

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
MUSEU NACIONAL

*ESTUDOS REPRODUTIVOS EM DUAS ESPÉCIES
SIMPÁTRICAS DE EPIDENDRUM L.
(EPIDENDROIDEAE – ORCHIDACEAE) EM
VEGETAÇÃO DE RESTINGA*

Luciene Campos São Leão



Rio de Janeiro
2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
MUSEU NACIONAL
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
BOTÂNICA**

**ESTUDOS REPRODUTIVOS EM DUAS ESPÉCIES SIMPÁTRICAS
DE *Epidendrum* L. (EPIDENDROIDEAE - ORCHIDACEAE) EM
VEGETAÇÃO DE RESTINGA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Museu Nacional, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica).

Luciene Campos São Leão

Orientadoras:

Profa. Dra. Heloisa Alves de Lima Carvalho

Profa. Dra. Lygia Dolores Ribeiro de Santiago-Fernandes

Rio de Janeiro
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
MUSEU NACIONAL
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -
BOTÂNICA

ESTUDOS REPRODUTIVOS EM DUAS ESPÉCIES SIMPÁTRICAS DE
Epidendrum L. (EPIDENDROIDEAE - ORCHIDACEAE) EM VEGETAÇÃO DE
RESTINGA.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Botânica) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre.

Aprovada por:

Prof. Dra. Tânia Wendt - Presidente

Prof. Dr. Joecildo Francisco Rocha

Prof. Dra. Tatiana Tavares Carrijo

Membros Suplentes:

Prof. Dra. Ana Tereza Araujo Rodarte

Prof. Dra. Luci de Senna Valle

FICHA CATALOGRÁFICA

São Leão, Luciene Campos

Estudos reprodutivos em duas espécies simpátricas de *Epidendrum* L. (Epidendroideae – Orchidaceae) em vegetação de restinga. Luciene Campos São Leão – Rio de Janeiro: UFRJ/Museu Nacional, 2012.

XVI, 67f. il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional, Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2012.

Orientadoras: Heloísa Alves de Lima Carvalho e Lygia Dolores Santiago

Fernandes

Bibliografia: p. 59-66

1- Epidendroideae – Orchidaceae. 2- *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex. Lindl. 3- Biologia da reprodução. 4- Simpátricas. 5-Análise Estrutural dos recursos (nectários e osmóforos). I- Santiago-Fernandes, Lygia Dolores Ribeiro de (Orient.). II- Lima, Heloisa Alves de (Orient.). III- Universidade Federal do Rio de Janeiro. IV- Museu Nacional, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica). V- Título.

I. Título.

*“À Sagrada Família: Jesus, Maria e José
Minha Dissertação vossa é!”
À Minha Família e Aquele que sempre me incentivou...*

Rio de Águas Vivas

*Eu quero em mim
Um rio de águas vivas
Que possa jorrar e abençoar as vidas
Por onde eu passar
As águas jorrarão, curarão e libertarão
Lavarão as feridas
E o Espírito se moverá
E o vento de Deus soprará
Trazendo vitória*

*Jorra em mim
Águas do rio de Deus
Vem transbordar todo o meu coração
Quero nascer da Tua fonte, Senhor
E nadar no Teu rio, e nadar no Teu rio
E nadar no Teu rio de amor
E nadar no Teu rio de amor
E nadar no Teu rio de amor.*

(Marcelo Nascimento)

Agradecimentos

A *Deus*, criador de todas as coisas, pelo dom da vida e por ser minha força e vitória. Um amor incondicional.

À Sagrada Família

E agora...

Nomes... Amigos... e se eu me esquecer de alguém...

Então é melhor assim...

À Minha querida família

A toda a equipe e amigos do Laboratório de Biologia Reprodutiva do Museu Nacional/UF RJ

A toda a equipe e amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal do Museu Nacional/UF RJ

Aos funcionários da Biblioteca e da Secretaria da Pós-graduação em Ciências Biológicas – Botânica, Museu Nacional/UF RJ

Aos mestres e amigos do Centro Universitário da Cidade

Aos funcionários da Biblioteca do Centro Universitário da Cidade

Aos amigos Tatiana e Marcelo, responsáveis pelo meu ingresso no Museu Nacional

Pois...

Cada um de vocês teve uma participação especial, direta ou indireta, contribuindo para a realização do “nosso trabalho”. É isso mesmo: na orientação, discussão dos resultados, ajuda nos emblocamentos, realização das fotos, confecção de gráficos, testes estatísticos, coleta dos pontos com GPS, confecção dos saquinhos de voil, companhia nas divertidas e às vezes assustadoras excursões para trabalhos de campo (picadas de mutuca doem muito, policiais fortemente armados, não presenciei,

mas... a vingança das viúvas negras e cobra na estrada...). No fim de cada excursão lá estava “ela” esperando por nós... nossa querida e bem gelada “coca-cola”, servida pela D. Elisa). Especialmente, agradeço ao amigo Rafael (my personal histological trainer), pelo auxílio nos testes histoquímicos e na realização das micrografias e à amiga Bárbara, pela confecção das pranchas e pelos inúmeros artigos (“Artigos legais sobre orquídeas, servem para a Luciene!”).

Frases que mais marcaram: “Não esquentar sua cabeça, pois seu Mestrado será realizado no Museu Nacional!” e... “Por favor... me ajudem... não consigo atarraxar o micrótomo!” e “Qual é o fio da navalha”?

Para que esta dissertação fosse realizada, vocês tornaram este caminho mais prazeroso, às vezes meio tribulado com minhas dúvidas e incertezas, mas fiquem certos de uma coisa:

“A amizade e o companheirismo foram fundamentais por colocarem felicidades em minha vida e sonhos em meus pensamentos”!

E tem mais...

*“Eu pedi pra Deus gravar
O teu Nome em minha mão
Deus foi muito mais além
Te gravou em meu coração
Já não posso mais esquecer de Ti”*

Terminando...

A CAPES, pela bolsa de mestrado e pelo auxílio PROAP concedidos.

Aos Doutores membros da Banca Examinadora.

O meu total Agradecimento!

E

Segundo uma pessoa... Eu pareço "Um Jardim de Infância"

Diria...

"Um lindo Jardim de Orquídeas"

Então...

Beijinhos carinhosos dentro do coração de cada um!!!

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	01
2 – MATERIAIS E MÉTODOS	05
2.1 - Área de Estudo	05
2.1.1 - Localização e descrição	05
2.1.2 - Características climáticas	06
2.2 - Estudo fenológico e distribuição das espécies estudadas	06
2.3 - Biologia floral	08
2.3.1 - Osmóforos	08
2.4 - Anatomia floral	08
2.5 - Microscopia de Varredura	09
2.6 - Visitantes florais	09
2.7 - Sistema reprodutivo	10
2.8 - Viabilidades das sementes	10
3 – RESULTADOS	11
3.1 - Distribuição das espécies	11
3.2 - Morfologia e Biologia floral	11
3.2.1 - Nectários: nupcial e extranupcial	21
3.2.2 - Testes histoquímicos	27
3.2.3 - Osmóforos	28
3.3 - Sistema reprodutivo	32
3.4 - Visitantes florais	35
3.5 - Fenologia reprodutiva	39
3.6 - Propagação vegetativa	42
4 - DISCUSSÃO	45
5 – CONCLUSÃO	57
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Aspecto geral da restinga e local de estudo na Área de Proteção Ambiental (APA) de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil. 05
- Figura 2:** Localização da área de estudo no cordão interno da Área de Proteção Ambiental (APA) de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil, mostrando as três fisionomias da vegetação em vista aérea. AAI, AANI (evidenciado em círculo vermelho), AFNI. Fonte: <http://maps.google.com>. 06
- Figura 3:** Dados médios de temperatura (°C) e de precipitação pluviométrica total (mm) para a região de Maricá, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2010. Dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) – estação N° 83089. 07
- Figura 4:** Distribuição de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (em verde) e de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (em rosa), na área de estudo de Maricá, Rio de Janeiro, período de março de 2010 a fevereiro de 2011. As áreas dentro do círculo vermelho = arbustiva aberta não inundável (moitas), círculo azul = arbustiva fechada, círculo cinza = arbustiva aberta inundável). 11
- Figura 5:** *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. - Morfologia geral de uma planta florida - raiz, caule, folhas, flor e botão (A), flor (B) e detalhe do labelo (C). Esc. 1:20 12
- Figura 6:** *Epidendrum orchidiflorum* Sazm. ex Lindl. - Morfologia geral de uma planta florida - raiz, caule, flor, fruto (A); Flor (B) e detalhe do labelo (C). Esc. 1:20 13
- Figura 7:** Inflorescência de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (A) e de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (B), na restinga da APA de Maricá, Rio de Janeiro. 14
- Figura 8:** Morfologia da flor de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (sd = sépala dorsal; sl = sépala lateral; pl = pétala lateral; lab = labelo; c = coluna; n = nectário floral nupcial; o = ovário; p = polinário; ne = nectário floral extranupcial). 15
- Figura 9:** Etapas da abertura floral em *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (A= botão em pré-antese (seta); B= Deslocamento das sépalas laterais (seta); C e D= Expansão da sépala dorsal (seta) e aspecto semelhante a leque (estrela); E= Tomando posições na flor em antese; F= Flor em antese). 16
- Figura 10:** Morfologia das flores de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (pl = pétala lateral; sl = sépala lateral; sd = sépala dorsal; lab = labelo). 17
- Figura 11:** Morfologia das flores de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (o = ovário; c = coluna; n = nectário nupcial; ne = nectário extranupcial). 18

Figura 12: Etapas da abertura floral em *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (A= botão em pré-antese; B= expansão da sépala dorsal; C-D = deslocamento das sépalas laterais e sépala dorsal; E= expansão do labelo; F= expansão semelhante a uma concha; G= lentamente tomando as posições na flor em antese. 19

Figura 13: Posição dos nectários de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (A) e de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (B). 21

Figura 14: Nectário extrafloral nos prófilos (setas) de (A)= *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e (B)=*Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. 21

Figura 15: Nectário nupcial de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. A= Posição; B= Os tricomas glandulares e a secreção em MEV; C= Detalhe dos tricomas glandulares em MEV; D= Aspecto geral; E= Face interna: tricomas glandulares; feixes vasculares (seta vermelha) e idioblastos contendo ráfides (seta preta); F= Presença de lipídeos; G= Presença de polissacarídeos ácidos; H= Presença de polissacarídeos neutros (escala/barra – Fig. A=5 mm; Fig. C=20µm; Figs. B, E, F, H=50µm; Fig. D=200µm; Fig. G=100µm). 23

Figura 16: Nectário extranupcial de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. A= Localização (setas); B= Aspecto geral da epiderme papilosa em MEV; C= Detalhe da papila em MEV; D= Aspecto geral anatômico da epiderme papilosa (setas) (escala/barra – Fig. A= 5 mm; Fig. B=20µm; Fig. C=10µm; Fig. D=200µm). 24

Figura 17: Nectário nupcial de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. A= Localização (setas); B=Aspecto geral em MEV; C= Detalhe da região interna evidenciando secreção; D= Corte transversal; E= Detalhe da face interna evidenciando a epiderme com células papilosas de citoplasma denso; F= Detalhe da face interna evidenciando o estágio pós-secretor; feixes vasculares (seta vermelha) e idioblastos com ráfides (seta preta). (escala/barra – Fig. A=4mm; Fig. B=500µm; Figs. C,E,F=50µm; Fig. D=200µm). 25

Figura 18: Nectário extranupcial de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. A= Posição (seta); B= Aspecto geral da face externa em MEV (seta); C e D= Detalhe em MEV. (barra/escala-Fig. A=5mm; Fig. B=100µm; Fig. C=50µm; Fig. D=20µm). 26

Figura 19: A=Flores de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr.e B= Flores de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. evidenciando labelos corados com solução aquosa de vermelho neutro 1:1000 (As flores com as setas representam flores controle). 28

Figura 20: Osmóforos em *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. A= Flor mostrando labelo (seta) e ápice da coluna (retângulo); B= Aspecto geral do labelo em MEV; C=

Detalhe da epiderme papilosa do labelo em MEV; D= Célula epidérmica corada com Sudan IV em microscopia óptica; E=Detalhe do calo do labelo; F= Ápice da coluna em MEV; G= Detalhe da coluna em MEV (escala/barra: Fig. A=5mm; Fig. B=100µm; Figs. C,D,G=20µm; Figs. E=10µm; Fig. F=50 µm). 30

Figura 21: Osmóforos em *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. A= Labelo (setas); B= Aspecto da epiderme do labelo em MEV; C= Detalhe da figura anterior, evidenciando a ornamentação de uma célula em MEV; D= Detalhe do calo do labelo evidenciando os poros (setas); E,F,G= Cortes transversais submetidos a testes histoquímicos: E= Teste Sudan IV (substâncias lipofílicas); F= Teste PAS (polissacarídeos); G= Teste com Dicromato de Potássio (substâncias fenólicas); H= Vista geral da capa da polínia em MEV; I= Detalhe do poro estomático em MEV (escala/barra: Fig. A=4mm; Figs. B, C= 20µm; Figs. D, E, F, G, H= 50µm; Fig. I= 10µm). 31

Figura 22: Flores de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. evidenciando o rostelo, a região estigmática e o polinário. 33

Figura 23: Aspecto geral do fruto de: A= *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e B= *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. 35

Figura 24: Borboleta Hesperíidae visitando flores de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (A, B e C) = coletando néctar; (D) = removendo o polinário (seta). 36

Figura 25: Polínia inserida na câmara estigmática A= *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. e B= *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (seta). 37

Figura 26: Análise de flores para observação das taxas de remoção de polínias, ao longo do período de maio de 2010 a maio de 2011, na APA da restinga de Maricá, Rio de Janeiro. A = *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e B = *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. 38

Figura 27: Percentuais de atividade (A) e Intensidade de Fournier (B), referentes às fenofases de emissão de botões, floração e frutificação em *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. na área estudada. 40

Figura 28: Percentuais de atividade (A) e Intensidade de Fournier (B), referentes às fenofases de emissão de botões, floração e frutificação em *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl., na área estudada. 41

Figura 29: Indivíduos de *Epidendrum*: A= *E. denticulatum* Barb. Rodr. e B= *E. orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. 42

- Figura 30:** Raízes das propagações vegetativas: A= *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e B= *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. 42
- Figura 31:** Propagação vegetativa com inflorescências: A= *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e B= *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. 43
- Figura 32:** Ramos secos servindo como apoio para as propagações vegetativas: A= *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e B= *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. 43
- Figura 33:** Individuos de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. mostrando propagações sobre a serrapilheira (A) e propagações em hábito epífita (B). 44
- Figura 34:** Ramos e folhas com pigmentação avermelhada em A= *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e em B= *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Morfometria das estruturas florais de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. na APA de Maricá, Rio de Janeiro. (média em mm \pm desvio padrão; c= comprimento, l= largura, n=30 para ambas as espécies). 20

Tabela 2: Morfometria das estruturas florais de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. na APA de Maricá, Rio de Janeiro. (média em mm \pm desvio padrão; c= comprimento, l= largura, n=30 para ambas as espécies). 20

Tabela 3: Testes histoquímicos nas flores de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. na APA de Maricá, Rio de Janeiro (C = coluna; N = nectário; L = labelo; + =positivo; - =negativo). 27

Tabela 4: Experimentos relativos ao sistema de reprodução de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (n= número amostral) 32

Tabela 5: Viabilidade das sementes nos frutos maduros dos experimentos relativos ao sistema de reprodução de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. 34

RESUMO

Trata-se de um estudo sobre a fenologia, biologia floral, reprodução e anatomia das estruturas secretoras, em especial aquelas produtoras de odor e de recurso floral, de duas espécies simpátricas do gênero *Epidendrum* L. (Orchidaceae) em vegetação de restinga. O gênero *Epidendrum* L., subfamília Epidendroideae, está representado na restinga de Maricá por duas espécies da tribo Epidendreae, subtribo Laeliinae: *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex. Lindl., as quais florescem sincronicamente ao longo de todo o ano, com picos na estação mais quente e úmida. As flores de *E. denticulatum* abrem-se pela manhã, têm coloração rosa conspícua, guia de néctar e nectários nupcial e extranupcial. Durante o dia, são visitadas por lepidópteros Hesperiiidae, que promovem a remoção dos polinários. As flores de *E. orchidiflorum* têm abertura floral noturna, coloração verde, nectários nupcial e extranupcial e odor marcante à noite, sugerindo polinização por agentes noturnos, possivelmente mariposas. Não foram registrados visitantes diurnos para a espécie, mas a remoção de polínias foi observada apenas durante a noite. Os nectários florais nupciais de ambas as espécies são do tipo cunículo e, estruturalmente, apresentam diferenças na epiderme secretora: em *E. denticulatum* há tricomas unicelulares e cutícula lisa e em *E. orchidiflorum* a epiderme é papilosa e recoberta por cutícula estriada. Estruturas produtoras de fragrâncias (osmóforos) foram detectadas. Em condições naturais, a produção de frutos é muito baixa. Os experimentos de polinização manual revelaram que as espécies são auto e intercompatíveis. No entanto, a produção de frutos e de sementes férteis alcançou o maior sucesso nos experimentos de polinização cruzada, sugerindo limitação na polinização. Não foram identificados indivíduos com morfologia intermediária. Barreiras pré-polinização relacionadas com a biologia floral das espécies (diferenças no horário de antese, cor, odor das flores e na forma floral, resultado da ressupinação das flores de *E. orchidiflorum*) parecem suficientes para evitar a hibridização. Por outro lado, a grande ocorrência de propagação vegetativa, aliada à dificuldade de estabelecimento de plântulas no ambiente de restinga, pode ter um papel muito importante na manutenção das espécies.

ABSTRACT

This is a study about the phenology, floral biology, reproduction and anatomy of the secretory structures, especially those that producing scent and floral resource, of two sympatric species of the genus *Epidendrum* L. (Orchidaceae) in restinga vegetation. At the restinga of Marica, the genus *Epidendrum* L., subfamily Epidendroideae, is represented by two species of the tribe Epidendreae, subtribe Laeliinae: *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. and *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex. Lindl., which bloom synchronously throughout the year, with peaks in the warmer and wet season. The flowers of *E. denticulatum* open in the morning, have conspicuous pink color, nectar guide and nuptial and extranuptial nectaries. During the day, they are visited by Lepidoptera Hesperiiidae, which promote the removal of pollinaria. The flowers of *E. orchidiflorum* open at night, have green color, nuptial and extranuptial nectaries and a strong odor at night, suggesting nocturnal pollination agents, possibly moths. There were no diurnal flower visitors for the species, but we observed removed pollinias only at night. The nuptial nectaries of both species are of the cuniculous type and structurally differ in relation to the secretory epidermis: in *E. denticulatum* there are unicellular trichomes and a smooth cuticle and in *E. orchidiflorum* the epidermis is papillose and covered with a striated cuticle. Structures producing fragrances (osmophores) were detected. Under natural conditions, the fruit set is very low. The hand pollination experiments revealed that the species are self and intercompatible. However, the production of fruits and fertile seeds achieved the greatest success in the experiments of cross-pollination, suggesting limitations in pollination. Individuals with intermediate morphology were not identified. Pre-pollination barriers related to the floral biology of the species (differences in the time of anthesis, color, odor and in the floral form resultant from the resupination of the flowers of *E. orchidiflorum*) seem sufficient to prevent hybridization. On the other hand, the high occurrence of vegetative propagation, combined with the difficulty of seedling establishment in restinga, may have an important role in maintaining of the species.

1 - Introdução

A família Orchidaceae constitui um dos maiores e mais diversos táxons de angiospermas, com cerca de 20.000 espécies (Dressler, 1993 *apud* Saddi, 2008; Souza & Lorenzi, 2005), constituindo um clado basal dentro da ordem Asparagales (APG III, 2003). A maioria das espécies de Orchidaceae, cerca de 10.850 espécies, ocorre nos trópicos, (Dressler, 1993 *apud* Saddi, 2008), embora a família esteja distribuída por todas as regiões do planeta (Dressler, 1990). O Brasil tem aproximadamente 235 gêneros e 2.419 espécies, sendo considerado o terceiro país com maior diversidade desta família (Pabst & Dungs, 1975; Dressler, 1990; Barros & Barbarena, 2010). Treze gêneros são exclusivos do neotrópico, incluindo *Epidendrum* L., com cerca de 1.500 espécies (Dressler, 1993 *apud* Saddi, 2008), um dos mais diversos da família, distribuído desde o sudeste dos Estados Unidos até o nordeste da Argentina (Hágsater & Soto Arenas, 2005). *Epidendrum* está incluído na subfamília Epidendroideae (Judd *et al.*, 1999; Pinheiro *et al.*, 2009) e as espécies são extremamente variáveis no que se refere à exigência de hábitat, sendo principalmente epífitas, mas também ocorrendo algumas litofíticas e outras terrestres (Conceição *et al.*, 2006).

A família Orchidaceae caracteriza-se pelo ovário ínfero, sincárpico; perianto formado por dois verticilos trímeros (3 sépalas e 3 pétalas), sendo que a pétala mediana, denominada “labelo” (lábio, em latim), com frequência é maior e apresenta glândulas ou ornamentações (calos) com funções relacionadas ao processo de polinização. Frequentemente ocorre ressupinação – a tração de 180° sofrida por flores zigomorfas em durante o desenvolvimento – que leva o labelo a ocupar a posição mais baixa na antese, podendo, assim, atuar como plataforma de pouso ou guia mecânico para os polinizadores (Mondragón-Palomino & TheiBen, 2009). O androceu e o gineceu, fundidos em maior ou menor grau, formam uma estrutura única denominada coluna. Nesta, a antera e a área estigmática são separadas por uma membrana, o rostelo, que impede a autopolinização. O número de anteras férteis em geral é muito reduzido, sendo uma e raramente duas ou três. As sementes são em geral diminutas e carecem de endosperma. Durante o processo de germinação estabelece-se uma simbiose entre fungos e a semente. O fungo providencia nutrientes para o embrião, sem os quais o

processo de germinação não seria possível na natureza (Dressler, 1990; Singer & Koehler, 2004; Souza & Lorenzi, 2005).

As orquídeas são conhecidas pelas diversas formas e cores de suas flores que favorecem a atração dos polinizadores (Judd *et al.*, 1999; Pabst & Dungs, 1975), sendo o néctar o principal recurso oferecido (Proctor *et al.*, 1996). A presença de néctar pode resultar em elevadas transferências de pólen em Orchidaceae, incluindo as orquídeas epidendroides (Peter & Johnson, 2009). Entretanto, óleos, tecidos, resinas e perfumes florais também estão representados. Ainda, numerosas orquídeas não oferecem recompensa aos polinizadores. São as “orquídeas de engodo”, cujas flores exibem conjuntos de caracteres (cores, fragrâncias florais, etc.) que atraem animais à procura de alimento que, entretanto, não é disponibilizado, ou apresentam estratégias mais sofisticadas, como nas orquídeas polinizadas por “pseudocópula”, que produzem fragrâncias florais que mimetizam os feromônios sexuais de fêmeas de insetos, geralmente os Hymenoptera (Singer & Koehler, 2004). O odor floral é responsável pela atração a longa distância (Proctor *et al.*, 1996).

A diversificação de nectários em Orchidaceae está intimamente relacionada com adaptações para diversos grupos de polinizadores (Baker & Baker, 1993; Pacini *et al.*, 2003). Nectários em muitas orquídeas são formados por protuberâncias (calos) ou regiões papilosas localizadas na coluna, labelo ou entre as duas (Dressler, 1993 *apud* Saddi, 2008).

No que se refere ao sistema de reprodução, a maioria das Orchidaceae não apresenta sistemas de incompatibilidade, mas a autopolinização espontânea é evitada pela presença do rostelo; dessa forma, as espécies dependem de vetores de pólen e são, na maioria dos casos, xenógamas, sendo a autogamia rara (van der Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1993 *apud* Saddi, 2008). Nas espécies que apresentam este sistema reprodutivo, o rostelo é curto ou rudimentar, permitindo que os grãos de pólen tenham contato com a área estigmática (Dodson, 1969; Singer & Sazima, 2001a, b).

Uma característica bastante conhecida da família Orchidaceae é a potencialidade para formar híbridos interespecíficos. A coexistência natural de espécies relacionadas e a manutenção da integridade das mesmas só são possíveis se existem mecanismos eficientes capazes de conter o fluxo genético entre elas. A hibridação é evitada principalmente pela existência de barreiras pré-polinização, podendo ser mecânicas (quando relacionadas a mecanismos da própria flor) ou ecológicas (pela presença de polinizadores específicos ou através da separação temporal da floração) (Dodson, 1969;

Coleta & Stort, 1976; Dressler, 1990; Paulus & Gack, 1990; Pansarin & Amaral, 2008a). Também podem ocorrer barreiras pós-polinização tais como morte do zigoto ou inviabilidade do híbrido (incapaz de procriar) (Dressler, 1990).

O elevado nível de compatibilidade reprodutiva na subtribo Laellinae, incluindo o gênero *Epidendrum* (Lenz & Wimber, 1959; Pansarin & Amaral, 2008a), associado a barreiras pré-polinização fracas ou ausentes resultam em eventuais hibridizações em populações naturais (Dunsteville, 1979; Hágsater, 1984; Dressler, 1990).

Estudos sobre a reprodução de espécies de *Epidendrum* indicam o grupo dos Lepidópteros como os principais polinizadores das espécies: ninfalídeos da subfamília Ithomiinae, espécies de Hesperiiidae e mariposas da família Artiidae polinizam *E. paniculatum* Ruiz & Pávon em mata semidecídua de altitude, na Serra do Japi, SP. (Pansarin, 2003). Dodson & Frymine (1961) registram *Urbanus proteus* Linné 1758 (Hesperiiidae) como polinizador de *E. secundum* Jacq. na América Central. Outro estudo aponta visitas de outras borboletas da família Hesperiiidae e de beija-flor do gênero *Amazilia* (Pansarin & Amaral, 2008b). Na Costa Rica, van der Pijl & Dodson (1966) relatam uma espécie não identificada de Hesperiiidae e *Papilio polysemes* (Papilionidae) como polinizadores de *E. secundum*.

Algumas espécies de *Epidendrum* do “complexo *Epidendrum secundum*”, *E. ibaguense* H.B.K. e *E. radicans* (Lindl.) Pávon, não produzem néctar e mimetizam espécies de *Lantana* e *Asclepias*, sendo polinizadas por engano (Boyden, 1980). Assim, a presença de nectários florais parece variável no gênero, uma vez que Reis *et al.* (2004) referem-se a *E. secundum* e *E. paniculatum* como espécies nectaríferas e Moreira *et al.* (2008) descrevem estruturas tricômicas nectaríferas, localizadas na coluna das flores de *E. fulgens* Brongn.

Segundo Rodarte (2008), na restinga de Maricá, RJ, ocorrem duas espécies do gênero *Epidendrum*: *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. Estas duas espécies florescem e frutificam sincronicamente ao longo de todo o ano. As flores de *E. denticulatum* são rosadas, com guias de cor branca, ao passo que as de *E. orchidiflorum* são verdes e desprovidas de contrastes de cor na corola. Além disso as espécies estão amplamente distribuídas e agrupadas indicando que ocorra propagação vegetativa. A propagação vegetativa é uma estratégia de sobrevivência de espécies alógamas e na natureza se dá quando a espécie encontra-se afetada no seu sistema reprodutivo principal, especialmente em plantas providas de bulbos e rizomas (Rosse *et al.*, 1997).

Almeida & Figueiredo (2003), em estudo sobre a biologia de *E. denticulatum*, não identificaram néctar nas flores, interpretando o sistema de polinização como deceptivo.

Com relação a *Epidendrum orchidiflorum*, não existem informações sobre a biologia reprodutiva ou sobre mecanismos de polinização. No entanto, há estudo realizado na Amazônia Central referente à anatomia ecológica foliar e da raiz e aspectos ecofisiológicos, no qual *E. orchidiflorum* (= *E. huebneri*) é descrita como epífita e secundariamente pseudoterrestre na campina aberta ou sombreada, perene, sempre verde, heliófila, umbrófila e apresentando metabolismo CAM (Bonates, 2007).

As orquídeas possuem papel importante na flora das Unidades de Conservação e, somente quando há um conhecimento sobre o habitat, a biologia, a ecologia e o tamanho das populações, é possível programar estratégias de conservação apropriadas para as espécies (Cribb *et al.*, 2003). Apesar do crescente aumento dos estudos de biologia reprodutiva de Orchidaceae, inclusive no Brasil, poucos estudos apresentam uma abordagem comparativa entre espécies de uma determinada área, especialmente de restinga.

O presente trabalho tem como objetivo estudar duas espécies simpátricas de Orchidaceae, *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. *ex* Lindl., quanto à fenologia, biologia floral, sistema reprodutivo e anatomia das estruturas secretoras, em especial aquelas secretoras de recurso floral e busca respostas para as seguintes questões: 1- As espécies estudadas oferecem néctar como recurso floral para polinizadores? 2- Há mecanismos que impedem ou dificultam polinizações interespecíficas e, caso isso se confirme, são relativos a aspectos da morfologia e da biologia das flores? 3- Embora as duas espécies floresçam ao longo do ano, ocorrem picos de intensidade diferentes para as mesmas? 4- Qual a importância da propagação vegetativa na manutenção e crescimento das populações de ambas as espécies na restinga?

2 - Materiais e Métodos

2.1 - Área de estudo

2.1.1 – Localização e descrição

O estudo foi realizado durante o período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011, em área de vegetação de restinga, na Área de Proteção Ambiental (APA) de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil, entre os distritos de Barra de Maricá e Itaipuaçu (22°53' a 22°52'S e 42°52' a 42°51'W).

A área da APA é composta por dois cordões arenosos (interno e externo), separados por uma depressão (brejos) (Fig.1). As observações de campo foram feitas na restinga interna, abrangendo três fisionomias da vegetação: arbustiva aberta inundável - AAI, arbustiva aberta não inundável (fisionomia de moitas intercaladas por áreas desnudas) – AANI e arbustiva fechada não inundável - AFNI (Menezes *et.al.*, 2005) (Fig. 2).



FIGURA 1: Aspecto geral da restinga e local de estudo na Área de Proteção Ambiental (APA) de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil.



FIGURA 2: Localização da área de estudo no cordão interno da Área de Proteção Ambiental (APA) de Maricá, Rio de Janeiro, Brasil, mostrando as três fisionomias da vegetação em vista aérea. AAI, AANI (evidenciado em círculo vermelho), AFNI.
Fonte: <http://maps.google.com>

2.1.2 - Características climáticas

Segundo a classificação de Köeppen (1948), o clima da região é do tipo Aw tropical chuvoso, apresentando precipitação pluviométrica média anual de 1130 mm, concentrada no verão e reduzida no inverno, sem estação seca. A temperatura média anual é de 23,6°C, com médias anuais das temperaturas máximas de 28,0°C, e das mínimas, de 15,3°C, sendo julho o mês mais frio e fevereiro o mês mais quente (Mantovani & Iglesias, 2001). Os dados de temperatura e precipitação pluviométrica para Maricá, durante o período de estudos encontram-se na Fig. 3.

2.2 - Estudo fenológico e distribuição das espécies estudadas

Para a análise fenológica registraram-se, uma vez por semana, as fenofases reprodutivas das duas espécies, ao longo de um ano (março de 2010 a abril de 2011). Para cada espécie, foram selecionados e etiquetados, ao acaso, 14 indivíduos, apresentando entre 04 e 10 rametos. Para cada rameto foi registrado: o número de inflorescências, botões, flores e frutos. Esses dados foram organizados em planilhas e

posteriormente foram utilizados na confecção de gráficos fenológicos dos eventos acompanhados.

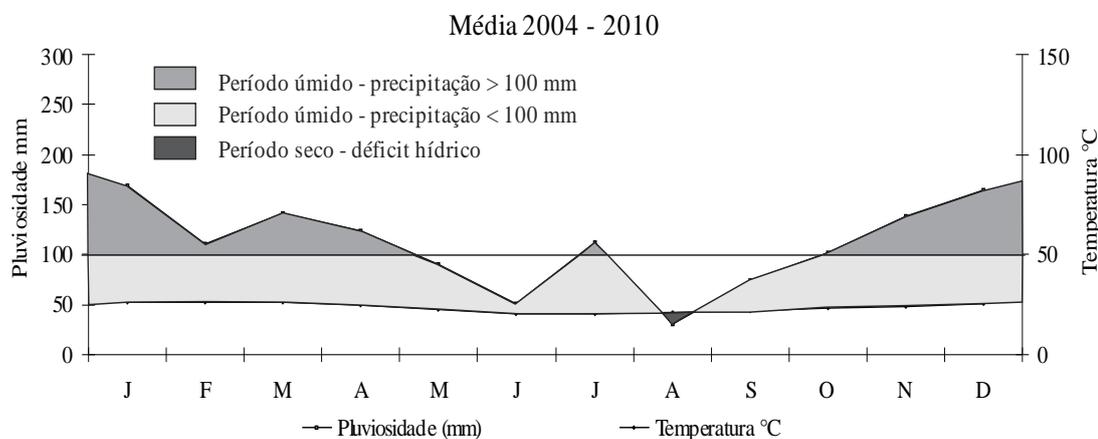


FIGURA 3: Dados médios de temperatura (°C) e de precipitação pluviométrica total (mm) para a região de Maricá, no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2010. Dados cedidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) – Estação N° 83089.

A intensidade de cada evento fenológico (emissão de botões, emissão de flores e frutos), ao longo das semanas, foi avaliada utilizando-se uma escala semi-quantitativa, variando de 0 a 4 (Fournier, 1974), onde: (0) – ausência do evento, (1) – entre 1 e 25% dos rametos exibindo o evento, (2) – entre 26 e 50 % dos rametos exibindo o evento, (3) – entre 51 e 75% dos rametos exibindo o evento e (4) – entre 76 e 100% dos rametos exibindo o evento. O valor mensal que cada indivíduo alcançou na escala de Fournier foi aquele considerado o mais expressivo no mês. O percentual de intensidade (% Fournier) foi calculado mensalmente para cada espécie, da seguinte maneira: somaram-se os valores da escala de Fournier obtidos para todos os indivíduos expressando uma determinada fenofase no mês e dividiu-se pelo valor máximo possível da referida escala (neste caso, 4) multiplicado por N (número total de indivíduos amostrados). O valor obtido foi multiplicado por 100 e transformado em percentual, sendo utilizado para expressar, a cada mês, a intensidade de uma determinada fenofase (Fournier, 1974).

$$\text{Percentual de intensidade} = \frac{\sum \text{Fournier}}{4 \times N} \times 100$$

Para calcular o percentual de atividade de uma fenofase, foi utilizado o método de Bencke & Morellato (2002), que considera, mensalmente, presença ou ausência da fenofase nos indivíduos, ao longo do ano. Além disso, estima a sincronia do evento, levando em conta que quanto maior o número de indivíduos manifestando uma fenofase, maior é a sincronia da mesma.

Todos os indivíduos de ambas as espécies encontrados foram marcados com auxílio de GPS (Garmin e Trex Legend Cx), ao longo de uma área de cerca de 6ha, sobre o cordão interno da restinga, passando pelas fisionomias: arbustiva aberta inundável, arbustiva aberta não inundável (moitas intercaladas com espaços de desnudos) e arbustiva fechada.

2.3 - Biologia floral

A análise da biologia floral foi realizada no campo, no laboratório de Biologia Reprodutiva do Departamento de Botânica e na Casa de Vegetação do Horto Botânico do Museu Nacional (UFRJ). Foram realizadas as seguintes observações: morfologia, morfometria (diâmetro ou largura e comprimento: sépalas, pétalase labelo, coluna, ovário), cor, forma (Faegri & van der Pijl, 1979), horário de abertura floral, período da longevidade foi considerado com a presença da polínia, presença de odor e natureza do recurso floral disponibilizado.

2.3.1 - Osmóforos

A pesquisa de osmóforos foi realizada com flores frescas mergulhadas em solução de vermelho neutro em diluição 1:1000 (Vogel, 1990; Dafni, 1992). A percepção de odores florais foi feita a partir de flores frescas colocadas em frascos de vidro, mantidos tampados por cerca de 30 minutos para melhor concentração do odor; partes florais foram testadas separadamente para identificar possíveis áreas correspondentes aos osmóforos.

2.4 - Anatomia floral

Flores em antese provenientes de indivíduos naturais da restinga foram coletadas. As amostras foram fixadas em solução de formaldeído 4% + glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,2 (Gahan, 1984), submetidas a baixa pressão, desidratadas em série etanólica, emblocadas em Historesin ® (Leica) e

seccionadas com navalha de vidro, em micrótomo rotativo, modelos Spencer 820 (American Optical Co) e RM 2255 (Leica). Secções seriadas de 1-3µm de espessura foram coradas com Azul de Toluidina a 0,05 % (Feder & O'Brien, 1968).

Para detectar as principais classes de metabólitos nas células, secções de material embocado e fresco, obtidas em micrótomo rotativo e de Ranvier, respectivamente, foram tratadas com: (a) Sudan III e IV, para detectar a presença de lipídeos em geral (Johansen, 1940); (b) dicromato de potássio 10%, para compostos fenólicos (Gabe, 1968); (c) Vermelho de Rutênio, para substâncias pécticas (Johansen, 1940); (d) reagente de Fehling, para açúcares redutores (Purvis *et al.*, 1964); (e) Lugol, para amido (Johansen, 1940) e (f) ácidos periódicos- reagente de Schiff (PAS), para polissacarídeos neutros (Taboga & Vilamaior, 2001; Amaral *et al.*, 2001).

As observações e microfotografias foram realizadas em microscópio Olympus BX-51 com sistema de captura composto por câmera Qcolor 5 e Software Image-Pro Express. As imagens foram editadas no Software Adobe® Photoshop® 7.0 e as pranchas montadas utilizando o Corel DRAW®12.

2.5 – Microscopia de varredura

Flores foram coletadas e fixadas imediatamente após sua retirada dos rametos, em paraformaldeído 4% + glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,2 (Gahan, 1984) e submetidas a baixa pressão. As amostras foram desidratadas em série alcoólicas e submetidas ao ponto crítico no laboratório de Microscopia eletrônica da Universidade Santa Úrsula.

Após este processo, as flores foram metalizadas com fina camada de ouro paládio, por 3 minutos (Denton Vacuum - Desk IV) e observadas em MEV (microscopia eletrônica de varredura - JEOL JSM/6390LV) no laboratório de microscopia eletrônica do Museu Nacional (RJ).

2.6 - Visitantes florais

O registro direto de visitantes florais em *E. denticulatum* foi feito a partir de observações focais, contando com um esforço de 20 horas.

A frequência de visitas e a eficiência da polinização das duas espécies foram estimadas, indiretamente, a partir das taxas de remoção e de deposição de polinários. Para tal, mensalmente, ao longo de um ano, flores foram coletadas ao acaso e analisadas sob microscópio estereoscópio quanto à remoção e deposição de polinário.

Para verificar a ocorrência de polinização noturna em *E. orchidiflorum* foram marcadas flores com polínias no final da tarde (17h); na manhã seguinte (6h), foram avaliadas quanto à remoção dos polinários. As observações prolongaram-se até o final da tarde (17h) para observação de remoção de polinários durante o dia. O experimento foi repetido em dois dias do mês de fevereiro (pico de floração), tendo sido acompanhadas 103 flores.

2.7 - Sistema reprodutivo

Para o estudo do sistema reprodutivo foram utilizadas técnicas de polinização manual. Para tal, botões florais foram isolados com sacos de voil e receberam os seguintes tratamentos: 1- nenhuma manipulação, para verificar a ocorrência de autopolinização espontânea; 2- autopolinização manual, para verificar a presença de sistemas de autoincompatibilidade; 3- polinização cruzada (xenogamia) manual (intra e interespecíficas); 4- flores não manipuladas e não ensacadas foram marcadas e utilizadas como controle para estimar a produção de frutos em condições naturais. Em todos os casos, os frutos resultantes foram acompanhados até a liberação das sementes.

Para estabelecer-se o grau de autocompatibilidade, calculou-se o índice de autocompatibilidade (IAc), conforme Lloyd & Shoen (1992), que é o resultado da divisão entre a percentagem de frutos formados por polinizações manuais que resultam em autofertilização (autogamia e geitonogamia) e a percentagem de frutos formados por polinizações cruzadas que resultam em fertilização cruzada (xenogamia). Plantas com IAc superior 0,75 são consideradas autocompatíveis.

2.8 - Viabilidade das sementes

Para observar a qualidade e viabilidade das sementes produzidas, frutos foram coletados e mensurados quanto ao comprimento e diâmetro. As sementes dos mesmos foram analisadas, considerando-se férteis, as sementes com embrião de cor verde claro, visíveis por transparência, e estéreis aquelas sem embrião.

O material testemunho 01 – *Epidendrum denticulatum* Barb.Rodr. e 02 – *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. encontra-se depositado no Herbário do Museu Nacional (R) – UFRJ.

3 - Resultados

3.1 – Distribuição das espécies

Epidendrum denticulatum e *E. orchidiflorum* ocorrem em simpatria na área de estudo, principalmente na fisionomia arbustiva aberta não inundável (AANI), com muitos indivíduos tanto nas bordas como no interior das moitas. *Epidendrum denticulatum* também pode ser encontrada, com frequência, na fisionomia arbustiva aberta inundável (AAI), onde *E. orchidiflorum* é rara. Na fisionomia arbustiva fechada não inundável *E. orchidiflorum* é frequente, ao passo que *E. denticulatum* é rara (Fig. 4).

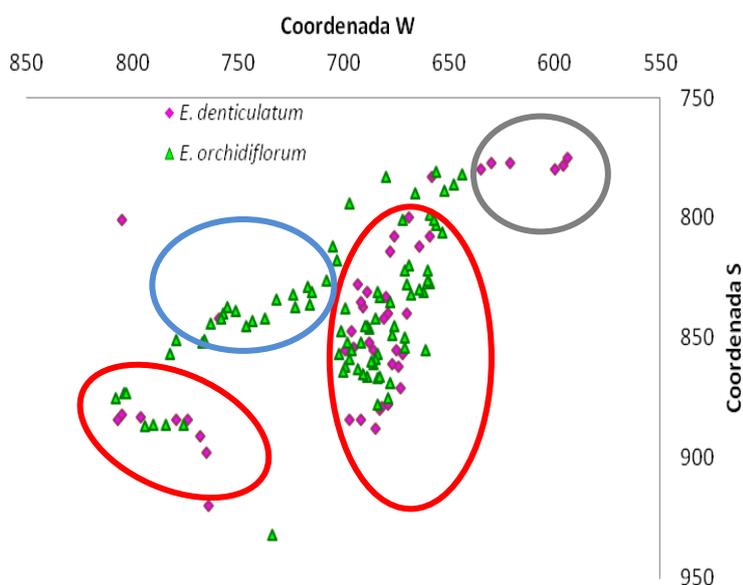


FIGURA 4: Distribuição de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (em verde) e de *Epidendrum denticulatum* Bar. Rodr. (em rosa), na área de estudo de Maricá, Rio de Janeiro, período de março de 2010 a fevereiro de 2011. As áreas dentro do círculo vermelho = arbustiva aberta não inundável (moitas), círculo azul = arbustiva fechada, círculo cinza = arbustiva aberta inundável.

3.2 – Morfologia e Biologia floral

As duas espécies são terrestres, raramente epífitas e de hábito herbáceo. Apresentam folhas coriáceo-carnosas, oblongas e verdes, observando-se pigmentação avermelhada em diversas fases do desenvolvimento (Figs. 5A e 6A). As inflorescências são racemosas, eretas, terminais, inseridas no ápice do caule, com número variável de

flores. As espécies diferenciam-se pelas flores, principalmente pela cor, tamanho e a posição do labelo (Figs. 5B, C e 6B, C).

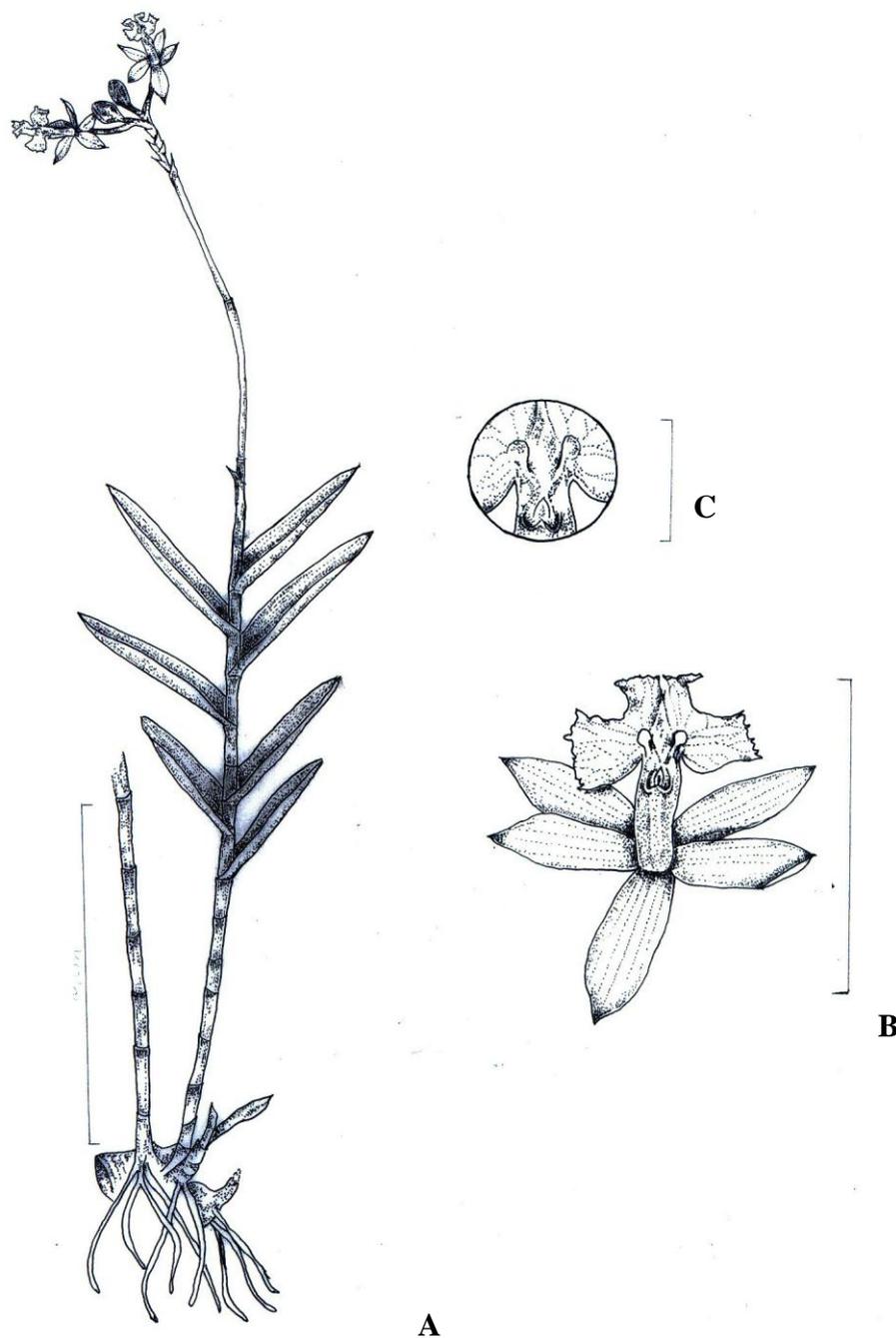


FIGURA 5: *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. Morfologia geral de uma planta florida – raiz, caule, folhas, flor e botão (A), flor (B) e detalhe do labelo (C). Esc.1:20

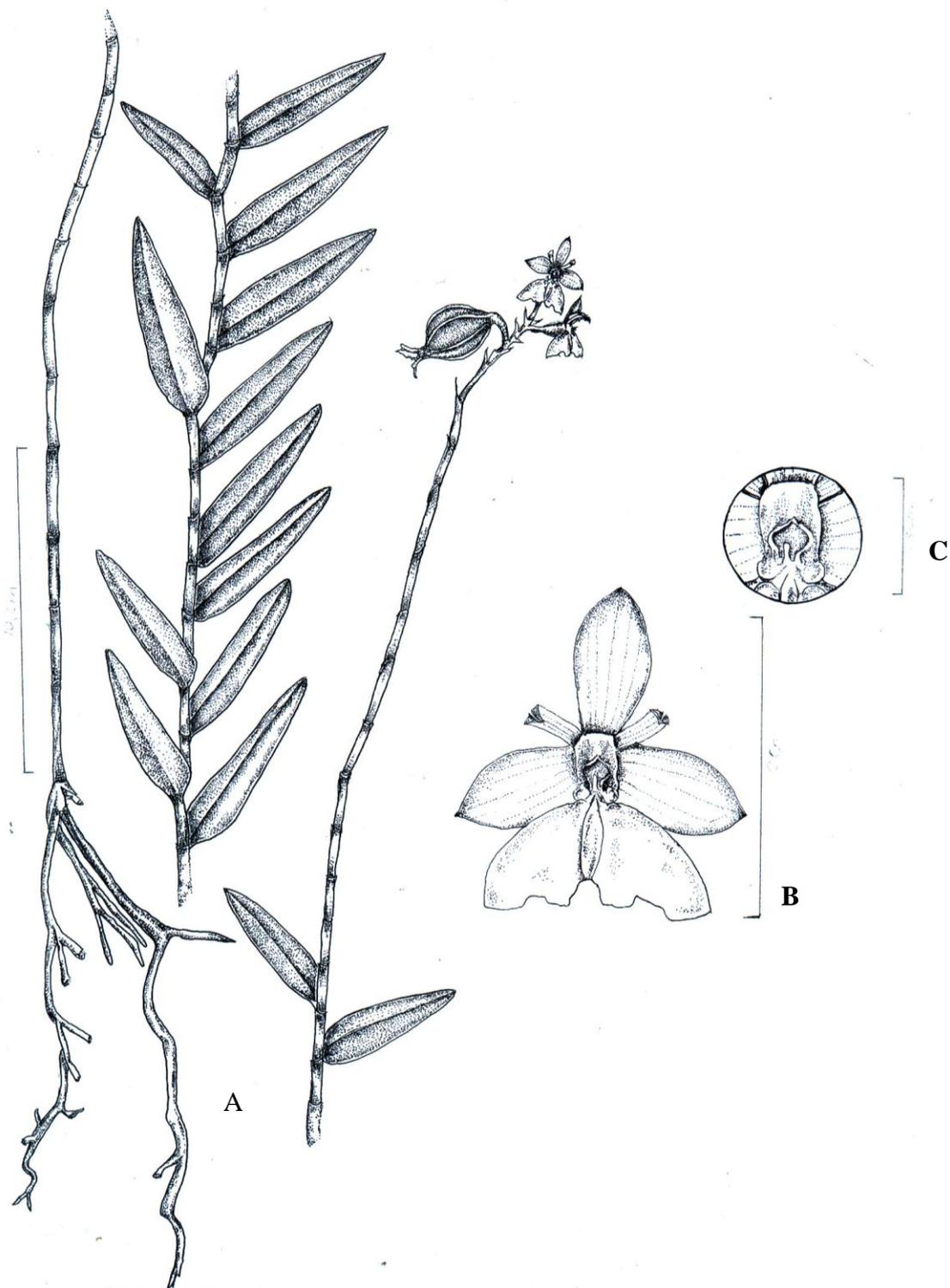


FIGURA 6: *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. Morfologia geral de uma planta florida – raiz, caule, folhas, flor e fruto (A), flor (B) e detalhe do labelo (C). Esc.1:20

As flores estão dispostas em inflorescência racemosa, ereta, terminal, inserida no ápice do caule, com número variável de flores. O número de flores por inflorescência varia de 1 a 13 (N=114) para *E. denticulatum* e de 1 a 8 (N=121) para *E. orchidiflorum* (Fig. 7A e B).



FIGURA 7: Inflorescências de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (A) e de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (B), na área de estudo na restinga da APA de Maricá, Rio de Janeiro.

As flores de *E. denticulatum* são diurnas, nectaríferas, conspícuas, coloridas, apresentando contraste da cor rosa das pétalas e sépalas com o branco das calosidades do labelo (Fig. 8). Apresentam duas sépalas laterais, uma sépala dorsal e pétalas laterais oblanceoladas. O labelo é trilobado com um par de calosidades ovoides, basais, que variam de 3-4mm de comprimento e 2-3mm de largura, e uma quilha alva. As flores não são ressupinadas e o labelo encontra-se em posição vertical e não serve como campo de pouso; a sépala dorsal é utilizada para tal função. A coluna é de coloração rosa, com cerca de 6-8mm de comprimento. O polinário apresenta dois pares de polínias amarelas do tipo ceróide. O ovário é ínfero, unilocular, multiovulado, com cerca de 5-7mm de comprimento. As medidas referentes às estruturas florais estão resumidas nas tabelas 1 e 2.

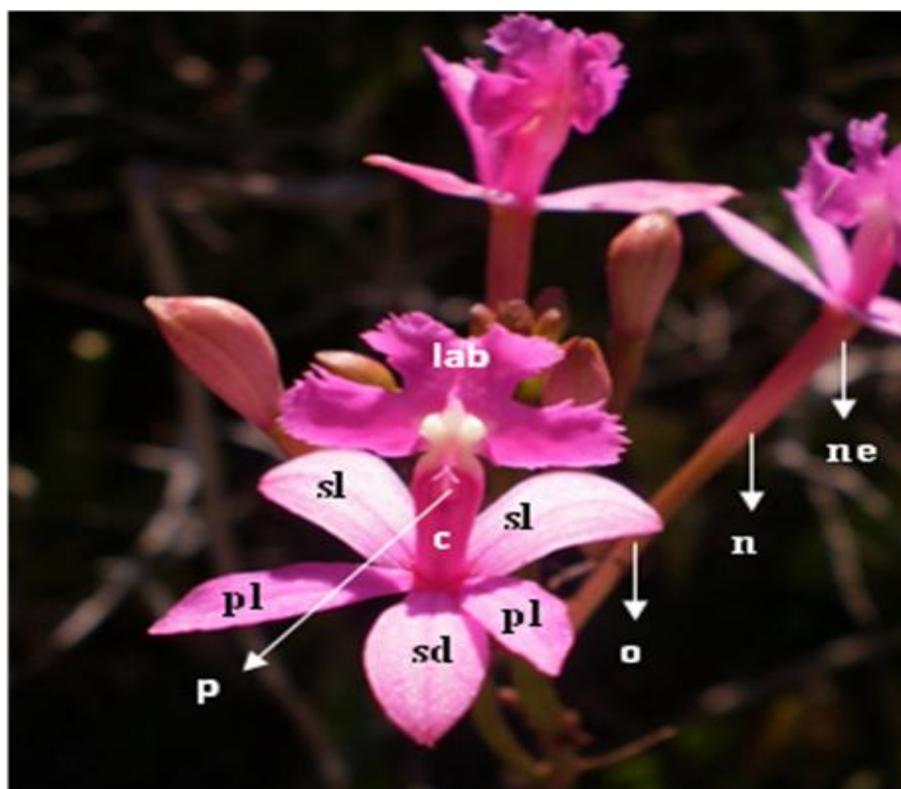


FIGURA 8: Morfologia da flor de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (sd = sépala dorsal; sl = sépala lateral; pl = pétala lateral; lab = labelo; c = coluna; n = nectário floral nupcial; o = ovário; p = polinário; ne = nectário floral extranupcial).

Em *E. denticulatum* a abertura floral é um processo longo, que leva aproximadamente 12 horas, começando no fim da tarde e estendendo-se até o início da manhã seguinte. Primeiramente as sépalas laterais deslocam-se, dando origem a uma pequena abertura (Fig. 9B) por onde a sépala dorsal emerge; em seguida, as sépalas laterais, pétalas laterais e o labelo formam uma espécie de “leque” (Fig. 9C e D) e, lentamente, vão tomando as suas posições na flor em antese (Fig. 9E). A abertura floral completa-se entre 07h30min e 8h da manhã seguinte (Fig. 9F).

Quanto à longevidade, as flores de *E. denticulatum* duram de 10 a 15 dias (n=10), caso o polinário não seja retirado. Com a retirada desta estrutura, a flor começa a senescer em 48 horas (n=5), ocorrendo primeiramente o murchamento do labelo, fenescendo após 24 horas



FIGURA 9 : Etapas da abertura floral em *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (A= botão em pré-antese (seta); B= Deslocamento das sépalas laterais (seta); C e D= Expansão da sépala dorsal (seta) e aspecto semelhante a leque (estrela); E= Tomando posições na flor em antese; F= Flor em antese).

As flores de *E. orchidiflorum* são verdes e desprovidas de contrastes de cor na corola, apresentam duas sépalas laterais, uma sépala dorsal e duas pétalas laterais oblanceoladas. Ocorre ressupinação e o labelo encontra-se em posição horizontal, servindo como possível campo de pouso. O labelo é trilobado, com um par de calosidades ovoides, basais, verdes, de 3-4mm de comprimento e 2mm de largura; o labelo mediano é bipartido, com margem fimbriada. A coluna é verde, de cerca de 6-7mm de comprimento. O polinário apresenta dois pares de polínias amarelas e do tipo ceroide. O ovário é ínfero, unilocular, multiovulado, com 5-6 mm de comprimento (Figs. 10 e 11).

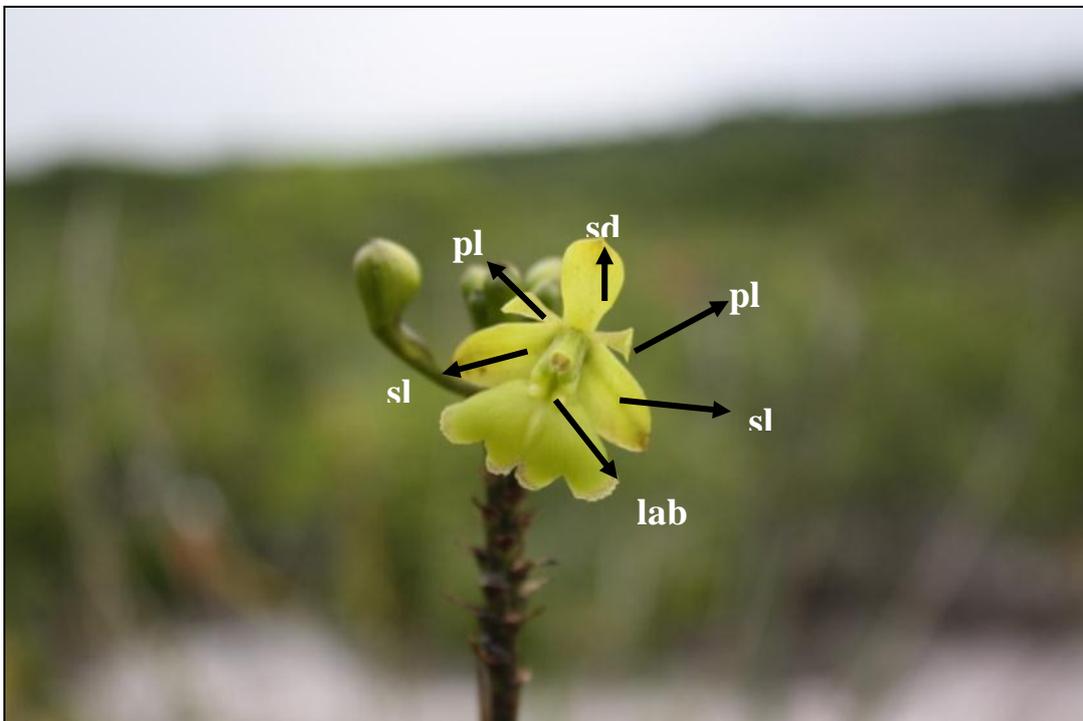


FIGURA 10: Morfologia da flor de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (pl = pétala lateral; sl = sépala lateral; sd = sépala dorsal; lab = labelo).

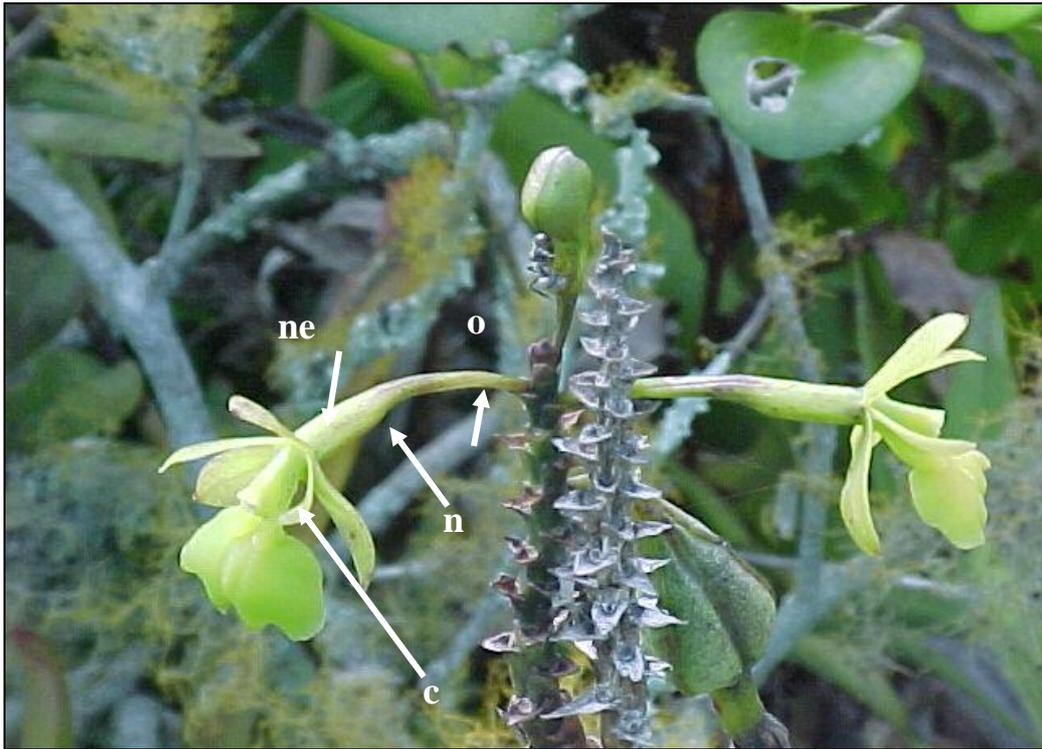


FIGURA 11: Morfologia da flor de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (o = ovário; c = coluna; n = nectário nupcial; ne = nectário extranupcial).

A abertura floral começa ao anoitecer, precisando de duas noites para atingir o início da antese. Na primeira noite as sépalas laterais deslocam-se bem lentamente, sendo possível visualizar o labelo no interior da flor semiaberta, que permanece assim, durante todo o dia subsequente (Fig. 12 B, C e D); no início da segunda noite, o labelo expande-se, seguido da sépala dorsal e por último das pétalas laterais (Fig. 12 E- F); a ressupinação ocorre lentamente ao longo da abertura floral (Fig. 12 G).

As medidas referentes às estruturas florais estão resumidas nas Tabelas 1 e 2.

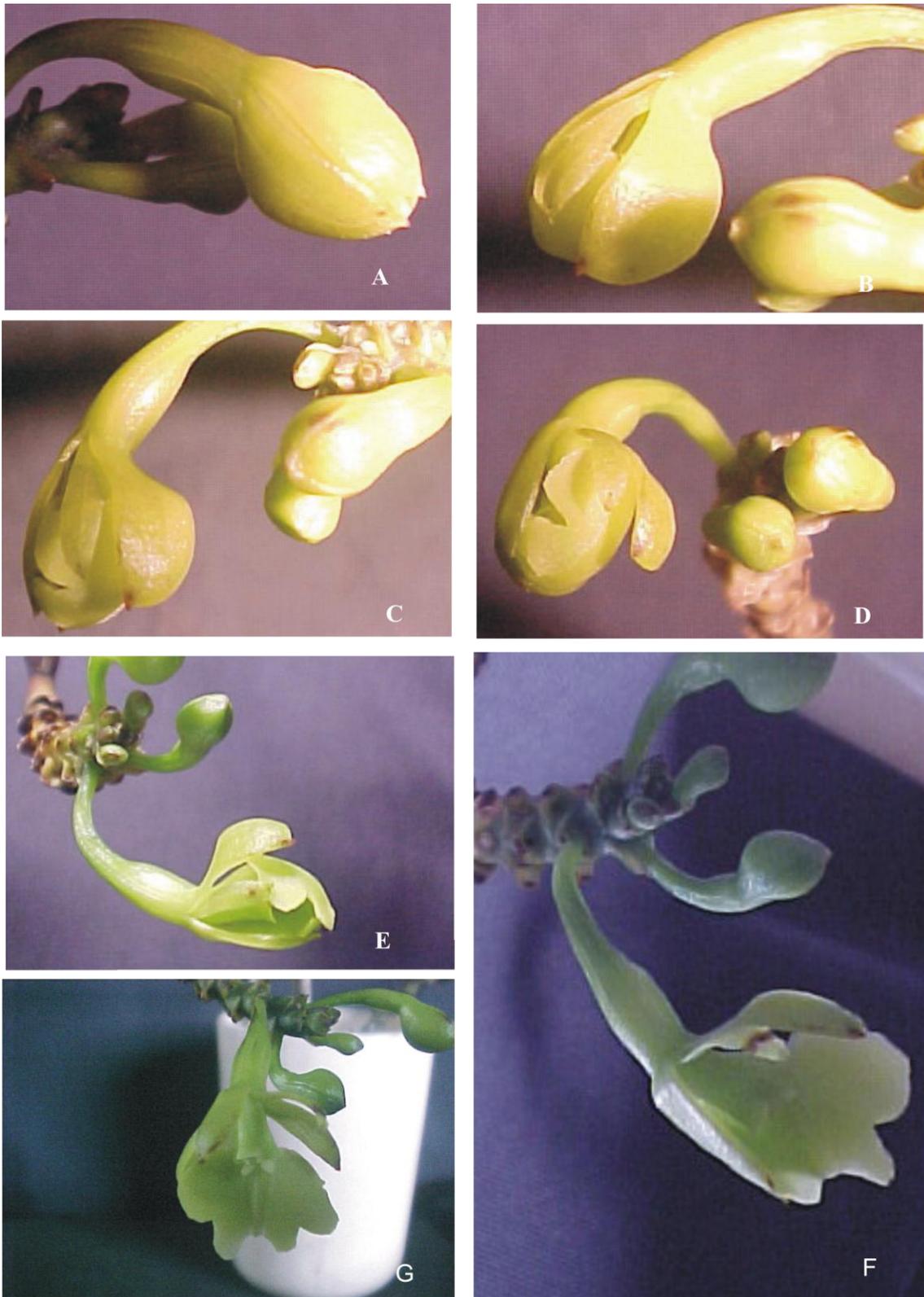


FIGURA 12: Etapas da abertura floral em *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl.
 (A= botão em pré-antese; B= expansão da sépala dorsal; C-D = deslocamento das sépalas laterais e sépala dorsal; E= expansão do labelo; F= expansão semelhante a uma concha; G= lentamente tomando as posições na flor em antese.

TABELA 1: Morfometria das estruturas florais de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. na APA de Maricá, Rio de Janeiro. (média em mm \pm desvio padrão; c= comprimento, l= largura, n=30 para ambas as espécies).

Espécies	Sépala				Pétala		Labelo	
	dorsal		lateral		lateral		c	l
	c	l	c	l	c	l		
<i>E. denticulatum</i> 	9,97	4,10	10,40	4,37	10,13	3,33	5,87	11,43
	$\pm 0,93$	$\pm 0,47$	$\pm 0,84$	$\pm 0,55$	$\pm 0,88$	$\pm 0,47$	$\pm 0,62$	$\pm 1,09$
<i>E. orchidiflorum</i> 	12,23	5,37	12,73	7,27	11,80	2,00	9,97	17,50
	$\pm 0,86$	$\pm 0,89$	$\pm 0,91$	$\pm 0,74$	$\pm 0,81$	± 0	$\pm 1,13$	$\pm 1,41$

TABELA 2: Morfometria das estruturas florais de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. na APA de Maricá, Rio de Janeiro. (média em mm \pm desvio padrão; c= comprimento, l= largura, n=30 para ambas as espécies).

Espécies	Labelo						Coluna	
	lóbulo lateral		lóbulo central		Calo		c	l
	c	l	c	l	c	l		
<i>E. denticulatum</i> 	5,27	6,13	4,07	6,57	3,13	2,17	6,27	2,00
	$\pm 0,93$	$\pm 0,85$	$\pm 0,44$	$\pm 0,62$	$\pm 0,34$	$\pm 0,37$	$\pm 0,44$	$\pm 0,00$
<i>E. orchidiflorum</i> 	7,97	10,07	3,33	8,00	1,97	3,47	6,40	3,67
	$\pm 0,93$	$\pm 1,08$	$\pm 0,99$	$\pm 1,08$	$\pm 0,18$	$\pm 0,31$	$\pm 0,50$	$\pm 0,4$

3.2.1 – Nectários: nupcial e extranupcial

Ocorrem nas flores de *Epidendrum denticulatum* e *E. orchidiflorum* dois tipos de nectários (nupcial e extranupcial). Em ambas as espécies, o nectário floral nupcial, denominado de tubular ou do tipo cunículo, é adnato à coluna e ao tubo floral na região entre a base do perianto e o ovário. Os nectários nupciais diferenciam-se quanto ao tamanho: em *E. denticulatum* cerca de 8-12mm de comprimento e em *E. orchidiflorum* cerca de 7 - 10 mm de comprimento (Figs. 13A e B).

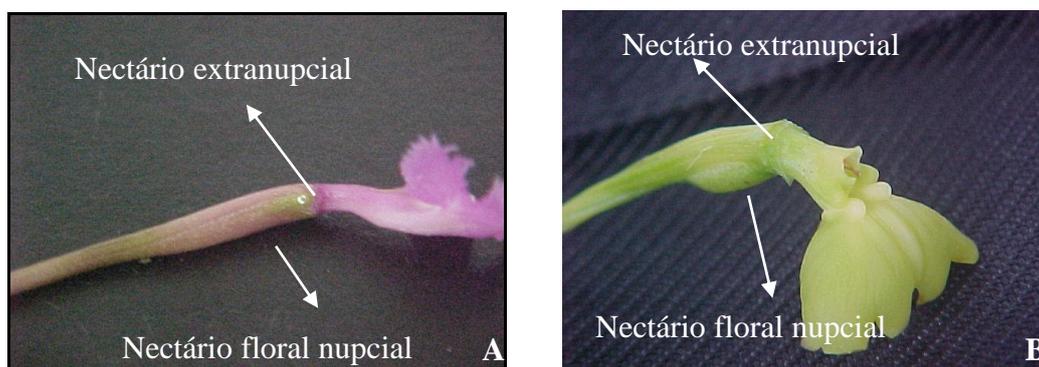


FIGURA 13: Posição dos nectários de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (A) e de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (B).

Ambas as espécies apresentam nectário extrafloral nos prófilos (Fig. 14 A e B). *Epidendrum denticulatum* apresenta, ainda, nectários no pecíolo.



FIGURA 14: Nectário extrafloral nos prófilos (setas) de (A)= *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e (B)= *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl.

Em *Epidendrum denticulatum* o nectário nupcial está localizado na parte interna do tubo floral, sendo constituído por epiderme e uma a duas camadas subepidérmicas, cujas células apresentam paredes espessas. A epiderme é uniestratificada, apresenta tricomas unicelulares e cutícula lisa (Figs. 15B e C). Nessas três camadas estão presentes compostos fenólicos e açúcares (Figs. 15F, G e H).

No parênquima fundamental pode-se perceber a presença de vários feixes vasculares e idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio em forma de ráfides (Figs. 15D e E).

Ainda no tubo floral, logo abaixo da inserção das sépalas laterais, estão presentes nectários extranupciais, frequentemente visitados por formigas. Estruturalmente estes nectários são constituídos por epiderme papilosa recoberta por cutícula estriada (Fig. 16 A-D).

Em *Epidendrum orchidiflorum* o nectário floral nupcial está localizado na face interna do tubo floral, sendo constituído pela epiderme e uma a duas camadas subepidérmicas. A epiderme é uniestratificada com células papilosas e cutícula lisa a levemente estriada. No estágio pós-secretor as células epidérmicas perdem a turgidez e o aspecto papiloso. Nestas células estão presentes compostos fenólicos e açúcares.

No parênquima fundamental pode-se perceber a presença de vários feixes vasculares e idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio em forma de ráfides (Fig. 17 A-F).

As flores apresentam logo abaixo da inserção das sépalas laterais, dois nectários extranupciais, que micromorfologicamente configuram pequenas protuberâncias. O exsudato é facilmente perceptível (Fig. 18 A).

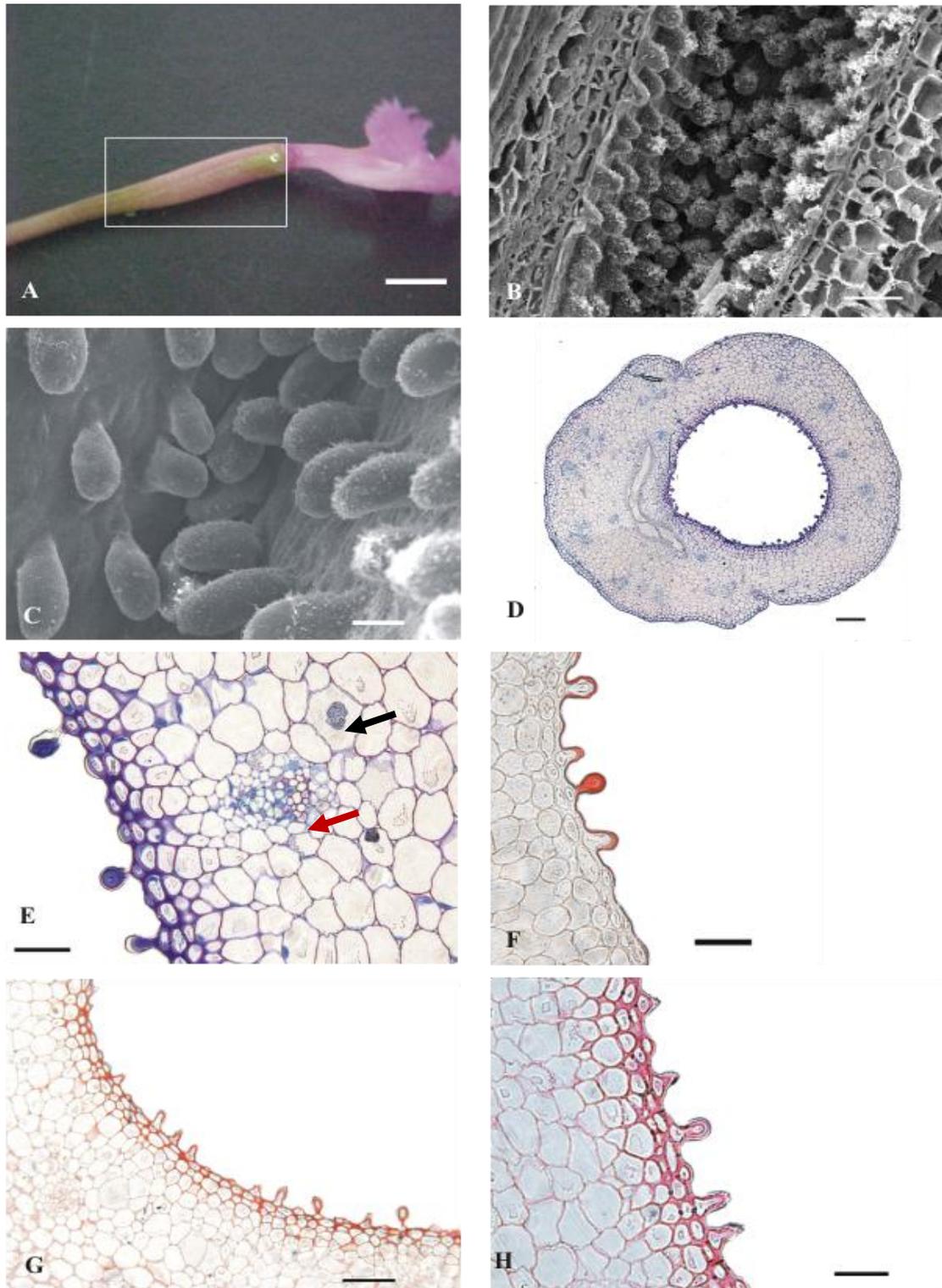


FIGURA 15: Nectário nupcial de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (A= Posição; B= Os tricomas glandulares e a secreção em MEV; C= Detalhe dos tricomas glandulares em MEV ; D= Aspecto geral; E= Face interna: tricomas glandulares, feixes vasculares (seta vermelha) e idioblastos contendo ráfides (seta preta); F= Presença de lipídeos; G= Presença de polissacarídeo ácido; H= Presença de polissacarídeos neutros (escala/barras – Fig. A=5 mm; Fig. C=20 μ m; Figs. B,E,F,H=50 μ m; Fig. D=200 μ m; Fig. G=100 μ m).

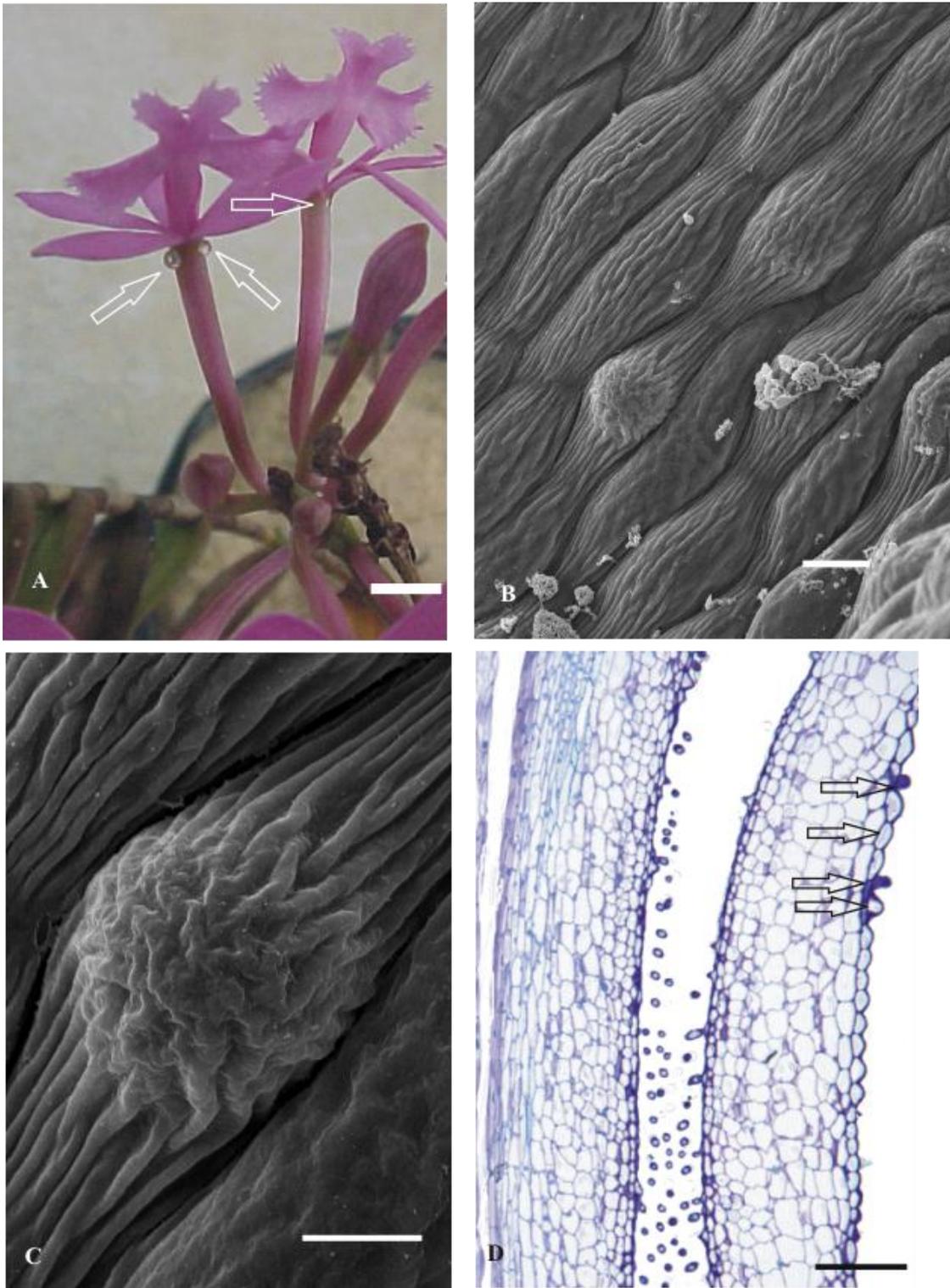


FIGURA 16: Nectário extranupcial de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (A= Localização (setas); B= Aspecto geral da epiderme papilosa em MEV; C= Detalhe da papila em MEV; D= Aspecto geral anatômico da epiderme papilosa (setas) (escala/barra – Fig. A= 5 mm; Fig. B=20 μ m; Fig. C=10 μ m; Fig. D=200 μ m).

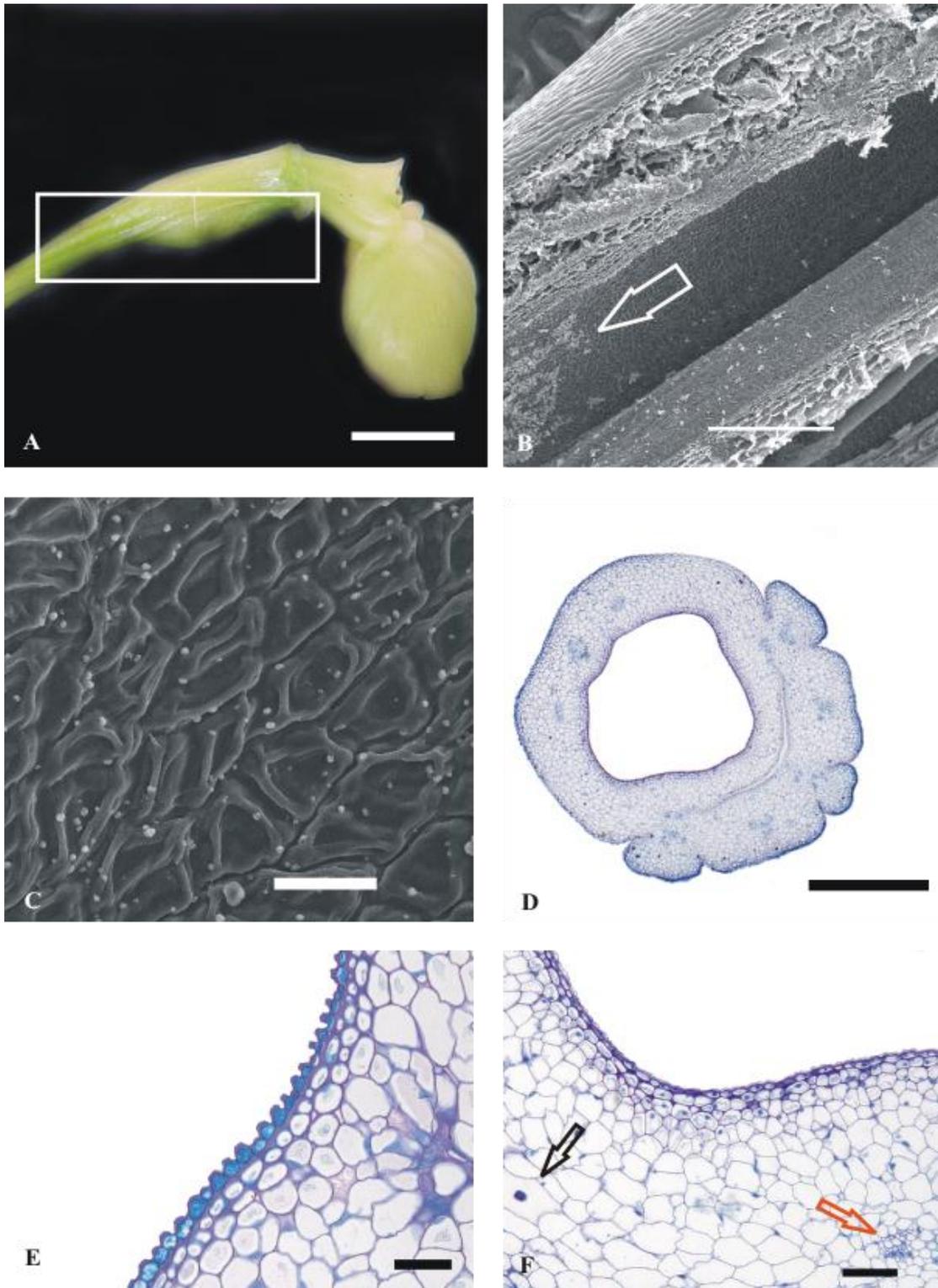


FIGURA 17: Nectário nupcial de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (A= Localização; B= Aspecto geral em MEV; C= Detalhe da região interna evidenciando secreção; D= Corte transversal; E= Detalhe da face interna evidenciando a epiderme com células papilosas de citoplasma denso; F= Detalhe da face interna evidenciando o estágio pós-secretor; feixes vasculares (seta vermelha) e idioblastos com ráfides (seta preta) (escala/barra – Fig. A=4mm; Fig. B=500µm; Figs. C,E,F=50µm; Fig. D=200µm).

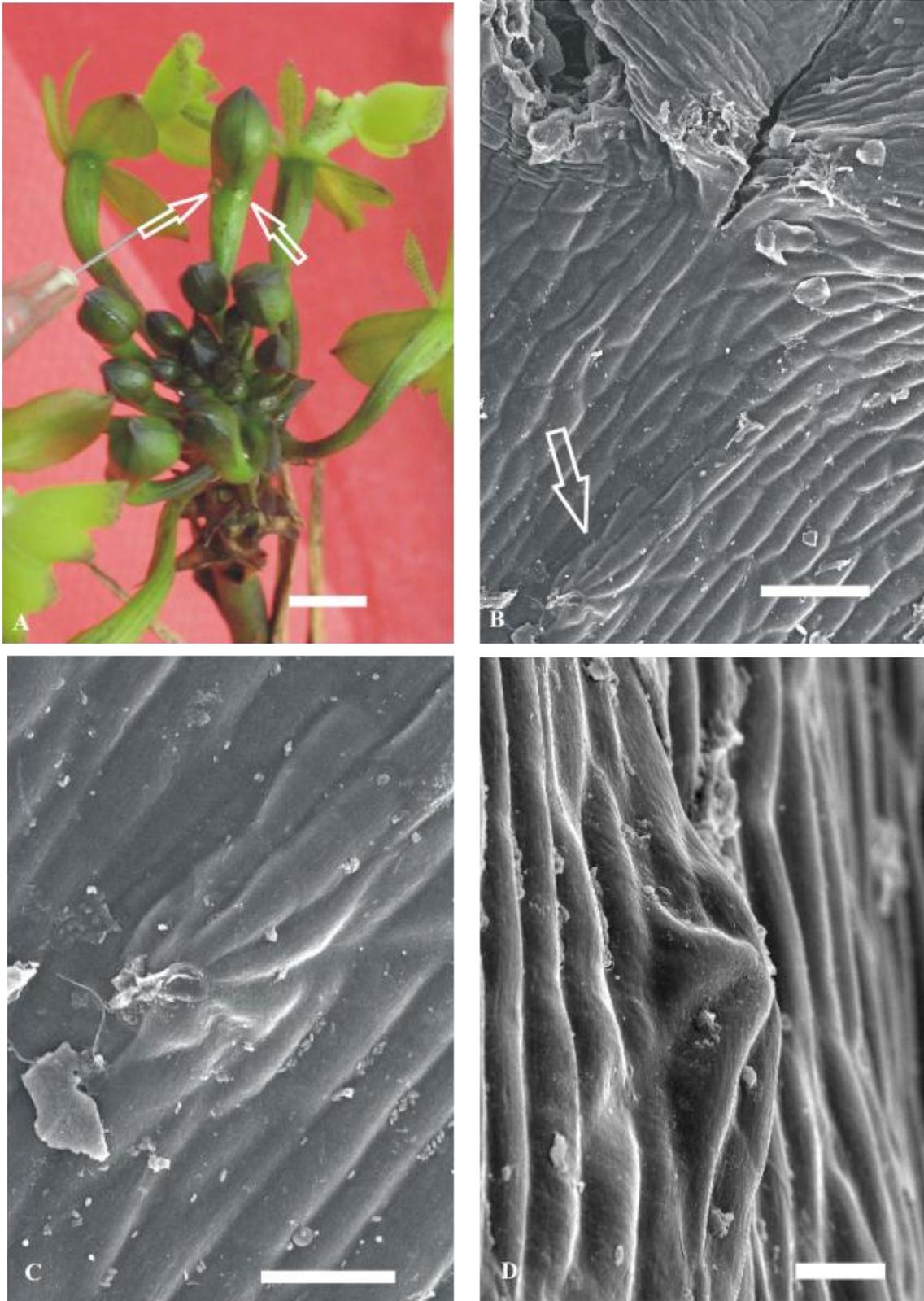


FIGURA 18: Nectário extranuptial de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (A= Posição (seta); B= Aspecto geral da face externa em MEV (seta); C e D= Detalhe do nectário extranuptial em MEV. (barra/escala-Fig. A=5mm; Fig. B=100 μ m; Fig. C=50 μ m; Fig. D=20 μ m).

3.2.2. Testes histoquímicos

Em *E. denticulatum* secreções lipofílicas foram detectadas na coluna, nas paredes dos tricomas glandulares do nectário e nas papilas do labelo, sendo possível verificar pequenas gotas de óleos voláteis. Em *E. orchidiflorum* secreções lipofílicas foram observadas na coluna e na cutícula do labelo, sendo possível visualizar no labelo inúmeras gotas de óleos voláteis. Foram verificados compostos fenólicos em todo tecido floral de *E. denticulatum* e nas células junto à epiderme da coluna e do cunículo, como também, no citoplasma das células epidérmicas do labelo na fase secretora, das flores de *E. orchidiflorum*. Açúcares redutores foram encontrados no nectário nas duas espécies. Amido foi identificado somente em *E. orchidiflorum*, entre a coluna e o nectário. Polissacarídeos ácidos foram observados no nectário e no labelo de ambas as espécies, sendo possível verificar que no labelo de *E. orchidiflorum*, os mesmos apresentam-se em forma de gotas (mucilagens e substâncias pécticas). Polissacarídeos neutros foram verificados no labelo de ambas as espécies e no nectário de *E. denticulatum*. Idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio em forma de ráfides estão distribuídos nos tecidos florais de ambas as espécies. Os resultados dos testes histoquímicos estão resumidos na Tabela 3.

TABELA 3: Testes histoquímicos nas flores de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. na APA de Maricá, Rio de Janeiro (C = coluna; N = nectário; L = labelo; + =positivo; - =negativo).

Substâncias	<i>Epidendrum denticulatum</i>			<i>Epidendrum orchidiflorum</i>		
	C	N	L	C	N	L
Lipídeos	+	+	+	+	-	+
Compostos fenólicos	+	+	+	+	+	+
Açúcares redutores	-	+	-	-	+	-
Amido	-	-	-	+	+	-
Polissacarídeos ácidos	-	+	+	-	+	+
Polissacarídeos neutros	-	+	+	-	-	+
Ráfides	+	+	+	+	+	+

3.2.3 – Osmóforos

Em *E. denticulatum* não foi possível perceber odores florais no campo, embora a reação positiva para o vermelho neutro tenha sido registrado no labelo, incluindo a região do calo e o ápice da coluna, sugerindo a presença de osmóforos (Fig. 19A). As flores de *E. orchidiflorum* exalam odor suave durante o dia, sendo que a noite o odor é mais acentuado, lembrando cloro. O vermelho neutro utilizado nestas flores, registrou a presença de osmóforos para o labelo e o ápice da coluna, incluindo a capa do polinário. (Fig. 19B).



FIGURA 19: A=Flores de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e B= Flores de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. evidenciando labelos corados com solução aquosa de vermelho neutro 1:1000 (As flores com as setas representam flores controle).

Nas flores de *E. denticulatum*, nas regiões que apresentaram reação positiva ao vermelho neutro, a epiderme é composta por células papilosas revestidas por cutícula ornamentada: rugulada no calo do labelo e com estrias longitudinais nas demais regiões acima citadas (Fig. 20).

No labelo das flores de *E. orchidiflorum*, a epiderme é composta por células alongadas recobertas por cutícula rugulada dotada de poros. Tais células apresentam compostos fenólicos e polissacarídeos. Tanto na epiderme quanto em células da camada subepidérmica desta região foi evidenciada a presença de substâncias lipofílicas.

Na capa do polinário a epiderme é formada por células cônicas, revestida por cutícula densamente estriada. Inúmeros estômatos são encontrados nesta região (Fig. 21).

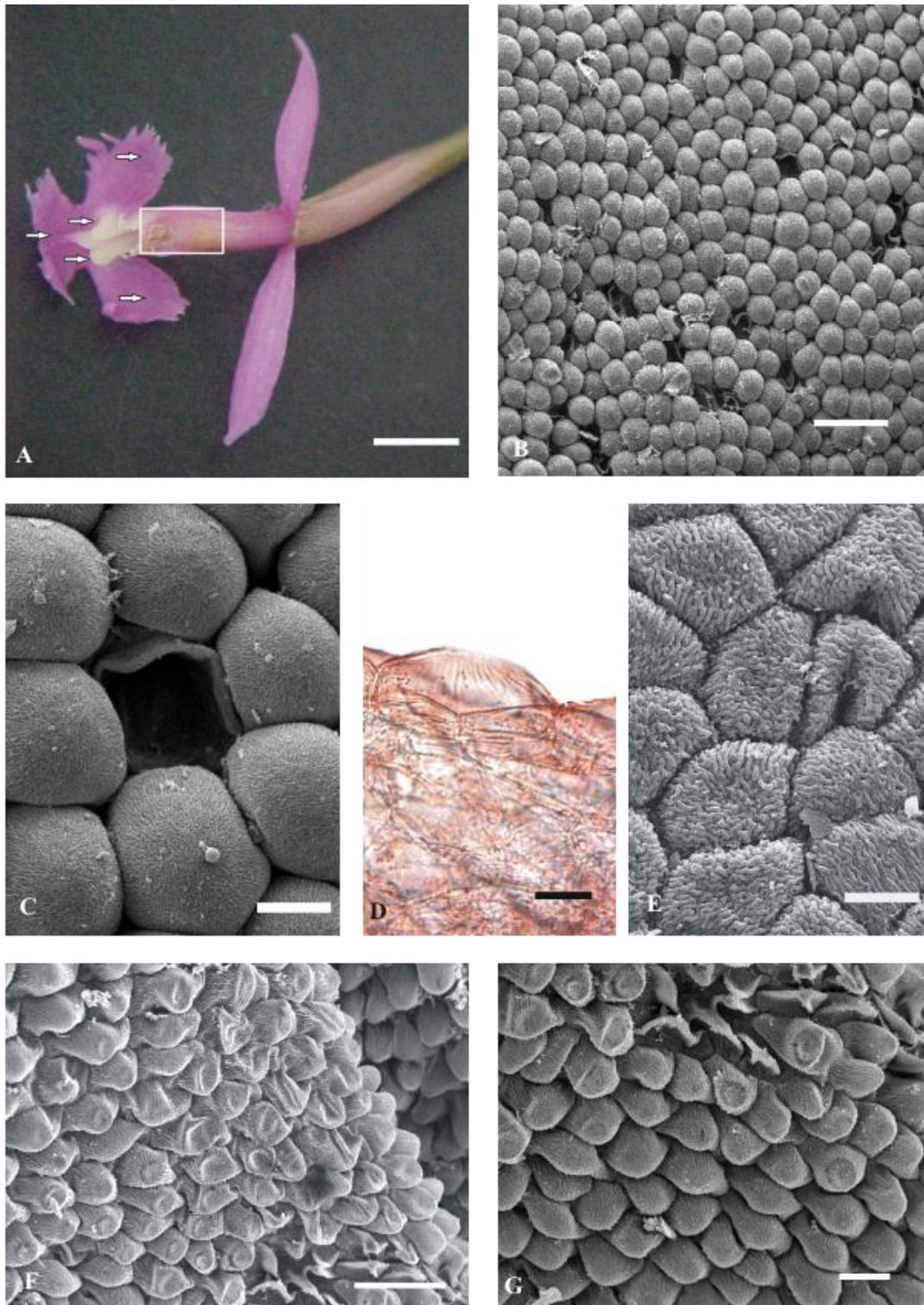


FIGURA 20: Osmóforos em *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. A= Flor mostrando labelo (seta) e ápice da coluna (retângulo); B= Aspecto geral do labelo em MEV; C= Detalhe da epiderme papilosa do labelo em MEV; D= Célula epidérmica corada com Sudan IV em microscopia óptica; E=Detalhe do calo do labelo lateral; F= Ápice da coluna em MEV; G= Detalhe da coluna em MEV (escala/barras: Fig. A=5mm; Fig. B=100µm; Figs. C,D,G=20µm; Figs. E=10µm; Fig. F=50 µm).

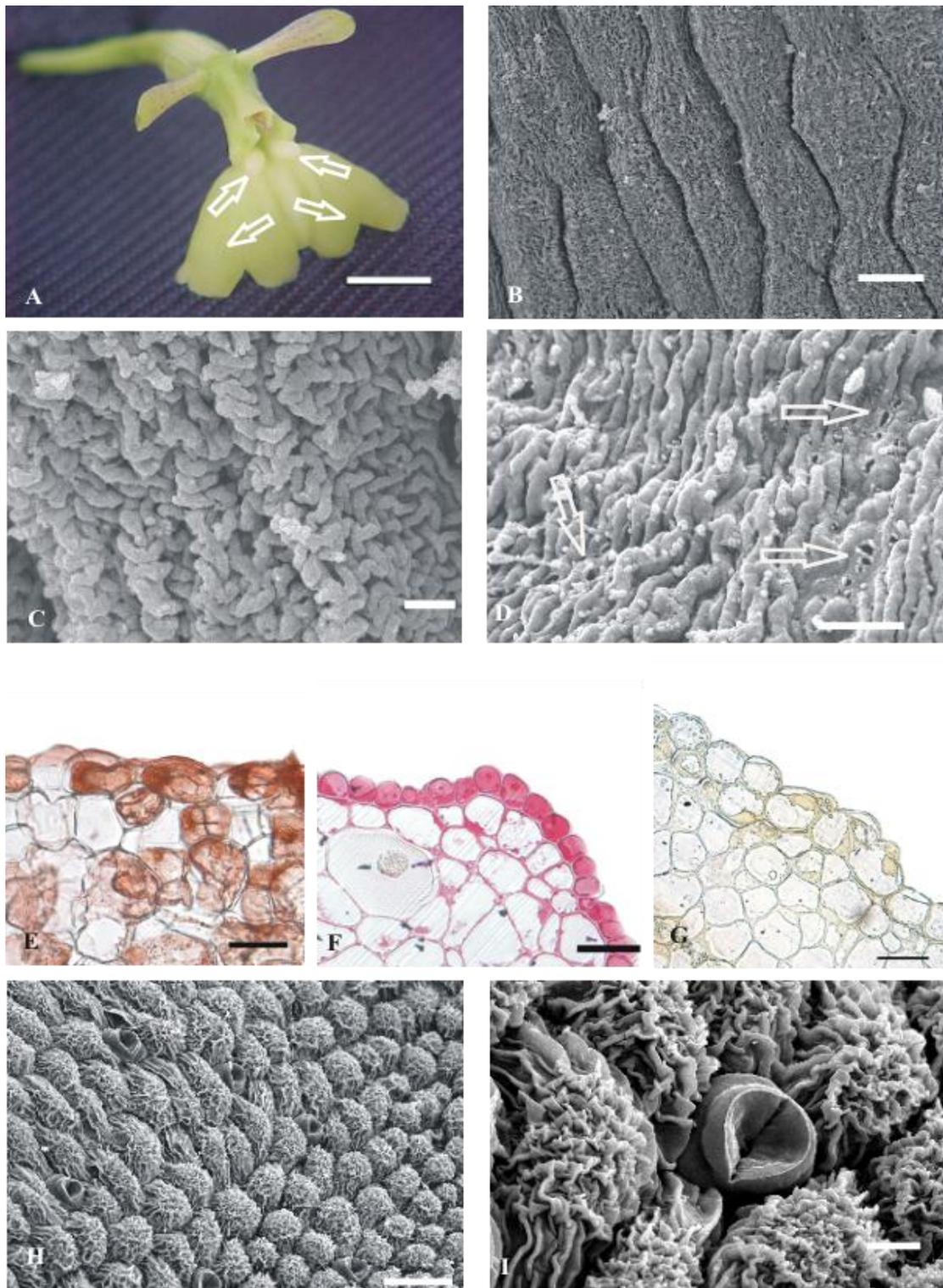


FIGURA 21: Osmóforos em *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. A= Labelo (setas); B= Aspecto da epiderme do labelo em MEV; C= Detalhe da figura anterior, evidenciando a ornamentação de uma célula em MEV; D= Detalhe de uma célula do calo do labelo evidenciando os poros (seta); E,F,G= Cortes transversais submetidos a testes histoquímicos: E= Teste Sudan IV(substâncias lipofílicas); F= Teste PAS (polissacarídeos); G= Teste com Dicromato de Potássio (substâncias fenólicas); H= Vista geral da capa da polínia em MEV; I= Detalhe do poro estomático em MEV (escala/barra: Fig. A=4mm; Figs. B, C= 20µm; Figs. D, E, F, G, H= 50µm; Fig. I= 10µm).

3.3 - Sistema reprodutivo

Os experimentos relativos ao sistema de reprodução encontram-se reunidos na tabela 4. As espécies não se autopolinizam espontaneamente, em função da presença do rostelo que impede o contato entre as polínias e a região estigmática (Fig. 22). Sendo assim, ambas as espécies necessitam de visitas dos polinizadores para efetuar a transferência de polínias para a região estigmática.

TABELA 4: Experimentos relativos ao sistema de reprodução de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. (n= número amostral).

Cruzamentos						
	<i>Epidendrum denticulatum</i>			<i>Epidendrum orchidiflorum</i>		
	n .	fr.inic.	fr.maduro	n.	fr.inic.	fr.maduro
Auto-espontânea	30	0		30	0	
Auto-manual	39	20,51%	17,94%	37	35,13%	18,91%
Xenogamia	36	22%	16,66%	35	42,85%	20,00%
Controle	39	5,12%	2,56%	77	7,79%	2,59%
Hibridização						
						
	n .	fr.inic.	fr.maduro	n.	fr.inic.	fr.maduro
	37	18,91%	13,51%	36	17%	13,88%

Os experimentos de autopolinização manual revelaram que as espécies apresentam autocompatibilidade (IAc = 1,07 para *E. denticulatum* e IAc = 0,94 para *E. orchidiflorum*). Os frutos de *E. denticulatum* e *E. orchidiflorum* obtidos apresentaram diferentes proporções de sementes viáveis e não viáveis.

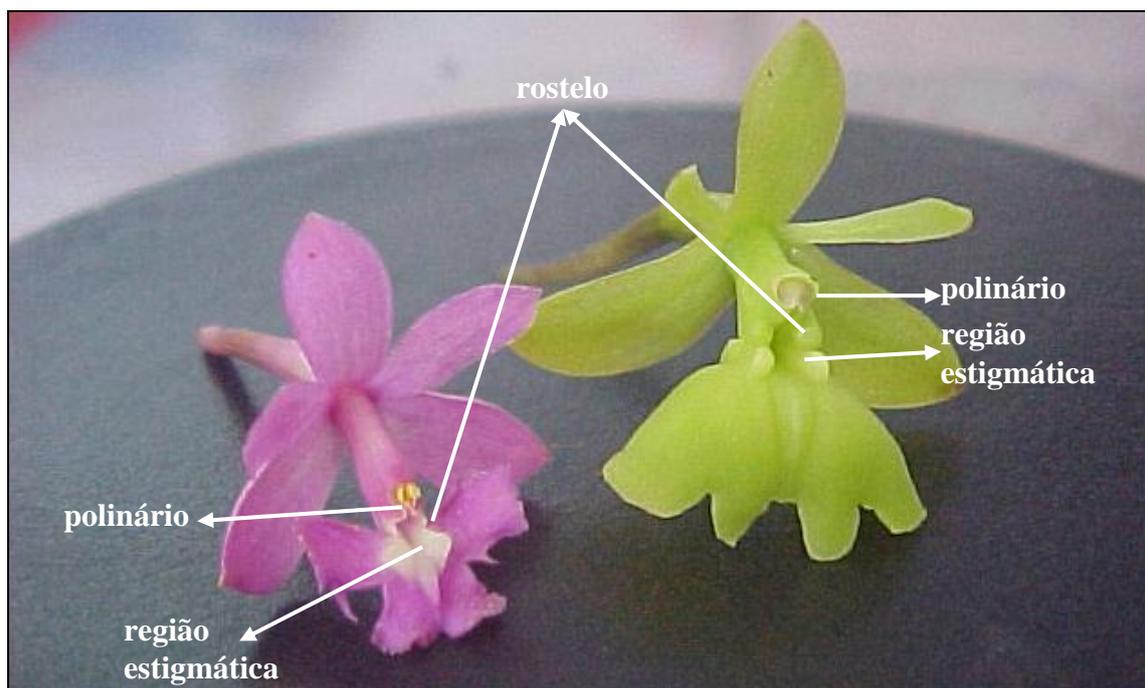


FIGURA 22: Flores de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. evidenciando o rostelo, a região estigmática e o polinário.

Em todos os experimentos, ocorreu uma maior percentagem de frutos iniciados do que de frutos maduros, revelando a ocorrência de aborto dos mesmos ao longo do desenvolvimento. Os frutos de ambas as espécies são polispérmicos, do tipo cápsula, com sementes anemocóricas medindo aproximadamente 2mm, dispersas por fendas longitudinais. A presença de embrião é facilmente identificada devido à coloração esverdeada.

Os experimentos que envolveram polinizações cruzadas entre indivíduos diferentes (xenogamia) foram os que resultaram em maior sucesso reprodutivo.

Os resultados da viabilidade das sementes dos frutos formados nos tratamentos de autopolinização manual e polinizações cruzadas encontram-se na Tabela 5.

Houve uma diferença considerável na viabilidade das sementes provenientes de polinização cruzada (xenogamia) e a dos frutos produzidos por auto polinização manual. As sementes viáveis na xenogamia foram consideradas um percentual de 66,66% para *E. denticulatum* e 71,42% em *E. orchidiflorum*. Enquanto a de auto polinização manual ambas as espécies apresentaram 42,85% dos frutos com sementes viáveis.

Os experimentos que envolveram a polinização entre as duas espécies redundaram em produção de frutos com sucesso de 13,51% e 13,88% quando *E. denticulatum* e *E. orchidiflorum* atuaram como indivíduo materno respectivamente. Em ambas as espécies 60% dos frutos maduros apresentaram sementes não viáveis.

Os resultados obtidos sobre a formação de frutos a partir de polinizações naturais (controle) revelou uma produção de frutos que não chega a atingir 3%. Frutos coletados ao acaso na área de estudo apresentaram sementes 100% viáveis, 100% inviáveis e com diferentes proporções de sementes viáveis e não viáveis (Fig. 23).

TABELA 5: Viabilidade das sementes nos frutos maduros dos experimentos relativos ao sistema de reprodução de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl.

Cruzamentos	 <i>Epidendrum denticulatum</i>			 <i>Epidendrum orchidiflorum</i>		
	n.fr. maduro	fr.fértil	fr.estéril	n.fr. maduro	fr.fértil	fr.estéril
Auto-manual	7	42,85%	57,15%	7	42,85%	57,15%
Xenogamia	6	66,66%	33,34%	7	71,42%	28,58%
Polinização natural	46	43,00%	57,00%	93	35,00%	65,00%
Hibridização						
	fr.maduro	fr.fértil	fr.estéril	fr.maduro	fr.fértil	fr.estéril
	5	40%	60%	5	40%	60%



FIGURA 23: Aspecto geral do fruto de: A= *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e B= *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl.

3.4 – Visitantes florais

Durante as observações de campo, foram registradas duas visitas de Lepidoptera às flores de *E. denticulatum*: sendo uma delas por Hesperiiidae, tendo sido removida a polínia durante a visita, que durou cerca de 10 minutos (Fig. 24). Não foram observadas visitas diurnas nem noturnas nas flores de *E. orchidiflorum*. Ressalta-se que foram observadas polínias inseridas na câmara estigmática de duas flores de *E. orchidiflorum* e uma de *E. denticulatum* (Fig. 25 A-B).

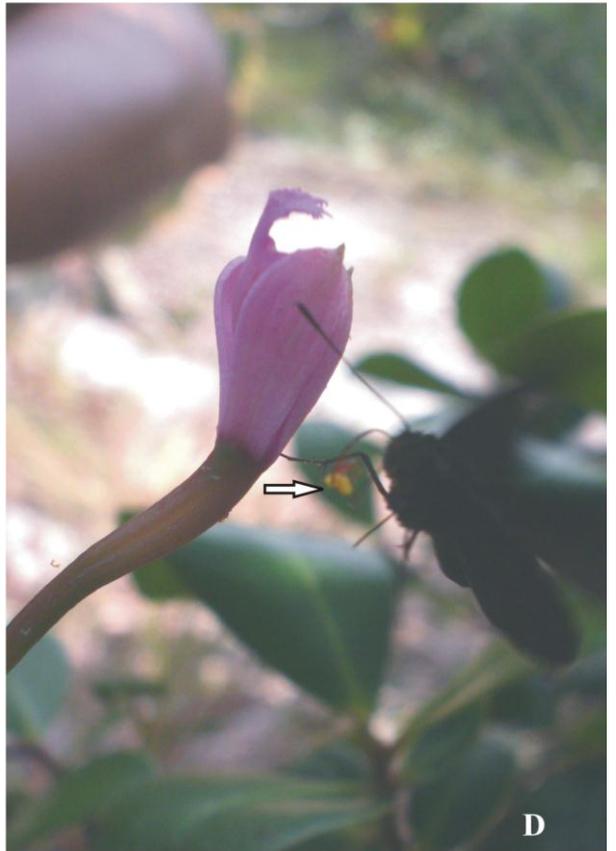
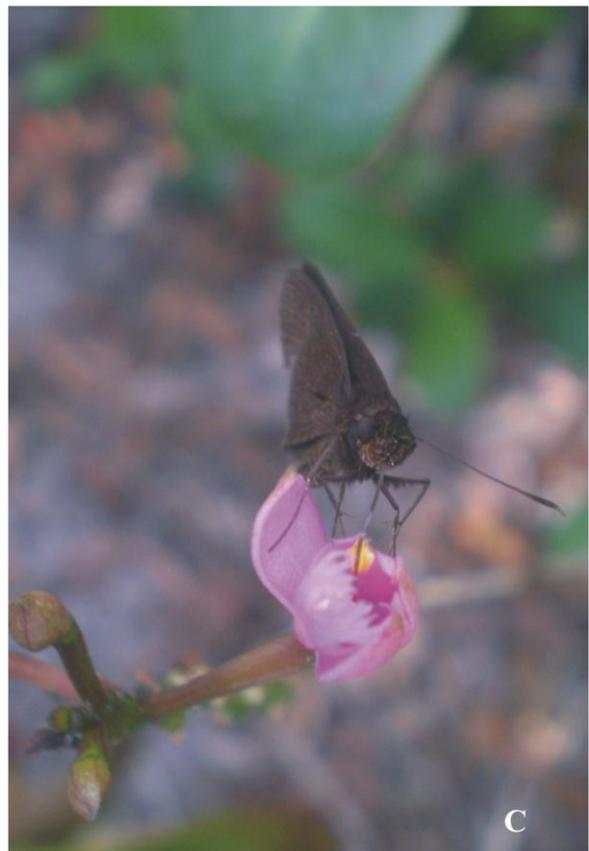
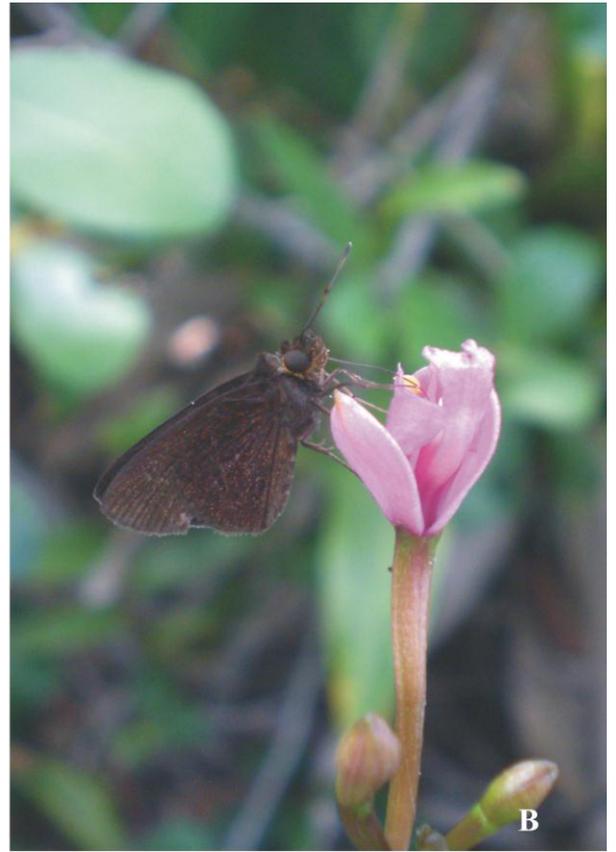


FIGURA 24: Borboleta Hesperidae visitando flores de *Epidendrum denticulatum* Barb.

Rodr. (A, B e C) = coletando néctar; (D) = removendo o polinário (seta).



Figura 25: Polínia inserida na câmara estigmática A= *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. e B= *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (seta)

Para verificar indiretamente os horários de visitas às flores de *E. orchidiflorum* foram etiquetadas 103 flores com polinário intacto, em duas noites do mês de fevereiro, pico de floração da espécie. As flores foram acompanhadas ao longo de 24 horas, tendo-se observado uma porcentagem de flores com polínias removidas igual a 7% no período entre 18h e 6h, e de 0% entre 6h e 18h.

Além disso, foram coletadas aleatoriamente e analisadas 553 flores de *E. denticulatum* e 422 flores de *E. orchidiflorum*, ao longo do ano. A taxa média de retirada de polína foi de 49% e 44%, respectivamente, durante o período de observação,

sendo os meses de menor taxa de remoção aqueles entre setembro e dezembro (Fig. 26A, B). Ocorrem visitas ao longo de todo o ano, embora a retirada de polínias seja mais frequente para *E. denticulatum* nos meses de maio e junho e para *E. orchidiflorum* nos meses maio e janeiro. No entanto, no mês de março de 2011, quando o maior número de flores foi coletado para *E. denticulatum* (120) e *E. orchidiflorum* (86), a retirada de polínia não passou de 40%. No mês de dezembro, a coleta de flores também foi bastante representativa, mas a retirada de polínia foi a mais baixa do ano. Nos meses de abril e maio/2011 a baixa coleta de flores foi devido à ação do fogo na área.

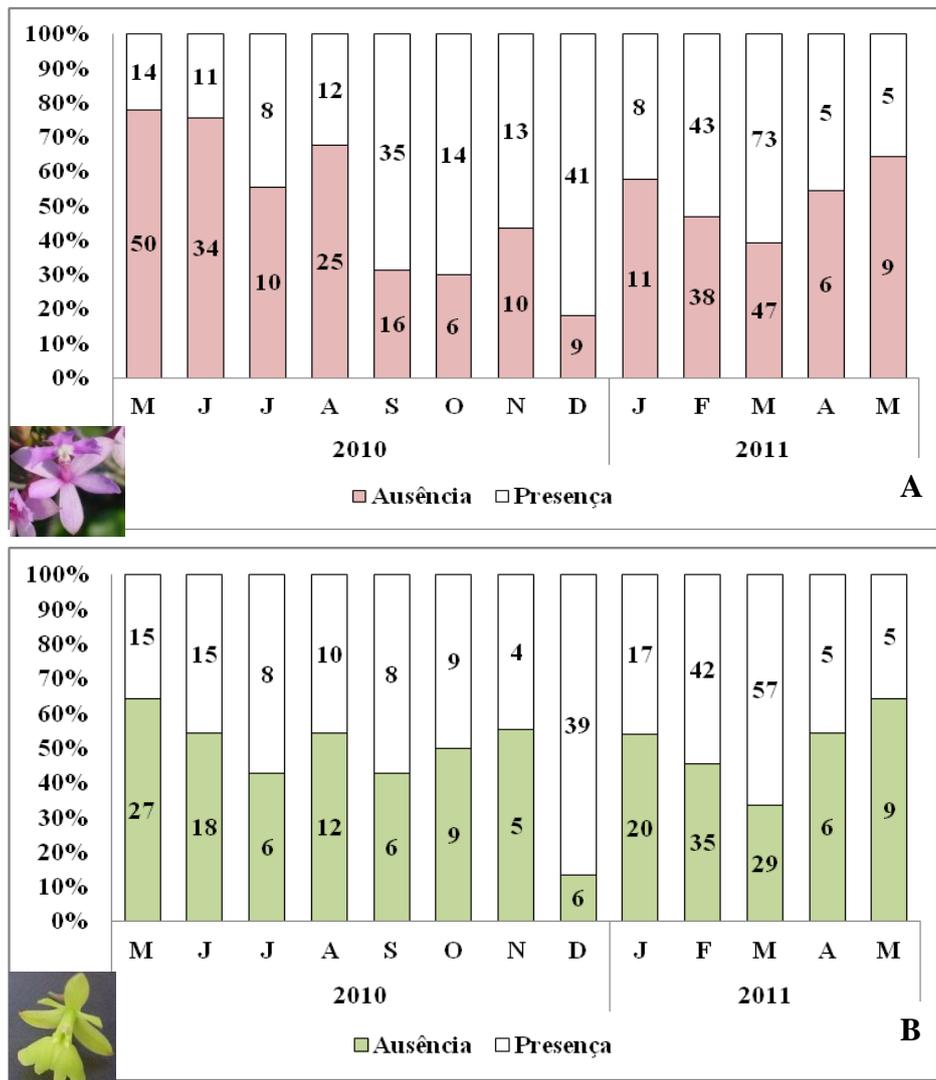


FIGURA 26: Análise de flores para observação das taxas de remoção de polínias, ao longo do período de maio de 2010 a maio de 2011, na APA da restinga de Maricá, Rio de Janeiro. A = *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e B = *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl.

3.5– Fenologia Reprodutiva

As duas espécies emitiram botões, floresceram e frutificaram ao longo de todo o ano, sendo que a população de *E. denticulatum* sempre apresentou maiores percentuais de atividade e de intensidade (Fig. 27 A, B).

Todos os indivíduos estudados emitiram botões durante o período de estudo. *E. denticulatum* alcançou picos de atividade (86%) nos meses de maio, julho, agosto e setembro e *E. orchidiflorum* em fevereiro (93%). No entanto, os valores máximos de intensidade na emissão de botões das duas espécies coincidiram nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro (Figs. 27 e 28).

Para *E. denticulatum* os maiores percentuais de atividade e de intensidade da floração ocorreram nos meses de maio (estação fria e seca) e dezembro/janeiro/fevereiro (estação quente e úmida). Assim, podemos definir para *E. denticulatum* uma tendência de floração contínua com episódios de maiores intensidades. Os percentuais de intensidade de frutificação alcançaram valores máximos em março (Fig. 27 A, B).

Para *E. orchidiflorum* os maiores percentuais de atividade e de intensidade da floração ocorreram nos meses de maio/junho (estação fria e seca) e janeiro/fevereiro/março (estação quente e úmida). Nos demais meses do ano tanto os percentuais de atividade como de intensidade foram bem inferiores aos obtidos para *E. denticulatum*. Os percentuais de intensidade de frutificação alcançaram valores máximos em julho (Fig. 28 A, B).

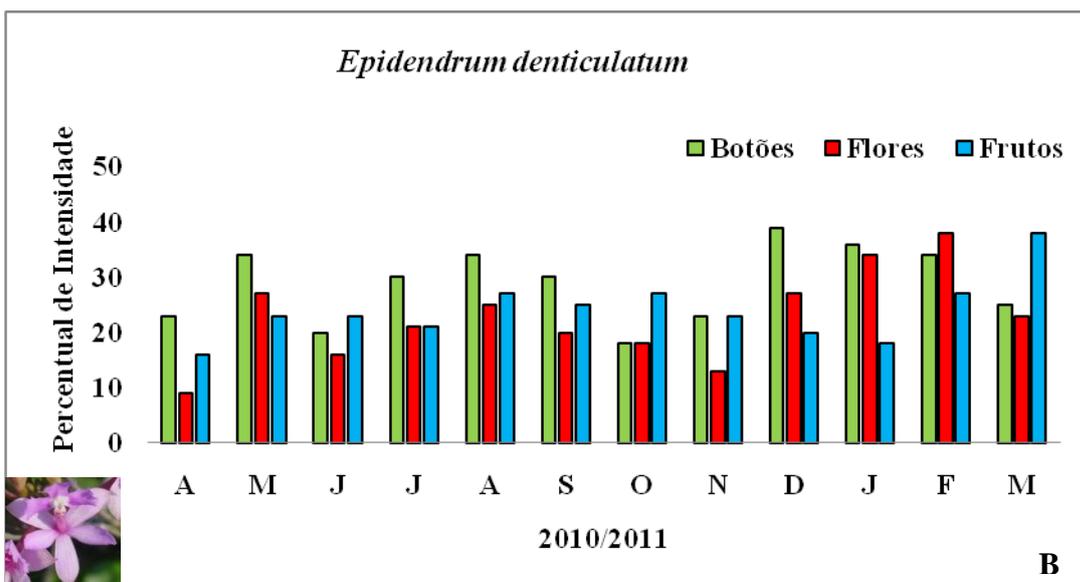
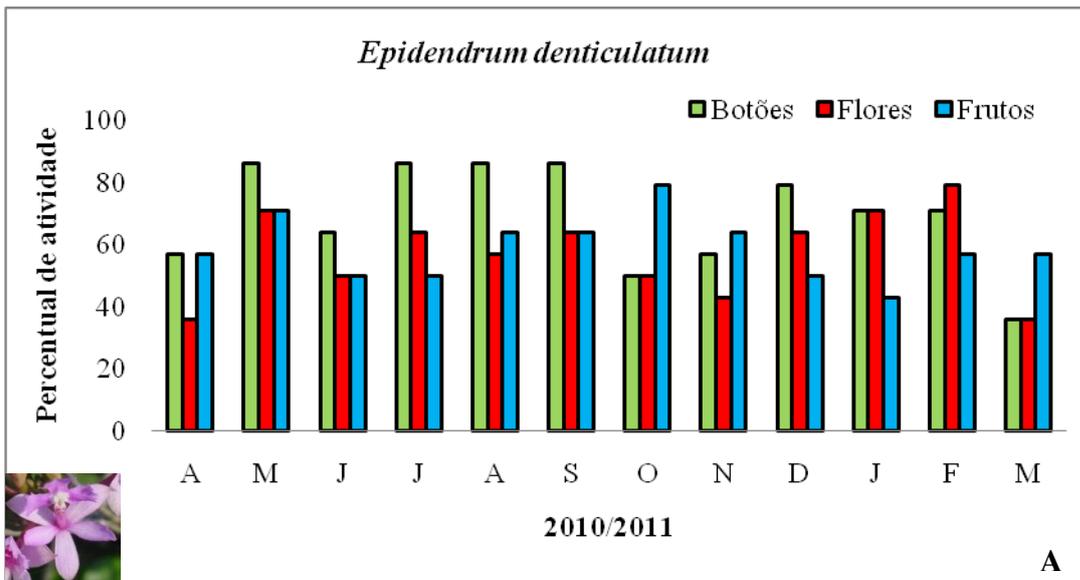


FIGURA 27: Percentuais de atividade (A) e Intensidade de Fournier (B), referentes às fenofases de emissão de botões, floração e frutificação em *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. na área estudada.

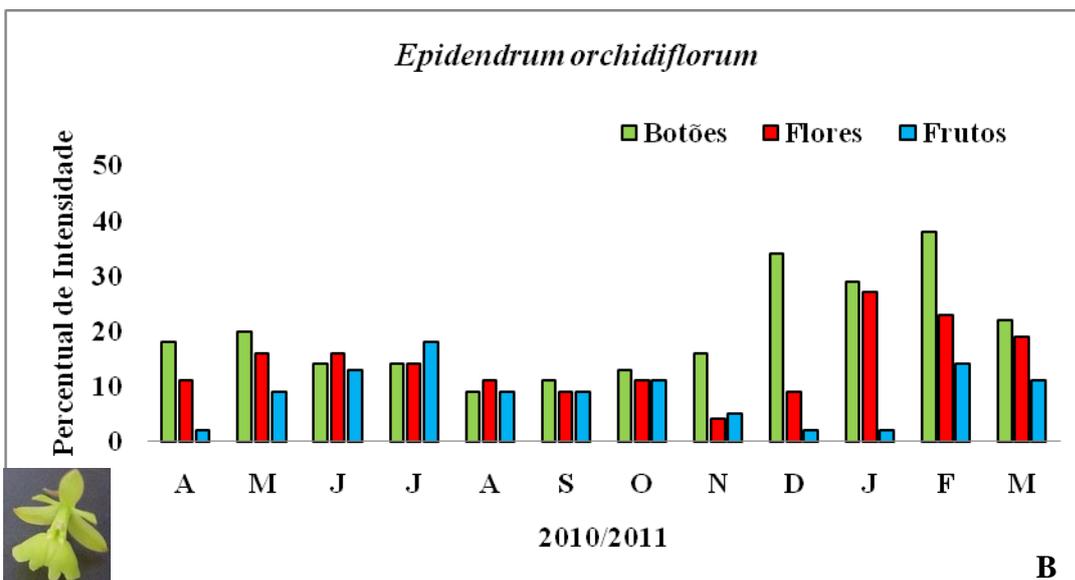
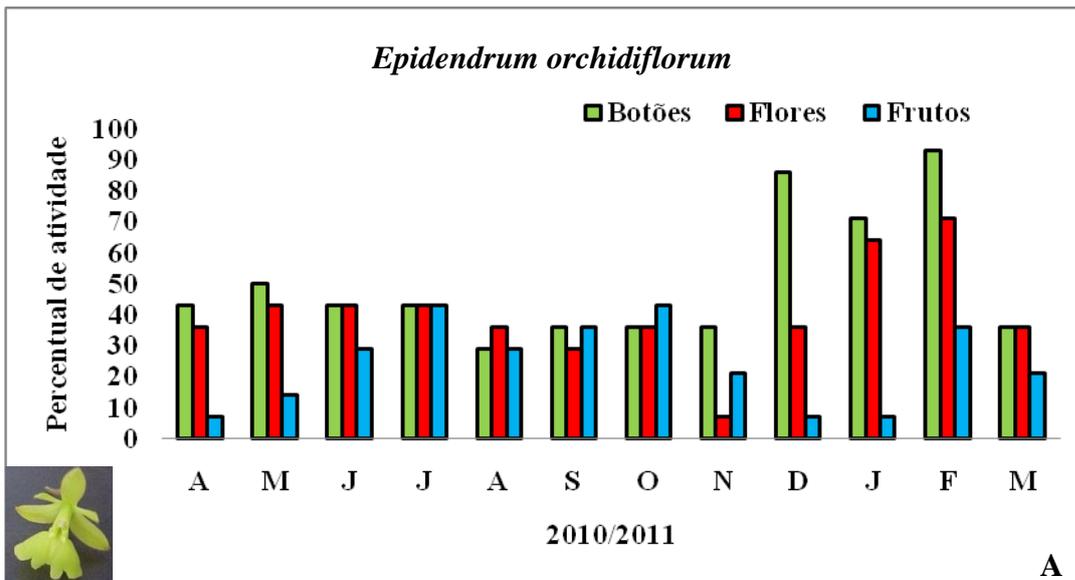


FIGURA 28: Percentuais de atividade (A) e Intensidade de Fournier (B), referentes às fenofases de emissão de botões, floração e frutificação em *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. na área estudada.

3.6 - Propagação Vegetativa

Ambas as espécies de *Epidendrum* apresentam crescimento simpodial a partir de gemas laterais, formando densas touceiras (Fig. 29A,B). Cada rameto reproduz-se sexuada e assexuadamente, ao mesmo tempo, sustentando muitas vezes frutos e brotos vegetativos. Na reprodução assexuada, cada rameto pode emitir até oito brotos vegetativos, clones da planta-mãe (Fig. 30A,B).



FIGURA 29: Indivíduos de *Epidendrum*: A= *E. denticulatum* Barb. Rodr. e B= *E. orchidiflorum* Salzm. ex Lindl.

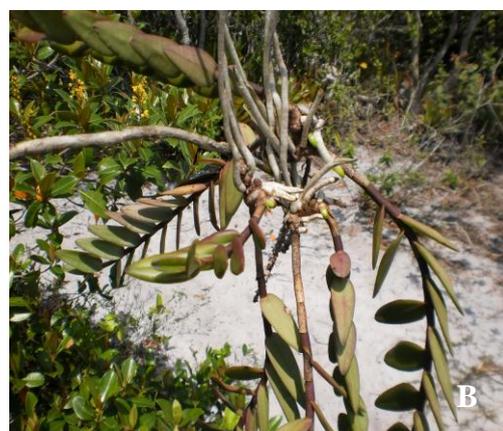


FIGURA 30: Raízes das propagações vegetativas: A= *Epidendrum denticulatum* Bar. Rodr. e *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl.

Em cada broto vegetativo, podem surgir novas inflorescências, continuando assim o ciclo de vida de modo sexuado (Fig. 31A,B). Com o término do ciclo de vida de cada rameto, o mesmo continua sendo apoio para as propagações vegetativas, as quais são epífitas em relação ao seu próprio rameto de origem, sendo possível visualizar raízes aéreas. As propagações podem secar juntamente ou separadamente do rameto (Fig. 32A,B).



FIGURA 31: Propagação vegetativa com inflorescências: A= *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e B= *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl.



FIGURA 32: Ramos secos servindo como apoio para as propagações vegetativas: A= *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e B= *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl.

Dependendo da quantidade de brotos vegetativos e de raízes emitidas formam-se grandes aglomerados, forçando o rameto a curvar-se até alcançar o solo, podendo ou não os brotos fixarem-se ao solo, vivendo assim sobre a serrapilheira formando ou aumentando a borda das moitas (Fig. 33A). Entretanto, se os rametos tombarem em direção ao tronco ou galhos de árvores próximas, como no caso da Fig. 33B, onde as raízes das propagações vegetativas de *E. orchidiflorum* apoiaram-se no galho de *Ouratea cuspidata* (St. Hil.) Engl. (Ochnaceae), prevalece um hábito epífita raramente observado na restinga. Em ambas as espécies é possível encontrar pigmentação avermelhada em diversas fases de seu desenvolvimento (Fig. 34).



FIGURA 33: Individuos de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. mostrando propagações sobre a serrapilheira (A) e propagações em hábito epífita (B)



FIGURA 34: Ramos e folhas com pigmentação avermelhada em A= *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e em B= *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl.

4 – Discussão

Biologia Floral e Polinização

Os caracteres florais registrados para *E. denticulatum* como coloração rosa, conspícua, guia de néctar, presença de osmóforos e de nectário, abertura floral pela manhã, visitas por borboletas durante o dia e não remoção de polinários durante a noite indicam psicofilia para a espécie. Já para *E. orchidiflorum*, o início da antese durante a noite, a coloração verde desprovida de contraste de cor na corola, a presença de nectário e de odor marcante sugerem que a polinização seja feita por agentes noturnos, provavelmente mariposas, uma vez que não foram registrados visitantes diurnos e polínias foram retiradas somente à noite. Ainda que Hymenoptera, principalmente abelhas, seja reconhecido como o grupo mais importante de polinizadores das orquídeas (van der Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1990), para o gênero *Epidendrum*, a polinização por borboletas e mariposas tem sido frequentemente registrada (van der Pijl & Dodson, 1966; Pansarin, 2003; Pansarin & Amaral, 2008a).

Os resultados apresentados não indicam que as duas espécies compartilhem polinizadores. Apesar das flores de *E. orchidiflorum* permanecerem abertas durante todo o dia, não foram observadas visitas neste período. Outros atributos florais, além da presença de cor e de odor, concorrem para que as flores sejam polinizadas por diferentes agentes, a saber, a ressupinação e o tamanho das flores. O fenômeno da ressupinação muda a orientação de muitas flores de orquídeas durante a antese, de modo que o labelo, inicialmente numa posição adaxial/superior da flor, assume uma posição abaxial/inferior, facilitando a polinização por apresentar o labelo como uma plataforma de pouso e um guia de néctar (Mondragón-Palomino & TheiBen, 2009). No caso de *E. orchidiflorum*, o posicionamento do labelo na porção mais inferior da flor, favoreceria a localização, o pouso e a identificação da fonte de néctar, principalmente pelo labelo ser a estrutura floral mais envolvida na secreção de odor. Sendo assim, poderia ser interpretado como um importante guia para polinizadores noturnos como diversas mariposas sensíveis a odores florais e que pousam nas flores durante suas visitas. Além disso, a ressupinação em *E. orchidiflorum* altera a forma floral (*sensu* Faegri & van der

Pijl, 1979), de modo que provavelmente os polinários das duas espécies aderem em áreas diferentes do corpo dos visitantes.

O recurso floral de *E. denticulatum* e de *E. orchidiflorum* é o néctar. Muitas espécies de Orchidaceae não apresentam nectários ou estes não são funcionais ou não apresentam secreção facilmente visualizada. Por isso, a polinização é muitas vezes interpretada como por engano (Ackerman, 1990; Ackerman & Montalvo, 1990; Calvo, 1990; Christensen, 1992). Nas espécies de *Epidendrum* estudadas, a ausência de néctar visível também poderia levar a tal interpretação, já sugerida por Almeida & Figueiredo (2003) para *E. denticulatum*. A evidência de funcionalidade do nectário das espécies de *Epidendrum* da restinga só foi possível através da análise anatômica e de testes histoquímicos, já que o néctar não se acumula no canal do nectário. De acordo com Pansarin (2003), em *E. paniculatum*, borboletas desenrolam a probóscide introduzindo-a no nectário, como o néctar não fica exposto, o lepidóptero precisa raspar sua probóscide na epiderme do nectário e danificar a cutícula do mesmo para ter acesso à recompensa. Possivelmente, mecanismo semelhante de retirada de néctar pelos lepidópteros ocorra em *E. denticulatum* e *E. orchidiflorum*, já que longos períodos de visita por borboletas em *E. denticulatum* foram observadas.

Os nectários extranupciais das espécies estudadas, frequentemente visitados por formigas, podem estar envolvidos na atração primária de pequenos polinizadores, até que estes encontrem nectários florais realmente envolvidos na polinização (Patt *et. al.* 1989). As visitas às flores de *E. denticulatum* observadas não confirmam esta hipótese, pelo fato de não ser observado formigas migrando para o nectário nupcial. Outra interpretação seria a de que nectários extranupciais teriam papel na atração de defensores, principalmente formigas, para a proteção e diminuição de danos causados por herbívoros (Inouye & Taylor, 1979; Keeler, 1977, 1981; Almeida e Figueiredo, 2003). De fato, as flores de ambas as espécies de *Epidendrum* não sofrem ação de herbívoros, possivelmente pela presença das formigas.

A estrutura dos nectários florais de ambas as espécies estudadas assemelha-se ao nectário epidérmico descrito por Nepi (2007). O autor menciona que a epiderme do nectário floral pode ser totalmente secretora, ou incluir apenas algumas estruturas secretoras, responsáveis pela produção de néctar, tais como: tricomas, papilas, idioblastos ou glândulas. Estruturalmente, os nectários das espécies estudadas diferem

em alguns aspectos. Em *E.denticulatum* a epiderme apresenta tricomas unicelulares com cutícula lisa, em toda a extensão do tubo floral. Em *E. orchidiflorum* a epiderme do nectário é papilosa, com cutícula lisa a levemente estriada, também ocupando toda a extensão do tubo floral. Nos dois casos, foram observados açúcares redutores nas células epidérmicas e subepidérmicas, evidenciados nos testes histoquímicos, além de resíduo de néctar na superfície da epiderme, nas análises em MEV. Tricomas unicelulares são os mais comuns em nectários epidérmicos em Orchidaceae (Stpiczynska *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2008; Galetto *et al.*, 1997; Davies *et al.*, 2005). A perda de turgidez observada nas papilas epidérmicas do nectário de *E. orchidiflorum*, no estágio pós-secretor, além da ausência de poros ou estômatos, sugere que a cutícula seja permeável ao néctar. Stpiczynska *et al.* (2005) citam que a cutícula que recobre as células do nectário de *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. apresentam protuberâncias em vários pontos, as quais não se rompem apesar da pressão exercida pelo néctar acumulado. Já em *Brassavola flagellaris* Barb. Rodr. vesículas sobre a epiderme do nectário no estágio secretor rompem-se, liberando o néctar, disponível para mariposas (Stpiczynska *et al.*, 2010). A presença de cutícula permeável ao néctar foi registrada para outras espécies de orquídeas (Stpiczynska, 2003; Stpiczynska *et al.*, 2004).

Os nectários epidérmicos do tipo cunículo, observados nas duas espécies, são similares no que se refere à presença de células epidérmicas e subepidérmicas colenquimatosas. A ocorrência de colênquima no nectário foi registrada para *Hexisea imbricata* (Stpiczynska *et al.*, 2005) e *Ascocentrum* spp. (Stpiczynska *et al.*, 2011) e interpretada como característica possivelmente relacionada com a prevenção de danos pelo bico do pássaro visitante. No entanto, muitas espécies que também exibem nectário com células colenquimáticas, como *E. fulgens* (Moreira *et al.*, 2008), *Brassavola flagellaris* (Stpiczynska *et al.*, 2010), além de *E. denticulatum* e *E. orchidiflorum* são entomófilas.

A presença de tricomas do nectário das flores de *E. denticulatum* pode estar relacionada ao aumento da superfície total para secreção do nectar. Tricomas bi ou multicelulares também ocorrem nos esporões de várias espécies da tribo Orchidinae. Por outro lado, na tribo Aeridinae ocorrem tricomas idênticos nos nectários de espécies ornitófilas e entomófilas, indicando que estas estruturas evoluíram independentemente da síndrome de polinização (Stpiczynska *et al.*, 2011).

Apenas em *E. orchidiflorum* foi identificado amido nos nectários florais, fato muito comum nas orquídeas (Figueiredo & Pais, 1992, Pais & Figueiredo, 1994; Galetto *et al.*, 1997). *Hexisea imbricata*, tem os açúcares transportados através dos cordões do floema e armazenados nas células dos nectários como amido (Pais & Figueiredo, 1994; Stpiczynska *et al.*, 2005) cuja degradação pode contribuir para o acúmulo de açúcares no néctar (Stpiczynska, 2003). Entretanto, pelo fato de neste trabalho ter sido analisada apenas a fase secretora, a ausência de amido em *E.denticulatum* não exclui a possibilidade de sua ocorrência na fase pré-secretora, da mesma forma que referido para *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L. O. Williams *ex* Hodge (Stpiczynska, 2003). Por outro lado, algumas espécies de orquídeas não apresentam amido no nectário em quaisquer das fases, sendo os açúcares do néctar provavelmente lançados diretamente do floema, especialmente desenvolvido nestes casos (Stpiczynska *et al.*, 2005, 2011).

Outra diferença observada foi a presença de lipídios apenas nas camadas subepidérmicas de *E.denticulatum*. Segundo Machado (1999, *apud* Pimentel *et al.*, 2011), os lipídios detectados nos nectários de *Citharexylum mirianthum* servem como fonte de energia e/ou de reserva e ainda podem funcionar na atração ou repelência de visitantes. Lipídios são frequentemente encontrados nas células de nectários de outras orquídeas (Figueiredo & Pais, 1992; Stpiczynska *et al.*, 2004).

Compostos fenólicos e polissacarídeos ácidos (mucilagens e substâncias pécticas) foram detectados no nectário de ambas as espécies, assim como em todo tecido floral. Levando em consideração o habitat de restinga, onde as espécies estão sujeitas ao estresse hídrico, a presença destes compostos pode estar relacionada com proteção contra desidratação, excesso de radiação ultravioleta, herbivoria e microrganismos patógenos (Meyberg, 1988; Paiva & Machado, 2008), como assinalados em flores de outras espécies de restinga, como *Pavonia alnifolia* A.St. – Hil. (Pimentel *et al.*, 2011).

A presença, em ambas as espécies de *Epidendrum*, de idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio em forma de ráfides é comum em nectários de orquídeas, como por exemplo, no parênquima subsecretor adjacente aos feixes vasculares de *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. Cristais de oxalato de cálcio na forma de drusas ou ráfides são frequentemente encontrados em nectários florais e extraflorais, Davies *et al.* (2005) sugere que esses produtos de excreção podem desencorajar a herbivoria por

invertebrados. Não só a forma e o tamanho, mas também a localização e o número absoluto de cristais podem impedir a herbivoria tanto por grandes animais como por pequenos, como insetos (Franceschi & Nakata, 2005). Por outro lado, cristais de oxalato de cálcio também atuam na regulação do cálcio nas plantas, sendo possível que altos níveis destes ions no nectário possam inibir o mecanismo secretor (Horner *et al.*, 2003). Em *Pistia* as ráfides parecem desempenhar uma dupla função: inicialmente na regulação do cálcio e na maturidade, como mecanismo de defesa. (Franceschi & Nakata, 2005).

Ambas as espécies de *Epidendrum* da restinga de Maricá, apresentam osmóforos. Em *E. denticulatum* nenhum odor foi percebido, apenas gotículas de óleo na epiderme do calo do labelo, sugerindo a presença de voláteis florais. Pansarin (2000), embora tenha identificado quimicamente em *E. secundum* vários compostos muito difundidos nos aromas de flores polinizadas por borboletas e mariposas, também não percebeu qualquer odor e sugeriu que nesta espécie a atração parece ser estritamente visual. Almeida e Figueiredo (2003) também não registraram odor nas flores de *E. denticulatum*. Kaiser (1993), estudando as fragrâncias florais de *Epidendrum ciliare* L., *E. nocturnum* Jacq., *E. lacertinum* Lindland. e *E. aromaticum*, constatou que, em geral, a fragrância floral entre as espécies de *Epidendrum* é fraca para a percepção humana. Já em *E. orchidiflorum*, as flores exalam odor suave, durante o dia e mais acentuado à noite. Tratando-se de uma flor desprovida de contraste de cor e com abertura floral noturna, é provável que a fragrância floral seja fundamental na atração dos polinizadores, fato registrado para outras orquídeas noturnas e polinizadas por mariposas (Goss & Adams, 1976; Nilsson, 1978; Nilsson *et al.*, 1985; Moya & Ackerman, 1993). As emissões de perfume noturno juntamente com a coloração discreta da flor se encaixam muito bem com a síndrome de polinização por mariposas (van der Pijl & Dodson, 1966).

Os osmóforos, evidenciados pela reação positiva ao vermelho neutro e pela presença de gotas de substâncias lipofílicas no labelo, calo e ápice da coluna nas duas espécies estudadas, têm características em comum com *Psilochilus modestus* (Pansarin, 2000; Pansarin & Amaral, 2008b) e com espécies de *Acianthera* (Melo *et al.*, 2010) como a epiderme papilosa. A ausência de amido também foi registrada para *Cyclopogon elatus* (Wiemer *et al.*, 2008) e *Grobya amherstiae* (Pansarin *et al.*, 2009) contrariamente ao registrado para a maioria dos osmóforos de orquídeas (Wiemer *et al.*, 2008).

A falta de evidências de poros ou estômatos nos osmóforos de *E. denticulatum* sugere que a emissão de compostos voláteis seja por difusão, assim como é observado nas espécies *Scaphosepalum* (Pridgeon & Stern, 1983) e *Stanhopea* (Stern *et al.*, 1987). A emissão de compostos voláteis em *E. orchidiflorum* parece estar associada à presença de poros cuticulares no labelo e estômatos modificados na capa do polinário. Poros cuticulares foram encontrados em espécies de *Restrepia e Restrepiella* (Pridgeon & Stern, 1983) e *Gymnadenia conopsea* (Stpiczynska, 2003), enquanto poros estomáticos foram encontrados em espécies *Acianthera* (Melo *et al.*, 2010). A coloração amarela e a presença de osmóforos na capa do polinário de *E. orchidiflorum* sugere atração visual e guia de odor para alcançar o tubo floral, onde se encontram as recompensas nutritivas das flores. Não foram encontradas referências na literatura relacionadas a osmóforos na capa de polinários.

As duas espécies de *Epidendrum* estudadas apresentam flores longevas, em antese por cerca de 10 a 15 dias. Flores de *E. secundum* e de *E. paniculatum* permanecem em antese por aproximadamente sete dias (Pansarin e Amaral, 2008a; Pansarin, 2003). Orquídeas exibem flores de longa duração, com a antese variando de uma semana até meses (Primack, 1985), embora também ocorram flores com antese restrita a poucas horas (van der Pijl & Dodson, 1969; Pansarin & Amaral, 2008b). O longo período de antese de muitas Orchidaceae, principalmente as europeias, foi interpretado como resultado de processo evolutivo para favorecer o sucesso reprodutivo, em resposta aos sistemas de polinização especializados e às baixas taxas de visitas de polinização, geralmente resultando em limitação de pólen (Neiland & Wilcock, 1998; Stpiczynska, 2003; Tremblay *et al.*, 2005). Mudanças florais e rápidas senescências das flores após a polinização também são bem conhecidas entre as orquídeas (Gregg, 1991; Ketsa *et al.*, 2001; Martini *et al.*, 2003; Attri *et al.*, 2008; Parra-Tabla *et al.*, 2009) e, de acordo com Galetto *et al.* (1997) este fato provavelmente está relacionado com a realocação de recursos para as sementes em desenvolvimento.

Por outro lado, o murchamento das flores, após a remoção dos polinários, como registrado para *E. denticulatum*, parece um fato inesperado, já que o murchamento após a retirada da polínia impossibilita a flor de exercer sua função feminina. No entanto, Huda & Wilcock (2011) registraram este efeito em todas as 14 espécies tropicais de

orquídeas estudadas (incluindo terrestres e epífitas, autocompatíveis e auto-incompatíveis) e sugeriram que, entre as orquídeas tropicais, o custo de manutenção das flores supera os benefícios da flor permanecer aberta apenas para a função feminina, após o polinário ter sido removido. Segundo estes autores (*loc. cit.*) as orquídeas tropicais estão muito sujeitas a limitações de recursos, limitações polínicas, têm altos custos de manutenção das flores e estão submetidas a alto stress decorrente de perda de água por transpiração.

Biologia da reprodução

As duas espécies de *Epidendrum* estudadas dependem de vetores de pólen para que a polinização aconteça, ou seja, não são autogâmicas. A autogamia é evitada em função da presença do rostelo, que impede o contato entre as polínias e a região estigmática. Barreiras mecânicas são encontradas na maioria das orquídeas e constituem importantes mecanismos para evitar a autofertilização (van der Pijl & Dodson, 1966). Entretanto, há registros de autogamia para algumas espécies do gênero, a saber: *E. rigidum* Jacq. (Iannotti *et al.* 1987), *E. nocturnum* Jacq., e *E. tridens* Poepp. & Endl. (Tremblay *et al.*, 2005).

Os experimentos aplicados para avaliar o sistema reprodutivo não mostraram diferenças no sucesso da produção de frutos a partir de xenogamia e de autopolinização, sugerindo que ambas as espécies estudadas sejam autocompatíveis. Resultados semelhantes foram obtidos para *E. fulgens* (Fuhro, 2006). Também há registro de autocompatibilidade para *E. ciliare* L (Acherman & Montalvo, 1990) e para *E. secundum* (Pansarin & Amaral, 2008a), mas, Pansarin (2003) registrou um alto grau de auto-incompatibilidade para *E. paniculatum* (apenas 1,3% de frutos a partir de autopolinizações manuais).

Cabe destacar, entretanto, que tanto nos experimentos de xenogamia como nos de autopolinização, nem todos os frutos que alcançaram a maturidade continham sementes férteis, levando à constatação de que o percentual de produção de frutos maduros nas espécies de *Epidendrum* da restinga não corresponde ao real sucesso reprodutivo feminino das mesmas. No caso das espécies estudadas, o percentual de frutos com sementes férteis é maior entre os frutos originados de xenogamia. Assim, é possível que as espécies apresentem uma autoincompatibilidade parcial ou o aborto das

sementes é em parte devido a algum grau de depressão autogâmica, no caso dos frutos resultantes de autopolinização manual. Resultados semelhantes para outras espécies de Orchidaceae levaram Huda & Wilcock (2011) a sugerirem que as diferenças no percentual de sementes férteis poderiam estar relacionadas com uma autoincompatibilidade de ação tardia em espécies previamente assumidas como autocompatíveis.

As baixas taxas de frutificação sob condições naturais (2,56% para *E. denticulatum* e 2,59% para *E. orchidiflorum*) também foram registradas para outras espécies do gênero - 4,5 a 7,5% para *E. secundum* (Pansarin, 2003) e 0,25% para *E. paniculatum* (Pansarin & Amaral, 2008a) - e para outros gêneros de orquídeas (Borba & Braga, 2003; Mickeliunas *et al.*, 2006; Silva-Pereira *et al.*, 2007; Tremblay *et al.*, 2005). A polinização cruzada manual (xenogamia) aumentou não só a produção de frutos, em cerca de oito vezes, como também a produção de frutos com sementes férteis, em relação à polinização natural. Tal fato sugere que fatores relacionados com a polinização sejam os principais responsáveis pela baixa produção de frutos nas espécies. De acordo com Burd (1994) a ocorrência de limitação polínica na reprodução sexuada das plantas pode ser experimentalmente detectada quando a polinização manual eleva a produção de frutos e sementes acima dos níveis naturais. A limitação polínica na produção de frutos é característica comum em orquídeas não autogâmicas. Estudos que envolveram polinizações manuais suplementares em 56 espécies de Orchidaceae claramente indicaram que as baixas razões fruto/flor observadas nas populações naturais são bem explicadas por fatores relacionados com a limitação na polinização, já que todas apresentaram aumento significativo na produção de frutos quando as flores foram submetidas à polinização cruzada manual (Tremblay *et al.*, 2005).

Diversos aspectos corroboram com uma limitação polínica nas espécies estudadas, envolvendo quantidade (poucas visitas às flores observadas) e qualidade dos polinizadores (quantidade de polínias inseridas na cavidade estigmática surpreendentemente pequena em relação à quantidade de polínias removidas). Usualmente, menos da metade das flores de orquídeas têm seus polinários removidos por visitantes, os quais parecem variar muito em termos de desempenho (Tremblay *et al.*, 2005). Durante as observações de campo, a despeito do investimento em tempo de observação, somente foram vistas poucas visitas de lepidópteros às flores de *E. denticulatum*, uma das quais com remoção de polínias por uma espécie de

Hesperiidae. Com relação a *E. orchidiflorum*, não foi possível fazer observações durante a noite, mas nenhuma visita durante o dia foi observada. No entanto, uma média de 49% para *E. denticulatum* e 44% para *E. orchidiflorum* de flores com polínias removidas foram registradas, o que mostra que ocorrem mais visitas do que as registradas. No entanto, estas visitas resultam em baixa taxa de polinização. Este aspecto sugere que a maioria dos visitantes que consegue retirar polinários não tende a retornar às flores, fato também registrado para outras espécies de *Epidendrum* (Pansarim, 2003; Pansarin & Amaral, 2008a). Assim, não é possível concluir sobre polinizadores e eficiência dos mesmos. De acordo com Tremblay (1992 *apud* Tremblay *et al.*, 2005), em muitas Orchidaceae nas quais os grãos de pólen são reunidos em polínias, a remoção do polinário por um polinizador ineficiente pode resultar em grande perda de pólen, o que pode influenciar negativamente o sucesso reprodutivo das espécies.

A razão entre o percentual de polínias removidas e o percentual de frutos produzidos naturalmente pode mostrar o grau de eficiência dos polinizadores em Orchidaceae (Tremblay *et al.*, 2005). Em *E. denticulatum*, esta razão é 18,9:1, e em *E. orchidiflorum* é 16,9:1. De acordo com Tremblay *et al.* (2005), os sistemas mais efetivos foram registrados para *Satyrium bicorne* e *Vanilla barbellata* (< 0,30:1), enquanto que os menos eficientes para *Stelis argentata* e *Bulbophyllum ipanemense* (>24,0:1). Nossos resultados indicam uma polinização ineficiente para as espécies de *Epidendrum* da restinga.

Por outro lado, mesmo nos experimentos de polinização cruzada manual, o máximo de sucesso obtido não ultrapassou 16%, levando a crer que outros fatores, entre eles a limitação de recursos, podem também estar atuando. Uma hipótese é que as espécies estudadas invistam grande quantidade de recursos em reprodução assexuada (propagação vegetativa), na qual o crescimento clonal resulta em novos indivíduos, geneticamente idênticos, que têm sua fase inicial de desenvolvimento subsidiada pelo indivíduo parental. Acredita-se que este tipo de reprodução garanta o estabelecimento de grandes populações de *Epidendrum* na restinga, especialmente nas áreas mais abertas e ensolaradas. Mesmo não se fixando de imediato no solo, os clones vivem sobre a serrapilheira formando ou aumentando a borda das moitas, já que os rametos sobre o qual se encontram tendem a tombar para o exterior das moitas. Cavatii *et al.* (2007) e Fraga & Pereira (1998) também observaram a presença de *Epidendrum* sp., nas regiões das bordas das moitas de restinga em Guarapari, onde a disponibilidade de

luminosidade é muito alta. Oliveira & Sajo (1999) relatam que a condição heliófila em *Epidendrum* sp. e sua presença nessas regiões pode estar relacionada com o metabolismo CAM, muito comum na família Orchidaceae, visto que as bordas de moitas são locais de grande incidência de raios solares e de baixa umidade do solo. Bonates (2007), estudando os aspectos ecofisiológicos de *E. orchidiflorum* (= *E. huebneri*), encontrada em campina aberta ou sombreada na Amazônia Central, menciona a presença do metabolismo CAM.

Ambas as espécies formam densas touceiras, na qual cada rameto emitido reproduz-se sexuado e assexuadamente, ao mesmo tempo. Dixon (1991 *apud* Swarts & Dixon, 2009) menciona que a reprodução vegetativa em orquídeas é conhecida como uma estratégia para superar os déficits na produção de sementes. Ressalta-se que no ambiente adverso da restinga (solo arenoso, alta temperatura, luminosidade e salinidade, além de solos oligotróficos) ocorrem sérios fatores limitantes para o desenvolvimento de plântulas, em especial nas Orchidaceae. Muitas orquídeas tropicais germinam facilmente na presença de umidade, nutrientes e temperaturas adequadas de germinação (Rasmussen, 1995; Baskin & Baskin, 1998). No entanto, devido a reservas alimentares limitadas, as sementes de orquídeas têm uma dependência completa de nutrientes fornecidos pela associação micorrízica durante a germinação precoce e fases de estabelecimento das mudas (Rasmussen, 1995).

Handel (1985) postula que a disseminação vegetativa tem um efeito importante sobre a estrutura genética das populações de plantas, determinando a extensão e a distribuição de indivíduos geneticamente idênticos e que, em espécies autocompatíveis, tem sido sugerido que os níveis significativos de estrutura clonal podem aumentar a probabilidade de autofecundação, devido à polinização cruzada entre diferentes rametos dos mesmos genets, aumentando assim os níveis de endogamia dentro das populações. Talvez esta possa ser uma explicação para o aborto de frutos e de sementes observados mesmo após polinização cruzada manual.

Mecanismos de isolamento reprodutivo e hibridização

Na restinga de Maricá, *E. orchidiflorum* e *E. denticulatum* são simpátricas, principalmente na fisionomia arbustiva aberta não inundável, caracterizada pela presença de moitas intercaladas por áreas desnudas. Deste modo, a fisionomia citada

pode ser considerada uma zona de contato ou de hibridização (Pinheiro *et al.*, 2010) entre estas espécies. Pijl & Dodson (1966), Dunsterville (1979), Hágsater & Soto Arenas (2005) e Pansarin & Amaral (2008a) registraram zonas de hibridização entre espécies de *Epidendrum* baseados em dados morfológicos e na distribuição das espécies. Alguns autores também registraram a compatibilidade reprodutiva para muitas coocorrências de espécies de *Epidendrum*, controlando experimentos de cruzamento interespecífico (Dunsterville, 1979; Pansarin & Amaral, 2008a). Apesar de simpátricas, intercompatíveis e com períodos de floração superpostos, não foram encontrados indivíduos morfológicamente intermediários entre as duas espécies em toda área estudada da restinga de Maricá, indicando assim a inexistência de hibridização natural entre as mesmas.

Atributos florais e observações de campo apontam para o não compartilhamento de agentes polinizadores entre as espécies de *Epidendrum* estudadas. Uma das diferenças marcantes entre as flores das duas espécies está na posição do labelo, consequência da ressupinação das flores de *E. orchidiflorum*, assegurando que os polinários sejam aderidos em diferentes partes do corpo do polinizador, ainda que visitas compartilhadas venham a ocorrer no período do crepúsculo ou no alvorecer. Assim, acredita-se que a mudança na forma floral represente uma das principais barreiras entre as duas espécies para não ocorrer a transferência do pólen interespecífico. Silva-Pereira *et al.* (2007) relatam que *Sophranits sincorana* e *S. pfisteri* compartilham polinizadores mas as diferenças no tamanho das partes florais e ginostêmio representam uma das principais barreiras entre as duas espécies para não ocorrer a transferência do pólen interespecífico.

Em orquídeas, barreiras pré-polinização, especialmente diferenças na morfologia da flor e no comportamento dos polinizadores têm sido apontadas como os principais fatores responsáveis pelo isolamento reprodutivo de espécies simpátricas e estreitamente relacionadas (van der Pijl & Dodson, 1966; Gill, 1989; Dressler, 1990; Steiner *et al.*, 1994; Borba & Semir, 1999, 2001). Entretanto, altos níveis de compatibilidade reprodutiva na subtribo Laeliinae, onde se inclui *Epidendrum*, e a falta de polinizadores específicos entre as espécies do gênero (Pansarin & Amaral 2008a) indicam que essas barreiras pré-polinização são fracas, tornando a hibridização em populações naturais um evento possível (Pinheiro *et al.* 2009), como registrado entre diversas espécies simpátricas do complexo *E. secundum* (van der Pijl & Dodson, 1966)

entre *E. secundum* e *E. fulgens* em Picinguaba (Pansarin & Amaral, 2008a) e entre *E. fulgens* e *E. puniceoluteum*, em populações das planícies costeiras do sul e sudeste do Brasil (Pinheiro *et al.*, 2009). Nossos resultados diferem dos até então apresentados na literatura, uma vez que barreiras pré-polinização relacionadas com a biologia floral das espécies (horário de antese, cor e odor das flores, forma floral) parecem suficientes para evitar a hibridização. Por outro lado, a grande ocorrência de propagação vegetativa, aliada à dificuldade de estabelecimento de plântulas no ambiente de restinga, pode ter um papel muito importante na manutenção da integridade das espécies no local.

5 – Conclusões

1. As flores de *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. e de *Epidendrum orchidiflorum* Salzm. ex Lindl. oferecem o néctar como recurso para visitantes, produzido a partir de nectários nupciais, do tipo cunículo e extranupciais.
2. Ambas as espécies de *Epidendrum* apresentam osmóforos. Em *E. denticulatum* nenhum odor foi percebido no entanto a presença de gotículas de óleo na epiderme do calo do labelo, sugere a existência de voláteis florais. Em *E. orchidiflorum* as flores exalam odor suave, durante o dia e mais acentuado à noite.
3. As espécies são simpátricas, principalmente na fisionomia arbustiva arbórea não inundável, florescem simultaneamente ao longo do ano e não apresentam picos de intensidade de floração diferentes. Os resultados apontam fortemente para o não compartilhamento de polinizadores. Apesar de simpátricas, intercompatíveis e com períodos de floração superpostos, não foram encontrados indivíduos morfológicamente intermediários entre as duas espécies em toda área estudada da restinga de Maricá, indicando assim a inexistência de hibridização natural entre as mesmas.
4. As espécies diferem com relação a atributos florais, sendo diurnas, coloridas e visitadas por borboletas Hesperíidae, capazes de remover as polínias, em *E. denticulatum* e noturnas, esverdeadas, ressupinadas, odoríferas e possivelmente polinizadas por lepidópteros noturnos em *E. orchidiflorum*.
5. A taxa de remoção de polínias é alta nas duas espécies, mas o sucesso reprodutivo é baixo e equivalente. As espécies são auto e intercompatíveis, embora a maior produção de frutos e de sementes férteis tenha sido registrada para os experimentos de xenogamia, sugerindo limitações na polinização.
6. Os mecanismos que impedem ou dificultam polinizações interespecíficas são ligados a aspectos morfológicos e etológicos, já que *E. denticulatum* apresenta antese diurna e *E. orchidiflorum* antese noturna. A ressupinação das flores de *E.*

orchidiflorum altera a posição de contato das polínias/cavidade estigmática em relação aos visitantes florais/polinizadores.

7. A propagação vegetativa prevalece em ambas às espécies, sendo importante para a ocupação, crescimento e manutenção das populações na restinga de Maricá.
8. A polinização cruzada manual (xenogamia) aumentou não só a produção de frutos, como também a produção de frutos com sementes férteis, em relação à polinização natural. Tal fato sugere que fatores relacionados com a polinização sejam os principais responsáveis pela baixa produção de frutos nas espécies, ou sejam nossos resultados indicam uma polinização ineficiente para as espécies de *Epidendrum* da restinga.

6 - Referências bibliográficas

- Ackerman JD. 1990.** Short-and long- term limitations to fruit production in a tropical orchid. *Ecology* **71**: 263-272.
- Ackerman JD, Montalvo AM. 1990.** Short and long term limitations to fruit production in a tropical orchid. *Ecology* **71**(1): 263-272
- Almeida AM, Figueiredo RA. 2003.** Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a Brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. *Brazilian Journal of Biology* **63**(4): 551-558.
- Amaral LIV, Pereira MF, Cortelazzo AL. 2001.** Formação das substâncias de reserva durante o desenvolvimento de sementes de urucum (*Bixa orellana* L. - Bixaceae). *Acta Botânica Brasílica* **15**(1): 125-132.
- Angiosperm Phylogeny Group III – APG. 2003.** An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botany Journal Linnean Society*. **141**(4): 399-436.
- Attri LK, Nayyar H, Bhanwra RK, Pehwal A. 2008.** Pós-pollination changes in the floral organs of two *Cymbidium* species. *Biologia Plantarum* **52**(4): 787-791.
- Baker HG, Baker I. 1993.** Floral nectar constituinte in relation to pollinator type In: Jones CE. Little RJ (eds.). Handbook of experimental pollination biology. *Scientific and Academic Editions*, New York, p.117-141.
- Barros F, Barbarena FFVA. 2010.** Nomenclatural notes and new combinations on *Anathallis* and *Specklinia* (Orchidaceae). *Rodriguésia* **61**(1): 127-131.
- Baskin CC, Baskin JA. 1998.** *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Bower Hills: Australia Academic Press. 630p.
- Bencke CSC, Morellato LPC. 2002.** Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. *Revista Brasileira de Botânica*. **25**(3): 269-275.
- Bonates LCM. 2007.** *Anatomia ecológica da folha e da raiz e aspectos ecofisiológicos de Orchidaceae epífitas de uma Campina da Amazônia Central*. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia e Universidade Federal do Amazonas. Manaus. (S.N. aprox. 490p.). 2v., il.
- Borba EL, Semir J. 1999.** Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution* **217**: 197-204.

- Borba EL, Semir J. 2001.** Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany* **88**: 75-88.
- Borba EL, Braga PIS. 2003.** Biologia reprodutiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. *Revista Brasileira de Botânica* **26**(4): 541-549.
- Boyden TC. 1980.** Floral mimicry by *Epidendrum ibaguense* (Orchidaceae) in Panama. *Evolution* **34**(1): 135-136.
- Burd M. 1994.** Bateman's principle and reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. *The Botanical Review* **60**: 63-139.
- Calvo RN. 1990.** Inflorescence size and fruit distribution among individuals in three orchid species. *American Journal of Botany* **77**(10): 1378-1381.
- Cavatti FS, Boina CD, Gonçalves JO, Voltolini, JC, Motta LB, Cardoso MFD, Fonseca RM. 2007.** Distribuição de *Epidendrum* sp. (Orchidaceae) em formações de Ilhas da restinga do Parque Estadual Paulo César Vinha, Guarapari, ES. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*. Caxambu, MG. 1-2.
- Christensen DE. 1992.** Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl.(Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. *Lindleyana* **7**: 28-33
- Coleta MHD, Stort MNS. 1976.** Estudo da possível influência do comprimento do órgão reprodutor feminino como barreira de isolamento reprodutivo em orquídeas. *Ciência e Cultura* **28** (8): 936-939.
- Conceição LP da, Oliveira ALPC de, Barbosa LV. 2006.** Characterization of the species *Epidendrum cinnabarium* Salzm. (Epidendroideae – Orchidaceae) occurring in Dunas do Abaeté-Salvador, Ba-Brasil. *Cytologia* **71**(2): 125-129.
- Cribb PJ, Kell SP, Dixon KW, Barret RL. 2003.** Orchid conservation: a global perspective. In: Dixon KW, Kell SP, Barret RL, Cribb PJ, (org.). *Orchid Conservation.*, Kota Kinabalu, Sabah: Natutal History Publications (Borneo), p.1-24.
- Dafni A. 1992.** *Breeding systems. In: Pollination ecology – A practical approach.* New York, Oxford University Press, p.25-58.
- Davies KL. 1999.** A preliminary survey of foliar anatomy *Maxillaria*. *Lindleyana* **14**: 126-135.
- Davies KL, Stpiczynska M, Gregg A. 2005.** Nectar-secreting floral in *Maxillaria anceps* Ames & C.Schweinf. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **96**: 217-227.
- Dodson CH. 1969.** Pollination and variation in the subtribe Catasetinae (Orchidaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **39**: 35-56.

- Dodson CH, Frymire GP. 1961.** Preliminary studies in the genus *Stanhopea*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **48**: 137-172.
- Dressler RL. 1990.** *The Orchids, Natural History and Classification*. Harvard University Press. Harvard, 314p.
- Dunsterville GC. 1979.** Orchids of Venezuela – *Epidendrum elongatum*. *American Orchid Society Bulletin* **48**: 447-454.
- Faegri G, van der Pijl L. 1979.** *The Principles of Pollination Ecology*. Third Revised Edition. Pergamon Press. London, 254p.
- Feder N, O'Brien TP. 1968.** Plant microtechnique: some principles and new methods. *American Journal of Botany* **55**: 123-142.
- Figueiredo ACS, Pais MS. 1992.** Ultrastructural aspects of the nectary spur of *Limodorum abortivum* (L.) Sw. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **70**: 325-331
- Fournier LA. 1974.** Un método cuantitativo para la medición de características fenológicas en árboles. *Turrialba* **24**: 422-423.
- Fraga CN, Pereira OJ. 1998.** Orchidaceae da comunidade pós-praia das restingas do Estado do Espírito Santo. *Caderno de Pesquisa da UFES* **8**: 65-72.
- Franceschi VR, Nakata PA. 2005.** Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 41-71.
- Fuhro D. 2006.** *O sistema Asclepias curassavica L., Epidendrum fulgens Brongn. e Lantana camara L. Constitui um complexo mimético, com borboletas como operadores? – Um estudo no Parque Estadual de Itapeva, Torres, RS.* Dissertação de Mestrado em Ecologia. Programa de Pós-graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. xxi+79.
- Gabe M. 1968.** *Techiques histologiques*. Masson, Paris.1113p.
- Gahan PB. 1984.** *Plant histochemistry and cytochemistry – an introduction*. London: Academic Press Inc. 301p.
- Galetto L, Bernardello G, Rivera GL. 1997.** Nectar, Nectaries, flores visitors and breeding system in five terrestrial Orchidaceae from Central Argentina. *Journal of Plant Research* **110**: 393-403.
- Gill DE. 1989.** Fruiting failure, pollinator inefficiency and speciation in orchids. In: Otte D, Endler JA. eds. *Speciation and its consequences*. Sunderland: Sinauer, p.458-481.
- Goss GJ, Adams RM. 1976.** The reproductive biology of the epiphytic orchids in Florida IV – sexually selective attraction of moths to the floral fragrance of *Epidendrum anceps* Jacquin. *American Orchids Society Bulletin* **45**: 997-1001

- Gregg KB. 1991.** Reproductive strategy of *Cleisthes divaricate* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **78**: 350-360.
- Hágsater E. 1984.** Towards an understanding of the genus *Epidendrum*. In: Tan KW (ed.). *Proceeding of the 11st World Orchid Conference*. 11 st World Orchid Conference, Miami, p.195-201.
- Hágsater E, Soto Arenas MA. 2005.** *Epidendrum* L. In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. (eds.). *Genera Orchidacearum.*, vol.4. Oxford University Press, Oxford, p.236-251.
- Handel SN. 1985.** The intrusion of clonal growth patterns on plant breeding systems. *American Naturalist* **125**: 367-384.
- Horner TH, Healy RA, Cervantes-Martinez T, Palmer RG. 2003.** Floral nectary fine structure and development in *Glycine* Maxl. (Fabaceae). *International Journal of Plant Sciences* **164**(5): 675-690.
- Huda MK, Wilcock CC. 2011.** Rapid floral senescence following male function and breeding systems of some tropical orchids. *Plant Biology* **14**(2012): 278-284.
- Iannotti MA, Stort MNS, Morales MAM. 1987.** O sistema reproductivo de *Epidendrum rigidum* Jacq. (Orchidaceae). *Ciência y Cultura* **39**: 641-644.
- Inouye DW, Taylor ORJr. 1979.** A temperate region plant-ant-seed predator system: consequences of extra floral nectar secretion by *Helianthelia quinquenervis*. *Ecology* **60**(1): 1-7
- Johansen DA. 1940.** *Plant Microtechnique*. London: Mac. Graw-Hill Comp. Book Inc.
- Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF. 1999.** *Plant Systematics: A Phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts U.S.A. 464p.
- Kaiser R. 1993.** *The scents of orchids, olfactory and chemical investigations*. Elsevier Amsterdam. 260p.
- Keeler KH, 1977.** The extra floral nectaries of *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* **64**(10): 1182-1188.
- Keeler KH, 1981.** Function of *Mentzelia nuda* (Loasaceae) postfloral nectaries in seed defense. *American Journal of Botany* **68**(2): 295-299.
- Ketsa S, Bunya-atichart K, Doorn WG. 2001.** Ethylene production and post-pollination development in *Dendrobium* flowers treated with foreign pollen. Australian. *Journal of Plant Physiology* **28**: 409-415.
- Köeppen W. 1948.** *Climatologia: com um stúdio de los climas de La tierra*. Version Henfrichs PR. Fondo de Cultura Econômica, México, 479p.

- Lenz LW, Wimber DE. 1959.** Hybridization and inheritance in orchids. In: Withner CL. (ed.). *The orchids, a scientific survey*. Ronald Press. New York, p.261-314.
- Lloyd DG, Schoen D. 1992.** Self-and cross-fertilization in plants. I- Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences* **153**(3): 358-369.
- Mantovani A, Iglesias RR. 2001.** Bromélias terrestres na restinga de Barra de Maricá, Rio de Janeiro: Influência sobre o microclima, o solo e a estocagem de nutrientes em ambientes de borda de moitas. *Leandra* **16**: 17-37.
- Martini P, Schlindwein C, Montenegro A. 2003.** Pollination, flower longevity, and reproductive biology of *Gongora quinquenervis* Ruiz and Pavón (Orchidaceae) in an Atlantic forest fragment of Pernambuco, Brasil. *Plant Biology* **5**: 495-503
- Melo MC, Borba EL, Paiva EAS. 2010.** Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* **286**: 141-151
- Menezes LFT, Peixoto AL, Araújo DSD de. 2005.** *História Natural da Marambaia*. Editora da Universidade Rural, 288p.
- Meyberg M. 1988.** Cytochemistry and ultrastructure of the mucilage secreting trichomes of *Nymphoides peltata* (Menyanthaceae). *Annals of Botany* **62**: 537-547.
- Mickeliunas L, Pansarin ER, Sazima M. 2006.** Biologia floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucesso reprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). *Revista Brasileira de Botânica* **29**(2): 251-258.
- Mondragón-Palomino M, TheiBen G. 2009.** Why are orchid flowers so diverse? Reduction of evolutionary constraints by paralogues of class B floral homeotic genes. *Annals of Botany* **104**: 583-594.
- Moreira ASFP, Fuhro D, Isaias RMS. 2008.** Anatomia Floral de *Epidendrum fulgens* Brongn. (Orchidaceae – Epidendroideae) com ênfase no nectário e sua funcionalidade. *Revista de Biologia Neotropical* **5**(1): 23-29.
- Moya S, Ackerman JD. 1993.** Variation in the floral fragrance of *Epidendrum ciliare* (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany* **13**: 41-47.
- Neiland MR, Wilcock CC. 1998.** Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany* **85**(12): 1657-1671.
- Nepi M. 2007.** Nectary structure and ultrastructure. In: Nicolson, SW, Nepi M, Pacini E. *Nectaries and nectar*. Springer, Dordrecht. 129-166.
- Nilsson A. 1978.** Pollination ecology and adaptation in *Platanthera chlorantha* (Orchidaceae). *Botanical Notiser* **131**: 35-51.

- Nilsson LA, Jonsson L, Rason L, Randrianjohany E. 1985.** Monophyly and pollination mechanism in *Angraecum arachnites* Schltr. (Orchidaceae) in a guild of long-tongued hawk-moths (Sphingidae) in Madagascar. *Biological Journal of the Linnean Society* **26**: 1-19.
- Oliveira VDC, Sajo MG. 1999.** Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. *Revista Brasileira de Botânica* **22**(3): 365-374.
- Pabst GFJ, Dungs F. 1975.** *Orchidaceae Brasilienses*. Hildesheim: Kurt Schmiersow. v-1, 408p.
- Pacini E, Nepi M, Vesprini J. 2003.** Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution* **238**: 7-21
- Pais MS, Figueiredo ACS. 1994.** Floral nectaries from *Limodorum abortivum* (L.) Sw. and *Epipactis atropurpurea* Rafin (Orchidaceae): ultrastructural changes in plastids during the secretory process. *Apidologie* **25**: 615-626.
- Paiva EAS, Machado SR. 2008.** The floral nectary of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae, Caesalpinioideae): structural aspects during floral development. *Annals of Botany* **101**: 125-133.
- Pansarin ER. 2000.** *Biologia reprodutiva e morfologia floral de espécies de Orchidaceae em diferentes ambientes no Estado de São Paulo*. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Campinas, SP (s.n.).146pp & illus.
- Pansarin ER. 2003.** Biologia reprodutiva e polinização em *Epidendrum paniculatum* Ruiz & Pavón (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **26**(2): 203-211.
- Pansarin ER, Amaral MCE. 2008a.** Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology* **10**(2): 211-219.
- Pansarin ER, Amaral MCE. 2008b.** Pollen and nectar as a reward in the basal epidendroid *Psilochilus modestus* (Orchidaceae: Triphoreae): A study of floral morphology, reproductive biology and pollination strategy. *Flora* **203**: 474-483.
- Pansarin LM, Castro MM, Sazima M. 2009.** Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. *Botanical Journal of the Linnean Society* **159**: 408-415.
- Parra-Tabla V, Abdala-Roberts L, Rojas JC, Navarro J, Salinas-Peba L. 2009.** Floral longevity and scent respond to pollen manipulation and resource status in the tropical orchid *Myrmecophila christinae*. *Plant Systematics and Evolution* **282**: 1-11.
- Patt JM, Merchant MW, Williams DRE, Meeuse RJD. 1989.** Pollination biology of *Platanthera stricta* (Orchidaceae) in Olympic National Park, Washington. *American Journal of Botany* **76**: 1097-1106.

- Paulus HF, Gack C. 1990.** Pollination of *Ophrys* (Orchidaceae) in *Cyprus*. *Plant Systematics and Evolution* **169**: 177-207.
- Pimentel RR, Machado SR, Rocha JF. 2011.** Estruturas secretoras de *Pavonia alnifolia* (Malvaceae), uma espécie ameaçada de extinção. *Rodriguésia* **62**(2): 253-262.
- Pridgeon AM, Stern WL. 1983.** Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **70**: 1233-1243.
- Primack RB. 1985.** Longevity of individual flowers. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**: 15-37.
- Peter CI, Johnson SD. 2009.** Reproductive biology of *Acrolophia cochlearis* (Orchidaceae): estimating rates of cross-pollination in epidendroid orchids. *Annals of Botany* **104**: 573-581.
- Pinheiro F, Koehler S, Correa AM, Salatino MLF, Salatino A, Barros F. 2009.** Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laeliinae, Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **283**(3-4): 165-177.
- Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Meyer D, Fay MF, Suzuki RM, Lexer C, Cozzolino S. 2010.** Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E.puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* **19**: 3981-3994.
- Proctor M, Yeo P, Lack A. 1996.** *The natural history of pollination*. Harper Collins, London. 479p.
- Purvis MJ, Collier DC, Walls D. 1964.** *Laboratory techniques in botany*. 371p.
- Rasmussen HN. 1995.** *Terrestrial orchids, from seed to mycotrophic plant* Cambridge: Cambridge University Press. 444p
- Reis MG, Pansarin ER, Silva UF da, Amaral MCEdo, Marsaioli AJ. 2004.** Pollinator attraction devices (floral fragrances) of some Brazilian orchids. *ARKIVOC* (vi): 103-111.
- Rodarte ATA. 2008.** *Caracterização Espacial, Temporal e Morfologia das Espécies de Restinga, com ênfase nos recursos florais*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica). Museu Nacional. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro. Xiii+189p.,il.
- Rosse LN, Davide AC, Bertolucci FLG, Ramalho MAP. 1997.** Influência da idade e da época de abate na brotação das cepas e no enraizamento de estacas em clones de *Eucalyptus* sp. *Cerne* **3**(1): 117-128.

- Saddi EM. 2008.** *Orchidaceae dos Afloramentos Rochosos da Pedra da Gávea, Parque Nacional da Tijuca, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.* Dissertação (Mestrado)-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/Escola Nacional de Botânica Tropical. Xvi + 119f.
- Singer RB, Koehler S. 2004.** Pollinarium morphology and floral rewards in Brazilian *Maxillariinae* (Orchidaceae). *Annals of Botany* **93**: 39-51.
- Singer RB, Sazima M. 2001a.** Flower morphology and pollination mechanism in three sympatric Goodyerinae orchids from southeastern Brazil. *Annals of Botany* **88**: 989-997.
- Singer RB, Sazima M. 2001b.** The pollination mechanism of three sympatric *Prescottia* (Orchidaceae:Prescottinae) species in southeastern Brazil. *Annals of Botany* **88**: 999-1005.
- Silva-Pereira V, Smidt E. de C, Borba EL. 2007.** Isolation mechanisms between two sympatric *Sophronitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **269**: 171-182.
- Souza VC, Lorenzi H. 2005.** *Botânica Sistemática; guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira.* Baseado em APG II. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum. 640p.
- Steiner KE, Whitehead VB, Johnson SD. 1994.** Floral and pollinator divergence in two sexually deceptive South African Orchids. *American Journal of Botany* **81**: 185-194
- Stern W, Curry KJ, Pridgeon AM. 1987.** Osmophores of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **74**: 1323-1331.
- Stpiczynska M. 2003.** Floral longevity and néctar secretion of *Platanthera chlorantha* (Custer) Rchb. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **92**: 191-197.
- Stpiczynska M, Davies KL., Gregg A. 2004.** Nectary structure and nectar secretion in *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae). *Annals of Botany* **93**: 87-95.
- Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A. 2005.** Comparative account of nectary structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **95**: 749-756.
- Stpiczynska M, Davies KL, Kaminska M. 2010.** Structure of the cuniculus nectary in *Brassavola flagellaris* Barb. Rodr. (Laeliinae Benth., Orchidaceae). *Acta Agrobotanica* **63**(1): 3-10.
- Stpiczynska M, Davies KL, Kaminska M. 2011.** Comparative anatomy of the nectary spur in selected species of *Aeridinae* (Orchidaceae). *Annals of Botany* **107**: 327-345.

- Swarts ND., Dixon KW. 2009.** Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany* **104**: 543-556.
- Taboga SR., Vilamaior PSL. 2001.** Citoquímica. In: Carvalho H. F., Recco-Pimentel S. M. (eds.). *A célula*. Barueri: Manoli Ltda.
- Tremblay RL, Ackerman JD, Zimmerman JK, Calvo RN. 2005.** Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of Linnean Society* **84**: 1-54
- van der Pijl L, Dodson CH. 1966.** *Orchid flowers: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables. 214p.
- Vogel S. 1990.** *The role of scent glands in pollination: On the structure and fuction of osmophores*. New Delhi: Amerind xvi, 202p. il. Smithsonian Institute Libraries.
- Wiemer AP, Moré M, Benitez-Vieyra S, Cocucci AA, Raguso RA, SérSOC AN. 2008.** A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cyclopogon elatus* (Orchidaceae). *Plant Biology* **11**: 506-514.