on *Dendrochilum longibracteatum* - a species pollinated by facultatively anthophilous insects. **Lindleyana** 10(1): 19-28.
- Peeters, C.; Hölldobler, B.; Moffet, M. & Musthak Ali, T. M. 1994. "Wall-papering" and elaborate nest architecture in the ponerine ant *Harpegnathos saltator*. **Ins. Soc.** 41(2): 211-218.
- Pijl, L. van der & Dodson, C. H. 1966. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. University of Miami Press, Coral Gables.

- Pleasants, J. M. & Moe, S. 1993. Floral display size and pollination of the western prairie fringed orchid, *Platanthera praeclara* (Orchidaceae). **Lindleyana** 8(1): 32-38.
- Proctor, M.; Yeo, P. & Lack, A. 1996. **The natural history of pollination**. Harper Collins, London.
- Reeves, L. M. & Reeves, T. 1984. Life history and reproduction of *Malaxis paludosa* in Minnesota. **Am. Orchid Soc. Bull.** 53(12): 1280-1291.
- Ridley, H. N. 1890. On the method of fertilization in *Bulbophyllum macranthum*, and allied orchids. **Ann. Bot.** 4(15): 327-336.
- Rodríguez-Robles, J. A.; Meléndez, E. A. & Ackerman, J. A. 1992. Effects of display size, flowering phenology, and nectar availability on effective visitation frequency in *Comparettia falcata* (Orchidaceae). **Amer. J. Bot.** 79(9): 1009-1017.
- Sabrosky, C. W. 1959. A revision of the genus *Pholeomyia* in North America (Diptera, Milichiidae). **Ann. Ent. Soc. Amer.** 52: 316-331.
- Sabrosky, C. W. 1973. **A catalogue of the Diptera of the South of the United States. 75-Family Milichiidae**. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Sabrosky, C. W. 1987a. Milichiidae. In J. F. Mc Alpine et al., org. **Manual of Nearctic Diptera, vol. 2**. Research Branch Agriculture Canada, Hull.
- Sabrosky, C. W. 1987b. A new species of *Leptomeltopa* (Diptera, Milichiidae) from Madagascar pollinating *Ceropegia* (Asclepiadaceae). **Proc. Entomol. Soc. Wash.** 89(2): 242-243.
- Sazima, M. 1978. Polinização por moscas em *Bulbophyllum warmingianum* Cogn. (Orchidaceae), na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. **Revta brasil. Bot.** 1(1): 133-138.
- Schemske, D. W. 1980. Evolution of floral display in the orchid *Brassavola nodosa*. **Evolution** 34(3): 489-493.
- Smythe, R. 1969. An observation on the pollination of *Bulbophyllum baileyi*. **The Orchadian** 3: 61.
- Thien, L. B. & Utech, F. 1970. The mode of pollination in *Habenaria obtusata* (Orchidaceae). **Amer. J. Bot.** 57(9): 1031-1035.
- Tremblay, R. L. 1992. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. **Can. J. Bot.** 70: 642-650.
- Vermeulen, J. J. 1991. **Orchids of Borneo. Vol. 2-Bulbophyllum**. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Vogel, S. 1961. Die Bestäubung der Kesselfallenblüten von *Ceropegia*. **Beitr. Biol. Pflanzen** 36: 159-237.

- Wolda, H. & Sabrosky, C. W. 1986. Insect visitors to two forms of *Aristolochia pilosa* in Las Cumbres, Panama. **Biotropica** 18(4): 295-299.
- Zimmerman, J. K. & Aide, T. M. 1989. Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. **Amer. J. Bot.** 76(1): 67-73.

## CAPÍTULO 2

**Variação temporal no tamanho do polinário após a sua remoção em espécies de *Bulbophyllum* Thouars: um diferente mecanismo de se evitar a autopolinização em Orchidaceae.**

I carefully described to Huxley the shooting out of the pollinia in *Catasetum*, and received for an answer, "Do you really think I can believe all that?"

*Charles Darwin, carta não publicada, 1868.*

<b>CONTEÚDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>RESUMO</b>	<b>47</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>48</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>49</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
<b>Tabelas</b>	<b>51</b>
<b>Figuras</b>	<b>52</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>60</b>

## **RESUMO**

Logo após a remoção do polinário em *Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & F.Barros e *B. ipanemense* Hoehne (Orchidaceae), duas espécies estreitamente relacionadas, este possui aproximadamente o dobro do diâmetro da entrada da cavidade estigmática, necessitando de 105 a 135 minutos em média para que diminua em tamanho e possa ocorrer a polinização, com apenas a largura reduzindo significativamente. Como os polinizadores destas espécies permanecem alguns minutos na mesma flor após a remoção das políneas, este mecanismo, ainda não conhecido nas Orchidaceae, é muito importante para evitar a autopolinização. Em *B. weddellii* (Lindl.) Rchb. f., este mecanismo não ocorre, e o polinizador não tem este comportamento de permanecer na flor após a remoção das políneas. O menor diâmetro da cavidade estigmática em *B. involutum* diminui em 50% as chances de polinizações interespecíficas com *B. weddellii*, podendo o cruzamento ocorrer em apenas uma direção. Isto é importante em ajudar a assegurar o isolamento entre estas espécies simpátricas, com eventos fenológicos sincronizados e que compartilham os mesmos polinizadores.

## INTRODUÇÃO

De uma maneira geral, a morfologia floral das Orchidaceae favorece a polinização cruzada. Salvo raras exceções, existe uma marcada hercogamia, com a região estigmática posicionando-se anteriormente à antera. A estrutura da flor faz com que o polinário seja normalmente removido apenas quando o polinizador se retira dela (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981).

Além deste mecanismo comum a quase todas orquídeas, outros mecanismos acessórios auxiliam em evitar a autopolinização, tais como auto-incompatibilidade (Christensen, 1992; Pedersen, 1995) e barreiras mecânicas temporais (barreiras que se desfazem com o tempo; e.g. Adams & Goss, 1976; Catling & Catling, 1991). Muitas vezes a presença destes mecanismos está associada a plantas possuindo polinizadores com comportamento de visitar várias flores na mesma inflorescência ou de permanecerem na mesma flor algum tempo após a remoção do polinário, como moscas por exemplo.

*Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & F.Barros (inéd.), *B. ipanemense* Hoehne e *B. weddellii* (Lindl.) Rchb. f. são espécies normalmente encontradas crescendo sobre rochas nos campos rupestres brasileiros, polinizadas exclusivamente por espécies de moscas da família Milichiidae (CAPÍTULO 1) e autocompatíveis (CAPÍTULO 3). *Bulbophyllum involutum* e *B. ipanemense* são espécies estreitamente relacionadas (CAPÍTULO 4) e polinizadas por diferentes espécies de moscas. Após a remoção das políneas, os polinizadores normalmente permanecem na flor por alguns minutos, podendo também ir embora e algumas vezes retornar rapidamente à mesma flor. A autopolinização porém não foi observada, uma vez que logo após a retirada do polinário, este não consegue passar através da abertura da cavidade estigmática, devido à maior largura em relação à esta. Uma vez que não é possível ser depositada apenas uma parte do polinário nestas espécies, é necessário que ocorra uma diminuição no tamanho do polinário para que este possa polinizar a flor. Em *B. weddellii* o mesmo não acontece, e o polinizador é "arremessado" para fora da flor no momento da remoção das políneas. *Bulbophyllum involutum* e *B. weddellii*, são espécies sincronopátricas e compartilham as mesmas espécie de polinizadores, podendo ocorrer hibridação. Aparentemente este mesmo mecanismo está também envolvido em diminuir as possibilidades de cruzamento interespecífico (CAPÍTULO 5).

O presente trabalho objetiva verificar e quantificar a variação em tamanho e alterações de forma do polinário destas espécies após a sua remoção das flores em condições de laboratório e correlacioná-las com a possível função de evitar a autopolinização e polinizações interespecíficas.

## METODOLOGIA

Foram realizadas medidas do polinário e da cavidade estigmática de flores de *Bulbophyllum involutum*, *B. ipanemense* e *B. weddellii* de indivíduos cultivados em casa de vegetação do Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campinas. Estes indivíduos tinham sido coletados a aproximadamente quatro meses nas mesmas populações onde foram realizadas observações de biologia floral (CAPÍTULO 1). Veja CAPÍTULO 1 para uma descrição e valores de temperatura e umidade relativa das áreas de ocorrência destas populações.

As flores foram coletadas preferencialmente de indivíduos diferentes e sempre no final da manhã, horário de maior incidência de visitas dos polinizadores, sendo imediatamente levadas ao laboratório para a realização das medições. As flores de *B. ipanemense* (n=16) e *B. weddellii* (n=13) foram coletadas no primeiro dia de antese, e as de *B. involutum* no primeiro (n=7) e terceiro (último) (n=8) dias de antese.

O polinário das flores foi removido e mantido em placas de Petri à temperatura ambiente, que variou de 23 a 26°C durante os intervalos de medições. Estas temperaturas são semelhantes às temperaturas medidas nos locais de ocorrência das populações nos horários de visitas dos polinizadores. O polinário e a cavidade estigmática das flores foram desenhados em estereomicroscópio Olympus SZH10 com objetiva de 6x equipado com câmara clara, e as medidas foram feitas a partir destes desenhos para se obter uma maior precisão. Foram tomadas medidas de maior largura e comprimento da entrada da cavidade estigmática, e de maior largura e altura do polinário. Foi realizada a regressão exponencial dos valores da largura do polinário dividido pela largura da cavidade estigmática em função do tempo.

Material testemunho das espécies foi depositado no herbário UEC (*B. weddellii*, E.L. Borba 151; *B. involutum*, E.L. Borba 150; *B. ipanemense*, E. L. Borba 177).

## RESULTADOS

As flores de *Bulbophyllum involutum* e *B. ipanemense* possuem a entrada da cavidade estigmática com âmbito retangular-alongado, possuindo uma relação entre largura e comprimento aproximadamente de 0,6. Esta mesma relação nas flores de *B. weddellii* é cerca de 0,9, assumindo a cavidade uma forma subquadrada (Fig. 1-3; Tab. 1).

O polinário das três espécies é formado por dois pares desiguais de políneas. Imediatamente após a retirada da antera no primeiro dia de antese, o âmbito destes polinários é circular em vista frontal e dorsal, com uma relação entre largura e altura variando de 1,0 a 1,2. Em vista lateral e superior pode ser visto um achatamento dorsiventral nas políneas de *B. weddellii*, o que não ocorre

nas outras duas espécies, possuindo o polinário destas duas últimas uma forma cúbica (Fig. 1-3; Tab. 1).

Em *B. involutum* (primeiro e último dia) e *B. ipanemense*, logo após a remoção do polinário, este não pode ser depositado na cavidade estigmática da mesma flor devido a ser bem mais largo do que a entrada desta (Fig. 1-2; Tab. 1). Em qualquer posição que se tente fazer passar o polinário através desta entrada, isto não é possibilitado. Isto não ocorre nas flores de *B. weddellii*. Nos raros casos onde a relação entre largura do polinário e da cavidade é superior a 1,0, o achatamento dorsiventral deste permite que ele ultrapasse a entrada da cavidade obliquamente (Fig. 3; Tab. 1). Porém, não é possível que polinários de *B. weddellii* sejam depositados na cavidade estigmática de flores de *B. involutum* e *B. ipanemense*. Já o contrário (políneas de *B. involutum* e *B. ipanemense* em *B. weddellii*) é possível de ser realizado.

Em *B. involutum* e *B. ipanemense*, a largura dos polinários decresce com o passar do tempo, enquanto que a altura permanece praticamente constante (Fig. 1-2,4A-C). Desta forma, ocorre uma modificação no âmbito do polinário, que se torna alongado apresentando um achatamento lateral.

Devido a este achatamento lateral gradativo, nas flores de *B. involutum* coletadas em primeiro dia de antese, a relação entre largura do polinário e da cavidade decresce exponencialmente ( $y=1,7701e^{-0,0054t}$ ; onde  $y$ =relação entre largura do polinário e da cavidade,  $t$ =tempo em minutos;  $R^2=0,6982$ ;  $p<0,001$ ). Após 105 minutos em média, esta relação atinge valor igual a 1,0 ( $y=1,0$ ) e o polinário pode ultrapassar a entrada da cavidade (Fig. 1,5A). Em algumas flores, já a partir de 60 minutos este valor é alcançado, podendo em outras isto demorar até 150 minutos para ocorrer. Não foi observada nenhuma correlação entre tamanho inicial do polinário e o tempo necessário para que esta relação atinja valor igual a 1,0.

Em algumas flores de terceiro dia de antese pode ser notada a ocorrência de uma pequena diminuição na largura do polinário ainda dentro da antera. Isto leva a uma relação menor entre largura do polinário e da cavidade logo após a remoção, quando comparado com flores de primeiro dia de antese (Tab. 1). Mesmo com esta diminuição em largura, é necessária uma maior redução posterior, o que também ocorre de maneira exponencial ( $y=1,5217e^{-0,0023t}$ ;  $R^2=0,3864$ ;  $p<0,001$ ). Os primeiros polinários atingiram a largura da entrada cavidade após 60 minutos, enquanto alguns levaram acima de 210 minutos para ocorrer esta diminuição. O tempo médio necessário foi de 183 minutos, ocorrendo uma variação entre as flores muito maior do que em flores de primeiro dia de antese (Fig. 5B). Polinários maiores levaram mais tempo para que ocorra a diminuição necessária em largura para que eles passem pela entrada da cavidade.

O mesmo foi observado em *B. ipanemense*, onde foram necessários em média 135 minutos para que esta relação se iguale a 1,0 ( $y=1,6733e^{-0,0038t}$ ;  $R^2=0,7296$ ;  $p<0,001$ ), variando de 100 a acima de 210 minutos (Fig. 2,5C). Foi observada uma correlação positiva entre tamanho inicial do polinário e tempo necessário para sua diminuição em largura.

Os polinários de *B. weddellii* se mantiveram praticamente constantes em largura e comprimento, não fornecendo uma regressão significativa (Fig. 3,4D,5D). A aparente diminuição a 120 minutos seguida de aumento em tamanho se deve a não se ter realizada a medição em todos os polinários a 210 minutos. Isto porque eles já haviam se estabilizados em tamanho neste momento.

Tabela 1- Medidas e relações entre medidas da abertura da cavidade estigmática e do polinário de flores em primeiro e terceiro dia de antese de *Bulbophyllum involutum* e de flores em primeiro dia de antese de *B. ipanemense* e *B. weddellii*. Medidas em milímetros; média±desvio padrão (máximo-mínimo)

medidas	<i>B. involutum</i> (1º dia) n=7	<i>B. involutum</i> (3º dia) n=8	<i>B. ipanemense</i> n=16	<i>B. weddellii</i> n=13
largura cavidade	0,49±0,03 (0,44-0,54)	0,51±0,04 (0,47-0,57)	0,44±0,03 (0,40-0,51)	0,85±0,10 (0,74-1,05)
comprimento cavidade	0,90±0,14 (0,70-1,09)	0,94±0,15 (0,70-1,09)	0,80±0,15 (0,51-1,06)	0,94±0,09 (0,77-1,08)
larg./comp. cavidade	0,56±0,09 (0,44-0,68)	0,55±0,09 (0,44-0,71)	0,57±0,15 (0,41-0,96)	0,91±0,07 (0,83-1,07)
largura polinário	0,94±0,09 (0,81-1,12)	0,83±0,14 (0,61-0,98)	0,80±0,07 (0,66-0,90)	0,87±0,12 (0,69-1,04)
altura polinário	0,95±0,07 (0,86-1,04)	0,92±0,08 (0,80-1,01)	0,70±0,08 (0,57-0,82)	0,77±0,06 (0,68-0,90)
larg./alt. polinário	0,99±0,08 (0,88-1,08)	0,90±0,10 (0,76-0,97)	1,16±0,09 (0,95-1,29)	1,13±0,15 (0,94-1,36)
larg. polinário/larg. cavidade	1,92±0,22 (1,50-2,24)	1,64±0,26 (1,25-2,01)	1,82±0,18 (1,53-2,18)	1,03±0,16 (0,83-1,31)

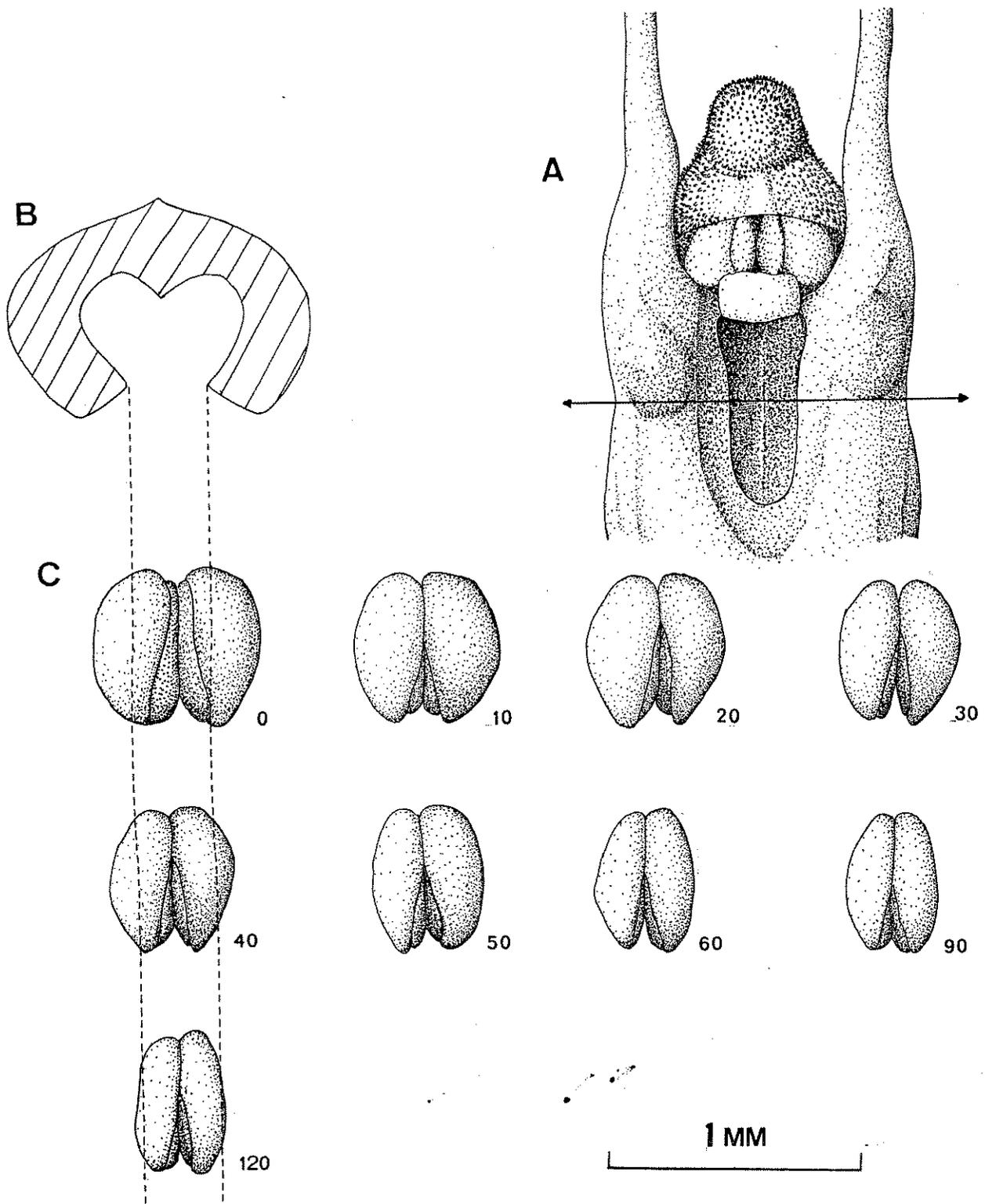


Figura 1- *Bulbophyllum involutum*, flor em primeiro dia de antese. A- coluna em vista ventral, indicando a região do corte transversal (seta). B- corte transversal da coluna conforme indicado em (A). C- polinários em vista frontal com o tempo em minutos após a sua remoção da flor indicado ao lado. Note a projeção da largura da entrada da cavidade estigmática.

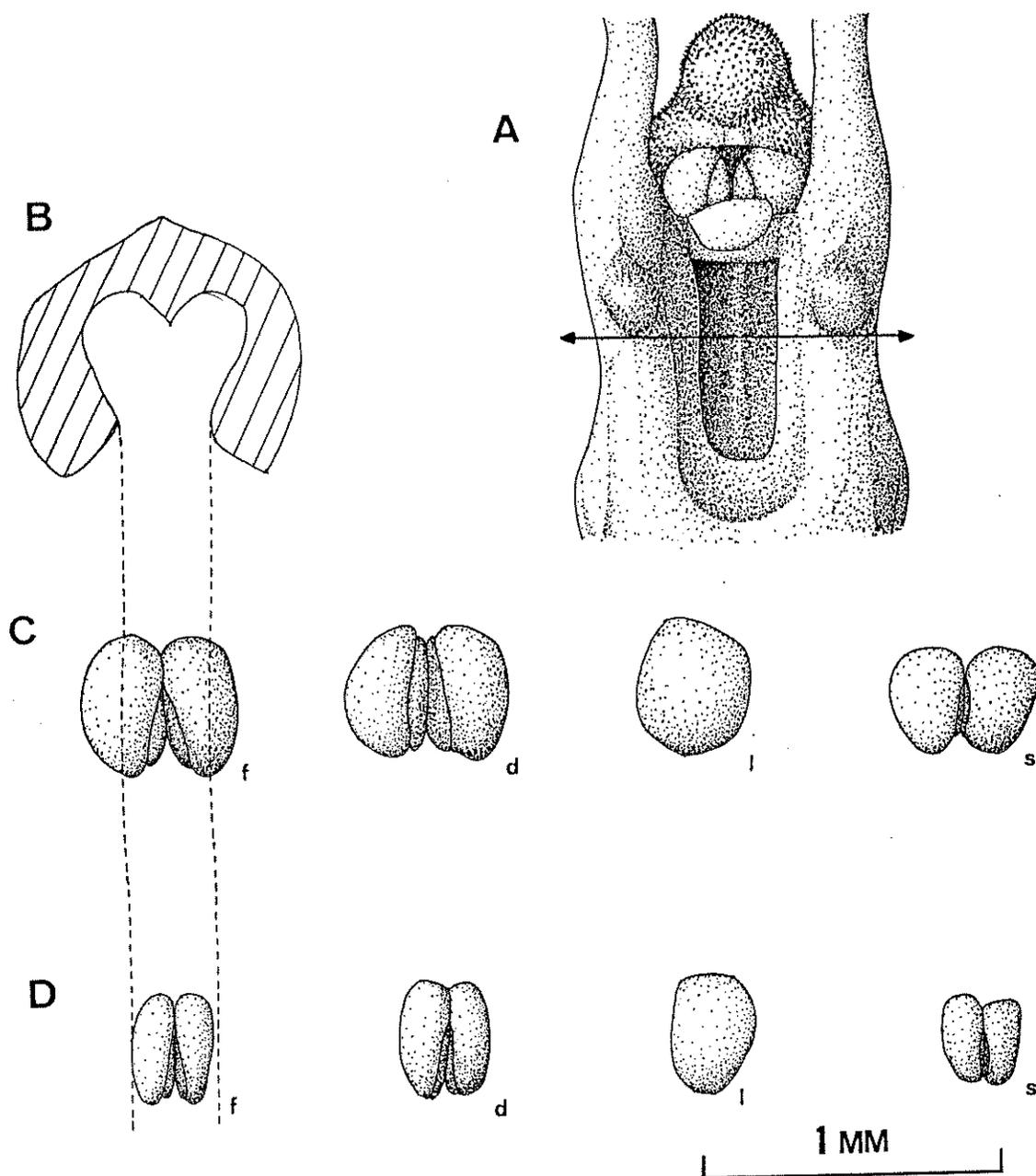


Figura 2- *Bulbophyllum ipanemense*. A- coluna em vista ventral, indicando a região do corte transversal (seta). B- corte transversal da coluna conforme indicado em (A). C- polinários em vista frontal (f), dorsal (d), lateral (l) e superior (s) logo após remoção da flor. D- polinários em vista frontal (f), dorsal (d), lateral (l) e superior (s) 120 minutos após remoção da flor. Note a projeção da largura da entrada da cavidade estigmática.

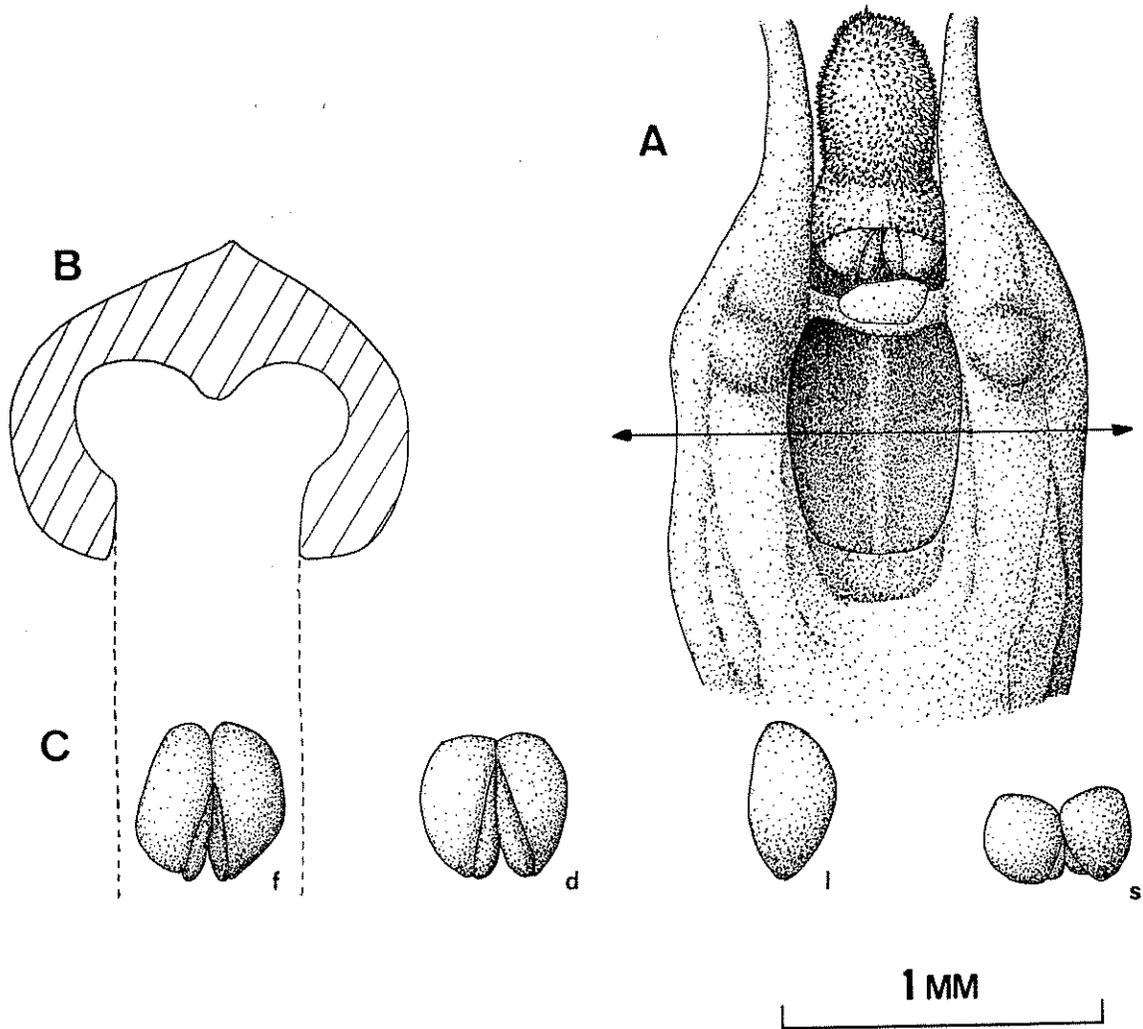


Figura 3- *Bulbophyllum weddellii*. A- coluna em vista ventral, indicando a região do corte transversal (seta). B- corte transversal da coluna conforme indicado em (A). C- polinários em vista frontal (f), dorsal (d), lateral (l) e superior (s) logo após remoção da flor, e 120 minutos após remoção da flor (não ocorreu alteração no tamanho). Note a projeção da largura da entrada da cavidade estigmática.

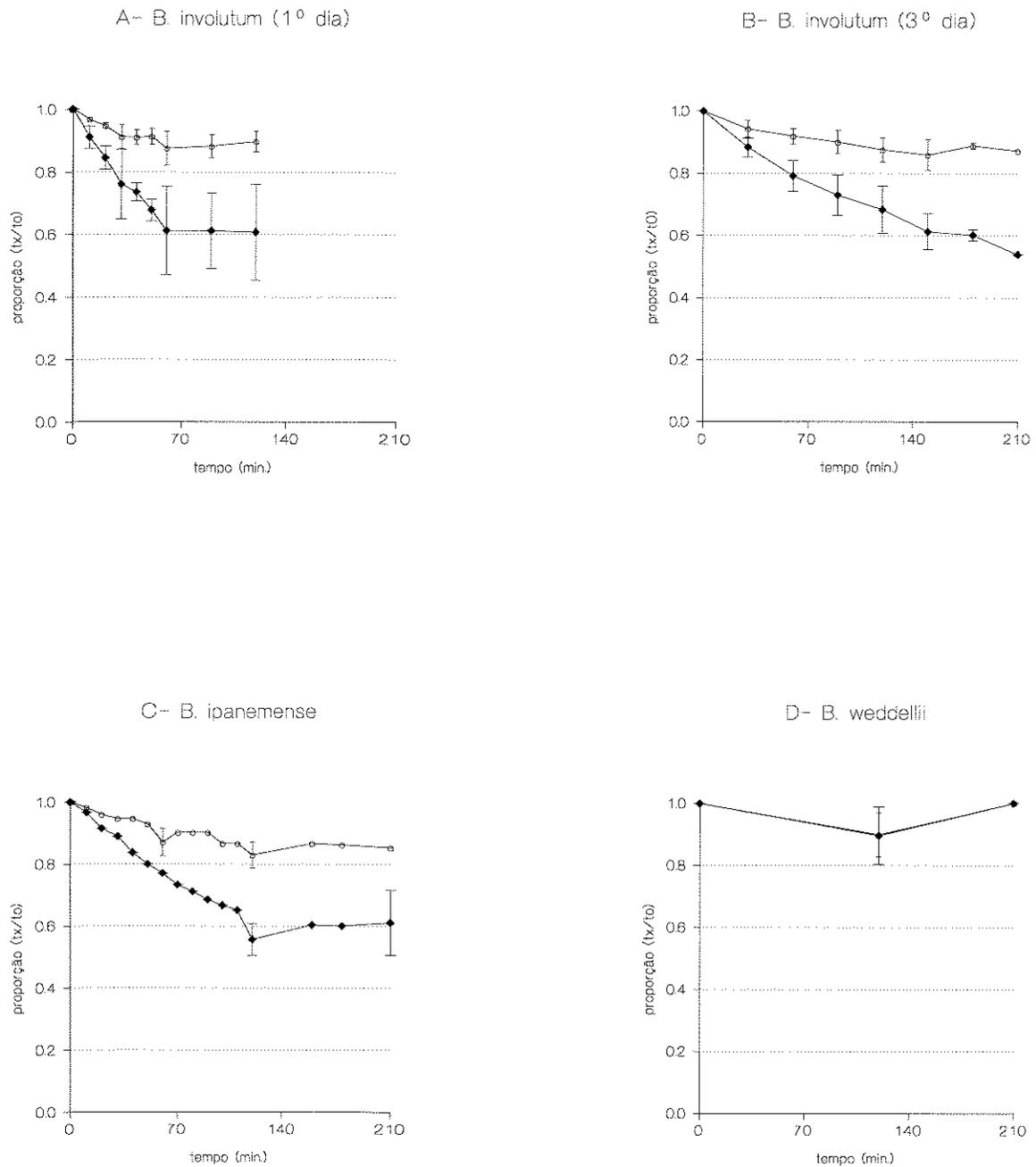


Figura 4- Proporção de largura e altura do polinário em diferentes tempos após remoção da flor em relação à largura e altura iniciais;  $\blacklozenge$  = largura/largura inicial ;  $\ominus$  = altura/altura inicial; o desvio padrão das amostras é representado. A- *Bulbophyllum involutum*, flores de primeiro dia de antese. B- *Bulbophyllum involutum*, flores de terceiro (último) dia de antese. C- *Bulbophyllum ipanemense*. D- *Bulbophyllum weddellii*.

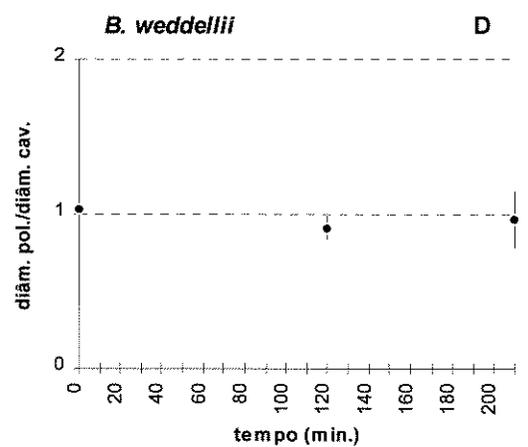
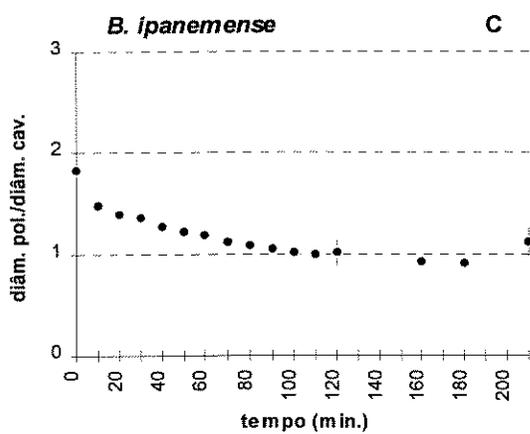
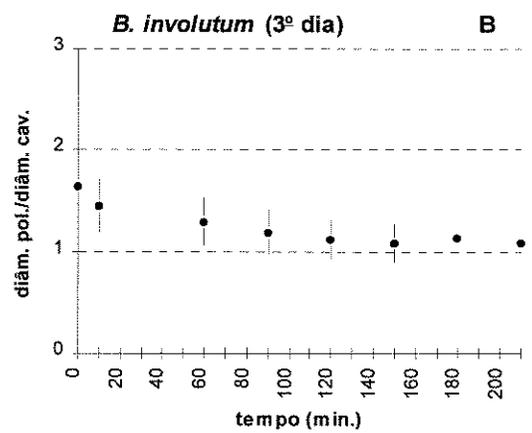
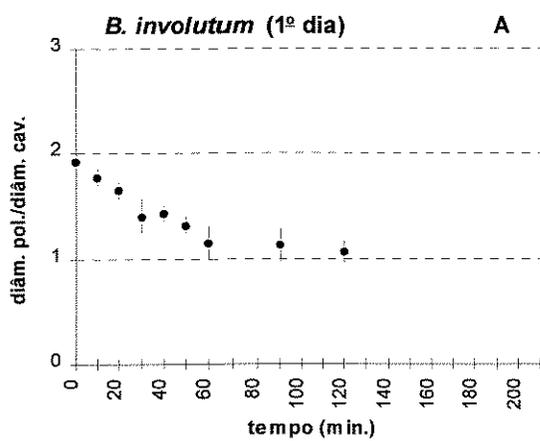


Figura 5- Relação média da largura do polinário dividido pela largura da entrada da cavidade estigmática em função do tempo; o desvio padrão das amostras é representado. A- *Bulbophyllum involutum*, flores de primeiro dia de antese. B- *Bulbophyllum involutum*, flores de terceiro (último) dia de antese. C- *Bulbophyllum ipanemense*. D- *Bulbophyllum weddellii*.

## DISCUSSÃO

Em *Bulbophyllum involutum* e *B. ipanemense*, respectivamente, foi observado que polinários de 39,3% e 92,3% das flores são removidos, em 100% e 67% das vezes os polinizadores permanecem na mesma flor após a remoção das políneas podendo autopolinizá-las, e, para cada flor polinizada, 10,4 e 11,7 polinários são removidos (CAPÍTULO 1). Por outro lado, em *B. weddellii* o inseto é “arremessado” para fora da flor no momento da retirada das políneas, e em nenhuma vez foi observado o seu retorno à mesma flor. Baseado nestes números, como estas espécies são auto-compatíveis (CAPÍTULO 3), caso não houvesse alguma barreira mecânica impedindo a autopolinização, a taxa de frutos inicialmente desenvolvidos poderia ser aumentada de 5,36% para 39,3% em *B. involutum*, e de 10,22% para 65,1% em *B. ipanemense* (CAPÍTULO 1). Porém, em *B. involutum*, como foi observado que o polinizador sempre permaneceu na flor após a remoção do polinário, todos os frutos seriam formados a partir de autopolinização. E dos frutos *B. ipanemense*, apenas 5,1% seriam desenvolvidos por polinização cruzada (valor que poderia ser inferior caso considerarmos a possibilidade do inseto retornar posteriormente à mesma flor).

Estas possíveis elevadas taxas de frutificação, com reduzido grau de polinização cruzada, seriam altamente prejudiciais a estas espécies, que estão sob limitação de recursos (CAPÍTULO 1). Nestes casos, onde a limitação de recursos está presente, a baixa taxa de frutificação pode ser vantajosa (Schemske, 1980; Montalvo & Ackerman, 1987; Zimmerman & Aide, 1989; Proctor et al., 1996), sendo mais importante a existência de mecanismos que assegurem que os escassos casos de reprodução sexuada sejam através de polinização cruzada do que uma produção massiva de frutos em apenas uma estação (CAPÍTULO 1).

O tempo médio necessário para que o polinário atinja um tamanho equivalente à largura da cavidade estigmática e possa passar através desta (120 minutos em *B. involutum* e 135 minutos em *B. ipanemense*) é bastante superior ao tempo de permanência dos polinizadores nas flores após estes removerem as políneas (7 minutos em *B. involutum* e 1 a 14 minutos em *B. ipanemense*, CAPÍTULO 1). Mesmo o tempo mínimo observado para que isto ocorra (60 minutos em *B. involutum* e 100 minutos em *B. ipanemense*) é suficiente para que a autopolinização seja evitada. A grande diferença entre tempo de permanência do inseto na flor e tempo para que o polinário diminua de tamanho oferece uma ampla margem de segurança no impedimento da autopolinização. Isto se torna necessário, uma vez que o polinizador pode retornar à mesma flor após alguns poucos minutos, como verificado em *B. ipanemense* (CAPÍTULO 1). Desta forma, esta diferença de tempo provavelmente é suficiente para que o polinizador vá embora para outro local.

Em algumas flores, aparentemente ocorre uma diminuição em tamanho nos polinários ainda dentro da antera a medida que a flor envelhece. Isto explica a maior variação na relação entre diâmetro do polinário e diâmetro da cavidade nas flores de último dia de antese. Mesmo com esta

relação inicial tendo sido menor do que nas flores de primeiro dia de antese, o tempo médio para que esta relação atinja valor 1,0 foi superior nestas flores, provavelmente como um efeito da pequena amostragem. Esta relação inicial menor, com ao menos manutenção do tempo médio para que ela atinja valor 1,0, mostra que polinários mais velhos possuem uma velocidade de diminuição reduzida em relação aos polinários mais jovens, funcionando como um fator de compensação. Foi observado que as visitas dos polinizadores concentram-se quase todas no primeiro dia de antese das flores, que coincide com o maior período de emissão de odores (CAPÍTULO 1). Desta forma, nestas flores mais velhas a autopolinização é pouco provável, mesmo que a diminuição do polinário dentro da antera seja grande o suficiente para que o tempo de permanência do inseto na flor seja maior do que o tempo necessário para que a relação atinja 1,0.

Este mecanismo de diminuição do polinário certamente envolve desidratação. A diminuição praticamente apenas em largura, exatamente a única necessária a ocorrer, levando a uma modificação na forma, é bastante intrigante. A organização estrutural das políneas destas espécies é um interessante objeto de estudos posteriores.

Aparentemente este mecanismo não foi citado anteriormente em Orchidaceae. *Bulbophyllum involutum* e *B. ipanemense* são espécies estreitamente relacionadas (CAPÍTULO 4), o mesmo não ocorrendo com *B. weddellii*. A extensão da ocorrência deste mecanismo em outras espécies do gênero é imprecisa. Observações preliminares indicam que possa ocorrer em espécies próximas às duas primeiras e que apresentam um sistema de polinização semelhante, como *B. warmingianum* Cogn. e *B. tripetalum* Lindl.

As características deste mecanismo indicam claramente uma adaptação destas espécies, como impedimento à autopolinização, ao comportamento destas moscas de permanecerem por um longo tempo nas flores a menos que elas sejam “expulsas” delas, como ocorre em *B. weddellii*. Em vários trabalhos a respeito de polinização de espécies de *Bulbophyllum*, os autores geralmente não mencionam ou são bastante vagos sobre o comportamento das moscas polinizadoras após a remoção das políneas e as possibilidades de autopolinização (e.g., Ridley, 1890; Jones & Gray, 1976; Braga, 1977). Chase (1985) observou que *Drosophila immigrans*, a mosca polinizadora de *Pleurothallis endotrachys* Rchb., permanece na flor após a remoção do polinário, aparentemente autopolinizando-a.

Meve & Liede (1994) também têm observado que moscas permanecem muito tempo nas flores de espécies da tribo Stapelieae (Asclepiadaceae), e muitas vezes retornam rapidamente à mesma flor, aumentando as chances de autopolinização nestas espécies, que são auto-incompatíveis. Auto-compatibilidade é a regra geral em Orchidaceae, porém auto-incompatibilidade também ocorre (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1993). Auto-incompatibilidade tem sido reportada em *Stelis argentata* Lindl. (Christensen, 1992) e *Dendrochilum longibracteatum* Pfitzer (Pedersen, 1995), duas Orchidaceae polinizadas por moscas. Em alguns casos, barreiras mecânicas temporais são

mais vantajosas do que auto-incompatibilidade: a perda de pólen, e em alguns casos de flores inteiras, é evitada. Evitar perda de pólen é particularmente importante em Orchidaceae e Asclepiadaceae, onde todo ele está reunido em apenas uma ou poucas unidades, as políneas (Tremblay, 1992). Além disto, estas barreiras formam um sistema mais plástico do que um impedimento genético, o que é especialmente importante na colonização de novas áreas por um ou poucos indivíduos de uma espécie, ou no estabelecimento de novas espécies (Pijl & Dodson, 1966).

Outras barreiras mecânicas temporais impedindo a autopolinização são encontradas em Orchidaceae, em alguns casos associadas a polinizadores com o comportamento de efetuar visitas longas ou de visitar várias flores na mesma inflorescência. Ackerman & Mesler (1979) citam a presença de bloqueio do estigma pelo rostelo até um dia após a retirada do polinário em *Listera cordata* (L.) R. Br., uma espécie polinizada principalmente por moscas; porém a geitonogamia é possível. O mecanismo mais comum é a retenção do capuz da antera nas políneas, que ocorre em *Tipularia discolor* (Pursh) Nuttall (Stoutamire, 1978; Catling & Catling, 1991), *Epidendrum anceps* Jacq. (Adams & Goss, 1976) e em espécies primitivas de *Catasetum* com flores hermafroditas (Pijl & Dodson, 1966). Nestes casos, após vários minutos a antera desidrata e se solta do polinário. Além da retenção da antera, *Epidendrum anceps* é também auto-incompatível, e o polinizador visita várias flores em uma mesma inflorescência; desta forma o que se evita é a perda de pólen (Adams & Goss, 1976). Alterações no estipe também têm sido observadas, como a torção em *Catasetum eburneum*, que possui flores hermafroditas (Dodson & Frymire, 1961), e curvamento em algumas espécies de Oncidiinae (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981). É interessante notar que estes mecanismos ocorrem em vários grupos distantes filogeneticamente.

Uma vez que *B. involutum* e *B. weddellii* são espécies sincronopátricas e compartilham as mesmas espécies de polinizadores (CAPÍTULO 1), este mecanismo é também importante em diminuir as chances de hibridização entre estas orquídeas. As políneas de *B. involutum* podem polinizar as flores de *B. weddellii*. Porém, como as políneas deste último não diminuem de tamanho, elas não conseguem passar através da estreita abertura da cavidade estigmática de *B. involutum*, reduzindo em 50% as possibilidades de cruzamento interespecífico. Outras barreiras parciais fazem com que a existência de híbridos entre estas espécies sejam eventos raros na natureza (CAPÍTULO 3), e estes quando ocorrem são aparentemente devidos a contribuição de pólen por *B. involutum* (CAPÍTULO 5).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerman, J. D. & Mesler, M. R. 1979. Pollination biology of *Listera cordata* (Orchidaceae). **Amer. J. Bot.** 66(7): 820-824.
- Adams, R. M. & Goss, G. J. 1976. The reproductive biology of the epiphytic orchids of Florida III.- *Epidendrum anceps* Jacq. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 45(6): 488-492.
- Braga, P. I. S. 1977. Aspectos biológicos das Orchidaceae de uma campina na Amazônia Central. **Acta Amazônica** 7(2, Suplemento): 1-89.
- Catling, P. M. & Catling, V. R. 1991. Anther-cap retention in *Tipularia discolor*. **Lindleyana** 6(2): 113-116.
- Chase, M. W. 1985. Pollination of *Pleurothallis endotrachys*. **Amer. Orchid. Soc. Bull.** 54(4): 431-434.
- Christensen, D. E. 1992. Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. **Lindleyana** 7(1): 28-33.
- Dodson, C. H. & Frymire, G. P. 1961. Natural pollination of orchids. **Missouri Bot. Gard. Bull.** 49: 133-139.
- Dressler, R. L. 1981. **The orchids: natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R. L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Dioscorides Press, Portland.
- Jones, D. L. & Gray, B. 1976. The pollination of *Bulbophyllum longiflorum* Thouars. **Am. Orchid. Soc. Bull.** 45(1): 15-17.
- Meve, U. & Liede, S. 1994. Floral biology and pollination in stapeliads - new results and a literature review. **Pl. Syst. Evol.** 192(1): 99-116.
- Montalvo, A. M. & Ackerman, J. D. 1987. Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). **Biotropica** 19(1): 24-31.
- Pedersen, H. A. 1995. Anthecological observations on *Dendrochilum longibracteatum* - a species pollinated by facultatively anthophilous insects. **Lindleyana** 10(1): 19-28.
- Pijl, L. van der & Dodson, C. H. 1966. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. University of Miami Press, Coral Gables.
- Proctor, M.; Yeo, P. & Lack, A. 1996. **The natural history of pollination**. Harper Collins, London.

- Ridley, H. N. 1890. On the method of fertilization in *Bulbophyllum macranthum*, and allied orchids. **Ann. Bot.** 4(15): 327-336.
- Schemske, D. W. 1980. Evolution of floral display in the orchid *Brassavola nodosa*. **Evolution** 34(3): 489-493.
- Stoutamire, W. 1978. Pollination of *Tipularia discolor*, an orchid with modified symmetry. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 47(5): 413-415.
- Tremblay, R. L. 1992. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. **Can. J. Bot.** 70: 642-650.
- Zimmerman, J. K. & Aide, T. M. 1989. Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. **Amer. J. Bot.** 76(1): 67-73.

## CAPÍTULO 3

**Sistemas de reprodução e potencialidade de hibridização em três espécies de *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae) ocorrentes nos campos rupestres brasileiros.**

At one end we have slightly odd lilies, at the other end, structures that practically transcend the concept of flower...

*Robert L. Dressler, "The orchids: natural history and classification", 1981.*

<b>CONTEÚDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>RESUMO</b>	<b>63</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>64</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>64</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>66</b>
<b>Tabelas</b>	<b>69</b>
<b>Figuras</b>	<b>72</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>82</b>

## **RESUMO**

Foram realizadas, experimentalmente, autopolinizações, polinizações cruzadas intraespecíficas e interespecíficas em *Bulbophyllum weddellii* (Lindl.) Rchb. f., *B. involutum* Borba, Semir e F.Barros e *B. ipanemense* Hoehne (Orchidaceae). As duas últimas espécies são muito relacionadas, o mesmo não acontecendo com *B. weddellii*. As três espécies são autocompatíveis, sendo necessária a ocorrência de polinização por um vetor para o desenvolvimento de frutos. Em todos os tipos de cruzamentos, ocorre uma elevada taxa de aborto de frutos e formação de sementes sem embrião, sendo estes mais elevados nos cruzamentos interespecíficos envolvendo *B. weddellii*. Cruzamentos entre as espécies próximas, *B. involutum* e *B. ipanemense*, fornecem valores de frutificação e viabilidade de sementes semelhantes aos cruzamentos intraespecíficos. Estes resultados concordam com hipóteses correntes sobre potencialidade de cruzamento interespecífico refletindo filogenia das espécies envolvidas. Exame dos tubos polínicos e dos frutos abortados indicam que uma série de fatores podem estar envolvidos no grande número de aborto de frutos e sementes sem embrião. A baixa fertilidade entre *B. weddellii* e *B. involutum* é importante para a manutenção do isolamento entre estas espécies, que são simpátricas, florescem no mesmo período e compartilham os mesmos polinizadores.

## INTRODUÇÃO

Em Orchidaceae, barreiras à autogamia e à hibridização entre espécies dentro de um mesmo gênero dão-se principalmente a nível de polinização (Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981, 1993). Porém, exceções à esta regra não são tão raras, ocorrendo também barreiras a nível genético (e.g. Johansen, 1990; Pedersen, 1995).

Vários estudos têm mostrado que barreiras genéticas interespecíficas intragenéricas em Orchidaceae ocorrem principalmente em espécies filogeneticamente menos relacionadas (Sanford, 1964, 1967; Stort, 1972, 1986; Scacchi et al. 1990), concordando com a teoria da incongruidade proposta por Hogenboom (1975). Segundo este autor, o não funcionamento de um cruzamento pode ser devido ao grau de divergência evolutiva entre as espécies envolvidas, e não a reações típicas de incompatibilidade. Algumas espécies onde normalmente não ocorre autopolinização tendem a expressar uma depressão endogâmica se autopolinizadas experimentalmente, provavelmente devido a acúmulo de alelos recessivos letais, o que normalmente não acontece em plantas que se reproduzem comumente por autogamia (Tremblay, 1994).

*Bulbophyllum weddellii* (Lindl.) Rchb. f., *B. involutum* Borba, Semir & F.Barros (inéd.) e *B. ipanemense* Hoehne são espécies frequentemente ocorrentes nos campos rupestres brasileiros, ao longo da Cadeia do Espinhaço. Estas espécies possuem eventos fenológicos sincronizados e são polinizadas por moscas da família Milichiidae, normalmente através de polinização cruzada (CAPÍTULOS 1 e 2). *Bulbophyllum involutum* e *B. ipanemense* são espécies muito próximas (CAPÍTULO 4), o mesmo não acontecendo com *B. weddellii*. *Bulbophyllum involutum* e *B. weddellii* compartilham as mesmas espécies de polinizadores. Isto faz com que estas três taxa formem um interessante grupo para estudos de sistemas de reprodução e de hibridização experimental.

Desta forma, este trabalho objetiva medir a capacidade de produção de prole através de autogamia e xenogamia em *B. weddellii* (Lindl.) Rchb. f., *B. involutum* Borba, Semir & F.Barros e *B. ipanemense* Hoehne e de hibridização entre estas espécies, utilizando-se para isto de polinizações experimentais.

## METODOLOGIA

Plantas de *B. weddellii*, *B. involutum* e *B. ipanemense*, mantidas em casa de vegetação do Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP (22°49'S; 47°06'W; ca. 700m alt.), foram utilizadas em vários tratamentos de polinização experimental. Os indivíduos foram coletados de suas populações naturais em sua maioria cerca de três a cinco meses anteriormente à realização dos experimentos. Os indivíduos de *B. weddellii* e *B. involutum* são

provenientes da Serra do Cipó, município de Santana do Riacho-MG (19°14'-19°19'S; 43°30'-43°33'W; ca. 1100 a 1400m alt.), e os de *B. ipanemense* de duas populações distantes cerca de 10km entre si, em Itutinga e Nazareno-MG (21°20'S; 44°34'W; ca. 1050m alt.). O clima do local de ocorrência de ambas populações é do tipo Cwb na classificação de Köppen, clima mesotérmico com verões brandos e estação chuvosa no verão, com estação seca de 3 a 4 meses coincidindo com o inverno e período úmido de 7 a 8 meses, sendo semelhante ao clima da cidade de Campinas. As espécies florescem de janeiro a julho, período que coincide com a estação úmida. Para uma caracterização dos locais e das espécies, veja CAPÍTULO 1. Algumas poucas polinizações manuais foram realizadas nas populações naturais, sendo indicadas no texto.

Foram realizados quatro tratamentos para cada espécie como receptora de pólen: autopolinização, polinização cruzada intraespecífica e polinizações interespecíficas entre elas. O número de polinizações variou entre cada tratamento e cada espécie, sendo dependente da disponibilidade de flores. A ordem das polinizações em cada inflorescência foi realizada ao acaso, sendo utilizadas flores em primeiro dia de antese. Além das polinizações manuais, flores não polinizadas e não emasculadas foram ensacadas para proteção de contato com polinizadores para verificação da ocorrência de agamospermia e/ou autopolinização espontânea. Foram acompanhados o início de frutificação e o tempo de desenvolvimento dos frutos. Os dados de polinizações manuais foram comparados com a taxa de frutificação nas populações naturais (CAPÍTULO 1).

Frutos maduros tiveram suas sementes removidas na época da deiscência e colocadas em uma solução de cloreto de 2, 3, 5-trifeniltetrazólio a 1% por 24 horas, que reage com a desidrogenase presente em células vivas evidenciando uma coloração vermelha. Foi examinada em microscópio uma amostra de 300 sementes por fruto e calculado o percentual de sementes viáveis. Foram consideradas sementes viáveis aquelas que possuíam um embrião bem desenvolvido e que reagiu com o tetrazólio apresentando-se corado de vermelho. Sementes sem embrião, com embrião rudimentar ou que não apresentou-se corado de vermelho foram consideradas inviáveis (Fig. 1A). Frutos coletados aleatoriamente nas populações naturais também tiveram o conteúdo de sementes viáveis avaliado.

A partir dos cruzamentos efetuados, flores que não desenvolveram frutos, frutos abortados e frutos maduros foram fixados em Carnoy por 24 horas e transferidos para álcool 70%. Posteriormente foram tratados com NaOH 10N a 60°C e lavados em água destilada. Em seguida, foram corados com azul de anilina e examinados em microscópio de epifluorescência para observação de crescimento de tubos polínicos e fertilização dos óvulos (modificado de Dafni, 1992).

Polinários foram colocados para germinar em solução de sacarose a 10% por cerca de 30 horas. Posteriormente foram fixados em FAA 70%, corados com carmim acético e examinados em microscópio.

O baixo número de não formação de frutos e elevado número de abortos de frutos em desenvolvimento fez com que não fosse possível uma análise estatística adequada dos dados, sendo necessário para isto a realização de um número superior de cruzamentos. Desta forma este trabalho limita-se a uma análise descritiva dos padrões observados.

Material testemunho das espécies foi depositado no herbário UEC (*B. weddellii*, E.L. Borba 151; *B. involutum*, E.L. Borba 150; *B. ipanemense*, E. L. Borba 177).

## RESULTADOS

### Taxa de frutificação e viabilidade de sementes

Os resultados das polinizações manuais e de viabilidade das sementes encontram-se resumidos na Tabela 1. No Apêndice 1 estão representados todos os cruzamentos efetuados.

Não foi verificada agamospermia ou autopolinização espontânea em nenhuma das três espécies, sendo conseqüentemente necessária a ocorrência de polinização e de polinizadores para haver formação de frutos. A taxa de formação de frutos na natureza foi muito baixa nas três espécies, e ocorre pelo menos em *B. weddellii* e *B. involutum* alguma taxa de aborto natural. Em *B. weddellii* a taxa de aborto nas polinizações manuais foi muito superior ao encontrado no campo. As mais altas taxas de frutificação inicial e de frutos maduros ocorreram quando *B. involutum* era o doador de pólen. Ocorreu uma grande variação no número de sementes viáveis por fruto em todos os cruzamentos.

Todas as três espécies são autocompatíveis. A taxa de frutificação e percentual de sementes viáveis por fruto em autopolinizações foi semelhante à de polinizações cruzadas intraespecíficas. O número médio de sementes viáveis mais baixo em polinização cruzada do que em autopolinização em *B. weddellii* se deve a excepcionalmente um fruto com apenas 3% de sementes viáveis (com a exclusão deste fruto o número médio de sementes viáveis se eleva de 40,0% para 52,4%). O percentual de sementes viáveis em autopolinizações e polinizações cruzadas intraespecíficas foi semelhante ou um pouco inferior (em *B. involutum*) ao encontrado nos frutos naturalmente formados nas populações naturais.

As taxas de frutificação e de viabilidade de sementes mais baixas ocorreram nos cruzamentos interespecíficos, especialmente entre *B. weddellii* e *B. ipanemense*. Entre estas duas espécies, o grau de compatibilidade foi maior quando *B. ipanemense* foi o doador de pólen. Ocorreu uma maior compatibilidade entre *B. involutum* e *B. ipanemense*, e principalmente quando *B. involutum* foi o doador de pólen. Os cruzamentos intraespecíficos menos compatíveis foram todos aqueles que envolveram *B. weddellii* como uma das espécies presentes.

Onde foram realizadas repetições de um mesmo cruzamento (utilizando o mesmo par de indivíduos), foi verificada a ocorrência de cruzamentos unilateralmente compatíveis, bilateralmente compatíveis e bilateralmente incompatíveis. Variação semelhante ocorreu em experimentos de autopolinização, tendo sido observado que alguns indivíduos puderam desenvolver frutos em todas, nenhuma ou apenas algumas das flores autopolinizadas. Exemplos são dados na Tabela 2. Quatro dos indivíduos de *B. weddellii* tiveram mais de uma flor autopolinizada, e se mostraram aparentemente autoincompatíveis, não desenvolvendo fruto em nenhuma delas.

### **Crescimento de tubos polínicos**

O tipo de crescimento dos tubos polínicos (se presente) e o grau de desenvolvimento do ovário foram agrupados em cinco categorias, independentes do cruzamento em que ocorreram:

Tipo 0: não ocorreu germinação dos grãos de pólen; sempre com apenas primórdios da placenta visíveis (Fig. 1B). Não ocorreu aumento no tamanho do ovário, e a flor fenesce em cerca de até 10 dias (Fig. 2A-F). Não foi observado em nenhum cruzamento onde *B. involutum* foi o doador de pólen (Fig. 3B,D,F). Foi mais frequente nos cruzamentos envolvendo *B. weddellii*, especialmente em cruzamentos interespecíficos como doador de pólen (Fig. 3A,D-F). Também presente quando *B. ipanemense* ocorre como doador de pólen.

Tipo 1: tubos polínicos crescendo somente até o canal estilar da coluna, se tornando então irregulares, tomados de calose, com ápice dilatado e sendo visível alguns deles se rompendo na extremidade e estravazando o conteúdo citoplasmático; placenta desenvolvida, sendo visíveis o início de desenvolvimento das células-mãe dos megásporos; ovário iniciando aumento em diâmetro (Fig. 1C-D). Fenescimento da flor ocorrendo por volta de 10 a 30 dias, excepcionalmente mais (Fig. 2A-C,E). Frequente nas autopolinizações e polinizações cruzadas intraespecíficas, raramente em polinizações interespecíficas (somente em *B. involutum* x *B. ipanemense*) (Fig. 3A-C,E).

Tipo 2: tubos polínicos atingindo a placenta e os óvulos, estes já então completamente desenvolvidos, a maioria se tornando irregulares, tomados de calose, com ápice dilatado e algumas vezes estourando; algumas fecundações visíveis, mas na maior parte das vezes, tubos apenas enovelados em volta dos óvulos (Fig. 1E). Fruto em desenvolvimento, com aborto ocorrendo principalmente entre 50 e 80 dias (Fig. 2A-D,F). Frequente em autopolinizações e polinizações cruzadas intraespecíficas (principalmente *B. weddellii*) e cruzamentos entre *B. weddellii* e *B. ipanemense* ou quando *B. involutum* é doador de pólen para outra espécie (Fig. 3A-D,F).

Tipo 3: tubos como no Tipo 2, porém muito enovelados na placenta; fruto completamente desenvolvido, com muitas sementes vazias e poucas sementes com embrião visíveis (Fig. 1F,G). Tempo de desenvolvimento normalmente semelhante ao de um fruto normal (90 a 130 dias), chegando a ocorrer a deiscência, porém frequentemente com um número menor de sementes

viáveis ou algumas vezes vazio naqueles de menor tempo de desenvolvimento (abaixo de 90 dias) (Fig. 2A-F). Ocorrentes em todos tipos de cruzamentos, especialmente nos interespecíficos (Fig. 3A-F). Veja Apêndice 1 para uma comparação entre conteúdo de sementes de frutos Tipo 3 e frutos “perfeitos” (Tipo 4).

Tipo 4: tubos na placenta e nos óvulos normais, regulares e com “plugs” de calose; grande número de sementes viáveis visíveis, ocorrendo também sementes vazias (Fig. 1H). Foram considerados como frutos “perfeitos”, com tempo de desenvolvimento entre 90 e 150 dias (Fig. 2A-F). Formados principalmente em autopolinizações e polinizações cruzadas intraespecíficas de *B. involutum* e *B. ipanemense*, ou polinizações interespecíficas com *B. involutum* sendo doador de pólen (Fig. 3A-F).

### **Germinação de pólen**

O dados de número de polinários que tiveram seus grãos de pólen germinados em solução de sacarose estão resumidos na Tabela 3. No Apêndice 2 encontram-se discriminados os dados para cada indivíduo. *Bulbophyllum involutum* e *B. ipanemense* apresentaram um elevado percentual de polinários cujos grãos de pólen falharam em germinar ou que tiveram uma baixa germinação. Normalmente polinários de todas as flores testadas de um mesmo indivíduo tiveram o mesmo comportamento (Apêndice 2).

Porém, não existiu nenhuma correlação entre indivíduos cujos polinários não germinaram *in vitro* e plantas cujos polinários não germinaram na região estigmática (Tipo 0) ou tubos morreram na coluna (Tipo 1) em polinizações experimentais. Veja Apêndices 1 e 2 para uma comparação.

Tabela 1- Resultados de frutificação e viabilidade de sementes das polinizações manuais realizadas em *B. weddellii* (wed), *B. involutum* (inv) e *B. ipanemense* (ipa).

feminino x masculino	Nº obs.	Nº indiv.	início frutificação (%)	frutos maduros (% início frutif.)	frutos maduros (% flores)	sementes viáveis média (max-min) (%)
wed (controle)	62	14	0	0	0	0
wed (polin. aberta)	798	41	5,6	80,0	4,5	54,4 (25,3-77,3)
wed (auto)	28	20	60,7	21,4	13,0	68,3 (58,7-78,0)
wed x wed	26	16	57,7	35,7	20,6	40,0 (3,0-66,3)
wed x ipa	10	9	90,0	22,2	20,0	14,7 (2,0-27,3)
wed x inv	8	6	100	75,0	75,0	19,3 (2,3-40,7)
ipa (controle)	12	5	0	0	0	0
ipa (polin. aberta)	661	29	10,2	-	-	47,0 (9,0-77,7)
ipa (auto)	16	8	81,3	54,5	44,3	44,4 (22,0-61,3)
ipa x ipa	8	6	75,0	66,6	50,0	51,8 (41,3-68,0)
ipa x wed	12	3	41,7	20,0	8,3	2,7
ipa x inv	5	4	100	75,0	75,0	48,3 (35,0-59,3)
inv (controle)	20	5	0	0	0	0
inv (polin. aberta)	504	46	5,4	70,4	3,8	71,2 (55,7-88,7)
inv (auto)	8	8	75,0	100	75,0	52,7 (30,7-75,7)
inv x inv	10	9	70,0	100	70,0	48,1 (21,7-79,7)
inv x ipa	8	8	62,5	100	62,5	29,9 (17,7-35,0)
inv x wed	12	8	58,3	100	58,3	22,8 (11,0-34,7)

Tabela 2- Resultados de repetições de autopolinizações e de cruzamentos recíprocos em *B. weddellii* (wed), *B. involutum* (inv) e *B. ipanemense* (ipa). Número dos indivíduos utilizados indicados após a espécie. Abreviações: cruzamentos bilateralmente compatíveis (BC), unilateralmente compatíveis (UC), bilateralmente incompatíveis (BI), totalmente autocompatíveis (AC), totalmente autoincompatíveis (AI) e parcialmente autocompatíveis (AC/AI).

CRUZAMENTOS	AC	AI	AC/ AI	BC	UC	BI
<b>autopolinizações</b>						
wed 24		X				
wed 38		X				
wed 39		X				
wed 40		X				
ipa I16	X					
ipa C2			X			
ipa I1			X			
<b>intraespecíficos</b>						
wed 39 x wed 38					X	
wed 22 x wed 36						X
inv 11 x inv 35					X	
inv 16 x inv 25					X	
ipa I16 x ipa I1				X		
<b>interespecíficos</b>						
wed 12 x inv 35				X		
wed 38 x inv 8				X		
wed 39 x inv 15				X		
wed 3 x inv 16					X	
wed 12 x inv 18					X	
wed 35 x inv 8					X	
inv 11 x wed 40					X	
inv 13 x wed 38					X	
wed 22 x ipa I1						X
wed 31 x ipa I1						X
wed 35 x ipa C2					X	
ipa I16 x inv 18					X	
ipa C16 x inv 15				X		
ipa I20 x inv 16				X		

Tabela 3- Germinação de grãos de pólen de *B. weddellii*, *B. involutum* e *B. ipanemense* em solução de sacarose 10%. Considerada como baixa germinação polinários que tiveram de um a poucas dezenas de grãos de pólen germinados, e elevada germinação aqueles com centenas a milhares de grãos de pólen germinados.

espécie	polinários (N)	nenhuma germinação (%)	baixa germinação (%)	elevada germinação (%)
<i>B. weddellii</i>	6	0	0	100
<i>B. involutum</i>	20	50,0	20,0	30,0
<i>B. ipanemense</i>	59	23,7	23,7	52,5

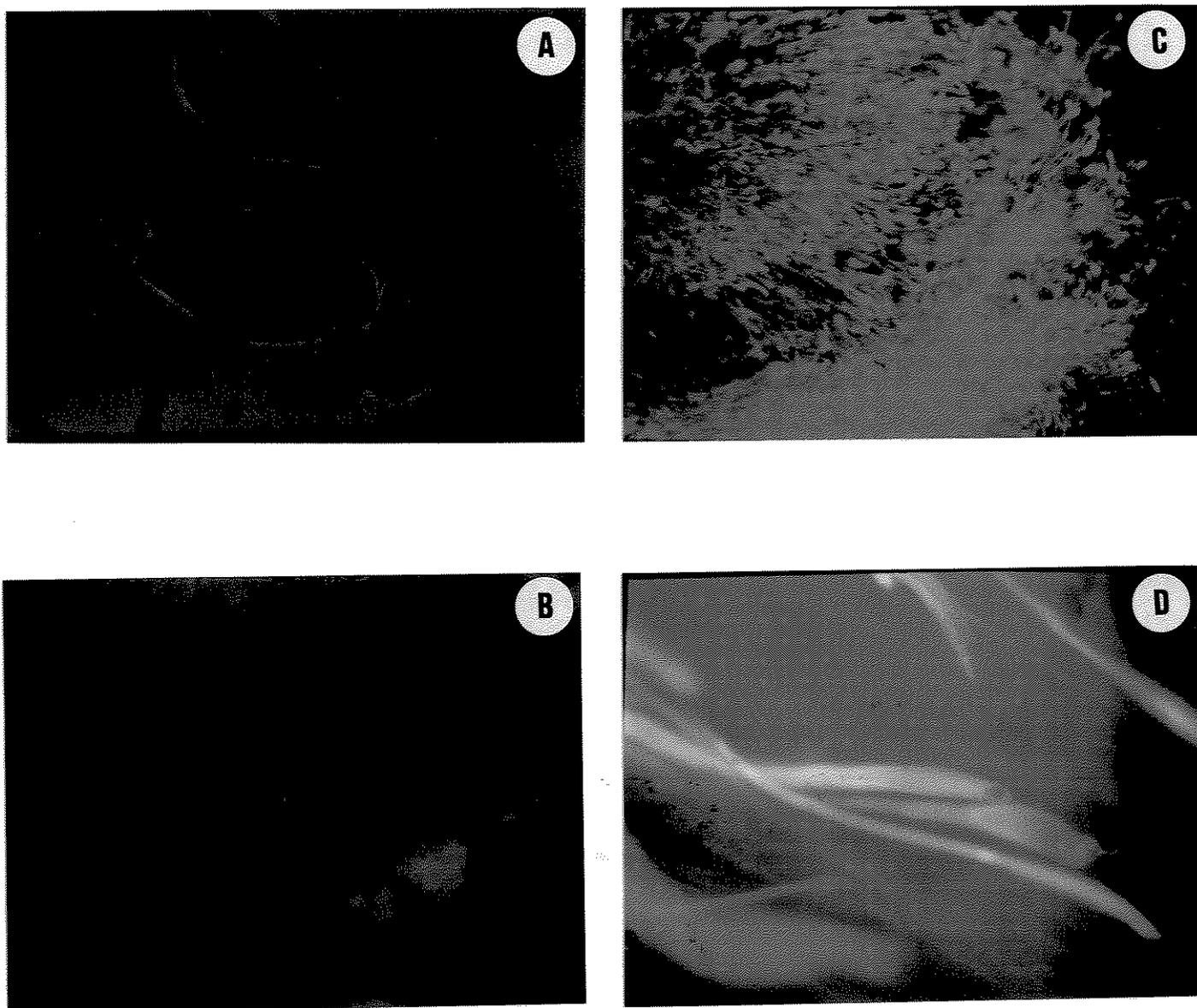


Figura 1. A- Sementes viáveis com embrião corado de vermelho (setas curtas) e inviáveis sem o embrião (seta longa) (*B. weddellii*, fruto formado no campo). B- Tipo 0; polinário na cavidade estigmática com grãos de pólen não germinados (*B. weddellii* x *B. ipanemense*). C, D- Tipo 1; tubos polínicos com ápice dilatado estourando (seta) ainda no canal estilar da coluna (C- *Bulbophyllum involutum*, autopolinização; D- *Bulbophyllum weddellii* x *B. weddellii*).

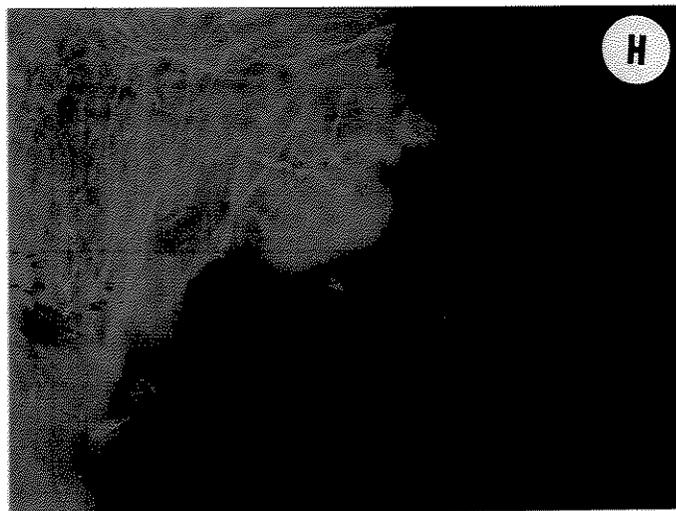
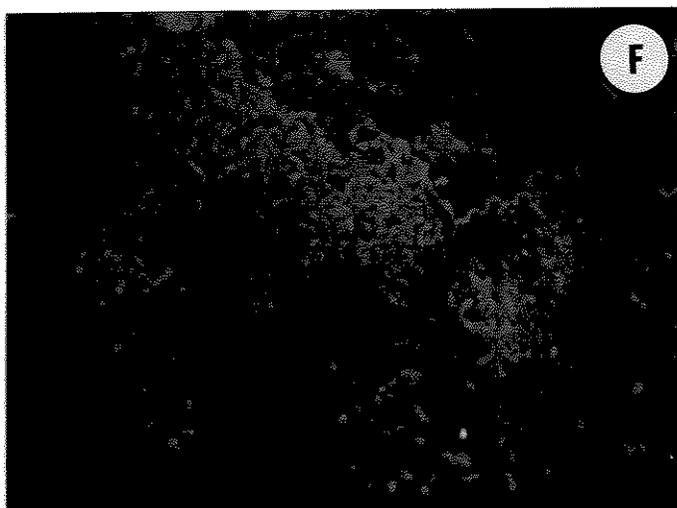
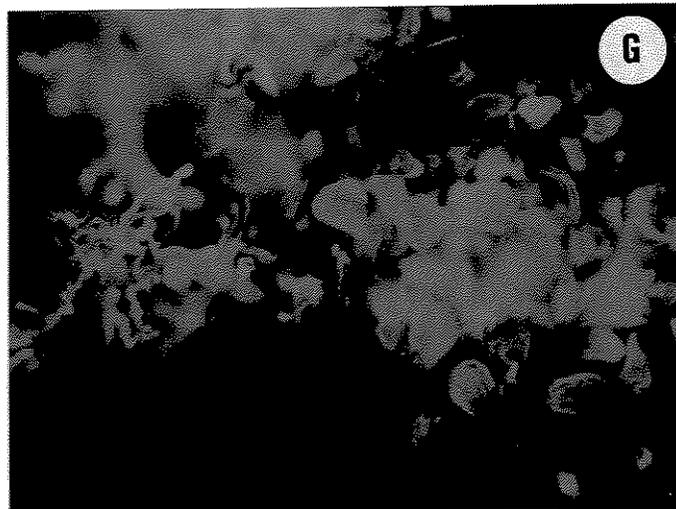
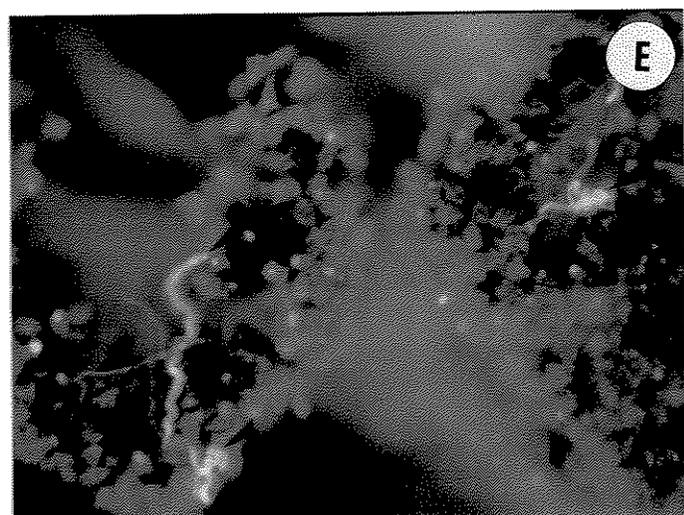


Figura 1 (cont.). E- Tipo 2; tubos polínicos deformados estourando na altura da placenta, alguns enovelados nos óvulos já maduros (setas curtas); algumas fertilizações visíveis (seta longa) (*B. weddellii*, autopolinização). F, G- Tipo 3; tubos polínicos deformados na placenta; sementes sem embrião (seta) (F- *Bulbophyllum ipanemense* x *B. weddellii*; G- *Bulbophyllum ipanemense* x *B. involutum*). H- Tipo 4; tubos polínicos perfeitos; sementes com (setas curtas) e sem embrião (seta longa) (*B. ipanemense*, fruto formado no campo).

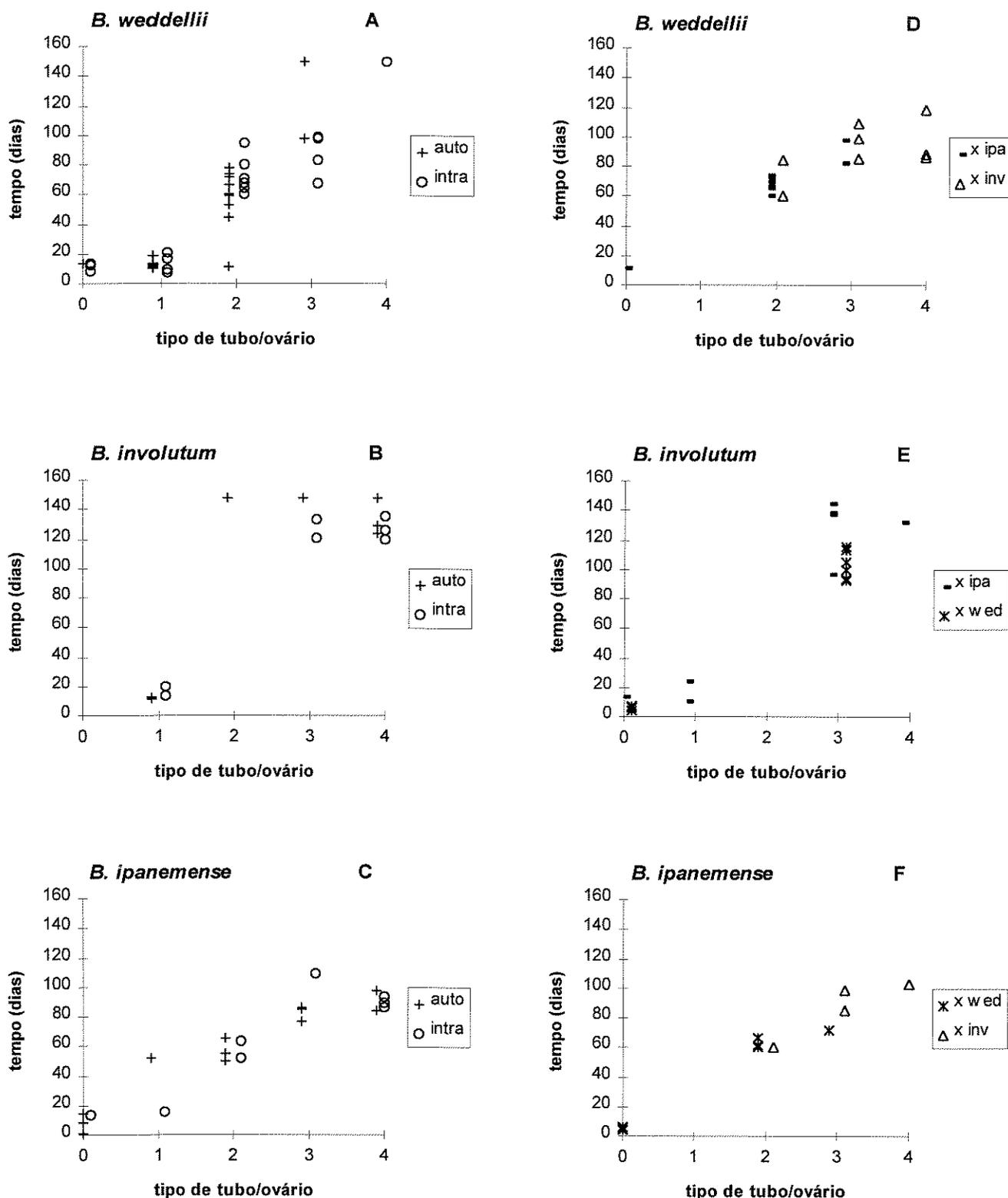


Figura 2- Relação entre tempo de desenvolvimento (dias) e tipo de tubo polínico/ovário encontrado em cruzamentos manuais em *B. weddellii* (wed), *B. involutum* (inv) e *B. ipanemense* (ipa). A-C- autopolinizações (auto) e polinizações cruzadas intraespecíficas (intra). D-E- polinizações interespecíficas.

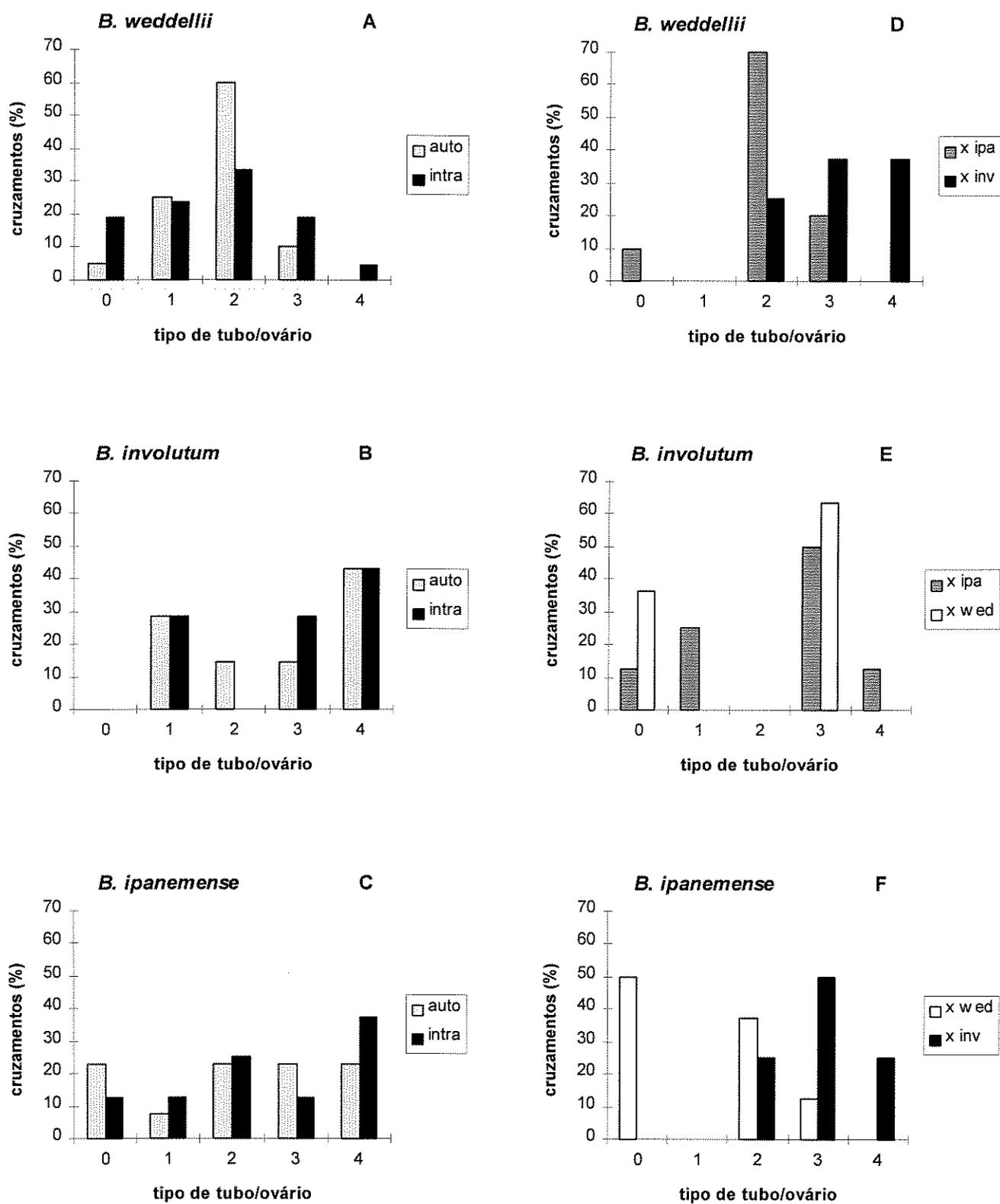


Figura 3- Frequência de tipos de tubo polínico/ovário encontrados em cruzamentos manuais em *B. weddellii* (wed), *B. involutum* (inv) e *B. ipanemense* (ipa). A-C- autopolinizações (auto) e polinizações cruzadas intraespecíficas (intra). D-E- polinizações interespecíficas.

## DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste trabalho devem ser analisados com cautela. O elevado número de abortos pode ter como uma das causas a utilização de plantas que em sua maioria tinham sido recém transplantadas (apenas 3 a 5 meses), além das diferenças ambientais entre os locais das populações e as condições de cultivo. Estas espécies encontram-se na natureza sob escassez de recursos (CAPÍTULO 1), condição que pode ser agravada por stress ocasionado por transplante, levando a falhas na frutificação e aborto de frutos (Lloyd, 1980; Stephenson, 1981). Entretanto, algumas espécies não têm apresentado modificações qualitativas nos diferentes tratamentos de polinização quando submetidas a stress hídrico, ocorrendo apenas mudanças quantitativas na taxa de aborto e de formação de sementes (Hauser & Loeschcke, 1996). Além disto, Sazima (1978) reportou taxas de maturação de frutos semelhantes em *B. involutum* (identificado como *B. warmingianum* Cogn.) em experimentos realizados na natureza, sem o transplante de indivíduos. Desta forma, e como alguns dos indivíduos que foram utilizados neste trabalho tinham sido transplantados a oito meses e se comportaram semelhantemente aos outros indivíduos, uma análise qualitativa destes resultados mostra-se coerente.

Baixa taxa de frutificação e elevada taxa de aborto têm sido frequentemente verificadas em experimentos realizados em populações naturais de orquídeas (Mehrlhoff, 1983; Ackerman & Oliver, 1985; Gonzáles-Dias & Ackerman, 1988). Este aborto pode ser causado não apenas pela já mencionada escassez de recursos, mas também por baixo número de sementes em desenvolvimento (Stephenson, 1981; Bertin, 1990). Número reduzido de tubos polínicos crescendo, devido a baixa carga de pólen ou mesmo a problemas com os tubos, tem sido citado como um dos motivos responsáveis por baixa formação de sementes, podendo ocasionar aborto (Bertin, 1990; Niesenbaum & Casper, 1994). Agnew (1986) sugere que a presença de sementes sem embrião em várias espécies de Orchidaceae estudadas por ele deve ser causada por problemas nos tubos polínicos, que não chegam a efetuar a fertilização. A morfologia dos tubos polínicos observada nas flores que não desenvolveram frutos (Tipo 1), frutos abortados (Tipo 2) e frutos com poucas sementes (Tipo 3) é bastante similar à encontrada em reações de incompatibilidade em várias espécies de angiospermas (Richards, 1986; Marshall & Folsom, 1991), inclusive em orquídeas (Dafni & Calder, 1987). Porém, a ocorrência de não germinação de grãos de pólen *in vitro* e na região estigmática de flores pode indicar que estes problemas com os tubos sejam mais devidos a problemas com os gametas masculinos (esterilidade masculina?) do que a algum tipo de incompatibilidade. Por outro lado, *B. weddellii* apresentou uma germinabilidade muito mais baixa em autopolinizações e polinizações intraespecíficas do que em polinizações interespecíficas, e *B. involutum*, que teve baixa germinabilidade *in vitro*, teve alta germinabilidade nas polinizações

manuais. Segundo Johri & Vasil (1961), germinabilidade de pólen *in vitro* pode algumas vezes não indicar germinabilidade e capacidade de frutificação *in vivo*, e vice-versa.

Mecanismos pós-zigóticos, como a presença de vários alelos recessivos letais, também têm sido apontados como causas de baixa formação de sementes, podendo induzir aborto (Johansen, 1990; Tremblay, 1994). Presença de alelos recessivos letais poderia explicar o grande número de aborto em autopolinizações, principalmente em *B. weddellii*. Pode também ser um dos motivos de aborto em polinizações cruzadas intraespecíficas, causado por semelhança genética entre indivíduos (Johansen, 1990; Tremblay, 1994), e interespecíficas entre espécies próximas (*B. involutum* e *B. ipanemense*) (Christensen, 1992). Um fortalecimento para esta hipótese é a ocorrência do aborto apresentando tubos e óvulos do Tipo 2 por volta dos 60 dias, período observado da ocorrência da fertilização em espécies de *Bulbophyllum* (Swamy, 1949). O mesmo foi observado em espécies de *Dendrobium* (Orchidaceae) por Johansen (1990).

É provável que os padrões aqui descritos representem um contínuo (Tipo 0 a 4), existindo limites tênues entre a carga de sementes capaz de manter ou não um fruto em desenvolvimento até a maturidade, que vão ser definidos pela capacidade de germinação do pólen, de crescimento dos tubos polínicos e fertilização dos óvulos e de sobrevivência dos embriões inicialmente formados. Provavelmente nestas espécies está ocorrendo um somatório destes e talvez de outros fatores, e este quadro apenas poderá ser elucidado com um número maior de cruzamentos e com a realização de outros experimentos a nível genético e embriológico.

Estes experimentos a nível genético e embriológico também poderiam ajudar a explicar porque alguns indivíduos de espécies autocompatíveis consistentemente se mostram autoincompatíveis quando autopolinizados repetidas vezes (*B. weddellii*). E também, o porque da unidirecionalidade de cruzamento entre alguns pares de indivíduos de espécies autocompatíveis, enquanto outros pares de indivíduos se mostram bilateralmente compatíveis ou bilateralmente incompatíveis. Alguns resultados semelhantes a estes foram encontrados por Faulkner (1973) em Cyperaceae, sem contudo o autor encontrar uma explicação para estes fatos.

Grande variabilidade no percentual de sementes com embrião tem sido encontrada em frutos formados por cruzamentos intraespecíficos em Orchidaceae (Stort, 1973, 1976; Catling, 1982; Stort & Galdino, 1984; Pavanelli & Stort, 1985; Iannotti et al. 1987). Devido a esta variação e a outros fatores, alguns autores têm criticado o potencial de intercruzamento como representando filogenia das espécies envolvidas (Stort, 1973; Selberg, 1989). Por outro lado, Hogenboom (1975) postulou que o não funcionando de um cruzamento pode ser resultante da falta de informação genética em um indivíduo sobre algum caráter relevante do outro (incongruidade), o que é devido ao grau de divergência evolutiva entre estas espécies (ou entre populações da mesma espécie). Apesar de alguns trabalhos terem mostrado resultados contraditórios à hipótese da incongruidade formulada por Hogenboom (Stort, 1982), mais numerosos são aqueles que mostram que capacidade de

cruzamento pode refletir similaridade ou filogenia em Orchidaceae (Sanford, 1964, 1967; Stort, 1972, 1986; Illg, 1975; Scacchi et al. 1990) e em outras famílias (Faulkner, 1973; Weiblen & Brehm, 1996). Alguns destes trabalhos estão em concordância não apenas com propostas filogenéticas baseadas em caracteres morfológicos, mas também em flavonóides (Stort, 1986) e isoenzimas (Scacchi et al. 1990).

A ocorrência de sucesso mais baixa em cruzamentos interespecíficos do que em intraespecíficos, e uma vez que *B. involutum* e *B. ipanemense* são espécies muito próximas (CAPÍTULO 4) e estas são relativamente distintas de *B. weddellii*, os resultados aqui apresentados concordam com a hipótese de Hogenboom (1975). Os intercruzamentos menos viáveis foram todos aqueles que envolveram *B. weddellii*. Além disto, os cruzamentos entre *B. involutum* e *B. ipanemense* foram intermediários aos cruzamentos intraespecíficos e intercruzamentos com *B. weddellii* (*B. involutum* x *B. ipanemense*) ou então foram semelhantes a cruzamentos intraespecíficos (*B. ipanemense* x *B. involutum*). Isto provavelmente se deve ao aborto de embriões já formados, o que pode ser visualizado pelo maior número de frutos do Tipo 3 do que do Tipo 4, contrariamente ao que ocorre em polinizações intraespecíficas. A maior incongruidade entre *B. weddellii* e *B. ipanemense* parece ser devida à baixa viabilidade do embrião formado logo após a fertilização, o que pode ser visto pela grande quantidade de aborto (Tipo 2).

Como *B. weddellii* e *B. involutum* são espécies simpátricas, possuem eventos fenológicos sincronizados e compartilham os mesmos polinizadores, certamente a baixa fertilidade entre elas não é uma barreira suficiente para impedir a formação de híbridos na natureza. Além desta barreira, outros mecanismos operando em conjunto devem estar funcionando como vários filtros, que somados são responsáveis pela frequência muito baixa de híbridos entre estas espécies encontrados na natureza (CAPÍTULOS 1, 2 e 5). Os resultados aqui obtidos também concordam com Pijl & Dodson (1966) e Dressler (1981, 1993), que sugerem que as barreiras à autogamia em Orchidaceae ocorrem principalmente a nível de polinização (CAPÍTULOS 1 e 2) do que a nível de autoincompatibilidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerman, J. D. & Oliver, J. C. M. 1985. Reproductive biology of *Oncidium variegatum*: moon phases, pollination, and fruit set. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 54(3): 326-329.
- Agnew, J. D. 1986. Self-compatibility/incompatibility in some orchids of the subfamily Vandoideae. **Plant Breeding** 97: 183-186.
- Bertin, R. I. 1990. Effects of pollination intensity in *Campsis radicans*. **Amer. J. Bot.** 77(2): 178-187.
- Catling, P. M. 1982. Breeding systems of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae). **Can. J. Bot.** 60: 3017-3039.
- Christensen, D. E. 1992. Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. **Lindleyana** 7(1): 28-33.
- Dafni, A. 1992. **Pollination ecology: a practical approach**. Oxford University Press, Oxford.
- Dafni, A. & Calder, D. M. 1987. Pollination by deceit and floral mimesis in *Thelymitra antennifera* (Orchidaceae). **Pl. Syst. Evol.** 158: 11-22.
- Dressler, R. L. 1981. **The orchids: natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R. L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Dioscorides Press, Portland.
- Faegri, K. & Pijl, L. van der. 1979. **The principles of pollination ecology**, 3ª ed. Pergamon Press, Oxford.
- Faulkner, J. S. 1973. Experimental hybridization of north-west European species in *Carex* section *Acutae* (Cyperaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 67(3): 233-253.
- González-Días, N. & Ackerman, J. D. 1988. Pollination, fruit set, and seed production in the orchid, *Oeceoclades maculata*. **Lindleyana** 3(3): 150-155.
- Hauser, T. P. & Loeschcke, V. 1996. Drought stress and inbreeding depression in *Lychnis flos-cuculi* (Caryophyllaceae). **Evolution** 50(3): 1119-1126.
- Hogenboom, N. G. 1975. Incompatibility and incongruity: two different mechanisms for the non-functioning of intimate partner relationships. **Proc. R. Soc. Lond. B.** 188: 361-375.
- Iannotti, M. A.; Stort, M. N. S. & Marin-Morales, M. A. 1987. O sistema reprodutivo de *Epidendrum rigidum* Jacq. (Orchidaceae). **Ciênc. Cult.** 39(7): 641-644.

- Illg, R. D. 1975. **Aspectos evolutivos em algumas Maxillarias brasileiras (Orchidaceae)**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Johansen, B. 1990. Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 103: 165-196.
- Johri, B. M. & Vasil, K. 1961. Physiology of pollen. **Bot. Rev.** 27(3): 325-381.
- Lloyd, D. G. 1980. Sexual strategies in plants. I. An hypothesis of serial adjustment of maternal investment during one reproductive session. **New Phytol.** 86: 69-79.
- Marshall, D. L. & Folsom, M. W. 1991. Mate choice in plants: an anatomical to population perspective. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 22: 37-63.
- Mehrhoff, L. A. 1983. Pollination in the genus *Isotria* (Orchidaceae). **Amer. J. Bot.** 70(10): 1444-1453.
- Niesenbaum, R. A. & Casper, B. B. 1994. Pollen tube numbers and selective fruit maturation in *Lindera benzoin*. **Am. Nat.** 144(1): 184-191.
- Pavanelli, E. A. S. & Stort, M. N. S. 1985. Cruzamentos artificiais em plantas de *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae). **Ciê. Cult.** 37(7): 1164-1168.
- Pedersen, H. A. 1995. Anthecological observations on *Dendrochilum longibracteatum* - a species pollinated by facultatively anthophilous insects. **Lindleyana** 10(1): 19-28.
- Pijl, L. van der & Dodson, C. H. 1966. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. University of Miami Press, Coral Gables.
- Richards, A. J. 1986. **Plant breeding systems**. Allen & Unwin, London.
- Sanford, W. W. 1964. Sexual compatibility relationship in *Oncidium* and related genera. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 33 (12): 1035-1048.
- Sanford, W. W. 1967. Sexual compatibility relationship in *Oncidium* and related genera - part II. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 36 (2): 114-122.
- Sazima, M. 1978. Polinização por moscas em *Bulbophyllum warmingianum* Cogn. (Orchidaceae), na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. **Revta brasil. Bot.** 1(1): 133-138.
- Scacchi, R.; De Angelis, G. & Lanzana, P. 1990. Allozyme variation among and within eleven *Orchis* species (fam. Orchidaceae), with special reference to hybridization aptitude. **Genética** 81: 143-150.
- Selberg, O. 1989. Genome analysis, phylogeny, and classification. **Pl. Syst. Evol.** 166: 159-171.
- Stephenson, A. G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 12: 253-279.
- Stort, M. N. S. 1972. Estudos em híbridos F1 artificiais de orquídeas. **Ciê. Cult.** 24(9): 847-851.

- Stort, M. N. S. 1973. Natural pollination in *Cattleya loddigesii* Lindl. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 42(7): 606-608.
- Stort, M. N. S. 1976. Cruzamentos artificiais entre plantas diplóides e tetraplóides de *Cattleya bicolor* Lindl. **Ciên. Cult.** 28(10): 1208-1211.
- Stort, M. N. S. 1982. Cruzamentos artificiais envolvendo espécies do gênero *Cattleya*, subgêneros *Monophyllae* e *Cattleya* (Orchidaceae). **Ciên. Cult.** 35(10): 1481-1485.
- Stort, M. N. S. 1986. Fertilidade de cruzamentos e relação filogenética entre algumas espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). **Revta brasil. Bot.** 9(1): 69-73.
- Stort, M. N. S. & Galdino, G. L. 1984. Self and cross-pollination in some species of the genus *Laelia* Lindl. (Orchidaceae). **Rev. Brasil. Genet.** 7(4): 671-676.
- Swamy, B. G. L. 1949. Embryological studies in the Orchidaceae. II. Embryogeny. **Am. Midland Nat.** 41(1): 202-232.
- Tremblay, R. L. 1994. Frequency and consequences of multi-parental pollinations of *Cypripedium calceolus* var. *pubescens* (Orchidaceae). **Lindleyana** 9(3): 161-167.
- Weiblen, G. D. & Brehm, B. G. 1996. Reproductive strategies and barriers to hybridization between *Tellima grandiflora* and *Tolmeia menziesii* (Saxifraceae). **Amer. J. Bot.** 83(7): 910-918.

## APÊNDICE

Apêndice 1- Polinizações manuais realizadas em *Bulbophyllum weddellii*, *Bulbophyllum ipanemense* e *Bulbophyllum involutum*. São apresentados os indivíduos (indiv.), posição da flor na inflorescência, início (+) ou não (-) de frutificação, tamanho do fruto, número de sementes viáveis (300 sementes contadas por fruto), e tipos de tubo polínico/ovário encontrado (de acordo com o texto). Número do indivíduo seguido de asterisco indica polinização feita em população natural (campo) sem o transplante do indivíduo. A letra antes do número do indivíduo em *B. ipanemense* indica a população de onde o indivíduo é proveniente (I= Itutinga; C= Serra de Camargos, Nazareno; PB= um indivíduo coletado em Poço Bonito, Lavras-MG, ca. 30km distante das outras duas populações). A presença de letra após o número do indivíduo em *B. ipanemense* indica diferentes inflorescências de um mesmo indivíduo (genet). Células vazias indicam ausência de dados.

### *B. weddellii*-----AUTOPOLINIZAÇÃO

INDIV.	FLOR	INÍCIO FRUT.	TEMPO DESENV. (DIAS)	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/OVÁRIO
3	1	-	10			1
3	10	-	11			1
14	7	-				
15	1	-	19			1
16	2	-				
19	24	-	14			1
21	1	+	66	7,9x4,0		2
22	4	+	74	8,0x5,4		2
24	9	+	53	8,3x4,5		2
24	10	+	45	7,2x3,4		2
25	9	+	98	10,3x8,6	234	3
26	14	-	12			1
31	5	+	59	5,5x3,4		2
32	2	-				
35	11	-	14			0
36	1	+	72	6,1x3,7		2
36	penúlt.	-				
38	1	+	78	5,7x4,0		2
38	9	+	66	5,8x3,4		2
39	10	+	67	6,7x3,4		2
39	15	-	11			2
40	2	+	66	7,7x3,5		2
40	1	+	60	6,8x3,7		2
14*	?	+				
14*	?	+				
14*	?	+				
61*	10	+	<150	6,2x7,3	176	3
81*	1	+	95	7,0x5,4		

*B. weddellii*-----POLINIZAÇÃO CRUZADA INTRA-ESPECÍFICA

INDIV.	FLOR	ORIGEM POLÍNEA	INÍCIO FRUT.	TEMPO DESENV. (DIAS)	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/ OVÁRIO
3	2	38	+	95	9,3x9,0	9	2
14	16	22	-	12			0
14	9	32	-				
16	9	31	-				
19	5	24	+				
21	2	22	+	68	9,1x4,3	150	3
22	9	36	+	68	6,9x3,3		2
22	10	32	+	64			2
24	7	38	+	68	8,8x5,5		2
26	2	36	-				
26	15	31	+	83	8,4x5,5	123	3
29	4	16	-	13			0
32	3	36	-	8			0
35	5	39	+	17	5,1x3,4		1
35	14	39	-				
36	2	32	-	9			1
36	3	14	-	9			1
36	4	22	+	71	8,8x5,6		2
38	2	23	+	< 99	4,9x5,2		3
38	3	39	+	80	6,3x3,8		2
38	16	24	-	14			0
39	13	38	+	< 98	7,3x6,4		3
39	21	3	-	7			1
40	3	37	+	21			1
40	5	37	+	60	7,7x3,5		2
61*	8	56	+	<150	7,4x8,2	199	4

*B. weddellii*-----POLINIZAÇÃO INTER-ESPECÍFICA (*B. ipanemense*)

INDIV.	FLOR	ORIGEM POLÍNEA	INÍCIO FRUT.	TEMPO DESENV. (DIAS)	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/ OVÁRIO
3	3	I 1B	-	11			0
21	4	I 1A	+	65			2
22	7	I 1B	+	73			2
26	7	I 5	+	82	8,2x3,2	82	3
29	6	I 1A	+	70	5,5x4,1		2
31	1	I 1A	+	60			2
31	4	I 1B	+	60			2
35	8	C 2	+	98	9,6x7,3	6	3
39	22	PB 1	+	74	9,0x5,7		2
40	12	I 4	+	66	7,4x4,2		2

*B. weddellii*-----POLINIZAÇÃO INTER-ESPECÍFICA (*B. involutum*)

INDIV.	FLOR	ORIGEM POLÍNEA	INÍCIO FRUT.	TEMPO DESENV. (DIAS)	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/OVÁRIO
3	12	16	+	109	10,3x9,9	35	3
12	7	35	+	88	9,0x7,3	73	4
12	10	18	+	86	8,9x7,6	52	4
35	3	8	+	99	8,3x6,9	7	3
38	11	8	+	118	8,4x6,6	122	4
38	18	13	+	84	5,8x3,8		2
39	31	15	+	85	8,5x6,0		3
40	17	11	+	60	7,2x4,1		2

*B. ipanemense*-----AUTOPOLINIZAÇÃO

INDIV.	FLOR	INÍCIO FRUT.	TEMPO DESENV. (DIAS)	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/OVÁRIO
C 2	3	+	77	9,0x6,9		3
C 2	9	+	50	5,8x3,4		2
C 7	1	+	58			
C 8	última	+				
I 16E	9	+	98	10,9x7,4	150	4
I 16E	10	+	98	10,5x8,7	184	4
I 16F	22	+	65	8,1x3,7		2
I 1A	23	+	55	5,0x3,0		2
I 1B	3	+	84	5,2x4,0		4
I 1B	5	-	15			0
I 1B	12	-	8			0
I 1C	4	+	86	6,8x3,3		3
I 20	15	+	85	6,4x5,4	66	3
I 21	14	+	52	4,7x2,6		1
PB 1	1	+				
PB 1	3	-	1			0

*B. ipanemense*-----POLINIZAÇÃO CRUZADA INTRA-ESPECÍFICA

INDIV.	FLOR	ORIGEM POLÍNEA	INÍCIO FRUT.	TEMPO DESENV. (DIAS)	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/OVÁRIO
C 2	10	I 4	+	89	7,0x4,5	124	4
I 15	18	I 22	+	52	7,8x4,1		2
I 16C	6	I 1C	+	86	8,5x5,3		4
I 16F	21	I 22	+	63	7,0x3,5		2
I 1C	3	I 16C	+	109	7,7x5,5	138	3
I 21	13	I 15	-	16			1
I 22	16	I 16F	+	93	8,3x6,5	204	4
I 22	17	I 15	-	13			0

*B. ipanemense*-----POLINIZAÇÃO INTER-ESPECÍFICA (*B. weddellii*)

INDIV.	FLOR	ORIGEM POLÍNEA	INÍCIO FRUT.	TEMPO DESENV. (DIAS)	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/ OVÁRIO
C 2	1	35	-	5			0
C 2	2	23	+	72	7,9x5,9	8	3
C 2	4	35	-				
I 1A	9	32	-	6			0
I 1A	10	36	+	56	5,8x3,0		
I 1A	13	16	-	4			0
I 1A	14	15	-				
I 1A	15	31	+	60	5,8x4,2		2
I 1A	16	26	-				
I 1A	22	38	+	61	7,1x4,1		2
I 1B	1	22	+	66	5,4x3,8		2
PB 1	2	39	-	6			0

*B. ipanemense*-----POLINIZAÇÃO INTER-ESPECÍFICA (*B. involutum*)

INDIV.	FLOR	ORIGEM POLÍNEA	INÍCIO FRUT.	TEMPO DESENV. (DIAS)	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/ OVÁRIO
C 16	5	15	+	85	7,2x6,0	105	3
I 16C	8	26	+	60	7,5x3,9		2
I 16D	14	18	+	103	9,2x6,9	178	4
I 1B	3	19	+				
I 20	16	16	+	99	7,7x6,9	152	3

*B. involutum*-----AUTOPOLINIZAÇÃO

INDIV.	FLOR	INÍCIO FRUT.	TEMPO DESENV. (DIAS)	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/ OVÁRIO
23	3	+	124	8,8x5,5	187	4
25	4	-	11			1
27	4	+	129	12,0x8,5	113	4
31	6	-	12			1
48*		+	<148	10,3x8,4	92	2
99*		+	<148	10,8x8,3	227	4
147*		+	<148	10,7x4,9		3
s/n*		+	92	11,9x7,9	172	

*B. involutum*-----POLINIZAÇÃO CRUZADA INTRA-ESPECÍFICA

INDIV.	FLOR	ORIGEM POLÍNEA	INÍCIO FRUT.	TEMPO DESENV. (DIAS)	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/OVÁRIO
1	5	15	+	120	9,0x5,7	239	4
11	5	35	+	126	8,5x5,0	211	4
15	8	18	+	135	9,7x7,1	127	4
16	6	25	+	133	7,2x5,4	65	3
18	3	1	+				
25	3	16	-	13			1
31	4	35	+	121	8,9x4,8	143	3
35	4	11	-	20			1
35	5	27	-				
109*		145	+	92	8,4x7,0	81	

*B. involutum*-----POLINIZAÇÃO INTER-ESPECÍFICA (*B. weddellii*)

INDIV.	FLOR	ORIGEM POLÍNEA	INÍCIO FRUT.	TEMPO DESENV. (DIAS)	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/OVÁRIO
1	1	19	+	93	9,2x5,8	51	3
8	2	35	-	6			0
8	3	35	-	4			0
8	4	38	+	105	7,4x3,5	33	3
11	1	38	+	105	8,3x5,1	104	3
11	2	40	+	115	8,2x5,0	88	3
13	1	38	+	113	7,9x5,1	84	3
15	2	3	-	7			0
15	4	39	+	92	8,3x4,4	45	3
16	1	3	-	6			0
18	2	12	-				
35	1	12	+	100	8,3x4,5	73	3

*B. involutum*-----POLINIZAÇÃO INTER-ESPECÍFICA (*B. ipanemense*)

INDIV.	FLOR	ORIGEM POLÍNEA	INÍCIO FRUT.	TEMPO DESENV. (DIAS)	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/OVÁRIO
1	7	C 14	-	24			1
8	5	I 4	+	97	7,5x3,8	53	3
15	9	C 16	+	138	7,6x5,5	103	3
16	3	I 20	+	132	8,2x6,1	105	4
18	4	I 16D	-	13			0
19	2	I 1A	-	10			1
26	1	I 16C	+	137	9,6x6,5	87	3
34	3	I 16	+	144	7,3x6,5	100	3

*B. weddellii*----- FRUTOS COLETADOS NO CAMPO

INDIV.	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/ OVÁRIO
1	12,1x8,3	143	
20 f/20	11,1x10,0	180	4
20 f/7	10,6x8,1	127	4
4	7,2x4,4	dispersado	
4	7,8x5,1	dispersado	
5	12,7x11,4	117	4
6	7,9x9,3	dispersado	
6	7,4x9,1	dispersado	
6	8,0x8,8	dispersado	
16	11,3x8,5	76	
16	10,9x8,7	180	
16	11,1x8,3	150	
17	11,3x9,0	216	
17	11,6x8,3	184	
17	10,3x7,0	201	
17	7,5x4,6	dispersado	
17	8,8x7,1	dispersado	
21	7,6x5,5	dispersado	
21	7,6x7,0	dispersado	
21	9,8x7,6	129	
24	8,1x8,8	dispersado	
24	8,3x8,7	99	
29	10,5x7,5	199	
29	9,2x6,8	128	
61 f/2	7,1x8,3	202	4
33	8,2x7,6	181	3
39	11,2x9,5	232	3
44	12,3x10,6	221	4
53	8,3x8,6	dispersado	
53	8,1x8,1	dispersado	
53	8,3x8,5	dispersado	
53	8,1x8,5	dispersado	
57	8,4x6,1	137	
57	9,3x9,7	dispersado	
57	9,8x9,5	dispersado	
81	7,0x5,4	dispersado	

OBS.: mais sete frutos não identificados com tubo Tipo 4

*B. ipanemense*-----FRUTOS COLETADOS NO CAMPO

INDIV.	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/ OVÁRIO
I 15	9,4x7,5	21	3
I 16F	8,4x6,3	83	
I 16F	12,0x7,0	140	
I 17	7,5x6,3	166	4
I 18	6,3x5,8		4
I 18 (A)	7,8x7,2	233	4
I 18 (B)	8,0x8,7	220	4
I 19	9,7x7,0	172	
I 19	8,8x7,0	185	
I 21	8,7x6,0	dispersado	
I 21	8,1x6,2	0 ?	
s/n	10,1x7,0	148	
s/n	9,7x7,2	27	
s/n	7,8x7,8	155	
s/n	9,3x5,6	dispersado	

*B. involutum*-----FRUTOS COLETADOS NO CAMPO

INDIV.	TAMANHO FRUTO (MM)	SEMENTES VIÁVEIS (N=300)	TIPO TUBO/ OVÁRIO
100	9,9x6,9	266	4
124 A	8,8x8,3	233	4
124 B	8,5x8,3	232	4
125 f/15	9,3x9,1	242	4
125 f/16	9,8x8,8	227	4
128	10,8x8,5	229	4
129 f/5	11,6x8,7	202	4
129 f/9	10,6x7,2	232	4
130 f/7	12,1x8,0	201	4
131	8,8x8,0	167	4
144	11,6x9,4	216	4
149 f/5	10,4x6,1	dispersado	4
149 f/6	10,1x7,8	174	4
s/n A	9,0x8,3	172	4
s/n B	10,6x8,4	198	4

Apêndice 2- Germinação de grãos de pólen de *Bulbophyllum ipanemense* e *Bulbophyllum involutum* em solução de sacarose a 10% por 30 horas. A letra antes do número do indivíduo em *B. ipanemense* indica a população de onde o indivíduo é proveniente (I= Itutinga; C= Serra de Camargos, Nazareno). A presença de letra após o número do indivíduo em *B. ipanemense* indica diferentes inflorescências de um mesmo indivíduo (genet).

*B. involutum*

INDIV.	NENHUMA GERMIN.	BAIXA GERMIN.	ALTA GERMIN.
1			X
1		X	
1		X	
12			X
12		X	
12			X
12			X
15	X		
15	X		
15	X		
15		X	
23	X		
23			X
23			X
28	X		
28	X		
28	X		
35	X		
35	X		
35	X		

*B. ipanemense*

INDIV.	NENHUMA GERMIN.	BAIXA GERMIN.	ALTA GERMIN.
?	X		
?			X
?	X		
?	X		
?			X
?	X		
C 2			X
C 2		X	
C 10		X	
C 10	X		
C 11	X		
C 12			X
C 12			X
C 13			X
C 13			X
C 13		X	
C 14			X
C 16		X	
C 16		X	
C 16		X	
C 20	X		
I 1			X
I 1C			X
I 1C			X
I 14			X
I 14			X
I 11	X		
I 11A	X		
I 11B		X	
I 11B		X	
I 12	X		
I 12		X	
I 13			X
I 13			X
I 13			X
I 14			X
I 14			X
I 14A			X
I 14A			X
I 15			X
I 16	X		
I 16			X
I 16A			X
I 16A			X
I 16A		X	
I 16A	X		
I 16C			X
I 16C			X
I 16D			X
I 16D			X
I 20		X	
I 21	X		
I 22	X		
I 22		X	
I 22		X	
I 22		X	

## CAPÍTULO 4

***Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & F. Barros**  
**(Orchidaceae), uma nova espécie dos campos rupestres do**  
**Brasil.**

If we find that X and Y, thought superficially very similar, never interbreed, many taxonomists would say, "They are biologically distinct species, but it's not practical to treat them as species if one can't tell them apart". Such populations may be termed "cryptic" species, and pairs of cryptic species often prove to be abundantly distinct when are carefully studied.

*Robert L. Dressler, "Phylogeny and classification of the orchid family", 1993.*

<b>CONTEÚDO</b>	<b>PÁGINA</b>
RESUMO	92
INTRODUÇÃO	93
RESULTADOS	93
Figuras	96
DISCUSSÃO	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

## **RESUMO**

*Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & F.Barros, uma nova espécie de orquídea dos campos rupestres brasileiros é descrita e ilustrada com notas sobre a biologia da espécie. Comparações com as espécies proximalmente relacionadas, *B. warmingianum* Cogn. e *B. ipanemense* Hoehne, são apresentadas.

## INTRODUÇÃO

*Bulbophyllum* Thouars é um dos maiores gêneros de orquídeas, incluindo acima de 1000 espécies, e tem uma distribuição pantropical, concentrada especialmente nos trópicos do Velho Mundo (Dressler, 1993).

A última monografia do gênero para as espécies brasileiras foi realizada por Cogniaux (1902), e muitas espécies foram descritas posteriormente em trabalhos isolados. No presente, 54 espécies de *Bulbophyllum* estão listadas para o Brasil (Pabst & Dungs, 1975, 1977). Esta falta de uma revisão recente tem dificultado a identificação das espécies brasileiras, ocorrendo frequentemente determinações errôneas de espécimes presentes nas coleções.

Um grande problema taxonômico neste gênero envolve um grupo de espécies principalmente encontrado nos campos rupestres brasileiros, onde cerca de oito destas espécies são vegetativamente muito semelhantes. A separação destas é possível apenas por caracteres florais muito sutis, os quais são difíceis de reconhecer em material de herbário, a despeito da relativamente fácil diagnose no campo. Estes problemas, em adição à falta de revisões recentes no gênero, têm levado a más interpretações de algumas espécies, muitas delas sendo erroneamente identificadas como *Bulbophyllum warmingianum* Cogn.

Durante a realização de estudos de biologia reprodutiva de algumas espécies deste complexo (CAPÍTULO 1) e examinando materiais de herbário, foi verificado que várias populações originariamente interpretadas como pertencendo a *B. warmingianum* Cogn. e *B. ipanemense* Hoehne apresentam algumas características que as identificam como uma espécie distinta, sendo então descrita aqui.

## RESULTADOS

*Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & F. Barros, sp. nov. Typus: Brasil. Minas Gerais: São Gonçalo do Rio Abaixo, Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental de Peti, 24 abr. 1993 (fl, fr) E. L. Borba 008 (holotypus, BHCB). Fig. 1, 2.

A *Bulbophyllum warmingianum* Cogn. et *Bulbophyllum ipanemensis* Hoehne affinis, sed anthesi flore singule, scapi bracteis florilibus purpuris, floribus purpuris majoribus, petalis ovatis, apice obtuso vel rotundato, basi labelli lobo terminale truncati vel subcordati cum margine involuto differt.

Ervas rúpicolas ou ocasionalmente epífitas. Raízes filiformes, fasciculadas, longas. Rizoma 20-51mm comp. entre os pseudobulbos, 3-6mm diâm., repente, coberto com bainhas paleáceas. Pseudobulbos 19-41x12-22mm, eretos, ovóides, tetrágonos, amarelados, monófilos. Folhas 31-115x16-31mm, sésseis, ereto-patentes, rígidas, coriáceas a levemente carnosas, elíptico-oblongas a oblongas, verdes, ápice agudo-apiculado, base atenuada e canaliculada. Inflorescência basal, escapo 29-48cm comp., 2-3mm diâm., ereto, rígido, púrpuro, com 6-11 brácteas, 14-18mm comp., púrpuras, posteriormente se tornando paleáceas, ápice obtuso; racemo 11-38cm comp., 11-30 flores, laxo, raque púrpura, curvada em direção horizontal. Brácteas florais 7,5-10,5x3-4,5mm, ovadas, persistentes, púrpuras quando novas se tornando paleáceas na antese, ápice obtuso. Pedicelos 1,0-2,7mm comp. Flores ressupinadas pela torção do pedicelo. Sépalas coriáceas, oval-triangulares, côncavas, naviculadas, acuminadas, face dorsal púrpura, face ventral verde com manchas e pontuações púrpuras; sépala dorsal 9,6-12-4x3,6-4,4mm, ereta; sépalas laterais 10,4-11,3x3,8-4,9mm, patentes a reflexas, oblíquas. Pétalas 3,3-5,1x2-3,1mm, membranáceas, obliquamente ovadas, patentes, púrpuras com manchas esverdeadas, ápice obtuso a rotundo, margem ciliada. Labelo 5,3-8,1x2,7-3,9mm, carnoso, ereto-pêndulo em ângulo de 45° com a coluna, articulado com o pé da coluna; lobos laterais eretos, auriculares, ciliados, atro-púrpuros com manchas brancas; lobo mediano púrpuro com ápice branco, côncavo, base truncada a cordada, ápice arredondado, margens laterais involutas, ciliadas; calo atro-púrpuro, oblongo, metade proximal longitudinalmente sulcada. Coluna 2,4-3,8mm comp., branca com manchas púrpuras, com dois longos e sinuosos braços ou estelídias e dois dentes falcados na face ventral; antera versátil, verde, papilosa, dois pares de políneas; ovário 2,9-5,2mm comp., obcônico, púrpuro, sulcado. Fruto cápsula, 8,5-12,1x6,1-9,4mm.

Paratypi. BRASIL. Minas Gerais: Diamantina, Serra da Samambaia, 7 Abr. 1980 (fl), **F. Barros 171** (SP); estrada Diamantina/Mendanha, km 585, 6 Jun. 1985 (fl), **H. F. Leitão-Filho 17523** (UEC); Santana do Riacho, Parque Nacional da Serra do Cipó, 3 Fev. 1994 (fl), **E. L. Borba 100** (BHCB); Santana do Riacho, Parque Nacional da Serra do Cipó, região do Congonhas, 900m, Maio 1995 (fl), **E. L. Borba 150** (UEC, MO); Santana do Riacho, Serra do Cipó, rio Santo Antônio, 500m, 27 Abr. 1978 (fl), **G. Martinelli 4412** (RB); Santana do Riacho, Serra do Cipó, km 100, 1000m, 27 Abr. 1978 (fl), **G. Martinelli 4364** (RB); Conceição do Mato Dentro, Serra do Cipó, km 129, Rio Santo Antônio, 1300m, 16 Jul. 1977 (fl), **G. Martinelli & A. Távora 2611** (RB); Serra do Cipó, 2 Maio 1973 (fl), **M. Sazima s/n** (HB 59402); Grão-Mogol, Vale do Riacho Ribeirão, 900m, 24 Maio 1987 (fl), **R. Mello-Silva & J. R. Pirani [CFCR 10866]** (SPF); estrada Grão-Mogol/Montes Claros, 16 Abr. 1981 (fl), **L. Rossi [CFCR 1025]** (SPF, SP). Bahia: Mucugê, estrada Mucugê/Cascavel, km 3 a 6, próximo ao rio Paraguaçu, 20 Set. 1981 (fl), **N. L. Menezes et al. [CFCR 1477]** (SPF, SP); Rio de

Contas, Chapada Diamantina, Vale do Queiroz, Pico das Almas, col. in 16 Set. 1995 and cultivated until flowering in July 1996, I. Koch & R. Lengruber 452 (UEC).

Distribuição: *Bulbophyllum involutum* é encontrado crescendo em rochas ou algumas vezes em árvores nos campos rupestres dos estados de Minas Gerais e Bahia, ao longo da Cadeia do Espinhaço. O limite sul de sua distribuição situa-se em São Gonçalo do Rio Abaixo, Minas Gerais, onde cresce em rochas graníticas dos contrafortes da Cadeia do Espinhaço, estendendo-se ao norte pelas formações quartzíticas da Serra do Cipó, Diamantina e Serra de Grão-Mogol, em Minas Gerais, até alcançar o Pico das Almas e Mucugê, no estado da Bahia.

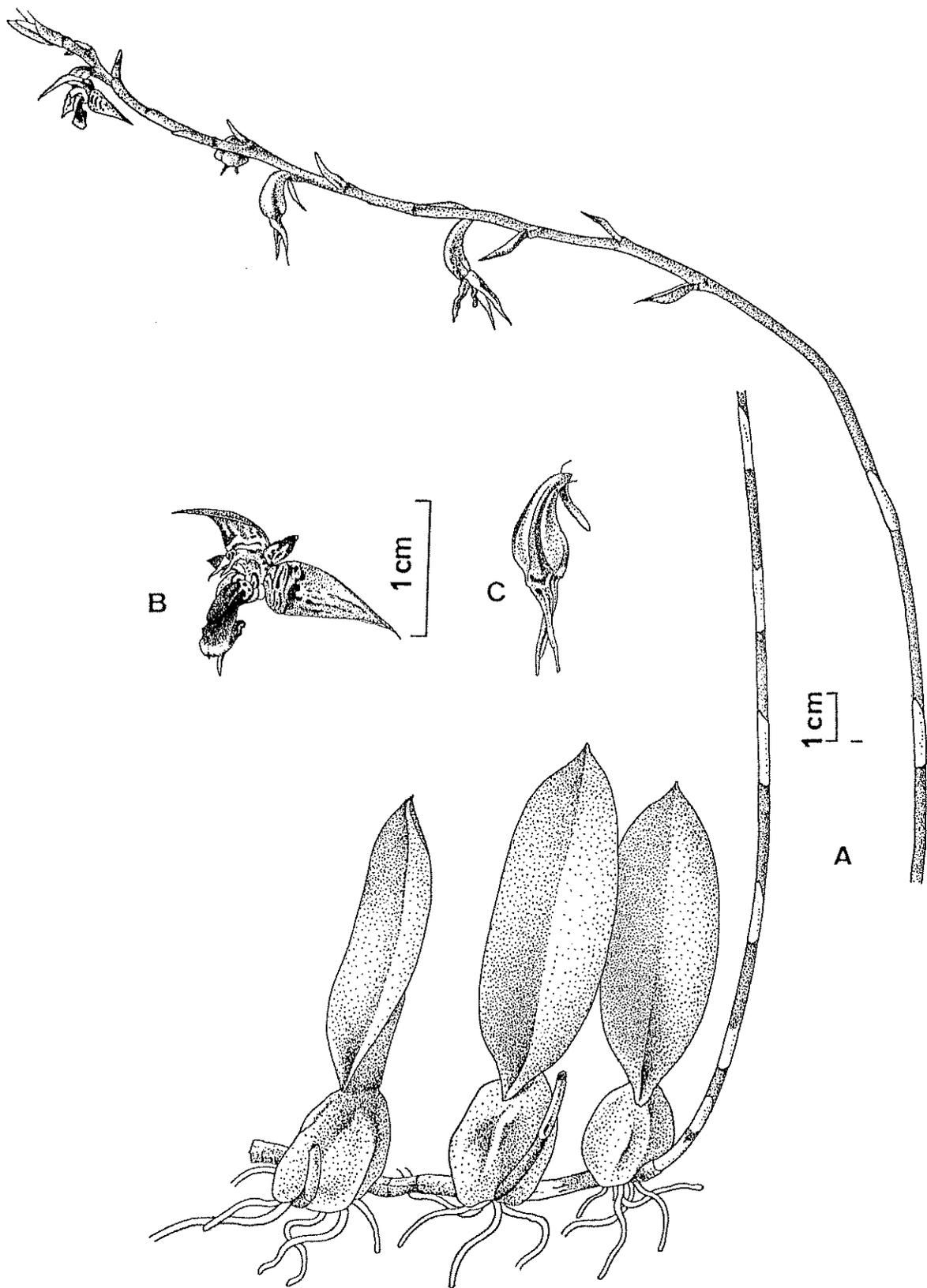


Figura 1- *Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & F. Barros. A- hábito e inflorescência. B- flor. C- fruto maduro em pré-deiscência.

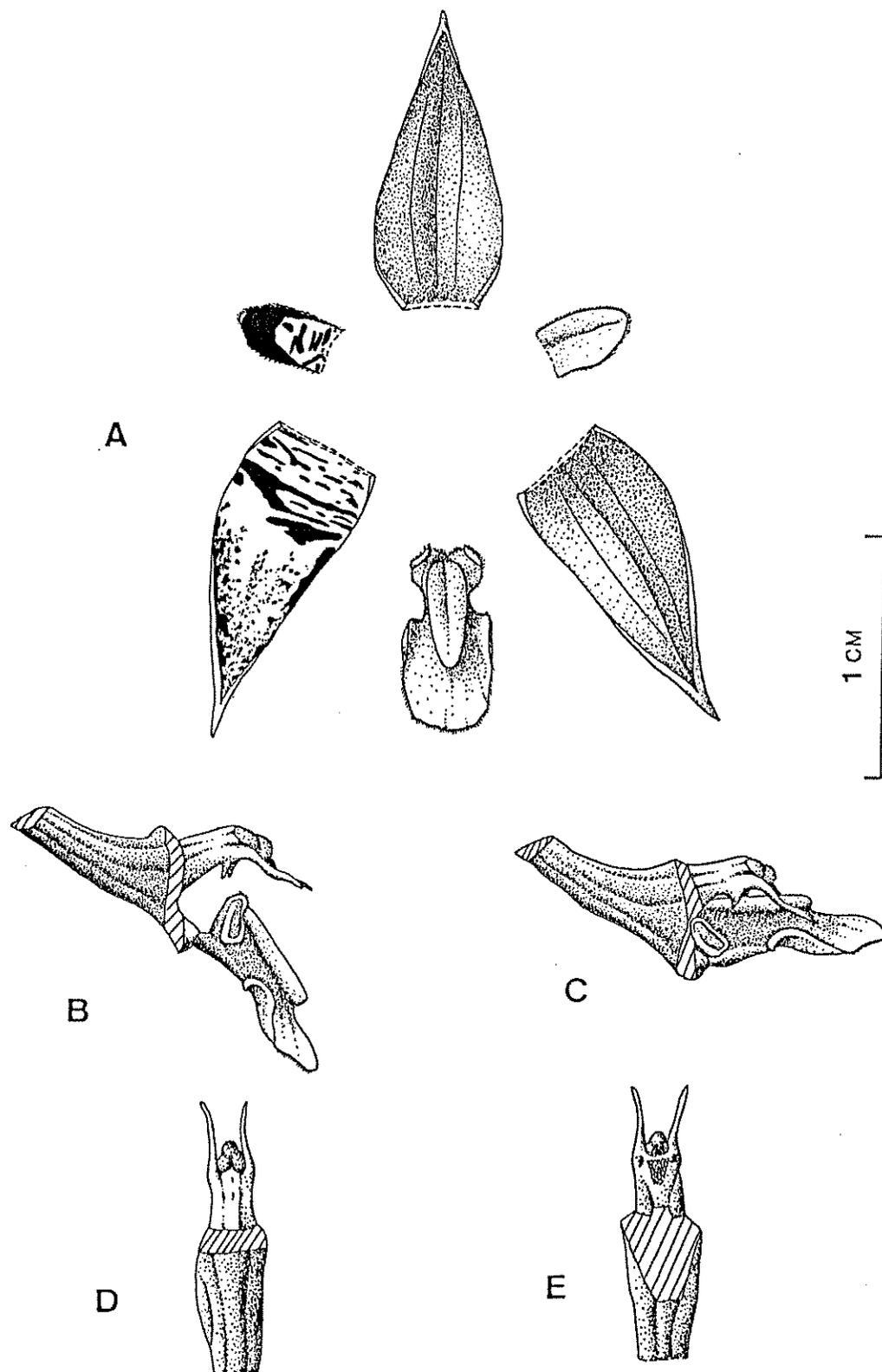


Figura 2- *Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & F. Barros. A- peças do perianto; pétala e sépala esquerda mostrando o padrão de coloração das manchas e pontos púrpuros. B- ovário, coluna e labelo em vista lateral; posição normal. C- ovário, coluna e labelo em vista lateral; labelo contra a coluna pela ação do vento. D- ovário e coluna em vista superior. E- ovário e coluna em vista inferior.

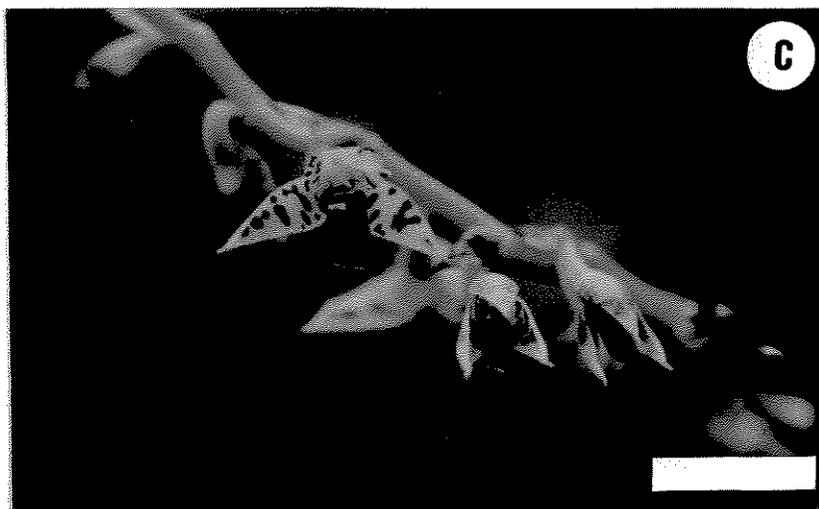


Figura 3- Flores de *Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & F. Barros (A), *B. warmingianum* Cogn. (B) e *B. ipanemense* Hoehne (C). Barras de escala = 1,0cm

## DISCUSSÃO

No campo, *Bulbophyllum involutum* é facilmente reconhecido pela sua inflorescência púrpura (flores, brácteas, escapo e raque), sempre com apenas uma única flor em antese (Fig. 3a), enquanto *B. warmingianum* e *B. ipanemense* (Fig. 3b-c) têm inflorescências verdes ou amarelo-esverdeadas, com três a cinco flores simultaneamente em antese, como pode ser observado nas pranchas coloridas das descrições destas espécies (Warming, 1883; Hoehne, 1938). Estas características também auxiliam no reconhecimento *B. involutum* em material de herbário, uma vez que a coloração púrpura permanece nas sépalas escapo e brácteas.

Em relação ao labelo, *B. involutum* aproxima-se muito de *B. warmingianum*, enquanto *B. ipanemense* tem um lobo mediano muito convexo com a base atenuada. A forma das pétalas, ovada com ápice obtuso, é muito peculiar em comparação às das outras duas espécies, as quais são sempre triangulares com ápice agudo.

Estudos de biologia floral desenvolvidos no campo e em casa de vegetação (CAPÍTULO 1) suportam o estabelecimento de *B. involutum* como espécie separada, ocorrendo uma que especificidade de polinizadores, pelo menos entre esta espécie e *B. ipanemense*. Investigações preliminares mostraram que isto pode ser devido a uma diferente composição dos compostos voláteis responsáveis pelos odores ocorrendo nas espécies, os quais certamente desempenham um importante papel na atração dos polinizadores (U. Flores et al., dados não publicados).

A presença de apenas uma flor em antese é uma característica muito uniforme entre as populações estudadas, verificada em todos indivíduos examinados desta espécie (> 150). Isto também afeta o tipo e a taxa de reprodução sexuada quando comparada com *B. ipanemense*, a outra espécie estudada neste aspecto. Por outro lado, *B. warmingianum* e *B. ipanemense* sempre apresentam três a cinco flores em antese simultânea.

Como as outras espécies de *Bulbophyllum*, *B. involutum* possui um labelo extremamente móvel, o qual é facilmente lançado pelo vento contra a coluna, e nesta espécie esta ação do vento desempenha um papel essencial na polinização (Sazima, 1978, identificado como *B. warmingianum*; CAPÍTULO 1).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Cogniaux, A. 1902. Orchidaceae. Pp. 1-664 in C. F. P. Martius & A. G. Eichler, eds., **Flora Brasiliensis, Vol. 3(5)**. Frid. Fleischer, Lipsiae.
- Dressler, R. L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Dioscorides Press, Portland.
- Hoehne, F. C. 1938. Cincoenta e uma novas espécies da flora do Brasil e outras descrições e ilustrações. **Arq. bot. Est. S. Paulo** 1(1): 1-38.
- Pabst, G. F. J. & Dungs, F. 1975. **Orchidaceae Brasiliensis, Vol. 1**. Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Pabst, G. F. J. & Dungs, F. 1977. **Orchidaceae Brasiliensis, Vol. 2**. Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Sazima, M. 1978. Polinização por moscas em *Bulbophyllum warmingianum* Cogn. (Orchidaceae), na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. **Rev. brasil. Bot.** 1: 133-138.
- Warming, E. 1883. **Symbolae ad floram Brasiliae centralis cognoscendam, Vol. 29**. Bianco Luno, Copenhagen.

## CAPÍTULO 5

***Bulbophyllum xcipoense* Borba & Semir (Orchidaceae), novo híbrido natural dos campos rupestres brasileiros: descrição e biologia.**

...as always in biology, one must be prepared for exceptions, for special adaptations, for "nature's playfulness" - things so often falsely regarded as unimportant curiosities of life, which nevertheless were and are of great elementary importance in the process of evolution.

*Friedrich G. Barth, "Insects and flowers: the biology of a partnership", 1985.*

<b>CONTEÚDO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>RESUMO</b>	<b>102</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>103</b>
<b>METODOLOGIA</b>	<b>104</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>105</b>
<b>Tabelas</b>	<b>109</b>
<b>Figuras</b>	<b>110</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>119</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>122</b>

## **RESUMO**

*Bulbophyllum xcipoense* Borba & Semir, um híbrido natural entre *B. weddellii* (Lindl.) Rchb. f. e *B. involutum* Borba, Semir & F.Barros, ocorrente na Serra do Cipó, estado de Minas Gerais, é descrito e ilustrado e sua biologia reprodutiva estudada. As duas espécies parentais são simpátricas, possuem eventos fenológicos sincronizados, compartilham os mesmos polinizadores e são intercompatíveis. Uma série de barreiras fracas entre estas duas espécies, que quando somadas fornecem um forte isolamento, contribui para a extrema raridade do híbrido e conseqüentemente para a manutenção do status destas espécies. O híbrido atrai os mesmos polinizadores dos parentais e se localiza dentro da população de *B. weddellii*, o que pode causar introgressão. Porém, o híbrido possui um alto grau de esterilidade ou autoincompatibilidade e características do labelo fazem com que a polinização seja ineficiente. As possíveis conseqüências deste evento de hibridização nas espécies parentais e no estabelecimento de uma nova espécie são discutidas.

## INTRODUÇÃO

Hibridização é um evento muito comum em vários grupos vegetais (Arnold, 1994; Bernardello et al., 1995; Rieseberg, 1995; Smith et al., 1996; Weiblen & Brehm, 1996), inclusive nas Orchidaceae (Pijl & Dodson, 1966; Sundermann, 1977; Schrenk, 1978, 1984; Romero & Carnevali, 1990, 1991a, 1991b, 1992). Apesar de alguns autores afirmarem que hibridização não possui significado evolutivo, muitos trabalhos têm mostrado que ela é um fator muito importante na evolução das plantas, principalmente como uma forma rápida de formação de espécies ou de conferir adaptabilidade a espécies pré-existentes através de introgressão (Pijl & Dodson, 1966; Schrenk, 1978; Klier et al., 1991; Arnold, 1994; Smith et al., 1996).

Os fatores que possibilitam o isolamento reprodutivo entre espécies podem ser separados em basicamente dois grupos: mecanismos pré-polinização e pós-polinização. Compatibilidade genética entre espécies próximas ou mesmo entre gêneros estreitamente relacionados é a regra em orquídeas, apesar de existirem várias exceções (Sanford, 1964, 1967; Johansen, 1990; Dressler, 1993). Assim, nas Orchidaceae mecanismos pré-polinização são os principais fatores que evitam a hibridização das espécies, tais como especificidade de polinizadores e presença de barreiras mecânicas nas flores (Dodson, 1962; Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1968, 1981; Paulus & Gack, 1990). Como várias espécies de orquídeas se diferenciam muito rapidamente, com poucas mudanças a nível cromossômico ocorrendo e não afetando a compatibilidade entre elas, uma vez que estas barreiras pré-polinização são quebradas, a formação de híbridos acaba frequentemente ocorrendo (Dodson, 1962; Pijl & Dodson, 1966; Linder, 1990; Romero & Carnevali, 1990, 1991a, 1991b, 1992; Rossi et al., 1992; Steiner et al., 1994).

*Bulbophyllum weddellii* (Lindl.) Rchb. f. e *B. involutum* Borba, Semir & F. Barros (inéd.) são espécies de ocorrência nos campos rupestres ao longo da Cadeia do Espinhaço, algumas vezes simpatricamente. Estas espécies são intercompatíveis, possuem eventos fenológicos sincronizados e compartilham as mesmas espécies de polinizadores (CAPÍTULOS 1, 3). Durante a realização de um estudo de biologia reprodutiva destas duas espécies na Serra do Cipó, Santana do Riacho-MG, um indivíduo apresentando características intermediárias a elas foi encontrado crescendo junto a indivíduos de *B. weddellii*. Estudos revelaram ser este indivíduo um híbrido natural entre estas duas espécies, não reportado anteriormente. Desta maneira, este trabalho é apresentada uma descrição e dados sobre a biologia reprodutiva deste híbrido, e são discutidas as possíveis consequências deste evento na evolução do grupo.

## METODOLOGIA

Este estudo foi realizado nos campos rupestres da Serra do Cipó, município de Santana do Riacho, estado de Minas Gerais. O híbrido foi encontrado crescendo sobre rochas de quartzito junto à uma população de *B. weddellii* (19°14'50"S; 43°30'40"W; ca. 1400m alt.), distante cerca de 10km da população de *B. involutum* anteriormente estudada (19°19'30"S; 43°33'50"W). O clima do local é do tipo Cwb na classificação de Köepen, mesotérmico com verões brandos e estação chuvosa no verão, estação seca de 3 a 4 meses no inverno e período úmido de 7 a 8 meses. Estas áreas possuem vegetação aberta e de baixo porte, dominada por espécies herbáceas crescendo em solo areno-pedregoso, e espécies herbáceas e arbustivas crescendo sobre afloramentos rochosos de quartzito.

O indivíduo foi comparado morfológicamente com indivíduos de *B. weddellii* e *B. involutum* destas populações, sendo traçado um quadro comparativo com as principais características intermediárias. Também foi comparado com material do gênero dos herbários BHCB, ESA, HB, RB, SP, SPF, UEC, UFU.

A frequência de floração dos "ramets" do híbrido nos últimos cinco anos (1992-1996) foi estimada através do exame da presença de eixos de inflorescência nos últimos pseudobulbos. Isto foi possível uma vez que o indivíduo cresce pela emissão de um novo pseudobulbo a cada ano e os eixos das inflorescências persistem secos na planta por vários anos. A fenologia do indivíduo foi acompanhada mensalmente de janeiro a julho de 1996.

Foram realizadas observações de visitantes florais nos dias 24-26/março de 1996, sempre entre 7:30 e 17:00 horas, totalizando 20,5 horas. As flores eram examinadas no início da manhã para verificar indiretamente a ocorrência de polinização no período noturno, uma vez que não foram feitas observações neste horário. Neste período de observação, a cada intervalo de uma hora foram tomadas medidas de temperatura e umidade relativa do ar, utilizando higrômetro seco/úmido, e velocidade do ar, através de anemômetro de palhetas Veb Anemometerbau Dresden. Observações suplementares foram realizadas em um indivíduo propagado clonalmente e cultivado a oito meses em casa de vegetação do Departamento de Botânica da Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

Foram realizadas autopolinizações em quatro flores, sendo uma delas no campo e as outras três no indivíduo cultivado em casa de vegetação. O número de flores disponíveis não permitiu um maior número de autopolinizações experimentais, nem a realização de retrocruzamentos com as espécies parentais. O fruto desenvolvido teve suas sementes removidas na época da deiscência e colocadas em uma solução de cloreto de 2, 3, 5-trifeniltetrazólio a 1% por 24 horas, que reage com a desidrogenase presente em células vivas formando uma coloração vermelha. Foi examinada em microscópio uma amostra de 300 sementes deste fruto para verificar a viabilidade das sementes.

Sementes sem embrião, com embrião rudimentar ou que não apresentou-se corado de vermelho foram consideradas inviáveis. Flores destes cruzamentos que não desenvolveram frutos e o fruto quando maduro foram fixados em Carnoy por 24 horas e transferidos para álcool 70%. Posteriormente foram tratados com NaOH 10N a 60°C e lavados em água destilada. Em seguida foram corados com azul de anilina e examinados em microscópio de epifluorescência para observação de crescimento de tubos polínicos e fertilização dos óvulos (Dafni, 1992; modificado). Polinários de quatro flores foram colocados para germinar em solução de sacarose a 10% por cerca de 50 horas. Posteriormente foram fixados em FAA 70%, corados com carmim acético e examinados em microscópio.

Material testemunho das espécies foi depositado no herbário UEC (*B. weddellii*, E.L. Borba 151; *B. involutum*, E.L. Borba 150; *B. xcipoense*, E. L. Borba 200).

## RESULTADOS

### Morfologia

*Bulbophyllum xcipoense* Borba & Semir, nothosp. nov. Typus: Brasil. Minas Gerais: Santana do Riacho, Parque Nacional da Serra do Cipó, Alto Palácio, 19°14'50"S, 43°30'40"W, ca. 1400m alt., jul. 1996 (fl) **E. L. Borba 200** (holótipo, UEC). Fig. 1-3.

Planta inter *B. weddellii* (Lindl.)Rchb. f. et *B. involutum* Borba, Semir & F. Barros intermedia et verisimiliter ex hybridatione harum specierum orta, inflorescentia nutante, magnitudine floris et aliis characteribus inter parentes media.

Erva rupícola. Raízes filiformes, fasciculadas, longas. Rizoma 13-28mm comp. entre os pseudobulbos, 6-8mm diâm., repente, coberto com bainhas paleáceas. Pseudobulbos 36-42x25-27mm, eretos, ovóides, tetrágonos, amarelados, monófilos. Folhas 49-71x24-32mm, sésseis, ereto-patentes, rígidas, coriáceas a levemente carnosas, elíptico-oblongas a oblongas, verdes, ápice agudo-apiculado, base atenuada e canaliculada. Inflorescência basal; escapo 26-43cm comp., 2-3mm diâm., ereto, rígido, purpúreo, com 8-10 brácteas, 11-15mm comp., púrpuras, posteriormente se tornando paleáceas, ápice obtuso; racemo 15-20cm comp., 15-19 flores, laxo, 1-2 flores em antese simultânea, raque púrpura, nutante. Brácteas florais 8-9x2-3mm, ovadas, persistentes, púrpuras quando novas se tornando paleáceas na antese, ápice obtuso. Pedicelos 1,5-2,7mm comp. Flores na metade proximal da raque (ascendente) ressupinadas por torção do pedicelo, na metade distal (descendente) ressupinadas devido ao curvamento da raque. Sépalas coriáceas, oval-

lanceoladas, pouco falcadas, côncavas, ápice agudo, naviculadas, face dorsal púrpura, face ventral amarelo-esverdeada com manchas e pontuações púrpuras na base; sépala dorsal 11,4-13,5x4,0-4,6mm, ereta; sépalas laterais 12,0-14,5x4,2-4,5mm, patentes, oblíquas. Pétalas 3,8-4,0x1,6-1,8mm, membranáceas, oval-lanceoladas, patentes, pouco falcadas, brancas com manchas púrpuras, ápice agudo, margem ciliada. Labelo 8,9-9,0x2,9-3,4mm, carnoso, pendente em ângulo de aproximadamente 70° com a coluna, articulado com o pé da coluna; lobos laterais eretos, auriculares, ciliados, atropurpúreos com pontuações brancas; lobo central membranáceo, purpúreo com terço distal e margens laterais brancas com manchas púrpuras, base obtusa, ápice obtuso, margens laterais levemente crenadas, ciliadas; calo atropurpúreo, oblongo com metade proximal sulcada. Coluna 3,3-4,0mm comp., branca com pontuações púrpuras, com dois braços longos, sinuosos ou estelídia e dois dentes falcados na face ventral; antera versátil, amarelada, papilosa, dois pares de políneas; ovário 3,5-5mm comp., obcônico, purpúreo, sulcado. Fruto cápsula, 11,7x6,3mm.

Em vários afloramentos rochosos visitados na Serra do Cipó, foi encontrado apenas um indivíduo ("genet") com sete "ramets", sendo que entre alguns deles ainda ocorre uma conexão morfológica, apesar de já estarem fisiologicamente isolados. Apesar da semelhança morfológica dos órgãos vegetativos, quando não estão florescendo os três taxa podem ser diferenciados pelo eixo persistente da inflorescência, que é nutante em *B. xcipoense*, genuflexa em *B. weddellii* e curvada em *B. involutum*.

Nos materiais de herbário examinados não foi encontrado nenhum espécime que poderia ser identificado como semelhante à *B. xcipoense*. À primeira vista, *B. xcipoense* se assemelha bastante à *B. involutum*, principalmente devido à predominância da coloração púrpura (Fig. 4), e possivelmente poderia passar despercebido caso ocorresse dentro da população desta espécie. Porém, o material de herbário de *B. involutum* examinado revela que *B. xcipoense* não poderia se enquadrar na variação desta espécie. A Tabela 1 apresenta um quadro comparativo entre *B. xcipoense* e as espécies parentais propostas, *B. weddellii* e *B. involutum*. As características intermediárias que mais chamam a atenção entre os taxa são a forma do eixo da inflorescência, forma, tamanho e cor das sépalas, pétalas e labelo, e tipo de ressupinamento da flor (Fig. 1-6).

## Fenologia

Os sete "ramets" do indivíduo de *B. xcipoense* apresentam uma frequência de floração baixa. Nos últimos três anos apenas 3 ou 4 floresceram, sendo que nos dois anos anteriores nenhuma floração ocorreu (Fig. 7A). Durante este período, cada "ramet" floresceu no máximo 3 vezes, enquanto dois deles não floresceram nenhuma vez (Fig. 7B).

A emissão de novos pseudobulbos ocorre anualmente a partir de agosto, com o surgimento das inflorescências em janeiro do ano seguinte. Dos três "ramets" que produziram inflorescências, um foi coletado para cultivo e posteriormente ser incorporado no herbário. Uma das inflorescências foi cortada por herbívoros ainda quando jovem, de forma que apenas um "ramet" chegou a florescer na natureza. A antese da primeira flor ocorreu em março, com a floração se estendendo até o final de maio. Das 19 flores produzidas por esta inflorescência, nenhum fruto foi naturalmente formado (uma das flores foi autopolinizada experimentalmente).

## **Biologia reprodutiva**

### ***Biologia floral***

No local de ocorrência de *B. xcipoense* a temperatura aumentou ao longo do dia, ultrapassando os 25°C por volta das 9:30 horas e atingindo o máximo diário entre 12 e 14 horas, decrescendo a partir deste horário (Fig. 8A). A umidade relativa do ar diminuiu ao longo do dia, passando a assumir valores inferiores a 50% por volta das 12 horas. A partir das 14 horas ela sobe repentinamente, ocorrendo frequentes chuvas no final da tarde. Ao longo de todo o dia, brisas e ventos leves entre 0,5 e 3m/s foram frequentes, principalmente no início da manhã e entre 11 e 13 horas (Fig. 8B).

A antese das flores de *B. xcipoense* ocorre por volta das 7 horas, com a liberação de um odor cítrico levemente adocicado, se assemelhando ao de *B. weddellii*, perceptível a partir das 10 horas, que vai se tornando menos intenso a partir das 15 horas. Na base do labelo acumula-se uma pequena quantidade de néctar. No início da manhã do terceiro dia as sépalas se fecham e a flor fenesce, permanecendo então disponíveis cerca de 48 horas. Após o fenescimento de uma flor, pode levar de 1 a 4 dias para ocorrer a antese de outra flor, ou menos frequentemente existir duas flores disponíveis em uma mesma inflorescência, o que nunca ocorre em *B. involutum*.

Os únicos visitantes observados em flores de *B. xcipoense* no campo foram pequenas moscas ( $2,4 \pm 0,1 \times 1,1 \pm 0,1$ mm) do gênero *Pholeomyia* (Milichiidae), pertencentes à mesma espécie do principal polinizador de *B. weddellii* (*Pholeomyia* sp.3; CAPÍTULO 1). No indivíduo cultivado, três espécies de *Pholeomyia*, também polinizadores de *B. weddellii* e *B. involutum* (*Pholeomyia* sp.2, sp.3, sp.4; CAPÍTULO 1), visitaram flores de *B. xcipoense*.

As visitas de *Pholeomyia* sp. ocorrem praticamente apenas no primeiro dia de antese, iniciando-se por volta das 9 horas, quando a temperatura se eleva acima dos 25°C, e se estende até as 16 horas (Fig. 8C-D). O período de maior frequência de visitas ocorreu entre 10 e 13 horas, horário onde foi percebida ser mais intensa a emissão de odores. Durante as 20,5 horas de observações, foram registradas 29 visitas destes Diptera às flores de *B. xcipoense*. Durante todo o

dia ocorreram aproximações de *Pholeomyia* sp. às flores através de sobrevôos de vários segundos, sem contudo pousarem nelas.

*Pholeomyia* sp. aproxima-se das flores através de vôos erráticos, podendo ficar sobrevoando a flor por vários segundos e depois pousando no ápice do labelo ou nas sépalas laterais. Apenas um indivíduo dirigiu-se à base do labelo para se alimentar, permanecendo nesta atividade por cerca de 5 minutos. Todas as outras visitas tiveram duração abaixo de um minuto, na maioria das vezes de apenas 1 a 5 segundos. O espaço entre o dorso do tórax do inseto e a coluna é intermediário ao encontrado em *B. weddellii* e *B. involutum*. Como nestas duas espécies, o vento é necessário para que ocorra a polinização, levantando o labelo e forçando a mosca contra a coluna. Em *B. xcipoense*, são necessários ventos de cerca de 2,0m/s para que isto aconteça. Porém, ventos com esta velocidade normalmente espantam os visitantes por balançarem fortemente a inflorescência. Desta forma, não pode ser observada remoção nem deposição de políneas nas flores de *B. xcipoense*.

### **Autopolinizações experimentais**

*Bulbophyllum xcipoense* é aparentemente autoincompatível ou estéril. Nenhuma das três flores autopolinizadas do indivíduo cultivado em casa de vegetação desenvolveu frutos, fenecendo após 8 a 21 dias. O exame ao microscópio revelou que os grãos de pólen germinaram completamente, com os tubos crescendo normalmente até aproximadamente metade do canal estilar em duas das flores. A partir daí, todos eles se tornam irregulares, tomados de calose e com o ápice dilatado, que acaba se estourado (Fig. 9). Na outra flor a mesma reação ocorreu, porém ainda na cavidade estigmática, antes da penetração no canal estilar.

A flor autopolinizada no campo desenvolveu fruto que levou 109 dias para amadurecer. Nenhuma das sementes se apresentou viável, não possuindo embrião ou com embrião rudimentar e que não reagiu com o tetrazólio. Estas sementes desenvolveram-se em apenas duas placentas. Nestas, puderam ser observadas fertilizações, e os tubos polínicos estavam aparentemente normais. Na outra placenta os óvulos estavam pouco desenvolvidos e não foram observados tubos polínicos.

### **Germinação de pólen in vitro**

Dos quatro polinários colocados em solução de sacarose, apenas um teve seus grãos de pólen germinados em grande quantidade. Em dois deles, raríssimos grãos de pólen germinaram. No outro não foi observada nenhuma germinação, e foram encontrados muitos grãos de pólen deformados e não formando tétrades (mônades e díades). Apesar disto, em todas os polinários, os grão de pólen mesmo não tendo germinado foram corados pelo carmim acético.

Tabela 1- Quadro comparativo de algumas características de *B. weddellii*, *B. involutum* e do híbrido natural entre estas espécies, *B. x cipoense*.

característica	<i>B. weddellii</i>	<i>B. xcipoense</i>	<i>B. involutum</i>
cor raque e brácteas	verde-claro	púrpura	púrpura
forma inflorescência	genuflexa	nutante	curvada
n° de flores em antese simultânea	> 10	1-2	1
ressupinamento da flor	curvamento da raque	curvamento da raque / torção do pedicelo	torção do pedicelo
ângulo labelo/coluna	90°	ca. 70°	45°
comp. labelo (mm)	11,8-14,7	8,9-9,0	6,0-8,1
forma base labelo	atenuada	obtusa	truncada a cordada
margem limbo labelo	plana	levemente crenada	involuta
cor limbo labelo	branco com manchas púrpuras	púrpuro / branco com manchas púrpuras	atropúrpuro com ápice branco
comp. sépala lateral (mm)	14,9-19,4	12,0-14,5	10,4-12,2
forma sépala lateral	oblongo-lanceolada falcada	oval-lanceolada falcada	oval-triangular
cor face adaxial sépalas	amarela com manchas púrpuras na base	amarelo-esverdeada com manchas púrpuras na base	verde com manchas púrpuras
largura pétala (mm)	0,4-0,7	1,6-1,8	2,0-3,1
forma pétala	linear falcada	oval-lanceolada levemente falcada	ovada
ápice pétala	agudo	agudo	obtuso

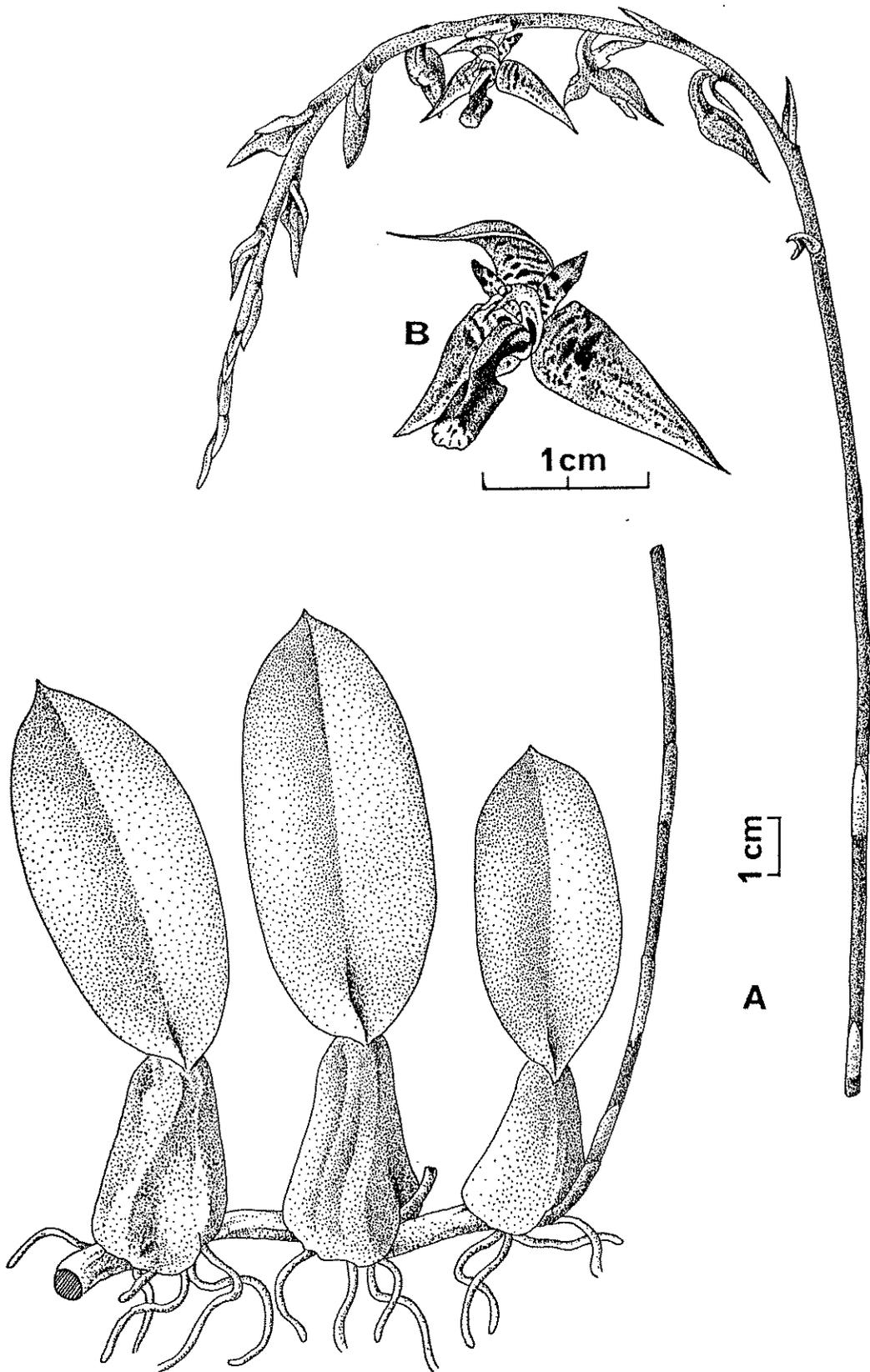


Figura 1- *Bulbophyllum xcipoense* Borba & Semir. A- Hábito e inflorescência. B- Flor.

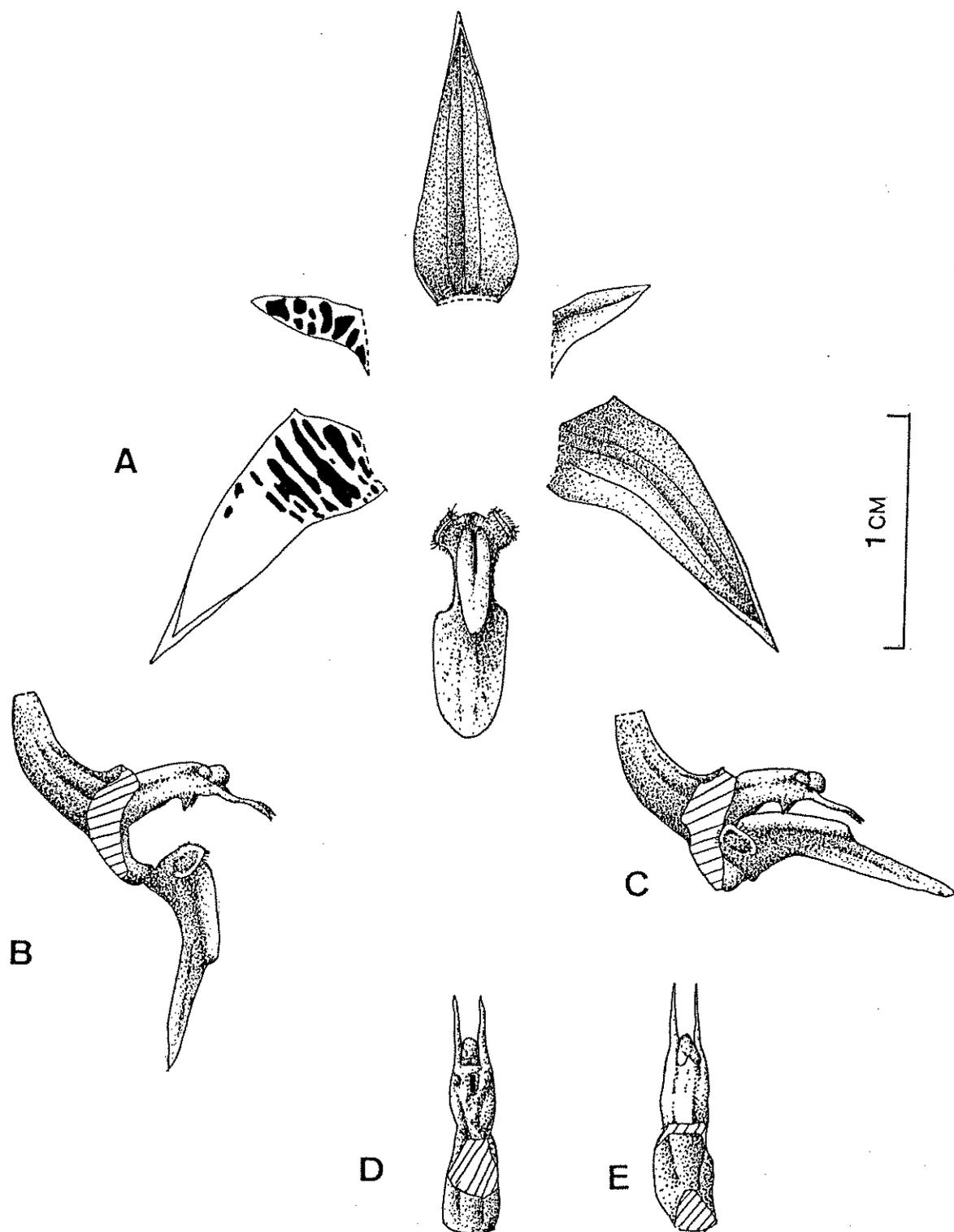


Figura 2- *Bulbophyllum xcipoense* Borba & Semir. A- peças do perianto; pétala e sépala esquerda mostrando o padrão de coloração das manchas e pontos púrpuros. B- ovário, coluna e labelo em vista lateral; posição normal. C- ovário, coluna e labelo em vista lateral; labelo contra a coluna pela ação do vento. D- ovário e coluna em vista inferior. E- ovário e coluna em vista superior.

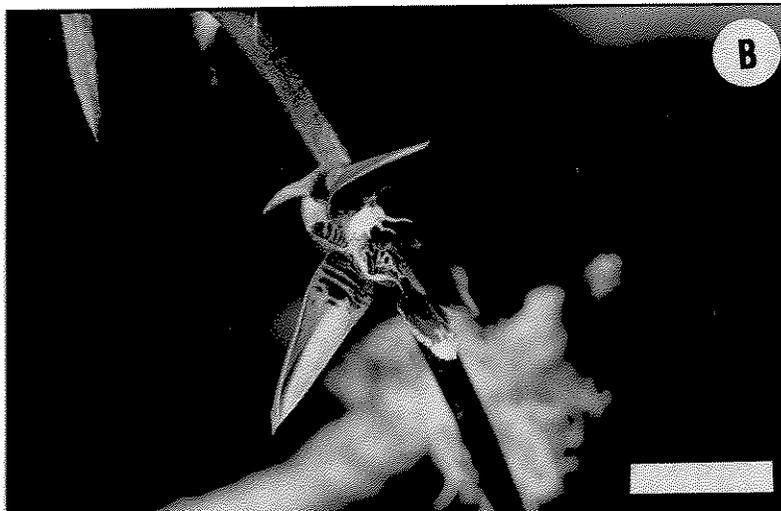


Figura 3- *Bulbophyllum xcipoense* Borba & Semir. A- Inflorescência. B- Flor. Barras de escala = 2,5cm (A) e 1,0cm (B).



Figura 4- Inflorescência de *B. involutum* (A) e *B. weddellii* (B). Barras de escala = 2,0cm.

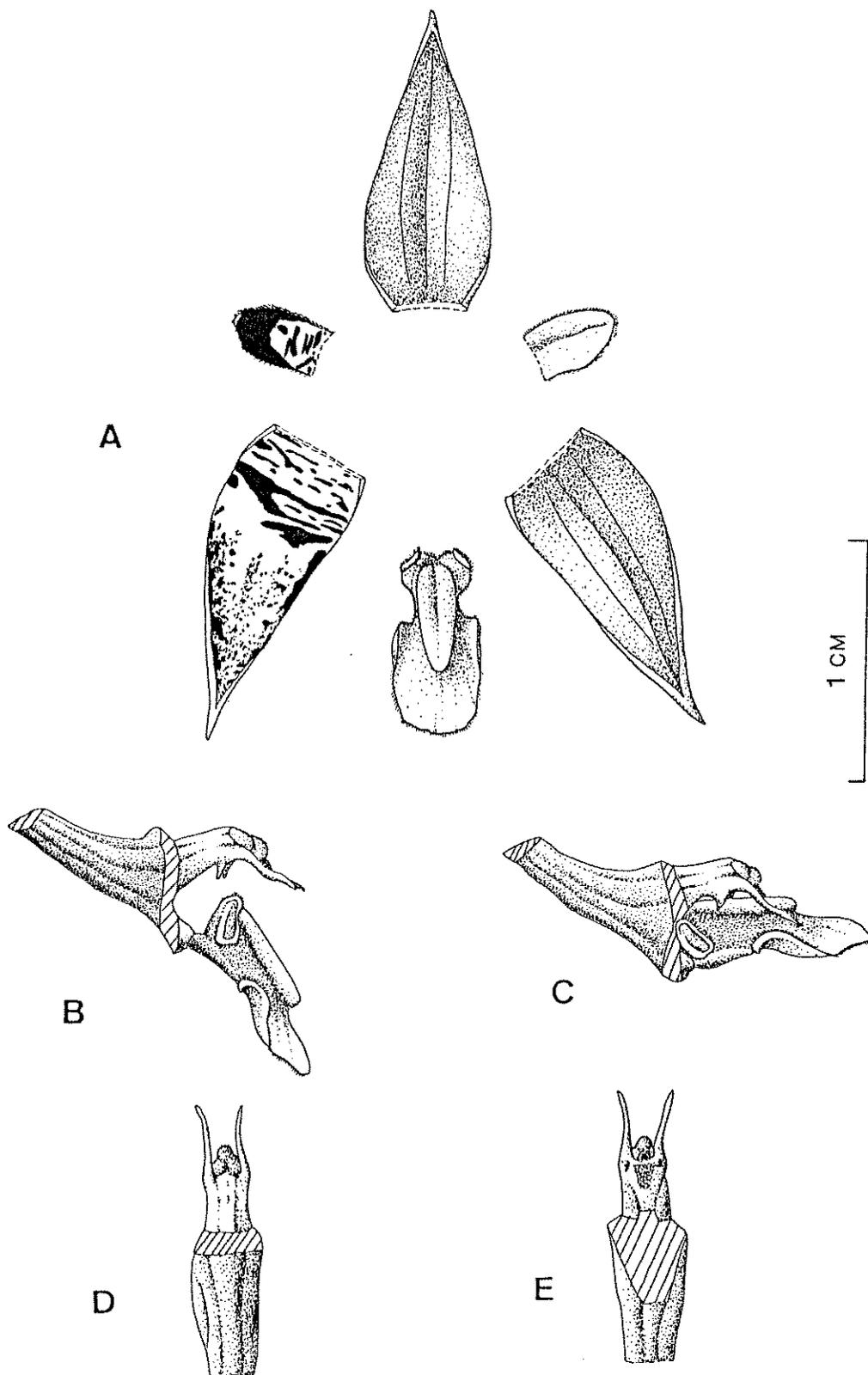


Figura 5- *B. involutum*. A- peças do perianto; pétala e sépala esquerda mostrando o padrão de coloração das manchas e pontos púrpuros. B- ovário, coluna e labelo em vista lateral; posição normal. C- ovário, coluna e labelo em vista lateral; labelo contra a coluna pela ação do vento. D- ovário e coluna em vista superior. E- ovário e coluna em vista inferior.

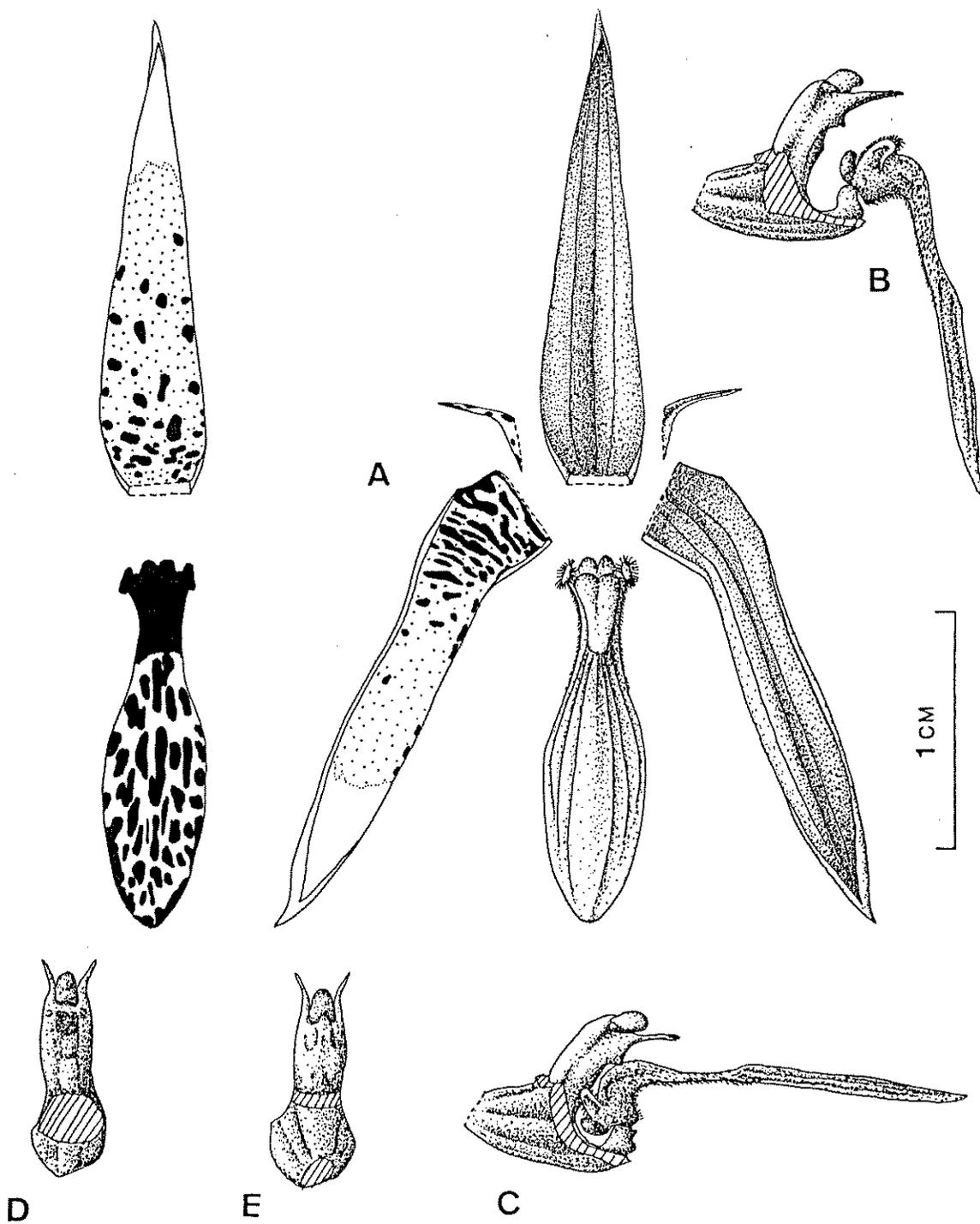


Figura 6- *B. weddellii*. A- peças do perianto; pétala e sépala esquerda mostrando o padrão de coloração das manchas e pontos púrpuros. B- ovário, coluna e labelo em vista lateral; posição normal. C- ovário, coluna e labelo em vista lateral; labelo contra a coluna pela ação do vento. D- ovário e coluna em vista inferior. E- ovário e coluna em vista superior.

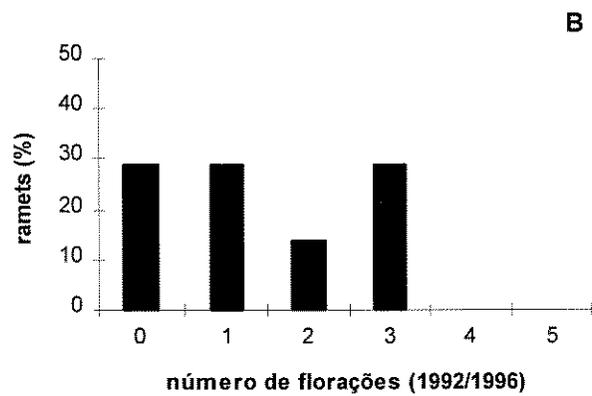
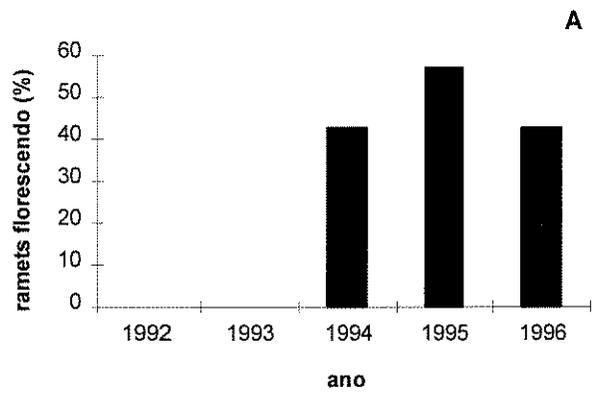


Figura 7- Percentual de “ramets” (n=7) de *B. xcipoense* florescendo (A) e número de florações por indivíduo (B) nos anos de 1992 a 1996.

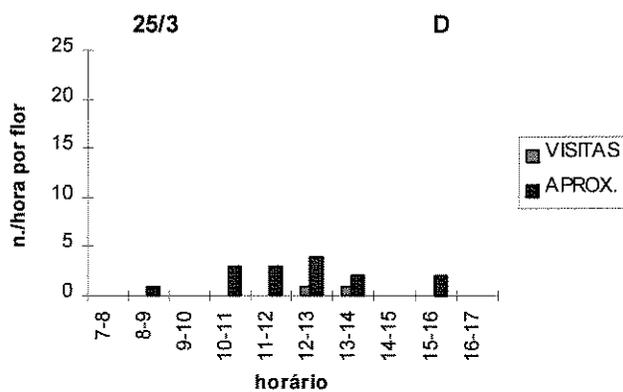
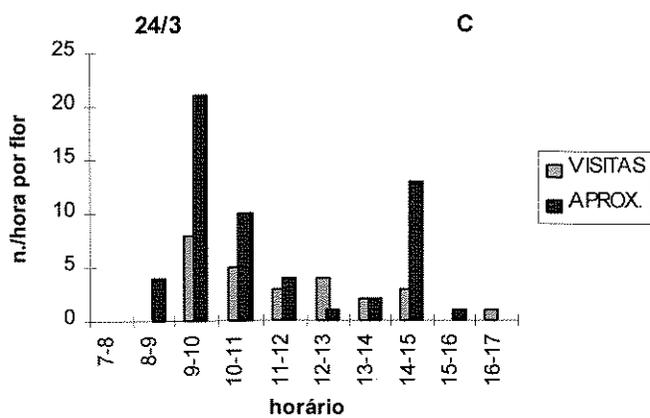
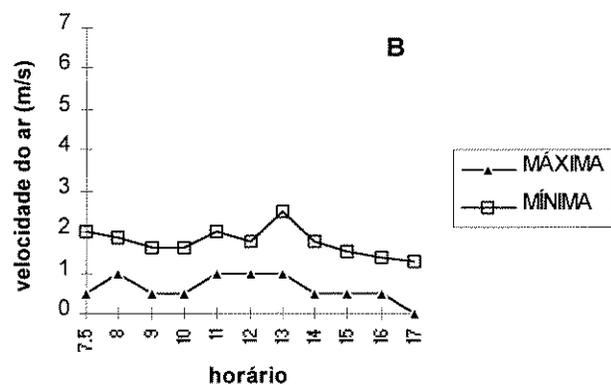
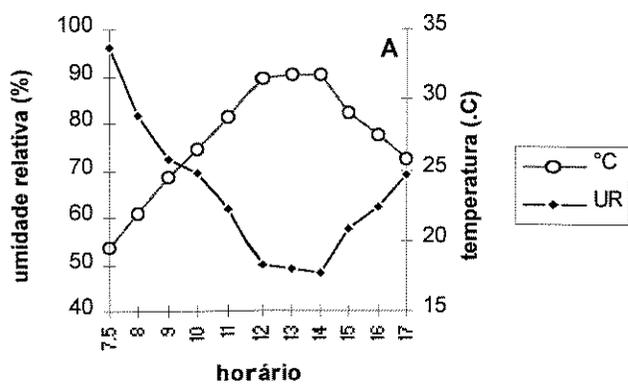


Figura 8- Dados médios de temperatura e umidade relativa do ar (A) e de velocidade do ar máxima e mínima (B) no local de ocorrência de *B. xcipoense* durante o período de observação de visitantes. Frequência de visitas e aproximações sem pouso por hora por flor nos dias 24/3 (C) e 25/3 (D) em *B. xcipoense* (mesma flor nos dois dias).

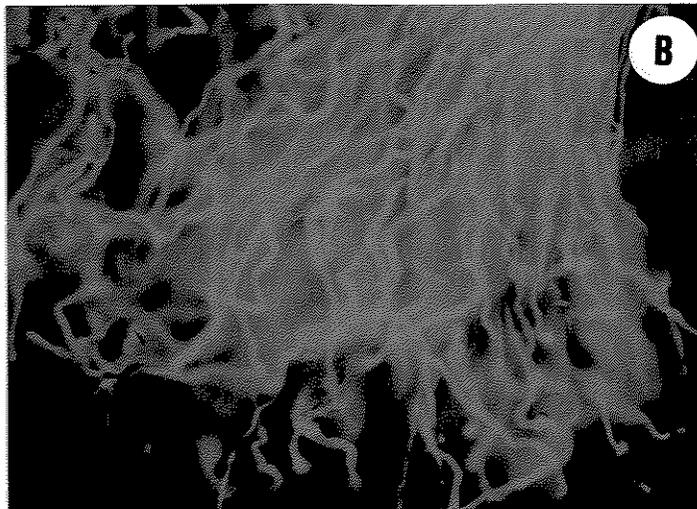
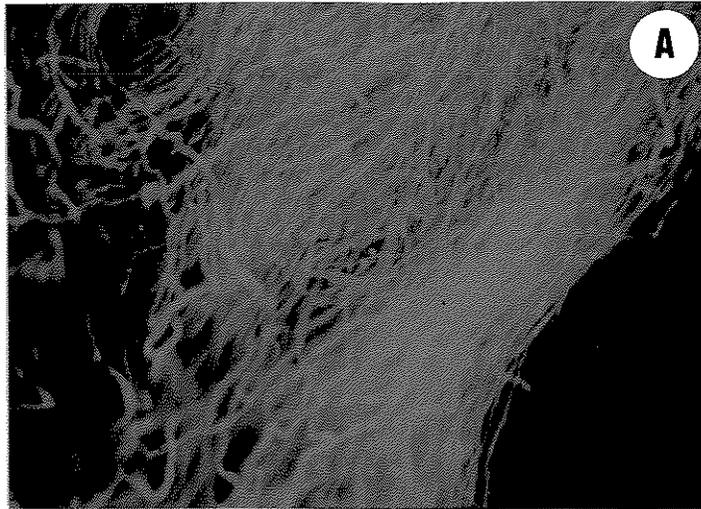


Figura 9- Tubos polínicos formados em autopolinização em *B. xipoense*. A- região normal dos tubos polínicos. B- mesma flor, com os tubos se tornando irregulares, tomados de calose e com ápice dilatado, na região do canal estilar.

## DISCUSSÃO

A ocorrência dentro da população de *B. weddellii*, a proximidade das populações, o compartilhamento de polinizadores com floração no mesmo período e compatibilidade genética entre *B. involutum* e *B. weddellii* (CAPÍTULOS 1, 3), além de morfologia intermediária, ocorrência de apenas um indivíduo e características da biologia (esterilidade) deixam poucas dúvidas que o indivíduo encontrado trata-se realmente de um híbrido F1 entre estas duas espécies. Uma vez que, devido ao tamanho, apenas o polinário de *B. involutum* pode ser depositado na cavidade estigmática de *B. weddellii* (CAPÍTULO 2) e *B. xcipoense* foi encontrado dentro da população de *B. weddellii*, é bastante plausível supor a direção do cruzamento que originou o híbrido, sendo *B. involutum* o doador de pólen.

Em orquídeas, barreiras pré-polinização, como separação temporal de floração, polinizadores específicos e diferenças estruturais na flor, são as mais importantes em conferir isolamento entre espécies (Dodson, 1962; Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1968, 1981; Paulus & Gack, 1990). Quando estas barreiras são inexistentes ou são quebradas, a formação de híbridos torna-se um evento comum, podendo ocorrer grandes populações de híbridos F1 (Pijl & Dodson, 1966; Sundermann, 1977; Schrenk, 1978; Romero & Carnevali, 1990, 1991a, 1991b, 1992). Mas quando estas barreiras pré-polinização são fortes, hibridização é inexistente ou acontece muito raramente (Linder, 1990; Rossi et al., 1992; Steiner et al., 1994).

Se não existem barreiras pré-polinização entre *B. weddellii* e *B. involutum*, e estas espécies são intercompatíveis, por quê híbridos entre elas são tão raros? Entre estas espécies não existe apenas um mecanismo de isolamento reprodutivo forte operando. Aparentemente, várias barreiras pré e pós-polinização que isoladamente são fracas, quando somadas tornam-se eficientes, formando um sistema de filtros que mantém a integridade entre estas espécies: os dois principais polinizadores destas espécies são os mesmos, mas em ordem hierárquica de frequência inversa, sendo que o principal polinizador de uma é o secundário de outra, e vice-versa (CAPÍTULO 1); o polinário de *B. weddellii* não passa através da cavidade estigmática das flores de *B. involutum*, apenas o contrário ocorre (CAPÍTULO 2); apesar de intercompatíveis, existe baixa fertilidade entre estas duas espécies (baixa congruência, senso Hogenboom, 1975; CAPÍTULO 3); híbrido autoincompatível ou estéril e com baixa adaptabilidade (polinização ineficiente). Mecanismos semelhantes, ocorrendo várias barreiras isoladamente deficientes, foram encontrados em outras Orchidaceae (Romero & Carnevali, 1991b), além de outras famílias (Weiblen & Brehm, 1996), e provavelmente são mais comuns do que se é estimado.

A baixa germinação de grãos de pólen *in vitro* e os problemas verificados com os tubos polínicos desenvolvidos nas autopolinizações e *in vitro* indicam a possibilidade deste híbrido possuir esterilidade masculina, talvez por problemas meióticos, o que poderia ser confirmado através de

estudos de citogenética. Contudo, segundo Pijl & Dodson (1966), com o grande número de óvulos e grãos de pólen por flor e ausência de endosperma nas sementes, as possibilidades de produção de ao menos algumas poucas sementes viáveis em um híbrido com elevado grau de esterilidade são altas em Orchidaceae. Os indivíduos de orquídeas usualmente vivem por um longo tempo, uma circunstância que fornece grandes chances de reprodução em indivíduos quase estéreis, principalmente se existe reprodução vegetativa, como em *B. xcipoense*. Desta forma, incompatibilidade e esterilidade de híbridos em orquídeas podem ser apenas termos relativos (Pijl & Dodson, 1966), e se estas barreiras à esterilidade iniciais são quebradas, completa fertilidade frequentemente é alcançada em gerações posteriores de híbridos (Rieseberg, 1995).

Porém, a baixa adaptabilidade de *B. xcipoense* em ter a sua polinização efetuada é um fator complicante para a reprodução deste híbrido. Esta baixa adaptabilidade parece advinda da herança intermediária de caracteres do labelo. Apesar de grandes diferenças no labelo de *B. weddellii*, que é longo com calo pequeno, e *B. involutum*, curto com calo grande, as duas espécies possuem exatamente o mesmo mecanismo de polinização, onde são necessários ventos com a mesma intensidade (CAPÍTULO 1). Isto torna-se possível devido ao diferente ângulo formado entre labelo e coluna. As flores de *B. xcipoense* possuem labelo longo com calo grande, o que aumenta o ângulo entre labelo e coluna e o torna extremamente pesado, necessitando de ventos mais fortes do que em *B. weddellii* e *B. involutum* para que a polinização ocorra. Porém, estes ventos mais fortes, que nas outras espécies espantam os polinizadores, fazem o mesmo em *B. xcipoense*, dificultando a polinização.

É muito frequente em orquídeas que os híbridos atraiam os mesmos polinizadores dos parentais (Romero & Carnevali, 1991a, 1991b). Caso estes híbridos então se estabeleçam dentro da população dos parentais, como ocorreu em *B. xcipoense*, introgressão acaba ocorrendo com frequência (Pijl & Dodson, 1966; Sundermann, 1977; Linder, 1990; Romero & Carnevali, 1990; Scacchi et al., 1990). Se por um lado isto pode impedir que estes híbridos sirvam como populações fundadoras para novas espécies, por outro lado Klier et al. (1991) mostraram que esta introgressão pode ter um significado adaptativo para as espécies parentais, ampliando o nicho ecológico delas.

A grande uniformidade fenotípica na população de *B. weddellii* não mostra indícios que introgressão esteja ocorrendo. Pijl & Dodson (1966) têm notado que apesar de hibridização entre espécies de um mesmo gênero em Orchidaceae ser um evento comum, efeitos nos parentais parecem ser limitados, indicando as dificuldades envolvidas em quebrar barreiras fisiológicas e ecológicas à hibridização. Isto pode levar à ocorrência de híbridos como apenas artefatos ocasionais encontrados raramente na natureza, não gerando consequências evolutivas nestes grupos e apenas causando confusão em taxonomistas quando incorporados em coleções limitadas de herbários (Pijl & Dodson, 1966; Sundermann, 1977; Schrenk, 1978), o que pode ser o caso de *B. xcipoense*. Por outro lado, como apontam Romero & Carnevali (1992), estudos de hibridização natural em

Orchidaceae podem ajudar a explicar padrões de variação morfológica em espécies com ampla distribuição geográfica (como *B. weddellii* e *B. involutum*), e então auxiliar a entender gêneros de orquídeas complexos e gerar novas idéias sobre ecologia e evolução da família.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnold, M. L. 1994. Natural hybridization and Louisiana irises: defining a major factor in plant evolution. **BioScience** 44(3): 141-147.
- Bernandello, L.; Rodriguez, I; Stiefkens, L. & Galetto, L. 1995. The hybrid nature of *Lycium ciliatum* x *cestroides* (Solanaceae): experimental, anatomical, and cytological evidence. **Can. J. Bot.** 73: 1995-2005.
- Dafni, A. 1992. **Pollination ecology: a practical approach**. Oxford University Press, Oxford.
- Dodson, C. H. 1962. The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America. **Am. Orchid Soc. Bull.** 31(7): 525-534, (8):641-649, (9): 731-735.
- Dressler, R. L. 1968. Observations on orchids and Euglossine bees in Panama and Costa Rica. **Rev. Biol. Trop.** 15(1): 143-183.
- Dressler, R. L. 1981. **The orchids: natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R. L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Dioscorides Press, Portland.
- Hogenboom, N. G. 1975. Incompatibility and incongruity: two different mechanisms for the non-functioning of intimate partner relationships. **Proc. R. Soc. Lond. B.** 188: 361-375.
- Johansen, B. 1990. Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 103: 165-196.
- Klier, K.; Leoschke, M. J. & Wendel, J. F. 1991. Hybridization and introgression in the white and yellow ladyslipper orchids (*Cypripedium candidum* and *Cypripedium pubescens*). **J. Hered.** 82(4): 305-318.
- Linder, H. P. 1990. Hybrids in *Disa* (Diseae-Orchidaceae). **Lindleyana** 5(4): 224-230.
- Paulus, H. F. & Gack, C. 1990. Pollination of *Ophrys* (Orchidaceae) in Cyprus. **Pl. Syst. Evol.** 169: 177-207.
- Pijl, L. van der & Dodson, C. H. 1966. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. University of Miami Press, Coral Gables.
- Rieseberg, L. H. 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. **Amer. J. Bot.** 82(7): 944-953.
- Romero, G. A. & Carnevali, G. 1990. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela - 1. *Catasetum* x *tapiriceps* Reichb. f. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 59(12): 1214-1220.

- Romero, G. A. & Carnevali, G. 1991a. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela - 2. *Catasetum* x *dunstervillei* G. Romero & Carnevali. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 60(2): 115-120.
- Romero, G. A. & Carnevali, G. 1991b. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela - 3. *Catasetum* x *roseo-album* (Hook) Lindley and *C. x wendlingeri* Foldats. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 60(8): 770-774.
- Romero, G. A. & Carnevali, G. 1992. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela IV: biology and nomenclature. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 61(4): 334-360.
- Rossi, W.; Arduino, P; Cianchi, R. & Bullini, L. 1992. A new natural hybrid in the genus *Orchis* L.: genetic data and description. **Lindleyana** 7(3): 121-126.
- Sanford, W. W. 1964. Sexual compatibility relationship in *Oncidium* and related genera. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 33 (12): 1035-1048.
- Sanford, W. W. 1967. Sexual compatibility relationship in *Oncidium* and related genera - part II. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 36 (2): 114-122.
- Scacchi, R.; De Angelis, G. & Lanzana, P. 1990. Allozyme variation among and within eleven *Orchis* species (fam. Orchidaceae), with special reference to hybridization aptitude. **Genetica** 81: 143-150.
- Schrenk, W. J. 1978. North American Platantheras: evolution in the making. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 47(5): 429-437.
- Schrenk, W. J. 1984. Natural hybrids unlimited - How certain is certain? **Amer. Orchid Soc. Bull.** 53(2): 130-143.
- Smith, J. F.; Burke, C. C. & Wagner, W. L. 1996. Interspecific hybridization in natural populations of *Cyrtandra* (Gesneriaceae) on the Hawaiian Islands: evidence from RAPD markers. **Pl. Syst. Evol.** 200(1): 61-77.
- Steiner, K. E.; Whitehead, V. B. & Johnson, S. D. 1994. Floral and pollinator divergence in two sexually deceptive South African orchids. **Amer. J. Bot.** 81(2): 185-194.
- Sundermann, H. 1977. The genus *Ophrys* - An example of the importance of isolation for speciation. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 46(9): 825-831.
- Weiblen, G. D. & Brehm, B. G. 1996. Reproductive strategies and barriers to hybridization between *Tellima grandiflora* and *Tolmeia menziesii* (Saxifrageae). **Amer. J. Bot.** 83(7): 910-918.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em 1981, Dressler declarou ser pequeno o conhecimento existente a respeito de especificidade entre moscas e orquídeas. Provavelmente devido à reputação dos Diptera como polinizadores ineficientes, caracterizados por falta de constância e comportamento casual (Pijl & Dodson, 1966; Faegri & Pijl, 1979; Bierzychudek, 1981; Chase, 1985; Christensen, 1994), o interesse devotado à miofilia em Orchidaceae tem sido escasso, sendo muito pouco acrescentado desde então. Os resultados aqui encontrados demonstram que relações muito interessantes podem ser encontradas entre estes insetos e orquídeas, formando uma área certamente muito promissora para estudos posteriores. Particularmente interessante é investigar a relação entre os Milichiidae e os *Bulbophyllum* neotropicais. Para isto, são necessários muitos estudos de caso não apenas nas espécies de *Bulbophyllum*, mas também nas espécies da subtribo Pleurothallidinae, assim como aumentar o número de estudos de polinização nas espécies asiáticas, africanas e da Oceania.

Mas o passo maior será dado com estudos de voláteis responsáveis pelos odores nas flores, que certamente desempenham o maior papel na atração dos polinizadores. Uma grande ajuda neste sentido tem sido feita pelo trabalho de Kaiser (1993), porém muito ainda há por se desenvolver. A identificação dos polinizadores também é um fator preponderante para o sucesso destes estudos, porém algumas vezes ela é impossibilitada: os polinizadores em casos de sapromiiofilia normalmente são fêmeas, e a taxonomia frequentemente é baseada nos machos (por exemplo, em Milichiidae), sendo muitas vezes as fêmeas das espécies desconhecidas (Dr. Curtis W. Sabrosky, USA National Museum, e Dr. Ângelo P. Prado, Depto. Parasitologia da Universidade Estadual de Campinas, comunicação pessoal). Infelizmente, aliado a esta dificuldade de identificação, alguns pesquisadores não coletam os polinizadores, sendo frequente encontrarmos expressões do tipo "drosophila-like" em vários trabalhos. Porém, à distância às quais estão observações são realizadas (normalmente não mais que um metro), Milichiidae, Drosophilidae, Chloropidae, Carnidae e muitas outras moscas acaliptradas são "drosophila-like".

Em relações de elevada especificidade, como nas de polinização por abelhas euglossine ou nos sistemas de pseudocópula, os estudos de polinização têm sido uma ferramenta auxiliar na taxonomia das orquídeas, mostrando-se bastante úteis. Isto chegou a levar Dressler (1968) a dizer que "não fosse o fato das *Euglossa* negarem-se a expressar opinião a respeito de material de herbário, os taxonomistas deveriam sempre consultá-las". A especificidade de polinização em relação a moscas aqui observada mostra que nestes grupos de orquídeas mioófilas estes estudos também podem ser de grande auxílio na taxonomia, como o foram no caso de *B. involutum* e *B. ipanemense*. Uma revisão taxonômica do complicado grupo com cerca de oito espécies muito semelhantes morfologicamente ao qual estas duas pertencem, utilizando-se do auxílio de dados de polinização e química de voláteis, é uma boa maneira de se por em prática estas idéias.

Uma pergunta bastante intrigante e que nos deixa bastante curiosos para respondê-la é: porque os gêneros de orquídeas com maior número de espécies, entre eles *Bulbophyllum*, são miiófilos? Não apenas a riqueza em espécies, mas também a ampla distribuição e a evolução repetidas vezes da miiófilia mostram o sucesso deste sistema na família. Talvez seja apenas coincidência, porém isto indica que não necessariamente orquídeas atraindo polinizadores ineficientes sejam fortemente selecionadas contrariamente e evolutivamente instáveis, como sugere Tremblay (1992). Conforme discutido anteriormente, esta aparente ineficiência provavelmente é uma eficiente estratégia ecológica, e possivelmente uma das chaves para o sucesso deste e de outros grupo miiófilos. Talvez nós é quem estejamos sendo ineficientes ao tentar medir “fitness” e estabilidade evolutiva através de estudos de frutificação em apenas uma estação fenológica destas plantas que podem viver centenas de anos. Uma vez que reprodução sexuada nestes indivíduos fica restrita a eventos relativamente raros, é importante a evolução de mecanismos que favoreçam a polinização cruzada. O mecanismo desenvolvido em *B. involutum* e *B. ipanemense* é extremamente interessante, e parece especialmente adaptado ao comportamento de moscas permanecerem na flor por um período prolongado de tempo. Vários mecanismos deste tipo têm sido encontrados em Orchidaceae (Dodson & Frymire, 1961; Pijl & Dodson, 1966; Ackerman & Mesler, 1979; Dressler, 1981; Catling & Catling, 1991). Estas barreiras mecânicas são muito vantajosas, pois elas não acarretam em perda de pólen e óvulos como em sistemas de autoincompatibilidade. Além disto, por serem plásticas, elas mantêm o potencial de apenas um indivíduo estabelecer uma população ou uma espécie em uma área. Isto é particularmente importante na dispersão de orquídeas restritas a afloramentos rochosos de campos rupestres, que representam verdadeiras ilhas.

Mas, diferente dos outros mecanismos que evitam autopolinização, este mecanismo de variação no tamanho da polínea apresentado por *B. involutum* e *B. ipanemense* oferece adicional isolamento em espécies não relacionadas que compartilham os mesmos polinizadores. Isto concorda com a teoria de Dodson (1962) a respeito da “leap-frog speciation”, formulada a princípio em espécies de *Stanhopea* polinizadas por euglossine. Segundo Dodson, espécies filogeneticamente próximas estariam sendo formadas e se mantendo isoladas através de odores diferentes atraindo polinizadores específicos (como em *B. involutum* e *B. ipanemense*), enquanto em espécies distantes o isolamento se daria através de vários outros mecanismos (como em *B. weddellii* e *B. involutum*).

Além dos estudos observacionais de polinização e estudos de química de voláteis, um maior número de trabalhos de sistemas de reprodução são necessários para entendermos os mecanismos de isolamento reprodutivo em orquídeas. Os conhecimentos de incompatibilidade (auto e entre espécies) foram negligenciados por muito tempo, conhecendo-se hoje muito pouco sobre os processos que ocorrem nestes cruzamentos. A infinidade de híbridos artificiais feitos pelo homem, com a divulgação apenas dos resultados de cruzamentos com sucesso, levou à crença de orquídeas

serem um grupo potencialmente muito promíscuo. Certamente, isto não é inteiramente verdadeiro, e o número de exceções se tornou muito elevado, mostrando que barreiras genéticas, totais ou parciais, estão presentes. Isto também ajuda a mostrar que o mito da especificidade de polinizadores como praticamente a única barreira à autopolinização e ao isolamento reprodutivo entre espécies não é verdadeiro. Orquídeas têm recentemente mostrado ser um grupo muito mais "maleável" do que foi primeiramente visualizado, sendo então mais esperado encontrarmos um sistema com várias barreiras "fracas" operando conjuntamente, como observado neste trabalho, do que apenas uma ou duas barreiras rígidas.

Mesmo com as eficientes barreiras interespecíficas, hibridização tem se mostrado muito comum em Orchidaceae, e alguns autores a tem considerado como uma das mais importantes formas de evolução no grupo (Pijl & Dodson, 1966; Schrenk, 1978). Além de podermos melhor entender o isolamento entre espécies, estudos envolvendo híbridos podem nos mostrar como determinadas características estão adaptadas e participam no processo de polinização em orquídeas, como o comprimento do limbo, calo e ângulo do labelo em *B. weddellii*, *B. involutum* e *B. xcipoense*. A já conhecida adaptabilidade ocasionada por introgressão entre espécies (Klier et al., 1991), bem como o surgimento e estabelecimento de novas espécies (Pijl & Dodson, 1966) também nos mostram a importância de darmos importância aos eventos de hibridização em orquídeas.

Dressler (1981), no seu primeiro livro sobre evolução e sistemática de Orchidaceae, devotou o último capítulo a relatar o que ele ainda achava necessário conhecermos a respeito das orquídeas, para melhor entendermos a evolução da família e construirmos um melhor sistema de classificação do grupo (cap. 12: "What we need to know about orchids", pág. 275). O impacto foi impressionante, e como ele próprio comenta no seu segundo livro a mesmo respeito (Dressler, 1993), o conhecimento produzido nos temas a que ele se referiu durante esta década que se passou foi espantosamente grande. Obviamente sem a mesma pretensão, dedico meus últimos parágrafos a relacionar alguns tópicos que acredito serem de grande importância para o entendimento dos grupos miiófilos de orquídeas, em especial *Bulbophyllum*.

Como já dito algumas vezes e mais uma vez é reforçado, são necessários vários estudos de casos de polinização das espécies de *Bulbophyllum*, e com preferência estudos comparativos envolvendo espécies de *Pleurothallis* e outras Pleurothallidinae. Durante os últimos anos tem crescido o número de trabalhos sobre fluxo polínico, e em orquídeas por terem todo o pólen empacotado em políneas são muito interessantes e relativamente fáceis de se desenvolverem estes estudos (Peakall, 1989). Como moscas normalmente voam distâncias muito curtas, quando comparadas com outros polinizadores como himenópteros, estes estudos são muito importantes para verificar o efeito da polinização por estes insetos na limitação do fluxo gênico dentro e entre populações. Isto pode ajudar a explicar a riqueza de espécies nestes grupos. Estes trabalhos poderiam ser fortemente auxiliados por estudos de isoenzimas a nível de populações. Medidas de

sucesso reprodutivo são também necessárias nestes grupos, e preferencialmente em estudos a longo prazo, visando detectar as consequências da frutificação em uma estação no desenvolvimento futuro do indivíduo, se possível com observações de estabelecimento de plântulas e recrutamento populacional. Devido à dificuldade, estes trabalhos são praticamente ausentes. Estudos de química de voláteis parecem ser um dos mais promissores no campo da biologia floral destas orquídeas, e hoje estão disponíveis apenas para algumas espécies asiáticas (Kaiser, 1993).

Devido à grande variação que tem sido encontrada, estudos envolvendo polinizações experimentais devem ser realizados com um número muito elevado de cruzamentos, e preferencialmente envolvendo várias repetições em um mesmo par de indivíduos. Isto deve ser acompanhado de estudos de embriologia e de investigações de tubos polínicos. Mas, provavelmente apenas com a ajuda da genética e da biologia molecular, padrões e processos de incompatibilidade em orquídeas poderão ser desvendados. Estes serão de grande valor para entendermos melhor o isolamento entre espécies e limites à autogamia e a cruzamentos entre indivíduos geneticamente semelhantes.

Trabalhos de citogenética poderão ajudar a entender processos de intercompatibilidade/incompatibilidade entre espécies. Estudos da meiose em híbridos naturais também são essenciais para conhecimento dos processos de esterilidade nestes, ou mesmo em espécies que apresentam problemas de reprodução, como as três aqui estudadas.

Estes tópicos, que na verdade abrangem praticamente toda a biologia reprodutiva do grupo, estão muito carentes de estudos, e ao relacioná-los talvez esteja apenas colocando-os como uma provável meta de meu próprio trabalho futuro, mas seria muito bom se também servisse como estímulo para algumas pessoas que queiram trabalhar com algo extremamente prazeroso e intrigante.

## BIBLIOGRAFIA GERAL

- Ackerman, J. D. 1989. Limitations to sexual reproduction in *Encyclia krugii* (Orchidaceae). **Syst. Bot.** 14(1): 101-109.
- Ackerman, J. D. & Mesler, M. R. 1979. Pollination biology of *Listera cordata* (Orchidaceae). **Amer. J. Bot.** 66(7): 820-824.
- Ackerman, J. D. & Oliver, J. C. M. 1985. Reproductive biology of *Oncidium variegatum*: moon phases, pollination, and fruit set. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 54(3): 326-329.
- Ackerman, J. D.; Rodríguez-Robles, J. A. & Meléndez, E. J. 1994. A meager nectar offering by an epiphytic orchid is better than nothing. **Biotropica** 26(1): 44-49.
- Adams, R. M. & Goss, G. J. 1976. The reproductive biology of the epiphytic orchids of Florida III.- *Epidendrum anceps* Jacq. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 45(6): 488-492.
- Agnew, J. D. 1986. Self-compatibility/incompatibility in some orchids of the subfamily Vandoideae. **Plant Breeding** 97: 183-186.
- Arnold, M. L. 1994. Natural hybridization and Louisiana irises: defining a major factor in plant evolution. **BioScience** 44(3): 141-147.
- Bänziger, H. 1996. The mesmerizing wart: the pollination strategy of epiphytic lady slipper orchid *Paphiopedilum villosum* (Lindl.) Stein (Orchidaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 121(1): 59-90.
- Barth, F. G. 1985. **Insects and flowers: the biology of a partnership**. Traduzido por M. A. Biederman-Thorson. Princeton University Press, Princeton.
- Bernandello, L.; Rodriguez, I; Stiefkens, L. & Galetto, L. 1995. The hybrid nature of *Lycium ciliatum* x *cestroides* (Solanaceae): experimental, anatomical, and cytological evidence. **Can. J. Bot.** 73: 1995-2005.
- Bertin, R. I. 1990. Effects of pollination intensity in *Campsis radicans*. **Amer. J. Bot.** 77(2): 178-187.
- Bierzychudek, P. 1981. Pollinator limitation of plant reproductive effort. **Am. Nat.** 117: 838-840.
- Braga, P. I. S. 1977. Aspectos biológicos das Orchidaceae de uma campina na Amazônia Central. **Acta Amazônica** 7(2, Suplemento): 1-89.
- Brantjes, N. B. M. 1980. Flower morphology of *Aristolochia* species and the consequences for pollination. **Acta Bot. Neerl.** 29: 212-213.
- Calvo, R. N. 1990. Inflorescence size and fruit distribution among individuals in three orchid species. **Amer. J. Bot.** 77(10): 1378-1381.

- Catling, P. M. 1982. Breeding systems of northeastern North American *Spiranthes* (Orchidaceae). **Can. J. Bot.** 60: 3017-3039.
- Catling, P. M. & Catling, V. R. 1991. Anther-cap retention in *Tipularia discolor*. **Lindleyana** 6(2): 113-116.
- Chase, M. W. 1985. Pollination of *Pleurothallis endotrachys*. **Amer. Orchid. Soc. Bull.** 54(4): 431-434.
- Christensen, D. E. 1992. Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. **Lindleyana** 7(1): 28-33.
- Christensen, D. E. 1994. Fly pollination in the Orchidaceae. In J. Arditti, ed. **Orchid biology: reviews and perspectives VI**. John Wiley & Sons, 415-454.
- Cogniaux, A. 1902. Orchidaceae. Pp. 1-664 in C. F. P. Martius & A. G. Eichler, eds., **Flora Brasiliensis, Vol. 3(5)**. Frid. Fleischer, Lipsiae.
- Dafni, A. 1992. **Pollination ecology: a practical approach**. Oxford University Press, Oxford.
- Dafni, A. & Calder, D. M. 1987. Pollination by deceit and floral mimicry in *Thelymitra antennifera* (Orchidaceae). **Pl. Syst. Evol.** 158(1): 11-22.
- Dodson, C. H. 1962. The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America. **Am. Orchid Soc. Bull.** 31(7): 525-534, (8):641-649, (9): 731-735.
- Dodson, C. H. & Frymire, G. P. 1961. Natural pollination of orchids. **Missouri Bot. Gard. Bull.** 49: 133-139.
- Dressler, R. L. 1968. Observations on orchids and Euglossine bees in Panama and Costa Rica. **Rev. Biol. Trop.** 15(1): 143-183.
- Dressler, R. L. 1981. **The orchids: natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R. L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Dioscorides Press, Portland.
- Faegri, K. & Pijl, L. van der. 1979. **The principles of pollination ecology**, 3<sup>rd</sup> ed. Pergamon Press, Oxford.
- Faulkner, J. S. 1973. Experimental hybridization of north-west European species in *Carex* section *Acutae* (Cyperaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 67(3): 233-253.
- González-Dias, N. & Ackerman, J. D. 1988. Pollination, fruit set, and seed production in the orchid, *Oeceoclades maculata*. **Lindleyana** 3(3): 150-155.

- Harberd, D. J. 1961. Observations on population structure and longevity of *Festuca rubra* L. **New Phytol.** 60: 184-206.
- Hauser, T. P. & Loeschcke, V. 1996. Drought stress and inbreeding depression in *Lychnis flos-cuculi* (Caryophyllaceae). **Evolution** 50(3): 1119-1126.
- Hoehne, F. C. 1938. Cincoenta e uma novas espécies da flora do Brasil e outras descrições e ilustrações. **Arq. bot. Est. S. Paulo** 1(1): 1-38.
- Hogenboom, N. G. 1975. Incompatibility and incongruity: two different mechanisms for the non-functioning of intimate partner relationships. **Proc. R. Soc. Lond. B.** 188: 361-375.
- Iannotti, M. A.; Stort, M. N. S. & Marin-Morales, M. A. 1987. O sistema reprodutivo de *Epidendrum rigidum* Jacq. (Orchidaceae). **Ciên. Cult.** 39(7): 641-644.
- Illg, R. D. 1975. **Aspectos evolutivos em algumas Maxillarias brasileiras (Orchidaceae)**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Johansen, B. 1990. Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 103: 165-196.
- Johri, B. M. & Vasil, K. Physiology of pollen. **Bot. Rev.** 27(3): 325-381.
- Jones, D. L. 1985. Pollination of *Bulbophyllum weinthalii* Rogers. **Victorian Naturalist** 103: 99-101.
- Jones, D. L. & Gray, B. 1976. The pollination of *Bulbophyllum longiflorum* Thouars. **Am. Orchid. Soc. Bull.** 45(1): 15-17.
- Kaiser, R. 1993 **The scent of the orchids. Olfactory and chemical investigations**. Elsevier, Amsterdam.
- Klier, K.; Leoschke, M. J. & Wendel, J. F. 1991. Hybridization and introgression in the white and yellow lady's slipper orchids (*Cypripedium candidum* and *Cypripedium pubescens*). **J. Hered.** 82(4): 305-318.
- Koehler, D. L. & Davenport, D. 1983. Ultraviolet mimicry by *Bulbophyllum lepidum*? **Am. Orchid. Soc. Bull.** 52(4): 359-363.
- Linder, H. P. 1990. Hybrids in *Disa* (Diseae-Orchidaceae). **Lindleyana** 5(4): 224-230.
- Lloyd, D. G. 1980. Sexual strategies in plants. I. An hypothesis of serial adjustment of maternal investment during one reproductive session. **New Phytol.** 86: 69-79.
- Marshall, D. L. & Folsom, M. W. 1991. Mate choice in plants: an anatomical to population perspective. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 22: 37-63.
- Mehrhoff, L. A. 1983. Pollination in the genus *Isotria* (Orchidaceae). **Amer. J. Bot.** 70(10): 1444-1453.

- Meve, U. & Liede, S. 1994. Floral biology and pollination in stapeliads - new results and a literature review. **Pl. Syst. Evol.** 192(1): 99-116.
- Montalvo, A. M. & Ackerman, J. D. 1987. Limitations to fruit production in *Ionopsis utricularioides* (Orchidaceae). **Biotropica** 19(1): 24-31.
- Netto, P. G. 1989. Análise comparativa da fauna associada a depósitos de guano de morcegos cavernícolas no Brasil. Primeira aproximação. **Revta. bras. Ent.** 33(2): 183-192.
- Niesenbaum, R. A. & Casper, B. B. 1994. Pollen tube numbers and selective fruit maturation in *Lindera benzoin*. **Am. Nat.** 144(1): 184-191.
- Nilsson, L. A. 1992. Orchid pollination biology. **TREE** 7(8): 255-259.
- Pabst, G. F. J. & Dungs, F. 1975. **Orchidaceae Brasiliensis, Vol. 1.** Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Pabst, G. F. J. & Dungs, F. 1977. **Orchidaceae Brasiliensis, Vol. 2.** Kurt Schmiersow, Hildesheim.
- Patt, J. M.; Merchant, M. W.; Williams, D. R. E. & Meeuse, B. J. D. 1989. Pollination biology of *Platanthera stricta* (Orchidaceae) in Olympic National Park, Washington. **Amer. J. Bot.** 76(8): 1097-1106.
- Paulus, H. F. & Gack, C. 1990. Pollination of *Ophrys* (Orchidaceae) in Cyprus. **Pl. Syst. Evol.** 169: 177-207.
- Pavanelli, E. A. S. & Stort, M. N. S. 1985. Cruzamentos artificiais em plantas de *Epidendrum nocturnum* Jacq. (Orchidaceae). **Ciê. Cult.** 37(7): 1164-1168.
- Peakall, R. 1989. A new technique for monitoring pollen flow in orchids. **Oecologia** 79: 361-365.
- Pedersen, H. A. 1995. Anthecological observations on *Dendrochilum longibracteatum* - a species pollinated by facultatively anthophilous insects. **Lindleyana** 10(1): 19-28.
- Peeters, C.; Hölldobler, B.; Moffet, M. & Musthak Ali, T. M. 1994. "Wall-papering" and elaborate nest architecture in the ponerine ant *Harpegnathos saltator*. **Ins. Soc.** 41(2): 211-218.
- Pijl, L. van der & Dodson, C. H. 1966. **Orchid flowers: their pollination and evolution.** University of Miami Press, Coral Gables.
- Pleasants, J. M. & Moe, S. 1993. Floral display size and pollination of the western prairie fringed orchid, *Platanthera praeclara* (Orchidaceae). **Lindleyana** 8(1): 32-38.
- Proctor, M.; Yeo, P. & Lack, A. 1996. **The natural history of pollination.** Harper Collins, London.
- Reeves, L. M. & Reeves, T. 1984. Life history and reproduction of *Malaxis paludosa* in Minnesota. **Am. Orchid Soc. Bull.** 53(12): 1280-1291.
- Richards, A. J. 1986. **Plant breeding systems.** Allen & Unwin, London.

- Ridley, H. N. 1890. On the method of fertilization in *Bulbophyllum macranthum*, and allied orchids. **Ann. Bot.** 4(15): 327-336.
- Rieseberg, L. H. 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. **Amer. J. Bot.** 82(7): 944-953.
- Rodríguez-Robles, J. A.; Meléndez, E. A. & Ackerman, J. A. 1992. Effects of display size, flowering phenology, and nectar availability on effective visitation frequency in *Comparettia falcata* (Orchidaceae). **Amer. J. Bot.** 79(9): 1009-1017.
- Romero, G. A. & Carnevali, G. 1990. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela - 1. *Catasetum x tapiriceps* Reichb. f. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 59(12): 1214-1220.
- Romero, G. A. & Carnevali, G. 1991a. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela - 2. *Catasetum x dunstervillei* G. Romero & Carnevali. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 60(2): 115-120.
- Romero, G. A. & Carnevali, G. 1991b. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela - 3. *Catasetum x roseo-album* (Hook) Lindley and *C. x wendlingeri* Foldats. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 60(8): 770-774.
- Romero, G. A. & Carnevali, G. 1992. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela IV: biology and nomenclature. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 61(4): 334-360.
- Rossi, W.; Arduino, P; Cianchi, R. & Bullini, L. 1992. A new natural hybrid in the genus *Orchis* L.: genetic data and description. **Lindleyana** 7(3): 121-126.
- Sabrosky, C. W. 1959. A revision of the genus *Pholeomyia* in North America (Diptera, Milichiidae). **Ann. Ent. Soc. Amer.** 52: 316-331.
- Sabrosky, C. W. 1973. **A catalogue of the Diptera of the South of the United States. 75-Family Milichiidae.** Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Sabrosky, C. W. 1987a. Milichiidae. In J. F. Mc Alpine et al., org. **Manual of Nearctic Diptera, vol. 2.** Research Branch Agriculture Canada, Hull.
- Sabrosky, C. W. 1987b. A new species of *Leptometopa* (Diptera, Milichiidae) from Madagascar pollinating *Ceropegia* (Asclepiadaceae). **Proc. Entomol. Soc. Wash.** 89(2): 242-243.
- Sanford, W. W. 1964. Sexual compatibility relationship in *Oncidium* and related genera. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 33 (12): 1035-1048.
- Sanford, W. W. 1967. Sexual compatibility relationship in *Oncidium* and related genera - part II. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 36 (2): 114-122.
- Sazima, M. 1978. Polinização por moscas em *Bulbophyllum warmingianum* Cogn. (Orchidaceae), na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. **Revta brasil. Bot.** 1(1): 133-138.

- Scacchi, R.; De Angelis, G. & Lanzana, P. 1990. Allozyme variation among and within eleven *Orchis* species (fam. Orchidaceae), with special reference to hybridization aptitude. **Genetica** 81: 143-150.
- Schemske, D. W. 1980. Evolution of floral display in the orchid *Brassavola nodosa*. **Evolution** 34(3): 489-493.
- Schrenk, W. J. 1978. North American Platantheras: evolution in the making. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 47(5): 429-437.
- Schrenk, W. J. 1984. Natural hybrids unlimited - How certain is certain? **Amer. Orchid Soc. Bull.** 53(2): 130-143.
- Selberg, O. 1989. Genome analysis, phylogeny, and classification. **Pl. Syst. Evol.** 166: 159-171.
- Smith, J. F.; Burke, C. C. & Wagner, W. L. 1996. Interspecific hybridization in natural populations of *Cyrtandra* (Gesneriaceae) on the Hawaiian Islands: evidence from RAPD markers. **Pl. Syst. Evol.** 200(1): 61-77.
- Smythe, R. 1969. An observation on the pollination of *Bulbophyllum baileyi*. **The Orchadian** 3: 61.
- Steiner, K. E.; Whitehead, V. B. & Johnson, S. D. 1994. Floral and pollinator divergence in two sexually deceptive South African orchids. **Amer. J. Bot.** 81(2): 185-194.
- Stephenson, A. G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 12: 253-279.
- Stort, M. N. S. 1972. Estudos em híbridos F1 artificiais de orquídeas. **Ciên. Cult.** 24(9): 847-851.
- Stort, M. N. S. 1973. Natural pollination in *Cattleya loddigesii* Lindl. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 42(7): 606-608.
- Stort, M. N. S. 1976. Cruzamentos artificiais entre plantas diplóides e tetraplóides de *Cattleya bicolor* Lindl. **Ciên. Cult.** 28(10): 1208-1211.
- Stort, M. N. S. 1982. Cruzamentos artificiais envolvendo espécies do gênero *Cattleya*, subgêneros *Monophyllae* e *Cattleya* (Orchidaceae). **Ciên. Cult.** 35(10): 1481-1485.
- Stort, M. N. S. 1986. Fertilidade de cruzamentos e relação filogenética entre algumas espécies do gênero *Cattleya* (Orchidaceae). **Revta brasil. Bot.** 9(1): 69-73.
- Stort, M. N. S. & Galdino, G. L. 1984. Self and cross-pollination in some species of the genus *Laelia* Lindl. (Orchidaceae). **Rev. Brasil. Genet.** 7(4): 671-676.
- Stoutamire, W. 1978. Pollination of *Tipularia discolor*, an orchid with modified symmetry. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 47(5): 413-415.

- Sundermann, H. 1977. The genus *Ophrys* - An example of the importance of isolation for speciation. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 46(9): 825-831.
- Swamy, B. G. L. 1949. Embryological studies in the Orchidaceae. II. Embryogeny. **Am. Midland Nat.** 41(1): 202-232.
- Thien, L. B. & Utech, F. 1970. The mode of pollination in *Habenaria obtusata* (Orchidaceae). **Amer. J. Bot.** 57(9): 1031-1035.
- Tremblay, R. L. 1992. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. **Can. J. Bot.** 70: 642-650.
- Tremblay, R. L. 1994. Frequency and consequences of multi-parental pollinations of *Cypripedium calceolus* var. *pubescens* (Orchidaceae). **Lindleyana** 9(3): 161-167.
- Vermeulen, J. J. 1991. **Orchids of Borneo. Vol. 2-Bulbophyllum**. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Vogel, S. 1961. Die Bestäubung der Kesselfallenblüten von *Ceropegia*. **Beitr. Biol. Pflanzen** 36: 159-237.
- Warming, E. 1883. **Symbolae ad floram Brasiliae centralis cognoscendam, Vol. 29**. Bianco Luno, Copenhagen.
- Weiblen, G. D. & Brehm, B. G. 1996. Reproductive strategies and barriers to hybridization between *Tellima grandiflora* and *Tolmeia menziesii* (Saxifraceae). **Amer. J. Bot.** 83(7): 910-918.
- Wolda, H. & Sabrosky, C. W. 1986. Insect visitors to two forms of *Aristolochia pilosa* in Las Cumbres, Panama. **Biotropica** 18(4): 295-299.
- Zimmerman, J. K. & Aide, T. M. 1989. Patterns of fruit production in a neotropical orchid: pollinator vs. resource limitation. **Amer. J. Bot.** 76(1): 67-73.