

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



LUDMILA MICKELIUNAS PANSARIN

**“BIOLOGIA FLORAL, REPRODUÇÃO E FILOGENIA DO
GÊNERO *CIRRHAEA* LINDL. (ORCHIDACEAE) E
EVOLUÇÃO DOS SISTEMAS DE POLINIZAÇÃO EM
STANHOPEINAE”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Ludmila Mickeliunas Pansarin
Marlies Sazima
e aprovada pela Comissão Julgadora.

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

Orientadora: Profa. Dra. Marlies Sazima

Campinas

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNICAMP

P195b	<p>Pansarin, Ludmila Mickeliunas Biologia floral, reprodução e filogenia do gênero <i>Cirrhaea</i> Lindl. (Orchidaceae) e evolução dos sistemas de polinização em Stanhopeinae / Ludmila Mickeliunas Pansarin – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientadora: Marlies Sazima Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. <i>Cirrhaea</i>. 2. Filogenia. 3. Orchidaceae. 4. Osmóforos 5. Polinização. I. Sazima, Marlies. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rcdt/ib)</p>
--------------	---

Título em inglês: Floral biology, reproduction and phylogeny of genus *Cirrhaea* Lindl. (Orchidaceae) and the evolution of pollination systems in Stanhopeinae.

Palavras-chave em inglês: *Cirrhaea*; Phylogeny; Orchidaceae; Osmophores; Pollination.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal.

Banca Examinadora: Marlies Sazima, Marília de Moraes Castro, Isabel Alves dos Santos, Samantha Koehler, Rodrigo Augusto Santinelo Pereira.

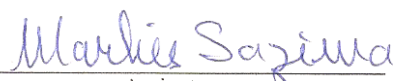
Data da defesa: 14/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

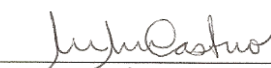
Campinas, 14 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marlies Sazima (Orientadora)


Assinatura

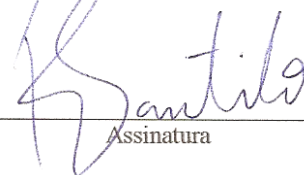
Profa. Dra. Marília de Moraes Castro


Assinatura

Profa. Dra. Isabel Alves dos Santos


Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Augusto Santinelo Pereira


Assinatura

Profa. Dra. Samantha Koehler


Assinatura

Prof. Dr. João Semir

Assinatura

Prof. Dr. Fábio de Barros

Assinatura

Dr. Wellington Forster

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Marlies Sazima pelo apoio, confiança e pela sempre tão dedicada orientação.

Ao meu co-orientador “extra-oficial” e esposo Emerson Ricardo Pansarin, pelo companheirismo, paciência, “puxões-de-orelha” nos momentos de desânimo, dedicação e imensurável auxílio durante todo o desenvolvimento do projeto.

À Fapesp (processo 07/55591-2), à Capes e ao CNPq pelo financiamento, tornando viável o desenvolvimento desse projeto, e ao assessor da Fapesp, que muito contribuiu para a melhoria do presente trabalho.

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

Ao Dr. Günter Gerlach, do Jardim Botânico de Munique, por ter aceitado participar do desenvolvimento desse trabalho. Seu conhecimento sobre a subtribo Stanhopeinae foi de grande valor para a finalização da tese.

Ao Dr. Eduardo Luís Martins Catharino, Diretor da Divisão Orquidário do Jardim Botânico de São Paulo, por permitir a coleta de material botânico para análises morfo-anatômicas.

À Juliana Hanna Leite El Ottra, pela companhia durante as viagens de campo ao Espírito Santo.

Aos alunos e funcionários da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto-SP), que me receberam de braços abertos e me auxiliaram no desenvolvimento das atividades práticas da tese. Em especial aos técnicos Maria Helena Pires e Amauri Ramos Pinhal.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Biosistemática de Plantas (LBMBP), que sempre me acompanharam nas atividades laboratoriais.

Aos professores, técnicos, funcionários e alunos da FCAV, Unesp, campus de Jaboticabal, pelos dois anos de convivência.

Aos professores Eduardo Leite Borba, Fábio de Barros e João Semir, pela leitura crítica e sugestões na pré-banca.

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

Aos colegas de departamento, pela convivência agradável e harmoniosa.

Aos pesquisadores e funcionários do Núcleo de Pesquisa de Picinguaba (Ubatuba-SP) e da Estação Biológica de Santa Lúcia (Santa Teresa-ES), que sempre nos receberam muito bem para os trabalhos de campo.

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

SUMÁRIO	PÁGINA
RESUMO	7
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO GERAL	11
OBJETIVOS	15
CAPÍTULO 1. Osmóforos florais de <i>Cirrhaea</i> Lindl. (Orchidaceae, Stanhopeinae): um estudo morfo-anatômico em espécies do Sudeste do Brasil	16
CAPÍTULO 2. Biologia floral e reprodução de espécies de <i>Cirrhaea</i> Lindl. (Orchidaceae, Stanhopeinae) no Sudeste do Brasil	42
CAPÍTULO 3. Filogenia de <i>Cirrhaea</i> Lindl. e evolução dos sistemas de polinização em Stanhopeinae (Orchidaceae), baseadas em sequências de DNA de regiões nuclear ribossomal (ITS) e de cloroplasto (<i>trnL-F</i> e <i>mat-K</i>)	78
CONSIDERAÇÕES FINAIS	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	129

RESUMO

O gênero *Cirrhaea* Lindl. (Orchidaceae) inclui sete espécies distribuídas principalmente pela região Sudeste do Brasil. Neste trabalho foram estudadas a fenologia, a biologia floral e reprodutiva das espécies de *Cirrhaea*, bem como a morfologia e a anatomia de suas estruturas secretoras. Para isso, observações de campo foram realizadas para investigar os polinizadores e os mecanismos de polinização. Flores frescas foram coletadas e fixadas para os estudos morfo-anatômicos e tratamentos de polinização manual foram feitos para verificar o sistema reprodutivo. Também foi determinada a quantidade de sementes potencialmente viáveis obtidas em cada tratamento e analisadas as fragrâncias. Os estudos de filogenia de *Cirrhaea* e de evolução dos sistemas de polinização de Stanhopeinae foram realizados a partir do seqüenciamento das regiões *trnL-F* e *matK* do DNA de cloroplasto e ITS do DNA nuclear. Os dados obtidos para as espécies de *Cirrhaea* foram acrescentados aos publicados para os demais gêneros de Stanhopeinae para a elaboração de um estudo sobre a evolução dos sistemas de polinização da subtribo. A filogenia das Stanhopeinae foi comparada com uma hipótese filogenética de abelhas da tribo Euglossini (Apidae) a fim de obter informações sobre a evolução dos sistemas de polinização para a subtribo. *Cirrhaea*, assim como os demais gêneros de Stanhopeinae, oferece fragrância como recurso floral, que é produzida por osmóforos epidermais localizados nas porções medianas dos labelos, em protuberâncias, como no caso de *Cirrhaea dependens* e *C. nasuta*, em depressões e fendas, nas espécies *C. fuscolutea* e *C. longiracemosa* e apenas na face interna dos lobos laterais do labelo nas demais espécies. A composição química das fragrâncias é distinta entre as espécies estudadas. Variação na composição da fragrância em populações de uma mesma espécie também pode ocorrer. A fragrância produzida nos osmóforos é fundamental para a atração dos polinizadores, além de ser usada como recurso pelos machos de Euglossini que visitam as flores. Diferentes espécies podem compartilhar um mesmo polinizador ou apresentar polinizadores distintos, refutando a hipótese de que as relações entre orquídeas e euglossines são espécie-específicas. O mecanismo de polinização é do tipo “queda” e semelhante ao previamente descrito para *Cirrhaea dependens*. As análises filogenéticas e anatômicas indicam que as espécies de *Cirrhaea* podem ser divididas em três clados: *C. dependens* e *C. nasuta*, *C. fuscolutea* e *C. longiracemosa*, e *C.*

loddigesii e *C. seidelii*, demonstrando que a morfologia reflete a filogenia do gênero. O grupo irmão de *Cirrhaea* é *Gongora* e ambos são polinizados por espécies de *Euglossa*, *Eulaema* e *Eufriesea*. Quando as filogenias de Stanhopeinae e Euglossini são comparadas, verifica-se que as plantas e os polinizadores aparentemente evoluíram de forma independente, uma vez que não há relação correspondente entre os dois grupos e nem especificidade planta-polinizador.

ABSTRACT

The genus *Cirrhaea* Lindl. (Orchidaceae) comprises seven species distributed mainly in Southeastern Brazil. We have studied the phenology, the floral biology and the reproduction of species of *Cirrhaea*, as well as their morphology and anatomy of secretory structures. Field observations were conducted to investigate the pollinators and the mechanisms of pollination. Furthermore, fresh flowers were collected and fixed for the studies of morpho-anatomy and hand pollinations were performed in order to verify the reproductive system. The amount of potentially viable seeds obtained in each treatment was also determined, and floral fragrances were analyzed. The phylogenetic hypothesis of *Cirrhaea* and the study of evolution of pollination systems of Stanhopeinae were developed based on sequencing of the regions *trnL-F* and *matK* (cpDNA) and ITS (nrDNA). The data obtained here for *Cirrhaea* species were added to those previously published for other Stanhopeinae genera in order to prepare the study about the evolution of pollination systems of the subtribe. The study about the phylogeny of Stanhopeinae was compared with a phylogenetic hypothesis of euglossine bees (Apidae) in order to reconstruct the evolution of pollination systems of the subtribe. The genus *Cirrhaea*, as other Stanhopeinae, produces floral fragrances as resources, which are produced by epidermal osmophores located on the lip midlobe, in protuberances, as in the case of *Cirrhaea dependens* and *C. nasuta*, in depressions and slits in *C. fuscolutea* and *C. longiracemosa*, and only in the inner surface of lateral lobes in the other species. The chemical composition of the fragrances is distinct among studied species. Variation in fragrance composition among populations of a singular species also occurs. The fragrance produced in the osmophores is fundamental to attract pollinators, besides serving as a resource for Euglossini males visiting the flowers. Different species of *Cirrhaea* can share the same pollinator or present distinct pollinators, refuting the hypothesis that the relationships between orchids and euglossine are species-specific. The pollination mechanism of all species is similar to that already described for *Cirrhaea dependens*. The results of the phylogenetic and anatomical studies indicate that species of *Cirrhaea* can be divided into three clades: *C. dependens* and *C. nasuta*, *C. fuscolutea* and *C. longiracemosa*, and *C. loddigesii* and *C. seidelii*, demonstrating that morphology recovers the phylogeny of the genus. *Cirrhaea* is sister to *Gongora* and both

genera are pollinated by species of *Euglossa*, *Eulaema* and *Eufriesea*. When the phylogenies of Stanhopeinae and Euglossini are compared, we could conclude that plants and pollinators have evolved independently, since there is neither linear relationship between both groups and nor specificity between plant and pollinator.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Orchidaceae abrange cerca de 7% das angiospermas, sendo considerada uma das maiores famílias deste grupo, ao lado de Fabaceae e Asteraceae (Arditti 1982). Segundo Dressler (2005), estima-se que a família possua cerca de 24.500 espécies distribuídas por todo o mundo, mas apresentando maior concentração e diversidade em regiões tropicais e subtropicais. De acordo com Barros *et al.* (2010), o Brasil possui cerca de 2.420 espécies distribuídas em 235 gêneros. A maioria das espécies é epífita, porém, existem espécies rupícolas, terrícolas, palustres e mico-heterotróficas (Dressler 1993). Espécies de orquídeas podem ser encontradas em todas as formações vegetais brasileiras (Hoehne 1949). A grande capacidade adaptativa das orquídeas pode ser explicada, em parte, pelas várias formas vegetativas presentes na família, as quais podem representar diferentes estratégias relacionadas, basicamente, com a obtenção e reserva de água e nutrientes. Caules intumescidos formando pseudobulbos, folhas carnosas, raízes dotadas de velame e o próprio crescimento em touceiras, favorecendo o acúmulo de matéria orgânica, são algumas destas estratégias (Dressler 1993).

Ao contrário dos órgãos vegetativos, que têm grande diversidade estrutural, as flores das orquídeas são relativamente uniformes quanto ao número e arranjo das partes, possuindo três sépalas e três pétalas, sendo que uma delas é diferenciada em labelo. Os órgãos reprodutivos são fundidos em uma estrutura, a coluna ou ginostêmio, com uma ou mais raramente duas ou três anteras e uma região estigmática formada pela fusão dos três lobos estigmáticos (Dressler 1981). Na maioria das Orchidaceae os grãos de pólen são reunidos em duas ou mais polínias, e essas, em conjunto com o viscido (e estipe em alguns gêneros), que é a extremidade adesiva responsável pela fixação ao polinizador, formam o polinário. O polinário é separado do estigma por uma região denominada rostelo (Dressler 1993).

A família Orchidaceae foi classificada por Dressler (1993) em 70 subtribos, 22 tribos e cinco subfamílias baseadas principalmente no número e na posição da antera. Essas subfamílias são: Apostasioideae, Cyripedioideae, Epidendroideae, Spiranthoideae e Orchidoideae. Atualmente, estudos baseados na análise de regiões de DNA (Cameron *et al.* 1999; Chase *et al.* 2003; Cameron 2004; Freudenstein *et al.* 2004) e caracteres

morfológicos (Freudenstein & Rasmussen 1999), demonstram que o número de subfamílias é mantido, porém, Spiranthoideae e Orchidoideae são consideradas como uma única subfamília (Orchidoideae), e Epidendroideae tem sido dividida, sendo criada a subfamília Vanilloideae (Cameron *et al.* 1999; Chase *et al.* 2003; Cameron 2004; Freudenstein *et al.* 2004). Epidendroideae forma um grupo parafilético que ultimamente está dividido em dois grandes clados. Um deles compreende as Epidendroideae derivadas, que apresentam polínias revestidas por viscina, antera incumbente, caule geralmente modificado em pseudobulbos e hábito predominantemente epifítico ou rupícola, como é o caso das Stanhopeinae. O sistema de classificação mais recente para a família é o de Pridgeon *et al.* (1999, 2001, 2003, 2005, 2009), que é baseado principalmente em caracteres macromoleculares e tende a substituir os mais antigos. Nesse sistema a família Orchidaceae é dividida em cinco subfamílias: Apostasioideae, Vanilloideae, Cypridioideae, Orchidoideae e Epidendroideae.

A subtribo Stanhopeinae (subfamília Epidendroideae, tribo Cymbidiae) compreende 22 gêneros distribuídos em regiões tropicais das Américas, e inclui o gênero *Cirrhaea* Lindl. (Dressler 1993), exclusivamente brasileiro. Dentre as mais de 20 espécies de *Cirrhaea* descritas, apenas sete estão sendo consideradas válidas atualmente (*C. dependens* Loudon, *C. fuscolutea* Lindl., *C. loddigesii* Lindl., *C. longiracemosa* Hoehne, *C. nasuta* Brade, *C. seidelii* Pabst e *C. silvana* P. Castro & Campacci) (Govaerts 1999, 2003). Com exceção de *C. silvana*, que ocorre no sul da Bahia, todas as espécies de *Cirrhaea* são encontradas no Sudeste do Brasil. Três dessas espécies (*C. dependens*, *C. loddigesii* e *C. fuscolutea*) são encontradas na planície litorânea de Picinguaba (Ubatuba-SP), dentro do Bioma da Mata Atlântica (Pansarin *et al.* 2006).

Cirrhaea, assim como os demais gêneros que pertencem à subtribo Stanhopeinae, produzem fragrâncias como recurso floral, que são coletadas exclusivamente por machos de abelhas da tribo Euglossini (Hymenoptera, Apidae) (Williams 1982). Os machos dessas abelhas são conhecidos por coletarem fragrâncias em espécies de várias famílias de Angiospermas, incluindo Orchidaceae (para uma revisão veja Williams 1982). Em orquídeas, as fragrâncias florais são produzidas quase exclusivamente no labelo, em estruturas glandulares ou epidermais chamadas osmóforos (Vogel 1963a, 1963b). O papel dos machos de abelhas da tribo Euglossini como polinizadores de orquídeas é amplamente

conhecido (Dressler 1967). Durante a coleta dessas substâncias aromáticas ou ao abandonar a flor, o polinário se fixa na abelha. De acordo com Pansarin *et al.* (2006), *Cirrhaea dependens* é polinizada principalmente por machos de *Euglossa viridis* e, eventualmente, por machos de *Eufriesea violacea*.

As primeiras hipóteses filogenéticas elaboradas para Orchidaceae foram baseadas em caracteres morfológicos (Burns-Balogh & Funk 1986; Dressler 1993). As hipóteses propostas por esses autores foram refletidas nos sistemas de classificação da família, que atualmente vem sendo revisado e sofrendo modificações. Desde a última década, o uso de seqüências de nucleotídeos para estimar relações filogenéticas entre táxons tem atraído a atenção de botânicos que estudam uma variedade de grupos de plantas (Clegg & Zurawski 1992), inclusive Orchidaceae (para uma revisão veja Cameron 2004 e Freudenstein *et al.* 2004). Atualmente, numerosos estudos (revisão em Cameron 2004) têm demonstrado que flores de orquídeas podem ser muito susceptíveis a convergência morfológica causada por pressão de seleção por parte de seus polinizadores, ainda que caracteres florais tenham sido tradicionalmente usados na classificação da família (Dressler & Dodson 1960; Dodson 1962). Nesses casos, seqüências de nucleotídeos têm a vantagem de, além de poderem ser rapidamente produzidas, serem pouco homoplásicas (Palmer *et al.* 1988). Seqüências gênicas podem ser obtidas a partir do DNA presente no núcleo (nDNA), cloroplastos (cpDNA) ou mitocôndrias (mDNA). As variações que ocorrem no DNA determinam os estados de caráter e incluem mutações pontuais e rearranjos, incluindo inversões, deleções e inserções de material genético. As mutações podem ser comparadas entre diferentes táxons e são analisadas através de métodos cladísticos, geralmente com a utilização do princípio de parcimônia.

Para a família Orchidaceae há poucos estudos envolvendo evolução dos sistemas de polinização. De acordo com Cozzolino & Widmer (2005), o estudo sobre evolução dos sistemas de polinização em Orchidaceae é atualmente uma área em expansão. Em uma investigação sobre a evolução dos sistemas de polinização em *Disa*, utilizando apenas caracteres morfológicos, foi verificado que reversões de flores de engano para flores com recurso ocorreram pelo menos três vezes dentro do gênero (Johnson *et al.* 1998). Apenas poucos trabalhos sobre evolução da polinização têm sido realizados envolvendo filogenias baseadas em dados macromoleculares. Uma exceção é o trabalho de Cozzolino *et al.*

(2001), que verificaram a evolução de flores de engano para flores com recurso em Orchidinae. Para a subtribo Stanhopeinae, apesar de existirem dados sobre sistemas de polinização de muitos gêneros na literatura, nada é conhecido sobre a evolução da polinização do grupo.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos:

1. Estudar a fenologia reprodutiva e a biologia floral das espécies de *Cirrhaea* e relacionar a morfologia floral com os atributos morfológicos dos polinizadores e o mecanismo de polinização;
2. Estudar a morfologia e a anatomia das estruturas secretoras (osmóforos) presentes nestas espécies, para testar a hipótese de que a morfologia floral, principalmente em relação aos osmóforos, reflete a filogenia do gênero.
3. Observar, em condições naturais, os tipos de visitantes florais de espécies de *Cirrhaea* e o comportamento de visita, testando a hipótese de que as relações são espécie-específicas.
4. Realizar experimentos para determinar o sistema reprodutivo e quantificar as sementes potencialmente viáveis obtidas em cada tratamento;
5. Elaborar hipóteses filogenéticas para *Cirrhaea* e demais gêneros da subtribo Stanhopeinae, utilizando caracteres macromoleculares de sequenciamento da região ITS do DNA nuclear ribossomal, e *matK* e *trnL-F* do DNA de cloroplasto;
6. Verificar a possível evolução dos sistemas de polinização na subtribo Stanhopeinae, utilizando os dados obtidos no presente trabalho, e informações sobre polinizadores presentes na literatura e as seqüências de nucleotídeos presentes no GenBank. Para isso, testamos a hipótese de que há uma relação correspondente entre as filogenias das plantas e dos polinizadores.

CAPÍTULO 1

Osmóforos florais de *Cirrhaea* Lindl. (Orchidaceae, Stanhopeinae): um estudo morfo-anatômico em espécies do Sudeste do Brasil

Ludmila Mickeliunas Pansarin¹, Emerson Ricardo Pansarin² e Marlies Sazima³

¹*Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, CP 6109 Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brasil*

²*Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brasil*

³*Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, CP 6109 Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brasil*

Resumo

No presente trabalho foram estudadas a morfologia e a anatomia do labelo das seis espécies de *Cirrhaea* Lindl. (Orchidaceae, Stanhopeinae) que ocorrem no Sudeste do Brasil: *Cirrhaea dependens* Loudon, *C. fuscolutea* Lindl., *C. loddigesii* Lindl., *C. longiracemosa* Hoehne, *C. nasuta* Brade e *C. seidelii* Pabst. Para os estudos morfológicos foram utilizadas flores frescas, enquanto para a investigação da anatomia foram usadas flores previamente fixadas em formalina neutra tamponada (FNT). Testes com vermelho neutro foram aplicados às flores para a detecção das regiões produtoras de odor. Para a análise da estrutura dos osmóforos, porções do labelo foram incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo rotativo. Os resultados indicam que as flores de *Cirrhaea*, com base nas características morfo-anatômicas dos osmóforos, podem ser reunidas em três grupos: 1) *Cirrhaea dependens* + *C. nasuta*, 2) *C. fuscolutea* + *C. longiracemosa*, e 3) *C. loddigesii* + *C. seidelii*. Essa divisão reflete a filogenia do gênero, que é composta por clados formados pelos mesmos grupos de espécies. Todas as espécies apresentam um osmóforo epidermal, plano, sem papilas e recoberto por uma cutícula, responsável pela atração dos polinizadores. A fragrância produzida nos osmóforos servem também como recurso e são coletados por diferentes espécies de machos de abelha da tribo Euglossini. Os resultados obtidos auxiliam no reconhecimento das espécies de *Cirrhaea* que ocorrem no Sudeste do Brasil e fornecem informações sobre as estruturas secretoras de odor (osmóforos) para as espécies do gênero, contribuindo como um bom caráter para o conhecimento da subtribo Stanhopeinae.

Introdução

A subtribo Stanhopeinae (Epidendroideae, Cymbidiae) é composta por 20 gêneros distribuídos pelas regiões tropicais das Américas, e inclui *Cirrhaea* Lindl. (Pridgeon *et al.* 2009). *Cirrhaea* é endêmico do Brasil e apresenta sete espécies: *C. dependens* Loudon, *C. loddigesii* Lindl., *C. longiracemosa* Hoehne, *C. nasuta* Brade, *C. fuscolutea* Lindl., *C. seidelii* Pabst e *C. silvana* V.P. Castro Neto & M.A. Campacci (Govaerts 1999, 2003). Com

exceção de *C. silvana*, que foi descrita para o sul da Bahia, o gênero está distribuído principalmente na porção leste da região Sudeste do Brasil. As espécies são raras, não formando populações, sendo encontrado indivíduos esparsos em áreas restritas de Mata Atlântica (Pansarin *et al.* 2006).

Espécies de *Cirrhaea*, assim como ocorre nos demais membros de Stanhopeinae, oferecem fragrâncias florais (*i.e.*, óleos voláteis) como recurso aos polinizadores. Esses perfumes são coletados exclusivamente por machos de abelhas da tribo Euglossini (Hymenoptera, Apidae) (Williams 1982). Machos de euglossine são conhecidos por coletar fragrâncias em plantas de muitas famílias. Em Orchidaceae, além de Stanhopeinae, a oferta de fragrância como recurso tem sido demonstrada para Catasetinae, e algumas espécies de Oncidiinae, Maxillariinae e Zygopetalinae (Williams 1982). Em orquídeas, as fragrâncias florais são produzidas quase exclusivamente no labelo, em estruturas chamadas osmóforos (Vogel 1963a, 1963b). Os osmóforos podem ser formados por uma única camada de células epidermais ou podem apresentar-se na forma de papilas secretoras (Curry *et al.* 1991; Endress 1994; Ascensão *et al.* 2005; Cseke *et al.* 2007; Pansarin *et al.* 2009).

A estrutura anatômica e a diversidade morfo-anatômica dos osmóforos de Stanhopeinae são ainda pouco conhecidas. De acordo com Curry *et al.* (1991), os osmóforos de *Sievekingia* e *Stanhopea* estão localizados difusamente em uma porção do labelo chamada hipoquílio e apresentam superfícies desde planas até com papilas uni ou pluricelulares. Para os gêneros *Acineta*, *Coryanthes* e *Soterosanthus* os osmóforos são encontrados em protuberâncias em forma de chifres (Pridgeon *et al.* 2009), mas não há informações sobre os tipos celulares que constituem o tecido secretor.

Estudos anatômicos de estruturas que atuam na atração ou produzem recursos aos polinizadores ainda são escassos para a família Orchidaceae (e.g., Teixeira *et al.* 2004; Pansarin *et al.* 2008; Pansarin *et al.* 2009). Para o gênero *Cirrhaea* dados estão disponíveis apenas para *C. dependens* (Pansarin *et al.* 2006). Em *C. dependens* os osmóforos estão localizados em uma protuberância do labelo, que apresenta células epidérmicas com citoplasma denso, núcleo grande e está coberta com uma cutícula. A ausência de características semelhantes em células de outras partes do labelo, além da coleta ativa de óleos voláteis por parte dos polinizadores nessa região, sugere que a fragrância seja produzida apenas na protuberância (Pansarin *et al.* 2006). Informações a respeito da

morfologia floral e sua relação com polinizadores e mecanismos de polinização, além da anatomia dos osmóforos, são inexistentes para as demais espécies do gênero. Além disso, *C. dependens* é a espécie com maior distribuição dentro do gênero, existindo pelo menos oito variedades descritas, diferenciadas pela coloração das sépalas e pétalas (Hoehne 1942). O estudo morfo-anatômico realizado por Pansarin *et al.* (2006) foi feito a partir de uma única população ocorrente na Serra do Japi, no município de Jundiaí, estado de São Paulo. Até o presente, nenhum estudo desse tipo havia sido feito com representantes de *C. dependens* de outras localidades.

O objetivo deste trabalho é investigar a morfologia floral e a estrutura dos osmóforos florais das seis espécies de *Cirrhaea* que ocorrem no Sudeste brasileiro (*C. dependens*, *C. fuscolutea*, *C. loddigesii*, *C. longiracemosa*, *C. nasuta* e *C. seidelii*) e testar a hipótese de que a morfologia dos osmóforos reflete a filogenia do gênero. A espécie *Cirrhaea silvana* não foi incluída neste estudo por não terem sido encontrados indivíduos no campo nem em cultivo para a coleta de flores. A partir dos dados obtidos, é discutida a relação dessas estruturas com a morfologia dos polinizadores e os mecanismos de polinização. Além disso, é discutida a importância dos caracteres morfo-anatômicos na taxonomia do gênero, bem como em relação aos demais gêneros de Stanhopeinae.

Material e Métodos

Para os estudos anatômicos foram utilizadas flores frescas coletadas no campo (Ubatuba-SP, Jundiaí-SP, Nova Friburgo-RJ e Santa Teresa-ES) ou cultivadas no orquidário do Instituto de Botânica de São Paulo (coletadas em Bertioga-SP e Ubatuba-SP), no primeiro dia de antese (**Tabela 1**).

As estruturas florais das espécies de *Cirrhaea* foram analisadas com auxílio de um estereomicroscópio binocular a partir de material fresco. Para cada espécie foram analisadas 30 flores. Para o estudo morfológico foram observados o formato, a simetria, a disposição e o tamanho das partes florais como sépalas, pétalas, labelo, coluna, antera e polinário levando-se em conta as possíveis variações intra-específicas (Faegri & van der

Pijl 1979). Os materiais testemunho foram depositados no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC).

Para determinar a região da flor produtora do odor, flores frescas foram submersas em uma solução de Vermelho Neutro 0,1% (específico para glândulas lipofílicas) por 30 minutos (Vogel 1962). Para a análise histológica foram utilizadas apenas as peças florais que evidenciaram a presença de osmóforos. Para caracterizar a estrutura anatômica das áreas produtoras de odor as flores foram fixadas em formalina neutra tamponada (FNT) por 48 horas (Lillie 1965) e colocadas em uma bomba de vácuo para garantir uma melhor penetração do fixador. As flores foram então estocadas em etanol 70%. Os labelos foram posteriormente desidratados em série butílica (Johansen 1940), incluídos em parafina e seccionados (transversal e longitudinalmente) em micrótomo rotativo (cortes com espessura entre 10-12 μm). Os cortes foram corados com Safranina O e Azul de Astra (Gerlach 1969) e as lâminas permanentes foram montadas com resina sintética. Essa metodologia é semelhante à empregada nos estudos de estruturas secretoras em *Grobya amherstiae* Lindl. (Pansarin *et al.* 2009) e no estudo envolvendo *Cirrhaea dependens* (Pansarin *et al.* 2006).

As lâminas foram observadas ao microscópio óptico Leica DM500 e as imagens digitais foram obtidas com máquina fotográfica Leica ICC50 acoplada ao microscópio. A montagem das pranchas foi feita com a utilização do programa Power Point - Microsoft.

Resultados

Os testes com vermelho neutro em flores de todas as espécies de *Cirrhaea* estudadas revelaram que as regiões produtoras de odor estão localizadas na porção mediana do labelo, em protuberâncias, como no caso de *Cirrhaea dependens* e *C. nasuta*, em depressões e fendas, em *C. fuscolutea* e *C. longiracemosa* e apenas na face interna dos lobos laterais do labelo nas demais espécies.

Não foram encontradas diferenças morfo-anatômicas entre indivíduos da mesma espécie coletados em diferentes populações. Para *Cirrhaea dependens* ocorreu apenas variação na coloração das sépalas e pétalas (de verdes a vináceas). A seguir estão

apresentados os caracteres morfo-anatômicos específicos para cada uma das espécies estudadas.

***Cirrhaea dependens* Loudon**

As flores de *Cirrhaea dependens* (ca. 2,5 x 3,2 cm) são de coloração que varia de creme-esverdeada a vinácea. O pedicelo + ovário mede ca. 3,3 cm de comprimento e é verde-amarronzado a vináceo. As sépala são verdes (a vináceas) e com margens levemente revolutas. A sépala dorsal (3,1-3,2 x 0,6-0,7 cm) é linear-lanceolada, com ápice agudo e retrorso. As sépala laterais (2,8-2,9 x 0,6-0,7 cm) são elíptico-lanceoladas com ápice agudo e levemente curvado para baixo. As pétalas medem ca. 2,75 x 0,3 cm, são eretas, convexas, linear-lanceoladas com ápice acuminado e creme-esverdeadas a vináceas. O labelo é carnoso e trilobado, com uma base unguiculada de 1,1 x 0,1 cm. Os lobos laterais (ca. 1,1 x 0,4 cm) são lanceolados, muito próximos entre si, de cor creme com algumas estrias vináceas a inteiramente vináceos e com o ápice agudo, voltado para baixo. O lobo apical (ca. 0,9 x 0,2 cm) é linear-lanceolado, ereto, com ápice agudo, verde com estrias vináceas a inteiramente vináceo e voltado para cima; possui na base uma protuberância subcilíndrica com ca. 0,12 x 0,11 cm, creme a vinácea e voltada para a coluna. A coluna mede ca. 1,35 x 0,25 cm, é creme-esverdeada com pintas vináceas a inteiramente vinácea, recurvada para dentro na base, com o rostelo no ápice e a antera logo abaixo, na face externa. O rostelo (0,3 x 0,22 cm) é dentiforme e côncavo. O estigma mede ca. 0,5 x 1,0 mm. A antera (ca. 0,45 x 0,2 cm) é transversalmente elíptica, com ápice arredondado e branco-hialina. O polinário mede ca. 0,5 cm e possui duas polínias (ca. 0,35 x 0,5 mm), elíptico-lanceoladas e amarelas, um estipe branco-hialino de ca. 1,8 x 0,4 mm e um viscidio creme e elíptico, com ca. 0,5 x 0,8 mm.

A flor de *Cirrhaea dependens* (**Figura 1A**) apresenta células secretoras principalmente na protuberância subcilíndrica, logo abaixo do lobo apical, (**Figura 1A**), e menos intensamente na porção basal da face interna dos lobos laterais. Nessa espécie o osmóforo presente na protuberância subcilíndrica (**Figura 1B**) é composto de uma única camada de células epidermais justapostas (**Figura 1C**) que secretam a fragrância. A função de osmóforo é evidenciada pelas características celulares, como um núcleo bem desenvolvido e grande vacúolo (**Figuras 1C-D**), típicas de células em alta atividade

metabólica. O tecido subjacente parenquimático do subcilindro é compacto, e suas células também apresentam um núcleo bem evidente e um grande vacúolo, auxiliando na produção do odor. Na face interna dos lobos laterais as células epidermais também são secretoras, com a participação das camadas mais adjacentes, mas não do parênquima mais interno. O osmóforo é recoberto por uma fina cutícula (**Figura 1D**).

***Cirrhaea loddigesii* Lindl.**

As flores de *Cirrhaea loddigesii* (ca. 1,5 x 2,8 cm) são predominantemente creme a amarelo-rosadas. O pedicelo + ovário mede ca. 3,3 cm de comprimento e é rosado. As sépalas são livres, creme-rosadas com pintas vináceas nas extremidades. A sépala dorsal (ca. 2,2 x 0,7 cm) é elíptico-lanceolada, com ápice arredondado, margens levemente revolutas e retrorsas. As sépalas laterais (ca. 2,0 x 0,7 cm) são elíptico-lanceoladas com ápice subagudo e um pouco revolutas. As pétalas medem ca. 1,7 x 0,3 cm, são eretas, formando um ângulo de 45° com o labelo, linear-lanceoladas com o ápice agudo e levemente voltado para baixo, amarelo-esverdeadas com pintas vináceas nas extremidades. O labelo é carnoso e trilobado, com uma base unguiculada de 1,0 x 0,1 cm. Os lobos laterais (ca. 1,25 x 0,3 cm) são lanceolados, levemente falcados, com o ápice acuminado e voltado para baixo, amarelos na base e de cor creme no ápice e levemente afastados na base (ca. 1,0 mm). O lobo apical (ca. 0,5 x 0,2 cm) tem forma de seta (estreito na base, com duas alas laterais no ápice), recurvado, formando um ângulo de quase 90° para frente com a base do labelo, com ápice agudo, rosa com estrias vináceas; possui na face interna da base de cada lobo lateral uma região triangular, com ápice para baixo (osmóforo) com ca. 0,4 x 0,2 cm e amarela. A coluna mede ca. 0,9 x 0,3 cm, creme-esverdeada, com algumas pintas róseas na face externa, recurvada para dentro na base, com o rostelo no ápice e a antera logo abaixo, na face externa. O rostelo mede ca. 0,27 x 0,35 cm, é transversalmente oval e côncavo. O estigma mede ca. 0,5 x 1,5 mm. A antera (ca. 0,4 x 0,17 cm) é elíptico-lanceolada, com ápice levemente agudo e branco-hialina. O polinário mede ca. 0,57 cm e possui duas polínias (ca. 0,3 x 0,1 cm), elíptico-lanceoladas e amarelas, um estipe branco-hialino de ca. 1,9 x 0,4 mm e um viscídio creme e levemente triangular, com ca. 0,7 x 1,0 mm.

Em *Cirrhaea loddigesii* as células secretoras estão localizadas na face interna dos lobos laterais do labelo (**Figura 2A**). O osmóforo é composto por uma única camada de células epidérmicas secretoras e 2-3 camadas de células parenquimáticas anisodiamétricas e compactas, com pequenos espaços intercelulares que acumulam assimilados. A epiderme apresenta um denso citoplasma, um núcleo proeminente e um grande vacúolo (**Figura 2B**).

Cirrhaea longiracemosa Hoehne

As flores de *Cirrhaea longiracemosa* (ca. 1,2 x 3,3 cm) são predominantemente verdes. O pedicelo + ovário mede ca. 3,4 cm de comprimento e é verde-acastanhado. As sépalas são livres, verdes e com margens levemente revolutas. A sépala dorsal (ca. 1,85 x 0,9 cm) é elíptica com ápice arredondado e voltada para trás. As sépalas laterais (ca. 1,8 x 0,9 cm) são elípticas e com ápice subagudo. As pétalas medem ca. 1,6 x 0,35 cm, são verde-amareladas, eretas, formando um ângulo de 45° com o labelo, linear-lanceoladas com ápice subagudo e levemente voltado para baixo. O labelo é carnoso e trilobado, com uma base unguiculada de 0,6 x 0,1 cm. Os lobos laterais (ca. 0,6 x 0,3 cm) são elíptico-lanceolados, creme-amarelados, com o ápice subagudo, voltado para baixo e muito afastados entre si (ca. 0,35 cm). O lobo apical (ca. 0,3 x 0,35 cm) é ovalado, conchiforme, muito côncavo, voltado para cima, verde-amarelado com muitas estrias vináceas internamente; possui na base uma calosidade com ca. 0,3 x 0,3 cm, convexa e amarela. A coluna mede ca. 1,0 x 0,35 cm, é verde-amarelada, recurvada para dentro na base, com o rostelo no ápice e a antera logo abaixo, na face externa. O rostelo mede ca. 0,25 x 0,27 cm, é cordiforme e levemente côncavo. O estigma mede ca. 0,5 x 1,5 mm. A antera (ca. 3,4 x 1,2 cm) é oblanceolada, com ápice arredondado e branco-hialina. O polinário mede ca. 0,58 cm e possui duas polínias (ca. 3,2 x 0,8 mm), linear-lanceoladas e amarelas, um estipe branco-hialino de ca. 1,9 x 0,5 mm e um viscídio creme e elíptico, com ca. 0,7 x 0,4 mm.

Em *Cirrhaea longiracemosa* (**Figura 3A**) as células secretoras se localizam mais intensamente na calosidade abaixo do lobo apical do labelo (**Figura 3B**), e menos intensamente na porção basal da face interna dos lobos laterais do labelo (**Figura 3C**). A calosidade abaixo do lobo apical possui uma reentrância bem evidente e o osmóforo presente nela é composto de uma única camada de células epidermais secretoras de fragrância, que apresentam núcleo bem desenvolvido e citoplasma denso (**Figura 3D**).

Nessa região o osmóforo é recoberto por uma espessa cutícula (**Figura 3D**). Na superfície interna dos lobos laterais as células epidérmicas também são secretoras, com a participação de 6-7 camadas de células parenquimáticas subjacentes, mas não do parênquima mais interno (**Figura 3C**).

***Cirrhaea nasuta* Brade**

As flores de *Cirrhaea nasuta* (ca. 2,0 x 2,5 cm) são predominantemente de cor creme. O pedicelo + ovário mede ca. 3,3 cm de comprimento e é rosa-esverdeado. As sépalas são livres, creme-rosadas e estreitas. A sépala dorsal (2,7-2,8 x 1,0-1,1 cm) é oval-lanceolada, com ápice agudo, margens levemente revolutas e voltadas para trás. As sépalas laterais (2,5-2,6 x 0,8-1,0 cm) são elíptico-lanceoladas com ápice subagudo e voltado para baixo e com margens levemente revolutas. As pétalas medem ca. 1,9 x 0,5 cm, são eretas, formando um ângulo de 45° com o labelo, oblanceoladas com base falcada e ápice subagudo e levemente voltado para baixo. O labelo é carnoso e trilobado, com uma base unguiculada de 1,0 x 0,1 cm. Os lobos laterais (ca. 1,1 x 0,45 cm) são linear-lanceolados, de cor creme, com o ápice agudo, voltados para baixo e muito próximos entre si. O lobo apical (ca. 0,65 x 0,15 cm) é linear-lanceolado, levemente falcado para frente, com ápice agudo, creme com estrias vináceas e voltado para cima; possui na base uma protuberância subcilíndrica com ca. 0,4 x 0,2 cm, creme e voltada para a coluna. A coluna mede ca. 1,4 x 0,3 cm, é creme, com poucas pintas róseas lateralmente, recurvada para dentro na base, com o rostelo no ápice e a antera logo abaixo, na face externa. O rostelo mede ca. 0,2 x 0,15 cm, é oval-cordiforme e profundamente côncavo. O estigma é uma fenda de ca. 2,0 x 0,5 mm. A antera (ca. 0,4 x 0,2 cm) é oblanceolada, com ápice arredondado e branco-hialina. O polinário mede ca. 0,45 cm e possui duas polínias (ca. 3,5 x 0,5 mm), linear-lanceoladas e amarelas, com estipe branco-hialino de ca. 0,4 mm e viscidio creme de forma oval, com ca. 0,6 x 0,9 mm.

O osmóforo de *Cirrhaea nasuta* (**Figura 4A**) é muito semelhante ao de *C. dependens*, diferenciando-se apenas no tamanho do subcilindro onde está localizado, que é cerca de duas vezes maior em *C. nasuta* (**Figura 4B**). As células epidérmicas são secretoras, com citoplasma denso e grandes vacúolos e as células parenquimáticas subjacentes participam na produção do odor (**Figura 4C**), fato evidenciado pela forte coloração

apresentada pelas células quando tratadas com Safranina e Azul de Astra. A epiderme é recoberta por uma fina cutícula (**Figura 4D**), que é rompida quando os polinizadores coletam a fragrância.

***Cirrhaea fuscolutea* Lindl.**

As flores de *Cirrhaea fuscolutea* (ca. 1,5 x 2,2 cm) são predominantemente verde-amareladas. O pedicelo + ovário mede ca. 3,4 cm de comprimento e é rosado. As sépalas são livres, verde-amareladas internamente e amarelo-acastanhadas externamente, elíptico-lanceoladas e com o ápice levemente acuminado. A sépala dorsal (2,3-2,4 x 0,8-0,9 cm) é voltada para trás e as sépalas laterais (1,9-2,0 x 1,0-1,1 cm) são voltadas para cima formando um ângulo de 45° com o labelo. As pétalas medem ca. 1,8 x 0,55 cm, são elíptico-lanceoladas com o ápice arredondado e amarelas (levemente esverdeadas). O labelo é carnoso e trilobado, com uma base unguiculada de 0,7 x 0,1 cm. Os lobos laterais (ca. 0,8 x 0,2 cm) são linear-lanceolados, amarelos, voltados para baixo, com os ápices subagudos e levemente recurvados para trás, próximos entre si. O lobo apical (ca. 0,6 x 0,3 cm) é ovalado e conchiforme, muito côncavo, amarelo internamente (algumas vezes com manchas vináceas) e acastanhado (ou amarelado) externamente e voltado para cima; possui na base uma calosidade amarela com ca. 0,2 x 0,15 cm e uma fenda mediana. A coluna mede ca. 1,0 x 0,8 cm, é amarelo-esverdeada, recurvada para dentro na base, com o rostelo no ápice e a antera logo abaixo, na face externa. O rostelo mede ca. 0,35 x 0,4 cm, é arredondado, plano, com três pequenas projeções na parte superior. O estigma mede ca. 0,5 x 2,0 mm. A antera (ca. 3,5 x 1,2 mm) é lanceolada, com ápice levemente agudo e branco-hialina. O polinário mede ca. 0,6 cm e possui duas polínias (ca. 3,1 x 0,9 mm), linear-lanceoladas e amarelas, um estipe branco-hialino de ca. 2,0 x 0,5 mm e um viscidio branco e oval, com ca. 0,5 x 0,4 mm.

A flor de *Cirrhaea fuscolutea* apresenta a região produtora de fragrância (**Figura 2C**) muito semelhante à de *C. longiracemosa*. Logo abaixo do lobo apical há uma calosidade que apresenta uma reentrância central (**Figura 2D**) onde o osmóforo está localizado. A epiderme é a camada de células secretoras, evidenciada pelo núcleo relativamente desenvolvido e citoplasma densamente corado pela Safranina. O parênquima subjacente apresenta células alongadas, com grandes vacúolos e núcleo bem evidente,

participando da produção do odor. A epiderme apresenta um núcleo central com nucléolo evidente, com vacúolos no citoplasma e é recoberta por uma cutícula muito fina (**Figura 2D**).

***Cirrhaea seidelii* Pabst**

As flores de *Cirrhaea seidelii* (ca. 1,1 x 2,0 cm) são predominantemente amarelas. O pedicelo + ovário mede ca. 1,4 cm de comprimento e é verde-rosado. As sépalas são livres, amarelas e com manchas vináceas nas extremidades, levemente revolutas. A sépala dorsal (ca. 1,5 x 0,4 cm) é elíptico-lanceolada, com ápice subagudo e voltada para trás. As sépalas laterais (ca. 1,1 x 0,4 cm) são elíptico-lanceoladas e com ápice levemente agudo. As pétalas medem ca. 0,9 x 0,15 cm, são linear-lanceoladas, côncavas, com o ápice arredondado levemente voltado para baixo, amarelas com manchas vináceas nas extremidades. O labelo é carnoso e trilobado, com uma base unguiculada de 0,35 x 0,10 cm. Os lobos laterais (ca. 1,1 x 0,3 cm) são linear-lanceolados, falcados para a base, com o ápice acuminado, alaranjados na base e amarelos no ápice, com algumas manchas vináceas, muito afastados entre si (ca. 1,0 cm). O lobo apical (ca. 0,35 x 0,15 cm) é rombóide (estreito na base, com duas alas laterais no ápice), recurvado para frente, formando um ângulo de quase 90° com a base do labelo, com ápice subagudo, amarelado com muitas estrias vináceas. A coluna mede ca. 0,8 x 0,2 cm, é verde-amarelada, com pequenas pintas vináceas, recurvada para dentro na base, com o rostelo no ápice e a antera logo abaixo, na face externa. O rostelo mede ca. 0,12 x 0,22 cm, é transversalmente oval e levemente côncavo. O estigma mede ca. 0,5 x 1,5 mm. A antera (ca. 0,28 x 0,13 cm) é elíptica, com ápice arredondado e branco-hialina. O polinário mede ca. 0,4 cm de comprimento e possui duas polínias (ca. 2,2 x 0,5 mm), linear-lanceoladas e amarelas, estipe hialino de ca. 0,5 x 0,2 mm e viscidio quadrangular, esbranquiçado, com ca. 0,11 x 0,9 mm.

Em *Cirrhaea seidelii* o osmóforo está localizado na superfície interna dos lobos laterais (**Figura 2E**), assim como em *C. loddigesii*, porém não é facilmente delimitado. Não apenas a epiderme, mas também as camadas subjacentes do parênquima (**Figura 2F**) participam da produção da fragrância. A epiderme apresenta um citoplasma denso e um núcleo relativamente grande, e é recoberta por uma fina cutícula. O parênquima subjacente apresenta duas camadas de células isodiamétricas, com as mesmas características da

epiderme: citoplasma fortemente corado pela Safranina e grandes vacúolos, caracterizando sua função de acúmulo de assimilados.

Discussão

O gênero *Cirrhaea* é monofilético (Capítulo 3) e caracterizado por seus pseudobulbos unifoliados e sulcados longitudinalmente, folhas longo-pseudopeciolas com lâminas plicadas e inflorescências racemosas e pendentes. As flores ressupinadas são efêmeras e possuem sépalas e pétalas livres e estreitas, labelo carnoso e trilobado, com base unguiculada e coluna ereta com duas polínias (Hoehne 1942). Além disso, como demonstrado aqui, todas possuem osmóforos formados por uma única camada de células epidérmicas secretoras e sem papilas e um parênquima subjacente que participa da produção do odor. O tamanho e a forma do viscidio também podem ser muito importantes para a identificação de espécies simpátricas de *Cirrhaea*, sobretudo em estudos de biologia da polinização com a administração de iscas odores (Pansarin *et al.* 2006; Capítulo 2).

O gênero *Cirrhaea*, de acordo com as características morfo-anatômicas analisadas no presente estudo, pode ser dividido em três grupos. Um deles está representado por *C. dependens* e *C. nasuta*, ambas com flores dotadas de osmóforos localizados em protuberâncias subcilíndricas. Essas duas espécies são facilmente reconhecidas pelo tamanho da protuberância, que é muito mais proeminente em *C. nasuta* do que em *C. dependens*. Outro grupo é representado por *C. fuscolutea* e *C. longiracemosa*, ambas com flores que possuem labelo com lobo apical conchiforme e uma calosidade com reentrância central na base, onde os osmóforos estão localizados. Ambas podem ser diferenciadas pela quantidade e tamanho das flores (*C. longiracemosa* apresenta inflorescências com um número maior de flores, entre 30-45, que por sua vez são menores em altura, mas maiores em largura) e pela disposição dos lobos laterais do labelo (*C. longiracemosa* apresenta lobos laterais muito mais afastados). O terceiro grupo está representado por *C. loddigesii* e *C. seidelii*, com flores que apresentam labelo com lobo apical setiforme, recurvado para frente em um ângulo de quase 90°, e com células secretoras localizadas na face interna dos lobos laterais. Essas duas espécies podem ser separadas pelo tamanho das flores (em *C.*

seidelii são menores) e pelo formato e disposição dos lobos laterais do labelo (*C. seidelii* apresenta os lobos laterais falcados e muito afastados entre si). Esses três grupos são sustentados por estudos filogenéticos baseados em dados moleculares, que demonstram que as espécies estão relacionadas da mesma forma, formando clados que correspondem aos três grupos aqui citados. O clado formado por *C. fuscolutea* e *C. longiracemosa* é o grupo irmão das demais espécies do gênero (Capítulo 3). Nesse caso, aceitamos a hipótese de que a morfo-anatomia floral, principalmente em relação aos osmóforos, remete à filogenia do gênero.

De acordo com Castro-Neto & Campacci (1990) a espécie *Cirrhaea silvana* apresenta o lobo apical do labelo romboidal, em forma de seta, como *C. loddigesii* e *C. seidelii*, e uma calosidade subfalcada na base do lobo apical que se assemelha às protuberâncias de *C. dependens* e *C. nasuta*. Dessa forma, apenas com os dados morfológicos presentes na literatura, não há como incluir *C. silvana* em nenhum dos grupos propostos no presente trabalho. Estudos morfo-anatômicos e moleculares que incluam *C. silvana* ainda são necessários para conhecer a relação dessa espécie com as demais do gênero.

É amplamente conhecido que machos de Euglossini são atraídos às flores de orquídeas devido à produção de fragrância, que também é utilizada como recurso por essas abelhas (Williams 1982). Em Stanhopeinae, os osmóforos são fundamentais na atração os visitantes e no processo de polinização das espécies (Williams & Dodson 1972). Durante o processo de coleta dos compostos aromáticos ou ao abandonarem a flor para transferirem as fragrâncias para as pernas traseiras, as abelhas escorregam e caem e, nesse momento, o polinário é depositado (Dressler 1968; Williams & Dodson 1972; Braga 1976; Williams 1982; Pansarin *et al.* 2006; Pansarin & Amaral 2009). No caso de espécies simpátricas, que possuem os mesmos polinizadores, diferenças na morfologia floral podem proporcionar deposição de polínias em diferentes partes do corpo do visitante, garantindo o isolamento reprodutivo entre essas espécies (Dressler 1981; Singer & Sazima 2004). Em *Cirrhaea* os polinários geralmente são depositados nas pernas das abelhas (Pansarin *et al.* 2006; Capítulo 2).

Embora sejam freqüentes na literatura informações relacionando a presença de estruturas secretoras, os polinizadores e mecanismos de polinização (*e.g.*, Mickeliunas *et al.*

2006; Pansarin *et al.* 2006; Pansarin & Amaral 2006, 2008), estudos detalhados envolvendo a anatomia dos tecidos secretores são escassos para as orquídeas brasileiras. Teixeira *et al.* (2004) analisaram estruturas secretoras de algumas espécies de *Bulbophyllum* que apresentam tanto osmóforos, que atuam na atração dos polinizadores e são compostos por papilas epidérmicas e duas a três camadas de células parenquimáticas compactas, quanto nectários, que produzem néctar que é usado como recurso por moscas e são compostos por uma epiderme e duas a três camadas de parênquima subjacentes que participam da produção do néctar. Para a espécie *Grobya amherstiae* Lindl. também foram encontrados dois tipos de estruturas secretoras envolvidas no mecanismo de polinização: osmóforos epidérmicos, com uma única camada de células papilosas na face abaxial do labelo que atuam na atração das abelhas, e elaióforos no ápice do labelo e na base da coluna, que secretam óleo coletado por fêmeas de *Paratetrapedia fervida*. Esses elaióforos são do tipo misto, pois apresentam tanto tricomas como epiderme em paliçada que secretam uma substância heterogênea, composta por uma mistura de óleo e mucilagem (Pansarin *et al.* 2009). Para as espécies de *Cirrhaea*, a mesma substância utilizada na atração dos polinizadores também é o recurso coletado pelos machos de Euglossini, não havendo outros tipos de tecidos secretores (nectários ou elaióforos) relacionados com os mecanismos de polinização das espécies do sudeste do Brasil.

Todas as espécies estudadas possuem osmóforo epidérmico, com um parênquima subjacente acumulador de assimilados. A natureza secretora da epiderme é evidenciada pelo resultado positivo com o teste de vermelho neutro. Através desse teste, as regiões secretoras do labelo das espécies de *Cirrhaea* coraram de vermelho claro nas regiões produtoras de odor. De acordo com Vogel (1963a, 1983), os óleos voláteis não se acumulam previamente nas células para serem liberados posteriormente. Eles são liberados à medida que são produzidos, sendo mantidos nas células sob a forma de precursores. Devido à presença intermediária de compostos hidrofílicos, os vacúolos das células dos osmóforos absorvem o vermelho neutro, permitindo a identificação das áreas produtoras do odor. As características anatômicas observadas em microscopia de luz, como núcleo relativamente grande e citoplasma denso, também indicam células em alta atividade metabólica (Fahn 1979).

As camadas subjacentes de parênquima também participam da produção da fragrância nas espécies de *Cirrhaea*, assim como ocorre com a maioria das espécies de orquídeas que secretam algum tipo de recurso ao polinizador (*e.g.*, Davies *et al.* 2003; Davies & Stpiczyńska 2009). As células parenquimáticas subjacentes são anisodiamétricas em todas as espécies estudadas, exceto em *C. fuscolutea* que apresenta células parenquimáticas alongadas e justapostas, semelhantes a um parênquima paliçádico. No geral, as células da epiderme e do parênquima subjacente secretor possuem parede celular mais espessada e costumam ser menores quando comparadas com as células parenquimáticas mais internas e não secretoras. Esse tipo de osmóforo epidérmico com a participação do parênquima subjacente já havia sido documentado para outras duas Stanhopeinae, *Stanhopea anfracta* Rolfe e *S. pulla* Rchb.f. (Curry *et al.* 1988). Além disso, em ambas as espécies ocorre o envolvimento das células subepidérmicas na delimitação de superfícies rugosas ou papilas nos osmóforos. De acordo com Curry *et al.* (1988), existem similaridades entre as células epidérmicas e as células parenquimáticas subjacentes, produzindo um osmóforo com padrão homogêneo ou com a formação de um tecido produtor de odor com mais de uma camada de células. Stpiczyńska (1993) encontrou esse mesmo padrão em osmóforos localizados na base das pétalas e na margem do labelo em *Cymbidium tracyanum* Hort.,. Em *Ophrys fusca* Link. e *O. lutea* Biv., os osmóforos estão localizados nas superfícies abaxial e adaxial do labelo, compostos por uma única e bem diferenciada camada epidérmica secretora em forma de papilas e duas a três camadas de parênquima, que formam um tecido subsecretor (Ascensão *et al.* 2005). Em espécies de *Bulbophyllum* (Teixeira *et al.* 2004) as células epidérmicas são em paliçada e apresentam um núcleo central grande e citoplasma fortemente corado. O tecido subjacente apresenta duas ou três camadas e consiste de células parenquimáticas compactas com citoplasma denso; essas células parenquimáticas produtoras de odor são menores que as células parenquimáticas que ocorrem no centro do labelo, assim como nas espécies de *Cirrhaea*.

Assim como registrado em *Cirrhaea dependes* (Pansarin *et al.* 2006), nas demais espécies de *Cirrhaea* estudadas aqui os osmóforos apresentam células epidérmicas distintas morfológicamente das células parenquimáticas subjacentes, e são recobertas por uma fina cutícula (um pouco mais espessa em *C. longiracemosa*) que protege a estrutura. Essa cutícula confere um aspecto liso ao labelo, fazendo com que as abelhas escorreguem e

caiam enquanto coletam os óleos voláteis ou ao abandonarem a flor (Pansarin *et al.* 2006; Capítulo 2). A cutícula precisa ser rompida pelo polinizador para a coleta da fragrância, no entanto, isso não impede a emissão da fragrância que atrai as abelhas, uma vez que o odor atravessa a cutícula por difusão (Curry *et al.* 1988). Em *Cirrhaea* o processo de difusão cuticular deve ser o sistema presente para a emissão da fragrância, visto que não foram observados estômatos ou poros na superfície cuticular. A presença de uma cutícula recobrendo as células produtoras de odor foi também registrada por Melo *et al.* (2010) para espécies de *Acianthera*. Nessas espécies, a epiderme também é unisseriada e o odor é liberado através de poros. A emissão de compostos voláteis por difusão cuticular foi registrada para outras Stanhopeinae, como algumas espécies de *Stanhopea* (Stern *et al.* 1987) e também para outras orquídeas, como algumas espécies de *Scaphosepalum* (Pridgeon & Stern 1985). Em *Restrepia* e *Restrepiella* (Pridgeon & Stern 1983) e *Gymnadenia conopsea* (L.) R.Br. (Stpiczyńska 2001), a emissão do odor ocorre através de poros cuticulares.

A superfície secretora do labelo das espécies de *Cirrhaea* é plana e sem papilas, uma estrutura muito similar à encontrada em outras Stanhopeinae, como em *Sievekingia* (Curry *et al.* 1991). Outras orquídeas apresentam osmóforos tricomáticos, como algumas espécies de *Stanhopea* (Curry *et al.* 1991), *Scuticaria* (Davies & Stpiczyńska 2008), e *Cyclopogon elatus* Schltr. (Wiemer *et al.* 2009). *Stanhopea lietzei* (Regel) Schltr., *S. insignis* Frost *ex* Hook. (Pansarin 2000; Pansarin & Amaral 2009) e *S. tigrina* (Curry *et al.* 1991) possuem osmóforos papilosos e pluricelulares. Em espécies de *Dichaea* (Davies & Stpiczyńska 2008), *Grobya amherstiae* Lindl. (Pansarin *et al.* 2009), espécies de *Bulbophyllum* (Teixeira *et al.* 2004) e em *Psilochilus modestus* Barb. Rodr. (Pansarin & Amaral 2008) as papilas são unicelulares. De acordo com Curry *et al.* (1991), osmóforos com superfícies planas, como aqueles encontrados em espécies de *Cirrhaea*, oferecem menor área de dispersão de odor, quando comparados com os de superfícies mais elaboradas, que apresentam papilas, rugosidades ou tricomas.

De acordo com os resultados das análises filogenéticas da subtribo Stanhopeinae (Capítulo 3), *Cirrhaea* apresenta-se como grupo-irmão de *Gongora* e ambos os gêneros compartilham o mesmo grupo de polinizadores e apresentam características vegetativas muito semelhantes, como o formato dos pseudobulbos e das folhas. Porém, a morfo-

anatomia das flores revela características bem distintas entre esses dois gêneros. Morfológicamente, as flores de *Gongora* podem ser diferenciadas de *Cirrhaea* pela presença de sépalas laterais voltadas para trás, as pétalas unidas às laterais da coluna e uma protuberância basal e ereta em cada um dos lobos laterais do labelo trilobado (Martini *et al.* 2003). Além disso, nas espécies de *Cirrhaea* o ovário e o pedicelo são bem curvados, fazendo com que os labelos fiquem o mais distante possível do eixo central da inflorescência, ao contrário do que ocorre em *Gongora* (Gerlach 1999). Em relação aos osmóforos, em *G. quinquenervis* Ruiz & Pav., por exemplo, a área com maior concentração de osmóforos encontra-se na base da superfície adaxial do labelo (hipoquílio) e nas sépalas laterais (Martini *et al.* 2003). Isso difere das *Cirrhaea*, nas quais os osmóforos estão presentes exclusivamente no labelo. Outros grupos de orquídeas, como as Pleurothallidinae, também apresentam osmóforos em outras partes do perianto. Em espécies de *Masdevallia*, *Pleurothallis*, *Restrepia*, *Scaphosepalum* (Vogel 1990) e *Acianthera* (Melo *et al.* 2010), os osmóforos se concentram na face adaxial das sépalas.

As características morfológicas e anatômicas dos osmóforos florais das espécies de *Cirrhaea* permitem uma maior compreensão dos mecanismos de polinização do gênero. Além disso, as informações contidas nesse trabalho representam uma ferramenta adicional para a identificação e separação das espécies de *Cirrhaea* que ocorrem no Sudeste brasileiro, assim como contribuem para o conhecimento da diversidade morfo-anatômica das estruturas secretoras em Stanhopeinae.

Referências Bibliográficas

- Ascensão, L.; Francisco, A.; Cotrim, H. & Pais, M.S. 2005. Comparative structure of the labellum in *Ophrys fusca* and *O. lutea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 92: 1059–1067.
- Braga, P.I.S. 1976. Estudos da flora orquidológica do Estado do Amazonas: I- Descrição e observação da biologia flora de *Stanhopea candida* Barb. Rodr. *Acta Amazonica* 6: 433-438.

- Castro-Neto, V.P. & Campacci, M.A. 1990. Nossas orquídeas menores – *Cirrhaea* Lindl (1^a parte). Orquidário 4: 27-29.
- Cseke, L.J.; Kaufman, P.B. & Kirakosyan, A. 2007. The biology of essential oils in the pollination of flowers. *Natural Product Communications* 2: 1317–1336.
- Curry, K.J.; Stern, W.L. & McDowell, L.M. 1988. Osmophore development in *Stanhopea anfracta* and *S. pulla* (Orchidaceae). *Lindleyana* 3: 212-220.
- Curry, K.J.; McDowell, L.M., Judd, W.S., & Stern, W.L. 1991. Osmophores, Floral Features, and Systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 78: 610-623.
- Davies, K.L. & Stpicyznska, M. 2008. Labellar micromorphology of two Euglossine-pollinated orchid genera; *Scuticaria* Lindl. and *Dichaea* Lindl. *Annals of Botany* 102: 805–824,
- Davies, K.L. & Stpicyznska, M. 2009. Comparative histology of floral elaiophores in the orchids *Rudolfiella picta* (Schltr.) Hoehne (Maxillariinae sensu lato) and *Oncidium ornithorhynchum* H.B.K. (Oncidiinae sensu lato). *Annals of Botany* 104: 221–234.
- Davies, K.L.; Turner, M.P. & Gregg, A. 2003. Lipoidal labellar secretions in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 91: 439-446.
- Dressler, R.L. 1968. Pollination by euglossine bees. *Evolution* 22: 202-212.
- Dressler, R.L. 1981. The orchids – natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge.
- Endress, P.K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press.
- Faegri, K. & van der Pijl, L. 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press, Oxford.
- Fahn, A. 1979. Secretory tissues in plants. Academic Press, London.
- Gerlach, G. 1969. Botanische Mikrotechnik. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 344 p.
- Gerlach, G. 1999: 80. Subtribus: Stanhopeinae. In Schlechter: Die Orchideen III / A, Berlin 2315-2435.
- Govaerts, R. 1999. World Checklist of Seed Plants 3(1, 2a & 2b): 1-1532. Continental Publishing, Deurne.

- Govaerts, R. 2003. World Checklist of Monocotyledons Database in ACCESS: 1-71827. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew.
- Hoehne, F.C. 1942. Orchidaceae. *In*: Hoehne, F.C. (Ed.). Flora Brasílica 12 (6): 1-224. São Paulo, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo.
- Johansen, D.A. 1940. Plant microtechnique. Mc Graw Hill, New York.
- Lillie, R.D. 1965. Histopathologic technic and practical histochemistry. 3rd ed., New York: McGraw-Hill Book Co.
- Martini, P.; Schlindwein, C. & Montenegro, A. 2003. Pollination, flower longevity, and reproductive biology of *Gongogra quinquenervis* Ruíz and Pavón (Orchidaceae) in an atlantic forest fragment of Pernambuco, Brazil. *Plant Biology* 5: 495-503.
- Melo, M.C.; Borba, E.L. & Paiva, E.A.S. 2010. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* 286:141–151
- Mickeliunas, L.; Pansarin, E.R. & Sazima, M. 2006. Biologia floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucesso reprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). *Revista Brasileira de Botânica* 29: 251-258.
- Pansarin, E.R. 2000. Biologia reprodutiva e morfologia floral de espécies de Orchidaceae em diferentes ambientes no Estado de São Paulo. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Pansarin, E.R. & Amaral, M.C.E. 2006. Biologia reprodutiva e polinização de duas espécies de *Polystachya* no sudeste do Brasil: evidência de pseudocleistogamia em Polystachyae (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 29: 423-432.
- Pansarin, E.R. & Amaral, M.C.E. 2008. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization?. *Plant Biology* 10: 211-219.
- Pansarin, E.R. & Amaral, M.C.E. 2009. Reproductive biology and pollination of southeastern Brazilian *Stanhopea* Frost ex Hook. (Orchidaceae). *Flora* 204: 238-249.
- Pansarin, E.R.; Bittrich, V. & Amaral, M.C.E.. 2006. At daybreak – reproductive biology and isolating mechanisms of *Cirrhaea dependens* (Orchidaceae). *Plant Biology* 8: 494-502.

- Pansarin, L.M.; Pansarin, E.R. & Sazima, M. 2008. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit. *Plant Biology* 10: 650-659.
- Pansarin, L.M.; Castro, M. de M. & 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.
- Pridgeon, A.M. & Stern, W.L. 1983. Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 70: 1233–1243.
- Pridgeon, A.M. & Stern, W.L. 1985. Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 146: 115–123.
- Pridgeon, A.M.; Cribb, P.; Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. (eds.) 2009. *Genera Orchidacearum*. v. 5, Oxford University Press: New York.
- Singer, R.B. & Sazima, M. 2004. Abelhas Euglossini como polinizadoras de orquídeas na região de Picinguaba, São Paulo, Brasil. *In*: Fábio de Barros; Gilberto B. Kerbauy. (Org.). *Orquidologia sul-americana: uma compilação científica*. São Paulo, p. 175-187.
- Stern, W.L.; Curry, K.J. & Pridgeon, A.M. 1987. Osmophores of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 74: 1323–1331.
- Stpiczyńska, M. 1993. Anatomy and ultrastructure of osmophores of *Cymbidium tracyanum* Rolfe (Orchidaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 62: 5-9.
- Stpiczyńska, M. 2001. Osmophores of the fragrant orchid *Gymnadenia conopsea* L. (Orchidaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 70: 91–96.
- Teixeira, S.P.; Borba, E.L. & Semir, J. 2004. Lip anatomy and its implications for the pollination mechanisms of *Bulbophyllum* Species (Orchidaceae). *Annals of Botany* 93: 499-505.
- Vogel, S. 1962. Die Duftdrüsen der Orchideen. Akademie der Wissenschaften under der Literatur, Mainz. *Abh. Math.-Naturwiss. Klasse*. 10: 603-763.
- Vogel, S. 1963a. Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung: Über Bau und Funktion der Osmophoren. Akademie der Wissenschaften under der Literatur, Mainz. *Abh. Math.-Naturwiss. Klasse, Jahrgang 1962*: 599-763.

- Vogel, S. 1963b. Das sexuelle Anlockungsprinzip der Catasetinen- und Stanhopeen-Blüten und die wahre Funktion ihres sogenannten Futtergewebes. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 100: 308-337.
- Vogel, S. 1983. Ecophysiology of zoophilic pollination. *In* Lange, O.L.; Nobel, P.S.; Osmond, C.B. & Ziegler, H. (eds.). *Physiological plant ecology III*. Berlin, Springer Verlag p.559-624.
- Vogel, S. 1990. The role of scent glands in pollination (transl. by Bhatti JS). Smithsonian Institute, Washington, DC.
- Wiemer, A.P.; Moré, M.; Benitez-Vieyra, S.; Cocucci, A.A.; Raguso, R.A. & Sérsic, A.N. 2009. A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cyclopogon elatus* (Orchidaceae). *Plant Biology* 11: 506-514.
- Williams, N.H. 1982. The biology of orchids and euglossine bees. *In* *Orchid biology and perspectives* J.Arditti (ed.), Ithaca: Cornell University Press, pp. 119-171.
- Williams, N.H. & Dodson, C.H. 1972. Selective attraction of male euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long distance pollen flow. *Evolution* 26:84-95.

Tabela 1: Dados sobre as localidades, suas coordenadas geográficas e os materiais testemunhos das flores coletadas para os estudos morfológicos e anatômicos.

Espécies	Localidade	Coordenada Geográfica	Material Testemunho
<i>Cirrhaea dependens</i> Loudon	Ubatuba-SP	23° 26' 02"S e 45° 04' 16"W	Pansarin 95, 01/1990, Ubatuba-SP (UEC)
	Nova Friburgo-RJ	22° 16' 55"S e 42° 31' 52"W	Pansarin & Mickeliunas 1057, 03/2003, Nova Friburgo-RJ (UEC)
	Jundiaí-SP	23° 11' 11"S e 46° 53' 03"W	Pansarin & Mickeliunas 926, 12/2002, Serra do Japi, Jundiaí-SP (UEC)
<i>Cirrhaea fuscolutea</i> Lindl.	Ubatuba-SP	23° 26' 02"S e 45° 04' 16"W	Pansarin 717, 10/2000, Ubatuba-SP (UEC)
<i>Cirrhaea loddigesii</i> Lindl.	Ubatuba-SP	23° 26' 02"S e 45° 04' 16"W	Pinheiro & Cunha 36, 01/2001, Ubatuba-SP (SP)
	Bertioga-SP	23° 51' 16"S e 46° 08' 19"W	SP 246824, planta em cultivo no IBot-SP (Coletada em Bertioga-SP)
<i>Cirrhaea longiracemosa</i> Hoehne	Ubatuba-SP	23° 26' 02"S e 45° 04' 16"W	SP 24486, planta em cultivo no IBot-SP (Coletada em Ubatuba-SP)
	Santa Teresa-ES	19° 56' 08"S e 40° 36' 01"W	Pansarin & Pansarin 50, 02/2009, Santa Teresa-ES (SPFR)
<i>Cirrhaea nasuta</i> Brade	Santa Teresa-ES	19° 56' 08"S e 40° 36' 01"W	Pansarin & Pansarin 49, 02/2009, Santa Teresa-ES (SPFR)
<i>Cirrhaea seidelii</i> Pabst	Santa Teresa-ES	19° 56' 08"S e 40° 36' 01"W	Pansarin, Pansarin & Gerlach 1320, 02/2010, Santa Teresa-ES (SPFR)

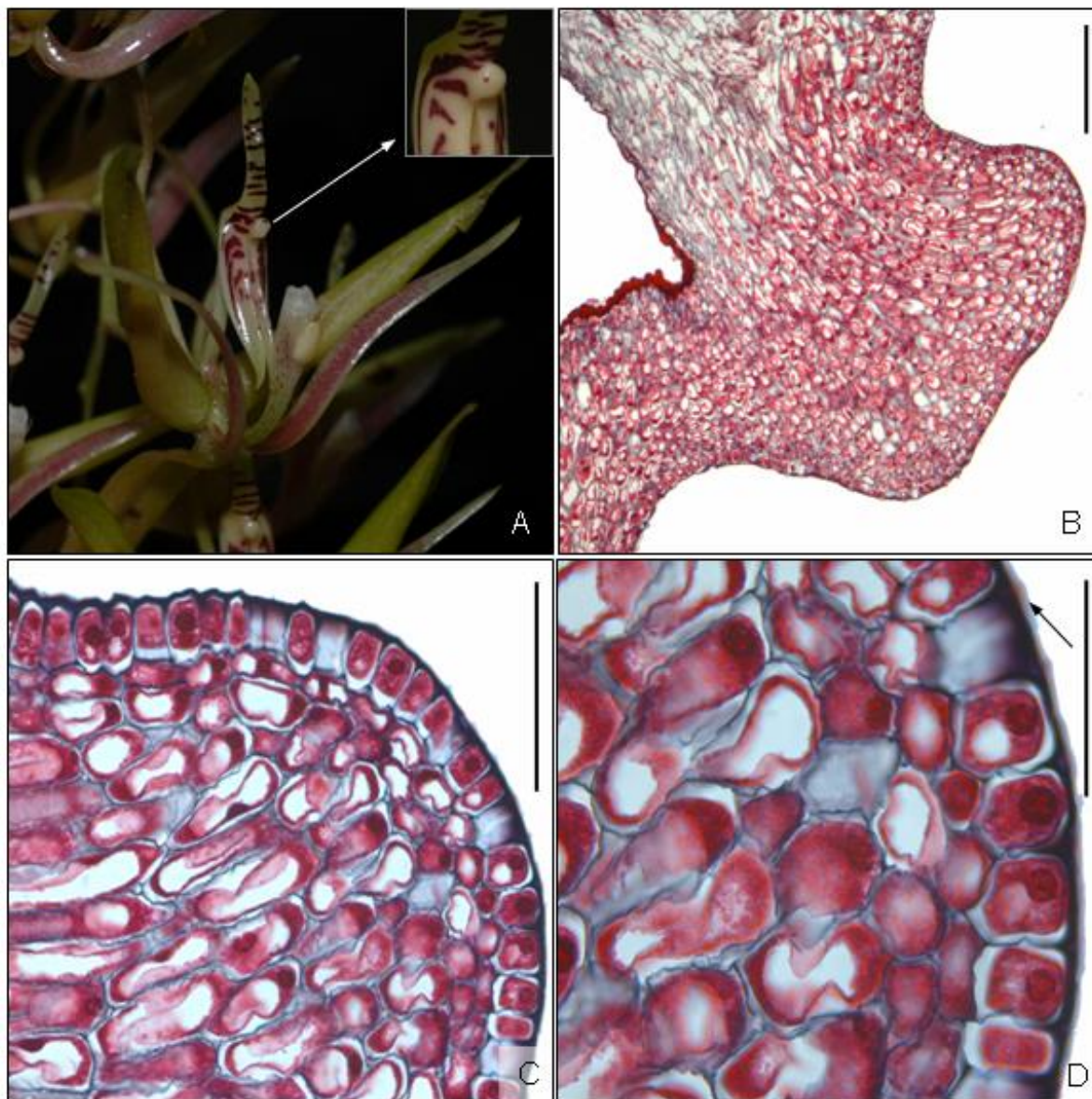


Figura 1: A-D: *Cirrhaea dependens*. A. Flor em vista frontal (em detalhe o osmóforo cilíndrico no labelo). B. Corte transversal do osmóforo cilíndrico. C. detalhe do ápice do osmóforo, evidenciando a epiderme secretora e o parênquima subjacente envolvido na produção do odor. D. Detalhe da epiderme secretora revestida por uma fina cutícula (seta). Barras de escala: B-C = 100 μm , D = 50 μm .

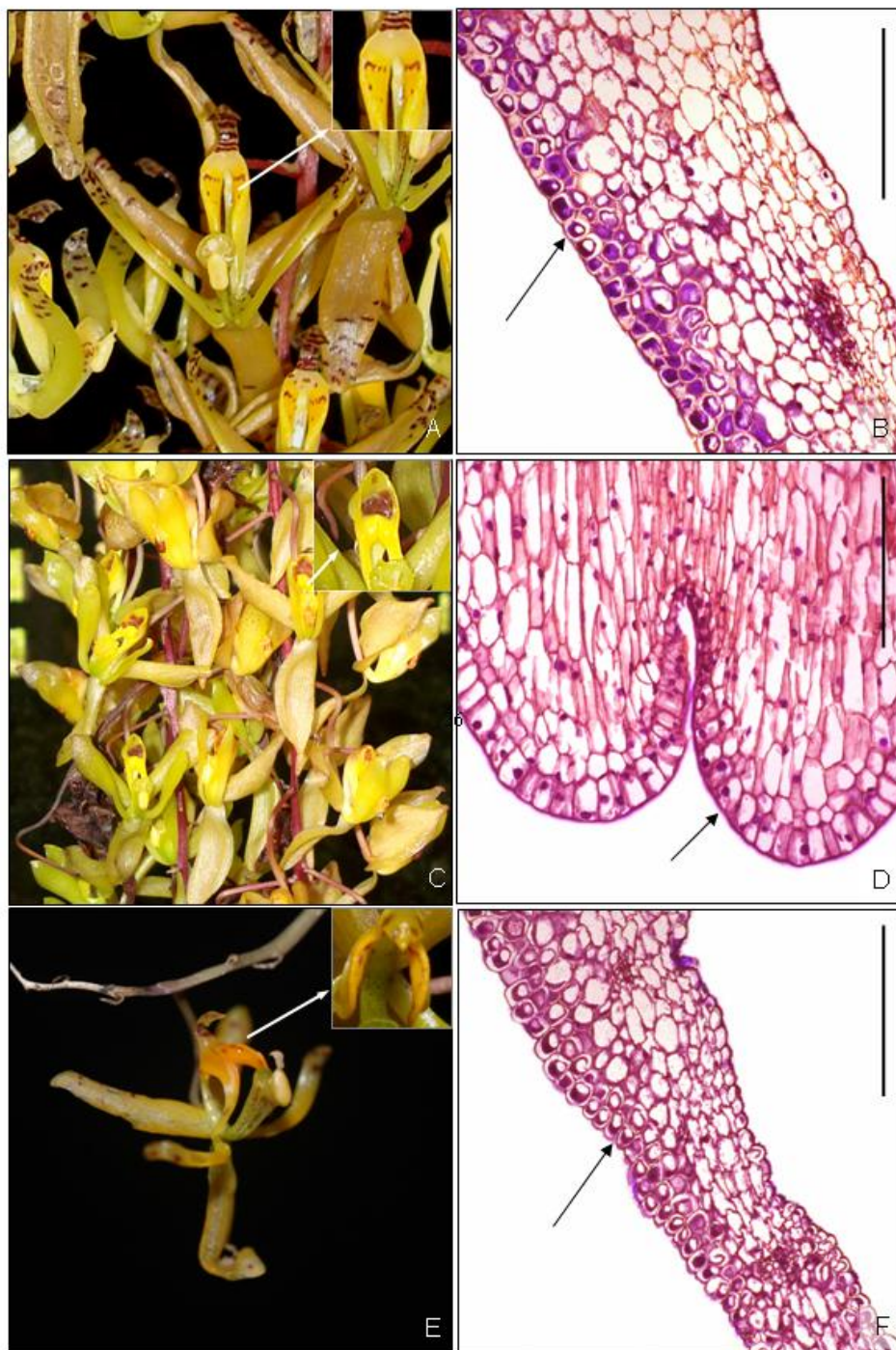


Figura 2: A. Flores de *Cirrhaea loddigesii* (em detalhe a região do osmóforo). B. Corte transversal do labelo, indicando os osmóforos (seta) na face interna dos lobos laterais. C. Flores de *Cirrhaea fuscolutea* (em detalhe a região do osmóforo). D. Corte transversal do labelo, indicando os osmóforos (seta) na base do lobo apical. E. Flor de *Cirrhaea seidelii* (em detalhe a região do osmóforo). F. Corte transversal do labelo, indicando os osmóforos (seta) na face interna dos lobos laterais. Barras de escala: B, D e F = 100 μ m.

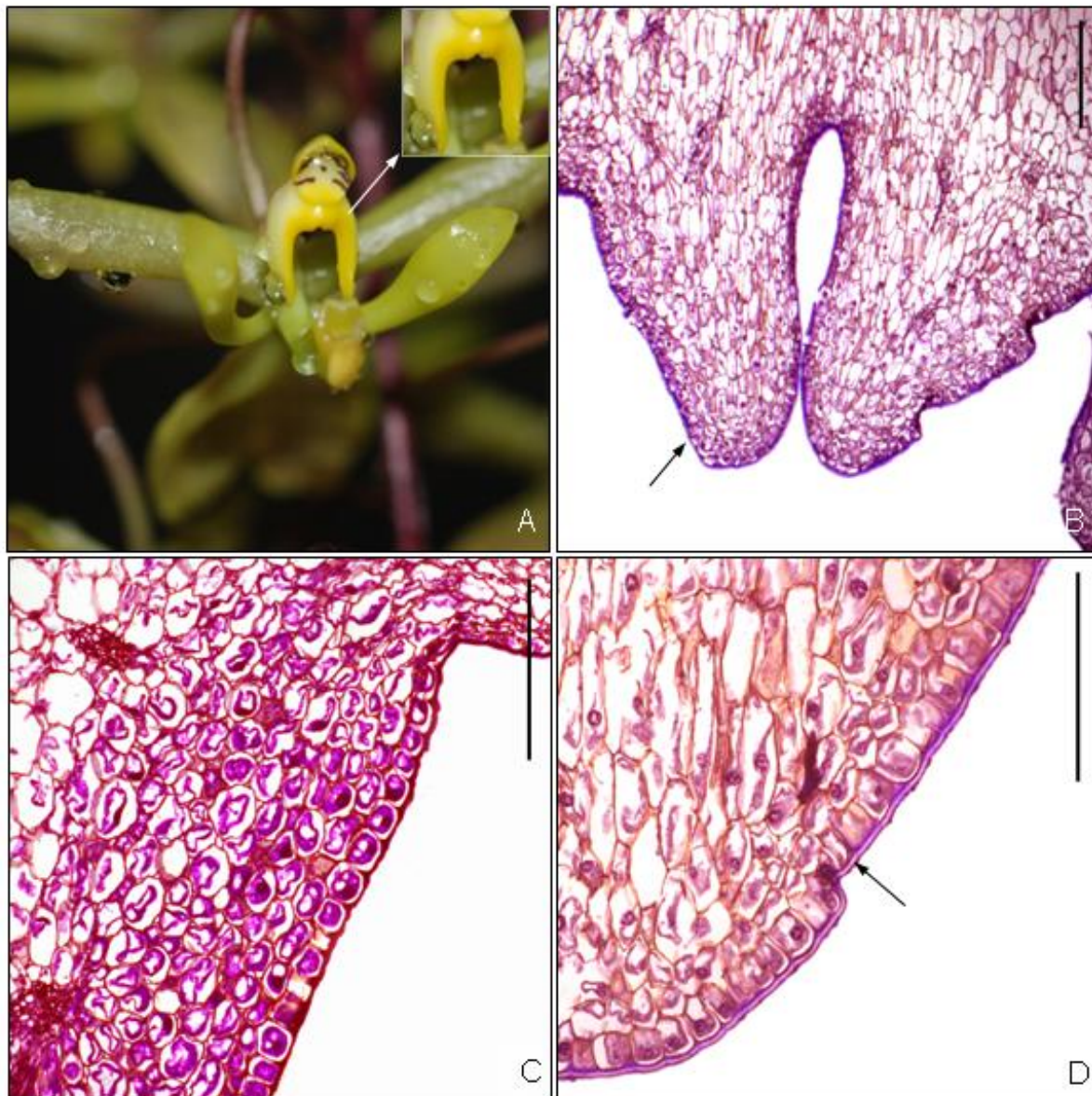


Figura 3: A-D: *Cirrhaea longiracemosa*. A. Flor em vista frontal (em detalhe a região do osmóforo). B. Corte transversal do labelo evidenciando o osmóforo a base do lobo apical. C. Corte transversal do labelo evidenciando o osmóforo na face interna dos lobos laterais. D. Detalhe da epiderme secretora revestida por uma grossa cutícula (seta). Barras de escala: B-D = 100 μm .

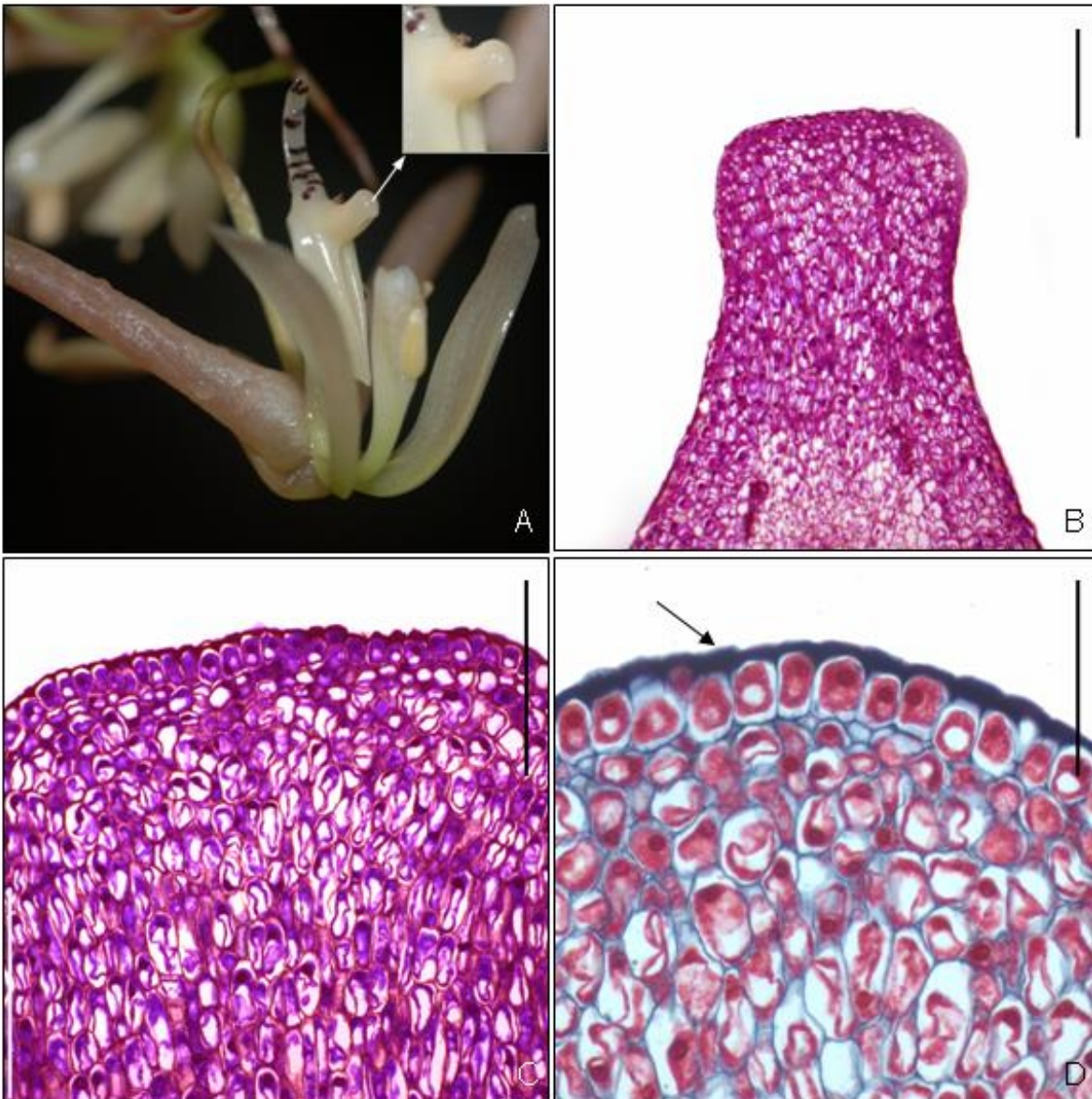


Figura 4: A-D: *Cirrhaea nasuta*. A. Flor em vista frontal (em detalhe o osmóforo cilíndrico no labelo). B. Corte transversal do osmóforo cilíndrico. C. detalhe do ápice do osmóforo, evidenciando a epiderme secretora e um parênquima subjacente envolvido na produção do odor. D. Detalhe da epiderme secretora revestida por uma cutícula (seta). Barras de escala: B-C = 100 μm , D = 50 μm .

CAPÍTULO 2

Biologia floral e reprodução de espécies de *Cirrhaea* Lindl. (Orchidaceae, Stanhopeinae) no Sudeste do Brasil

Ludmila Mickeliunas Pansarin¹, Emerson Ricardo Pansarin², Günter Gerlach³ e Marlies Sazima⁴

¹*Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brasil*

²*Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brasil*

³*Botanischer Garten München-Nymphenburg, Menzinger Straße 65, D-80638, München, Germany*

⁴*Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brasil*

Resumo

A biologia floral e a reprodução de seis espécies de *Cirrhaea* Lindl. ocorrentes no Sudeste do Brasil (*C. dependens* Loudon, *C. fuscolutea* Lindl., *C. loddigesii* Lindl., *C. longiracemosa* Hoehne, *C. nasuta* Brade e *C. seidelii* Pabst) foram estudadas. Os estudos de campo foram desenvolvidos nos municípios de Ubatuba-SP e Santa Teresa-ES. Para cada uma das espécies foram obtidos dados sobre a fenologia reprodutiva, morfologia floral, composição das fragrâncias florais, visitantes e mecanismos de polinização. Também foram realizados testes de polinizações experimentais para verificar o sistema reprodutivo das espécies, bem como foi avaliada a quantidade de sementes potencialmente viáveis obtidas em cada tratamento. Os resultados indicam que as espécies de *Cirrhaea* florescem entre a primavera e o verão, no entanto, os períodos de floração de espécies simpátricas tendem a não se sobrepor. Todas as espécies são polinizadas por machos de abelhas Euglossini que coletam fragrâncias no labelo das flores. Espécies de *Cirrhaea* podem compartilhar um polinizador de mesma espécie ou possuírem polinizadores distintos. O mecanismo de polinização dessas espécies é semelhante ao descrito previamente para *C. dependens*. Os polinários são depositados sempre nas pernas das abelhas. Todas as espécies de *Cirrhaea* estudadas são autocompatíveis e o número de sementes potencialmente viáveis é alto, tanto nos frutos derivados de autopolinização quanto nos frutos formados por polinização cruzada. As análises da composição química das fragrâncias das flores de *Cirrhaea* demonstram que há variação entre as espécies, bem como entre diferentes populações de uma mesma espécie.

Introdução

A subtribo Stanhopeinae (Epidendroideae, Cymbidiae) é composta por 20 gêneros distribuídos pela América tropical, incluindo *Cirrhaea* L. (Pridgeon *et al.* 2009), um gênero com sete espécies endêmicas do Brasil. *Cirrhaea*, assim como os demais gêneros que pertencem à subtribo Stanhopeinae, produz fragrâncias como recurso floral. O perfume consiste de substâncias voláteis que são coletadas exclusivamente por machos de abelhas da tribo Euglossini

(Hymenoptera, Apidae) (Williams 1982). Os machos dessas abelhas são conhecidos por coletarem fragrâncias em espécies de várias famílias, como Araceae, Gesneriaceae, Solanaceae, Euphorbiaceae e Orchidaceae (Williams & Dressler 1976; Dressler 1982; Williams 1982; Sazima *et al.* 1993; Eltz *et al.* 2007). Há muito se conhece o papel dos machos de abelhas da tribo Euglossini como polinizadores de orquídeas (Dressler 1967). Orquídeas das subtribos Catasetinae, Stanhopeinae e algumas espécies de Zygopetalinae, Lycastinae, Maxillariinae, Ornithocephalinae e Oncidiinae são visitadas exclusivamente pelos machos dessas abelhas, que são primariamente atraídos à flor através da produção de substâncias aromáticas voláteis, principalmente terpenóides, sesquiterpenos, ésteres e ácidos aromáticos, totalizando aproximadamente 60 compostos conhecidos (Braga 1976; Williams & Dodson 1972, Gerlach dados não publicados). A coleta da fragrância é realizada através da aplicação, pelas abelhas, de secreções derivadas de ácidos graxos originários de glândulas labiais cefálicas. Essas substâncias lipofílicas são compostas em sua maioria de hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, acetatos e diacetatos, e são difundidas nos osmóforos para auxiliar na dissolução e retenção dos óleos voláteis (Whitten *et al.* 1989, 1993). A fragrância é coletada com as cerdas localizadas nos tarsos dianteiros e posteriormente transferida para o órgão tibial localizado na perna traseira (Cruz-Landim *et al.* 1965). A forma de utilização das fragrâncias pelos machos de Euglossini ainda é incerta. Acredita-se que os machos expõem a fragrância de forma ativa e ventilam esse “buquê” de perfumes como forma de defesa de território no sub-bosque de florestas, onde ocorre o processo de corte (Eltz *et al.* 2005; Zimmermann *et al.* 2006).

Conforme sua composição, a substância odorífera atrairá uma a muitas espécies de abelhas Euglossini. A especificidade na atração das abelhas tem grande importância nos mecanismos de isolamento e especiação de várias espécies de orquídeas (Williams & Dodson 1972). As substâncias odoríferas podem permitir a orientação do inseto na flor, a qual apresenta regiões com maior ou menor número de osmóforos (Braga 1976). No ato da coleta desses óleos aromáticos, ou ao abandonar a flor, o polinário se fixa na abelha (*e.g.*, Dressler 1968; Pansarin *et al.* 2006; Pansarin & Amaral 2009). De acordo com Janzen (1971) e Williams & Dodson (1972), as abelhas Euglossini são capazes de voar grandes distâncias, o que favorece o fluxo gênico das espécies que polinizam.

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

O presente trabalho tem por objetivo apresentar a biologia floral e reprodutiva de espécies de *Cirrhaea* em populações nativas do sudeste do Brasil, testando a hipótese de que as relações entre plantas e polinizadores são espécie-específicas. Para isso foram investigados aspectos da fenologia reprodutiva, morfologia floral, composição das fragrâncias florais, seus polinizadores e os mecanismos de polinização, assim como as formas de reprodução das espécies através da realização de teste de polinizações manuais.

Material e métodos

Áreas de estudo

Para *Cirrhaea dependens*, *C. fuscolutea*, *C. loddigesii* e *C. longiracemosa* os estudos foram desenvolvidos na planície litorânea de Picinguaba, município de Ubatuba, São Paulo (23° 26' 13" S e 45° 04' 08" W), onde todas estas espécies podem ser encontradas, em diferentes regiões do município, com baixa frequência e de maneira esparsa. Essa região apresenta pouca variação em seu relevo, tendo como ponto mais alto o Morro do Corsário, com aproximadamente 50 m de altitude. O clima é quente e úmido, com temperaturas médias superiores a 18 °C, não

apresentando estação seca invernal (Nimer 1977). Estudos realizados pela Estação Experimental de Ubatuba constataram que no período observado entre os anos de 1961 e 1990 ocorreu diminuição da pluviosidade apenas no inverno, enquanto os verões foram muito úmidos. Neste período, as médias anuais de precipitação pluviométrica foram de 2624 mm, e as médias mensais de temperatura foram de 21,2 °C, com época mais quente e chuvosa entre dezembro e março (médias de 24,1 °C e 331,7 mm de precipitação), e a mais fria e seca entre agosto e dezembro (médias de 18,1 °C e 97,6 mm de precipitação). A vegetação predominante é a de restinga, atualmente designada vegetação de planície litorânea (Suguio & Martin 1990). A fisionomia dessa restinga apresenta árvores altas (15-20 m) até nas proximidades da praia. O solo arenoso e úmido encontra-se geralmente coberto por uma camada de serapilheira, sendo em diversas áreas sazonalmente inundado, enquanto em outras áreas a inundação pode ser permanente, ocorrendo então os chamados cachetais (formações com predominância de *Tabebuia cassinoides* DC.). Ao longo dos rios, algumas áreas estão sujeitas a inundações diárias, conforme o movimento das marés (Moraes 1997).

As demais espécies de *Cirrhaea*: *C. nasuta* e *C. seidelii*, endêmicas do estado do Espírito Santo, foram estudadas na Estação Biológica de Santa Lúcia (EBSL), município de Santa Tereza, Espírito Santo. Nessa área o número de indivíduos de ambas as espécies é baixo, e as plantas ocorrem de maneira simpátrica e sintópica, porém muito dispersas. A EBSL (19° 56' 10" S e 40° 36' 06" W) compreende um remanescente de aproximadamente 440 hectares de Mata Atlântica na Serra da Mantiqueira. A região apresenta vegetação de Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica de Encosta) em diferentes estágios de sucessão, altitudes variando de 550 a 950 metros, com forte declividade, originando afloramentos rochosos de composição granito-gnaissica e pequenas várzeas intermontanas. O clima é meso-térmico, com estação seca no inverno e forte pluviosidade no verão. A temperatura média anual máxima fica em torno de 24 °C e a mínima em torno 16 °C, sendo que a mínima pode atingir 4 °C e a máxima 30 °C. A precipitação média anual fica em torno de 1.400 mm. O período chuvoso vai de outubro a abril e os menores índices ocorrem no período de maio a setembro. A umidade média relativa do ar é de 85 % (Mendes & Padovan 2000). A EBSL é cortada em toda sua extensão pelo Rio Timbuí. Destacam-se na área representantes de diversas espécies das famílias Myrtaceae, Lauraceae, Sapotaceae, Rubiaceae,

Annonaceae, Melastomataceae e outras. O epifitismo é destacado na floresta principalmente pela concentração e diversidade de orquídeas, bromélias, cactáceas, aráceas e outras (Thomaz 1996).

Para o desenvolvimento das diferentes etapas deste estudo foram feitas viagens periódicas ao campo, intensificadas durante o período de floração das espécies.

Fenologia reprodutiva e morfologia floral

O período de produção de inflorescências, de flores e de frutos para as espécies de *Cirrhaea* estudadas foi obtido através de visitas ao campo e em indivíduos previamente marcados (Stiles 1985). Inflorescências de diferentes indivíduos das espécies de *Cirrhaea* foram marcadas e analisadas *in situ* quanto ao número de flores abertas por dia, horário, seqüência e duração de cada flor, além do período de produção de recursos.

As estruturas florais das espécies de *Cirrhaea* foram analisadas a partir de material fresco com auxílio de um esteromicroscópio binocular. Para cada espécie ($n = 30$) foram observados aspectos gerais como formato, simetria, disposição e tamanho das partes florais como sépalas, pétalas, labelo e coluna, levando-se em conta as possíveis variações intra-específicas, e relacionando-as com os atributos morfológicos dos polinizadores e o mecanismo de polinização (Faegri & van der Pijl 1980). As medidas foram feitas diretamente sobre as estruturas florais usando um paquímetro. Para determinar a região da flor produtora do odor, flores frescas foram submersas em uma solução de Vermelho Neutro 0,1% por 30 minutos (Vogel 1962). Os materiais testemunho estão depositado no Herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC). (Números de voucher: Capítulo 1).

Visitantes florais e mecanismos de polinização

A observação dos visitantes florais foi realizada em condições naturais, durante o período de floração de cada espécie. O período e as horas de observação constam na **Tabela 1**. Foi realizado, também, o registro fotográfico do processo de polinização. Os visitantes florais foram coletados com o auxílio de rede entomológica e introduzidos em uma câmara mortífera contendo acetato de etila. Adicionalmente foram realizadas observações a partir do uso de iscas odoríferas com fragrâncias artificiais obtidas comercialmente (eucaliptol, eugenol, indol, linalol e vanilina) para atração de abelhas que podem portar polinários. A administração das iscas de odor foi realizada

no campo e durante o período de floração de cada uma das espécies. Cada substância foi aplicada independentemente e diretamente sobre os troncos das árvores ou em pequenos pedaços de papel amarrados com fitas nos galhos das árvores. A quantidade e frequência de reposição de cada um dos compostos para manter a atratividade das abelhas variou de 30 min. a 1 h 30 min., e dependeu da taxa de evaporação de cada um deles. Os visitantes florais foram coletados para identificação e inclusão no acervo do Museu de Zoologia da Unicamp (ZUEC).

Experimentos, contagem das sementes potencialmente viáveis e sucesso reprodutivo

Os tratamentos para verificação do sistema reprodutivo das espécies foram aplicados a partir de indivíduos coletados no campo e cultivados na casa de vegetação do Setor de Botânica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP), no município de Ribeirão Preto (aprox. 21°09'S e 47°51'W). Para verificação do sistema reprodutivo foram realizados quatro tratamentos: autopolinização manual, autopolinização espontânea, emasculação e polinização cruzada. Para cada tratamento foram utilizadas todas as flores produzidas pelas espécies (2 plantas-4 inflorescências para *Cirrhaea dependens*, 3 plantas-4 inflorescências para *C. loddigesii*, 3 plantas-3 inflorescências para *C. nasuta*, 2 plantas-3 inflorescências para *C. fuscolutea*, 2 plantas-4 inflorescências para *C. seidelii*). O baixo número de plantas coletadas e utilizadas para os tratamentos ocorreu em virtude da baixa frequência de indivíduos no campo, que foram preservados em ambiente natural para as observações dos mecanismos de polinização. Os experimentos manuais foram feitos a partir de inflorescências previamente ensacadas com tule (Kearns & Inouye 1993). Para a realização das autopolinizações e polinizações cruzadas os polinários foram removidos e mantidos em uma placa de Petri por 40 minutos para que as polínias desidratassem e pudessem ser inseridas na fenda estigmática (Pansarin *et al.* 2006).

A partir dos frutos obtidos nos experimentos para verificação do sistema reprodutivo foi quantificado o número de sementes potencialmente viáveis. Para cada fruto maduro, todas as sementes foram removidas e colocadas em um frasco com etanol 70%, que foi agitado para homogeneização. Uma amostra de 200 de sementes de cada fruto foi analisada. Para o teste de viabilidade as sementes foram colocadas em uma solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio a 1% e observadas em microscópio óptico (Lakon 1949). De acordo com Borba *et al.* (2001), embriões bem formados coram de vermelho, indicando sementes viáveis, enquanto embriões mal

formados não coram. No presente estudo as sementes com embriões bem formados foram consideradas potencialmente viáveis, enquanto sementes com embriões mal formados ou ausentes foram consideradas inviáveis (Borba *et al.* 2001). Foi também verificada a possível ocorrência de poliembrionia nas espécies de *Cirrhaea*, um fenômeno que tem sido observado em algumas espécies de orquídeas (Borba *et al.* 2001, Pansarin *et al.* 2008).

Análise das fragrâncias florais

Para a coleta das fragrâncias produzidas pelas espécies estudadas, cada planta foi acondicionada em um Becker de vidro fechado com papel alumínio, por onde entrava apenas uma mangueira de borracha acoplada a um tubo de vidro (5 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro interno) contendo 50 mg de porapak-Q e lã de vidro (ambos previamente tratados com solvente). O ar contendo a fragrância da flor foi arrastado a um fluxo de 450 ml/min, por meio de uma bomba operada a pilha por um período de duas horas. Após esse tempo o tubo contendo os compostos adsorvidos foi desconectado do sistema. O processo de dessorção dos voláteis foi realizado utilizando-se cerca de 2 ml de diclorometano. A remoção do solvente foi realizada através de fluxo de nitrogênio até atingir a concentração de aproximadamente 20 µl. Em seguida, as amostras foram analisadas por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas na Universidade de Ciências Aplicadas de Zurich (Suíça) pelo Dr. Roman Kaiser. As análises de GC/MS foram realizadas utilizando um sistema HP-5890/5970 equipado com uma coluna de sílica J. & W. Científica HP (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), com temperaturas programadas a partir de 50° para 290° em 4°/min e 15 min em 290°, utilizando como gás de arraste o hélio. As temperaturas de injeção e de interface foram 250° e 285° respectivamente. As MS foram obtidas em 70 eV. A velocidade de digitalização foi de 0,84 scan/s e de 40-700m/z (adaptação de Kaiser 1993).

Resultados

Fenologia reprodutiva e morfologia floral

Os dados sobre a fenologia das espécies de *Cirrhaea* estudadas estão apresentados na **Tabela 2**. O período de floração de cada uma das espécies dura cerca de 30-50 dias. O pico de floração ocorre cerca de 15 dias após a abertura das primeiras flores, ocasião em que a maioria dos indivíduos está em flor. A abertura de todas as flores de uma inflorescência ocorre simultaneamente. As flores abrem ao amanhecer e duram cerca de 3-4 dias. Os frutos se tornam deiscentes cerca de 5-6 meses após os eventos de polinização. As espécies de *Cirrhaea* produzem fragrâncias florais como recurso. A fragrância é suave em todas as espécies, sendo percebida no momento da abertura das flores. O odor é intenso e perceptível apenas no primeiro dia.

Durante o período compreendido entre a antese e o pré-fenecimento das flores não são observadas mudanças na morfologia e na disposição das partes florais, independentemente da remoção ou não de polinários. A remoção ou deposição de polínias no estigma causam o fenecimento precoce das flores, cujo início é evidenciado pelo processo de murcha das peças do perianto.

As flores das espécies de *Cirrhaea* estudadas apresentam sépalas e pétalas livres. As pétalas são estreitas e o labelo é carnoso, trilobado e com base unguiculada. A coluna é ereta e o polinário possui duas polínias. *Cirrhaea dependens* é a espécie que apresenta maior variação na coloração de suas flores (**Figuras 1A-F**). A morfologia do labelo e a localização dos osmóforos é variável entre as espécies. Em *C. dependens* e *C. nasuta* o osmóforo está localizado na base do lobo apical do labelo em uma protuberância com formato cilíndrico. Em *C. fuscolutea* e *C. longiracemosa* o osmóforo encontra-se em uma calosidade que apresenta uma reentrância na base do lobo apical do labelo. No entanto, nessas duas espécies, células secretoras de odor também ocorrem entre os lobos laterais do labelo. Em *C. loddigesii* e *C. seidelii* células secretoras de odor estão espalhadas difusamente na face interna os lobos laterais do labelo (Capítulo 1).

Visitantes florais e mecanismos de polinização

Todas as espécies de *Cirrhaea* apresentam mecanismos de polinização semelhantes: a abelha paira em frente à flor e em seguida pousa sobre o labelo. Posteriormente, raspa com as

pernas dianteiras a região onde está o osmóforo. Durante a coleta a abelha paira por diversas vezes para transferir o odor das pernas dianteiras para as medianas e em seguida para a tíbia das pernas traseiras. Cada abelha pode visitar diversas vezes uma mesma flor ou flores de uma mesma inflorescência. A remoção e deposição do polinário ocorrem quando a abelha abandona a flor para transferir a fragrância para as pernas traseiras ou quando escorrega enquanto coleta a fragrância. Os polinários só poderão ser depositados no estigma após um período médio de 40 minutos, tempo necessário para a desidratação das polínias.

Não houve remoção ou deposição de polínias durante a noite. A utilização de diferentes iscas de odor atraiu várias espécies de Euglossini que carregavam polinários das espécies de *Cirrhaea* nas duas áreas de estudo. A substância que mais atraiu machos de Euglossini, tanto em relação à quantidade total de indivíduos como em número de espécies, foi o Eucaliptol, tanto em Ubatuba-SP, como em Santa Teresa-ES. A preferência por uma isca específica em cada localidade, assim como as espécies de abelhas coletadas com os polinários das diferentes *Cirrhaea* encontram-se na **Tabela 3**.

As flores de *Cirrhaea dependens* são polinizadas por machos de *Euglossa cordata* (Linnaeus, 1758) (**Figuras 1E-F**) e *E. viridis* (Perty, 1833). As visitas ocorreram a intervalos irregulares, entre 0700h e 1600h, em virtude da chuva (o pico de floração ocorreu em um período de chuvas constantes, o que inviabilizou o registro do número de visitas por inflorescência). Os polinários desta espécie se fixaram às pernas medianas de *E. cordata* (**Figura 1F**) e *E. viridis*.

Há fortes indícios de que as flores de *Cirrhaea loddigesii* (**Figuras 2A-B**) sejam polinizadas por machos de *Euglossa annectans* (Dressler, 1982), uma vez que foram observadas visitas dessa espécie às flores, porém, sem visualização de remoção de polinários. Durante o período de floração (meados de dezembro de 2008 e 2009) as chuvas foram intensas e as visitas durante o período de antese das flores na população estudada foram escassas. Assim que as chuvas cessaram, foram administradas iscas de odor no campo. Essas iscas atraíram diferentes espécies de Euglossini, inclusive *Euglossa cordata* (Linnaeus, 1758), que apresentava polinário de *C. loddigesii* na perna posterior (**Figuras 2C-D**).

As flores de *Cirrhaea longiracemosa* (**Figuras 3A-D**) são polinizadas por machos de *Eufriesea violacea* (Blanchard, 1840) (**Figuras 3C-D**) e possivelmente também por *Euglossa chalybeata* (Friese, 1925) e *Euglossa annectans* (Dressler, 1982), coletadas com a utilização de

iscas de odor e que apresentaram polinários de *C. longiracemosa* nas pernas. As visitas ocorreram em intervalos irregulares, entre 0700h e 1500h durante o primeiro dia de antese das flores. O polinário se fixava em suas pernas medianas e traseiras.

As flores de *Cirrhaea nasuta* (**Figuras 4A-B**) provavelmente são polinizadas por machos de *Eulaema nigrata* (Lepeletier, 1841) e *Euglossa annectans* (Dressler, 1982). Durante o período de floração (meados de janeiro de 2009) as chuvas também foram intensas e não houve visitas durante esse período na população estudada. Assim que as chuvas cessaram, foram administradas no campo iscas de odor. Essas iscas atraíram diferentes espécies de Euglossini, inclusive *E. nigrata* (**Figuras 4C-D**) e *E. annectans* que apresentaram polinários de *C. nasuta* nas pernas anteriores e medianas, respectivamente.

Foram observados machos de *Euglossa chalybeata* (Friese, 1925) visitando as flores de *Cirrhaea fuscolutea* (**Figura 5E**). A utilização de iscas de odor atraiu diferentes espécies de Euglossini, inclusive *Euglossa cordata* (Linnaeus, 1758) (**Figura 5F**) e *Eulaema nigrata* (Lepeletier, 1841), que apresentaram polinários de *C. fuscolutea* nas pernas posteriores (**Fig. 1F**).

As flores de *Cirrhaea seidelii* (**Figuras 5A-D**) são polinizadas por machos de *Euglossa* aff. *cordata* (**Figuras 5C-D**). As visitas ocorreram em intervalos irregulares, entre 0900h e 1500h, em virtude da chuva (o pico de floração ocorreu em um período de chuvas constantes, o que inviabilizou o registro do número de visitas por inflorescência). Para *Cirrhaea seidelii* os polinários se fixavam na perna mediana de *E. aff. cordata* (**Figura 5D**).

Experimentos, contagem das sementes potencialmente viáveis e sucesso reprodutivo

As espécies de *Cirrhaea* estudadas são autocompatíveis. Frutos foram formados através dos experimentos de autopolinizações manuais e polinizações cruzadas. Em ambos os tratamentos a porcentagem de abortos foi alta (em média 30% para as polinizações cruzadas e 50% para as autopolinizações). Nenhum fruto foi formado a partir das flores emasculadas e nem por autopolinização espontânea (flores intactas). A porcentagem de sementes viáveis variou entre 86% e 92% em frutos derivados das autopolinizações manuais e entre 91% e 96% em frutos provenientes das polinizações cruzadas. Não foram observadas sementes portando mais de um embrião. Os resultados dos tratamentos para verificação do sistema reprodutivo e número de sementes potencialmente viáveis obtidas em cada tratamento estão apresentados na **Tabela 4**.

Análises químicas das fragrâncias

A análise da composição química das fragrâncias oferecidas pelas flores de *Cirrhaea* (**Tabela 5**) demonstra que há grande variação entre as espécies estudadas. Em *C. dependens*, os principais compostos encontrados são mirceno e ipsdienol. Esses compostos principais variaram em concentração de acordo com a planta estudada, sendo cada planta proveniente de uma população diferente, demonstrando que as fragrâncias podem variar entre indivíduos de uma mesma espécie, de acordo com a região onde se encontram. *C. nasuta*, que apresenta semelhanças morfológicas com *C. dependens*, também possui composição química muito parecida, variando apenas nos compostos secundários. Para *C. fuscolutea*, os compostos principais são Eucaliptol e Cariofileno. *C. loddigesii* e *C. seidelii*, que também são morfológicamente semelhantes, apresentam como principal composto (E)-Ocimeno, sendo que *C. seidelii* apresenta também uma concentração considerável de Metil-2-Hidroxi-3-Fenilpropionato.

Discussão

Assim com registrado previamente para *Cirrhaea dependens* (Pansarin *et al.* 2006) e para *Stanhopea* (Pansarin & Amaral 2009), em todas as espécies de *Cirrhaea* estudadas as flores de uma mesma inflorescência abrem simultaneamente nas primeiras horas do dia. Além disso, as flores de *Cirrhaea* são bastante efêmeras, o que parece ser comum em Stanhopeinae, (*e.g.*, Dodson & Frymire 1961; Martini *et al.* 2003; Pansarin *et al.* 2006; Pansarin & Amaral 2009). De acordo com Gerlach & Schill (1991), a curta longevidade das flores provavelmente ocorre pelo alto custo energético para a produção e liberação dos odores florais. Além disso, não há motivo para duração prolongada das flores como ocorre em outras espécies de orquídeas, uma vez que a liberação intensa da fragrância ocorre apenas no primeiro dia da antese floral.

A polinização das flores de *Cirrhaea* estudadas por diferentes espécies de machos de Euglossini é semelhante ao mecanismo descrito por Pansarin *et al.* (2006) para *C. dependens*. Polinização do tipo queda, em que as abelhas escorregam e caem enquanto coletam fragrância ou abandonam a flor, parece ser comum em Stanhopeinae, tendo sido demonstrada para *Gongora*

(Martini *et al.* 2003) e *Stanhopea* (Dressler 1968; Braga 1976; Pansarin & Amaral 2009). Em *Coryanthes* o mecanismo de polinização também é do tipo queda, no entanto, nesse gênero a porção apical do labelo é adaptada para acumular a secreção liberada por duas glândulas laterais presentes na coluna. Machos de euglossine atraídos pela fragrância pousam no hipoquílio e coletam os óleos voláteis. Eventualmente eles escorregam e caem na secreção acumulada no epiquílio e somente conseguem abandonar a flor por um pequeno espaço entre a antera e o labelo (Dodson *et al.* 1969).

Em *Gongora*, *Stanhopea* e *Coryanthes* os polinários são depositados na porção dorsal das abelhas (*e.g.*, van der Pijl & Dodson 1966; Dressler 1968; Braga 1976; Martini *et al.* 2003; Pansarin & Amaral 2009). Em *Cirrhaea*, no entanto, a deposição de polinários ocorre na porção ventral das abelhas, nas pernas ou nos primeiros segmentos do abdômen (Hoehne 1933; Pansarin *et al.* 2006). Em Stanhopeinae a deposição de polinários nas pernas das abelhas tem sido documentada para *Paphinia subclausa* Dressler (van der Pijl & Dodson 1966), *Sievekingia* (van der Pijl & Dodson 1966; Dressler 1968; Ackerman 1983; Gerlach 1999) e *Soterosanthus* (Gerlach 1999). A deposição de polinários em diferentes partes do corpo de uma mesma espécie de abelha pode garantir o isolamento reprodutivo entre espécies simpátricas que florescem no mesmo período (Dressler 1981, 1982; Williams 1982; Singer & Sazima 2004).

Em *Cirrhaea* polínias túrgidas e recém removidas apresentam espessura maior que a da fenda estigmática. Assim, as polínias precisam desidratar para atingir espessura compatível com a abertura da fenda estigmática (Pansarin *et al.* 2006). Esse mecanismo de desidratação das polínias também ocorre em outras Stanhopeinae (van der Pijl & Dodson 1966; Dressler 1968; Pansarin & Amaral 2009) e tem sido considerado como um tipo de protandria que tende a reduzir a ocorrência de autopolinização (Pansarin *et al.* 2006; Pansarin & Amaral 2009). Esse fenômeno, que também tem sido demonstrado para outros grupos de orquídeas (Borba & Semir 1998; Johnson & Edwards 2000), é particularmente interessante para prevenir autopolinização em espécies autocompatíveis polinizadas por machos de Euglossini, que tendem a visitar várias vezes a mesma flor, uma vez que os compostos voláteis são transferidos das pernas anteriores para as traseiras apenas quando as abelhas pairam durante o vôo (Dressler 1968; Williams 1982; Pansarin *et al.* 2006; Pansarin & Amaral 2009).

Como demonstrado aqui, todas as espécies de *Cirrhaea* estudadas são autocompatíveis, embora um polinizador seja necessário para a transferência de pólen. A ocorrência de autocompatibilidade é comum em Stanhopeinae, uma subtribo na qual a ocorrência de autopolinização é evitada principalmente por intermédio de barreiras de pré-polinização (van der Pijl & Dodson 1966; Dressler 1968; Martini *et al.* 2003; Pansarin *et al.* 2006; Pansarin & Amaral 2009).

A frutificação em polinizações cruzadas foi sempre maior quando comparado ao número de frutos formados através das autopolinizações manuais. Essa diferença na taxa de frutificação também foi registrada para *Gongora quinquenervis* (Martini *et al.* 2003) e para outras espécies de orquídeas, como *Grobya amherstieae* Lindl. (Mickeliunas *et al.* 2006) e *Cyrtopodium polyphyllum* (Vell.) Pabst ex F. Barros (Pansarin *et al.* 2008). Adicionalmente, uma alta taxa de abortos ocorreu em frutos derivados de autopolinizações e de polinizações cruzadas, e isso pode estar relacionado com a sobrecarga de polinizações manuais a que foram submetidas as inflorescências (Pansarin *et al.* 2006). Para as espécies de *Cirrhaea* não foram registradas diferenças significativas entre o número de sementes potencialmente viáveis provenientes dos dois tipos de tratamentos, resultado semelhante ao encontrado para outras orquídeas (Mickeliunas *et al.* 2006, Pansarin *et al.* 2008). Embora não tenha sido possível quantificar de maneira sistemática a frutificação natural, uma vez que as espécies são raras na natureza, é comum que os indivíduos não apresentem frutos ou, quando frutificam, a taxa de frutificação normalmente é baixa, com uma ou duas cápsulas sendo formadas. Embora dados sobre o sucesso reprodutivo de espécies de Stanhopeinae sejam escassos, a frutificação em condições naturais em algumas espécies dos gêneros *Gongora*, *Stanhopea* e *Cirrhaea* é baixa (e.g., Dressler 1968; Martini *et al.* 2003; Pansarin *et al.* 2006; Pansarin & Amaral 2009). De acordo com Pansarin *et al.* (2006), a frutificação de *C. dependens* é baixa devido à combinação de diversos fatores, como a produção de flores efêmeras, presença de mecanismos florais prevenindo a autopolinização, a floração não sincrônica entre diferentes plantas de uma população, e baixo número de indivíduos esparsamente distribuídos dentro de uma população.

A utilização de compostos sintéticos, análogos àqueles produzidos nas flores, como iscas para atração de machos de Euglossini, é uma importante ferramenta que permite a obtenção de dados sobre a ecologia dessas abelhas (Roubik & Ackerman 1987). A preferência pela isca-odor

eucaliptol registrada para a maioria dos polinizadores de *Cirrhaea* foi também encontrada em um estudo sobre a comunidade de Euglossini no litoral da Bahia (Viana *et al.* 2002), no qual quase todos os machos de *Euglossa cordata* e *Eulaema nigrita* foram atraídos por eucaliptol, assim como foi registrado em Ubatuba-SP e em Santa Teresa-ES. Esses dados são semelhantes aos obtidos por outros estudos que também empregaram o eucaliptol como uma das iscas de atração (Raw 1989; Neves & Viana 1997, 1999; Bezerra & Martins 2001).

Para as orquídeas que oferecem fragrância como recurso floral, os machos das abelhas Euglossini (*Eufriesea*, *Euglossa*, *Eulaema*, *Exaerete* e *Aglae*) são os polinizadores obrigatórios, porém as Euglossini não dependem apenas das orquídeas como fonte de fragrâncias (Feinsinger 1983; Roubik & Ackerman 1987), apresentando relações mais ou menos especializadas com essa família, dependendo da espécie de abelha (Roubik 2004). Os machos de Euglossini diferem das outras abelhas de sua família principalmente pela língua extremamente longa, pela coloração geralmente brilhante e iridescente e pelo hábito solitário. Eles apresentam adaptações morfológicas como tufos no tarso anterior para coletar os perfumes florais, estruturas em forma de pente no tarso das pernas medianas para a transferência dos compostos aromáticos e tibia posterior dilatada com superfície interna adaptada para estocar e transportar as fragrâncias (Moure 1967; Michener 2000; Silveira *et al.* 2002). Foi estabelecido que os machos de abelhas Euglossini são atraídos às flores pelo odor (Dodson 1962). Em orquídeas polinizadas por machos de euglossine a produção de fragrâncias é capaz de orientar as abelhas, mesmo se as flores estiverem em locais de difícil visualização (Dodson *et al.* 1969).

Para Williams & Whitten (1983), as relações entre espécies de orquídeas e abelhas Euglossini são altamente específicas, e essa especificidade é baseada nas combinações espécies-específicas dos compostos das fragrâncias florais, que atraem apenas uma ou raramente poucas espécies de abelhas Euglossini. No caso das espécies de *Cirrhaea*, entretanto, essa especificidade não foi encontrada, visto que uma única espécie de *Cirrhaea* pode ser polinizada por até três espécies de abelhas, como observado em *C. fuscolutea* e *C. longiracemosa*, e uma única espécie de Euglossini, como *Euglossa cordata*, pode polinizar mais de uma espécie de *Cirrhaea* (*i.e.*, *C. dependens*, *C. fuscolutea* e *C. loddigesii*), mesmo apresentando composição química das fragrâncias distintas. Segundo Dodson *et al.* (1969), a forte atração das abelhas Euglossini por fragrâncias específicas produzidas pelas flores fornece o necessário isolamento reprodutivo para a

manutenção da integridade de espécies intercompatíveis. Gerlach & Schill (1991) afirmam que essa especificidade entre os perfumes das orquídeas e as Euglossini pode promover o isolamento reprodutivo de espécies simpátricas, como ocorre com *Gongora aceras* Dressler e *G. napoensis* Jenny, nos Andes. Nossos dados contradizem a hipótese de especificidade entre espécies de Orchidaceae e Euglossini que vem sendo afirmada nos últimos 40 anos de pesquisa (Dodson *et al.* 1969; Dressler 1967; Dressler 1982; Williams & Whitten 1983, 1999; Eltz *et al.* 1999; Cameron 2004) e demonstram que a relação entre orquídeas e esse grupo de abelhas não ocorre de forma exclusiva e restrita (Capítulo 3).

Assim como registrado para as espécies de *Stanhopea* ocorrentes no sudeste do Brasil (Pansarin & Amaral 2009), nas espécies de *Cirrhaea* estudadas a emissão das fragrâncias é perceptível apenas no primeiro dia de antese das flores. Normalmente as orquídeas polinizadas por Euglossini tendem a produzir intensa fragrância por um curto período de tempo, e o perfume contém substâncias como monoterpenos, sequiterpenos, compostos aromáticos simples e ésteres (Gerlach & Schill 1991). Esses compostos diferem dos produzidos por espécies de orquídeas polinizadas por outros grupos de abelhas, em que são produzidos muitos compostos que são exalados em pequenas quantidades durante um longo período (Gerlach & Schill 1991). Em geral, fragrâncias florais simples, com poucos compostos, podem atrair um grande número de espécies de Euglossini, enquanto fragrâncias mais complexas habitualmente atraem poucas espécies. Um aroma apropriado de compostos pode atrair apenas uma única espécie de abelha entre dezenas de euglossines que habitam uma mesma região (Pridgeon *et al.* 2009).

De acordo com Gerlach & Schill (1991) as fragrâncias florais variam amplamente em composição e complexidade entre as espécies de Stanhopeinae. A composição química das fragrâncias das espécies de *Cirrhaea* difere, na composição da fragrância, de outras Stanhopeinae, como as de *Stanhopea lietzei* Schltr., composta principalmente por indol, linalol e benzoato de benzila, e de *S. insignis* Frost *ex* Hook., composta principalmente por álcool benzílico (Reis *et al.* 2004). Porém, as fragrâncias de *C. dependens* e *C. nasuta* são semelhantes, quanto aos compostos principais, às de *Stanhopea anfracta* Rolfe e *S. annulata* Mansf. (Williams & Whitten 1999) e também à de *Sievekingia butcheri* Dressler, cuja predominância também é de ipsdienol (Kaiser & Gerlach, dados não publicados). As fragrâncias de *C. loddigesii* e *C. seidelii*

assemelham-se à de *Gongora galeata* Rchb.f., que também apresenta (E)-Ocimeno como principal composto (Cancino & Damon 2007).

A variação na composição da fragrância registrada entre indivíduos de *C. dependens* pode ser explicada pela diferente origem das plantas. Em estudo realizado na Itália, diferentes populações de uma espécie de *Ophrys* apresentaram odores com composições químicas diferentes, porém atraindo o mesmo polinizador, *Colletes cunicularius* (L.) (Mant *et al.* 2005). De acordo com Kullenberg *et al.* (1984), em flores de *Ophrys* a composição química do odor pode variar entre os indivíduos de acordo com a duração da flor, a temperatura do ar, a umidade atmosférica e a turbulência do vento.

Apesar de ainda ser incerta a forma de utilização das fragrâncias por parte das Euglossini, essas abelhas têm grande importância na evolução das orquídeas que produzem esses compostos (Murray 1960). As espécies de *Cirrhaea*, assim como as demais Stanhopeinae, oferecem fragrância e dependem exclusivamente dos machos de Euglossini para a formação de frutos em ambiente natural. A preservação desse grupo de abelhas é de fundamental importância para a manutenção das populações naturais de orquídeas, principalmente para *Cirrhaea*, que apresenta populações muito pequenas, com indivíduos muito esparsos, tanto em Ubatuba-SP como em Santa Teresa-ES.

Referências Bibliográficas

- Ackerman, J.D. 1983. Specificity and mutual dependency of the orchid- euglossine bee interaction. *Biological Journal of the Linnean Society* 20: 301–314.
- Bezerra, C.P. & Martins, C.F. 2001. Diversidade de Euglossinae (Hymenoptera, Apidae) em dois fragmentos de mata atlântica localizados na região urbana de João Pessoa, Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 18: 823-835.
- Borba, E.L. & Semir, J. 1998. Wind-assisted fly pollination in three *Bulbophyllum* (Orchidaceae) species occurring in the Brazilian campos rupestres. *Lindleyana* 13: 203–218.

- Borba, E.L.; Semir, J. & Shepherd, G.J. 2001. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* 88: 88-89.
- Braga, P.I.S. 1976. Estudos da flora orquidológica do Estado do Amazonas: I- Descrição e observação da biologia flora de *Stanhopea candida* Barb. *Rodr. Acta Amazonica* 6: 433-438.
- Cameron, S.A. 2004. Phylogeny and biology of Neotropical orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Entomology* 49: 377-404.
- Cancino, A.D. & Damon, A. 2007. Fragrance analysis of euglossine bee pollinated orchids from Soconusco, south-east Mexico. *Plant Species Biology* 22: 129-134.
- Cruz-Landim, C.; Stort, A.C.; Cruz, M.A.C. & Kitajima, E.W. 1965. Orgão tibial dos machos de Euglossini. Estudo ao microscópio óptico e eletrônico. *Revista Brasileira de Biologia* 25: 323-341.
- Dodson, C.H. 1962. The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America. *American Orchid Society Bulletin* 31: 525-554; 641-649; 731-735.
- Dodson, C.H. & Frymire, G.P. 1961. Natural pollination of orchids. *Missouri Botanical Garden Bulletin* 49: 133-152.
- Dodson, C.H.; Dressler, R.L.; Hills, H.G.; Adams, R.M. & Williams, N.H. 1969. Biologically Active Compounds in Orchid Fragrances. *Science* 164: 1243-1249.
- Dressler, R.L. 1967. Why do euglossine bees visit orchid flowers? *Atas do Simposio sobre a Biota Amazonica* 5: 171-180.
- Dressler, R.L. 1968. Pollination by euglossine bees. *Evolution* 22: 202-212.
- Dressler, R.L. 1981. *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Dressler, R.L. 1982. Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 373-394.
- Eltz, T., Whitten, M.W., Roubik, D.W. & Linsemair, K.E. 1999. Fragrance collection, storage, and accumulation by individual male orchid bee. *Journal of Chemical Ecology* 25: 157-175.

- Eltz, T., Sager, A. & Lunau, K. 2005. Juggling with volatiles: exposure of perfumes by displaying male orchid bees. *Journal of Comparative Physiology, A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 191: 575-581.
- Eltz, T., Zimmermann, Y., Haftmann, J., Twele, R., Francke, W., Quezada - Euan, J.J.G. & Lunau, K. 2007. Enfleurage, lipid recycling, and the origin of perfume collection in orchid bees. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 274: 2843–2848.
- Faegri, K. & van der Pijl, L. 1980. *The principles of pollination ecology*, 3^a edição. Oxford: Pergamon Press.
- Feinsinger, P. 1983. Coevolution and pollination. *In* *Coevolution* (Futuyma, D.J. & Slatkin, M. eds), Sunderland: Sinauer Associates, pp. 282-310.
- Garay, L.A. 1960. On the origin of the Orchidaceae. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University* 19: 57-96.
- Gerlach, G. 1999. *Sievekingia* y *Soterosanthus*: parientes, pero diferentes. *Sievekingia* and *Soterosanthus*: related by different. *Orquideología* 21: 214–227.
- Gerlach, G. & Schill, R. 1991. Composition of orchids scents attracting euglossine bees. *Botanica Acta* 104: 379-391.
- Herrera, C. 1989. Pollinator abundance, morphology, and flower visitation rate: analysis of the “quantity” component in plant - pollinator system. *Oecologia* 80: 241-148.
- Hoehne, F.C. 1933. Contribuição para o conhecimento do gênero *Catasetum*, especialmente hermaphroditismo e trimorfismo das suas ores. *Boletim de Agricultura do Estado de São Paulo* 1: 133-196.
- Janzen, D.H. 1971. Euglossine bees as long distance pollinators of tropical plants. *Science* 171: 203-205.
- Johnson, S.D. & Edwards, T.J. 2000. The structure and function of orchid pollinaria. *Plant Systematics and Evolution* 222: 243-269.
- Kaiser, R. 1993. *The scent of orchids: olfactory and chemical investigations*. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, The Netherlands. 259 p.
- Kearns, C. & Inouye, W. 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Niwot.

- Kullenberg, B. Borg-Karlson, A.K. & Kullenberg, A.L. 1984. Field studies on the behaviour of the *Eucera nigrilabris* male in the odour flow from flower labellum extract of *Ophrys tenthredinifera*. Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis, Serie V:C 3: 79–110.
- Lakon, G. 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germination capacity of seeds. Plant Physiology 24: 389-394.
- Mant, J.; Peakall, R. & Schiestl. 2005. Does selection on floral odor promote differentiation among populations and species of the sexually deceptive orchid genus *Ophrys*? Evolution 59: 1449-1463.
- Martini, P.; Schlindwein, C. & Montenegro, A. 2003. Pollination, flower longevity, and reproductive biology of *Gongogra quinquenervis* Ruíz and Pavón (Orchidaceae) in an atlantic forest fragment of Pernambuco, Brazil. Plant Biology 5: 495-503.
- Mendes, S.L. & Padovan, M.P. 2000. A Estação Biológica de Santa Lúcia, Santa Teresa, Espírito Santo. Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão (N. Série), 11/12: 35-48.
- Michener, C.D. 2000. The Bees of the World. Baltimore, London: Johns Hopkins Univ. Press. 913 pp.
- Mickeliunas, L., Pansarin, E.R. & Sazima, M. 2006. Biologia floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucesso reprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). Revista Brasileira de Botânica 29: 251–258.
- Moraes, M.D. 1997. A família Asteraceae na planície litorânea de Picinguaba, município de Ubatuba - São Paulo. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas. Área de Biologia Vegetal). Universidade Estadual de Campinas. Campinas: UNICAMP. 154p.
- Moure, J.S. 1967. A check-list of the known euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica 5 (Zool): 395-415.
- Murray, M.J. 1960. The genetic basis for a third ketone group in *Mentha spicata* L. Genetics 45: 925-931.
- Neves, E.L. & Viana, B.F. 1997. Inventário da fauna de Euglossinae (Hymenoptera, Apidae) do baixo sul da Bahia, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia 14: 831-837.

- Neves, E.L. & Viana, B.F. 1999. Comunidade de machos de Euglossinae (Hymenoptera, Apidae) das matas ciliares da margem esquerda do médio Rio São Francisco, Bahia. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28: 201-210.
- Nimer, E. 1977. Climatologia da região sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Geografia* 34: 3-48.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1975. *Orchidaceae Brasilienses v. 1*, Hildesheim, Kurt Schmersow 408p.
- Pansarin, E. R. & Amaral, M.C.E. 2009. Reproductive biology and pollination of southeastern Brazilian *Stanhopea* Frost ex Hook. (Orchidaceae). *Flora* 204: 238-249.
- Pansarin, E.R.; Bittrich, V. & Amaral, M.C.E.. 2006. At daybreak – reproductive biology and isolating mechanisms of *Cirrhaea dependens* (Orchidaceae). *Plant Biology* 8: 494-502.
- Pansarin, L.M.; Pansarin, E.R. & Sazima, M. 2008. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit. *Plant Biology* 10: 650–659.
- Pridgeon, A.M.; Cribb, P.; Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. (eds.) 2009. *Genera Orchidacearum*. v. 5, Oxford University Press: New York.
- Raw, A. 1989. The dispersal of euglossine bees between isolated patches of eastern brazilian wet forest (Hymenoptera, Apidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 33: 103-107.
- Reis, M.G.; Pansarin, E.R.; Silva, U.F.; Amaral, M.C.E. & Marsaioli, A.J. 2004. Pollinator attraction devices (floral fragrances) of some Brazilian orchids. *ARKIVOC* 6: 89–97.
- Roubik, D.W. 2004. *Orchid bees of Tropical America*. INBio, Costa Rica.
- Roubik, D.W. & Ackerman, J.D. 1987. Long-term ecology of euglossine orchid-bees (Apidae: Euglossini) in Panama. *Oecologia* 73: 321-333.
- Sazima, M.; Vogel, S.; Cocucci, A. & Hausner, G. 1993. The perfume flowers of *Cyphomandra* (Solanaceae): pollination by euglossine bees, bellows mechanism, osmophores, and volatiles. *Plant Systematics and Evolution* 187: 51-88.
- Silveira, F.A.; Melo, G.A.R. & Almeida, E.A.B. 2002. *Abelhas brasileiras: sistemática e identificação*. Fundação Araucária, Belo Horizonte, 254p.
- Singer, R.B. & Sazima, M. 2004. Abelhas Euglossini como polinizadoras de orquídeas na região de Picinguaba, São Paulo, Brasil. *In Orquidologia Sul-Americana: uma compilação*

- Científica (Barros, F. and Kerbauy, G. B., eds.), São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, pp.175–187.
- Stiles, F.G. 1985. Seasonal patterns and coevolution in the hummingbird pollination of some Costa Rica *Heliconia* species. *Ecology* 56: 285-301.
- Suguio, K. & Martin, L. 1990. Geomorfologia das restingas. In Anais do II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileiro. ACIESP, Águas de Lindóia. 3: 185-206.
- Thomaz, L.D. 1996. Florística e fitossociologia da floresta atlântica na Estação Biológica de Santa Lúcia, Santa Teresa, Espírito Santo. Tese de Doutorado. Rio Claro, Universidade Estadual de São Paulo, 321p.
- Tremblay, R.L. 1992. Trends in pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. *Canadian Journal of Botany* 70: 642-650.
- van der Pijl, L. & Dodson, C.H. 1966. *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Florida, University of Miami Press.
- Viana, B.F., Kleinert, A.M.P. & Neves, E.L. 2002. Comunidade de Euglossini (Hymenoptera, Apidae) das dunas litorâneas do Abaeté, Salvador, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 46: 539-545.
- Vogel, S. 1962. *Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung: Über Bau und Funktion der Osmophoren*. Mainz: Akademie der Wissenschaften und der Literatur 10: 1-165.
- Whitten, W.M., Young, A.M. & Williams, N.H. 1989. Function of glandular secretions in fragrance collection by male euglossine bees. *Journal of Chemical Ecology* 15: 1285-1295.
- Whitten, W.M., Young, A.M. & Stern, D.L. 1993. Nonoral sources of chemicals that attract male euglossine bees (Apidae: Euglossini). *Journal of Chemical Ecology* 19: 3017-3027.
- Williams, N.H. 1982. The biology of orchids and euglossine bees. *In* *Orchid biology and perspectives* J.Arditti (ed.), Ithaca: Cornell University Press, pp. 119-171.
- Williams, N.H. & Dodson, C.H. 1972. Selective attraction of male euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long distance pollen flow. *Evolution* 28: 84-95.
- Williams, N.H., & Dressler, R.L. 1976. Euglossine pollination of *Spathiphyllum* (Araceae). *Selbyana* 1: 349- 356.
- Williams, N.H & Whitten, W.M. 1983. *Orchid Floral Fragrances & Male Euglossine Bees: Methods & Advances in the Last Sesquidecade*. *Biology Bulletin* 164: 355-395.

- Williams, N.H. & Whitten, W.M. 1999. Molecular phylogeny and floral fragrances of male euglossine bee-pollinated orchids: A study of *Stanhopea* (Orchidaceae). *Plant Species Biology* 14: 129-136
- Zimmermann, Y., Roubik, D.W. & Eltz, T. 2006. Species-specific attraction to pheromonal analogues in orchid bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60: 833-843.

Tabela 1: Dados sobre a localidade, o período e o número de horas de observação para cada espécie estudada.

Espécies	Localidade	Período de estudo	Horas de observação
<i>Cirrhaea dependens</i> Loudon	Ubatuba-SP	18-20/12/2008 20-23/12/2009	35h
<i>Cirrhaea fuscolutea</i> Lindl.	Ubatuba-SP	15-17/12/2008 17-20/12/2009	40h
<i>Cirrhaea loddigesii</i> Lindl.	Ubatuba-SP	18-22/01/2008 13-16/01/2009	36h
<i>Cirrhaea longiracemosa</i> Hoehne	Ubatuba-SP	28/11-03/12/2008	40h
<i>Cirrhaea nasuta</i> Brade	Santa Teresa-ES	20-27/01/2009	28h
<i>Cirrhaea seidelii</i> Pabst	Santa Teresa-ES	20-26/02/2010	35h

Tabela 2: Dados sobre a fenologia da floração nas seis espécies de *Cirrhaea* estudadas, indicando os períodos de emissão de inflorescências e de floração.

Espécies	Emissão de Inflorescência	Floração
<i>Cirrhaea dependens</i>	dezembro	janeiro - fevereiro
<i>Cirrhaea fuscolutea</i>	outubro	novembro - dezembro
<i>Cirrhaea loddigesii</i>	novembro	dezembro - janeiro
<i>Cirrhaea longiracemosa</i>	outubro	novembro - dezembro
<i>Cirrhaea nasuta</i>	novembro	dezembro - janeiro
<i>Cirrhaea seidelii</i>	dezembro	janeiro - fevereiro

Tabela 3: Iscas de odor que atraíram as abelhas Euglossini em cada localidade, assim como as espécies de abelhas coletadas com os polinários das diferentes espécies de *Cirrhaea*.

Espécies	Localidade	Isca de odor	Polinário
<i>Euglossa annectans</i>	Ubatuba-SP	Eucaliptol	<i>Cirrhaea longiracemosa</i>
<i>Euglossa cordata</i>	Ubatuba-SP	Vanilina e Eucaliptol	<i>Cirrhaea loddigesii</i> e <i>Cirrhaea fuscolutea</i>
<i>Eulaema nigrita</i>	Ubatuba-SP	Eucaliptol	<i>Cirrhaea fuscolutea</i>
<i>Euglossa chalybeata</i>	Ubatuba-SP	Vanilina	<i>Cirrhaea longiracemosa</i>
<i>Eulaema nigrita</i>	Santa Teresa-ES	Vanilina e Eucaliptol	<i>Cirrhaea nasuta</i>
<i>Euglossa annectans</i>	Santa Teresa-ES	Indol	<i>Cirrhaea nasuta</i>
<i>Euglossa aff. cordata</i>	Santa Teresa-ES	Eucaliptol	<i>Cirrhaea seidelii</i>

Tabela 4: Frutificação final (frutos maduros) e porcentagem de sementes potencialmente viáveis nas espécies de *Cirrhaea*. AP = Autopolinização, PC = Polinização cruzada. Na frutificação: número de frutos formados/número de flores.

Espécie	Frutificação (AP)	Frutificação (PC)	Sementes (AP/PC)
<i>Cirrhaea dependens</i>	29/45 (64,4%)	33/42 (78,6%)	88,9% / 92,3%
<i>Cirrhaea fuscolutea</i>	14/21 (66,7%)	16/22 (72,7%)	90,4% / 93,9%
<i>Cirrhaea loddigesii</i>	15/38 (39,5%)	22/40 (55%)	86,4% / 91,7%
<i>Cirrhaea longiracemosa</i>	20/31 (64,5%)	19/26 (73,1%)	91,1% / 94,8%
<i>Cirrhaea nasuta</i>	8/13 (61,5%)	5/8(62,5%)	89,3% / 92,1%
<i>Cirrhaea seidelii</i>	4/10 (40%)	9/12 (75%)	92,8% / 94,7%

Tabela 5: Composição química das fragrâncias oferecidas pelas flores de *Cirrhaea*, mostrando a porcentagem proporcional de cada composto.

Compostos Químicos	<i>Cirrhaea</i>	<i>Cirrhaea</i>	<i>Cirrhaea</i>	<i>Cirrhaea</i>	<i>Cirrhaea</i>				
	<i>dependens</i> (branca)	<i>dependens</i> (esverdeada)	<i>dependens</i> (vinácea)	<i>dependens</i> (amarela)	<i>nasuta</i>	<i>fuscolutea</i>	<i>loddigesii</i>	<i>loddigesii</i> (2)	<i>seidellii</i>
Metil 2-Metilbutirato									
α -Pineno	0,3	0,1	0,2	0,2	0,2	1,6			
β -Pineno	0,4		0,1	0,3	0,1	0,1			
Sabineno	3	0,3	0,6	0,6	1,3	0,05			
Myrceno	25	1,2	85	28,5	48,5	3,4			0,2
A-Terpineno					0,04				
Limoneno	0,2		0,1	0,2	0,1	2,5	0,5	0,5	0,1
Eucaliptol	0,02	0,1	0,9	0,05	0,02	55,8	7	7	
(Z) -Ocimeno	0,03			0,02			0,4	0,4	0,4
(E) -Ocimeno	0,5		0,2	0,1	0,2	3,6	80	80	79
(E)-4,8-Dimetil-1,3,7-Nonatrieno					0,05				
Terpinoleno						0,3			
2-Metil-6-Metileno-1,3,7-Octatrieno	3,8	0,03		1,7					
6-Metil-5-hepteno-2-one	0,03	0,06			0,1				0,3
Tridecano				1					

Hexanol						0,03			
(Z) -3(4) -Epoxi-3,7-dimetil-1,6-octadieno									0,4
Nonanal		0,04				0,03			0,1
Tetradecano									
(E)-3(4)-Epoxi-3,7-dimetil-1,6-octadieno									0,9
6,7 -Epoximirceno (Mirceno epoxido)	2,9	0,5	4,6	1,6	3,7				
152(1),109(8),79(25),67(45),41(100)			2,8						
3,10 –Epoxi mirceno					3,5				
trans-Linalol oxido (furanoide))					0,06				
(Z) –Ocimeno epoxido									0,06
Ipsenono	0,7	1,2		0,2					
trans-Sabineno hydrato	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,03			
2-Metil-6-Metileno-Octa-1,7-Dien-3-One			0,3	0,1					
Neral			0,02		0,2				
cis-Linalol oxido (furanoide)					0,03				
(E)-Ocimeno epoxido							0,6	0,6	1,1
Dime-Octadienono-3,7,1,35		0,1							
Decanal		0,03							
1,2-Epoxi Mirceno					0,8				
Benzaldeído				0,1	0,8	0,03			0,04
Cis-Sabineno hidrato		0,01			0,1				

135(12),107(15),91(22),79(100),67(30)	3,1			1,5				
Linalol	3,1	0,2		0,8	5,5	0,1		0,2
(E) -2(3) -Epoxi-2,6-dimetil-6,8-nonadieno								
Ipsdienono	3,2	6,5		1,5				
Cariofilleno		0,2			8,9	23,3		0,3
Ipsdienol Acetato	0,2	0,3		0,1				
Trans-Alfa-Bergamoteno	0,5			0,5				
Metil benzoato	0,05			0,05	1,2			
Fenilacetaldéido					0,1			
(E) - β -Farneseno		0,2			0,1	0,4	0,4	0,2
Ipsdienol	43,7	82,6		52,2	0,4			
α -Terpineol	0,03		0,04	0,03	0,2			
(Z,E) - α -Farneseno		0,1						
1,2-Dimetoxibenzeno					0,3			
1,4-Dimetoxibenzeno (Hidroquinona dimetil eter)				0,01		4		
Metil salicilato	0,2	0,07		0,7	3,6			
Geranil Acetato			0,6					
(Z)-Geranilacetona					0,07			
(E)-Geranilacetona					0,05			

2-Oxo-Citronelol				0,02	
Beta-Sesquifelandreno	0,3				
Feniletil acetato	0,05	0,01		0,08	
2(3)-Epoxi-Geranyl Acetato		0,08		0,2	
Cis-Piperitol		0,05			
2(3)-Epoxi Geraniol		0,01		3,1	
Lactona		0,2			
(E,E)-2,6-Dimetil-3,5,7-octatrieno-2-ol					0,1
AR-Curcumeno	0,07		0,04		
Dihidro- β -Ionono	0,2	0,02		0,08	0,5
(E) -Geranylacetona					0,2
Álcool Benzílico				1,8	
Feniletil álcool				0,4	
β -Ionono				0,1	0,1
Perilla álcool				0,3	
Anis Aldeído				0,05	
Cinamico aldeído				0,07	
3-Fenilpropanol				0,2	
(E) - α -Farneseno Epoxido	0,1				
(E) -Nerolidol	0,02			0,05	0,1
Metil 2-metoxibenzoato				0,05	

Metil Anisato				0,07	
1,2,4-Trimetoxibenzeno				0,3	
7(11) -Epoxi-Megastigma-5(6) -en-9-one	0,2	0,05	0,02	2,3	
Anisil acetato	0,03		0,08	4,9	
2-Aminobenzaldeíde					
(E)-Metil Isoeugenol	0,01		0,02	0,2	
Elemicina				0,05	
Chavicol				0,05	
(E)-Isoelemicina	0,2	0,06		1,2	
Veratril Acetato				0,1	
Fenil Benzoato					0,03
Eugenol					0,01
(E) -Cinamico álcool				0,05	
1,2,4,5-Tetrametoxibenzeno				0,8	
Coumarina					0,01
Benzil benzoato					0,1
Beta-Felandreno	0,1			0,06	
Humuleno				0,08	0,3
Germacreno D					2,7
Biciclogermacreno					0,1
Epoxi-Perileno				0,04	

Metil Geranato					0,02				
Beta-Bisaboleno	3,9	1,8		3,2	0,6				
Geraniol			0,2		1				
Germacreno A			0,05		0,1				
Nerol		0,03							
Alfa-Ionono	0,02								
Gama-Cadineno						0,05			
Cariofileno Epoxido					0,2	0,1			
Germacra-1(10),5-Dien-4-ol						0,7			
Metil Fenilacetato	0,2				0,04		0,5	0,5	1,5
2-Oxi-5-Me-Acetofenona									0,8
Metil 2-Hidroxi-3-Fenilpropionato							1,4	1,4	9,9
Anisil álcool					0,04				
Total	96,19	96,57	96,26	95,62	99,18	98,91	90,8	90,8	96,5



Figura 1. *Cirrhaea dependens*. A-D. Variação na coloração das flores (A seta: osmóforo). E. *Euglossa cordata* coletando fragrância no osmóforo. F. *E. cordata* deixando a flor com o polinário fixado à perna mediana (seta).

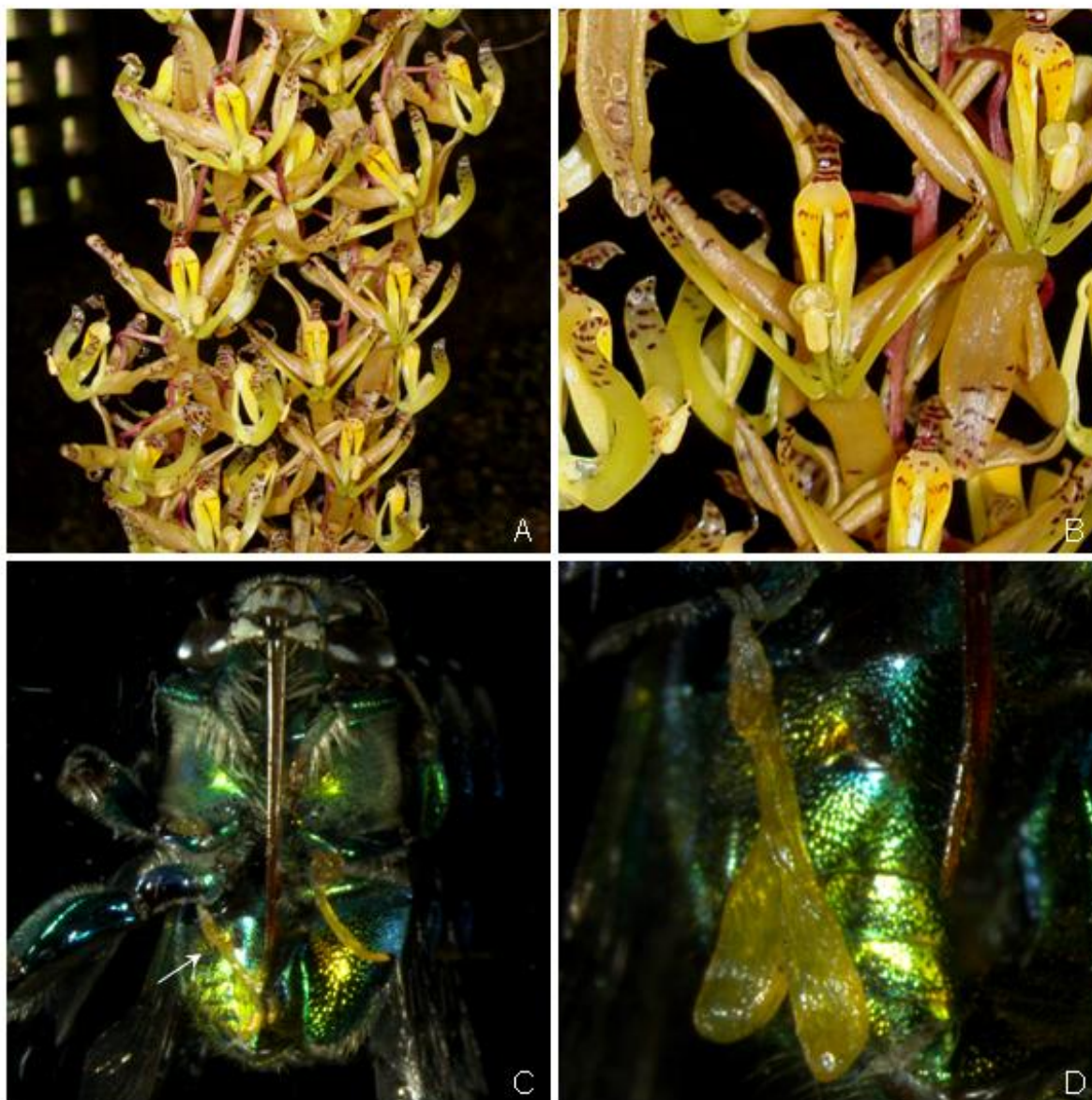


Figura 2. *Cirrhaea loddigesii*. A. Inflorescência pendente e racemosa. B. Detalhe da flor. C. *Euglossa cordata* com polinário de duas espécies de *Cirrhaea*, sendo um deles o de *C. loddigesii* (seta) e o outro de *C. longiracemosa*. D. Detalhe do polinário de *C. loddigesii*.



Figura 3. *Cirrhaea longiracemosa*. A. Parte da inflorescência pendente e racemosa. B. Detalhe da flor em vista frontal, evidenciando o osmóforo (seta). C. *Eufriesea violacea* coletando fragrância no osmóforo. D. *E. violacea* deixando a flor com o polinário aderido à perna traseira (seta).



Figura 4. *Cirrhaea nasuta*. A. Inflorescências. B. Detalhe da flor de *C. nasuta* evidenciando o osmóforo (seta). C. *Eulaema nigrita* com polinário de *C. nasuta* na perna anterior. D. Detalhe do polinário de *C. nasuta* preso à perna de *E. nigrita*.

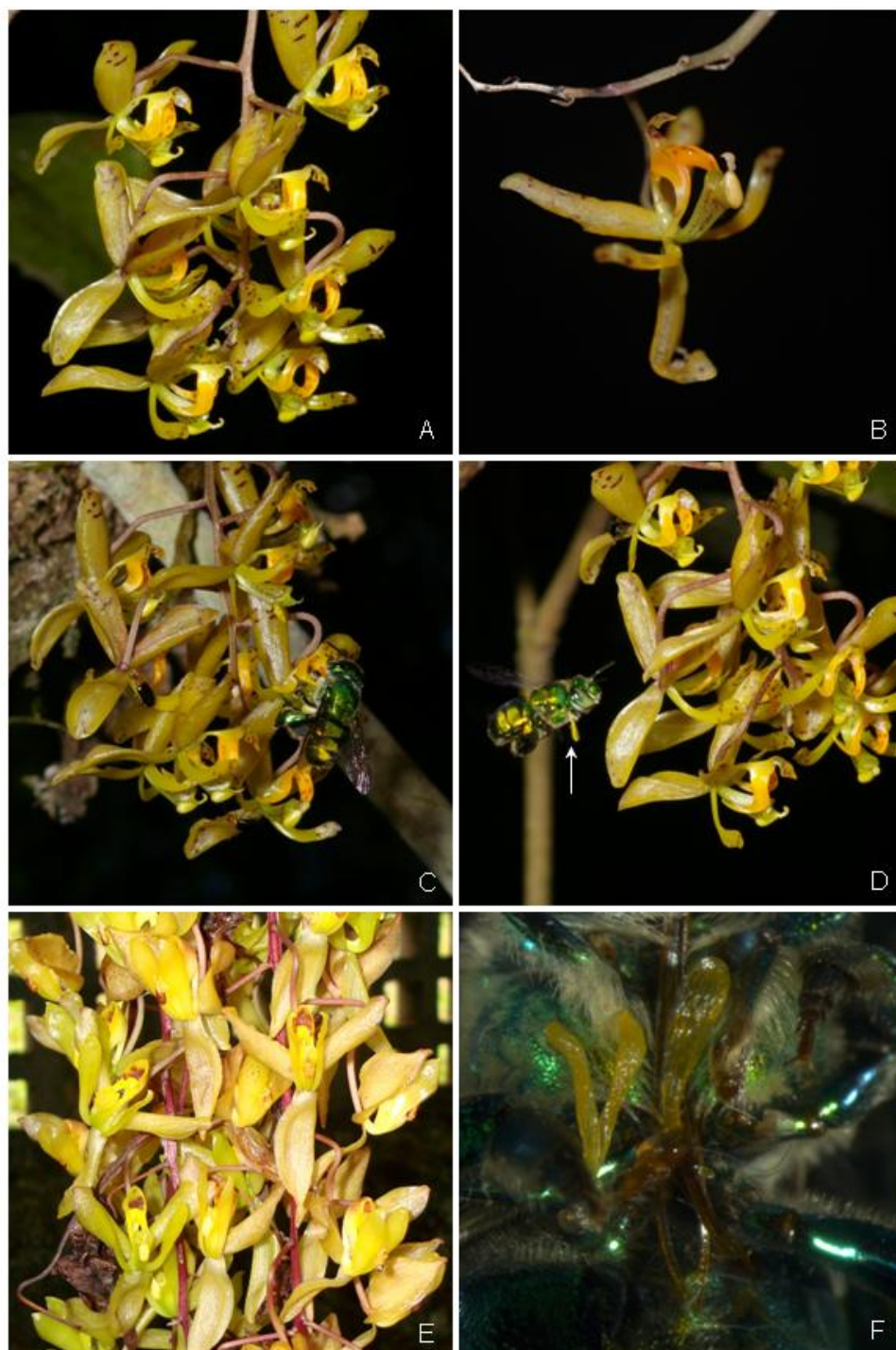


Figura 5. A. Inflorescência de *Cirrhaea seidelii*. B. Detalhe da flor de *C. seidelii*. C. *Euglossa* aff. *cordata* coletando a fragrância nos osmóforos de *C. seidelii*. D. *E. aff. cordata* com polinário de *C. seidelii* na perna anterior (seta). E. Parte da inflorescência de *Cirrhaea fuscolutea*. F. *Euglossa cordata* com polinário de *C. fuscolutea* aderido às pernas traseiras.

CAPÍTULO 3

Filogenia de *Cirrhaea* Lindl. e evolução dos sistemas de polinização em Stanhopeinae (Orchidaceae), baseadas em sequências de DNA de regiões nuclear ribossomal (ITS) e de cloroplasto (*trnL-F* e *matK*)

Ludmila Mickeliunas Pansarin¹, Emerson Ricardo Pansarin², Günter Gerlach³ e Marlies Sazima⁴

¹*Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brasil*

²*Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brasil*

³*Botanischer Garten München-Nymphenburg, Menzinger Straße 65, D-80638, München, Germany*

⁴*Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970, Campinas, SP, Brasil*

Resumo

A filogenia do gênero *Cirrhaea* e a evolução dos sistemas de polinização em Stanhopeinae foram investigadas com base em análises das regiões ITS (nrDNA), *matK* e *trnL-F* (cpDNA). Informações sobre polinizadores e filogenia de Euglossini foram obtidas e usadas para inferir os mecanismos de evolução da polinização da subtribo. As análises filogenéticas demonstram que a subtribo Stanhopeinae, assim como o gênero *Cirrhaea*, são monofiléticos. No entanto, a inclusão de *Braemia* na análise de *trnL-F* torna a subtribo parafilética. *Cirrhaea* é grupo irmão de *Gongora* e o clado formado pelos dois gêneros aparece como irmão do resto das Stanhopeinae na maioria das análises. Dentro de *Cirrhaea*, o clado formado por *C. fuscolutea* e *C. longiracemosa* é o grupo irmão do clado formado por *C. loddigesii*, *C. seidelii*, *C. dependens* e *C. nasuta*. Todas as espécies de Stanhopeinae são polinizadas por machos de Euglossini, e as análises filogenéticas indicam que não há relação correspondente entre a evolução das plantas e dos polinizadores, sugerindo que ambos evoluíram de forma independente. Também ficou evidenciado que não há especificidade entre essas orquídeas e as abelhas Euglossini, e que o mecanismo de co-evolução entre orquídeas e Euglossini não ocorreu, havendo uma dependência unilateral por parte das plantas.

Introdução

A subtribo Stanhopeinae (Epidendroideae, Cymbidiae) compreende 20 gêneros e aproximadamente 270 espécies distribuídas em regiões úmidas dos Neotrópicos (Pridgeon *et al.* 2009). Entre esses gêneros está *Cirrhaea* Lindl., que ocorre principalmente no Sudeste do Brasil (exceto *C. silvana*, que ocorre no sul da Bahia) e são encontradas em regiões de Mata Atlântica (Pansarin *et al.* 2006). O gênero é caracterizado por seus pseudobulbos sulcados e unifoliolados, pelas folhas pseudopeciolas e plicadas, e pelas inflorescências em racemos e pendentes com flores efêmeras. Fortemente relacionada com *Gongora*, *Cirrhaea* pode ser diferenciada por seu labelo trilobado destituído de projeções laterais do mesoquílio e pela sua coluna ereta. Das mais de 20 espécies de *Cirrhaea* descritas apenas sete são consideradas válidas: *C. dependens* (Lodd.)

Loudon, *C. loddigesii* Lindl., *C. longiracemosa* Hoehne, *C. nasuta* Brade, *C. fuscolutea* Lindl., *C. seidelii* Pabst e *C. silvana* Castro & Campacci. (Govaerts 1999, 2003)

As flores de *Cirrhaea*, assim como ocorre em outras Stanhopeinae, como *Stanhopea* e *Gongora*, apresentam estrutura do labelo muito complexa e altamente especializada, que é diretamente relacionada com o mecanismo de polinização das espécies (van der Pijl & Dodson 1966; Dressler 1968b). De acordo com van der Pijl & Dodson (1966), as relações entre membros da subtribo Stanhopeinae e seus polinizadores tendem a ser espécie-específicas e estão associadas a produção de fragrâncias distintas entre as espécies. Nesse caso, a especificidade pode atuar como mecanismo de isolamento reprodutivo entre espécies que ocorrem simpatricamente e florescem no mesmo período (van der Pijl & Dodson 1966, Dressler 1993).

Cirrhaea, assim como os demais gêneros que pertencem à subtribo Stanhopeinae, produzem fragrâncias (óleos voláteis) como recurso floral e são coletadas exclusivamente por machos de abelhas da tribo Euglossini (Hymenoptera, Apidae) (Williams 1982). Os machos dessas abelhas são conhecidos por coletarem compostos voláteis em espécies de várias famílias, incluindo Orchidaceae (para uma revisão veja Williams 1982). Em orquídeas as fragrâncias florais são produzidas quase exclusivamente no labelo, em estruturas glandulares ou epidérmicas chamadas osmóforos (Vogel 1963a, 1963b). O papel dos machos de abelhas euglossine como polinizadores de orquídeas e seus incríveis mecanismos de polinização são amplamente conhecidos (*e.g.*, van der Pijl & Dodson 1966; Dressler 1967; Williams 1982; Pansarin *et al.* 2006; Pansarin & Amaral 2009).

No trabalho realizado por Whitten *et al.* (2000) sobre as relações filogenéticas em Maxillarieae com ênfase em Stanhopeinae, utilizando as regiões ITS, *matK* e *trnL-F*, *Braemia* aparece como gênero irmão das demais Stanhopeinae. *Cirrhaea* e *Gongora* formam um clado. No entanto, apenas uma espécie de *Cirrhaea* (*C. dependens*) foi incluída nas análises. *Stanhopea* também forma um clado monofilético dentro da subtribo. *Peristeria*, um gênero tradicionalmente incluído em Stanhopeinae (Dressler 1993), atualmente está sendo considerado como membro das Coeleopsidinae (Pridgeon *et al.* 2009). As regiões de DNA utilizadas nos estudos de Whitten *et al.* (2000) foram *matK*, *trnL-F* (cloroplasto) e ITS (nuclear).

Para a família Orchidaceae há poucos estudos envolvendo evolução dos sistemas de polinização. De acordo com Cozzolino & Widmer (2005), o estudo sobre evolução dos sistemas

de polinização em Orchidaceae é atualmente uma área em expansão. Em uma investigação sobre a evolução dos sistemas de polinização em espécies de *Disa*, utilizando apenas caracteres morfológicos, foi verificado que reversões de flores de engano para flores com recurso ocorreram pelo menos três vezes dentro do gênero (Johnson *et al.* 1998). Apenas poucos trabalhos sobre evolução da polinização têm sido realizados envolvendo dados macromoleculares. Uma exceção é o trabalho de Cozzolino *et al.* (2001), que verificaram a evolução de flores de engano para flores com recurso em Orchidinae.

Muitos trabalhos envolvendo a biologia da polinização de espécies de Stanhopeinae vêm sendo realizados, no entanto, até o presente não há informações sobre a evolução dos sistemas de polinização na subtribo utilizando dados moleculares. Além disso, representantes brasileiros de Stanhopeinae são raramente incluídos em hipóteses filogenéticas envolvendo a subtribo (Whitten *et al.* 2000). A maioria das espécies incluídas em trabalhos de filogenia ocorre na América Central e dados estão faltando, principalmente para *Cirrhaea*, com apenas uma espécie representada em análises até o presente. Baseados nesses fatos, os objetivos principais do presente estudo são: investigar a filogenia de *Cirrhaea*, gênero raro e endêmico do Brasil, e elaborar uma hipótese filogenética para a subtribo Stanhopeinae baseada em caracteres moleculares para as regiões ITS (nrDNA), *trnL-F* e *matK* (cpDNA), reforçando os dados obtidos por Whitten *et al.* (2000). A partir de dados disponíveis sobre polinizadores das espécies e de hipóteses filogenéticas da tribo Euglossini foi estudada a evolução dos sistemas de polinização na subtribo. Para isso, testamos a hipótese de que há uma relação correspondente entre as filogenias das plantas e dos polinizadores.

Material e Métodos

Material botânico

As espécies utilizadas neste estudo, assim como os dados moleculares obtidos a partir do GenBank estão apresentados na **Tabela 1**. Os táxons de Stanhopeinae escolhidos para esse estudo foram aqueles para os quais havia dados sobre os polinizadores disponíveis na literatura e obtidos através de novas observações para *Cirrhaea* (Capítulo 2). A escolha dos grupos externos:

Dressleria (Catasetinae), *Eulophia* (Eulophiinae), *Cyrtopodium*, *Grammatophyllum* (Cyrtopodiinae) e *Peristeria* (Coeliopsidinae) foi baseada em estudos prévios (Whitten *et al.* 2000; Pridgeon *et al.* 2009). A espécie *Cirrhaea silvana* não foi incluída neste estudo por não terem sido encontrados indivíduos no campo nem em cultivo para a coleta de material para a extração de DNA. A espécie “*Stanhopea* sp.” foi coletada no campo (Espírito Santo), mas sem flor e por isso não pôde ser identificada.

Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

A partir de fragmentos de folhas frescas ou desidratadas em sílica-gel (Chase & Hills 1991) foi realizada a extração de DNA dos espécimes a serem analisados pelo método CTAB (Doyle & Doyle 1987). O produto obtido foi analisado por eletroforese utilizando gel de agarose 1% e Sybr Safe para testar a qualidade e a quantidade do DNA. Para todas as extrações (de acordo com a concentração de cada amostra) foram realizadas as devidas diluições em tampão TE, que foram estocadas em freezer a -20° C. A partir das diluições, os fragmentos de DNA foram amplificados através da reação em cadeia de polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction; Palumbi 1996), utilizando-se 50 μ l de reação de PCR e 0,25 μ l de Taq DNA polimerase. A Taq DNA polimerase foi adicionada à mistura no termociclador a 80° C, após um período de 10 minutos de denaturação a 99° C. Os iniciadores utilizados foram ITS (Sun *et al.* 1994), *matK* (Johnson & Soltis 1995) e *trnL-F* (Taberlet *et al.* 1991). As temperaturas de anelamento para amplificação foram 51° C para *matK*, $56-58^{\circ}$ C para *trnL-F* e 61° C para ITS. Após 35 ciclos no termociclador, os produtos amplificados foram purificados utilizando-se kits de purificação GFX (Amersham Biosciences) de acordo com os procedimentos indicados pelo fabricante. Posteriormente, os produtos de PCR purificados foram estocados em freezer a -20° C.

A partir das purificações foram realizadas as reações de sequenciamento para cada uma das amostras, que foram analisadas com auxílio de sequenciadores automáticos de DNA Biosystems, modelos 3100 e 3700, usando Big Dye 3.1 (ABI) e seguindo os protocolos do fabricante. Muitas das seqüências de ITS, *matK* e *trnL-F* utilizadas nesse estudo foram previamente publicadas (Whitten *et al.* 2000) e estão disponíveis no banco de dados Genbank. As seqüências foram alinhadas usando o programa Clustal X versão 1.83 (Thompson *et al.* 1997). As correções manuais foram feitas utilizando o programa BioEdit versão 5.0.9. Indels foram

codificados como dados ausentes. Os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Biosistemática de Plantas (LBMBP) da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP) em Ribeirão Preto, SP.

Análises Cladísticas e evolução da polinização

As análises filogenéticas foram realizadas usando o programa PAUP 4.0b.5. (Swofford 2001) pelo princípio de parcimônia de Fitch (todos os caracteres com mesmo peso e não ordenados, Fitch 1971), incluindo autapomorfias. Todas as otimizações foram realizadas usando o algoritmo ACCTRAN, com ramos de comprimento igual a zero, colapsados. A estratégia de busca utilizada para as análises cladísticas foi de 10.000 replicações para cada inclusão aleatória de cada táxon, com a opção MULTREES (salvando múltiplas árvores), e algoritmo TREEBISECTION-RECOGNITION (TBR) com obtenção de dez árvores por replicação e salvando as mais curtas.

Para verificação da sustentação dos ramos obtidos nas árvores, foram realizadas análises de Bootstrap e de Jackknife, com 1000 replicações cada, com dez replicações para adição aleatória de cada táxon, com obtenção de uma árvore para cada replicação. O “Partition Homogeneity Test” do PAUP*4.0b5 (Swofford 2001) foi utilizado para assegurar a congruência entre as filogenias. O teste é equivalente ao teste de ILD de Farris *et al.* (1994) que tem sido utilizado para determinar se diferentes conjuntos de dados podem ser combinados em uma análise de parcimônia. O teste foi conduzido seguindo os parâmetros: busca heurística, TBR, com 100 adições de seqüências aleatórias e 500 replicações para gerar a hipótese nula. O suporte para os clados foi constatado utilizando 1000 replicações de Bootstrap e Jackknife, com 50% de deleção (Felsenstein 1985). Foram considerados bem sustentados os clados que apresentaram valores de Bootstrap e Jackknife acima de 80%, moderadamente sustentados os clados que apresentaram entre 70% e 80% e com baixa sustentação os que apresentaram valores inferiores a 70%.

Para a filogenia do gênero *Cirrhaea* foram conduzidas buscas heurísticas com 12 táxons (720 caracteres) para a região ITS, 15 táxons (1384 caracteres) para a região *matK*, nove táxons (1147 caracteres) para a região *trnL-F* e nove táxons (3251 caracteres) para a combinação dos dados das árvores das três regiões.

A partir das hipóteses filogenéticas para Stanhopeinae obtidas aqui e dos dados de polinização de *Cirrhaea* e demais gêneros disponíveis (**Tabela 2**) foi estimada a evolução dos sistemas de polinização da subtribo através da comparação com estudos filogenéticos para a tribo Euglossini (Michel-Salzat *et al.* 2004). Essa comparação foi feita através do programa COMPARE (Martins 2001), seguindo a metodologia aplicada em Weiblen (2004).

Resultados

Os dados estatísticos das árvores filogenéticas para o gênero *Cirrhaea*, incluindo o número de caracteres utilizados, o número de passos, o número de caracteres variáveis, o número de árvores encontradas, o número de caracteres filogenéticos potencialmente informativos, o Índice de Consistência (CI), o índice de Homoplasia, excluindo caracteres não informativos (HI) e o Índice de Retenção (RI) para os dados individuais e combinados estão apresentados na **Tabela 3**. A matriz para ITS consiste em 720 bases, das quais 118 (16,4%) são variáveis e 28 (4%) são potencialmente informativas. Para a região *matK*, foram utilizadas 1384 bases, das quais 61 (4,4%) são variáveis e 33 (2,4%) são informativas, e para a região *trnL-F* foram utilizadas 1147 bases, das quais 38 (3,3%) são variáveis e 25 (2,2%) são informativas. Para os dados combinados entre as três regiões de DNA, foram utilizadas 3251 bases, das quais 216 (6,6%) são variáveis e 78 (2,4%) são informativas.

As árvores de consenso geradas para as regiões ITS, *matK* e *trnL-F* isoladas estão apresentadas, respectivamente, nas **figuras 1, 2 e 3**. A árvore de consenso entre as três regiões do DNA está apresentada na **figura 4**. Todas as árvores, individuais e combinada, mostraram boa resolução, com altos valores de Bootstrap e Jackknife.

Os dados filogenéticos mostram que *Cirrhaea* apresenta três cladogramas distintos: um formado por *C. dependens* e *C. nasuta*, outro por *C. loddigesii* e *C. seidelii*, e um último formado por *C. fuscolutea* e *C. longiracemosa*, todos muito bem sustentados, com valores de Bootstrap acima de 80% e valores de Jackknife acima de 70%, tanto nas análises individuais como na análise combinada. De acordo com essas análises, o clado formado pelas espécies *Cirrhaea fuscolutea* e *C. longiracemosa* é o grupo irmão dentro das demais espécies do gênero.

Para os estudos filogenéticos da subtribo Stanhopeinae foram utilizados 49 taxons (674 caracteres) para ITS (**Fig. 5**), 61 taxons (1354 caracteres) para *matK* (**Fig. 6**), 51 taxons (933 caracteres) para *trnL-F* (**Fig. 7**) e 43 taxons (2873 caracteres) para a combinação dos dados das árvores das três regiões do DNA (**Fig. 8**). Os dados estatísticos das árvores filogenéticas para a subtribo Stanhopeinae, incluindo o número de caracteres utilizados, o número de passos, o número de caracteres variáveis, o número de árvores encontradas, o número de caracteres filogenéticos potencialmente informativos, o Índice de Consistência (CI), o Índice de Homoplasia, excluindo caracteres não informativos (HI) e o Índice de Retenção (RI) para os dados individuais e combinados estão apresentados na **Tabela 4**.

A matriz para ITS consiste em 739 bases, das quais 252 (34%) são variáveis e 173 (19%) são potencialmente informativas. Para a região *matK* foram utilizadas 1354 bases, das quais 171 (12,7%) são variáveis e 151 (11,1%) são informativas, e para a região *trnL-F* foram utilizadas 933 bases, das quais 164 (17,6%) são variáveis e 91 (9,8%) são informativas. Para a análise combinada das três regiões do DNA foram utilizadas 2926 bases, das quais 480 (16,4%) são variáveis e 423 (14,5%) são informativas. Todas as árvores de consenso calculadas foram bem resolvidas, com exceção da da região *trnL-F* isolada, que apresentou politomias entre as espécies de *Stanhopea*, e alguns clados pouco sustentados.

De acordo com essas análises podemos constatar que o gênero *Peristeria* é grupo irmão das Stanhopeinae, com Bootstrap (BS) e Jackknife (JK) acima de 70% (ITS, *trnL-F*, *matK* e combinada). Com a inclusão de *Braemia* na análise (*trnL-F*), Stanhopeinae torna-se parafilética (BS = 82, JK = 76; **Fig. 7**). *Cirrhaea* forma um clado monofilético, muito bem sustentado nas árvores de ITS *matK* e combinada (BS e JK = 100; **Figs. 5, 6 e 8**), e *trnL-F* (BS = 91; JK = 66; **Fig. 7**). *Cirrhaea* aparece como irmão de *Gongora* em todas as análises (**Figs. 5-8**) e o clado (*Cirrhaea* + *Gongora*) é irmão de um clado formado pelo restante das Stanhopeinae (*matK*, *trnL-F* e combinada; **Figs. 6-8**) ou do clado formado por *Paphinia*, *Houlletia*, *Trevoria* e *Schilimmia* (ITS; **Fig. 5**). Ainda na análise de ITS (**Fig. 5**), o clado ((*Cirrhaea* + *Gongora*) + (*Paphinia* + (*Houlletia* + (*Trevoria* + *Schilimmia*))) forma uma tricotomia com o clado *Polycynis* + *Kegeliella* + *Acineta* + *Lacaena* (BS = 96, JK = 92) e com o clado formado por *Stanhopea*, *Embreea*, *Coryanthes* e *Sievekingia* (BS = 100, JK = 96). O gênero *Stanhopea* aparece como um gênero monofilético nas análises de ITS e combinada (BS = 100, JK = 100; **Figs. 5 e 8**) e *trnL-F* (BS =

61, JK = 62; **Fig. 7**). Na árvore filogenética para a região *matK*, *Stanhopea* aparece como um gênero parafilético, formando uma tricotomia com *Sievekingia* (BS = 93, JK = 90; **Fig. 6**).

A partir dos dados de polinizadores disponíveis para Stanhopeinae foi possível verificar que machos de três gêneros de Euglossini (*Euglossa*, *Eulaema* e *Eufrisea*) atuam como polinizadores dentro da subtribo. Cada espécie pode ser polinizada por uma ou mais espécies de abelhas. Além disso, uma mesma espécie de abelha pode atuar como polinizador de mais de um táxon de Stanhopeinae (**Tabela 2**). Algumas vezes uma espécie de Euglossini pode atuar como polinizador de gêneros distintos, como *Cirrhaea* e *Stanhopea*, por exemplo. A combinação da filogenia das Stanhopeinae com a hipótese filogenética disponível para Euglossini mostra que não há relação correspondente entre a evolução das plantas e dos polinizadores, sugerindo que ambos evoluíram de forma independente. Esse resultado está representado pela **figura 9**. Deve-se ressaltar, no entanto, que a filogenia das Euglossini inclui poucos representantes que atuam como polinizadores de Stanhopeinae.

Discussão

De acordo com os resultados apresentados aqui, Stanhopeinae emerge como grupo monofilético na maioria das análises e *Peristeria*, um gênero atualmente incluído em Coeliopsidinae (Pridgeon *et al.* 2009), aparece como irmão das Stanhopeinae. Com a inclusão de *Braemia* na análise (*trnL-F*) Stanhopeinae torna-se parafilética. De acordo com a classificação de Dressler (1993), a subtribo Stanhopeinae forma um clado monofilético dentro da tribo Maxillarieae e é caracterizada por hábito epífita, velame do tipo *Cymbidium*, folhas terminais e plicadas, inflorescência lateral com flores frequentemente pendentes, duas polínias com um estipe proeminente e estigma inteiro. De acordo com Dressler (1993) os gêneros que compõem Stanhopeinae são: *Acineta*, *Braemia*, *Cirrhaea*, *Coeliopsis*, *Coryanthes*, *Embreea*, *Gongora*, *Houlletia*, *Horichia*, *Kegeliella*, *Lacaena*, *Lueddemannia*, *Lycomormium*, *Paphinia*, *Peristeria*, *Polycycnis*, *Schlimia*, *Sievekingia*, *Soterosanthus*, *Stanhopea*, *Trevoria* e *Vasquezziella*. Em uma classificação mais recente para o grupo (Pridgeon *et al.* 2009) os gêneros *Coeliopsis*, *Peristeria* e *Lycomormium* foram segregados para uma nova subtribo, Coeliopsidinae. Essa subtribo é

fortemente sustentada como grupo irmão de Stanhopeinae e foi criada baseada em sinapomorfias como pseudobulbos com 3-4 folhas, raízes com tricomas proeminentes, viscidio esclerificado com estipe curto e sementes normalmente do tipo “balão” (Whitten *et al.* 2000). Geralmente as flores de Coeliopsidinae são carnosas e globosas e têm sépalas e pétalas rígidas e coluna com um pé proeminente, enquanto as flores de Stanhopeinae geralmente possuem sépalas e pétalas mais finas e flexíveis e a coluna não possui um pé na base. Essas duas subtribos (Coeliopsidinae + Stanhopeinae) formam o grupo irmão de Maxillariinae (Pridgeon *et al.* 2009). Para Stanhopeinae, *Braemia vittata* é grupo irmão de todos os gêneros da subtribo. *Paphinia* é monofilético e irmão do clado *Houlletia*, *Trevoria* e *Schlimmia*. *Acineta*, *Lueddemannia*, *Lacaena* e *Vasqueziella*. *Polycycnis*, *Soterosanthus* e *Kegeliella* formam um grupo parafilético (Pridgeon *et al.* 2009).

Todas as regiões de DNA analisadas para Stanhopeinae forneceram árvores bem sustentadas, com exceção da região *trnL-F* isolada, que apresentou politomias e clados pouco sustentados. *Cirrhaea* é monofilético, formando um clado muito bem sustentado em todas as árvores filogenéticas analisadas. O gênero *Cirrhaea* é caracterizado por seus pseudobulbos unifoliados, pelas folhas plicadas e longo-pseudopicionadas, pelas inflorescências laterais e pendentes com flores efêmeras com labelo e coluna eretos, e com labelo 3-lobado e não dividido em hipoquílio, mesoquílio e epiquílio (Pridgeon *et al.* 2009; Capítulo 1). *Cirrhaea* forma um clado com *Gongora*, corroborando os dados previamente publicados por Whitten *et al.* (2000). Morfologicamente, ambos os gêneros apresentam características vegetativas muito semelhantes, como formato de pseudobulbo e folhas. No entanto, as flores são facilmente distinguidas. Em *Cirrhaea* o labelo é ereto e trilobado, enquanto em *Gongora* o labelo fica em uma posição horizontal e é claramente dividido em hipoquílio, mesoquílio e epiquílio. O mesoquílio do labelo de *Gongora* possui projeções laterais, assim como ocorre em *Stanhopea* (veja Dressler 1993; Pansarin & Amaral 2009; Pridgeon *et al.* 2009).

O gênero *Stanhopea*, para a maioria das regiões estudadas, aparece como um clado muito bem sustentado (acima de 90% de Bootstrap e Jackknife), porém o grupo-irmão desse gênero varia de acordo com a região analisada. Para ITS *Embreea* aparece como grupo-irmão de *Stanhopea*. Analisando essa mesma região, Whitten *et al.* (2000) encontraram como grupo irmão de *Stanhopea* o clado formado por *Sievekingia* e *Coryanthes*. Nas análises de *trnL-F* o gênero *Stanhopea* forma um clado monofilético e irmão de *Sievekingia*. Esse resultado é diferente do

encontrado por Whitten *et al.* (2000) para esse mesma região (*trnL-F*), que registrou *Stanhopea* como parafilético, formando um clado com *Sievekingia*, *Embreea* e *Coryanthes*. As análises de *matK* realizadas aqui mostram que *Stanhopea* é um gênero parafilético, pois está em um clado que inclui membros de *Sievekingia*, tendo como grupo-irmão do clado o gênero *Coryanthes*. Whitten *et al.* (2000), obtiveram resultado semelhante para a região *matK*, porém, *Embreea* apareceu como grupo irmão do clado formado por *Stanhopea* e *Sievekingia*. Na árvore de consenso entre as três regiões do DNA estudadas, *Stanhopea* também aparece como um clado monofilético, tendo como grupo-irmão o clado que inclui os gêneros *Coryanthes*, *Sievekingia* e *Embreea*. Resultado semelhante foi encontrado por Whitten *et al.* (2000), porém tendo como grupo-irmão o clado formado por *Coryanthes* e *Embreea*.

De acordo com Michel-Salzat *et al.* (2004), a filogenia para a tribo Euglossini possui alta resolução e é bem sustentada, mas apenas algumas poucas espécies que atuam como polinizadores de Stanhopeinae foram incluídas em suas análises. Embora apenas algumas das espécies de polinizadores tenham sido incluídas na filogenia de euglossine, nossos dados mostram claramente que não há uma relação correspondente e específica entre plantas e polinizadores. Uma única espécie de abelha pode polinizar duas ou mais espécies de Stanhopeinae com composições químicas de fragrância diferentes, e uma única espécie de orquídea é polinizada por mais de uma espécie de abelha. Os dados obtidos aqui, portanto, diferem dos apresentados por Williams & Whitten (1983), que mostram alta especificidade nas relações entre espécies de orquídeas e abelhas Euglossini, e afirmam que essa especificidade é baseada em diferentes combinações dos compostos que compõem as fragrâncias florais. Dessa forma, rejeitamos a hipótese de há uma relação correspondente entre evolução de Stanhopeinae e Euglossini.

De acordo com Cozzolino & Widmer (2005) a diversidade floral das orquídeas tem sido atribuída à complexa interação com seus polinizadores, e a especificidade dos polinizadores tem sido considerada como o principal mecanismo de isolamento reprodutivo pré-zigótico entre as espécies de orquídeas (Gill 1989, van der Pijl & Dodson 1966, Dressler 1993). Com base nos dados disponíveis na literatura, é estimado que entre 60-70% das orquídeas possuem uma única espécie de polinizador (Tremblay 1992, Tremblay *et al.* 2005). Entretanto, van der Cingel (1995), através de uma compilação de dados sobre polinização de orquídeas européias, constatou que

essas relações espécie-específicas entre flores e polinizadores ocorrem em poucos grupos, como em *Ophrys*, que é um gênero polinizado através de mecanismos de engano sexual.

Diferentemente do encontrado por Cozzolino *et al.* (2001), que verificaram a evolução de flores de engano para flores com recurso em Orchidinae, para a subtribo Stanhopeinae não houve variação do tipo de recurso floral oferecido aos polinizadores (fragrância), nem a perda ou aquisição de outros recursos. Dessa forma, as espécies de Stanhopeinae dependem exclusivamente dos machos de abelhas Euglossini para a polinização, enquanto as abelhas possuem outras fontes para a aquisição das fragrâncias. Um estudo realizado por Pemberton & Wheeler (2006) demonstrou que uma espécie de Euglossini, *Euglossa viridissima*, colonizou regiões da Flórida onde não ocorrem orquídeas que oferecem fragrância como recurso, e coletam os odores de plantas de outras famílias, como Acanthaceae, Apocynaceae, Bignoniaceae e Fabaceae. Esse fato reforça a idéia de que as abelhas podem forragear e coletar fragrâncias com composição semelhante à das orquídeas em outras plantas e que não dependem exclusivamente das orquídeas para constituir seus “buquês” de odores. Portanto, esses fatos evidenciam que as relações entre Stanhopeinae e Euglossini não ocorreram de forma estrita, sendo uma dependência unilateral por parte das plantas, não representando um mecanismo de co-evolução entre ambos os grupos como tem sido atribuído para figos e vespas do figo (Herre 1999) e *Yucca* e mariposas (Pellmyr 2003).

A interação entre figos (*Ficus*: Moraceae) e suas vespas polinizadoras (Agaonidae, Chalcidoidea) representa o mais especializado caso de mutualismo e co-dependência conhecido, no qual as espécies hospedeiras de figos são polinizadas por espécies específicas de vespas (Herre 1999). Um estudo realizado por Machado *et al* (2010), demonstra que há uma relação correspondente entre as filogenias das plantas e das vespas. O gênero *Tetrapus*, que poliniza de forma passiva as flores das figueiras, aparece como o polinizador ancestral entre as vespas, e está relacionado com o subgênero monóico e neotropical *Pharmacosycea*, que é o grupo mais basal na filogenia dos figos. Outro exemplo de possível co-evolução amplamente conhecido ocorre entre *Yucca* (Agavaceae) e suas mariposas polinizadoras (Lepidoptera, Prodoxidae), na qual as mariposas adultas ovipõem nos ovários das flores de yucca. Essas mariposas polinizam as flores e sua prole se alimenta das sementes em desenvolvimento. No entanto, as análises das relações entre essas plantas e seus polinizadores ainda são preliminares, já que a filogenia das espécies de

yucca é incompleta e pouco resolvida, assim como a filogenia das mariposas, que apresenta muitas politomias, inviabilizando as análises de relações correspondentes entre os dois grupos (Pellmyr 2003).

Referências Bibliográficas

- Ackerman, J.D. 1983. Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee interaction. *Biological Journal of the Linnean Society* 20:301-314.
- Allen, P.A. 1952. The swan orchids, a revision of the genus *Cycnoches*. *Orchid Journal* 1: 226.
- Allen, P.A. 1954. Pollination in *Gongora maculata*. *Ceiba* 4: 121-124.
- Braga P.I.S. 1977. Aspectos biológicos das Orchidaceae de uma campina da Amazônia Central. *Acta Amazonica (Supl.)* 7: 1-89.
- Chase, M.W. & Hills, H.M. 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40: 215-220.
- Cozzolino, S. & Widmer, A. 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution* 20: 487-494.
- Cozzolino, S.; Aceto, S.; Caputo, P.; Widmer, A. & Dafni, A. 2001. Speciation processes in eastern Mediterranean *Orchis* s.l. species: molecular evidence and the role of pollination biology. *Israel Journal of Plant Sciences* 49: 91-103.
- Dodson, C. 1962. The importance of pollination in the evolution of the orchids of Tropical America. *American Orchid Society Bulletin* 31: 525-554.
- Dodson, C.H. 1965a. Agentes de Polinización y su Influencia en Sobre la Evolución de la familia Orquidacea. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Instituto General de Investigaciones, Iquitos, Perú. 128 pp.
- Dodson, C.H. 1965b. Studies in orchid pollination: The genus *Coryanthes*. *American Orchid Society Bulletin* 34: 680-687.
- Dodson, C.H. 1966. Ethology of some bees of the tribe Euglossini (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Kansas Entomological Society* 39: 607-629.

- Dodson, C.H. 1967. Relationships between pollinators and orchid flowers. *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica (Zool.)* 5: 1-72.
- Dodson, C.H. 1975a. Coevolution of orchids and bees. *In* Gilbert, L.E. and Raven, P.H. (eds.) *Coevolution of Animals and Plants*, University of Texas Press, Austin. pp. 91-99.
- Dodson, C.H. 1975b. Orchids of Ecuador. *Stanhopea*. *Selbyana* 1:114-129.
- Dodson, C.H. 1975c. Clarification of some nomenclature in the genus *Stanhopea* (Orchidaceae). *Selbyana* 1: 46:55.
- Dodson, C.H. & Frymire, G.P. 1961. Preliminary studies in the genus *Stanhopea*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 48: 137-172.
- Dodson, C.H. & Hills, H.G. 1966. Gas Chromatography of Orchid Fragrances. *American Orchid Society Bulletin* 35: 720-725.
- Dodson, C.H.; Dressler, R.L.; Hills, H.G.; Adams, R.M. & Williams, N.H. 1969. Biologically Active Compounds in Orchid Fragrances. *Science* 164: 1243-1249.
- Dodson, C.H.; Williams, N.H. & Whitten, W.M. 1989. A new species of *Gongora* (Orchidaceae) from Ecuador. *Lindleyana* 1: 30-32.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.S. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- Dressler, R.L. 1966. Some observation on *Gongora*. *Orchid Digest* 30: 220-223.
- Dressler, R.L. 1967. Why do euglossine bees visit orchid flowers? *Atas do Simposio sobre a Biota Amazonica* 5: 171-180.
- Dressler, R.L. 1968a. Observations on orchids and Euglossine bees in Panama and Costa Rica. *Revista de Biologia Tropical* 15: 143-183.
- Dressler, R.L. 1968b. Pollination by euglossine bees. *Evolution* 22: 202-210.
- Dressler, R.L. 1976a. How to study orchid pollination without any Orchids. *In* Senghas, K. (ed.) *Proceedings 8th world Orchid Conference, Frankfur, Germany*. pp. 534-537.
- Dressler, R.L. 1976b. Una *Sievekingia* Nueva de Colombia. *Orquideología* 11: 215-221.
- Dressler, R.L. 1977. El género *Polycynis* en Panamá y Costa Rica. *Orquideología* 12: 117-133.
- Dressler, R.L. 1978. New species of *Euglossa* from Mexico and central America. *Revista Biología Tropical* 26: 167-185.
- Dressler, R.L. 1979a. Una *Sievekingia* llamativa de Panamá. *Orquideología* 13: 221-227.

- Dressler, R.L. 1979b. *Eulaema bombiformis*, *E. meriana*, and mullerian mimicry in related species (Hymenoptera: Apidae). *Biotropica* 11: 144-151.
- Dressler, R.L. 1982a. New species of *Euglossa*. II. (Hymenoptera: Apidae). *Revista Biología Tropical* 30: 121-129.
- Dressler, R.L. 1982b. New species of *Euglossa*. III. The *Bursigera* species group (Hymenoptera: Apidae). *Revista Biología Tropical* 30: 131-140.
- Dressler, R.L. 1982c. New species of *Euglossa*. IV. The *cordata* and *purpurea* species groups (Hymenoptera: Apidae). *Revista Biología Tropical* 30: 141-150.
- Dressler, R.L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ducke, A. 1902. As especies paraenses do gênero *Euglossa* Latr. *Boletim do Museu Paraense* 3: 561-577.
- Farris, J.S.; Källersjö, M.; Kluge, A.G.; Bult, C. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315–320.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fitch, W.M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.
- Friese, K. 1899. Monographie der Bienengattung *Euglossa*. *Termesztudományi Fuzetek* 22: 136.
- Gerlach, G. & Dressler, R.L. 2003. Stanhopeinae Mesoamericanae I. *Lankersteriana* 8:23-30.
- Gill, D.E. 1989. Fruiting failure, pollination inefficiency, and speciation in orchids. *In* *Speciation and its Consequences* (Otte, D. & Endler, J.A., eds), Academy of Natural Sciences Publications pp. 458–481.
- González, J.M. 1998. Associated plants and distribution of the orchid bee genus *Eulaema* (Apidae: Bombinae: Euglossini) in Venezuela. *Boletim del Centro de Investigaciones Biológicas Universidad del Zulia* 32: 203-212.
- González, J.M. & Gaiani, M.A. 1989. New species of *Eufriesea* (Hymenoptera: Apidae) from Venezuela. *Journal of Tropical Biology* 37: 149-152.
- Govaerts, R. 1999. *World Checklist of Seed Plants* 3(1, 2a & 2b): 1-1532. Continental Publishing, Deurne.

- Govaerts, R. 2003. World Checklist of Monocotyledons Database in ACCESS: 1-71827. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew.
- Herre, E. A. 1999. Laws governing species interactions? Encouragement and caution from figs and their associates. In *Levels of selection in evolution* (ed. L. Keller), Princeton University Press. pp. 209-237.
- Hoehne, F.C. 1933. Contribuição para o conhecimento do gênero *Catasetum* especialmente hermaphroditismo e trimorfismo das suas flores. Boletim de Agricultura do Estado de São Paulo 1: 133-196.
- Johnson, L.A. & Soltis, D.E. 1995. Phylogenetic inference in Saxifragaceae *sensu stricto* and *Gilia* (Polemoniaceae) using *matK* sequences. Annals of the Missouri Botanical Garden 82: 149-175.
- Johnson, S.D.; Linder, H.P. & Steiner, K.E. 1998. Phylogeny and radiation of pollination systems in *Disa* (Orchidaceae). American Journal of Botany 85: 402-411.
- Kimsey, L.S. 1982. Systematics of Bees of the Genus *Eufriesea* (Hymenoptera, Apidae). University of California Publications, Entomology, Volume 95.
- Machado, C.A.; Jusselin, E.; Kjellberg, F.; Compton, S.G. & Herre, E.A. 2010. Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of fig-pollinating wasps. Proceedings of the Royal Society B – Biological Science 268: 685-694.
- Martini, P.; Schlindwein, C. & Montenegro, A. 2003. Plooination flower longevity and reproductive biology of *Gongora quinquenervis* Ruiz & Pavón (Orchidaceae) in an Atlantic Forest fragment of Pernambuco, Brazil. Plant Biology 5: 495-503.
- Martins, E.P. 2001. COMPARE 4.4. Computer programs for the statistical analysis of comparative data. Department of Biology, Indiana University, Bloomington.
- Michel-Salzat, A.; Cameron, S.A. & Oliveira, M.L. 2004. Phylogeny of the orchid bees (Hymenoptera: Apinae: Euglossini): DNA and morphology yield equivalent patterns. Molecular Phylogenetics and Evolution 32: 309-323.
- Moure, J.S. 1965. Some new species of Euglossine bees (Hymenoptera: Apidae). Journal of the Kansas Entomological Society 38: 266-277.
- Moure, J.S. 1968. Especies novas de *Euglossa* da América central (Hymenoptera, Apidae). Boletim da Universidade do Paraná 3: 13-64.

- Palumbi, S.R. 1996. Nucleic acids II. The polymerase chain reaction. *In* D.M. Hillis, C. Moritz & B.K. Mable (eds.) *Molecular Systematics*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Pansarin, E.R.; Bittrich, V. & Amaral, M.C.E.. 2006. At daybreak – reproductive biology and isolating mechanisms of *Cirrhaea dependens* (Orchidaceae). *Plant Biology* 8: 494-502.
- Pansarin, E.R. & Amaral, M.C.E. 2009. Reproductive biology and pollination of southeastern Brazilian *Stanhopea* Frost ex Hook. (Orchidaceae). *Flora (Jena)* 204: 238-249.
- Pearson, D.L. & Dressler R.L. 1985. Two-year study of male orchid bee (Hymenoptera: Apidae: Euglossini) attraction to chemical baits in lowland southeastern Perú. *Journal of Tropical Ecology* 1: 37-54.
- Pellmyr, O. 2003. Yuccas, yuccas moths, and coevolution: a review. *Annals of Missouri Botanical Garden* 90: 35–55.
- Pemberton, R.W. & Wheeler, G.S. 2006. Orchid bees don't need orchids: evidence from the naturalization of an orchid bee in Florida. *Ecology* 87: 1995-2001.
- Peruquetti, R.C.; Campos, L.A.O.; Coelho, C.D.P.; Abrantes, C.V.M. & Lisboa, L.C.O. 1999. Abelhas Euglossini (Apidae) de áreas de Mata Atlântica: abundância, riqueza e aspectos biológicos. *Revista Brasileira de Zoologia* 16: 101-118.
- Pridgeon, A.M.; Cribb, P.; Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. (eds.) 2009. *Genera Orchidacearum*. v. 5, Oxford University Press: New York.
- Ramírez, S.; Dressler, R.L. & Ospina, M. 2002. Abejas euglosinas (Hymenoptera: Apidae) de la Región Neotropical: Listado de especies con notas sobre su biología. *Biota Colombiana* 3: 7-118.
- Romero, G.A. & Carnevali, G. 1989. Novelty in the orchid flora of southern Venezuela. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76: 454-461.
- Roubik, D.W. & Ackerman, J.D. 1987. Long-term ecology of euglossine orchid bees (Apidae: Euglossini) in Panama. *Oecologia* 73: 321-333.
- Schmid, R. 1969. The pollination of *Polycynis barbata* (Stanhopeinae) by the euglossine bee *Eulaema speciosa*. *Orchid Digest* 33: 220-223.
- Sun, Y; Skinner, D.Z.; Liang, G.H. & Hulbert, S.H. 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 26-32.

- Swofford, D.L. 2001. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony version 4.b.8. Computer program distributed by Sinauer Associates, Inc.
- Taberlet, P.; Gielly, L.; Pautou, G. & Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17, 1105-1109.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The ClustalX- Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882.
- Tremblay, R.L. 1992. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. *Canadian Journal of Botany* 70: 642–650.
- Tremblay, R.L.; Ackerman, J.D.; Zimmerman, J.K. & Calvo, R.N. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequence. A spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 1–54
- van der Cingel, N.A. 1995. An atlas of orchid pollination. European orchids. Rotterdam: Balkema Publishers.
- van der Pijl, L. & Dodson, C.H. 1966. *Orchid Flowers, Their Pollination and Evolution*, University of Miami Press.
- Vogel, S. 1963a. Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung: Über Bau und Funktion der Osmophoren. Akademie der Wissenschaften unter der Literatur, Mainz. Abh. Math.-Naturwiss. Klasse, Jahrgang 1962: 599-763.
- Vogel, S. 1963b. Das sexuelle Anlockungsprinzip der Catasetinen- und Stanhopeen-Blüten und die wahre Funktion ihres sogenannten Futtergewebes. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 100: 308-337.
- Weiblen, G.D. 2004. Correlated Evolution in Fig Pollination. *Systematic Biology* 53: 128-139.
- Whitten, W.M. & Williams, N.H. 1992. Floral fragrances of *Stanhopea* (Orchidaceae). *Lindleyana* 7: 130-153.
- Whitten, W.M.; Williams, N.H. & Chase, M.W. 2000. Subtribal and generic relationship of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. *American Journal of Botany* 87: 1842-1856.
- Williams, N.H. 1982. The biology of orchids and euglossine bees. *In* *Orchid biology and perspectives* J.Arditti (ed.), Ithaca: Cornell University Press, pp. 119-171.

- Williams, N.H. & Whitten, W.M. 1983. Orchid floral fragrances and male euglossine bees: Methods and advances in the last sesquidecade. *The Biological Bulletin* 164: 355-395.
- Williams, N.H. & Whitten, W.M. 1988. *Stanhopea panamensis*, a new species from central Panamá (Orchidaceae). *Lindleyana* 3: 9-11.

Tabela 1: Lista das espécies de Stanhopeinae (*sensu* Pridgeon *et al.* 2009) utilizadas nos estudos moleculares, com seus respectivos vouchers, herbários e números de acesso para o GenBank.

Espécie	Voucher	Herbário	ITS	<i>matK</i>	<i>trnL-F</i>
<i>Acineta superba</i> Rchb.	Gerlach 03/1716	M			
<i>Braemia vittata</i> (Lindl.) Jenny	Chase 84748	FLAS	AF239380	AF239476	AF239572
<i>Cirrhaea dependens</i> (Lodd.) Loudon	Whitten 93152	FLAS	AF239381	AF239477	AF239573
<i>Cirrhaea dependens</i> (Lodd.) Loudon	Pansarin ER 95, 01/1990, Ubatuba-SP	UEC			
<i>Cirrhaea dependens</i> (Lodd.) Loudon	Pansarin ER & Mickeliunas 926, 12/2002, Serra do Japi, Jundiaí-SP	UEC			
<i>Cirrhaea dependens</i> (Lodd.) Loudon	Pansarin ER & Mickeliunas 1057, 03/2003, Nova Friburgo-RJ	UEC			
<i>Cirrhaea fuscolutea</i> Lindl.	SP 246824, planta em cultivo no IBot- SP	SP			
<i>Cirrhaea fuscolutea</i> Lindl.	Pansarin ER 717, 10/2000, Ubatuba-SP	UEC			
<i>Cirrhaea loddigesii</i> Lindl.	Pinheiro & Cunha 36, 01/2001, Ubatuba-SP	SP			
<i>Cirrhaea longiracemosa</i> Hoehne	SP 24486, planta em cultivo no IBot-SP	SP			
<i>Cirrhaea longiracemosa</i> Hoehne	Gerlach 09/2135	M			
<i>Cirrhaea nasuta</i> Brade	Pansarin LM & Pansarin ER 49, 02/2009, Santa Teresa-ES	UEC			

Cont.

Espécie	Voucher	Herbário	ITS	matK	trnL-F
<i>Cirrhaea seidelii</i> Pabst	Pansarin ER, Pansarin LM & Gerlach 1320, 02/2010, Santa Teresa-ES	SPFR			
<i>Cirrhaea</i> sp.	Pansarin ER 500, 06/1999, Teresópolis- RJ	UEC			
<i>Cirrhaea</i> sp.	Faria s/n 01/2000, Domingos Martins- ES	UEC			
<i>Coryanthes elegantium</i> Linden & Rchb.f.	Whitten 87268	FLAS	AF239360	AF239456	AF239552
<i>Coryanthes macrantha</i> (Hook.) Hook.	Whitten 95018	FLAS	AF239359	AF239455	AF239551
<i>Coryanthes speciosa</i> (Hook.) C.Morren	Gerlach 09/2718	M			
<i>Coryanthes trifoliata</i> C.Schweinf.	Gerlach 09/2761	M			
<i>Cyrtopodium punctatum</i> (L.) Lindl.	Chase O-126	K	AF239412	AF239508	AF239604
<i>Dressleria dilecta</i> (Rchb.f.) Dodson	Whitten F1046	FLAS	AF239411	AF239507	AF239603
<i>Embreea rodigasiana</i> (Claes ex Cogn.) Dodson	Whitten 90105	FLAS	AF239358	AF239454	AF239550
<i>Eulophia guineensis</i> Lindl.	Whitten s.n.	FLAS	AF239413	AF239509	AF239605
<i>Gongora armeniaca</i> (Lindl. & Paxton) Rchb.f.	Whitten F1636 FP 4511 (<i>matK</i>)	FLAS	AF239386	EU214355	AF239578
<i>Gongora bufonia</i> Lindl.	Pansarin LM & Pansarin ER 50, 12/2009, Ubatuba-SP	UEC			

Cont.

Espécie	Voucher	Herbário	ITS	matK	trnL-F
<i>Gongora escobariana</i> Whitten	Whitten 95023	FLAS	AF239383	AF239479	AF239575
<i>Gongora galeata</i> (Lindl.) Rchb.f.			-	EF079251	-
<i>Gongora horichiana</i> Fowlie			-	EU214356	-
<i>Grammatophyllum speciosum</i> Blume	Chase 89103	K	AF239414	AF239510	AF239606
<i>Horichia dressleri</i> Jenny	Whitten 93151	FLAS	AF239362	AF239458)	AF239554
<i>Houlletia sanderi</i> Rolfe	Whitten 93079	FLAS	AF239371	AF239467	AF239563
<i>Houlletia tigrina</i> Linden ex Lindl.	Whitten 91354	FLAS	AF239370	AF239466	AF239562
<i>Kegeliella atropilosa</i> L.O.Williams & A.H.Heller	Gerlach 08/0896	M			
<i>Kegeliella kupperi</i> Mansf.	Whitten F167	FLAS	AF239364	AF239460	AF239556
<i>Lacaena spectabilis</i> Rchb.f.	Gerlach 03/2470	M			
<i>Lueddemmania pescatorei</i> (Lindl.) Linden & Rchb.f.	Gerlach 92/3661	M			
<i>Paphinia cristata</i> Lindl.	Gerlach 1285	M	EU441207	-	-
<i>Paphinia neudeckeri</i> Jenny	Gerlach 09/1053	M			
<i>Polycynis barbata</i> Rchb.f.	FP 5154		-	EU214431	-
<i>Polycynis gratiosa</i> Endres & Rchb.f.	Whitten 93178	FLAS	AF239373	AF239469	AF239565
<i>Schlimmia stevensonii</i> Dodson	Whitten 94107	FLAS	AF239367	AF239463	AF239559

Cont.

Espécie	Voucher	Herbário	ITS	matK	trnL-F
<i>Sievekingia butcheri</i> Dressler	Gerlach 04/2513	M			
<i>Sievekingia hirtzii</i> Waldv.	Gerlach 09/1054	M			
<i>Sievekingia reichenbachiana</i> Rolfe			-	EF079234	-
<i>Sievekingia suavis</i> Rchb.f.	Gerlach 99/0838	M			
<i>Sotosanthus shephardii</i> (Rolfe) Jenny	C.H. Dodson 18580-3	FLAS	AF239361	AF239457	AF239553
<i>Stanhopea anfracta</i> Rolfe	Whitten 87228	FLAS	AF239354	AF239450	AF239546
<i>Stanhopea annulata</i> Mansf.	Whitten F1514	FLAS	AF239348	AF239444	AF239540
<i>Stanhopea cirrhata</i> Lindl.	Whitten F1296	FLAS	AF239368	AF239464	AF239560
<i>Stanhopea connata</i> Klotzsch	Gerlach 95/3605	M			
<i>Stanhopea costaricensis</i> Rchb.f.	Gerlach 04/0435	M			
<i>Stanhopea ecornuta</i> Lem.	Whitten 90026	FLAS	AF239349	AF239445	AF239541
<i>Stanhopea embreei</i> Dodson	Gerlach 06/1532	M			
<i>Stanhopea graveolens</i> Lindl.	Gerlach 02/2293	M			
<i>Stanhopea insignis</i> J.Frost ex Hook.	Pansarin ER 212, 01/2000, Ubatuba-SP	UEC			
<i>Stanhopea jenischiana</i> Kramer ex Rchb.f.			FJ565637	FJ565129	-
<i>Stanhopea lietzei</i> Schltr.	Pansarin ER & Mickeliunas 1108, 01/2004, Serra do Japi, Jundiáí-SP	UEC			
<i>Stanhopea pulla</i> Rchb.f.	Whitten 93117	FLAS	AF239355	AF239451	AF239547
<i>Stanhopea radiosa</i> Lem.	Gerlach 99/3311	M			

Cont.

Espécie	Voucher	Herbário	ITS	<i>matK</i>	<i>trnL-F</i>
<i>Stanhopea saccata</i> Bateman	Whitten F1004	FLAS	AF239351	AF239447	AF239543
<i>Stanhopea tigrina</i> Bateman ex Lindl.	Whitten F1545	FLAS	AF239352	AF239448	AF239544
<i>Stanhopea wardii</i> Bateman ex Lindl.	Whitten F1024	FLAS	AF239350	AF239446	AF239542
<i>Trevoria escobariana</i> Garay			EF079428	EF079235	-
<i>Trevoria zahlbruckneriana</i> (Schltr.) Garay	Dodson 17309	QCNE	AF239365	AF239461	AF239557
<i>Vasqueziella boliviana</i> Dodson	R. Vasquez s.n.	FLAS	AF239377	AF239473	AF239569

Tabela 2: Espécies de Stanhopeinae e seus possíveis polinizadores, considerando visitas observadas ou polínias aderidas ao corpo.

Stanhopeinae	Polinizadores	Referências
<i>Acineta barkeri</i> Lindl.	<i>Eufriesea concava</i> (Friese, 1899)	van der Pijl & Dodson 1966, Dodson 1967
<i>Acineta chrysantha</i> Lindl. & Paxton	<i>Eufriesea concava</i> (Friese, 1899)	Dodson 1965a
<i>Acineta superba</i> Rchb.	<i>Eufriesea concava</i> (Friese, 1899)	Dressler 1968a, Dodson 1967
	<i>Eufriesea venezolana</i> (Schrottky, 1913)	Ramirez <i>et al.</i> 2002
<i>Cirrhaea dependens</i> (Lodd.) Loudon	<i>Euglossa viridis</i> (Perty, 1833)	Pansarin <i>et al.</i> 2006
	<i>Euglossa cordata</i> (Linnaeus, 1758)	Pansarin <i>et al.</i> in prep.
<i>Cirrhaea fuscolutea</i> Lindl.	<i>Euglossa cordata</i> (Linnaeus, 1758)	Pansarin <i>et al.</i> in prep.
	<i>Euglossa chalybeata</i> (Friese, 1925)	
	<i>Eulaema nigrita</i> (Lepeletier, 1841)	
<i>Cirrhaea loddigesii</i> Lindl.	<i>Euglossa cordata</i> (Linnaeus, 1758)	Pansarin <i>et al.</i> in prep.
	<i>Eufriesea venusta</i> (Moure, 1965)	Kimsey 1982
<i>Cirrhaea longiracemosa</i> Hoehne	<i>Eufriesea violacea</i> (Blanchard, 1840)	Pansarin <i>et al.</i> in prep.
	<i>Euglossa chalybeata</i> (Friese, 1925)	
<i>Cirrhaea nasuta</i> Brade	<i>Eulaema nigrita</i> (Lepeletier, 1841)	Pansarin <i>et al.</i> in prep.
	<i>Euglossa annectans</i> (Dressler, 1982)	
<i>Cirrhaea seidelii</i> Pabst	<i>Euglossa aff. cordata</i>	Pansarin <i>et al.</i> in prep.
<i>Cirrhaea</i> sp.	<i>Eufriesea violacea</i> (Blanchard, 1840)	Hoehne 1933
	<i>Euglossa annectans</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982a

	<i>Euglossa mandibularis</i> (Friese, 1899)	van der Pijl & Dodson 1966
<i>Coryanthes bicalcarata</i> Schltr.	<i>Euglossa cordata</i> (Linnaeus, 1758)	Dodson 1965b
<i>Coryanthes bungerothii</i> Rolfe	<i>Eulaema bombiformis</i> (Packard, 1869)	Ramirez <i>et al.</i> 2002
<i>Coryanthes cataniapoensis</i> G.A.Romero & Carnevali	<i>Eulaema cingulata</i> (Fabricius, 1804)	Romero & Carnevali 1989
	<i>Eulaema meriana</i> (Olivier, 1789)	Romero & Carnevali 1989
<i>Coryanthes elegantium</i> Linden & Rchb.f.	<i>Euglossa hemichlora</i> (Cockerell, 1917)	Dodson 1965a,b
<i>Coryanthes kaiseriana</i> G.Gerlach	<i>Euglossa allenii</i> (Moure, 1968)	Gerlach & Dressler 2003
	<i>Euglossa flammea</i> (Moure, 1969)	
<i>Coryanthes leucocorys</i> Rolfe	<i>Eulaema meriana</i> (Olivier, 1789)	Dodson 1965b
<i>Coryanthes macrantha</i> Hook.	<i>Eulaema cingulata</i> (Fabricius, 1804)	Dodson 1965a, b
	<i>Eulaema basalis</i> (Friese, 1898)	van der Pijl & Dodson 1966
	<i>Eufriesea limbata</i> (Mocsary, 1897)	González & Gaiani 1989
	<i>Euglossa cordata</i> (Linnaeus, 1758)	Dodson 1962
	<i>Eulaema peruviana</i> (Friese, 1903)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Coryanthes maculata</i> Hook.	<i>Euglossa azureoviridis</i> (Friese, 1930)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa despecta</i> (Moure, 1968)	Ackerman 1983
	<i>Euglossa tridentata</i> (Moure, 1970)	Ackerman 1983
<i>Coryanthes rodriguezii</i> Hoehne	<i>Eufriesea superba</i> (Hoffmannsegg, 1817)	Dodson 1965a, b
<i>Coryanthes speciosa</i> (Hook.) C.Morren	<i>Euglossa cordata</i> (Linnaeus, 1758)	Allen 1952, 1954
	<i>Euglossa alleni</i> (Moure, 1968)	Dodson 1967
	<i>Euglossa variabilis</i> (Friese, 1899)	Ramírez <i>et al.</i> 2002

<i>Coryanthes trifoliata</i> C.Schweinf.	<i>Euglossa ignita</i> (Smith, 1874)	Dodson 1965a, b
	<i>Euglossa mixta</i> (Friese, 1899)	van der Pijl & Dodson 1966
	<i>Euglossa cognata</i> (Moure, 1970)	Ackerman 1983
<i>Coryanthes</i> sp.	<i>Eufriesea purpurata</i> (Mocsary, 1896)	Dressler 1967
	<i>Euglossa alleni</i> (Moure, 1968)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa amazonica</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982c
	<i>Euglossa dressleri</i> (Moure, 1968)	Moure 1968
	<i>Euglossa gaianii</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982c
	<i>Euglossa gorgonensis</i> (Chessman, 1929)	Roubik & Ackerman 1987
	<i>Euglossa hemichlora</i> (Cockerell, 1917)	Roubik & Ackerman 1987
	<i>Euglossa modestior</i> (Dressler, 1982)	Peruquetti <i>et al.</i> 1999
	<i>Euglossa retroviridis</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982a
	<i>Euglossa securigera</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982c
	<i>Euglossa cybelia</i> (Moure, 1968)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa maculilabris</i> (Moure, 1968)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Euglossa towsendi</i> (Cockerell, 1904)	Ramírez <i>et al.</i> 2002	
<i>Gongora armeniaca</i> Rchb.f.	<i>Euglossa viridissima</i> (Friese, 1899)	Dodson 1965a
	<i>Euglossa oleolucens</i> (Dressler, 1978)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Eulaema bombiformis</i> (Packard, 1869)	González 1998
<i>Gongora armeniaca</i> var. <i>bicornuta</i> C.Schweinf. & P.H.Allen	<i>Euglossa dodsoni</i> (Moure, 1965)	Dodson 1965a

<i>Gongora aromatica</i> Rchb.f.	<i>Euglossa viridis</i> (Perty, 1833)	Ramirez <i>et al.</i> 2002
<i>Gongora atropurpurea</i> Hook.	<i>Eulaema cingulata</i> (Fabricius, 1804)	Dodson 1966
<i>Gongora bufonia</i> Lindl.	<i>Eufriesea violácea</i> (Blanchard, 1840)	Hoehne 1933
<i>Gongora galeata</i> Rchb.f.	<i>Euglossa vilosa</i> (Moure, 1968)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Gongora galeottiana</i> A.Rich. & Galeotti	<i>Euglossa viridissima</i> (Friese, 1899)	Dressler 1966
<i>Gongora gibba</i> Dressler	<i>Euglossa asarophora</i> (Moure & Sakagami, 1969)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa gorgonensis</i> (Cheesman, 1929)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Gongora grossa</i> Rchb.f.	<i>Euglossa hemichlora</i> (Cockerell, 1917)	Dodson 1962
	<i>Euglossa nigropilosa</i> (Moure, 1965)	Dodson 1965a
	<i>Euglossa gibbosa</i> (Dressler, 1982)	Dodson <i>et al.</i> 1989
<i>Gongora hirtzii</i> Dodson & N.H. Williams	<i>Euglossa dressleri</i> (Moure, 1968)	Dodson <i>et al.</i> 1989
<i>Gongora horichiana</i> Fowlie	<i>Euglossa vilosa</i> (Moure, 1968)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Gongora maculata</i> Lindl.	<i>Euglossa augaspis</i> (Dressler, 1982)	Dodson 1966
	<i>Euglossa cordata</i> (Linnaeus, 1758)	
	<i>Euglossa imperialis</i> (Cockerell, 1922)	Allen 1954
	<i>Euglossa viridissima</i> (Friese, 1899)	Dodson 1965a
<i>Gongora quinquenervis</i> Ruiz & Pav.	<i>Euglossa cordata</i> (Linnaeus, 1758)	Allen 1954, 1952, Dressler 1966,
	<i>Euglossa orichalcea</i> (Moure, 1967)	Dodson 1962
	<i>Euglossa townsendii</i> (Cockerell, 1904)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa</i> sp.	Dressler 1966
	<i>Euglossa cf. variabilis</i>	Dodson 1962

Cont.	<i>Euglossa ignita</i> (Smith, 1874)	Dressler 1968a
<i>Gongora quinquenervis</i> Ruiz & Pav.	<i>Euglossa augaspis</i> (Dressler, 1982)	Dodson 1962
	<i>Euglossa decorata</i> (Smith, 1874)	Dodson 1962
	<i>Euglossa perpulchra</i> (Moure & Schlindwein, 2002)	Dodson 1962
	<i>Euglossa allosticta</i> (Moure, 1969)	Martini <i>et al.</i> 2003
	<i>Euglossa bursigera</i> (Moure, 1970)	Ackerman 1983
	<i>Euglossa deceptrix</i> (Moure, 1968)	Ackerman 1983
	<i>Euglossa dissimula</i> (Dressler, 1978)	Williams & Whitten 1983
	<i>Euglossa dodsoni</i> (Moure, 1965)	Roubik & Ackerman 1987
	<i>Euglossa dressleri</i> (Moure, 1968)	Dodson 1967
	<i>Euglossa gibbosa</i> (Dressler, 1982)	Ackerman 1983
	<i>Euglossa gorgonensis</i> (Chessman, 1929)	Dressler 1982c
	<i>Euglossa hemichlora</i> (Cockerell, 1917)	Dodson <i>et al.</i> 1969
	<i>Euglossa heterosticta</i> (Moure, 1968)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa imperialis</i> (Cockerell, 1922)	Ackerman 1983
	<i>Euglossa mixta</i> (Friese, 1899)	Ackerman 1983
	<i>Euglossa tridentata</i> (Moure, 1970)	Ackerman 1983
	<i>Euglossa variabilis</i> (Friese, 1899)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa viridissima</i> (Friese, 1899)	Ackerman 1983
	<i>Euglossa despecta</i> (Moure, 1968)	Dodson & Hills 1966
<i>Euglossa ioprosopa</i> (Dressler, 1982)	Ramírez <i>et al.</i> 2002	

	<i>Euglossa modestior</i> (Dressler, 1982)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Gongora tricolor</i> Rchb.f.	<i>Euglossa cyanura</i> (Cockerell, 1917)	Dressler 1968a
<i>Gongora unicolor</i> Schltr.	<i>Euglossa purpurea</i> (Friese, 1899)	Dressler 1968a
<i>Gongora</i> sp.	<i>Eufriesea rufocauda</i> (Kimsey, 1977)	Kimsey 1982
	<i>Euglossa amazônica</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982c
	<i>Euglossa asarophora</i> (Moure & Sakagami, 1969)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa bursigera</i> (Moure, 1970)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa cybelia</i> (Moure, 1968)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa flammea</i> (Moure, 1969)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa gairanii</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982c
	<i>Euglossa gorgonensis</i> (Chessman, 1929)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa modestior</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982c
	<i>Euglossa parvula</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982b
	<i>Euglossa retroviridis</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982a
	<i>Euglossa viridissima</i> (Friese, 1899)	Dressler 1968a
	<i>Eufriesea anisochlora</i> (Kimsey, 1977)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Eufriesea chrysopyga</i> (Mocsary, 1898)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Eufriesea lucifera</i> (Kimsey, 1977)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa allosticta</i> (Moure, 1969)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa amazônica</i> (Dressler, 1982)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa chalybeata</i> (Friese, 1925)	Ramírez <i>et al.</i> 2002

Cont.	<i>Euglossa cognata</i> (Moure, 1970)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
Gongora sp.	<i>Euglossa deceptrix</i> (Moure, 1968)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa despecta</i> (Moure, 1968)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa hansonii</i> (Moure, 1965)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa heterosticta</i> (Moure, 1968)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa intersecta</i> (Latreille, 1938)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa nigropilosa</i> (Moure, 1965)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa piliventris</i> (Guérin, 1845)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa purpurea</i> (Friese, 1899)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa stilbonata</i> (Dressler, 1982)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Houlletia brocklehurstiana</i> Lindl.	<i>Euglossa</i> sp.	Dressler 1968a
	<i>Euglossa annectans</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982a
<i>Houlletia odoratissima</i> Linden ex Lindl. & Paxton	<i>Eufriesea lucifera</i> (Kimsey, 1977)	Kimsey 1982
	<i>Euglossa asarophora</i> (Moure & Sakagami, 1969)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa sapphirina</i> (Moure, 1968)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Eulaema speciosa</i> ((Mocsáry, 1897))	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Houlletia tigrina</i> Linden ex Lindl.	<i>Eulaema meriana</i> (Olivier, 1789)	Dressler 1979b
<i>Houlletia</i> sp.	<i>Euglossa cordata</i> (Linnaeus, 1758)	Dressler 1976a
	<i>Euglossa deceptrix</i> (Moure, 1968)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Kegeliella atopilosa</i> L.O.Williams & A.H.Heller	<i>Eufriesea concava</i> (Friese, 1899)	Dressler 1968a

<i>Kegeliella houtteana</i> (Rchb.f.) L.O. Williams	<i>Eufriesea concava</i> (Friese, 1899)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Kegeliella cf. houtteana</i>	<i>Euglossa dodsoni</i> (Moure, 1965)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Kegeliella kupperi</i> Mansf.	<i>Euglossa imperialis</i> (Cockerell, 1922)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Kegeliella</i> sp.	<i>Euglossa deceptrix</i> (Moure, 1968)	Roubik & Ackerman 1987
	<i>Euglossa dressleri</i> (Moure, 1968)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Lacaena bicolor</i> Lindl.	<i>Eufriesea caeruleascens</i> Lepeletier, 1841)	van der Pijl & Dodson 1966
<i>Lacaena spectabilis</i> Rchb.f.	<i>Euglossa</i> sp.	van der Pijl & Dodson 1966
	<i>Euglossa maculilabris</i> (Moure, 1968)	Dressler 1968a
<i>Lacaena</i> sp.	<i>Euglossa dodsoni</i> (Moure, 1965)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Paphinia clausula</i> Dressler	<i>Euglossa gorgonensis</i> (Chessman, 1929)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa hansonii</i> (Moure, 1965)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa asarophora</i> (Moure & Sakagami, 1969)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa orichalcea</i> (Moure, 1967)	Dressler 1968a
<i>Paphinia cristata</i> Lindl.	<i>Euglossa cognata</i> (Moure, 1970)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa tridentata</i> (Moure, 1970)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Paphinia herrerae</i> Dodson	<i>Euglossa charapensis</i> (Cockerell, 1917)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Paphinia subclausa</i> Dressler	<i>Euglossa asarophora</i> (Moure & Sakagami, 1969)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa gorgonensis</i> (Chessman, 1929)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa hansonii</i> (Moure, 1965)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa hemichlora</i> (Cockerell, 1917)	Dressler 1968a

<i>Paphinia</i> sp.	<i>Euglossa bidentata</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982a
	<i>Euglossa chalybeata</i> (Friese, 1925)	Pearson & Dressler 1985
	<i>Euglossa parvula</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982b
	<i>Euglossa cognata</i> (Moure, 1970)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa liopoda</i> (Dressler, 1982)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa piliventris</i> (Guérin, 1845)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Peristeria elata</i> Hook.	<i>Eufriesea concava</i> (Friese, 1899)	Dressler 1968a
<i>Peristeria pendula</i> Hook.	<i>Euglossa ignita</i> (Smith, 1874)	Dodson 1965a
	<i>Euglossa mixta</i> (Friese, 1899)	Dodson 1965a
<i>Polycynis barbata</i> Rchb.f.	<i>Eulaema polychroma</i> ((Mocsáry, 1899))	Schmid 1969
	<i>Eulaema speciosa</i> ((Mocsáry, 1897))	Schmid 1969
<i>Polycynis gratiosa</i> Endres & Rchb.f.	<i>Euglossa</i> sp.	Dressler 1968a
	<i>Eufriesea anisochlora</i> (Kimsey, 1977)	Dressler 1977
	<i>Eufriesea chrysopyga</i> (Mocsary, 1898)	Dressler 1977
	<i>Eufriesea rufocauda</i> (Kimsey, 1977)	Dressler 1977
	<i>Euglossa villosa</i> (Moure, 1968)	Dressler 1968a
<i>Polycynis muscifera</i> Rchb.f.	<i>Euglossa oleolucens</i> (Dressler, 1978)	Dressler 1978
	<i>Euglossa imperialis</i> (Cockerell, 1922)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Polycynis</i> sp.	<i>Eufriesea rufocauda</i> (Kimsey, 1977)	Kimsey 1982
	<i>Eufriesea anisochlora</i> (Kimsey, 1977)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Eufriesea chrysopyga</i> (Mocsary, 1898)	Ramírez <i>et al.</i> 2002

	<i>Euglossa deceptrix</i> (Moure, 1968)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa villosiventris</i> (Moure, 1968)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Schlimia trifida</i> Rchb.f.	<i>Eufriesea cf. purpurata</i>	van der Pijl & Dodson 1966
<i>Sievekingia butcheri</i> Dressler	<i>Euglossa cyanura</i> (Cockerell, 1917)	Dressler 1979a
	<i>Euglossa tridentata</i> (Moure, 1970)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Sievekingia fimbriata</i> Rchb.f.	<i>Euglossa</i> sp.	Dressler 1968a
	<i>Eufriesea duckei</i> (Friese, 1923)	Dressler 1976b
	<i>Eufriesea mussitans</i> (Fabricius, 1787)	Dressler 1976b
	<i>Euglossa crassipunctata</i> (Moure, 1968)	Dressler 1976b
	<i>Euglossa cybelia</i> (Moure, 1968)	Dressler 1976b
	<i>Euglossa mixta</i> (Friese, 1899)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa sapphirina</i> (Moure, 1968)	Dressler 1968a
<i>Sievekingia hirtzii</i> Waldv.	<i>Euglossa nigropilosa</i> (Moure, 1965)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Sievekingia jenmannii</i> Rchb.f.	<i>Euglossa nigropilosa</i> (Moure, 1965)	Dodson 1965a
	<i>Euglossa dodsoni</i> (Moure, 1965)	Dressler 1968a
<i>Sievekingia reichenbachiana</i> Rolfe	<i>Eufriesea surinamensis</i> (Linnaeus, 1758))	Williams 1982
<i>Sievekingia rhonhofiae</i> Mansf.	<i>Euglossa gibbosa</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982c
	<i>Euglossa hansonii</i> (Moure, 1965)	Dressler 1976b
	<i>Euglossa heterosticta</i> (Moure, 1968)	Dressler 1976b
	<i>Euglossa tridentata</i> (Moure, 1970)	Dressler 1976b
<i>Sievekingia suavis</i> Rchb.f.	<i>Euglossa bursigera</i> (Moure, 1970)	Dressler 1976b

	<i>Euglossa dodsoni</i> (Moure, 1965)	Dressler 1968a
<i>Sievekingia</i> sp.	<i>Eufriesea ornata</i> ((Mocsary, 1896))	Roubik & Ackerman 1987
	<i>Eufriesea duckei</i> (Friese, 1923)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa cybelia</i> (Moure, 1968)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Euglossa ignita</i> (Smith, 1874)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
<i>Stanhopea anfracta</i> Rolfe	<i>Euglossa viridis</i> (Perty, 1833)	Whitten & Williams 1992
<i>Stanhopea annulata</i> Mansf.	<i>Euglossa grantii</i> (Cheesman, 1929)	Dodson 1975b
<i>Stanhopea candida</i> Barb.Rodr.	<i>Euglossa ignita</i> (Smith, 1874)	Dodson 1965a
	<i>Eulaema meriana</i> (Olivier, 1789)	Dodson 1965a, Whitten & Williams 1992
	<i>Euglossa chlorosoma</i> (Cockerell, 1918)	Dodson 1975b
	<i>Eulaema mocsaryi</i> (Friese, 1899)	Braga 1977
<i>Stanhopea cirrhata</i> Lindl.	<i>Euglossa cf. ignita</i>	Dodson 1965a
	<i>Euglossa championi</i> (Cheesman, 1929)	Dressler 1976a
	<i>Euglossa flammea</i> (Moure, 1969)	Dressler 1968a
	<i>Euglossa gorgonensis</i> (Cheesman, 1929)	Dressler 1976a
	<i>Euglossa gorgonensis erythrophana</i> (Dressler, 1978)	Dressler 1978
	<i>Euglossa hansonii</i> (Moure, 1965)	Dressler 1976a
	<i>Euglossa imperialis</i> (Cockerell, 1922)	Dressler 1976a
<i>Stanhopea connata</i> Klotzsch	<i>Eulaema speciosa</i> (Mocsáry, 1897)	Dodson 1965a
<i>Stanhopea costaricensis</i> Rchb.f.	<i>Eulaema seabrai</i> (Moure, 1960)	Dodson 1965a, Dressler 1979b

	<i>Eufriesea rufocauda</i> (Kimsey, 1977)	Williams & Whitten 1983
	<i>Eufriesea schmidtiana</i> (Friese, 1925)	Dressler 1968a, b
	<i>Eulaema luteola</i> (Moure, 1967)	Williams & Whitten 1983
	<i>Eulaema meriana</i> (Olivier, 1789)	Dressler 1968b, Ackerman 1983
	<i>Eulaema nigrita</i> (Lepeletier, 1841)	Williams & Whitten 1983, Ackerman 1983
	<i>Eulaema seabrai luteola</i> (Moure, 1966)	Williams & Whitten 1983
<i>Stanhopea ecornuta</i> Lem.	<i>Euglossa nigropilosa</i> (Moure, 1965)	Dodson 1965a
	<i>Eufriesea schmidtiana</i> (Friese, 1925)	Dressler 1968a, b
	<i>Eulaema seabrai</i> (Moure, 1960)	Dodson 1965a
<i>Stanhopea embreei</i> Dodson	<i>Eulaema bomboides</i> (Friese, 1923)	Dodson 1975b
<i>Stanhopea florida</i> Rchb.f.	<i>Eufriesea schmidtiana</i> (Friese, 1925)	Dressler 1968a
	<i>Eulaema seabrai</i> (Moure, 1960)	van der Pijl & Dodson 1966, Dressler 1979b
	<i>Euglossa nigropilosa</i> (Moure, 1965)	Dodson 1965a
	<i>Eulaema nigrita</i> (Lepeletier, 1841)	van der Pijl & Dodson 1966
<i>Stanhopea frymirei</i> Dodson	<i>Eulaema bomboides</i> (Friese, 1923)	Dodson 1975b
<i>Stanhopea gibbosa</i> Rchb.f.	<i>Eulaema meriana</i>	Dodson 1965a, b
<i>Stanhopea grandiflora</i> (Lodd.) Lindl.	<i>Eulaema meriana</i> (Olivier, 1789)	van der Pijl & Dodson 1966
	<i>Euglossa ignita</i> (Smith, 1874)	Ducke 1902
	<i>Euglossa ioprosopa</i> (Dressler, 1982)	Dressler 1982a
	<i>Eulaema bombiformis</i> (Packard, 1869)	Ramírez <i>et al.</i> 2002

<i>Stanhopea graveolens</i> Lindl.	<i>Eufriesea mexicana</i> (Mocsary, 1897)	Whitten & Williams 1992
<i>Stanhopea impressa</i> Rolfe	<i>Euglossa grantii</i> (Cheesman, 1929)	Dodson 1975b
<i>Stanhopea insignis</i> J.Frost ex Hook.	<i>Eufriesea purpurata</i> (Mocsary, 1896)	Pansarin & Amaral 2009
<i>Stanhopea</i> aff. <i>jenishiana</i>	<i>Eulaema bomboides</i> (Friese, 1923)	Dodson & Frymire 1961, Dressler 1968b
<i>Stanhopea lietzei</i> Schltr.	<i>Eufriesea pulchra</i> (Smith, 1854)	Pansarin & Amaral 2009
<i>Stanhopea maculosa</i> Knowles & Westc.	<i>Eufriesea caerulescens</i> (Lepelletier, 1841)	Ramirez <i>et al.</i> 2002
<i>Stanhopea oculata</i> Lindl.	<i>Eulaema cingulata</i> (Fabricius, 1804)	Van der Pijl & Dodson 1966, Dodson 1967
	<i>Eufriesea caerulescens</i> (Lepelletier, 1841)	Williams & Whitten 1983, 1988
	<i>Eulaema bomboides</i> (Friese, 1923)	Dodson 1962
<i>Stanhopea panamensis</i> N.H.Williams & W.M. Whitten	<i>Eufriesea ornata</i> (Mocsary, 1896)	Williams & Whitten 1983, 1988
	<i>Eufriesea mussitans</i> (Fabricius, 1787)	Kimsey 1982
	<i>Euglossa deceptrix</i> (Moure, 1968)	Williams & Whitten 1983
	<i>Euglossa despecta</i> (Moure, 1968)	Williams & Whitten 1983
	<i>Euglossa tridentata</i> (Moure, 1970)	Williams & Whitten 1983
<i>Stanhopea pulla</i> Rchb.f.	<i>Euglossa asarophora</i> (Moure & Sakagami, 1969)	Williams & Whitten 1983, Dressler 1968b
<i>Stanhopea radiosa</i> Lem.	<i>Euglossa viridissima</i> (Friese, 1899)	Dodson 1975c
<i>Stanhopea reichenbachiana</i> Roetzl ex Rchb.f.	<i>Eulaema leucopyga</i> (Friese, 1898)	van der Pijl & Dodson 1966, Dodson 1967
<i>Stanhopea saccata</i> Bateman	<i>Euglossa viridissima</i> (Friese, 1899)	van der Pijl & Dodson 1966, Dodson 1967
	<i>Eufriesea caerulescens</i> (Lepelletier, 1841)	Dodson 1975c
<i>Stanhopea</i> aff. <i>saccata</i>	<i>Euglossa variabilis</i> (Friese, 1899)	Ramírez <i>et al.</i> 2002

<i>Stanhopea tigrina</i> Bateman	<i>Euglossa viridissima</i> (Friese, 1899)	Friese 1899
	<i>Eufriesea caerulescens</i> (Lepeletier, 1841)	Williams & Whitten 1983
<i>Stanhopea tricornis</i> Lindl.	<i>Eulaema meriana</i> (Olivier, 1789)	Dodson & Frymire 1961
<i>Stanhopea wardii</i> Lodd. ex Lindl.	<i>Eulaema polychroma</i> (Mocsáry, 1899)	Dodson 1965a, 1975a
	<i>Eufriesea chrysopyga</i> (Mocsary, 1898)	Williams & Whitten 1983, 1988
	<i>Eufriesea concava</i> (Friese, 1899)	Dodson 1975a,b
	<i>Eufriesea rufocauda</i> (Kimsey, 1977)	Williams & Whitten 1983, 1988
	<i>Eufriesea corusca</i> (Kimsey, 1977)	Dodson 1975b
	<i>Eulaema bombiformis</i> (Packard, 1869)	Dodson & Frymire 1961
<i>Stanhopea warscewicziana</i> Klotsch	<i>Eufriesea macroglossa</i> (Moure, 1965)	Dodson 1965a, Moure 1965
<i>Stanhopea aff. weberbaueriana</i>	<i>Eulaema polychroma</i> (Mocsáry, 1899)	Dodson 1967
<i>Stanhopea</i> sp.	<i>Eufriesea kimimari</i> (González & Gaiani, 1989)	González & Gaiani 1989
	<i>Eufriesea ornata</i> (Mocsary, 1896)	Kimsey 1982
	<i>Eufriesea chrysopyga</i> (Mocsary, 1898)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Eufriesea mexicana</i> (Mocsary, 1897)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Eufriesea schmidtiana</i> (Friese, 1925)	Ramírez <i>et al.</i> 2002
	<i>Eulaema speciosa</i> (Mocsáry, 1897)	Ramírez <i>et al.</i> 2002

Tabela 3: Dados estatísticos das árvores filogenéticas para o gênero *Cirrhaea*, incluindo o número de caracteres utilizados, o número de passos, o número de caracteres variáveis, o número de melhores árvores encontradas, o número de caracteres filogenéticos potencialmente informativos, o número de árvores Fitch, o número de caracteres excluídos, o Índice de Consistência (CI), o Índice de Homoplasia, excluindo caracteres não informativos (HI) e o Índice de Retenção (RI) para os dados individuais e combinados.

Parâmetros	ITS	Mat-K	Trnl-f	Combinados
Número de caracteres	720	1384	1147	3251
Número de passos	160	121	70	338
Caracteres Variáveis	118	61	38	216
Caracteres informativos filogeneticamente	28	33	25	78
Número de árvores mais parcimoniosas	160	121	70	338
Número de árvores Fitch	3	1	1	1
Caracteres excluídos	574	1290	1084	2957
CI	0,9812	0,8017	0,9429	0,9201
HI	0,0909	0,4211	0,1333	0,2500
RI	0,9362	0,5862	0,8857	0,7353

Tabela 4: Dados estatísticos das árvores filogenéticas para a subtribo *Stanhopeinae*, incluindo o número de caracteres utilizados, o comprimento da árvore, o número de caracteres variáveis, o número de melhores árvores encontradas, o número de caracteres filogenéticos potencialmente informativos, o número de árvores Fitch, o número de caracteres excluídos, o Índice de Consistência (CI), o índice de Homoplasia, excluindo caracteres não informativos (HI) e o Índice de Retenção (RI) para os dados individuais e combinados.

Parâmetros	ITS	Mat-K	Trnl-f	Combinados
Nº de Caracteres	739	1354	933	2926
Comprimento da árvore	925	592	349	1604
Caracteres Variáveis	252	171	164	480
Caracteres informativos filogeneticamente	173	151	91	423
Nº melhores árvores encontradas	925	592	349	1604
Nº árvores Fitch	72	51	36	31
Caracteres excluídos	314	1032	678	2023
CI	0,6486	0,6182	0,8138	0,6958
HI	0,4495	0,5459	0,3672	0,4523
RI	0,7806	0,7731	0,7988	0,7473

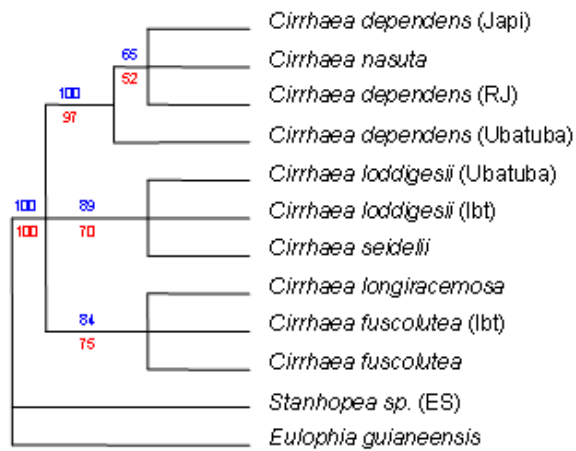


Figura 1: Árvore de consenso estrito obtida a partir da região ITS (nrDNA) para *Cirrhaea*. Valores acima dos ramos (em azul) = Bootstrap; valores abaixo dos ramos (em vermelho) = Jackknife.

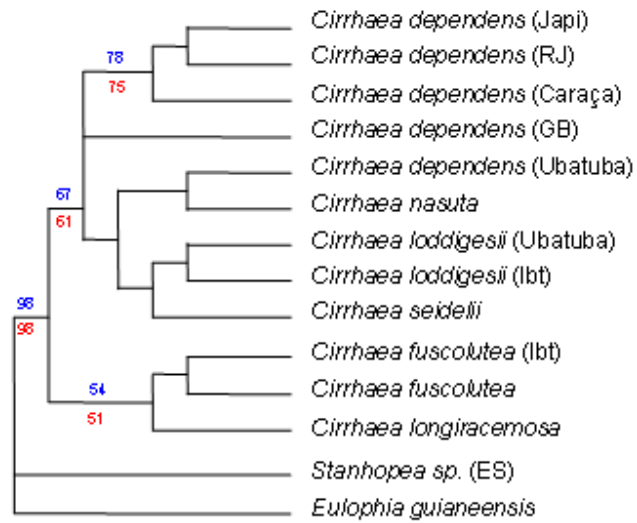


Figura 2: Árvore de consenso estrito obtida a partir da região *matK* (cpDNA) para *Cirrhaea*. Valores acima dos ramos (em azul) = Bootstrap; valores abaixo dos ramos (em vermelho) = Jackknife.

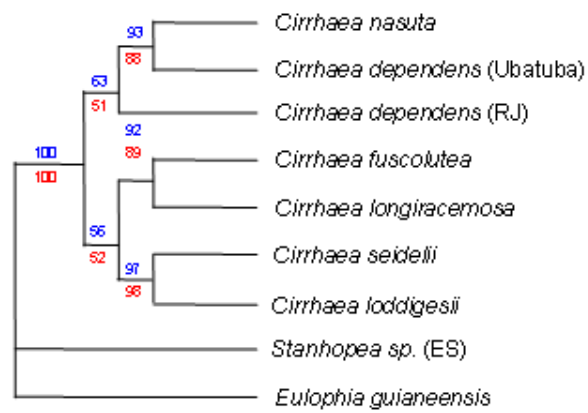


Figura 3: Árvore de consenso estrito obtida a partir da região *trnL-F* (cpDNA) para *Cirrhaea*. Valores acima dos ramos (em azul) = Bootstrap; valores abaixo dos ramos (em vermelho) = Jackknife.

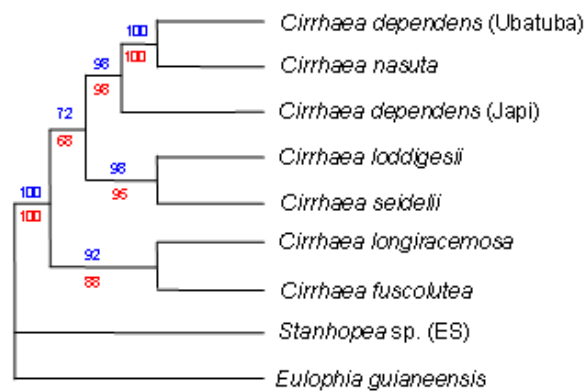


Figura 4: Árvore de consenso estrito obtida a partir das regiões ITS (nrDNA), *matK* e *trnL-F* (cpDNA) para *Cirrhaea*. Valores acima dos ramos (em azul) = Bootstrap; valores abaixo dos ramos (em vermelho) = Jackknife.

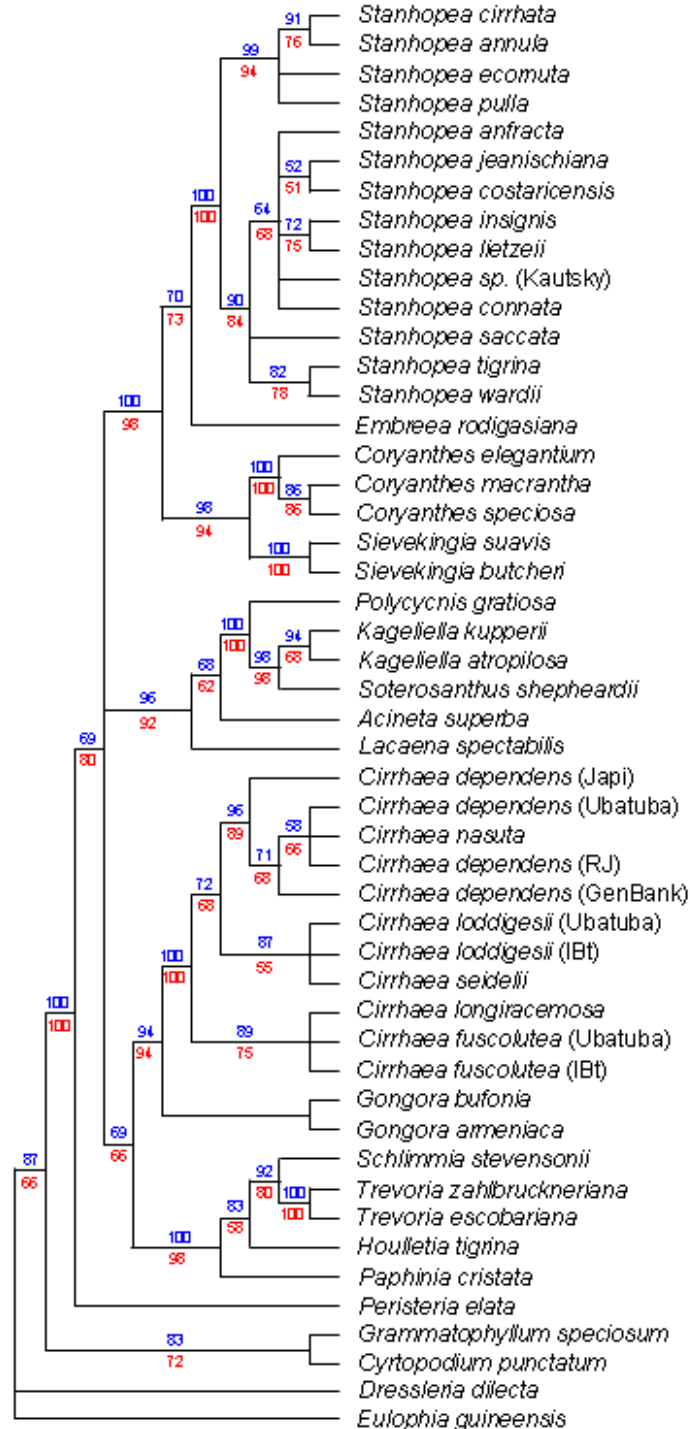


Figura 5: Árvore de consenso estrito obtida a partir da região ITS (nrDNA) para Stanhopeinae. Valores acima dos ramos (em azul) = Bootstrap; valores abaixo dos ramos (em vermelho) = Jackknife.

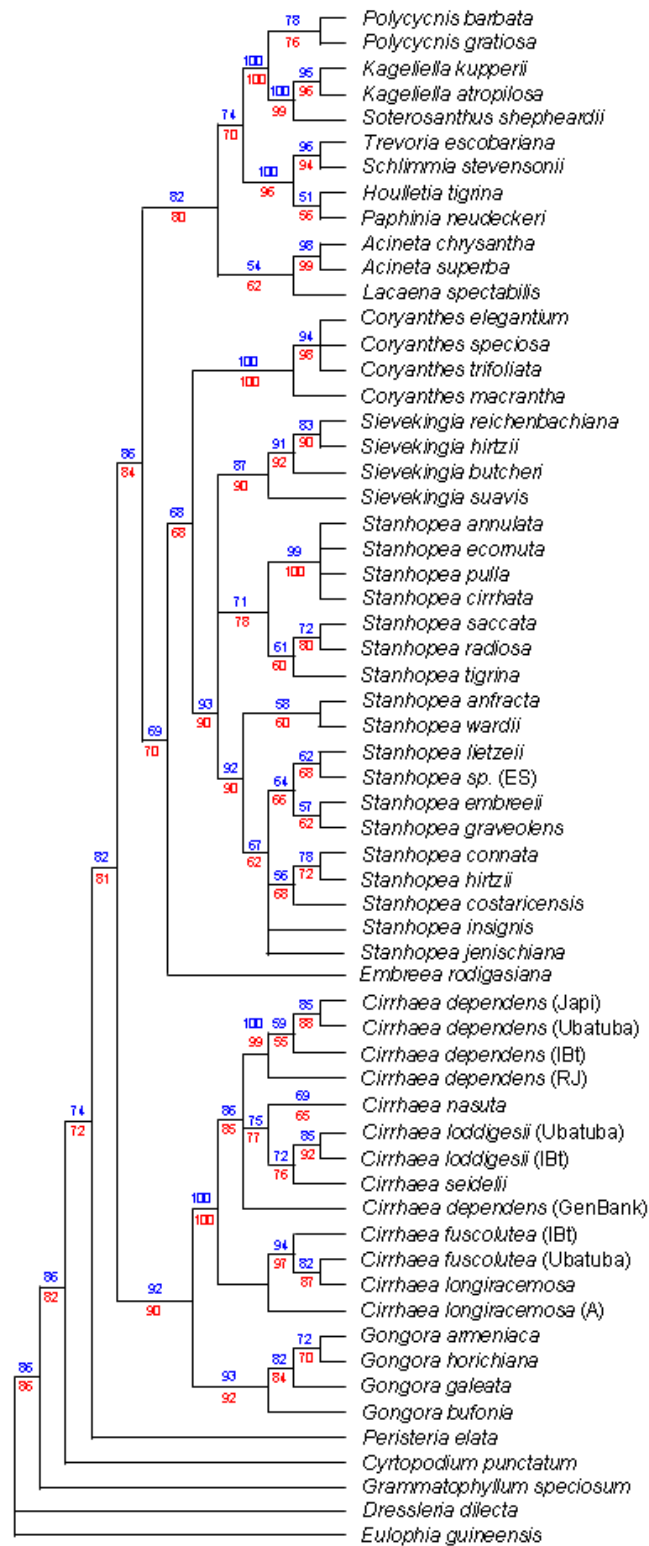


Figura 6: Árvore de consenso estrito obtida a partir da região *matK* (cpDNA) para Stanhopeinae. Valores acima dos ramos (em azul) = Bootstrap; valores abaixo dos ramos (em vermelho) = Jackknife.

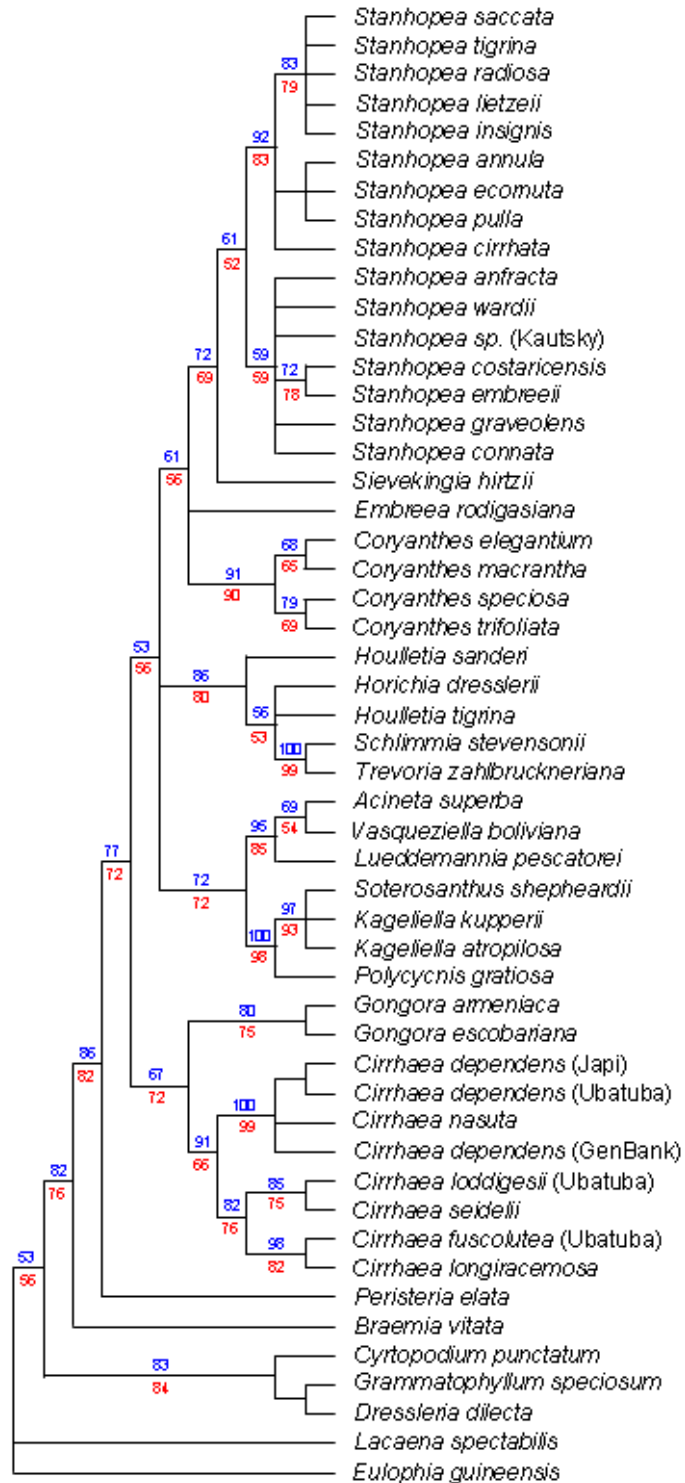


Figura 7: Árvore de consenso estrito obtida a partir da região *trnL-F* (cpDNA) para Stanhopeinae. Valores acima dos ramos (em azul) = Bootstrap; valores abaixo dos ramos (em vermelho) = Jackknife.

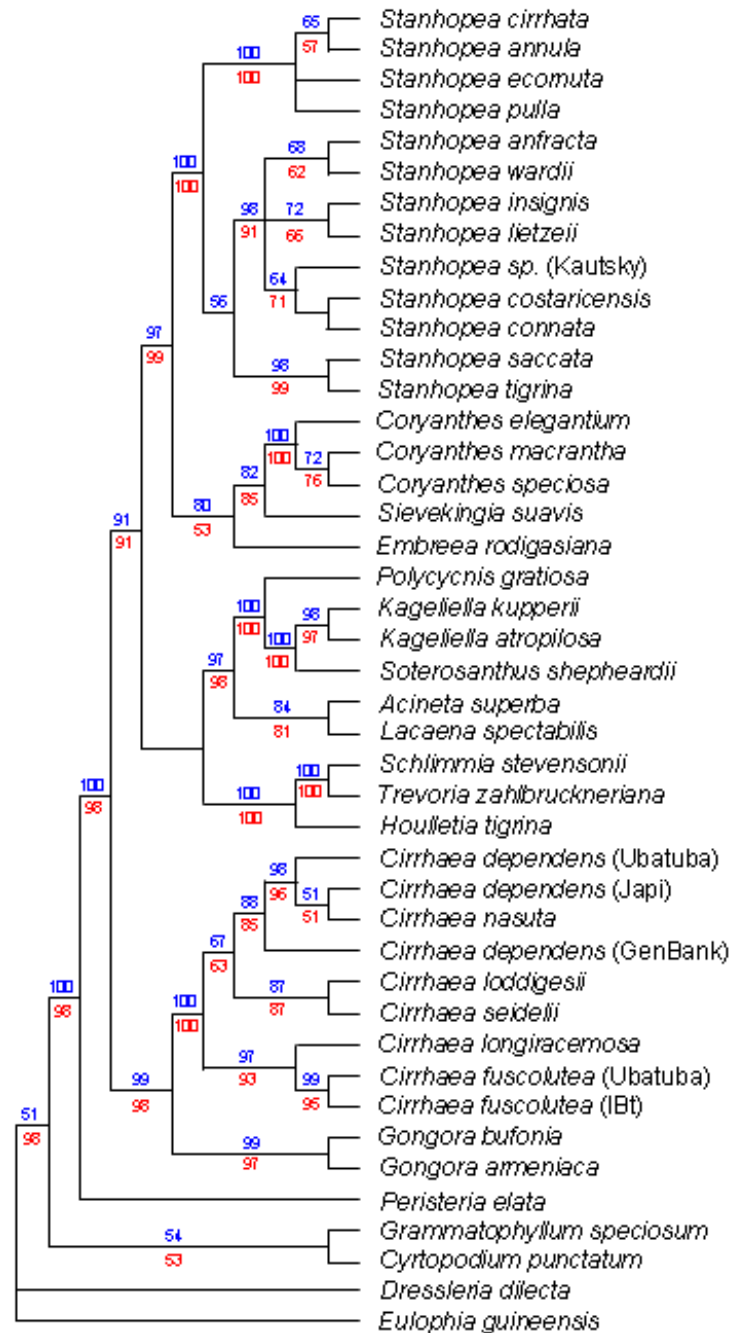


Figura 8: Árvore de consenso estrito obtida a partir das regiões ITS (nrDNA), *matK* e *trnL-F* (cpDNA) para Stanhopeinae. Valores acima dos ramos (em azul) = Bootstrap; valores abaixo dos ramos (em vermelho) = Jackknife.

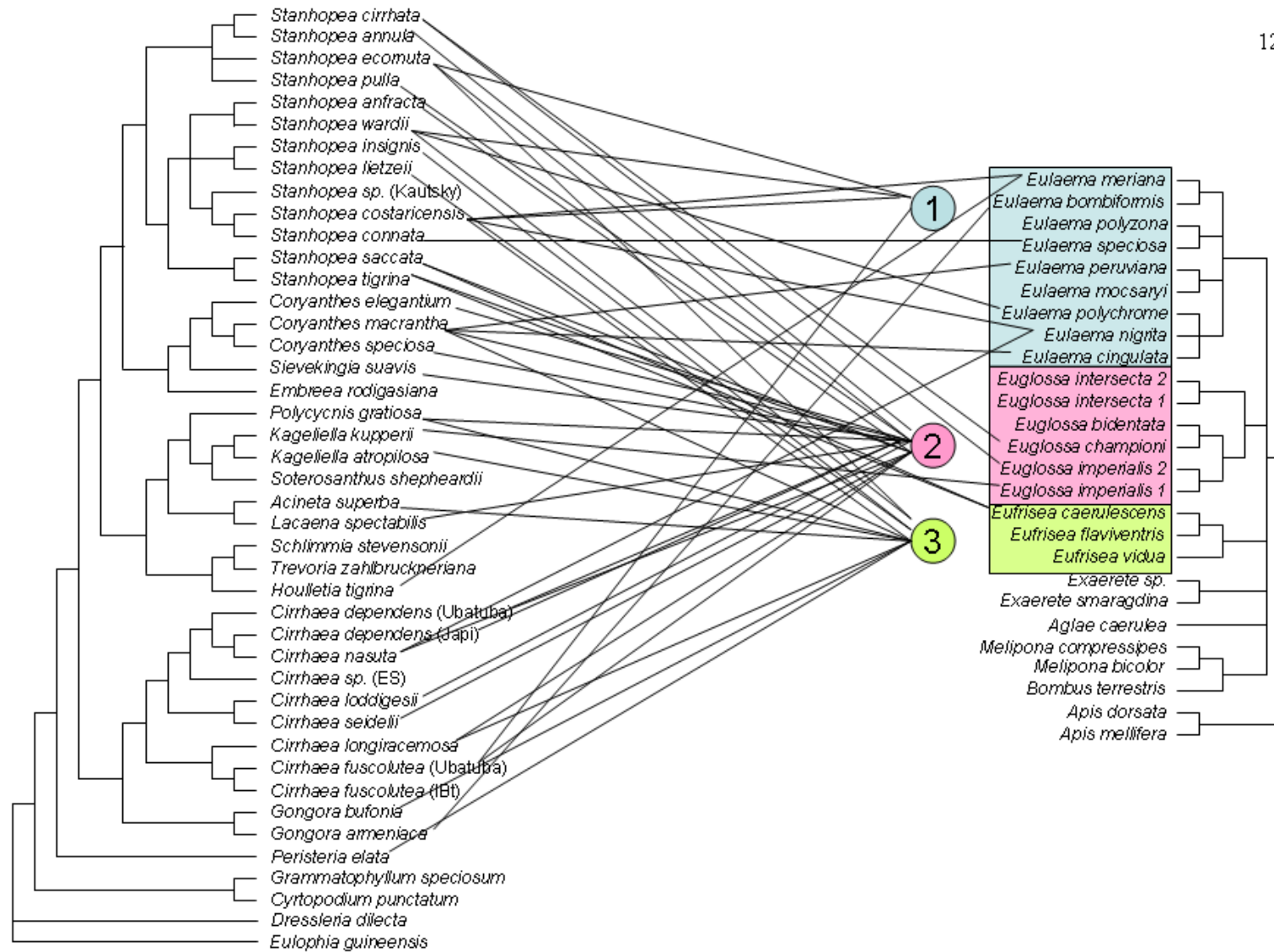


Figura 9: Árvores filogenéticas da subtribo Stanhopeinae (esquerda) e da tribo Euglossini (direita). As linhas indicam a relação planta-polinizador entre as espécies. Os números 1, 2 e 3 indicam outras espécies dos gêneros *Eulaema*, *Euglossa* e *Eufriesea* (respectivamente) que são polinizadoras, mas que não aparecem na análise.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As flores de *Cirrhaea* Lindl. produzem fragrâncias como recurso floral. Essa fragrância é produzida em osmóforos epidérmicos, com um parênquima subjacente acumulador de assimilados, cuja localização varia entre as espécies estudadas. Em *Cirrhaea dependens* e *C. nasuta* os osmóforos estão localizados em uma protuberância subcilíndrica logo abaixo do lobo apical do labelo. Em *C. fuscolutea* e *C. longiracemosa* estão localizados principalmente na calosidade com reentrância central abaixo do lobo apical conchiforme. Nas espécies *C. loddigesii* e *C. seidelii* estão presentes de forma difusa na face interna dos lobos laterais do labelo. A composição química das fragrâncias é variável não só entre as espécies estudadas, como também entre populações de uma mesma espécie. A fragrância produzida nos osmóforos é fundamental para a atração dos polinizadores, além de servir como recurso aos machos de Euglossini.

Em todas as espécies de *Cirrhaea* o mecanismo de polinização é do tipo queda, no qual a abelha pousa sobre o labelo, raspa os osmóforos com as pernas dianteiras, paira por diversas vezes para transferir o odor das pernas dianteiras para as medianas e em seguida para a tíbia das pernas traseiras. A remoção ou deposição do polinário ocorre quando a abelha abandona a flor para transferir a fragrância para as pernas traseiras ou quando escorrega e cai enquanto coleta a fragrância. O mecanismo de polinização de todas as espécies é semelhante ao descrito para *Cirrhaea dependens*. Todas as espécies de *Cirrhaea* estudadas são autocompatíveis, no entanto, um polinizador é necessário para a transferência de pólen. Diferentes espécies de *Cirrhaea* podem compartilhar um mesmo polinizador ou apresentar diferentes polinizadores.

As análises filogenéticas realizadas para as três regiões de DNA revelam que o gênero *Cirrhaea* apresenta três clados: *C. dependens* e *C. nasuta*, *C. fuscolutea* e *C. longiracemosa*, e *C. loddigesii* e *C. seidelii*, e cada clado corresponde a um grupo morfológico quanto à morfo-anatomia dos osmóforos, o que nos leva a aceitar a hipótese de que a morfologia reflete a filogenia do gênero. *Cirrhaea* aparece como grupo irmão de *Gongora*, e ambos apresentam espécies de *Euglossa*, *Eulaema* e *Eufrisea* como polinizadores. Quando são comparadas as filogenias de Stanhopeinae e Euglossini, verifica-se que as plantas e os polinizadores evoluíram de forma independente. Não há relação correspondente entre os dois grupos, e nem especificidade

entre planta e polinizador, visto uma única espécie de *Cirrhaea* pode ser polinizada por até três espécies de abelha (por exemplo., *C. fuscolutea* e *C. longiracemosa*) e uma única espécie de Euglossini, como *Euglossa cordata*, pode polinizar mais de uma espécie de *Cirrhaea* (i.e., *C. dependens*, *C. fuscolutea* e *C. loddigesii*), que apresentam composição química das fragrâncias distintas. Estes dados nos fornece condições para refutar a hipótese de especificidade entre orquídeas e euglossines, que vem sendo sustentada há mais de 40 anos de pesquisa. Também rejeitamos a hipótese de que há uma relação correspondente entre plantas e polinizadores e que não existe uma relação estrita e exclusiva entre os grupos, sendo uma dependência unilateral por parte das plantas.

A falta de populações naturais conhecidas de *Cirrhaea silvana* e a complexa relação com orquidófilos para a aquisição comercial desta espécie inviabilizou um trabalho mais completo sobre o gênero. Porém, a obtenção recente de fragmentos de folhas de *C. silvana* provenientes do Jardim Botânico de Munich (Alemanha) permitirá a inclusão desta espécie nas análises filogenéticas, complementando os dados obtidos. A compra de um espécime raro de *C. silvana* pelo curador do Jardim Botânico, Dr. Gunter Gerlach, permitirá que seja realizada a análise química de sua fragrância, assim como a coleta de fixação de flores para futuros estudos morfo-anatômicos.

Assim que as seqüências de nucleotídeos estiverem completas, uma análise Bayesiana será providenciada para a reconstrução filogenética, além da Máxima parcimônia já realizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- Arditti, J. 1982. Orchid biology, reviews and perspectives, II. Cornekk University Press. Ithaca and London. 4: 146-170.
- Barros, F.; Vinhos, F.; Rodrigues, V.T.; Barberena, F.F.V.A. & Fraga, C.N. 2010. Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil - Orchidaceae. *In*: Forzza, R.C.; Leitman, P.M.; Costa, A. *et al.* . (Org.). Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 2, p. 1344-1426.
- Burns-Balogh, P. & Funk, V. 1986. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae. *Smithsonian Contributions to Botany* nº 61.
- Cameron, K.M. 2004. Utility of plastid gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 1157-1180.
- Cameron, K.M.; Chase, M.A.; Whitten, W.M.; Kores, P.J.; Jarrell, C.; Albert, V.A.; Yukawa, T.; Hills, H.G. & Goldman, D.H. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 86: 208-224.
- Chase, M.W.; Cameron, K.M.; Barret, R.S. & Freudenstein, J.V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematic: a new phylogeny classification. *In* Dixon, K.W.; Kell, S.P.; Barret, R.L. & Cribb, P.J. (eds.) *Orchid Conservation* pp.69-89. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah.
- Clegg, M. & Zurawski, G. 1992. Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. *In* P. Soltis, D. Soltis & J. Doyle (eds.) *Molecular systematics of plants*. New York, NY: Chapman and Hall.
- Dressler, R.L. 1967. Why do euglossine bees visit orchid flowers? *Atas do Simposio sobre a Biota Amazonica* 5: 171-180.
- Cozzolino, S. & Widmer, A. 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution* 20: 487-494.
- Cozzolino, S.; Aceto, S.; Caputo, P.; Widmer, A. & Dafni, A. 2001. Speciation processes in eastern Mediterranean *Orchis* s.l. species: molecular evidence and the role of pollination biology. *Israel Journal of Plant Sciences* 49: 91-103.

- Dodson, C. 1962. The importance of pollination in the evolution of the orchids of Tropical America. *American Orchid Society Bulletin* 31: 525-554.
- Dressler, R.L. 1967. Why do euglossine bees visit orchid flowers? *Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica* 5: 171-180.
- Dressler, R.L. 1981. *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Dressler, R.L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Dressler, R.L. 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26:155-158
- Dressler, R.L. & Dodson, C. 1960. Classification and phylogeny of the Orchidaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 47: 25-68.
- Freudenstein, J.V. & Rasmussen, F.N. 1999. What does morphology tell us about orchid relationships? – a cladistic analysis. *American Journal of Botany* 86: 225-248.
- Freudenstein, J.V.; van den Berg, C.; Goldman, D.H.; Kores, P.J.; Molvray, M. & Chase, M.W. 2004. An expanded plastid DNA phylogeny of Orchidaceae and analyses of Jackknife branch support strategy. *American Journal of Botany* 91: 149-157.
- Govaerts, R. 1999. *World Checklist of Seed Plants* 3(1, 2a & 2b): 1-1532. Continental Publishing, Deurne.
- Govaerts, R. 2003. *World Checklist of Monocotyledons Database in ACCESS*: 1-71827. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew.
- Hoehne, F.C. 1949. *Iconografia das Orchidáceas do Brasil*. São Paulo, Secretaria da Agricultura. p. 18-42.
- Johnson, S.D.; Linder, H.P. & Steiner, K.E. 1998. Phylogeny and radiation of pollination systems in *Disa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85: 402-411.
- Kitching, I.J. 1992. The determination of character polarity. *In* *Cladistics - a practical course in systematics* (P. L. Forey, C. J. Humphries, I. L. Kitching, R. W. Scotland, D. J. Siebert & D. M. Williams, eds.). The Systematics Association Publ. n° 10. Clarendon Press, Oxford.
- Palmer, J.; Jansen, R.; Michaels, H.; Chase, M.W. & Manhart, J. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 1180-1206.

- Pansarin, E.R.; Bittrich, V. & Amaral, M.C.E.. 2006. At daybreak – reproductive biology and isolating mechanisms of *Cirrhaea dependens* (Orchidaceae). *Plant Biology* 8: 494-502.
- Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. (eds.) 1999. *Genera Orchidacearum*. v. 1, Oxford University Press: New York.
- Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. (eds.) 2001. *Genera Orchidacearum*. v. 2, Oxford University Press: New York.
- Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. (eds.) 2003. *Genera Orchidacearum*. v. 3, Oxford University Press: New York.
- Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. (eds.) 2005. *Genera Orchidacearum*. v. 4, Oxford University Press: New York.
- Pridgeon, A.M.; Cribb, P.; Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. (eds.) 2009. *Genera Orchidacearum*. v. 5, Oxford University Press: New York.
- Vogel, S. 1963a. Duftdrüsen im Dienste der Bestäubung: Über Bau und Funktion der Osmophoren. Akademie der Wissenschaften und der Literatur, Mainz. Abh. Math.-Naturwiss. Klasse, Jahrgang 1962: 599-763.
- Vogel, S. 1963b. Das sexuelle Anlockungsprinzip der Catasetinen- und Stanhopeen-Blüten und die wahre Funktion ihres sogenannten Futtergewebes. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 100: 308-337.
- Williams, N.H. 1982. The biology of orchids and euglossine bees. *In* *Orchid biology and perspectives* J.Arditti (ed.), Ithaca: Cornell University Press, pp. 119-171.