

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO JOSÉ
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NATASSIA SOARES SANTOS

Biologia e Fenologia Reprodutiva em *Zygopetalum triste*
Barb. Rodr. (Orchidaceae).

RIO DE JANEIRO - RJ

2019



Biologia e Fenologia Reprodutiva em *Zygopetalum triste*
Barb. Rodr. (Orchidaceae).

Natassia Soares Santos

Trabalho de Conclusão de Curso de
Ciências Biológicas para obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Biológicas das Faculdades São José.

Orientadore(s): MSc. Thiago de Ávila
Medeiros, Dr^a Luciene Campos São
Leão & Dr^a Heloisa Alves de Lima.

RIO DE JANEIRO - RJ
2019

Biologia e Fenologia Reprodutiva em *Zygopetalum triste*
Barb. Rodr. (Orchidaceae).

Natassia Soares Santos

Aprovada por:

Prof. Dr Daniel Medina Corrêa Santos.

Prof. Msc, Thiago Ávila Medeiros

Profª Drª Luciene Campos São Leão

RIO DE JANEIRO – RJ – BRASIL
NOVEMBRO DE 2019

*Aos meus pais, Nádía e Jaime,
que sempre estiveram ao meu lado.
Minhas primas Ketilen e Vanessa pela força e companhia.
Aos amigos que fiz durante esta jornada,
que comigo dividiram esta luta.
E especialmente a minha afilhada Lívía, que foi
o meu refúgio, minha fortaleza, e minha motivação*



Zygopetalum triste Barb. Rodr.

Foto: Natassia S. Santos

AGRADECIMENTOS

Neste momento tão importante da minha vida, eu quero agradecer por este trabalho a todos aqueles que me incentivaram e me apoiaram de alguma forma. Primeiramente, quero agradecer aquele que todos chamam de Deus, que para mim é mais que um espírito personificado, é a energia infinitamente grande que impulsionou a criação do universo e tudo aquilo que estudei nas Ciências Biológicas, obrigada Deus, pela natureza em sua perfeição e por ter me dado forças para chegar até aqui;

Agradeço a toda a minha família, principalmente aos meus pais, Nádia e Jaime, por todo o amor, esforço e dedicação para me ajudar na minha formação, ao meu avô Celício, à minha prima Vanessa por ter aprendido junto comigo, e à minha prima Ketilen por ter sido uma irmã, por ter cuidado de mim e por ter me presenteado com a minha afilhada Lívia, que com sua inocência de criança me deu forças e inspiração para me tornar graduada;

Ao meu amigo e parceiro de aventuras Lucas, que também me inspira e me apoia neste sonho;

A minha saudosa madrinha Iara, que não está mais conosco mas como um exemplo de mãe e profissional da pedagogia, estaria comemorando esta vitória comigo;

A todos os professores, sem exceção, que passaram por mim nesta trajetória, especialmente aos meus orientadores, Thiago Ávila (UniSãoJosé), Luciene Campos e Heloísa (Museu Nacional/UFRJ), e ao professor Daniel Medina (UniSãoJosé), por ter aceitado o convite de participar da banca avaliadora;

Todos estes foram importantes para este objetivo ser alcançado, vocês são especiais e para sempre estarão guardados em meu coração.

Resumo:

A presente pesquisa trata da biologia floral, polinização, sistema reprodutivo e fenologia reprodutiva de *Zygopetalum triste* Barb. Rodr. (Epidendroideae - Orchidaceae). O estudo foi realizado no Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais, Sudeste do Brasil (PEIB-MG). A pesquisa envolveu a busca de osmóforos e nectários funcionais, a fim de compreender a biologia floral e a interação da espécie com seus polinizadores. Experimentos de polinização manual foram usados para entender o sistema reprodutivo. A espécie floresce de abril a setembro. As flores são diurnas, conspicuas, ressupinadas, sutilmente perfumadas, dispostas em racemos laterais, variando de três a seis flores, e amadurecendo da base para o ápice. As flores foram visitadas por abelhas (*Bombus morio* e *Apis mellifera*). Sépalas e pétalas são vináceas e contrastam com o labelo roxo articulado, utilizado pelo polinizador como plataforma de pouso e apresentando glândula odorífera (osmóforo). O polinário apresenta dois pares de polínias cartilaginosas. Nos experimentos de polinização manual, observamos que a espécie não se autopoliniza espontaneamente, devido à presença do rostelo que impede o contato entre a polínia e a região estigmática. Assim, a espécie depende de visitas de polinizadores para a transferência de pólen para a região estigmática. A produção de frutos obteve maior sucesso na polinização cruzada (xenogamia), com 65% de frutificação. Na autopolinização manual, o sucesso alcançou 47%. A eficiência da polinização foi avaliada indiretamente pela observação das frequências de polínias removidas da flor e inseridas na região estigmática. Os resultados revelaram uma baixa taxa de visitação, pois 75% das flores observadas não foram visitadas (polínias não removidas nem inseridas); 13% tinham somente as polínias removidas, mas não inseridas; apenas 12% das flores foram legitimamente polinizadas, ou seja, tiveram polínias inseridas na região estigmática (n = 338).

Palavras-chave: polinização por engano, melitofilia, osmóforo, limitação polínica, Parque Estadual do Ibitipoca, Epidendroideae.

ABSTRACT

The present research deals with the floral biology, pollination, reproductive system and reproductive phenology of *Zygopetalum triste* Barb. Rodr. (Epidendroideae - Orchidaceae). The study was conducted at Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais State, Southeastern Brazil (PEIB-MG). The research involved the search for osmophores and functional nectary in order to understand the floral biology and the interaction that the species has with its pollinators. Manual pollination were used to understand the reproductive system. The species flowers from April to September. The flowers are diurnal, conspicuous, resupinated, subtly fragrant, arranged in lateral racemes, ranging from three to six flowers, and ripening from the base to the apex. The flowers were visited by bees (*Bombus morio* and *Apis mellifera*). Sepals and petals are vinaceous and contrast with the purple articulated labellum, used by pollinators as a landing platform and presenting odor gland (osmophore). The pollinaria presents two pairs of cartilaginous pollinia. In the manual pollination experiments, we found that the species does not self-pollinate spontaneously, due to the presence of the rostellum that prevents contact between the pollinia and the stigmatic region. Thus, the species depends on pollinators visits for the transfer of pollen to the stigmatic region. Fruit production achieved greater success in cross pollination (xenogamy), with 65% of fruit set. In manual self-pollination, success reached 47%. Pollination efficiency was indirectly evaluated by observing the frequencies of pollinia removed from the flower and inserted in the stigmatic region. The results revealed a low visitation rate, as 75% of the observed flowers were not visited (pollinia not removed neither inserted); 13% had only removed but not inserted pollinia; only 12% of the flowers were legitimately pollinated, that is, they had pollinia inserted in the stigmatic region (n = 338).

Keyword: pollination by mistake, melittophily, osmophore, pollen limitation, Parque Estadual do Ibitipoca, Epidendroideae.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
3. METODOLOGIA	12
3.1 Área de estudo	12
3.2 Fenologia reprodutiva	14
3.3 Morfologia e biologia florais	14
3.4 Morfoanatomia das estruturas secretoras florais associadas à polinização	15
3.5 Sistema reprodutivo	15
3.6 Visitantes florais	16
4. RESULTADOS	16
4.1 Distribuição e período de florescimento	16
4.2 Morfologia e biologia florais	17
4.3 Sistema reprodutivo	19
4.4 Visitantes florais	20
5. DISCUSSÃO	21
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
7. REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

Orchidaceae Juss. é uma das maiores famílias de angiospermas com aproximadamente 28.000 espécies, distribuídas em 736 gêneros que se encontram agrupados em cinco subfamílias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae e Epidendroideae (CHASE *et al.* 2015; THE PLANT LIST, 2017).

Orchidaceae é considerado o maior grupo de monocotiledôneas (FLORA DO BRASIL, 2019). Espécies da família são ervas, com diversificadas formas de crescimento, tamanho, coloração das flores e ornamentações de labelo (DRESSLER, 1993; PRIDGEON, *et al.* 1999, 2010), apresentando distribuição cosmopolita, ausente apenas nas áreas dos polos e desertos (GOVAERTS *et al.* 2017; TROPICOS, 2017). No Brasil, encontra-se representada por 221 gêneros e 2.497 espécies presentes em todas as formações vegetacionais do país (BFG, 2015).

O néctar é o principal recurso floral oferecido aos polinizadores (PROCTOR *et al.* 1996), secretado em nectários perigonais, cuniculares ou esporões, frequentemente difíceis de localizar e de ter sua funcionalidade avaliada (DRESSLER 1990). Também ocorrem espécies cujo óleo é o recurso floral aos polinizadores, principalmente em Oncidiinae (DRESSLER 1990). Entretanto, numerosas orquídeas não oferecem recompensas aos polinizadores e, nesse caso, as visitas são baseadas em algum tipo de engano (KOCYAN; ENDRESS, 2001, SINGER; KOEHLER, 2004), incluindo *Zygopetalum mackayi* polinizada por *Bombus pauloensis* (CAMPACCI *et al.*, 2016).

Com relação ao sistema reprodutivo, as orquídeas tendem a ser autocompatíveis, porém é necessária a presença de um vetor de pólen para que ocorra a polinização. A autopolinização espontânea é prevenida em algumas espécies devido à presença de barreiras mecânicas (rostelo), que promovem uma separação espacial entre polínias e região estigmática, caracterizando uma hercogamia. Desta forma, a polinização cruzada é favorecida na maioria das espécies (VAN DER PIJL; DODSON, 1966, PANSARIN, 2003, MICKELIUNAS *et al.* 2006). Algumas espécies são autoincompatíveis, o que evidencia a ocorrência de barreiras genéticas (BORBA *et al.* 2001, BARBOSA *et al.* 2009, PANSARIN; PANSARIN, 2010).

Zygopetalum Hooker é um dos 650 gêneros da subfamília Epidendroideae, a maior das subfamílias, com cerca de 18.000 espécies diversificadas (PRIDGEON *et al.* 2005). As espécies de *Zygopetalum* são descritas como plantas geralmente cespitosas; rizoma quase sempre curto; caule secundário espessado em pseudobulbo; folhas apicais com várias nervuras longitudinais proeminentes, articuladas com bainhas. A inflorescência ocorre em racemo lateral; brácteas florais cimbriformes, com flores vistosas, sépalas e pétalas semelhantes entre si, labelo branco variavelmente venulado em roxo; quatro polínias do tipo cartilaginosas, dotadas de estipe e vicídio (ROMANINI, 2006).

As orquídeas do complexo "*Zygopetalum maculatum*" (Kunth) Garay, do qual a espécie estudada faz parte, são típicas dos campos rupestres e de altitude do leste do Brasil. Atualmente são reconhecidas seis espécies para este grupo que, por compartilharem características morfológicas diagnósticas, são reconhecidas como um complexo de espécies. O nome do gênero faz referência ao formato de suas flores zigomorfas (com apenas duas pétalas iguais) (SHEEHAN; SHEEHAN, 1994).

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar *Zygopetalum triste* Barb. Rodr., no Parque Estadual do Ibitipoca, quanto à fenologia reprodutiva, biologia e morfologia florais, sistema reprodutivo e polinização.

Os objetivos específicos são: (i) avaliar o período de floração e frutificação da espécie; (ii) verificar a funcionalidade do nectário e a presença de osmóforo nas flores; (iii) avaliar o sucesso reprodutivo a partir dos experimentos de polinização manual e natural; (iv) e estimar as visitas de polinizadores através da remoção de polínias e inserção das mesmas na região estigmática, ao longo do período de floração.

As orquídeas possuem papel importante na flora das Unidades de Conservação e, somente quando há conhecimento sobre habitat, biologia, ecologia e tamanho das populações, é possível programar estratégias de conservação apropriadas para as espécies. Na segunda edição do "Atlas para a conservação da biodiversidade no estado de Minas Gerais", a Serra de Ibitipoca está entre as áreas prioritárias para a conservação da flora no Estado, sendo, portanto, relevante o estudo reprodutivo de *Zygopetalum triste*

Barb. Rodr. (Orchidaceae), ressaltando-se que o gênero em foco permanece pouco conhecido sob aspectos de reprodução.

O presente estudo pretende estabelecer respostas para as seguintes questões:

- *Zygopetalum triste* é uma espécie autocompatível, mas depende de polinizadores para a produção de frutos e sementes.
- O mecanismo de polinização da espécie está baseado em algum tipo de engano.
- A taxa de visita dos polinizadores às flores de *Zygopetalum triste* é baixa, podendo ser inferida através da análise de flores com polínias inseridas na região estigmática.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Zygopetalum Hook. é um pequeno gênero de Orchidaceae que comporta cerca de 14 espécies reconhecidas no Brasil, país considerado o seu centro de diversidade (CHASE *et al.* 2003). Essas plantas ocorrem em lugares saturados de umidade (SHEEHAN; SHEEHAN, 1994), em meio a gramíneas e diversas espécies de samambaias, em frestas de rochas onde há detritos vegetais acumulados, e eventualmente sobre tronco de árvores e em beiras de estradas e barrancos (HOEHNE, 1953; CAMPACCI, 2013).

Apesar de ter poucas espécies, *Zygopetalum* ainda apresenta problemas de delimitação. Os táxons que ocorrem em campos rupestres de altitude, como *Z. maculatum* (Kunth) Garay, (= *Zygopetalum mackayi* Hooker), *Z. brachypetalum* Lindl., *Z. intermedium* Lood., *Z. triste* Barb. Rodr., *Z. reginae* Pabst, *Z. guillanryi* Pabst. e *Z. sincoranum* V. P. Castro & Campacci têm sua taxonomia duvidosa por conta da sobreposição de caracteres morfológicos diagnósticos.

Muitos pesquisadores relatam que as orquídeas polinizam-se por engodo, por não oferecer recompensa (néctar) aos insetos que as polinizam. A polinização é um dos exemplos de mutualismo mais emblemáticos presentes na literatura científica. De um

lado, plantas com flores atrativas e com odores oferecem uma extensa variedade de recursos florais, os quais podem ser utilizados pelos agentes polinizadores como alimento (néctar, óleos e pólen). Por outro lado, os polinizadores desempenham uma função importante na reprodução da planta, que é a de dispersão dos gametas masculinos, garantindo, em muitos casos, altos níveis de fecundação cruzada (PINHEIRO, 2014).

A polinização por engodo foi descoberta por Sprengel (1793), que descreveu a ausência de néctar em flores de diversas espécies de Orchidaceae. Estima-se que cerca de um terço das Orchidaceae sejam polinizadas por engano, pelo simples fato de não oferecerem nenhum tipo de recursos floral, onde muitas espécies utilizam diversas formas para atrair o visitante, dentre elas, a simulação de estruturas que sirvam de alimento ou mimetizem flores que oferecem recurso (ACKERMAN, 1986, BORBA; BRAGA, 2003, MICKELIUNAS, 2006, PANSARIN, 2008).

Estudos referentes à orquídea *Zygopetalum mackayi* mostraram que a espécie é apomítica facultativa, necessitando do polinizador para formação de frutos, revelando a presença de variação de número cromossômico ($2N = 48$, $2N = 72$ e $2N = 96$), ao longo de um gradiente geográfico (MOURA, 2018).

Até onde sabemos, não existem informações sobre os mecanismos de biologia reprodutiva e polinização de *Z. triste*, nem sobre dados micromorfológicos, anatômicos ou histoquímicos relacionados à presença e funcionalidade de estruturas secretoras associadas à polinização.

3. METODOLOGIA

3.1 Área de Estudo

O estudo foi realizado em área de vegetação de campo rupestre, no Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB), sudeste do Estado de Minas Gerais, Brasil, entre os municípios de Santa Rita de Ibitipoca e Lima Duarte ($21^{\circ}40'$ - $21^{\circ}44'$ S e $43^{\circ}52'$ - $43^{\circ}55'$ W) (Fig.1). Segundo a classificação de Koeppen (1948), o clima da região é do tipo Cwb: mesotérmico úmido, com verões amenos e invernos secos, sendo que a estação mais quente e úmida vai de outubro a março e a estação mais fria e seca de abril a setembro.

A precipitação anual média é de 1.532 mm e a temperatura média é de 18,9°C (CETEC, 1983).

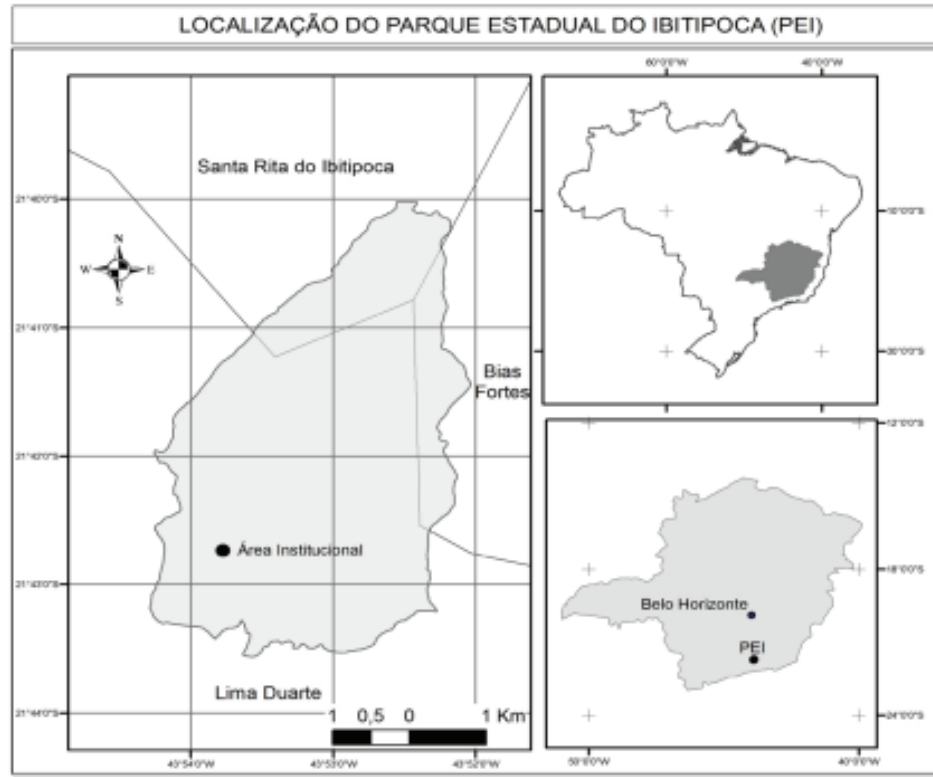


FIGURA 1: Localização do Parque Estadual do Ibitipoca, MG. Fonte: IBGE (s/d.). Org: Bento, 2012; Exec. Martins, 2012.

A Serra do Ibitipoca faz parte do Complexo da Mantiqueira, que tem seu relevo caracterizado com altitudes variáveis entre 1200 e 1800 metros (CETEC, 1983). O relevo do Parque mostra-se bastante escarpado, com paredões e grutas por toda a área (CORREA NETO, 1997). O Parque Estadual do Ibitipoca apresenta em sua área um mosaico de formações vegetais, das quais o campo rupestre ocupa a maior extensão, sendo também encontradas em seus domínios diversas formações florestais: floresta ombrófila densa (ou floresta nebulosa); mata ciliar e cerrado de altitude (SALIMENA-PIRES, 1997; FONTES, 1997; RODELA, 1998; VITTA, 2002).

3.2 Fenologia Reprodutiva

Para o estudo da fenologia reprodutiva de *Zygopetalum triste*, foram selecionados e marcados com o auxílio do GPS os indivíduos adultos em cinco áreas demarcadas de 20m x 20m, entre os gradientes de 1.668 a 1.711m de altitude, no Circuito Janela do Céu.

As observações fenológicas foram realizadas mensalmente, no período entre abril a setembro de 2019, registrando-se a presença de fenofases de floração (botões e flores) e frutificação (frutos imaturos e frutos maduros).

3.3 Morfologia e biologia florais

Através de observações feitas diretamente no campo, flores de *Z. triste* foram selecionadas ao acaso e analisadas quanto ao: horário de antese, período de longevidade e presença de odor (n= 30 flores). A longevidade floral foi avaliada em flores controle (não manipuladas), em flores após a remoção das polínias e em flores após a inserção das polínias (n= 30 flores). No laboratório de Biologia Reprodutiva do Museu Nacional (UFRJ), foram realizadas as seguintes observações: morfologia, morfometria (diâmetro e/ou largura e comprimento das flores e das estruturas florais como sépalas, pétalas, labelo, coluna e ovário), cor, forma, presença de osmóforos e receptividade estigmática (n= 30 flores) (FAEGRI; VAN DER PIJL, 1979, DAFNI, 1992). Para verificar a receptividade estigmática, 30 flores foram testadas com o método de atividade peroxidásica (DAFNI, 1992), que consiste em pingar gotas de peróxido de hidrogênio na região estigmática e verificar a reação através da formação de bolhas na mesma. Para verificar a presença de osmóforos, flores frescas em antese foram mergulhadas em solução de vermelho neutro em diluição aquosa de 1:1000, por 20 a 30 minutos e, posteriormente, lavadas em água corrente (VOGEL, 1990, DAFNI, 1992). As medidas foram tomadas a partir de paquímetro digital, sob microscópio estereoscópico (n= 30 flores).

3.4 Morfoanatomia das estruturas secretoras florais associadas à polinização

Para as análises anatomicamente as estruturas florais associadas à polinização, botões e flores foram coletados, fixados em solução de formaldeído 4% + glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,2 (GAHAN, 1984), submetidos a baixa pressão, desidratadas em série etílica, emblocados em Histoiresin[®] (Leica) e seccionados com navalha de vidro, em micrótomo rotativo, modelos Spencer 820 (American Optical Co) e RM 2255 (Leica). Secções seriadas de 1-3µm de espessura foram coradas com Azul de Toluidina 0,05% (FEDER; O'BRIEN, 1968).

As observações foram realizadas em microscópio Leica DM 750 com câmera Leica ICC50 HD e software LAS EZ versão 3.0.0.

Para detectar a presença de substâncias lipofílica e amido as amostras foram tratadas com: Sudan III e Sudan IV (JOHANSEN, 1940) e Lugol (Johansen, 1940) respectivamente.

3.5 Sistema reprodutivo

Para o estudo do sistema reprodutivo foram utilizadas técnicas de polinização manual. 1 – para verificar a ocorrência de **autopolinização espontânea**, botões florais sem nenhuma manipulação foram isolados com sacos de voil (n= 16 botões); 2- a **autopolinização manual**, que consiste em inserir a própria polínia na região estigmática de uma mesma flor, para verificar a presença de sistemas de autoincompatibilidade (n= 17 flores); 3- **polinização cruzada manual (xenogamia)**, que consiste na troca de polínias de flores de indivíduos diferentes, para estimar a produção potencial de frutos (n=20 flores); 4- flores não manipuladas e não ensacadas foram marcadas e utilizadas como **controle** para estimar a produção de frutos em condições naturais (n = 34 flores). Os frutos resultantes foram acompanhados até o estágio próximo à liberação das sementes, quando foram coletados e mensurados quanto ao comprimento e diâmetro. A fim de verificar a viabilidade das sementes produzidas, utilizou-se a técnica do carmim acético que consiste em confirmar por transparência a presença de embrião no interior da semente, considerando-se sementes férteis aquelas com embrião visível e estéreis aquelas sem embrião (KEARNS; INOUE, 1993). Para tal, foram analisadas no máximo 1000 sementes por fruto.

O grau de autocompatibilidade foi estabelecido através do cálculo do índice de autocompatibilidade (IAc), conforme Lloyd & Shoen (1992), que é o resultado da divisão entre a percentagem de frutos formados por polinizações manuais que resultam em autofertilização (autopolinização manual) e a percentagem de frutos formados por polinizações cruzadas que resultam em fertilização cruzada (xenogamia). Plantas com IAc superior a 0,75 são consideradas autocompatíveis

3.6 Visitantes florais

O registro de visitantes florais foi realizado no campo a partir de observações focais em 12 dias diferentes, em diversos horários, entre 9h e 15h, com cerca 20 horas de esforço de observação. Como a taxa de visitação em espécies de Orchidaceae geralmente é muito baixa, a frequência de visitas e a eficiência da polinização também foram estimadas indiretamente a partir das taxas de remoção e de deposição de polinários. Para tal, 338 flores foram classificadas como: flores com polinário intacto sem polínias inseridas; flores com polinário removido sem polínias inseridas e flores com polinário removido e polínias inseridas. Foram analisadas quanto à remoção e deposição de polinário diretamente no campo ao acaso durante o período de floração (TREMBLAY *et al.*, 2005).

4. RESULTADOS

4.1 Distribuição e período de florescimento

Zygopetalum triste ocorre no “Circuito Janela do Céu”, entre 1.668 a 1.711 m de altitude, sendo possível encontrar poucos indivíduos entre a Portaria e o Centro de visitantes do PEIB. Sua floração é anual e regular de abril a setembro, na estação mais fria e seca do ano, com pico de floração no mês de maio e frutificação nos meses de agosto e setembro. Durante o mês de setembro ocorre a maturação dos frutos e conseqüentemente a dispersão das sementes anemocóricas (Fig. 2).

Período de Floração e Frutificação											
J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
			bt.	fl.	fl./fr.	fl./fr.	fr.	fr.			

FIGURA 2: Fenofases reprodutivas de *Zygopetalum triste* no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais. bt- emissão de botões florais; fl-floração; fr-frutificação

4.2 Morfologia e biologia florais

Zygopetalum triste apresenta flores zigomorfas, labiadas, grandes ($56,27 \pm 15,01$ x $55,36 \pm 10,17$ mm), diurnas, conspícuas, ressupinadas, sutilmente perfumadas, dispostas em racemos laterais, com flores variando em número de três a seis e amadurecendo da base para o ápice. As sépalas: laterais ($35,01 \pm 18,24$ x $12,80 \pm 16,43$ mm) e dorsal ($32,94 \pm 18,19$ x $13,05 \pm 16,39$ mm) e pétalas laterais ($31,24 \pm 18,58$ x $11,00 \pm 16,74$ mm) são vináceas e contrastam com o labelo lilás que apresenta projeções brancas ($33,78 \pm 18,15$ x $33,63 \pm 13,02$ mm). O labelo é articulado com a coluna curta. O polinário apresenta dois pares de polínias cerosas (Fig. 3A).

A reação positiva ao vermelho neutro ocorreu nas papilas localizadas no calo na face adaxial do labelo e coluna (Fig. 3B), sugerindo a presença de osmóforo. Nossos resultados apontam para confirmação da ocorrência do osmóforo uma vez que cortes anatômicos e testes histoquímicos indicaram tecido com presença de grãos de amido (Lugol) e de gotículas lipofílicas (Sudan IV).

As flores receptivas apresentam secreção na entrada da região estigmática, onde o polinário adere com facilidade.

O período de antese das flores (longevidade) não visitadas, sem que haja remoção e/ ou inserção das polínias, estende-se até 27 dias. Após três dias da inserção experimental da polínia na cavidade estigmática, ocorre o fechamento da entrada desta região, dando início à desidratação e senescência das estruturas florais (Fig. 3C).

As flores apresentam como destaque o labelo, o qual atua como atrativo, pela cor e presença do osmóforo na região adaxial; por serem ressuspínadas o labelo também constitui plataforma de pouso durante as visitas.

O possível nectário está situado em um prolongamento do labelo originando um pequeno esporão. Entretanto sua estrutura e funcionalidade ainda encontram-se em análise (Fig.3D).

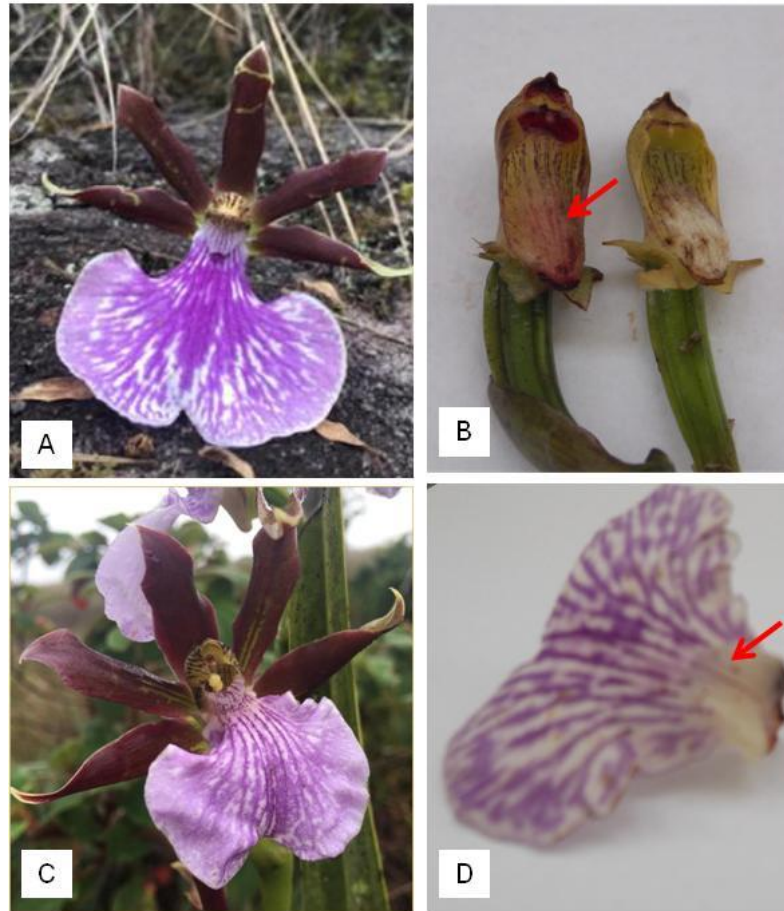


FIGURA 3: Flores de *Zygopetalum triste* no seu habitat (A); evidências do osmóforo em reação com teste de vermelho neutro - indicado pela seta (B); flores com polínia inserida na região estigmática (C) e possível localização do nectário – indicado pela seta(D).

4.3 Sistema reprodutivo

Os experimentos relativos ao sistema de reprodução encontram-se reunidos na tabela 1. A espécie não se poliniza espontaneamente, em função da presença do rostelo que impede o contato entre as polínias e a região estigmática. Sendo assim, a espécie necessita de visitas dos polinizadores para efetuar a transferência de polínias para a região estigmática.

Em praticamente todos os experimentos, ocorreu uma maior porcentagem de frutos iniciados do que de frutos maduros, revelando a ocorrência de aborto dos mesmos ao longo do desenvolvimento. Os frutos são polispérmicos, do tipo cápsula, verdes, com sementes anemocóricas medindo aproximadamente 2 mm, dispersas por fendas longitudinais (Fig. 4 A). A presença de embrião é facilmente identificada devido à coloração pelo carmim acético.

A produção de frutos alcançou maior sucesso na polinização cruzada (xenogamia), atingindo 65%, ao passo que na autopolinização manual o sucesso limitou-se a 47%. Deste modo a espécie foi considerada autoincompatível por ser revelado um $IAC = 0.72 (<0,75)$, embora alguns frutos possam se originar por autopolinização manual.

Tabela 01: Experimentos de sistema de reprodução em flores de *Zygopetalum triste* Barb. Rodr.

Experimentos	n/flores	sucesso reprodutivo
polinização cruzada (xenogamia)	20	65%
autopolinização manual	17	47%
autopolinização espontânea	16	0%
controle	35	1%

Os frutos originados de xenogamia apresentaram sementes com embrião (77,02%; n=4 frutos) Os resultados obtidos sobre a formação de frutos a partir de polinizações naturais (controle) revelou uma produção de frutos que não chega a atingir 1%. Frutos coletados ao acaso na área de estudo apresentaram sementes (58,61%; n=13 frutos) com embrião. Os frutos originados de autopolinização ainda estão em análise sobre os números de sementes com embrião.

4.4 Visitantes florais

Durante as observações de campo foi registrada a remoção de polínias através de uma visita de *Bombus morio*, que durou cerca de 5 minutos. Outras três flores foram observadas com *Apis mellifera* mortas na entrada da região estigmática (Fig.4B).

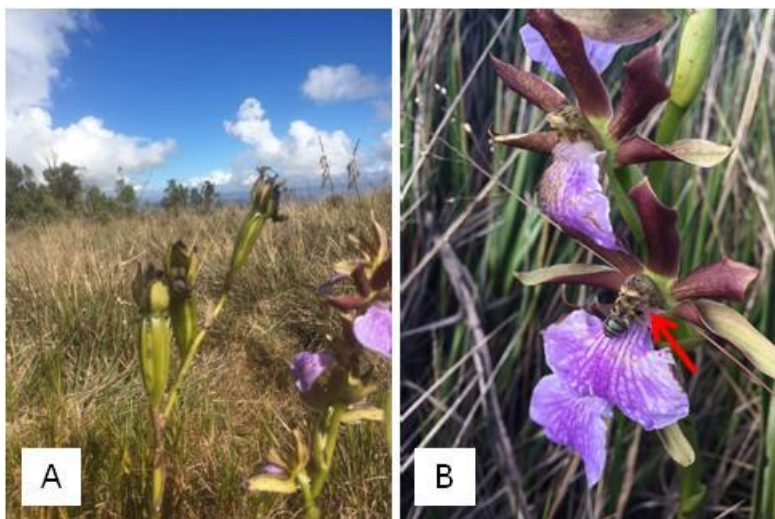


FIGURA 4: Frutos naturais (A) e *Apis mellifera* morta na entrada da região estigmática na flor de *Zygotetrum triste* (B).

A avaliação indireta das visitas mostrou que a taxa média de flores com polinário intacto e sem polínias inseridas (flores não visitadas) foi de 75%; de flores com polinário removido sem polínias inseridas foi de 12% e de flores com polinário removido e com polínias inseridas na região estigmática (efetivamente polinizadas) foi de 13% (Fig. 5).

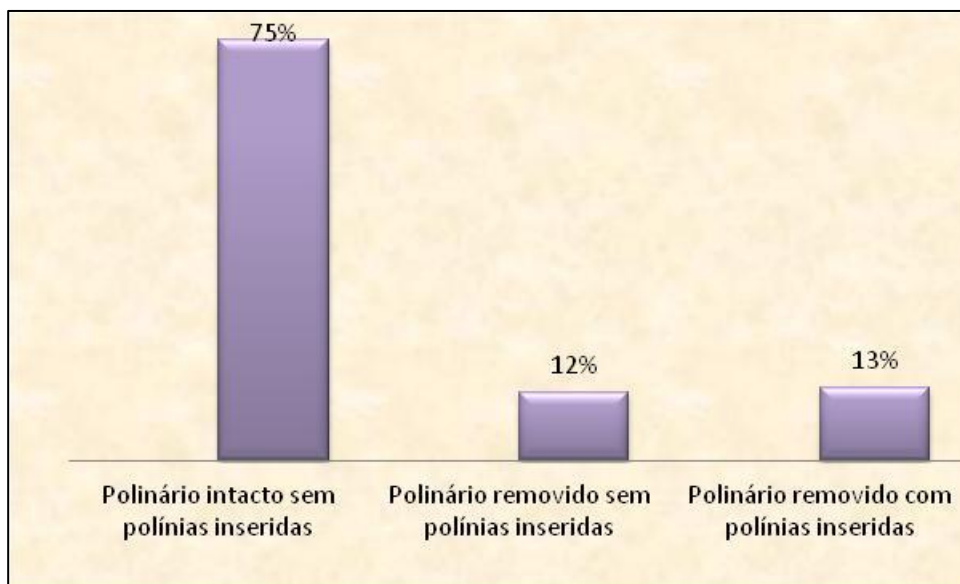


FIGURA 05: Frequência de visitação inferida a partir de observações indiretas em flores de *Zygopetalum triste*, no Parque Estadual do Ibitipoca, MG.

5. DISCUSSÃO

Zygopetalum triste apresenta atributos florais associados à melitofilia (FAEGRI et van der PIJL, 1979) tais como: flores vistosas, cor roxa, presença de plataforma de pouso, simetria bilateral, odor suave e antese diurna. A observação da visita por *Bombus morio*, por cerca de 5 minutos, confirma a hipótese de melitofilia e sugere que o recurso floral existe e é o néctar.

A presença da plataforma de pouso decorre do fenômeno da ressupinação, o qual muda a orientação de muitas flores de orquídeas durante a antese, de modo que o labelo, inicialmente numa posição adaxial/superior da flor, assume uma posição abaxial/inferior, facilitando a polinização por apresentar o labelo como uma plataforma de pouso e um guia de néctar (MONDRAGÓN-PALOMINO & THEIBEN, 2009). No caso de *Z. triste*, a presença de osmóforo entre o labelo e a coluna sugere que esta pétala modificada é também a estrutura floral mais envolvida na secreção de odor, favorecendo a localização e a identificação da fonte de néctar (?) ou de possível nectário não funcional. Tal fato também foi observado em *Epidendrum orchidiflorum*, cujas flores noturnas e ressupinadas apresentam labelo acumulando as funções de plataforma de pouso e secreção de odor (SÃO LEÃO *et al.*, 2019). Entretanto, CAMPACCI *et.al.* (2016)

concluíram que o nectário das flores de *Z. mackayi* não é funcional, sendo a espécie polinizada por engano. Em outras espécies da subfamília Epidendroideae a confirmação da funcionalidade do nectário só foi alcançada após estudos morfoanatômicos e testes histoquímicos (*Epidendrum denticulatum* e *Epidendrum orchidiflorum* - SÃO LEÃO *et.al*, 2019). Assim, preferimos não inferir ser a polinização por engano na espécie em foco, antes de concluir estes testes, uma vez que muitas espécies de Orchidaceae não apresentam secreção facilmente visualizada, sendo o sistema de polinização muitas vezes equivocadamente interpretado como por engano (ACKERMAN, 1990; CHRISTENSEN, 1992).

Flores ensacadas de *Zygopetalum triste* não formaram frutos, portanto a produção de frutos depende da ação dos polinizadores, não sendo a espécie autogâmica. No entanto, a espécie produziu alguns frutos por autopolinização manual (47%), apesar do índice de autocompatibilidade ter sido inferior a 0,75 (I_{Ac}=0,72), caracterizando a espécie como autoincompatível. O maior sucesso reprodutivo (65%) foi obtido a partir da transferência de pólen entre indivíduos diferentes (xenogamia); esses frutos continham 69,85% de sementes com embrião. Esses resultados assemelham-se àqueles obtidos por CAMPACCI *et.al.* (2016) para *Z. mackayi*, mas estes autores registraram apomixia facultativa na espécie. MOURA (2018) também observou, com frequência, a ocorrência de poliembrionia nas sementes de *Z. mackayi*, sugerindo apomixia para a espécie. Nossos experimentos permitem concluir apenas que *Z. triste* não tem apomixia obrigatória, já que flores ensacadas não produziram frutos, mas ressaltamos que não observamos sementes com poliembrionia nos frutos dos experimentos realizados em *Z. triste*.

Concluimos que a polinização cruzada manual (xenogamia) aumentou não só a produção de frutos, como também o número de sementes férteis por fruto, em relação à estimativa direta do sucesso da polinização natural (1%; n=34 flores). Outros estudos também demonstraram um sucesso reprodutivo abaixo de 10% para muitas espécies de orquídeas (CARVALHO; MACHADO, 2002, MARTINI *et al.* 2003, PANSARIN, 2003, PANSARIN *et al.* 2006, MICKELIUNAS *et al.* 2006, CARVALHO; MACHADO, 2006, PANSARIN; AMARAL, 2008, PANSARIN *et al.* 2008a PANSARIN; PANSARIN, 2010, RECH *et al.* 2010, STORTI *et al.* 2011, SÃO LEÃO *et al.* 2019).

O resultado obtido para o sucesso da polinização natural é muito mais baixo do que o observado a partir de flores com polínias inseridas (13%; n=338). Tal fato provavelmente está relacionado com o pequeno número amostral usado na avaliação de frutos por polinização natural.

A baixa taxa de visitas às flores, evidenciada tanto nas observações diretas (observação de visitas propriamente ditas) como nas indiretas (flores com polínias removidas e inseridas) e o aumento da produção de frutos nos experimentos de polinização manual (xenogamia) sugerem limitação polínica. A limitação polínica pode ser demonstrada empiricamente quando a suplementação manual de pólen cruzado sobre as áreas estigmáticas das flores aumenta a fertilidade feminina em comparação à polinização natural (LARSON; BARRETT 2000). Plantas têm sucesso reprodutivo reduzido, de modo que a produção real de frutos e de sementes fica aquém da produção potencial, ou seja, para a qual há recursos maternos disponíveis (HARDER; AIZEN, 2010). Flores com polinários removidos, mas sem polínias inseridas (12%) sugerem visitas ilegítimas ou ineficientes, resultando em perda de pólen e possivelmente influenciando negativamente o sucesso reprodutivo da espécie.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Concluimos que *Zygopetalum triste* é uma espécie autoincompatível dependente de polinizadores para a produção de frutos e sementes.*

Não podemos inferir mecanismo de polinização por engano as flores de *Z. triste* pois a funcionalidade do possível nectário ainda encontra-se em análise.

A taxa de visita dos polinizadores às flores de *Zygopetalum triste* é baixa, podendo ser inferida através da análise de flores com polínias inseridas na região estigmática.

7. REFERÊNCIAS

- ACKERMAN JD Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. **Lindleyana**. 1:108-113. 1986.
- ACKERMAN JD. Short-and Long-term limitations to fruit production in a tropical orchid. **Ecology** 71: 263-272. 1990
- BARBOSA AR, MELO MC, BORBA EL. Self-Incompatibility and myophily in Octomeria (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. **Plant Systematic and Evolution** 283: 1-8. (2009)
- BENCKE CSC, MORELLATO LPC. Comparação de dois métodos de avaliação da fenologia de plantas, sua interpretação e representação. **Revista Brasileira de Botânica**. 25(3): 269-275. 2002.
- BFG - The Brazil Flora Group. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia** 66: 1085-1113. 2015.
- BORBA EL, SEMIR J, SHEPHERD GJ. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian Pleurothallis (Orchidaceae) species. **Annals of Botany** 88: 89-99. 2001.
- BORBA EL, BRAGA PIS. Biologia reprodutiva de Pseudolaelia corcovadensis (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. **Revista Brasileira de Botânica**. 26(4): 541-549. 2003.
- CAMPACCI T. Polinização por engano e Poliembrionia no Complexo 'Zygopetalum maculatum' (Orchidaceae). Dissertação – Mestrado em Ecologia e evolução. Universidade Federal de São Paulo. Diadema. 2013.
- CAMPACCI TVS; CASTANHO CT; OLIVEIRA RLF; SUZUKIB RM; CATHARINO ELM; KOEHLERA S. Effects of pollen origin on apomixis in Zygopetalum mackayi orchids. **Flora**. São Paulo. 2016.
- CARVALHO R; MACHADO IC. Pollination of Catasetum macrocarpum (Orchidaceae) by Eulaema bombiformis (Euglossini). **Lindleyana**. 17(2): 85-90. 2002.

CARVALHO R, MACHADO IC. *Rodriguezia bahiensis* Rchb. f.: biologia floral, polinizadores e primeiro registro de polinização por moscas Acroceridae em Orchidaceae. **Revista Brasileira de Botânica**. 29(3): 461-470. 2006.

CETEC. Diagnóstico ambiental de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1983.

CHASE MW; CAMERON, K. M.; BARRET R. L. FREUDENSTEIN, J. V. DNA data and Orchidaceae Systematics: A new Phylogenetic Classification . In *Orchid conservation*. (DIXON, K. W.; KELL, S. P.; BARRET S. L.; & CRIBB, P. J., eds.). Kota Kanabalu. **Natural History Publication**. Sabah, 69-89. 2003.

CHASE MW, CAMERON KM, FREUDENSTEIN JV, PRIDGEON AM, SALAZAR G, VAN DEN BERG C & SCHUITEMAN A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 177: 151-174. 2015.

CHRISTENSEN DE. Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. **Lindleyana** 7:28-33. 1992.

CORREA NETO, A. V. Convergência quartzitos da Serra de Ibitipoca, sudeste de Minas Gerais. P 51-60. In: G. C. Rocha (coord.). *Anais do 1º Seminário de Pesquisa sobre o Parque Estadual do Ibitipoca*. Juiz de Fora, Núcleo de Pesquisa em Zoneamento Ambiental da UFJF. 1997

DAFNI A. Breeding systems. In: *Pollination ecology – A practical approach*. New York, Oxford University Press, p-25-58. 1992

DRESSLER RL. *The Orchids, Natural History and Classification*. Harvard University Press. Harvard. 1990.

DRESSLER RL. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland, OR, USA. P. 316.1993

FAEGRI G, VAN DER PIJL L, The Principles of pollination Ecology: Third Revised Edition. Pergamon Press. London, p-254. 1979.

FEDER N, O'BRIEN TP. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**. 55: 123-142. 1968.

FLORA DO BRASIL. *Zygopetalum* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB12379> . Acesso em 01 de junho de 2019.

FONTES M A. Análise da Composição Florística das Florestas Nebulares do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais. (Mestrado) C. Florestais, Universidade Federal de Lavras, MG. p-50. 1997.

GAHAN PB. 1984. Plant histochemistry and cytochemistry – na introduction. **London Academic Press** Inc. 301p.

GOMES SLG. Variação genética no complexo poliploide *Zygopetalum maculatum* (*Orchidaceae*). Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, MG. 2017.

GOVAERTS R; BERNET P; KRATOCHVIL K; GERLACH G; CARR G; ALRICH P; PRIDGEON AM; PFAHL J; CAMPACCI MA; BAPTISTA DH; TIGGES H; SHAW J; CRIBB P; GEORGE A; KREUZ K; WOOD J. World checklist of Orchidaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em <http://apps.kew.org/wcsp/>. Acessado em 23 setembro 2019.

HARDER LD; AIZEN MA. Floral adaptation and diversification under pollen limitation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 365, p. 529-543. 2010.

HOEHNE, F. C. **Zygopetalum**. Flora Brasílica. Orchidaceas. V-12. N-1. P 1-12. 1953.

JOHANSEN DA. **Plant Microtechnique**. London: Mac.Graw-Hill Comp.Book Inc. 1940.

KEARNS AC; INOUE DW. Technique for pollination biologists. **University press of Colorado**. USA. 1993.

KOCKYAN A, ENDRESS PK. Floral structure and development in *Apostasia* and *Neuwiedia* (Orchidaceae) and their relationships to other Orchidaceae. **International Journal of Plant Sciences** 162, 847-867. 2001.

LARSON BMH; BARRET SCH; A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. **Biological Journal of the Linnean Society**. v. 69, p. 503-520. 2000.

MARTINI P, SCHLINDWEIN C, MONTENEGRO A. Pollination, Flower Longevity and Reproductive Biology of *Gongora quinquenervis* Ruíz and Pavón (Orchidaceae) in an Atlantic Forest Fragment of Pernambuco, Brazil. **Plant Biology**. 5:495-503. 2003.

MANDRÁGON-PALOMINO M; THEIBEN G. Why are orchid flowers so diverse? Reduction of evolutionary constraints by paralogues of class B floral homeotic genes. **Annals of Botany**. 104: 583-594. 2009.

MICKELIUNAS L, PANSARIN ER, SAZIMA M. Biologia floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucesso reprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). **Revista Brasileira de Botânica**. 29 (2): 251-258. 2006.

Missouri Botanical Garden (MOBOT). **TROPICOS**. Disponível em: <http://www.mobot.org>. Acessado em 12 de setembro de 2019.

MOURA AY. Orquídeas apomíticas facultativas *Zygopetalum mackayi* preferem reprodução sexuada em zona de contato entre citótipos. UNICAMP – Instituto de Biologia. Campinas. 2018.

PABST GFJ; DUNGS F. **Orchidaceae Brasiliensis**. Hildesheim: Kurt Schemersow. V-1. 1975.

PANSARIN ER. Biologia floral de *Cleistes macrantha* (Barb. Rodr.) Schltr. (Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae). **Revista Brasileira de Botânica** 26(1): 73-80. (2003).

PANSARIN ER, BITTRICH V, AMARAL MCE. At Daybreak – Reproductive biology and isolating mechanisms of *Cirrhaea dependens* (Orchidaceae). **Plant Biology** 8: 494-502. 2006.

PANSARIN ER. Reproductive biology and pollination of *Govenia utriculata*: A syrphid fly orchid pollinated through a pollen-deceptive mechanism. **Plant Species Biology** 23: 90-96. 2008.

PANSARIN ER, AMARAL MCE. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? **Plant Biology** 10: 211-219. 2008.

PANSARIN LM, PANSARIN ER, SAZIMA. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodinae pollinated by deceit. **Plant Biology** 10: 650-659. 2008.

PANSARIN ER, PANSARIN LM. Reproductive biology of *Trichocentrum pumilum*: an orchid pollinated by oil-collecting bees. **Plant Biology** 13(2011): 576-581. 2010.

PANSARIN ER. Biologia reprodutiva e polinização em *Epidendrum paniculatum* Ruiz & Pavón (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26 (2):203-211. 2003

PINHEIRO F. **Biologia da polinização**. 1 ed. C. 15. Polinização por engodo 327-341. Rio de Janeiro. 2014.

PRIDGEON AM, CRIBB PJ, CHASE, MW; RASMUSSEN FN. Genera Orchidacearum. Vol. 1. General introduction, Apostasioideae, Cyripedioideae. Oxford University Press Inc., Oxford. 240p. 1999.

PRIDGEON AM, CRIBB PJ, Chase MW; Rasmussen FN. Genera Orchidacearum, v. 4: Epidendroideae (part 1). Oxford University Press, New York. 2005.

PRIDGEON AM, CRIBB PJ, CHASE MW; RASMUSSEN FN. Genera Orchidacearum. Vol. 5. Epidendroideae (Part II). Oxford University Press Inc., Oxford. 664p. 2009.

PROCTOR M, YEO P, LACK A. The natural history of pollination. Harper Collins, London. 479p. 1996.

RECH AR, ROSA YBCJ, MANENTE-BALESTIERI FCL. Aspects of the reproductive biology of *Brassavola cebolleta* Rchb. f. (Orchidaceae). **Acta Scientiarum Biological ScienceS** 32(4): 335-341. 2010.

RODELA LC. Cerrados de altitude e campos rupestres do Parque Estadual de Ibitipoca, sudeste de Minas Gerais: Distribuição e florística for sibfisionomias da vegetação. **Revista do Departamento de Geografia** n-12, p- 163-189. 1998

ROMANINI RP. A família Orchidaceae no Parque Estadual da Ilha do Cardoso. Dissertação - Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Cananéia, SP. 2006.

SADDI EM. Orchidaceae dos Afloramentos Rochosos da Pedra da Gávea, Parque Nacional da Tijuca. Dissertação (Mestrado) - Intituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro/ Escola Nacional de Botânica Tropical. Rio de Janeiro, RJ. 2008.

SALIMENA-PIRES, FR. **Aspectos fisionômicos e vegetacionais do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil.** p-60-61. In: Rocha (coord.). Anais do 1º Seminário de Pesquisa sobre o Parque Estadual de Ibitipoca. Juiz de Fora, Núcleo de Pesquisa em Zoneamento Ambiental da UFJF. 1997.

SÃO LEÃO LC; SÁ-HAIAD B; RODARTE ATA; PIMENTEL RR; BENEVIDES CR; SANTIAGO-FERNANDES LDR; LIMA HÁ. Reproductive biology of two synchronopatric neotropical species of *Epidendrum* (Orchidaceae). **Flora**. Rio de Janeiro. 2019.

SHEEHAN TJ; SHEEHAN M. **An illustrated survey of orchid genera.** Timber, Portland. 1994.

SINGER RB, KOEHLER S, Pollinarium morphology and pollination mechanism in three sympatric. *Goodyerinae* orchids from southeastern Brazil. **Annals of Botany**. 2004.

SOUZA VC, LORENZI H. Botânica Sistemática; guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira. Baseado em APG II. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum. 2005.

STORTI EF, BAGA PIS., STORTI-FILHO A. Biologia reprodutiva de *Cattleya eldorado* uma espécie de Orchidaceae das campinas amazônicas. **Acta Amazonica** 41(3): 361-368. 2011.

THE PLANT LIST. Version 1.1. Publicado na Internet. Disponível em Acesso em 25 setembro 2017.

TREMBLAY RL, ACKERMAN JD, ZIMMERMAN JK, CALVO RN. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasodic journey to diversification. **Biological Journal of Linnean Society**. n84: 1-54. 2005.

VAN DER PIJL L. DODSON CH. *Orchid flowers: their pollination and evolution.* University of Miami Press, Coral Gables. 214p. 1966.

VITTA F. Diversidade e conservação da flora nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais. P-90-94. In: EL ARAUJO; AN Moura; EVSB Sampaio; LMS GESTINARI; JMT Carneiro (eds.). Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco/ Sociedade Botânica do Brasil. 2002.

VOGEL, S. The role of scent glands in pollination: On the structure and function of osmophore. New Delhi: Amerind xvi, p- 202. 1990.