

RÚBIA SANTOS FONSECA

**ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS DE PLANTAS DE SUB-BOSQUE
DE FLORESTA ATLÂNTICA EM DIFERENTES ESTÁDIOS
SUCESSIONAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Botânica,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

Fonseca, Rúbia Santos, 1984-

F676e
2013

Estratégias reprodutivas de plantas de sub-bosque de
Floresta Atlântica em diferentes estádios sucessionais / Rúbia
Santos Fonseca. – Viçosa, MG, 2013.

vi, 50f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Milene Faria Vieira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Orquídea - Reprodução. 2. Polinização. 3. Mata
Atlântica. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Vegetal. Programa de Pós-Graduação em Botânica.
II. Título.

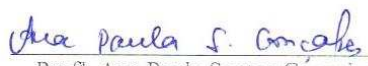
CDD 22. ed. 574.4

RÚBIA SANTOS FONSECA

**ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS DE PLANTAS DE SUB-BOSQUE
DE FLORESTA ATLÂNTICA EM DIFERENTES ESTÁDIOS
SUCESSIONAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Botânica,
para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 17 de junho de 2013.


Prof.^a Ana Paula Santos Gonçalves


Prof. Fabrício Alvim Carvalho


Prof.^a Flávia Monteiro Coelho Ferreira


Prof. Sebastião Venâncio Martins


Prof.^a Milene Faria Vieira
(Orientadora)

RESUMO

FONSECA, Rúbia Santos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2013. **Estratégias reprodutivas de plantas de sub-bosque de Floresta Atlântica em diferentes estádios sucessionais.** Orientadora: Milene Faria Vieira. Co-orientadora: Leonor Patricia Cerdeira Morellato.

As características reprodutivas das comunidades vegetais são influenciadas pelo seu histórico de perturbação. A Mata do Paraíso, um fragmento de 195 ha de Floresta Atlântica em Viçosa, Minas Gerais, sudeste brasileiro, apresenta ambientes que foram submetidos a diferentes históricos de usos e correspondem aos seguintes estádios sucessionais: pasto abandonado (Pasto) e florestas em estágio inicial (FEI), médio (FEM) e avançado (FEA) de regeneração. Para compreender a distribuição das estratégias reprodutivas nessa comunidade é necessária a análise das espécies em relação aos seus estádios sucessionais. Foram objetivos: 1) verificar a distribuição da frequência (% de espécies) e da abundância (% de indivíduos) dos sistemas sexuais nos hábitos de crescimento e nos estádios sucessionais em sub-bosque; 2) verificar se a eficiência da polinização é afetada pela idade da flor em *Corymborkis flava* (Sw.) Kuntze, orquídea terrestre de sub-bosque de FEA; 3) confirmar a autogamia em *Cyclopogon variegatus* Barb. Rodr., orquídea terrestre de sub-bosque de FEM, descrever o seu mecanismo de autopolinização e interpretar as consequências ecológicas dessa estratégia reprodutiva. Para o primeiro objetivo, 24 parcelas foram distribuídas nos diferentes estádios sucessionais e obtidas as espécies, seus hábitos, sistemas sexuais e abundância de indivíduos. Para o segundo objetivo, flores de *C. flava* foram submetidas a observações morfológicas (aspectos do perianto e da área estigmática), teste químico (teste para atividade enzimática com peróxido de hidrogênio) e polinizações manuais. Para o terceiro objetivo, flores de *C. variegatus*, em diferentes estádios, foram analisadas com auxílio da microscopia de fluorescência e de luz (cortes anatômicos); foram conduzidos testes de polinização, de viabilidade das sementes, realizadas observações de polinizadores e de remoção de polinários. Foram encontrados cinco sistemas sexuais: hermafroditismo (em 80,5% das espécies), dioícia (12,4%), monoícia (5,3%), andromonoícia (0,88%) e ginomonoícia (0,88%). O hábito e os estádios sucessionais interferiram na distribuição dos sistemas sexuais. Houve associação das ervas ao hermafroditismo, das trepadeiras à monoícia e das arvoretas à dioícia. A andromonoícia e a ginomonoícia foram restritas às ervas. Em relação aos estádios, a andromonoícia foi restrita ao Pasto, a ginomonoícia à FEI, enquanto a monoícia não foi observada na FEA e a dioícia predominou nesse estágio. Tais

diferenças parecem determinadas pela gama de hábitos que compõem o sub-bosque de cada estágio sucessional. A frequência ou a abundância dos sistemas sexuais nos hábitos permitiu a mesma conclusão: a distribuição dos hábitos está relacionada à distribuição dos sistemas sexuais. No entanto, para os estágios sucessionais a frequência e a abundância propiciaram conclusões distintas. As abundâncias dos sistemas sexuais diferiram entre os estágios, enquanto as frequências foram semelhantes. As observações morfológicas e o teste químico nas flores de *C. flava* foram igualmente efetivos na definição do período de receptividade estigmática e de polinização. Porém, a maior frutificação no primeiro e segundo dias de antese mostrou que o melhor método para definir a receptividade estigmática, incluindo a sua magnitude, é a polinização manual. Dessa forma, para orquídeas com flores longevas, são recomendadas polinizações cruzadas *in vivo* para avaliar o grau máximo de receptividade estigmática e o real potencial reprodutivo das flores. *C. variegatus* apresentou a morfologia funcional da coluna distinta da de outras espécies de Spiranthoideae. Essas divergências incluem a área estigmática no interior da cavidade do clinândrio, característica única, e a perda da hercogamia, tornando a autogamia obrigatória. Esse mecanismo de autopolinização é novo para as orquídeas e pode favorecer o estabelecimento da população estudada, onde não há polinizadores. Esses resultados demonstram que o sub-bosque apresenta diversidade de estratégias reprodutivas, que garantem a sobrevivência das suas espécies em ambientes com diferentes níveis de perturbação.

ABSTRACT

FONSECA, Rúbia Santos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2013. **Reproductive strategies of understory plant species of Atlantic Forest in different successional stages.** Adviser: Milene Faria Vieira. Co-adviser: Leonor Patricia Cerdeira Morellato.

The reproductive traits of a plant community are influenced by its disturbance history. Mata do Paraíso is an Atlantic Forest fragment with 195 ha in the municipality of Viçosa, Minas Gerais State, Southeastern Brazil. It comprises different environments that have undergone varied uses corresponding to the following successional stages: abandoned pasture (Pasture) and forests at early (FEI), intermediate (FEM) and advanced (FEA) stages of regeneration. To understand the distribution of reproductive strategies in this plant community, it is necessary to analyze the species in relation to their successional stages. The objectives of this study were: 1) to examine the distribution of frequency (% of species) and abundance (% of individuals) of the sexual system in the different growing habits and in the understory plant species at the four successional stages, 2) to verify whether the flower age of *Corymborkis flava*, a terrestrial orchid that grows in areas of advanced regeneration (FEA), affects pollination efficiency; 3) to confirm the autogamy in *Cyclopogon variegatus* Barb. Rodr., a terrestrial orchid that grows in areas of intermediate regeneration (FEM), as well as to describe the self-pollination mechanism and interpret the ecological consequences of this reproductive strategy. For the first objective, 24 plots were distributed in different successional stages for identification of plant species, their growing habits, the sexual systems and the abundance of individuals per plant species. For the second objective, flowers of *C. flava* were undergone to morphological evaluations (aspects of the perianth and stigmatic area), chemical test (test for enzymatic activity with hydrogen peroxide) and hand-pollination tests. For the third objective, flowers of *C. variegatus* were analyzed using light microscopy (anatomical sections) and fluorescence; besides, we made tests of pollination and the viability of seed, observations of pollinators and pollinaria removal. We find five sexual systems: hermaphroditism (in 80.5% of the species), dioecy (12.4%), monoecy (5.3%), andromonoecy (0.88%) and gynomonoecy (0.88%). The growing habits and the successional stages interfered in the distribution of sexual systems. We observed association of herbs with hermaphroditism, of vines with monoecy and treelets with dioecy. Andromonoecy and gynomonoecy were restricted to herbs. Regarding to stages, andromonoecy was restricted to Pasture, gynomonoecy to FEI; no monoecy was observed in FEA and dioecy prevailed at this stage. Such

differences seem determined by the range of habits in each successional stage. The frequency or abundance of sexual systems related with growing habits allowed the same conclusion: habits distribution is related to distribution of sexual systems. However, to successional stages the frequency or abundance resulted in different conclusions. The abundances of sexual systems differed between stages, while the frequencies were similar. Morphological observations and chemical test, in *C. flava* flowers, were equally effective in defining the period of stigmatic receptivity as well as pollination. However, the greater fruit setting on the first and second day of anthesis showed that the best method to define the stigma receptivity, including its magnitude, was hand-pollination. We conclude that, for orchid species with long-lasting flowers, cross-pollination *in vivo* is recommended to evaluate the maximum degree of stigmatic receptivity and the real reproductive potential of the flowers. The functional morphology of the *C. variegatus* column is distinct of the column of the other Spiranthoideae species. These differences include the stigmatic area in the clinandrium cavity, unique feature, and the loss of herkogamy, promoting obligatory autogamy. This self-pollination mechanism is new to orchids and seems to have favored the establishment of the population in the study area, where pollinators are absent. All these results demonstrated that the understory plant species of Atlantic forest present a variety of reproductive strategies, which ensure their survival in environments with different levels of disturbance.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	2
Capítulo 1: Sistemas sexuais do sub-bosque de Floresta Atlântica: distribuição nos hábitos de crescimento e estádios sucessionais	
Resumo.....	5
1.1. Introdução	6
1.2. Material e Métodos	7
1.2.1. Área de estudo	7
1.2.2. Obtenção dos dados	9
1.2.3. Análise dos dados	9
1.3. Resultados.....	10
1.3.1. Distribuição dos sistemas sexuais nos hábitos de crescimento.....	12
1.3.2. Distribuição dos sistemas sexuais entre os estádios sucessionais.....	14
1.4. Discussão.....	17
1.5. Agradecimentos.....	21
1.6. Referências Bibliográficas.....	21
Capítulo 2: Is the pollination efficiency of the long-lived flowers of orchids affected by age?	
Resumo.....	25
Abstract.....	25
Acknowledgements.....	29
References.....	29
Capítulo 3: Autopolinização em <i>Cyclopogon variegatus</i> (Spiranthoideae, Cranichideae): novo mecanismo em orquídea neotropical em expansão territorial	
Resumo.....	33
3.1. Introdução.....	34
3.2. Material e Métodos.....	35
3.2.1. Área de estudo e espécie.....	35
3.2.2. Morfologia funcional da coluna.....	36
3.2.3. Sistema reprodutivo e visitantes florais.....	37
3.2.4. Análises estatísticas.....	37
3.3. Resultados.....	38
3.3.1. Morfologia da coluna e mecanismo de autopolinização.....	38
3.3.2. Sistema reprodutivo e visitantes florais.....	39
3.4. Discussão.....	40
3.4.1. Mecanismo de autopolinização.....	40
3.4.2. Consequências ecológicas.....	42
3.5. Agradecimentos.....	43
3.6. Referências Bibliográficas.....	44
CONCLUSÕES GERAIS.....	50

INTRODUÇÃO GERAL

Informações sobre as estratégias reprodutivas de espécies de comunidades vegetais são indispensáveis para sua conservação e manejo (Kearns & Inouye 1997; Machado & Lopes 2004). No entanto, pouco se sabe sobre essas estratégias em florestas tropicais, devido à dificuldade em se analisar todos os seus componentes, por se tratar de comunidades megadiversas (Johnson & Steiner 2000; Ramirez 2004). Nessas florestas, o sub-bosque, estrato da vegetação representado por plantas adultas (reprodutivamente ativas) com até cinco metros de altura (Kress & Beach 1994), se destaca dos demais estratos pelo elevado número de espécies vegetais com diferentes características florais e hábitos (Ramírez 1989; Bawa 1990; Kress & Beach 1994). No sub-bosque, as diferentes condições microclimáticas influenciam diretamente as estratégias reprodutivas das plantas (Kato 1996), promovendo grande diversidade de mecanismos reprodutivos (Kress & Beach 1994).

Dentre as florestas tropicais está a Floresta Atlântica, um dos biomas mais ameaçados do mundo (Myers *et al.* 2000). Atualmente esse bioma está totalmente fragmentado, restando apenas um pequeno percentual de sua cobertura original. Esses fragmentos apresentam diferentes tamanhos e estádios sucessionais (Ribeiro *et al.* 2009). Cada estágio sucessional é representado por uma flora específica em resposta à intensidade de um distúrbio e, ou ao tempo que esse distúrbio ocorreu (Horn 1974). Considerando que as características reprodutivas das espécies que compõem uma comunidade são influenciadas pelo seu histórico de perturbação (Opler *et al.* 1980; Ibarra-Manriquez & Oyama 1992; Chazdon *et al.* 2003), a análise das estratégias reprodutivas das espécies de Floresta Atlântica deve ser relacionada ao estágio sucessional em que cada espécie habita.

A Zona da Mata de Minas Gerais, inserida no domínio dos mares de morros (Ab'Saber 2003), é predominantemente coberta por florestas semidecíduas, uma formação da Floresta Atlântica tolerante à sazonalidade climática (Oliveira-Filho & Fontes 2000). Nessa região está o município de Viçosa, caracterizado pela topografia montanhosa, que favorece a formação de ambientes diferenciados e, conseqüentemente, a manutenção de elevada diversidade, pois em pequenas áreas há diferenças na composição florística influenciadas pelo gradiente topográfico (topo, encosta e baixada; Martins *et al.* 2003; Ferreira-Júnior *et al.* 2007).

Dentre os remanescentes florestais de Viçosa, destaca-se a Mata do Paraíso, por ser o maior fragmento, com 195 ha. Devido ao relevo e às perturbações no passado, a Mata do Paraíso é composta por um mosaico de habitats e estádios sucessionais, que

incluem pastos abandonados, florestas em diferentes estádios sucessionais, além de pequenas áreas de brejo (Silva-Júnior *et al.* 2004). Nesse fragmento, há registros de espécies vegetais endêmicas (Vieira & Grabalos 2003) e de espécies de borboletas exigentes em condições ambientais e indicadoras de ambientes preservados (Cruz *et al.* 2012).

Estudos preliminares da flora do sub-bosque da Mata do Paraíso demonstraram elevada riqueza; foram inventariadas cerca de 500 espécies não-arbóreas nesse remanescente (Vieira & Fonseca 2011). Os estudos em biologia reprodutiva realizados nesse fragmento, englobando 10% das espécies, demonstraram grande variedade de sistemas reprodutivos e sexuais, além de estratégias reprodutivas inéditas (p. ex. Pereira *et al.* 2006; Vieira *et al.* 2007; Bessa *et al.* 2010; Duarte-Silva *et al.* 2010; Vieira *et al.* 2012; Fonseca *et al.* 2013).

Nesse contexto, objetivou-se descrever e analisar as estratégias reprodutivas de espécies do sub-bosque da Mata do Paraíso em diferentes estádios sucessionais. Foram objetivos específicos: 1) analisar a distribuição da frequência (% de espécies) e da abundância (% de indivíduos) dos sistemas sexuais nos hábitos e em quatro estádios sucessionais; 2) verificar se a eficiência da polinização é afetada pela idade da flor em *Corymborkis flava* (Sw.) Kuntze, orquídea com flores longevas encontrada em floresta em estágio avançado de regeneração; 3) confirmar a autogamia em *Cyclopogon variegatus* Barb. Rodr., orquídea encontrada em floresta em estágio médio de regeneração, descrever o seu mecanismo de autopolinização e interpretar as consequências ecológicas dessa estratégia reprodutiva. Cada objetivo pertence a um dos capítulos desta tese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SÁBER, A.N. 2003. Os domínios da natureza do Brasil - Potencialidades paisagísticas. São Paulo: Ateliê, 159p.
- BAWA, K.S. 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21:399-422.
- BESSA, J.; CRUZ, K.C. ; VIEIRA, M.F. 2010. Location of the stigmatic areas in *Mutisia speciosa* Aiton ex Hook. a new floral feature in Asteraceae. *Sexual Plant Reproduction* 23:207-209.
- CHAZDON, R.L.; CAREAGA, S.; WEBB, C.; VARGAS, O. 2003. Community and phylogenetic structure of reproductive traits of woody species in wet tropical forests. *Ecological Monographs* 73:331-348.
- CRUZ, K.C.; LELIS. S.M.; GODINHO, M.; FONSECA, R.S.; FERREIRA, P.S.F.; VIEIRA, M.F. 2012. Species richness of anthophilous butterflies (Lepidoptera, Rhopalocera) of an Atlantic Forest fragment in southeastern Brazil. *Revista Ceres* 59:571-579.

- DUARTE-SILVA, E.; VIEIRA, M.F.; BITTENCOURT JR., N.S.; GARCIA, F.C.P. 2010. Polimorfismo floral em *Valeriana scandens* L. (Valerianaceae). *Acta Botanica Brasílica* 24:871-876.
- FERREIRA JÚNIOR, W.G.; SILVA, A.F.; SCHAEFER, C.E.G.R.; MEIRA NETO, J.A.A.; DIAS, A.S.; IGNACIO, M.; MEDEIROS, M.C.M.P. 2007. Influence of soils and topographic gradients on tree species distribution in a Brazilian Atlantic Tropical Semideciduous Forest. *Edinburgh Journal of Botany* 64:137-157.
- FONSECA, R.S.; CAMPOS, L.A.O.; VIEIRA, M.F. 2013. Melittophily and ornithochory in *Tilesia baccata* (L.f.) Pruski: an Asteraceae of the Brazilian Atlantic Forest understory with fleshy fruits. *Flora* 208:370- 380.
- HORN, H.S. 1974. The ecology of secondary succession. *Annual Reviews* 5:25-37.
- IBARRA-MANRIQUEZ, G; OYAMA, K. 1992. Ecological correlates of reproductive traits of mexican rain forest trees. *American Journal of Botany* 79:383-394.
- IVANAUSKAS, N.M.; ASSIS, M.C. 2012. Formações florestais brasileiras. *In*: MARTINS, S.V. (Ed.), *Ecologia de florestas tropicais do Brasil*. Viçosa: Editora UFV, pp. 107-140.
- JOHNSON, S.D.; STEINER, K.E. 2000. Generalization versus specialization in plant pollinator systems. *TREE* 15:140-143.
- KATO, M. 1996. Plant-pollinator interactions in the understory of a lowland mixed dipterocarp forest in Sarawak. *American Journal of Botany* 83:732-743.
- KEARNS, C.; INOUE, D. 1997. Pollinators, Flowering plants, and conservation biology. *Bioscience* 47:297-307.
- KRESS, W.J.; BEACH, J.H. 1994. Flowering plant reproductive systems. *In*: MACDADE, L.A.; BAWA, K.S.; HESPENHEIDE, H.A.; HARTSHORN, G.S. (Eds.), *La Selva - Ecology and natural history of a neotropical rain forest*. Chicago: University of Chicago Press, pp.161-182.
- MACHADO, I.C.; LOPES, A.V. 2004. Floral traits and pollination systems in the caatinga, a Brazilian tropical dry forest. *Annals of Botany* 94:365-376.
- MARTINS, S.V.; SILVA, N.R.S.; SOUZA, A.L.; MEIRA NETO, J.A. 2003. Distribuição de espécies arbóreas em um gradiente topográfico de Floresta Estacional Semidecidual em Viçosa, MG. *Scientia Florestalis* 64:172-181.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853-858.
- OLIVEIRA-FILHO, A.T.; FONTES, M.A.L. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil, and the influence of climate. *Biotropica* 32:793-810.
- OPLER, P.A.; BAKER, H.G.; FRANKIE, G.W. 1980. Plant reproductive characteristics during secondary succession in Neotropical lowland forest ecosystems. *Biotropica* 12:40-46.
- PEREIRA, Z.V.; VIEIRA, M.F.; OKANO, R.M.C. 2006. Fenologia da floração, morfologia floral e sistema de incompatibilidade em espécies distílicas de Rubiaceae em fragmento florestal do Sudeste brasileiro. *Revista Brasileira de Botânica* 29:471-480.
- RAMIREZ, N. 1989. Biología de polinización en una comunidad arbustiva tropical de la alta Guayana Venezolana. *Biotropica* 21:319-330.
- RAMIREZ, N. 2004. Ecology of pollination in a tropical Venezuelan savanna. *Plant Ecology* 173:171-189.
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142:1141-1153.

- SILVA-JUNIOR, W.M.; MARTINS, S.V.; SILVA, A. F.; MARCO-JUNIOR, P. 2004. Regeneração natural de espécies arbustivo-arborea em dois trechos e uma Floresta Estacional Semidecidual, Viçosa, MG. *Scientia Forestalis* 66:169-179.
- VIEIRA, M. F.; FONSECA, R.S.; SHEPHERD, G.J. 2012. Morfologia floral e mecanismos de polinização em espécies de *Oxypetalum* R. Br. (Apocynaceae, Asclepiadoideae). *Revista Brasileira de Biociências* 10:314-321.
- VIEIRA, M.F.; ANDRADE, M.R.S.; BITTENCOURT JR., N.S.; OKANO, R.M.C. 2007. Flowering phenology, nectary structure and breeding system in *Corymborkis flava* (Spiranthoideae: Tropicidae), a terrestrial orchid from a Neotropical forest. *Australian Journal of Botany* 55:635-642.
- VIEIRA, M.F.; FONSECA, R.S. 2011. Interações entre plantas e polinizadores em sub-bosque de Floresta Atlântica. Relatório de Projeto. Fapemig Edital PPM III/2009.
- VIEIRA, M.F.; GRABALOS, R. 2003. Sistema reprodutivo de *Oxypetalum mexiae* Malme (Asclepiadaceae), espécie endêmica de Viçosa, MG, Brasil, em perigo de extinção. *Acta Botanica Brasilica* 17:137-145.

Capítulo 1

Sistemas sexuais do sub-bosque de Floresta Atlântica: distribuição nos hábitos de crescimento e estádios sucessionais

Resumo

Objetivou-se avaliar se o hábito de crescimento e o estágio sucessional estão relacionados à distribuição da frequência (% de espécies) e da abundância (% de indivíduos) dos sistemas sexuais em sub-bosque de floresta semidecídua (formação do domínio da Floresta Atlântica) em Viçosa, Minas Gerais, sudeste brasileiro. Para tanto, 24 parcelas de 100 m² foram distribuídas igualmente entre quatro estádios sucessionais e avaliadas quinzenalmente de abril de 2011 a março de 2012; todas as parcelas foram avaliadas em um mesmo dia. Os estádios foram: pasto abandonado (Pasto) e florestas em estágio inicial (FEI), médio (FEM) e avançado (FEA) de regeneração. Foram identificadas, em cada parcela, as espécies que se reproduziram com até 5 m de altura e anotados os seus hábitos, sistemas sexuais e abundância de indivíduos. Esses dados foram submetidos ao teste G, a análises de variância e à Análise de Componente principal (PCA). Na área de estudo foram encontrados cinco sistemas sexuais: hermafroditismo (em 80,5% das espécies), dioícia (12,4%), monoícia (5,3%), andromonoícia (0,88%) e ginomonoícia (0,88%). O hábito influenciou na distribuição dos sistemas sexuais. As ervas relacionaram-se ao hermafroditismo, as trepadeiras à monoícia e as arvoretas à dioícia. A andromonoícia e a ginomonoícia foram restritas às ervas. A distribuição dos sistemas sexuais também foi distinta entre os estádios sucessionais. A andromonoícia foi restrita ao Pasto, a ginomonoícia à FEI, enquanto a monoícia não foi observada na FEA e a dioícia predominou nesse estágio. Tais diferenças parecem determinadas pela gama de hábitos que compõem o sub-bosque de cada estágio. A frequência ou a abundância dos sistemas sexuais nos hábitos permitiu a mesma conclusão: a distribuição dos hábitos está relacionada à distribuição dos sistemas sexuais. No entanto, para os estádios sucessionais a frequência e a abundância propiciaram conclusões distintas. As abundâncias dos sistemas sexuais diferiram entre os estádios, enquanto as frequências foram semelhantes. Esses resultados confirmam a existência de padrões na distribuição dos sistemas sexuais nos hábitos e nos estádios sucessionais em sub-bosque de Floresta Atlântica.

Palavras-chave: dioícia, floresta semidecídua, hermafroditismo, monoícia

1.1. Introdução

Os sistemas sexuais em angiospermas são diversos (Yampolsky & Yampolsky 1922). Desde os tempos de Darwin tem sido constante o interesse em se compreender os complexos processos da reprodução sexuada desse grupo de plantas (Sakai & Weller 1999). As estratégias reprodutivas, incluindo o sexo das flores, determinam o sucesso reprodutivo na comunidade (Opler *et al.* 1980; Bawa & Beach 1981). Esse sucesso regula a capacidade de colonização das plantas, no ambiente em que estão aptas a ocupar (Baker 1955; 1967).

Em comunidades tropicais, a distribuição dos sistemas sexuais das plantas não é aleatória. Estudos demonstraram que a ocorrência e frequência dos sistemas sexuais modificam-se entre os tipos de vegetação (Ramirez 1993; Matallana *et al.* 2005), o estrato florestal (Kress & Beach 1994), o hábito de crescimento (Bawa & Opler 1975; Bullock 1985; Ramirez 1993; Matallana *et al.* 2005) e os estádios sucessionais (Opler *et al.* 1980; Ibarra-Manriquez & Oyama 1992; Chazdon *et al.* 2003).

Kress & Beach (1994) observaram, em florestas na Costa Rica, que a monoícia é mais frequente no sub-bosque, que no dossel e a dioícia é rara no sub-bosque e comum nos estratos superiores. Matallana *et al.* (2005) encontraram, em uma área de restinga no Brasil, a dioícia concentrada em ambientes florestais e ausente em formações abertas. Em relação aos hábitos, foi registrada maior frequência da dioícia em espécies arbóreas e do hermafroditismo em herbáceas, em diferentes comunidades (Ormond *et al.* 1991; Oliveira 1996; Matallana *et al.* 2005). Segundo Chazdon *et al.* (2003), em florestas úmidas da Costa Rica sujeitas a diferentes históricos de perturbação, a frequência dos sistemas sexuais não variou em espécies arbóreas. Mas, quando esses autores avaliaram a abundância relativa dos sistemas sexuais, calculada pelo número total de indivíduos das espécies agrupados por sistema, foi possível observar variações; houve diminuição da abundância do hermafroditismo e aumento da monoícia e da dioícia em função do avanço sucessional.

A carência de informações sobre as estratégias reprodutivas em florestas tropicais é devida à dificuldade de se analisar todos os componentes em comunidades megadiversas (Johnson & Steiner 2000; Ramirez 2004). Nessas florestas, o sub-bosque, comparado ao dossel, se destaca pelo elevado número de espécies vegetais com diferentes características florais e hábitos (Ramírez 1989; Bawa 1990; Kress & Beach 1994). No sub-bosque, as diferentes condições microclimáticas influenciam diretamente as estratégias reprodutivas das plantas (Kato 1996), promovendo a ocorrência de grande diversidade de estratégias, o que distingue esse estrato do dossel.

No Brasil, um país que se destaca pela elevada biodiversidade, a distribuição dos sistemas sexuais foi analisada em poucas comunidades vegetacionais, pertencentes aos domínios do Cerrado (Oliveira 1996; Oliveira & Gibbs 2000), da Caatinga (Machado *et al.* 2006) e da Floresta Atlântica, neste caso, campo de altitude (Freitas & Sazima 2006) e comunidades costeiras (restinga, Ormond *et al.* 1991; Matallana *et al.* 2005). Inexistem estudos sobre a distribuição dos sistemas sexuais nas formações florestais interioranas da Floresta Atlântica. Dentre estas formações, estão as florestas semidecíduas (Floresta Estacional Semidecidual *sensu* IBGE 2012), compostas por espécies tolerantes a um período seco (Oliveira-Filho & Fontes 2000; Oliveira-Filho *et al.* 2006; Ivanauskas & Assis 2012).

Atualmente, o domínio Atlântico está totalmente fragmentado, restando apenas um pequeno percentual de sua cobertura original. Esses fragmentos apresentam diferentes tamanhos e estádios sucessionais (Ribeiro *et al.* 2009). Cada estágio sucessional é representado por uma flora específica em resposta à intensidade de um distúrbio e, ou ao tempo que esse distúrbio ocorreu (Horn 1974). Considerando que as características reprodutivas das espécies que compõem uma comunidade são influenciadas pelo seu histórico de perturbação (Opler *et al.* 1980; Ibarra-Manriquez & Oyama 1992; Chazdon *et al.* 2003), a compreensão da distribuição das estratégias reprodutivas, na atual Floresta Atlântica, deve ser fundamentada em análises que envolvem diferentes estádios sucessionais.

Diante do exposto, objetivou-se descrever e analisar a distribuição dos sistemas sexuais nos hábitos de crescimento em quatro estádios sucessionais em sub-bosque de floresta semidecídua no sudeste do Brasil. Ainda, buscou-se responder às seguintes questões:

- I- O tipo de hábito de crescimento interfere na distribuição dos sistemas sexuais?
- II- O estágio sucessional interfere na distribuição dos sistemas sexuais?

1.2. Material e Métodos

1.2.1. Área de estudo

Esse estudo foi realizado em um remanescente de Floresta Atlântica com área de 195 ha e altitude média de 690 m (Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso, 20°45'07"S e 42°55'31"W), situado no município de Viçosa, Minas Gerais, sudeste brasileiro. O clima da região de Viçosa, Cwb *sensu* Köppen, é caracterizado por duas estações climáticas bem definidas: a estação fria e seca, de abril a setembro, e a estação quente e úmida, de outubro a março. A

temperatura e precipitação média de 1961-1990 foram de 19,4°C e 1221 mm (DNMET).

O remanescente florestal estudado possui trechos com diferentes históricos de perturbação antrópica (Silva-Júnior 2004), que são: pasto abandonado (Pasto) e florestas em estágio inicial (FEI), médio (FEM) e avançado (FEA) de regeneração (Fig. 1). O Pasto é composto pelo estrato herbáceo, dominado por indivíduos de *Melinis minutiflora* P. Beauv. (capim-gordura), que estão entremeados por herbáceas das famílias Asteraceae e Rubiaceae. As árvores ou arvoretas são raras nesse ambiente. Na FEI, há dois estratos definidos, o herbáceo-arbustivo e o dossel, que é baixo (cerca de 7 m) e descontínuo. Na FEM, há estratificação vertical e o dossel é contínuo, com cerca de 10 m de altura. Na FEA, há diferentes estratos florestais e o dossel, denso e contínuo, permite uma menor penetração de luz em relação aos demais estádios; o dossel nesse estágio possui altura média de 15-20 m. As classificações sucessionais foram baseadas em estrutura e composição florística do estrato arbóreo, assim como em fotografias aéreas das décadas de 1960 e 1970, que possibilitaram identificar as áreas alteradas pela ação antrópica (Silva-Júnior *et al.* 2004; Pinto *et al.* 2007; S.V. Martins comunicação pessoal; observação pessoal).



Figura 1: Estádios sucessionais da Mata do Paraíso, Viçosa, Minas Gerais. A: pasto abandonado; B: floresta em estágio inicial; C: floresta em estágio médio; D: floresta em estágio avançado de regeneração.

1.2.2. Obtenção dos dados

Foram instaladas seis parcelas de 100 m² (50 x 2 m) em cada estágio sucessional (Pasto, FEI, FEM e FEA), totalizando 24 unidades amostrais. Cada parcela foi avaliada quinzenalmente, de abril de 2011 a março de 2012; todas as parcelas foram avaliadas em um mesmo dia. Foram amostrados e marcados todos os indivíduos que se reproduziram (flores e frutos) com até 5 m de altura. Esses indivíduos foram considerados componentes efetivos (reprodutivamente ativos) do sub-bosque (*sensu* Kress & Beach 1994). Cada espécie foi classificada quanto ao hábito de crescimento em: erva (incluindo epífitas), trepadeira (incluindo herbáceas e lenhosas), arbusto e árvoreta (Vidal & Vidal 2003; Gonçalves & Lorenzi 2007). A sexualidade foi determinada após a análise de flores de diferentes indivíduos, frescas ou estocadas em etanol 70%. Adicionalmente, foram analisadas flores de exsicatas do Herbário VIC. As flores foram classificadas em perfeitas, estaminadas e pistiladas. O sistema sexual das espécies foi classificado de acordo com a terminologia de Sakai & Weller (1999) em: hermafroditismo, dioícia, androdioícia, ginodioícia, monoícia, andromonoícia e ginomonoícia.

Em cada parcela, foi obtida a frequência dos sistemas sexuais das espécies, calculada pela porcentagem de espécies por sistema sexual, e a sua abundância, calculada pela porcentagem de indivíduos das espécies agrupados por sistema sexual. Os nomes das espécies e das famílias foram definidos de acordo com a Lista de Espécies da Flora do Brasil (2013). Os espécimes foram depositados no acervo do Herbário VIC.

1.2.3. Análises dos dados

Pergunta I – Para verificar se a distribuição dos sistemas sexuais variou com os hábitos de crescimento foi efetuado o teste-G, utilizando os números (recomendado em Gotelli & Ellison 2011) de espécies e de indivíduos com cada sistema sexual (variável repostada) para cada hábito (variável preditora). Esse teste foi realizado no software Bioestat (Ayres *et al.* 2007). Complementar ao teste-G e para verificar quais sistemas sexuais se distribuíram distintamente entre os hábitos, foram quantificadas as frequências dos sistemas nas espécies e a sua abundância por hábito e por parcela, sem considerar o estágio sucessional. As espécies e indivíduos de cada parcela foram considerados unidades amostrais e foi obtida a variância dos dados. Esses dados foram sujeitos à verificação dos pressupostos da estatística paramétrica através dos testes de homogeneidade de Levene e de normalidade de Shapiro-Wilk. Após a verificação dos

pressupostos, adotou-se o teste Kruskal-Wallis, seguido do *post hoc* de Mann-Whitney com correção de Bonferroni. Essas análises foram efetuadas no software Past versão 2.15 (Hammer *et al.* 2001).

Para verificar as relações entre os sistemas sexuais e os hábitos foram confeccionadas matrizes; nelas as colunas corresponderam aos hábitos e as linhas aos sistemas sexuais, frequência ou abundância. Esses dados foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA), por meio do software PC-Ord versão 6.0 (McCune & Mefford 2011).

Pergunta II – Para verificar se a distribuição dos sistemas sexuais diferiu entre os estádios sucessionais, foi efetuado o teste-G, utilizando os números de espécies e de indivíduos representantes de cada sistema sexual em cada estágio sucessional. Para verificar quais sistemas sexuais se distribuíram distintamente entre os estádios foram quantificadas a frequência e a abundância dos sistemas sexuais em todas as parcelas. As parcelas, devidamente separadas entre os estádios, foram utilizadas como unidades amostrais. Quando atendidos os pressupostos da estatística paramétrica, foi realizada a ANOVA e quando esta foi significativa ($p \leq 0,050$), foi realizado o teste *post hoc* de Tukey. Quando não atendidos os pressupostos, os dados foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis e quando este foi significativo ($p \leq 0,050$), foi realizado o teste *post hoc* de Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

Para verificar as relações entre os sistemas sexuais e os estádios sucessionais, foi realizada a PCA. Nas matrizes, as colunas corresponderam aos estádios sucessionais e as linhas aos sistemas sexuais, frequência ou abundancia.

1.3. Resultados

Foram avaliados 906 indivíduos pertencentes a 113 espécies e 35 famílias e encontrados cinco sistemas sexuais: hermafroditismo (em 80,5% das espécies), dioícia (12,4%), monoícia (5,3%), andromonoícia (0,88%) e ginomonoícia (0,88%). Sete famílias somaram 60% das espécies: Asteraceae (15 espécies), Rubiaceae (15), Piperaceae (9), Malvaceae (7), Solanaceae (7) e Melastomataceae (6). A maior riqueza de espécies foi observada no Pasto (58), seguido da FEA (32), FEI (25) e FEM (22). Houve espécies em comum nos estádios: Pasto e FEI e Pasto e FEM, FEI e FEM e FEM e FEA. Não houve espécies em comum entre FEA e Pasto e FEA e FEI.

Foram registradas espécies restritas a apenas um estágio. O Pasto apresentou o maior número de espécies restritas (47), seguido da FEA (25), FEI (12) e FEM (8). Das espécies restritas ao pasto, 40% pertenceram às famílias Asteraceae e Fabaceae,

enquanto 40% das espécies restritas à FEA pertenceram a Piperaceae e Rubiaceae. As espécies restritas às FEI e FEM se distribuíram em diversas famílias.

A gama de hábitos de crescimento diferiu nos estádios sucessionais (Fig. 2), com predominância de espécies herbáceas no Pasto e de arbustos e arvoretas nos ambientes florestais (Fig. 2). Houve a tendência de diminuição das ervas e trepadeiras e aumento dos arbustos e arvoretas com o avanço da sucessão (Fig. 2).

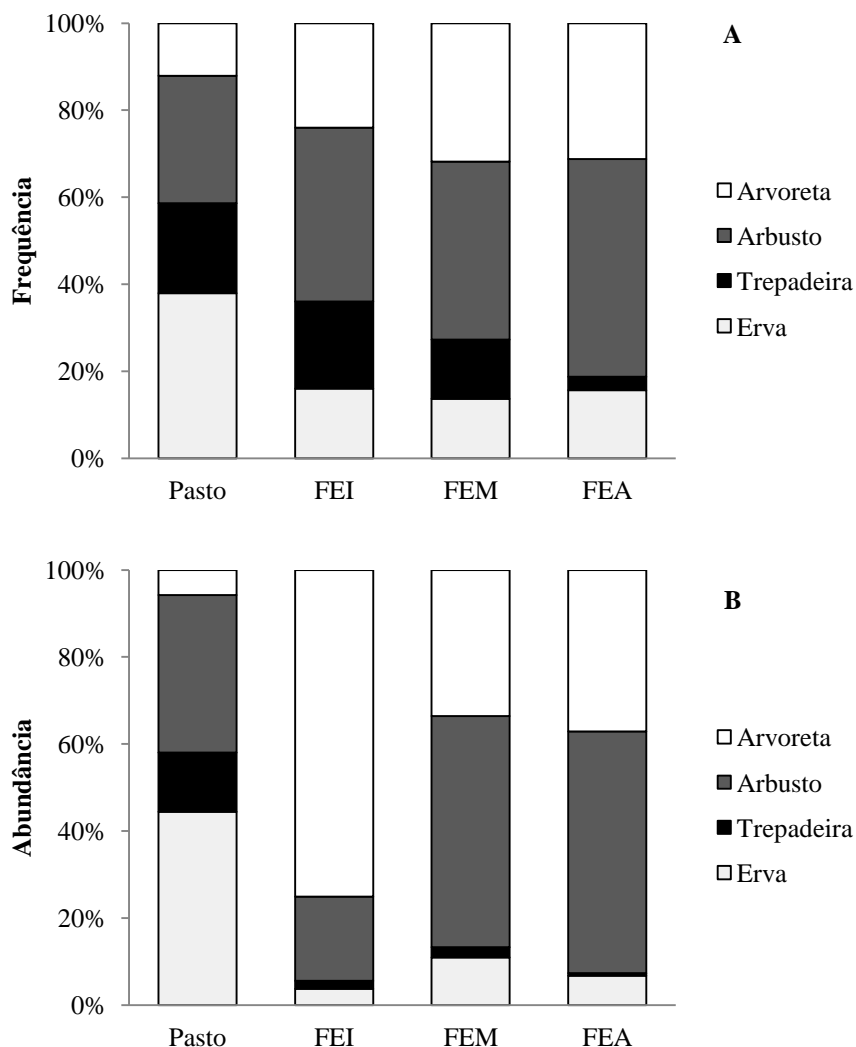


Figura 2: Distribuição dos hábitos de crescimento nos estádios sucessionais (Pasto e florestas em estágio inicial (FEI), médio (FEM) e avançado (FEA) de regeneração) em sub-bosque de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. A: frequência dos hábitos nas espécies. B: abundância dos hábitos nos indivíduos.

1.3.1. Distribuição dos sistemas sexuais nos hábitos de crescimento

As ervas, excetuando-se a monoícia, apresentaram todos os sistemas sexuais; a andromonoícia e a ginomonoícia foram restritas a esse hábito (Fig. 3). As plantas com os outros hábitos apresentaram apenas dois ou três sistemas. O hermafroditismo predominou em todos os hábitos, exceto entre os indivíduos das trepadeiras, que predominou a monoícia. Houve elevada frequência e abundância da dioícia nas arvoretas. A monoícia não foi observada entre os arbustos (Fig. 3).

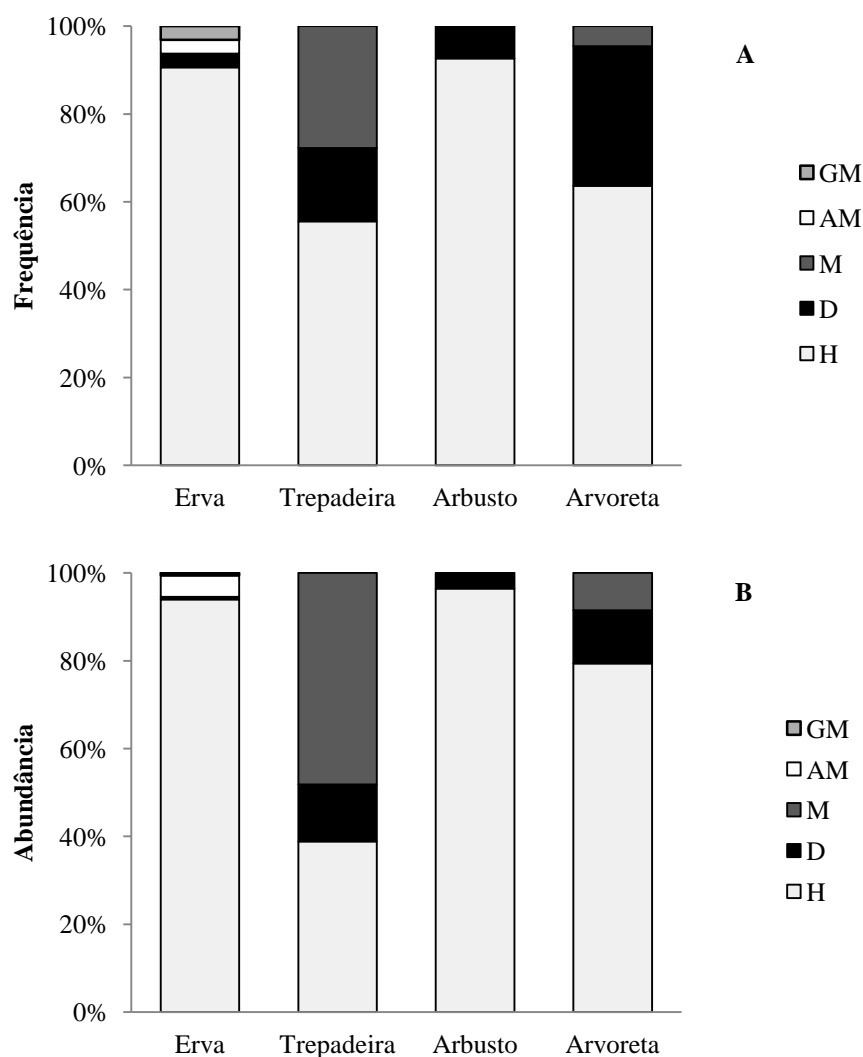


Figura 3: Distribuição dos sistemas sexuais nos hábitos em sub-bosque de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. A: frequência dos sistemas sexuais; B: abundância dos sistemas sexuais. AM: andromonoícia; D: dioícia; GM: ginomonoícia; H: hermafroditismo; M: monoícia.

A distribuição dos sistemas sexuais foi distinta entre os hábitos, considerando a sua frequência ou abundância ($G=33,86$, $gl=12$, $p=0,005$; $G=222,86$, $gl=12$, $p=0,000$, respectivamente). A frequência e a abundância do hermafroditismo, dioícia, monoícia e

andromonoicia foram distintas entre os hábitos (frequência: $H=35,54$, $gl=3$, $p=0,000$; $H=15,37$, $gl=3$, $p=0,000$; $H=32,13$, $gl=3$, $p=0,000$; $H= 8,523$, $gl=3$, $p=0,036$, respectivamente; abundância: $H=32,64$, $gl=3$, $p=0,000$; $H=14,61$, $gl=3$, $p=0,002$; $H=32,32$; $gl=3$, $p=0,000$; $H=8,52$, $gl=3$, $p=0,036$, respectivamente; Tabela 1). A ginomonoicia não foi estatisticamente diferente entre os hábitos (frequência: $H=2,77$, $p=0,428$; abundância: $H=2,77$, $p=0,428$).

Tabela 1: Frequências e abundâncias médias* dos sistemas sexuais nos hábitos em sub-bosque de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. AM: andromonoicia; D: dioicia; GM: ginomonoicia; H: hermafroditismo; M: monoicia.

Hábito	Espécies (n°)	Frequência dos sistemas sexuais (%)**				
		H	D	M	AM	GM
Erva	32	95,60a	00,65a	00,00a	01,48a	01,48a
Trepadeira	18	52,95b	15,64b	31,41b	00,00a	00,00a
Arbusto	41	98,15a	01,85a	00,00a	00,00a	00,00a
Arvoreta	22	66,32b	19,31b	14,38b	00,00a	00,00a

Hábito	Indivíduos (n°)	Abundância dos sistemas sexuais (%)**				
		H	D	M	AM	GM
Erva	183	96,71a	00,18a	00,00a	01,6a	01,52a
Trepadeira	54	50,32b	14,53b	35,15b	00,00a	00,00a
Arbusto	339	98,07a	01,93a	00,00a	00,00a	00,00a
Arvoreta	330	71,37a	17,37b	11,26b	00,00a	00,00a

*Valores médios obtidos nas parcelas. **Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna, para a frequência ou abundância, não diferiram significativamente no teste *post hoc* ($p>0,050$).

A PCA de frequência e de abundância dos sistemas sexuais em relação aos hábitos mostrou tendências semelhantes, isto é, a monoicia se relacionou às trepadeiras, a dioicia às arvoretas e o hermafroditismo aos arbustos (Fig. 4). A relação da andromonoicia e da ginomonoicia foi devida à restrição desses sistemas sexuais ao hábito herbáceo (Fig. 4; Tabela 1).

Na PCA que relacionou a frequência de cada sistema sexual com o hábito o primeiro eixo apresentou autovalor de 2,33 e explicou 58% da variação. Esse eixo foi determinado principalmente pelas ervas e arvoretas. No segundo eixo a autovalor foi de 1,26 e a explicação de 32%. Esse eixo foi determinado pelas trepadeiras e pelos arbustos (Fig. 4A). Similarmente, a PCA de abundância apresentou autovalores de 2,58 e 1,27 para o primeiro e segundo eixos, explicando, respectivamente, 64,6 e 31,7% da variação (Fig. 4B). O primeiro e o segundo eixos foram definidos pelas mesmas variáveis da PCA para frequência dos sistemas sexuais. A explicação dos eixos foi considerada alta,

uma vez que as variáveis utilizadas (cinco sistemas sexuais) são fixas e dificilmente extrapoladas.

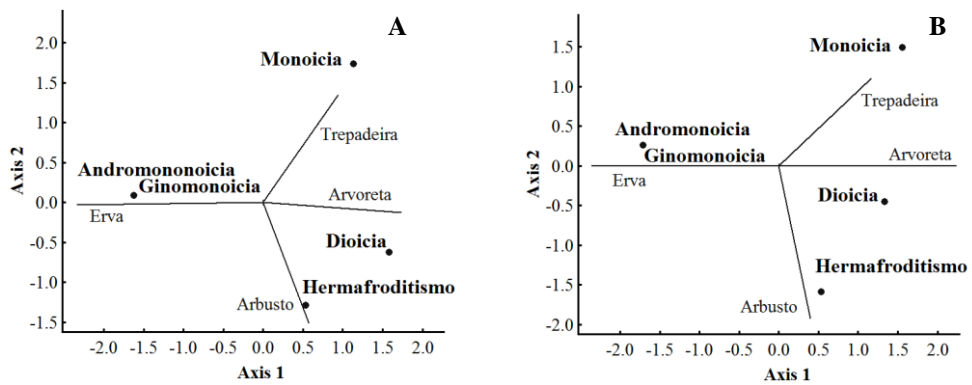


Figura 4: Análise de Componentes Principais (PCA) da relação entre os sistemas sexuais e os hábitos de crescimento. A: frequência dos sistemas sexuais; B: abundância dos sistemas sexuais.

1.3.2. Distribuição dos sistemas sexuais entre os estádios sucessionais

O Pasto apresentou todos os sistemas, exceto a ginomonoicia; na FEI não foi registrada apenas a andromonoicia; na FEM foi observado o hermafroditismo, a dioicia e a monoicia, enquanto na FEA ocorreu apenas o hermafroditismo e a dioicia (Fig. 5). O hermafroditismo foi o sistema predominante em todos os estádios sucessionais. As maiores frequência e abundância da dioicia foram observadas na FEA. A maior frequência da monoicia foi observada na FEI e a abundância na FEM. A andromonoicia e a ginomonoicia foram pouco representadas (Fig. 5) e restritas, respectivamente, ao Pasto, devido à presença de *Solanum palinacanthum*, e à FEI, devido à presença de *Chaptalia nutans*.

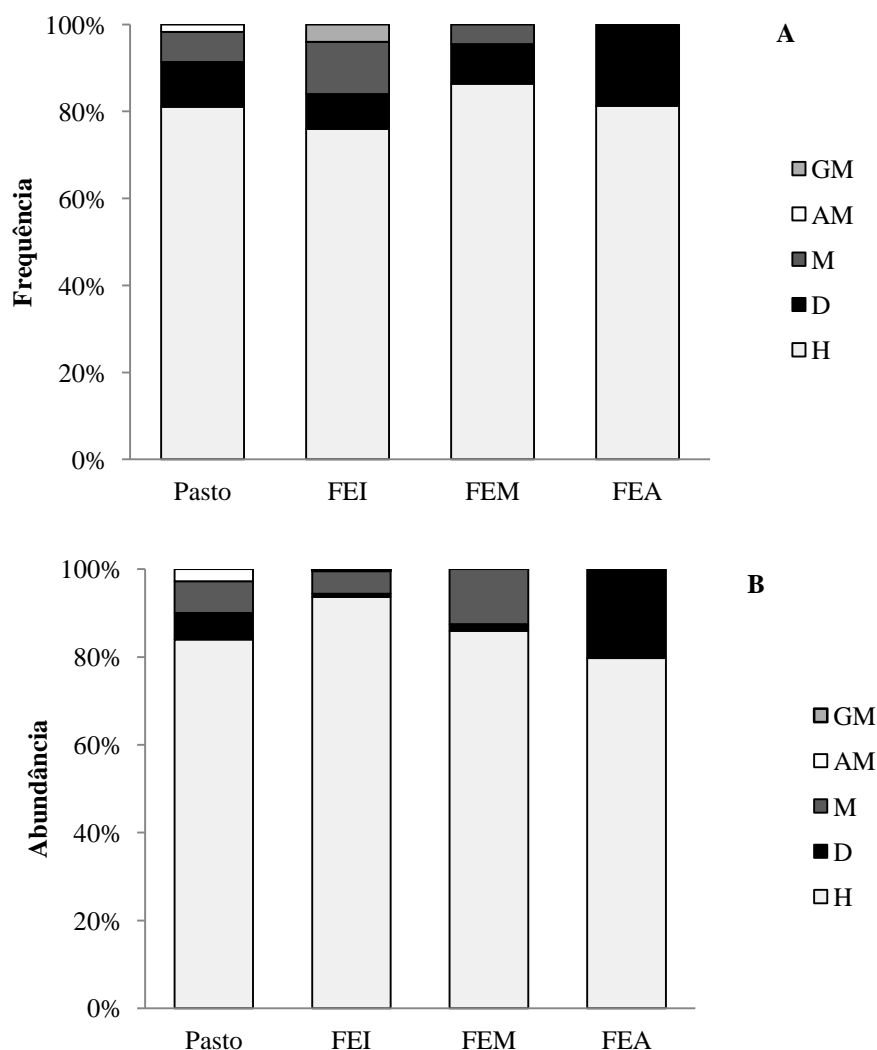


Figura 5: Distribuição dos sistemas sexuais nos estádios sucessionais em sub-bosque de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. A: frequência dos sistemas sexuais; B: abundância dos sistemas sexuais. AM: andromonoic; D: dioic; GM: ginomonoic; H: hermafroditismo; M: monoic.

Os estádios sucessionais diferiram significativamente entre si apenas em relação à abundância dos sistemas sexuais (frequência: $G=12,138$, $gl= 12$, $p=0,734$; abundância: $G=114,81$, $gl= 12$, $p=0,000$). Quando avaliada a distribuição das abundâncias de cada sistema sexual entre os estádios, foi possível observar distinções para a dioic, monoic e andromonoic ($H=13,77$, $gl=3$, $p=0,003$; $H=13,11$, $gl=3$, $p=0,004$; $H=9,80$, $gl=3$, $p=0,020$, respectivamente; Tabela 2). As abundâncias do hermafroditismo e da ginomonoic foram semelhantes entre os estádios ($H=4,89$, $gl=3$, $p=0,179$; $H=3$, $gl=3$, $p=0,391$, respectivamente; Tabela 2).

Tabela 2: Frequências e abundâncias médias* dos sistemas sexuais nos estádios sucessionais em sub-bosque de Floresta Atlântica no sudeste do Brasil. AM: andromonoícia; D: dioícia; GM: ginomonoícia; H: hermafroditismo; M: monoícia.

Estádio Sucessional		Frequência dos sistemas sexuais (%)**				
Estádio Sucessional	Espécies (n°)	H	D	M	AM	GM
Pasto	58	82,40a	06,73a	08,41a	02,46a	00,00a
FEI	25	80,32a	02,38a	14,92a	00,00a	02,38a
FEM	22	86,16a	04,05a	09,80a	00,00a	00,00a
FEA	32	77,54a	22,46a	00,00a	00,00a	00,00a

Estádio Sucessional		Abundância dos sistemas sexuais (%)**				
Estádio Sucessional	Indivíduos (n°)	H	D	M	AM	GM
Pasto	331	83,96a	06,26a	07,21a	02,57a	00,00a
FEI	269	93,54a	00,74a	05,41a	00,00a	00,31a
FEM	128	83,82a	02,41a	13,77a	00,00a	00,00a
FEA	178	79,80a	20,20b	00,00b	00,00a	00,00a

*Valores médios obtidos nas parcelas. **Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna, para a frequência ou abundância, não diferiram significativamente no teste *post hoc* ($p > 0,050$).

Ao analisar as frequências ou as abundâncias dos sistemas sexuais em relação aos estádios sucessionais, foi observada relação da ginomonoícia à FEI, da andromonoícia ao Pasto e da dioícia à FEA (Fig. 6). No entanto, quanto à frequência, o hermafroditismo apresentou-se associado à FEM e à FEA e a monoícia não se relacionou a nenhum estágio (Fig. 6A), enquanto para a abundância o hermafroditismo não apresentou qualquer relação e a monoícia se relacionou à FEM (Fig. 6B).

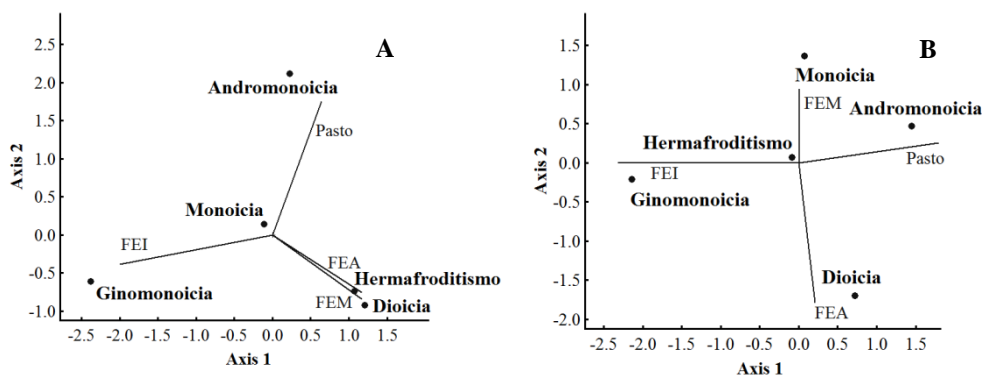


Figura 6: Análise de Componentes Principais (PCA) da relação entre sistemas sexuais e estádios sucessionais. A: frequência dos sistemas sexuais; B: abundância dos sistemas sexuais.

A PCA que relacionou a frequência de espécies de cada sistema sexual com o estágio apresentou autovalores de 2,08 e 1,56 para o primeiro e segundo eixos, os quais explicam, respectivamente, 52% e 39% da variação dos dados (Fig. 6A). O primeiro eixo foi determinado principalmente pela FEI e o segundo pelo pasto. A explicação da variação dos dados foi considerada alta pelos motivos já explicados da PCA em relação

ao hábito. Em relação à abundância, a PCA apresentou autovalores de 1,80 e 1,25 para o primeiro e segundo eixos, explicando respectivamente 45% e 31% da variação dos dados (Fig. 6B). O primeiro eixo foi determinado pela FEI e pelo pasto e o segundo eixo pela FEM e a FEA.

1.4. Discussão

Os resultados demonstraram que o tipo de hábito influencia a distribuição dos sistemas sexuais, de modo semelhante ao observado em diferentes comunidades (Bawa 1980; Bullock 1985; Ramirez & Brito 1990; Ramirez 1993; Kress & Beach 1994; Renner & Ricklefs 1995; Sakai 1995; Chazdon *et al.* 2003; Vamosi & Vamosi 2004; Matallana *et al.* 2005). No presente estudo, apenas as ervas apresentaram andromonoicidia e ginomonoicidia, semelhante ao observado por Ramirez *et al.* (1993) no estrato herbáceo de uma vegetação predominantemente arbustiva. O hermafroditismo foi mais frequente e abundante nas ervas e arbustos em relação aos demais hábitos, resultados também obtidos em outros estudos (Ormond *et al.* 1991; Matallana *et al.* 2005). A dioicidia quase que restrita às arvoretas corrobora as afirmativas de Bawa (1980) e Sakai (1995) sobre o predomínio desse sistema em espécies lenhosas. De fato, a dioicidia é incomum entre as herbáceas na comunidade estudada e em outras (Bawa 1980; Matallana *et al.* 2005). A monoicidia restrita às trepadeiras, por outro lado, difere do observado em outros estudos. Neles, a monoicidia foi associada ao hábito herbáceo (Ramirez & Brito 1990; Ramirez 1993; Matallana *et al.* 2005; Machado *et al.* 2006). Nossos resultados, somados aos dos demais autores, confirmaram que o hábito de crescimento é um importante determinador do sistema sexual.

Além do hábito, os estádios sucessionais distintos, de acordo com os resultados, também ocasionaram distribuições distintas dos sistemas sexuais. O hermafroditismo, que predominou em todos os estádios sucessionais, é o sistema sexual mais frequente das angiospermas (Yampolsky & Yampolsky 1922; Richards 1986) e o mais comumente registrado nas comunidades vegetacionais (Ramirez 1993; Chazdon *et al.* 2003; Freitas & Sazima 2006, Machado *et al.* 2006). Portanto, nossos resultados seguiram essa tendência, somando-se o fato de que as famílias mais ricas na área de estudo possuem flores tipicamente hermafroditas.

A monoicidia foi observada em cerca de 5% das espécies, semelhante ao encontrado por Yampolsky & Yampolsky (1922). A distribuição desse sistema sexual foi distinta entre os estádios e não ocorreu na FEA, contrariando os resultados de outros autores, que afirmaram que a monoicidia é comum em espécies de sub-bosque de florestas

preservadas (Kress & Beach 1994; Chazdon *et al.* 2003). A predominância da monoícia nestes casos está relacionada à presença de espécies de Areceaceae, tipicamente monóicas, no sub-bosque; tais espécies não foram observadas no sub-bosque no presente estudo. A dioícia, registrada em 18,7% das espécies, ficou acima do esperado; para Renner & Ricklefs (1995) esse sistema ocorre em 7-10% das angiospermas. Entretanto, a porcentagem encontrada foi inferior à média das comunidades florestais neotropicais (acima de 20%; Bawa & Opler 1975, Bawa *et al.* 1985), onde uma maior frequência de espécies dioicas é comumente observada (Bawa 1980; Sakai 1995). Vale ressaltar que a maior parte dos estudos em comunidades florestais neotropicais incluiu predominantemente espécies do dossel, nas quais há maior ocorrência de dioícia em relação ao sub-bosque.

A andromonoícia, rara entre as angiospermas (registrada em cerca de 1,7% das espécies, Yampolsky & Yampolsky 1922), restrita ao Pasto, foi representada por uma espécie (*Solanum palinacanthum*) comum em áreas abertas e alteradas (Coleman & Coleman 1982) e pertencente a um gênero que possui outras espécies com essa expressão (Freitas & Sazima 2006; Machado *et al.* 2006). *Solanum* possui flores tipicamente hermafroditas (Anderson & Symon 1989) e a andromonoícia, que muitas vezes está relacionada à ambientes pobres em nutrientes, é considerada uma resposta adaptativa que reduz os gastos da planta com a produção de flores estaminadas, em substituição às hermafroditas, que favorecem a polinização cruzada, com o aumento da disponibilidade de pólen (Coleman & Coleman 1982; Solomon 1986). A ginomonoícia, também pouco frequente entre as angiospermas (cerca de 2,8%, Yampolsky & Yampolsky 1922), ficou restrita à FEI por ser o único estádio onde ocorreu a asterácea *Chaptalia nutans*. A ginomonoícia é mais comum em espécies de asteráceas (Bertin & Kerwin 1998), mas por serem típicas de áreas abertas (Funk *et al.* 2005) foram raramente encontradas nas áreas florestais (uma espécie hermafrodita na FEA e nenhuma na FEM).

Dessa forma, na comunidade estudada, a andromonoícia e a ginomonoícia, como sistemas raros, e o hermafroditismo, como comum em todos os estádios, não permitem a diferenciação dos estádios. Por outro lado, a monoícia e a dioícia ocorreram na maior parte dos estádios e em frequências e abundâncias distintas, permitindo a diferenciação dos estádios em função das suas distribuições.

A dioícia é um sistema sexual vantajoso, pois torna a polinização cruzada obrigatória e garante uma maior variabilidade genética (Richards 1986). Entretanto, em populações pequenas, as espécies dióicas são as mais afetadas, quando comparadas com

espécies com outros sistemas sexuais, devido ao potencial reprodutivo inferior das dióicas (cerca de 50% dos indivíduos possuem flores estaminadas), resultando em menor número de indivíduos efetivamente ativos na produção de sementes (Vamosi *et al.* 2008). Por isso, a dioicia é mais frequente em fragmentos maiores (Meave & Kellman 1994; Gillespie 1999) e em ambientes mais preservados (Opler *et al.* 1980; Oliveira 1996; Chazdon *et al.* 2003; presente estudo). Segundo Ramirez (1993), a ausência de polinizadores e de dispersores também limita o número de espécies dióicas em uma área.

Apesar de não haver um censo comum sobre as pressões que determinaram a evolução da dioicia, esse sistema sexual é frequentemente relacionado a espécies com ciclo de vida longo, hábito lenhoso, obrigatoriedade de polinização cruzada, polinização por insetos, dispersão por animais e grandes sementes (Bawa & Opler 1975; Bawa 1980; Sakai 1995; Vamosi *et al.* 2008). Tais características são filogeneticamente associadas e frequentes em espécies de estádios mais avançados de regeneração (Chazdon *et al.* 2003). Esse conjunto de atributos caracteriza as espécies k-estrategistas (MacArthur & Wilson 1967), que toleram competição (Grime 1977) e ocorrem comumente em ambientes estáveis e ricos em espécies, como as florestas em estágio avançado de sucessão. Tal estratégia parece válida para as espécies dióicas do presente estudo, cujo hábito foi preferencialmente o lenhoso e o ambiente a FEA.

O processo de sucessão, tal como ocorre na área de estudo (Pinto *et al.* 2007), é governado por interações bióticas contínuas, que permitem a colonização de espécies iniciais, tolerantes a determinados fatores físicos, que alteram o ambiente, propiciando a colonização posterior de espécies características de estádios sucessionais mais avançados (Pickett & McDonnell 1989), tais como as dióicas na FEA. Entretanto, segundo Opler *et al.* (1980), os estádios sucessionais são responsáveis apenas por parte das pressões adaptativas que guiam a evolução de determinadas combinações de características reprodutivas e que outros fatores, como o estrato vegetal e o hábito de crescimento apresentam importância semelhante.

O Pasto se diferenciou dos demais estádios avaliados em função da sua gama mais restrita de hábitos, uma vez que é composto basicamente por espécies herbáceas e arbustivas e, por isso, caracterizado como uma fisionomia campestre; os demais estádios são fisionomias florestais. Considerando que os hábitos determinam a frequência dos sistemas sexuais, o Pasto tenderia a se assemelhar a outras formações campestres. Essa hipótese parece válida, pois Freitas & Sazima (2006) encontraram, em um campo de altitude no Brasil, 82% de hermafroditismo, 9% de dioicia e 3,2% de

monoícia, porcentagens semelhantes às observadas no Pasto, respectivamente, 81%, 10,4% e 7%. Ademais, as espécies dióicas encontradas por Freitas & Sazima (2006) pertenciam às espécies de *Baccharis*, que, no presente estudo, representaram 50% das espécies dióicas e 60% dos indivíduos unissexuais do Pasto. Esses resultados indicam que a gama de hábitos que uma dada comunidade pode determinar a distribuição dos sistemas sexuais das suas espécies.

Todavia, assim como diversas características ecológicas, o hábito e os sistemas sexuais são filogeneticamente relacionados (Chazdon *et al.* 2003, Vamosi *et al.* 2008). Por isso, afinidades e tolerâncias ambientais podem selecionar grupos taxonômicos com atributos reprodutivos peculiares (Ramirez 1993; Freitas & Sazima 2006). Segundo Chazdon *et al.* (2003), as comunidades florestais tropicais são filogeneticamente determinadas, havendo inclusive proximidade taxonômica entre as espécies de um mesmo estrato florestal, isto é, sub-bosque ou dossel.

Apesar da influência filogenética na determinação dos sistemas sexuais em uma comunidade, a mudança na abundância das espécies ao longo da sucessão altera a distribuição dos sistemas sexuais (Ibarra-Manriquez & Oyama 1992; Chazdon *et al.* 2003; presente estudo). No presente estudo, o uso da frequência e da abundância dos sistemas sexuais nos hábitos permitiram conclusões semelhantes; ambos os métodos demonstraram que os hábitos interferiram na distribuição dos sistemas sexuais. Para os estádios sucessionais esses diferentes métodos propiciaram conclusões distintas, isto é, os estádios sucessionais não interferiram na frequência dos sistemas sexuais, mas determinaram a sua abundância. Este resultado, somado ao encontrado por Chazdon *et al.* (2003), comparando comunidades, demonstra que o uso da abundância dos sistemas sexuais é o método indicado para a comparação da distribuição desses atributos reprodutivos entre diferentes ambientes, pois expressa a magnitude real das características reprodutivas e recursos em cada comunidade. A distinção nas conclusões baseadas na frequência ou abundância dos sistemas sexuais, no presente estudo, foi devido à dominância de algumas espécies na comunidade, um reflexo da dinâmica vegetacional dos estádios que afeta diretamente as frequências dos sistemas sexuais. Um exemplo é a variação na frequência e abundância do hermafroditismo na FEI; tal alteração se deve à dominância de *Psychotria sessilis* nesse ambiente.

Os resultados do presente estudo, somados aos da literatura, demonstram que há um padrão na distribuição dos sistemas sexuais, que se apresentam associados preferencialmente a determinados hábitos e estádios; neste caso, o hermafroditismo às ervas, e a dioícia às arvoretas e a estádios mais avançados de sucessão. Esse é primeiro

estudo sobre os sistemas sexuais de uma comunidade de floresta semidecídua brasileira. A observação dos padrões de distribuição dos sistemas sexuais é inédita para o sub-bosque de Floresta Atlântica. A continuidade dos estudos sobre os sistemas sexuais em diferentes comunidades permitirá análises comparativas entre ambientes, fornecendo assim inferências sobre os fatores que interferem na distribuição desses sistemas em diferentes formações vegetais e regiões geográficas.

1.5. Agradecimentos

Ao programa de Pós-graduação em Botânica/UFV, pela oportunidade de realização dessa pesquisa e apoio logístico. Ao Departamento de Engenharia Florestal/UFV por permitir a execução dos estudos na Mata do Paraíso. À FAPEMIG pela concessão da bolsa de doutorado e financiamento do projeto “Interações entre plantas e polinizadores em sub-bosque de Floresta Atlântica” pelo Edital PPM III/2009. A Marcos Simão e Daniel Arruda pelo auxílio na montagem do experimento. A Daniel Arruda pelo apoio estatístico. Aos taxonomistas João R. Stehmann (Solanaceae), José M. Fernandes (Leguminosae), Leandro L. Giacomini (Solanaceae), Luís C. Bernacci (Passifloraceae), Luiz M. Neto (Orchidaceae), Lynn A. Bohs (Solanaceae), Marcos E. Sobral (Myrtaceae), Maria de F. Agra (Solanaceae), Massimo G. Bovini (Malvaceae) e Renato Goldenberg (Melastomataceae), que contribuíram de forma essencial ao trabalho, identificando as espécies.

1.6. Referências bibliográficas

- ANDERSON, G.J.; SYMON, D.E. 1989. Functional dioecy and andromonoecy in *Solanum*. *Evolution* 43:204-219.
- AYRES, M.; AYRES, J.R.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. 2007. BioEstat 5.0- Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 364p.
- BAKER, H.G. 1955. Self-compatibility and establishment after "long-distance" dispersal. *Evolution* 9:347-349.
- BAKER, H.G. 1967. Support for Baker's law-as a rule. *Evolution* 21:853-856.
- BAWA, K.S.; BEACH, J.H. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68:254-274.
- BAWA, K.S.; OPLER, P.A. 1975. Dioecism in tropical forest trees. *Evolution* 29:167-179.
- BAWA, K.S. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:15-39
- BAWA, K.S. 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21:399-422.
- BAWA, K.S.; PERRY, D.R.; BEACH, J.H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. *American Journal of Botany* 72:331-345.

- BERTIN, R.I.; KERWIN, M.A. 1998. Floral sex ratios and gynodioecy in *Aster* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 85:235-244.
- BULLOCK, S.H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* 17:287-301.
- CHAZDON, R.L.; CAREAGA, S.; WEBB, C.; VARGAS, O. 2003. Community and phylogenetic structure of reproductive traits of woody species in wet tropical forests. *Ecological Monographs* 73:331-348.
- COLEMAN, J.R.; COLEMAN, M.A. 1982. Reproductive biology of an andromonoecious *Solanum* (*S. palinacanthum* Dunal). *Biotropica* 14:69-75.
- DNMET - DEPARTAMENTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. 1992. Normas climatológicas (1961-1990). Brasília: SPI/EMBRAPA, 84p.
- FREITAS, L.; SAZIMA, M. 2006. Pollination biology in a tropical high-altitude grassland in Brazil: interactions at the community level. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93:465-516.
- FUNK, V.A.; BAYER, R.J.; KEELEY, S.; CHAN, R.; WATSON, L.; GEMEINHOLZER, B.; SCHILLING, E.; PANRELO, J.L.; BALDWIN, B.G.; GARCIA-JACAS, N.; SUSANNA, A.; JANSEN, R.K. 2005. Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *In: FRIIS, I., BALSLEV, H. (Eds.), Proceedings of a symposium on plant diversity and complexity patterns—local, regional and global dimensions. Copenhagen: Biological Skrifter, Royal Danish Academy of Sciences and Letters, pp. 343-373.*
- GILLESPIE, T.W. 1999. Life history characteristics and rarity of woody plants in tropical dry forest fragments of Central America. *Journal of Tropical Ecology* 15:637-649.
- GONÇALVES, E.G.; LORENZI, H. 2007. Morfologia vegetal: organografia e dicionário ilustrado de morfologia das plantas vasculares. Nova Odessa: Instituto Plantarum de estudos da Flora LTDA, 416p.
- GOTELLI, N.J.; ELLISON, A.M. 2011. Princípios de estatística em ecologia. Porto Alegre: ARTMED, 528 p.
- GRIME, J.P. 1977. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The American Naturalist* 111:1169-1194.
- HAMMER, O., HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4:9p.
- HORN, H.S. 1974. The ecology of secondary succession. *Annual Reviews* 5:25-37.
- IBARRA-MANRIQUEZ, G.; OYAMA, K. 1992. Ecological correlates of reproductive traits of Mexican rain forest trees. *American Journal of Botany* 79:383-394.
- IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2012. Manual técnico da vegetação brasileira. Rio de Janeiro: IBGE, 274p.
- IVANAUSKAS, N.M.; ASSIS, M.C. 2012. Formações florestais brasileiras. *In: MARTINS, S.V. (Ed.), Ecologia de florestas tropicais do Brasil. Viçosa: Editora UFV, pp. 107-140.*
- JOHNSON, S.D.; STEINER, K.E. 2000. Generalization versus specialization in plant pollinator systems. *TREE* 15:140-143.
- KATO, M. 1996. Plant-pollinator interactions in the understory of a lowland mixed dipterocarp forest in Sarawak. *American Journal of Botany* 83:732-743.
- KRESS, W.J.; BEACH, J.H. 1994. Flowering plant reproductive systems. *In: MACDADE, L.A.; BAWA, K.S.; HESPENHEIDE, H.A.; HARTSHORN, G.S. (Eds.), La Selva - Ecology and natural history of a neotropical rain forest. Chicago: University of Chicago Press, pp.161-182.*
- LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL. 2013. *in* <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>
- MACARTHUR, R.H.; WILSON, E.O. 1967. The theory of Island Biogeography. Princeton: Princeton University Press, 203p.

- MACHADO, I.C.; LOPES, A.V.; SAZIMA, M. 2006. Plant sexual systems and a review of the breeding system studies in the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. *Annals of Botany* 97:277-287.
- MATALLANA, G.; WENDT, T.; ARAUJO, D.S.D.; SCARANO, F.R. 2005. High abundance of dioecious plants in a tropical coastal vegetation. *American Journal of Botany* 92:1513-1519.
- MCCUNE, B.; MEFFORD, M. 2011. PC-ORD. Multivariate analysis of ecological data, version 6. Gleneden Beach, OR, USA: MjM Software.
- MEAVE, J.; KELLMAN, M. 1994. Maintenance of rain forest diversity in riparian forests of tropical savannas: implications for species conservation during Pleistocene drought. *Journal of Biogeography* 21:121-135.
- OLIVEIRA, P.E.; GIBBS, P.E. 2000. Reproductive biology of woody plants in a Cerrado community of Central Brazil. *Flora* 195:311-329.
- OLIVEIRA, P.E. 1996. Dioecy in the cerrado vegetation of central Brazil. *Flora* 191:235-243.
- OLIVEIRA-FILHO, A.T.; FONTES, M.A.L. 2000. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil, and the influence of climate. *Biotropica* 32:793-810.
- OLIVEIRA-FILHO, A.T.; JARENKOW, J.A.; RODAL, M.J.N. 2006. Floristic relationships on seasonally dry forests of Eastern South America based on tree species distribution patterns. *In*: PENNINGTON, R.T.; LEWIS, G.P.; RATTER, J.A. (Eds.), *Neotropical savannas and seasonally dry forests: plant diversity, biogeography and conservation*. Boca Raton: Francis & Taylor, p.159-192.
- OPLER, P.A.; BAKER, H.G.; FRANKIE, G.W. 1980. Plant reproductive characteristics during secondary succession in Neotropical lowland forest ecosystems. *Biotropica* 12:40-46.
- ORMOND, W.T.; PINHEIRO, M.C.B.; LIMA, H.A. 1991. Sexualidade das plantas da restinga de Maricá, RJ. *Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro, Série Botânica* 87:1-24.
- PICKETT, S.T.A.; MCDONNELL, M.J. 1989. Changing perspectives perspectives in community dynamics: A theory of successional forces. *TREE* 4:241-245.
- PINTO, S.I.C.; MARTINS, S.V.; SILVA A.G.; BARROS, N.F.; DIAS, H.C.T.; SCOSS, L.M. 2007. Estrutura do componente arbustivo-arbóreo de dois estádios sucessionais de floresta estacional semidecidual na Reserva Florestal Mata do Paraíso, Viçosa, MG, Brasil. *Revista Árvore* 31:823-833.
- RAMIREZ, N.; BRITO, Y. 1990. Reproductive biology of a tropical palm swamp community in the Venezuelan llanos. *American Journal of Botany* 77:1260-1271.
- RAMIREZ, N. 1989. Biología de polinización en una comunidad arbustiva tropical de la alta Guayana Venezolana. *Biotropica* 21:319-330.
- RAMIREZ, N. 1993. Reproductive biology in a tropical shrubland of Venezuelan Guayana. *Journal of Vegetation Science* 4:5-12.
- RAMIREZ, N. 2004. Ecology of pollination in a tropical Venezuelan savanna. *Plant Ecology* 173:171-189.
- RENNER, S.S.; RICKLEFS, R.E. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany* 82:596-606.
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141-1153.
- RICHARDS, A.J. 1986. *Plant breeding systems*. London: George Allen & Unwin, 529p.
- SAKAI, A.K.; WELLER, S.G. 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants: a review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic

- approaches. *In*: Geber, M.A.; Dawson, T.E.; Delph, L.F. (Eds.), Gender and sexual dimorphism in flowering plants. Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-31.
- SAKAI, A.K.; WAGNER, W.L.; FERGUSON, D.M.; HERBST, D.R. 1995. Biogeographical and ecological correlates of dioecy in the Hawaiian flora. *Ecology* 76:2530-2543.
- SILVA-JUNIOR, W.M.; MARTINS, S.V.; SILVA, A. F.; MARCO-JUNIOR, P. 2004. Regeneração natural de espécies arbustivo-arborea em dois trechos e uma Floresta Estacional Semidecidual, Viçosa, MG. *Scientia Forestalis* 66:169-179.
- SOLOMON, B.P. 1986. Sexual allocation and andromonoecy: Resource investment in male and hermaphrodite flowers of *Solanum carolinense* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 73:1215-1221.
- VAMOSI, J.C.; VAMOSI, S.M. 2004. The role of diversification in causing the correlates of dioecy. *Evolution* 58:723-731.
- VAMOSI, S.M.; MAZER, S.J.; CORNEJO, F. 2008. Breeding systems and seed size in a neotropical flora: Testing evolutionary hypotheses. *Ecology* 89:2461-2472.
- VIDAL, W.N.; VIDAL, M.R.R. 2003. Botânica - organografia: Quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos. Viçosa: Editora UFV, 124p.
- YAMPOLSKY, C.; YAMPOLSKY, H. 1922. Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. *Bibliotheca Genetica* 3:1-62.

Capítulo 2

Submetido à Acta Botanica Brasilica

Is the pollination efficiency of the long-lived flowers of orchids affected by age?

Rúbia Santos Fonseca^{1,2}, Flávia Aparecida dos Santos¹, Milene Faria Vieira¹

¹ Departamento de Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, Brazil

² Corresponding author: rubiafonseca@hotmail.com

RESUMO

(A eficiência da polinização em flores longevas de orquídeas é afetada pela idade da flor?). As flores longevas das orquídeas aumentam as chances de polinização e, conseqüentemente, o sucesso reprodutivo. Entretanto, surge a questão: a eficiência da polinização, expressada pela produção de frutos, varia com a idade da flor? Objetivou-se verificar se a idade da flor de *Corymborkis flava* afeta a eficiência da polinização. Foram testadas as hipóteses: 1) a frutificação em flores mais velhas é menor que em flores jovens; 2) observações morfológicas (do perianto e da área estigmática), teste de receptividade estigmática com solução de peróxido de hidrogênio e polinizações manuais são igualmente efetivos na definição do período de receptividade do estigma. A receptividade estigmática das flores foi observada do primeiro ao quarto dia de antese. A frutificação das flores mais velhas (terceiro e quarto dias) foi menor que a das jovens. As observações morfológicas, o teste de receptividade estigmática e as polinizações manuais foram igualmente efetivos na definição do período de receptividade do estigma. Porém, para as orquídeas com flores longevas são recomendadas polinizações manuais para avaliar o grau máximo de receptividade estigmática, além do período de receptividade.

Palavras-chave: biologia floral, *Corymborkis flava*, frutificação, Orchidaceae, receptividade estigmática

ABSTRACT

(Is the pollination efficiency of the long-lived flowers of orchids affected by age?). The long-lived flowers of orchids increase the chances of pollination and thus the reproductive success. However, the following question arises: does the efficiency of pollination, expressed by fruit set, vary with the flower age? The objective was to verify whether the flower age of *Corymborkis flava*, affects pollination efficiency. The following hypotheses were tested: 1) the fruiting of older is lower than that of younger flowers; 2) morphological observations (perianth and stigmatic area), stigma receptivity

test by using a solution of hydrogen peroxide and hand-pollination tests are equally effective in defining the period of stigmatic receptivity. Flowers were found to be receptive from the first to the fourth day of anthesis. Fruiting of older flowers (third and fourth day) was lower than that of younger flowers. Morphological observations, the stigma receptivity test and hand-pollinations were equally effective in defining the period of stigmatic receptivity. However, for orchids species with long-lived flowers, we would recommend hand-pollinations to evaluate the maximum degree of stigma receptivity, beyond the period of receptivity.

Key words: *Corymborkis flava*, floral biology, fructification, Orchidaceae, stigma receptivity

Pollination is essential for the conservation and evolution of plant species and communities (Machado & Lopes 2004), ensuring the maintenance of the genetic variability in natural populations. The success of pollination is mainly influenced by three factors: the period of stigmatic receptivity, defined by the capacity of the stigma to ensure pollen germination; the ability of pollen tube to grow within the style; and the viability of ovules (Sanzol & Herrero 2001; Dafni *et al.* 2005). These factors are associated to floral anthesis (Schoen & Ashman 1995), which is the period between flower opening and senescence, when pollinator visits occur (Primack 1985). This period determines the flower longevity (van Doorn 1997) and, if longer than three days, the flowers are considered long-lived (*sensu* Primack 1985). Orchidaceae is one of the larger families among the angiosperms and this success is based on aspects of their reproductive mechanisms, such as: diversity of floral resources, pollinators, herkogamy and floral longevity (van der Pijl & Dodson 1966; Primack 1985; Dressler 1993). Orchids have the longest-lived flowers, lasting up to nine months, e.g., the flowers of *Grammatophyllum multiflorum* (van der Pijl & Dodson 1966). In these plants, greater longevity is observed in non-pollinated flowers; pollination promotes rapid changes that induce floral senescence (Proctor & Harder 1995; Martini *et al.* 2003; Abdala-Roberts *et al.* 2007). The long-lived orchid flowers have been interpreted as an adaptation to low pollinator activity (Stpiczynska 2003), increasing the chances of pollination and thus the reproductive success (van der Pijl & Dodson 1966; Martini *et al.* 2003). However, the question arises: is the efficiency of pollination, expressed by fruit set, influenced by flower age? Few studies on the breeding system of orchid species provide information about the stigma receptivity during the flower lifespan. Stpiczynska (2003) examined the stigma receptivity of *Platanthera chlorantha* (Orchidaceae). This author found that

the receptivity lasted, on average, 15 days and 89.68% of the hand-pollinated flowers set fruit (83.33–100%) between the 2nd and 19th day of anthesis. In this case, it was concluded that pollination efficiency was not affected by the flower age. Most studies using hand-pollination however, provide no information on the age of the flowers in the tests (Stort & Galdino 1984; Calvo 1990; Galetto *et al.* 1997; Singer & Sazima 1999; Singer 2001, 2002; Singer & Sazima 2001; Borba & Braga 2003; Gale 2007; Peter & Johnson 2009; Micheneau *et al.* 2010; Srimuang *et al.* 2010). In studies that cite the flower age, hand-pollinations were performed on the first (Borba *et al.* 1999; Pansarin & Amaral 2006; Li *et al.* 2008; Pansarin & Amaral 2008, Aguiar *et al.* 2011) or second day of floral anthesis (Vieira *et al.* 2007). So far, nothing is known about the possible differences between fruit set according to the pollinated flower age. Knowing the optimum flower age for pollination (expressed by maximum degree of stigma receptivity), and consequently the real reproductive potential of the species, would enhance the efficiency of experimental pollination procedures. The purpose of this study was to verify whether the pollination efficiency of *Corymborkis flava* (Sw.) Kuntze, a terrestrial orchid of the Atlantic Forest, is affected by the flower age. The following hypotheses were tested: 1) the fruiting of older is lower than that of younger flowers, 2) the observation of morphological changes (stigmatic area color and exudates presence and aspect of the perianth), stigma receptivity test by using a solution of hydrogen peroxide (for detected the presence of stigmatic peroxidases) and hand-pollination tests are equally effective in defining the period of the stigmatic receptivity.

The study was conducted at the Estação de Pesquisa, Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso (EPTEAMP, 20°45'07"S, 42°55'31"W, 690 m asl), the largest forest fragment (195 ha) of the municipality of Viçosa, State of Minas Gerais, southeastern Brazil. Its vegetation is part of the Atlantic Forest and, according to the classification of Veloso *et al.* (1991), a seasonal semideciduous forest. In EPTEAMP, *Corymborkis flava* grows in areas with vegetation in an advanced stage of regeneration and occurs at a density of 600 plants/ha (personal observation). The flowering of this orchid is annual (March-June) and the flowers are long-lived, lasting for 7-9 days (Vieira *et al.* 2007). Its flowers are yellow, tubular, nectariferous and odorless (Vieira *et al.* 2007), with ornithophilous characteristics (Abreu & Vieira 2004). Its pollinarium consists of viscidium, caudicles and two sectile pollinia (composed of sub-units known as massulae). *C. flava* is self-compatible, but the occurrence of herkogamy prevents spontaneous self-pollination (more detail in Vieira *et al.* 2007). The period of stigma receptivity was analyzed using non-pollinated flowers (n = 25) at different ages.

Initially, these flowers were examined with a stereomicroscope for two aspects: perianth (changes in its appearance, including the color) and stigmatic area (color and presence of exudate). Then the stigma receptivity, of the same flowers, was tested with hydrogen peroxide at 6% (Dafni *et al.* 2005). Based on the results of the morphological observations and the stigma receptivity test, flowers (n = 40) with different ages were hand-pollinated (cross-pollinations) and the fruit sets were recorded. In these pollinations, the whole pollinarium, removed from the flowers on the first day of anthesis, was inserted into the stigmatic area of each flower, as suggested by Dafni *et al.* (2005), between 11 am and 14 pm. The association between pollination success and flower age was assessed by the Trend Test ($A > 0$, the trend is increasing; $A < 0$, the trend is decreasing). This analysis was conducted using BioEstat 5.0 (Ayres *et al.* 2007).

The flowers have sepals with bright color (yellow) and a white and moist stigmatic area, until the fourth day of anthesis. On the fifth day, the perianth and the stigma become brownish, characterizing the beginning of flower senescence. The hydrogen peroxide test showed intense bubbling on the stigma of flowers from the first to the third day of anthesis. On the fourth day, there was little bubbling and on the fifth day, few bubbles were observed. The reduction in bubbling, according to Dafni & Maués (1998), indicates a reduction in enzyme activity and, consequently, lower stigmatic receptivity. Based on these results, flowers from the first to the fourth day of anthesis were used to carry out the cross-pollinations. The fruit set data were 90 and 100% on the first and second days and 60 and 50% on the third and fourth days, respectively. It was observed that the flower age influences the success of pollination, which decreases as the flower gets older ($A = -8$, $X^2 = 6.8267$, $df = 1$, $p = 0.0090$). During the pollination tests, differences according to the flower age were observed in the speed of pollinarium adhesion to the stigma. In the first two days, adhesion was fast, decreasing on the third day and becoming weak on the fourth. Thus, the adherence of the pollinia in the stigmatic area can also be regarded as an indicator of stigma receptivity in *Corymborkis flava*. Morphological observations and the stigma receptivity test were equally effective in defining the period of stigmatic receptivity as well as hand-pollination. However, the higher fruit sets on the first and second day of anthesis showed that the best method to define the stigma receptivity, including its magnitude, was experimental pollination. Our results provided answers to one of the purposes of studies involving stigma receptivity. Dafni *et al.* (2005) commented that receptivity should be investigated with the purpose of identifying the optimum flower age for artificial pollination procedures. In orchid species, the statement that older long-lived

flowers are related to lower stigma receptivity is not always true (see Stpiczynska 2003). In addition, according to Primack (1985), the long-lived flowers of many species are not receptive throughout the entire flower lifespan, as seems to be the case of *C. flava*. Flowers last 7-9 days (Vieira *et al.* 2007) and their optimum age for pollinations were on the first and second day of anthesis (this study). In conclusion, for orchids species with long-lived flowers, *in vivo* cross-pollination is recommended to evaluate the maximum degree of stigmatic receptivity and the real reproductive potential of the flowers (90 to 100% fruit set in *C. flava*), in addition to stigma receptivity tests and analysis of morphological aspects.

Acknowledgements

The authors are indebted to the Foundation for Research Support of Minas Gerais (FAPEMIG) and to National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), for scholarships for Doctor of Science and productivity, granted to the first and third author, respectively, and for funding the project "Interações entre plantas e polinizadores em sub-bosque de Floresta Atlântica "(Process CRA-PPM - 00105-09 FAPEMIG). This work is part of the doctoral thesis presented by the first author in the postgraduate program in Botany of the Federal University of Viçosa.

References

- Abdala-Roberts, L.; Parra-Tabla, V. & Navarro, J. 2007. Is Floral Longevity Influenced by Reproductive Costs and Pollination Success in *Cohniella ascendens* (Orchidaceae)? **Annals of Botany** **100**: 1367-1371.
- Abreu, C.R.M. & Vieira, M.F. 2004. Os beija-flores e seus recursos florais em um fragmento florestal de Viçosa, sudeste brasileiro. **Lundiana** **5**: 129-134.
- Aguiar, J.M.R.B.V.; Pansarin, L.M.; Ackerman, J.D. & Pansarin, E.R. 2011. Biotic versus abiotic pollination in *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae). **Plant Species Biology** **27**: 86-95.
- Ayres, M.; Ayres, J.R.M.; Ayres, D.L. & Santos, A.S. 2007. **BioEstat 5.0-Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**. Belém, Sociedade Civil Mamirauá.
- Borba, E.L. & Braga, P.I.S. 2003. Biologia reprodutiva de *Pseudolaelia corcovadensis* (Orchidaceae): melitofilia e autocompatibilidade em uma Laeliinae basal. **Revista Brasileira de Botânica** **26**: 541-549.

- Borba, E.L.; Shepherd, G.J. & Semir, J. 1999. Reproductive systems and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occurring in Brazilian 'campo rupestre' vegetation. **Plant Systematics and Evolution** **217**: 205-214.
- Calvo, R. 1990. Four year growth and reproduction of *Cyclopogon cranichoides* (Orchidaceae) in south Florida. **American Journal of Botany** **77**: 736-741.
- Dafni, A.; Kevan, P.G. & Husbans, B.C. 2005. **Practical pollination biology**. Cambridge, Enviroquest.
- Dafni, A. & Maués, M.M. 1998. A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. **Sexual Plant Reproduction** **11**: 117-180.
- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland, Dioscorides Press.
- Gale, S. 2007. Autogamous seed set in a critically endangered orchid in Japan: pollination studies for the conservation of *Nervilia nipponica*. **Plant Systematics and Evolution** **268**: 59-73.
- Galetto, L.; Bernardello, G. & Rivera, G.L. 1997. Nectar, Nectaries, Flower Visitors, and Breeding System in Five Terrestrial Orchidaceae from Central Argentina. **Journal of Plant Research** **110**: 393-403.
- Li, P.; Luo, Y.; Bernhardt, P.; Kou, Y. & Perner, H. 2008. Pollination of *Cypripedium plectrochilum* (Orchidaceae) by *Lasioglossum* spp. (Halictidae): the roles of generalist attractants versus restrictive floral architecture. **Plant Biology** **10**: 220-23.
- Machado, I.C. & Lopes, A.V. 2004. Floral traits and pollination systems in the caatinga, a Brazilian tropical dry forest. **Annals of Botany** **94**: 365-376.
- Martini, P.; Schlindwein, C. & Montenegro, A. 2003. Pollination, flower longevity, and reproductive biology of *Gongora quinquenervis* Ruíz and Pavón (Orchidaceae) in an Atlantic Forest fragment of Pernanbuco, Brazil. **Plant Biology** **5**: 495-503.
- Micheneau, C.; Fournel, J.; Warren, B.H.; Hugel, S.; Gauvin-Bialecki, A.; Pailler, T.; Strasberg, D.; Chase, M.W. 2010. Orthoptera, a new order of pollinator. **Annals of Botany** **105**: 355-364.
- Pansarin, E.R. & Amaral, M.C.E. 2006. Biologia reprodutiva e polinização de duas espécies de *Polystachya* Hook. no Sudeste do Brasil: evidência de pseudocleistogamia em Polystachyaeae (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.
- Peter, C.I. & Johnson, S.D. 2009. Reproductive biology of *Acrolophia cochlearis* (Orchidaceae): estimating rates of cross-pollination in epidendroid orchids. **Annals of Botany** **104**: 573-581.
- Primack, R.B. 1985. Longevity of individual flowers. **Annual Review of Ecology and Systematics** **16**: 15-37.
- Proctor, H.C. & Harder, L.D. 1995. Effect of pollination success on floral longevity in the orchid *Calypso bulbosa* (Orchidaceae). **American Journal of Botany** **82**: 1131-1136.
- Sanzol, J. & Herrero, M. 2001 The "effective pollination period" in fruit trees. **Scientia horticulturae -Amsterdam** **90**: 1-17.
- Schoen, D.J. & Ashman, T.L. 1995 The evolution of floral longevity: resource allocation to maintenance versus construction of repeated parts in modular organisms. **Evolution** **49**: 131-139.
- Singer, R.B. 2001. Pollination biology of *Habenaria parviflora* (Orchidaceae: Habenariinae) in southeastern Brazil. **Darwiniana** **39**: 201-207.
- Singer, R.B. 2002. The pollination mechanism in *Trigonidium obtusum* Lindl (Orchidaceae: Maxillariinae): Sexual mimicry and trap-flowers. **Annals of Botany** **89**: 157-163.
- Singer, R.B. & Sazima, M. 1999. The pollination mechanism in the 'Pelexia alliance' (Orchidaceae: Spiranthinae). **Botanical Journal of the Linnean Society** **131**: 249-262.
- Singer, R.B. & Sazima, M. 2001. Flower morphology and pollination mechanism in three sympatric Goodyerinae orchids from Southeastern Brazil. **Annals of Botany** **88**: 989-997.
- Srimuang, K.; Watthana, S.; Pedersen, H.A.; Rangsayatorn, N. & Eungwanichayapant, P.D. 2010. Flowering phenology, floral display and reproductive success in the genus *Sirindhornia* (Orchidaceae): a comparative study of three pollinator-rewarding species. **Annales Botanici Fennici** **47**: 439-448.
- Stort, M.N.S. & Galdino, G.L. 1984. Self- and cross-pollination in some species of the genus *Laelia* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Genética** **7**: 671-676.
- Stpiczynska, M. 2003. Stigma receptivity during the life span of *Platanthera chlorantha* Custer (Rchb.) flowers. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica** **45**: 37-41.

- van der Pijl, L. & Dodson, C.H. 1966. **Orchid Flowers: Their Pollination and Evolution**. Coral Gables, University of Miami Press.
- van Doorn, W.G. 1997. Effects of pollination on floral attraction and longevity. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1615-1622.
- Veloso, H.P.; Rangel-Filho, A.L.R.; Lima, J.C.A. 1991. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro, IBGE.
- Vieira, M.F.; Andrade, M.R.S.; Bittencourt, J.R.N.S. & Carvalho-Okano, R.M. 2007. Flowering phenology, nectary structure and breeding system in *Corymborkis flava* (Spiranthoideae: Tropicidae), a terrestrial orchid from a Neotropical forest. *Australian Journal of Botany* **55**: 635-642.

Capítulo 3

***Cyclopogon variegatus* (Spiranθοideae, Cranichideae): orquídea terrestre neotropical com um novo mecanismo de autopolinização**

Resumo

As orquídeas apresentam flores tipicamente hercogâmicas, dependentes de polinizadores e frutificações baixas; a autogamia é rara e tem sido associada a altas frutificações. Em 2010, *Cyclopogon variegatus* foi encontrada pela primeira vez em Minas Gerais, em fragmento de Floresta Atlântica na Zona da Mata desse Estado. Observações preliminares demonstraram elevadas frutificações nessa população. Objetivou-se confirmar a autogamia em *C. variegatus*, descrever o mecanismo de autopolinização e interpretar suas consequências ecológicas. Flores em diferentes estádios foram analisadas por meio de microscopia de fluorescência e de luz (cortes anatômicos). Foram conduzidos testes de polinização e de viabilidade das sementes. Ademais, foram realizadas observações de polinizadores e avaliada a remoção de polinário em flores senescentes. As áreas estigmáticas de *C. variegatus*, representadas por dois conjuntos de papilas projetadas para o interior da cavidade de clinândrio (face dorsal do rostelo) é característica nova em Spiranθοideae. Nas demais espécies dessa subfamília, o estigma é uma depressão na face ventral da coluna. As papilas do interior da cavidade de clinândrio produzem mucilagem, em botões em pré-antese, e são adjacentes à base das polínias, promovendo a germinação precoce dos grãos de pólen. Os tubos polínicos crescem e atingem o tecido transmissor. Esse processo continua nas flores em antese e caracteriza uma autopolinização obrigatória. Os testes reprodutivos reforçam a autogamia, pois *C. variegatus* não é agamospérmica e produz porcentagens elevadas de frutos e de sementes viáveis através da autopolinização espontânea. Não houve atuação de polinizadores. O mecanismo de autopolinização em *C. variegatus* é inédito nas orquídeas, diferindo do observado em outras espécies autógamas. Essas divergências incluem a interiorização da região estigmática e autogamia precoce. Esse novo mecanismo reprodutivo pode ter permitido o estabelecimento dessa espécie na área de estudo, onde os polinizadores estão ausentes, e pode estar favorecendo a sua expansão territorial sobre um bioma totalmente fragmentado.

Palavras-chave: autogamia, Floresta Atlântica, micromorfologia, sucesso reprodutivo

3.1. Introdução

A autogamia tem sido considerada como um sistema reprodutivo raro em Orchidaceae (Neiland & Wilcock 1998). Segundo van der Pijl & Dodson (1966), apenas 3% das orquídeas são autógamas e as demais são dependentes de polinizadores diversos para que ocorra a frutificação. Por outro lado, Catling (1990) mencionou que em até 20% das orquídeas ocorre a autopolinização, mas essa estratégia é incomum em espécies tropicais.

A autopolinização nas orquídeas ocorre em espécies com flores cleistógamas (autogamia obrigatória) e em espécies com flores casmógamas (van der Pijl & Dodson 1966; Cattling 1990; Ackerman 1992). Nestas últimas, a autogamia é resultante de alterações morfológicas nas flores, que promovem a redução da distância entre estigma e grãos de pólen devido: ao clinândrio raso associado a polínias frágeis e quebradiças (Catling 1987; Claessens *et al.* 1998; Talalaj & Brzosko 2008); à produção abundante de secreção estigmática, que alcança os grãos de pólen na antera e promove a sua germinação e o crescimento dos tubos polínicos (Bonatti *et al.* 2006; Kowalkowska & Margońska 2012); ao rostelo rudimentar, ausente (Hagerup 1952; Pedersen & Ehlers 2000; Gale *et al.* 2007; Micheneau *et al.* 2008), ou modificado, que atua como área estigmática (Hagerup 1952; Catling 1990).

A autopolinização também se tornou possível entre as orquídeas devido a movimentos das peças florais, envolvendo processos mecânicos. Exemplificam esses processos, a rotação do polinário em até 360° e a sua inserção no estigma (Martens 1926; van der Pijl & Dodson 1969; Catling 1980; González-Díaz & Ackerman 1988; Liu *et al.* 2006; Aguiar *et al.* 2012; Chaturvedi 2012) e movimentos de curvatura da coluna ou do labelo, que propiciam o contato das polínias com a área estigmática (Chaturvedi 2009; Chaturvedi & Chaturvedi 2011).

Nas orquídeas, excetuando-se as cleistógamas, a autopolinização raramente é obrigatória (Dressler 1981). Nas que possuem este mecanismo, as flores se autopolinizam no final do período de antese (*delayed self-pollination sensu* Lloyd & Schoen 1992), provavelmente devido à escassez de polinizadores (Liu *et al.* 2006; Wheelwright 2006). Como essas plantas tipicamente apresentam baixo sucesso reprodutivo (Neiland & Wilcock 1998; Tremblay *et al.* 2005), a autogamia tem sido a justificativa para as elevadas frutificações observadas, tal como relatado por Ackerman (1992), Blanco (2002) e Pansarin & Pansarin (2010). Esses autores, entretanto, inferiram a autogamia sem analisar o sistema reprodutivo das espécies envolvidas.

Nas espécies da subfamília *Spiranthoideae* e tribo *Cranichideae sensu* Dressler (1993), como, por exemplo, a do presente estudo, *Cyclopogon variegatus* Barb. Rodr., as flores são consideradas pequenas a médias, ressupinadas, com antera dorsal, ereta e paralela a um amplo rostelo (Dressler 1981) e o estigma é uma depressão, única ou bilobada, na face ventral da coluna (Dressler 1993; Singer & Sazima 1999). Essas características favorecem a polinização cruzada e, portanto, a dependência por polinizadores para que ocorra a frutificação (Calvo 1990; Singer & Sazima 1999; Singer & Sazima 2000).

Cyclopogon variegatus é uma espécie terrestre (RBGK 2013) encontrada na Argentina e no Brasil (Mobot 2013); neste último caso, em formações de Floresta Atlântica na região Sul, Centro-oeste e Sudeste (Barros *et al.* 2013). Na região Sudeste, ocorre nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (Barros *et al.* 2013). Em 2010, essa espécie foi encontrada pela primeira vez no estado de Minas Gerais, atualmente a região limítrofe da sua distribuição no Sudeste brasileiro (obs. pess.). Essa população ocorre em fragmento de Floresta Atlântica no município de Viçosa, Zona da Mata de Minas Gerais. Em observações preliminares, em Viçosa, foram verificadas elevada frutificação e ausência de polinizadores nos indivíduos, fatores que indicam a autogamia. Nesse contexto, foram objetivos confirmar a autogamia em *C. variegatus*, descrever o mecanismo de autopolinização e interpretar as consequências ecológicas dessa estratégia reprodutiva.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Área de estudo e espécie

O estudo foi conduzido no período de 2010 a 2012, em um remanescente de floresta semidecídua de 195 ha, a Estação de Pesquisa Treinamento e Educação Ambiental Mata do Paraíso (20°45'07"S e 42°55'31"W, 690m de alt.), no município de Viçosa, Minas Gerais, sudeste do Brasil. Esse remanescente é composto por diferentes estádios sucessionais: pasto e florestas em estágio inicial, médio e avançado de regeneração (Silva-Júnior 2004). É circundado por áreas urbanas, pastos e pequenos capões de mata.

O clima de Viçosa, segundo a classificação de Köppen, é definido como Cwb, mesotérmico com verões quentes e úmidos e invernos frios e secos. As médias anuais de pluviosidade, umidade relativa do ar e temperatura são, respectivamente, de 1221,4 mm, 81% e 19,4°C; a média das temperaturas máximas é de 26,4°C e das mínimas de

14,8°C (DNMET 1992). A estação seca se concentra entre os meses de abril a setembro, e a estação chuvosa entre os meses de outubro a março.

Cyclopogon variegatus possui folhas com limbo castanho-esverdeado repleto de pontos rosa-pálidos, que se encontram apoiadas sobre a serrapilheira, local onde habita, dificultando a visualização dos indivíduos. Os indivíduos da população estudada, cerca de 40 adultos e diversos jovens, foram encontrados numa área de aproximadamente 4 ha, sob plantação de *Pinus* sp. e em porções adjacentes de floresta em estágio médio de regeneração. O material testemunho foi depositado no Herbário VIC (Nº: 33787).

Nessa população, a floração foi observada de agosto a setembro. Suas inflorescências, com cerca de 23,75 cm ($\pm 5,3$; n=9 plantas) de altura, apresentaram 11,6 ($\pm 3,5$; n=11) flores castanho-esverdeadas de labelo branco, dispostas em espiral. Essas flores permaneceram em antese por 8 dias (± 2 ; n=8). Nessa ocasião, foram observadas duas ou três pequenas gotas de néctar próximas à base da coluna (teste positivo com fita indicadora de açúcares simples *sensu* Dafni *et al.* 2005). Após esse período, o labelo tornou-se amarelo-pálido, caracterizando o início da senescência floral. Em seguida, o perianto e a coluna murcharam e iniciou-se a frutificação, observada pelo aumento de volume do ovário. Foi possível observar simultaneamente botões, flores e frutos em uma mesma inflorescência.

3.2.2. Morfologia funcional da coluna

Para a caracterização morfofuncional da coluna, flores em diferentes estádios de desenvolvimento (botões jovens, em pré-antese e flores em antese), após a remoção do perianto, foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,0, por 24 h. Algumas flores foram coradas com azul de anilina e observadas sob microscopia de fluorescência para localização de tubos polínicos (Martin 1959). Outras foram desidratadas em séria etanólica e embebidas em historesina (metacrilato). Nestas, foram realizadas secções transversais e longitudinais, com 5 μ m de espessura, utilizando-se o micrótomo rotativo (RM 2155, Leica, Deerfield, Illinois, EUA). Os cortes foram corados com azul de toluidina (O'Brien *et al.* 1964) e montados em lâmina de vidro com Permount.

Testes histoquímicos com corifosfina (Ueda & Yoshioka 1976), para verificar a presença de substâncias pécticas, foram conduzidos em material previamente fixado e embebido em resina (metacrilato). Amostras controle foram conduzidas simultaneamente de acordo com as especificações do teste e lâminas sem qualquer tratamento também foram montadas. Observações e registros de imagens foram

realizados com microscópio de luz (Modelo AX70TRF, Olympus Optical, Tokio, Japão) equipado com câmera digital (U-photo system) e epifluorescência (HBO 50W).

3.2.3. Sistema reprodutivo e visitantes florais

Botões em pré-antese e flores, recém-coletados, foram dissecados sob estereomicroscópio. Nos botões (n=10), flores em antese (n=8) e senescentes (n=10), verificou-se que, ao remover o polinário, as polínias se fragmentavam e uma porção delas permanecia na cavidade do clinândrio. Diante desta constatação, foi estimada, visualmente, a porcentagem de cada polínia que permaneceu nessas flores.

Os seguintes testes de polinização foram conduzidos: polinização aberta (controle); autopolinização espontânea, com o isolamento de plantas inteiras; e agamospermia, com a eliminação de todas as peças florais, exceto o ovário, em botões jovens.

Para a análise da viabilidade, sementes provenientes de frutos maduros de três indivíduos, oriundas dos testes de polinização aberta (n=5156 sementes) e autopolinização espontânea (n=4435 sementes), foram pré-condicionadas em solução de sacarose 10% por 24 horas e, em seguida, imersas em tetrazólio 1% por 24 horas (Hosomi *et al.* 2011). Foram consideradas viáveis sementes com embrião corado de vermelho.

A presença de visitantes florais foi verificada por meio de observações em dias não consecutivos das 08:00 às 17:00 horas, totalizando 30 horas. Adicionalmente, flores senescentes (n=40) coletadas em diferentes períodos durante a floração, foram observadas sob estereomicroscópio para verificar se houve remoção do polinário, a fim de confirmar a atuação de possíveis polinizadores.

3.2.4. Análises estatísticas

A maior parte dos dados não apresentou distribuição normal. Em função disso, foi utilizada mediana e o desvio interquartil para uma descrição mais acurada dos resultados (Gotelli & Ellinson 2011). Os testes estatísticos foram escolhidos de acordo com a distribuição dos dados em relação à curva normal. As porcentagens das políneas remanescentes nas flores em antese e senescente foram analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis. As frutificações obtidas nos testes de polinização aberta e espontânea foram comparadas por meio do teste Qui-quadrado. As diferenças na viabilidade das sementes foram analisadas por meio da Anova. As análises foram conduzidas no software BioEstat 5.0 (Ayres *et al.* 2007).

3.3. Resultados

3.3.1. Morfologia da coluna e mecanismo de autopolinização

A coluna possui face ventral plana, rostelo ereto com viscidio no ápice de sua face dorsal, antera com grãos de pólen organizados em tétrades e cavidade do clinândrio profunda (Fig. 1A-B). Não foi observada cavidade estigmática na região ventral da coluna (Fig. 1A). Nessa região ocorrem duas projeções que cobrem as extremidades laterais da base do rostelo (Figs. 1C-D), que na sua face ventral, no terço inferior, apresentou papilas dispostas nas extremidades laterais, formando duas faixas (Figs. 1C-E). Também foram observadas papilas na base do rostelo, em sua face dorsal, organizadas em dois conjuntos opostos, que se projetam para o interior da cavidade do clinândrio e (Figs. 1C-E). Estas papilas são frouxamente organizadas (Fig. 1D); as do interior do clinândrio estão adjacentes à base das polínias (Fig. 1E). As papilas possuem características de células secretoras, tais como, parede celular delgada, núcleo bem desenvolvido e citoplasma denso (Figs. 1D-E), e secretam mucilagem (confirmado pelos testes histoquímicos). Na base do rostelo, em contínuo às papilas, foi observado o tecido transmissor (Figs. 1A, D). Este possui lume preenchido por mucilagem, que é revestido por células com características secretoras (Fig. 1F). O tecido transmissor encontra-se imerso em parênquima de preenchimento (Figs. 1A, F).

Ao analisar as diferentes fases florais, foi observado que em botões jovens a antera apresentou parede íntegra e composta por duas camadas de células: a epiderme, externamente, com células justapostas e achatadas, e internamente o endotécio, com células caracterizadas por faixas de parede espessadas (Figs. 1B, G-H). O tapete não foi observado, o que indica que já foi consumido durante a microsporogênese. Cada polínia apresentou, na porção voltada para o rostelo, uma zona de fragilidade, onde a epiderme não foi observada e o endotécio inicia o processo de ruptura (Figs. 1H-I). Os testes histoquímicos demonstraram que a produção de mucilagem nas papilas (Figs. 1H-I) e no tecido transmissor iniciou-se nos botões jovens. Nessa fase, foram observados óvulos em começo de desenvolvimento.

Nos botões em pré-antese, a parede da antera encontra-se rompida e as tétrades liberadas no interior da cavidade do clinândrio (Fig. 2A). Dessa forma, nessa fase é iniciado o contato entre as papilas do interior da cavidade do clinândrio, cobertas por secreção mucilagínosa, e as tétrades (Figs. 2A-B). Após esse contato, ocorre a germinação dos grãos de pólen e o crescimento dos tubos polínicos, que penetram nos espaços intercelulares das papilas (Fig. 2B). Esse processo continua nas flores em

antese, quando muitos tubos polínicos são observados crescendo entre as papilas nos conjuntos do interior da cavidade do clinândrio (Figs. 2C-D).

Após penetrar nos conjuntos de papilas do interior da cavidade do clinândrio, os tubos polínicos alcançaram o tecido transmissor. Poucos tubos polínicos foram observados ao longo do tecido transmissor em botões em pré-antese (Fig. 2E), se comparados às flores em antese (Fig. 2F). Os feixes de tubos polínicos provenientes de cada conjunto de papilas do interior da cavidade do clinândrio cresceram nas extremidades do tecido transmissor e mantiveram-se separados até alcançar o ovário (Figs. 2E-F). Foram observados tubos polínicos penetrando no ovário nos botões em pré-antese e nas flores em antese.

3.3.2. Sistema reprodutivo e visitantes florais

Botões em pré-antese, flores em antese e senescentes apresentaram uma porção das polínias que se fragmentou e permaneceu aderida às papilas do interior da cavidade do clinândrio após a remoção do polinário. Essa porção apresentou coloração translúcida, diferindo do restante das polínias, com coloração-pálida (opaca). Em botões florais, a porção das polínias que permaneceu no clinândrio compreendeu poucos grãos de pólen e, por isso, a sua porcentagem não foi estimada. A porcentagem da polínia remanescente foi crescente, na seguinte ordem: flores em antese ($25\% \pm 21,5$) e flores senescentes ($50\% \pm 0$); houve diferença significativa entre os valores observados ($H=17.6667$, $gl=1$, $p<0.001$).

As frutificações resultantes dos testes de polinização aberta e autopolinização espontânea foram altas e semelhantes. Não houve formação de frutos no teste de agamospermia (Tabela 1).

Tabela 1: Resultados das frutificações obtidas nos testes de polinização em flores de *Cyclopogon variegatus* em Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Testes	Indivíduos	Flores	Frutos	Frutificação (%)
Polinização aberta	5	100	90	90 ^a
Autopolinização espontânea	5	86	69	80 ^a
Agamospermia	3	10	0	0

Mesmas letras indicam frutificações estatisticamente semelhantes ($\chi^2 = 2.811$, $gl=1$, $p=0,093$).

A viabilidade das sementes provenientes da polinização aberta ($98,99\% \pm 2,07$) e autopolinização espontânea ($91,72\% \pm 2,51$) foram elevadas e não diferiram significativamente entre si ($F=6,59$; $gl=1$, $p= 0,06$).

Não há polinizadores, pois nenhum visitante floral foi observado ou polinários foram removidos das flores senescentes.

3.4. Discussão

3.4.1. Mecanismo de autopolinização

A localização da região estigmática em *C. variegatus* diverge da das demais espécies de Spiranthoideae, que possuem área estigmática na face ventral da coluna, representada tipicamente por uma depressão única ou bilobada (Dressler 1981; Singer & Coccuci 1999; Singer & Sazima 1999; Figueroa *et al.* 2012). Em *C. variegatus* são duas áreas estigmáticas independentes, representadas por dois conjuntos de papilas no interior da cavidade do clinândrio. O contato desses conjuntos de papilas com a base das polínias, associado à produção de mucilagem, ruptura do endotécio e liberação dos grãos de pólen, resultou na germinação do pólen e no crescimento dos tubos polínicos em botões florais (*prior anthesis self-pollination sensu* Lloyd & Schoen 1992). Por isso, a autogamia é um sistema obrigatório em *C. variegatus* e as áreas estigmáticas, como descritas, são inéditas para Spiranthoideae e demais orquídeas. A perda da hercogamia, mecanismo clássico das orquídeas que impede a autopolinização (van der Pijl & Dodson 1969), com a interiorização das áreas estigmáticas, dentro da cavidade do clinândrio e adjacente às polínias, constitui um novo mecanismo de autopolinização em Orchidaceae.

Em *C. variegatus*, as faixas de papilas da porção ventral do rostelo, apesar de apresentarem as mesmas condições das papilas do interior do clinândrio, não promoveram a autogamia, pois devido ao clinândrio profundo os grãos de pólen permanecem nessa cavidade durante toda a antese. O rostelo como área receptiva capaz de promover a germinação de pólen, foi registrado em outras orquídeas autógamas (Hagerup 1952; Catlling 1990). Nelas, a polínia quebradiça e o clinândrio raso permitiram a queda de grãos de pólen sobre papilas na região ventral do rostelo e a consequente germinação e crescimento de tubos polínicos.

As áreas estigmáticas posicionadas na cavidade do clinândrio, associadas à elevada frutificação na autopolinização espontânea, ausência de frutos agamospérmicos e de polinizadores, reafirmam a autogamia obrigatória em *C. variegatus*. Em espécies alógamas de *Cyclopogon*, a polinização é realizada por abelhas da família Halictidae (Singer & Coccuci 1999; Singer & Sazima 1999; Benitez-Vieyra *et al.* 2006), que recebem o polinário no aparelho bucal. Logo, a polinização ocorre quando o inseto insere o seu aparelho bucal na flor e pressiona o polinário contra a área estigmática,

posicionada na porção ventral da coluna. Devido à característica frágil e quebradiça das suas polínias, porções de grãos de pólen aderem-se ao estigma (Singer & Coccuci 1999; Singer & Sazima 1999; Benitez-Vieyra *et al.* 2012). Dessa forma, se um polinizador com polinário visitasse a flor de *C. variegatus*, ele dificilmente conseguiria depositar pólen nas faixas de papilas do rostelo, localizadas na porção ventral, pois não há superfície contra a qual o polinário possa ser pressionado e o possível contato entre o polinário e essas faixas não proporcionaria a quebra de porções das polínias. Além disso, as projeções do ápice da coluna na sua face ventral, que protegem a base das faixas de papilas do rostelo, reduziram a área passível de contato com pólen externo, minimizando as chances de uma eventual polinização xenogâmica.

A autogamia obrigatória em *C. variegatus* também é reforçada pela porção das polínias que se fragmentou e permaneceu aderida às papilas do interior do clinândrio, após a remoção manual do polinário. Por causa disso, um polinário removido por um possível polinizador, nessa planta, teria cerca de 25% a menos de pólen e esta perda poderia afetar negativamente o sucesso reprodutivo oriundo da polinização xenogâmica. O mecanismo de autopolinização de *C. variegatus* parece ser extremo e desvantajoso quando comparado ao de outras plantas autógamas (Lloyd & Schoen 1992). Nelas, a autogamia é facultativa e a autopolinização tardia, ou seja, ocorre no final da antese em flores não visitadas (Tremblay *et al.* 2005; Talalaj & Brzosko 2008). Desse modo, o sistema reprodutivo é misto (alogamia e autogamia), sem perda de pólen (Harder & Wilson 1998 e citações contidas neste trabalho). A autopolinização precoce, como a observado em *C. variegatus*, sem chances à polinização cruzada, se assemelha à das flores cleistógamas (Culley & Klooster 2007).

Em *C. variegatus*, a autogamia e, conseqüente, independência por polinizadores, parece ser uma condição derivada recente. Essa suposição está baseada no conjunto de características mantidas por suas flores, a casmogamia, a produção de néctar e o clinândrio profundo. Essas características estão relacionadas à polinização cruzada, também observadas na orquídea autógama *Nervilia nipponica* por Gale *et al.* (2007).

Em *Cyclopogon*, gênero com 70 espécies (Balogh 1982), tem sido observado a autocompatibilidade (Calvo 1990; Singer & Sazima 1999; Benitez-Vieyra *et al.* 2006). A autogamia foi registrada em apenas duas espécies por Catlling (1990), que verificou modificações estruturais nas flores, como rostelo e clinândrio ausentes. De fato, em orquídeas autógamas frequentemente se observa a redução ou perda de características morfológicas, que favorecem a autopolinização (Hagerup 1952; Micheneau *et al.* 2008), embora essas modificações inexistam em *C. variegatus*. Nossos resultados demonstram

que a autogamia, em orquídeas, pode resultar de distintas estratégias, que envolvem, além de reduções, perdas ou movimentos das peças florais, o surgimento de novas estruturas, como as papilas posicionadas próximas das polínias, no interior da cavidade do clinândrio.

3.4.2. Consequências ecológicas

Em populações naturais de angiospermas é esperado que os cruzamentos ocorram aleatoriamente entre os indivíduos (Charlesworth & Charlesworth 1987), mas esse padrão tem sido alterado em respostas às pressões ambientais (Schoen & Brown 1991; Neiland & Wilcock 1998; Bonatti *et al.* 2006; Liu *et al.* 2006; Wheelwright 2006), como parece ser o caso da população estudada de *C. variegatus*. Nela não há cruzamentos entre indivíduos, devido à ausência de polinizadores e ao mecanismo de autopolinização descrito anteriormente.

A estratégia das orquídeas que apresentam o mutualismo obrigatório com polinizadores específicos é arriscada e comumente submete as espécies à limitação de pólen, se há escassez de polinizadores (Neiland & Wilcock 1998; Johnson & Edwards 2000; Liu *et al.* 2006). Por isso, muitas espécies tendem a desenvolver estratégias de reprodução autônoma a fim de garantir maior sucesso reprodutivo (Tremblay *et al.* 2005), semelhante ao observado em *C. variegatus*. No entanto, a prole proveniente da polinização cruzada tem maior capacidade de adaptação e colonização que a de autopolinização, devido aos efeitos negativos da endogamia (Barret 2002). Dessa forma, quando as plantas restringem a sua reprodução à autogamia, tal como *C. variegatus*, parece haver uma compensação, ou seja, a qualidade da prole oriunda da polinização cruzada é substituída pela segurança reprodutiva garantida pela autopolinização (Dressler 1981).

Devido à autogamia obrigatória era esperado que *C. variegatus* sofresse os efeitos deletérios da endogamia. No entanto, essa espécie apresentou elevada frutificação natural, isto é, acima de 90%, enquanto a média das orquídeas tropicais, segundo Neiland & Wilcock (1998), é de 13,6%. *C. variegatus* apresentou também elevada viabilidade das sementes provenientes de autopolinização, acima de 90%, enquanto média é de 41% (Tremblay *et al.* 2005). Esses resultados indicam que a maioria dos alelos deletérios de *C. variegatus* foram eliminados pela seleção natural, tal como sugerido por Charlesworth & Charlesworth (1987) para outras espécies que baseiam sua reprodução na autogamia. Processo semelhante pode ter ocorrido com a

autógama *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl., que possui elevadas viabilidades das sementes provenientes da autopolinização (González-Díaz & Ackerman 1988).

A autogamia em *C. variegatus* possibilitou o seu estabelecimento na área de estudo, onde inexistem polinizadores. A área de estudo representa o extremo da distribuição de *C. variegatus* e a autogamia poderia ser uma adaptação local, devido à ausência de polinizadores. Essa hipótese foi embasada em muitas outras espécies tipicamente dependentes de polinizadores, que se tornam autógamas nos limites da sua distribuição geográfica, onde os polinizadores são escassos ou ausentes (Hagerup 1952; Catling 1987; Claessens *et al.* 1998; Barret 2002). Entretanto, na Serra do Japi, estado de São Paulo, essa espécie também não possui polinizadores e, provavelmente, também se reproduz de forma autônoma (Pansarin & Pansarin 2010). Essas observações somadas às do presente estudo sugerem que a autogamia em *C. variegatus* não seja uma estratégia em resposta à ausência de polinizadores, mas sim uma característica reprodutiva da espécie ao longo de toda a sua área de ocorrência.

A autogamia é uma estratégia frequente em ilhas (Schueller 2004). Nesses ambientes se estabelecem principalmente as espécies capazes de se autopolinizar (Schueller 2004), pois um único indivíduo é capaz de reproduzir e estabelecer uma população (Baker 1955; Wheelwright 2006). Nesse contexto, a autogamia pode ter favorecido a expansão de *C. variegatus* sobre a Floresta Atlântica, um dos biomas mais ameaçados do planeta (Myers *et al.* 2000), além de totalmente fragmentado (Ribeiro *et al.* 2009). O isolamento desses fragmentos por matrizes de difícil transposição faz com que cada remanescente atue como verdadeiras ilhas (Harris 1984). Dessa forma, a autogamia de *C. variegatus* pode favorecer o seu avanço sobre as ilhas de vegetação da Floresta Atlântica, aumentando assim a sua distribuição geográfica.

3.5. Agradecimentos

Ao programa de Pós-graduação em Botânica da UFV, pela oportunidade de realização dessa pesquisa e apoio logístico. À FAPEMIG pela concessão da bolsa de doutorado e financiamento do projeto “Interações entre plantas e polinizadores em sub-bosque de Floresta Atlântica” pelo edital PPM III/2009. Ao taxonomista Luiz M. Neto pela identificação da espécie.

3.6. Referências bibliográficas

- ACKERMAN, J.D. 1992. The Orchids of Puerto Rico and the Virgin Islands. Puerto Rico: La Editorial Universidad de Puerto Rico, 168p.
- AGUIAR, J.M.R.B.V.; PANSARIN, L.M.; ACKERMAN, J.D.; PANSARIN, E.R. 2012. Biotic versus abiotic pollination in *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae). *Plant Species Biology* 27:86-95.
- AYRES, M.; AYRES, J.R.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. 2007. BioEstat 5.0- Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 364p.
- BAKER, H.G. 1955. Self-compatibility and establishment after "long-distance" dispersal. *Evolution* 9:347-349.
- BALOGH, P. 1982. Generic Redefinition in Subtribe Spiranthinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 69:1119-1132.
- BARRETT, S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature* 3:274-284.
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W. 2013. *Orchidaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- BENITEZ-VIEYRA, S.; MEDINA, A.M.; GLINOS, E.; COCUCCHI, A.A. 2006. Pollinator-mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated orchid. *Functional Ecology* 20:948-957.
- BLANCO, M.A. 2002. Notes on the natural history of *Cyclopogon obliquus* (Orchidaceae: Spiranthinae) in Costa Rica. *Lankesteriana* 5:3-8.
- BONATTI, P.M.; SGARBI, E.; DEL PRETE, C. 2006. Gynostemium micromorphology and pollination in *Epipactis microphylla* (Orchidaceae). *Journal of Plant Research* 119:431-437.
- CALVO, R.N. 1990. Four-Year Growth and Reproduction of *Cyclopogon cranichoides* (Orchidaceae) in South Florida. *American Journal of Botany* 77:736-741.
- CATLING, P.M. 1980. Rain-assisted autogamy in *Liparis loeselii* (L.) L. C. Rich. (Orchidaceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 107:525-529.
- CATLING, P.M. 1987. Notes on the breeding system of *Sacoila lanceolata* (Aublet) Garay (Orchidaceae). *Annals of The Missouri Botanical Garden* 74:58-68.
- CATLING, P.M. 1990. Auto-pollination in *Orchidaceae*. In: ARDITTI, J. (Ed.), *Orchid biology, reviews and perspectives*. Portland: Timber Press, pp.121-158.
- CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:237-268.
- CHATURVEDI, S.K. 2009. Mechanism of self pollination in *Cymbidium sinense* (Jaks. Ex Ander) Willd. (Orchidaceae). *Journal of Plant Reproductive Biology* 1:1-4.
- CHATURVEDI, S.K. 2012. A unique mode of mechanical autogamy in *Phalaenopsis taenialis* (Lindl.) E.A. Christensen & Pradhan (Orchidaceae). *Journal of Plant Reproductive Biology* 4:1-4.
- CHATURVEDI, S.K.; CHATURVEDI, S. 2011. A unique mode of autogamy in *Flickingeria calocephala* Tsi & Chen (Orchidaceae). *Journal of Plant Reproductive Biology* 3:37-41.
- CLAESSENS, J.; KLEYNEN, J.; WIELINGA, R. 1998. Some notes on *Epipactis helleborine* (L.) Crantz ssp. *neerlandica* (Vermeulen) Buttler and *Epipactis renzii* K. Robatsch. *Eurorchis* 10:55-64.
- CULLEY, T.M.; KLOOSTER, M.R. 2007. The cleistogamous breeding system: a review of its frequency, evolution and ecology in angiosperms. *The Botanical Review* 73:1-30.
- DAFNI, A.; KEVAN, P.G.; HUSBAND, B.C. 2005. *Practical pollination biology*. Cambridge: Enviroquest, Ltd., 590p.

- DNMET - DEPARTAMENTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. 1992. Normais climatológicas (1961-1990). Brasília: SPI/EMBRAPA, 84p.
- DRESSLER, R.L. 1981. The Orchids: natural history and classification. Cambridge: Harvard University Press, 332p.
- DRESSLER, R.L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Portland: Dioscorides Press, 314p.
- FIGUEROA, C.; SALAZAR, G.A.; TERRAZAS, T.; DÁVILA, P. 2012. Estructura y desarrollo del ginostemio en *Dichromanthus michuacanus* (Orchidaceae, Spiranthinae). Revista Mexicana de Biodiversidad 83:73-82
- GALE, S. 2007. Autogamous seed set in a critically endangered orchid in Japan: pollination studies for the conservation of *Nervilia nipponica*. Plant Systematics and Evolution 268:59-73.
- GONZÁLEZ-DÍAZ, N.; ACKERMAN, J.D. 1988. Pollination, fruit set, and seed production in the orchid *Oeceoclades maculata*. Lindleyana 3:150-155.
- GOTELLI, N.J.; ELLISON, A.M. 2011. Princípios de estatística em ecologia. Porto Alegre: ARTMED, 528p.
- HAGERUP, O. 1952. Bud Autogamy in some northern orchids. Phytomorphology 2:51-60.
- HARDER, L.D.; WILSON, W.G. 1998. A clarification of pollen discounting and its joint effects with inbreeding depression on mating system evolution. American Naturalist 152:684-695.
- HARRIS, L.D. 1984. The fragmented forest: island biogeography theory and the preservation of biotic diversity. Chicago: University Of Chicago Press, 230p.
- HOSOMI, S.T.; SANTOS, R.B.; CUSTODIO, C.C.; SEATON, P.T.; MARKS, T.R.; MACHADO-NETO, B. 2011. Preconditioning *Cattleya* seeds to improve the efficacy of the tetrazolium test for viability. Seed Science and Technology 39:178-189.
- JOHNSON, S.D.; EDWARDS, T.J. 2000. The structure and function of orchid pollinaria. Plant Systematics and Evolution 222:243-269.
- KOWALKOWSKA, A.K.; MARGOŃSKA, H.B. 2012 Notes on the self-pollination of *Dendrobium biflorum* (G. Forst.) Sw. (Orchidales, Dendrobiinae). Acta Societatis Botanicorum Poloniae 81:223-228.
- LIU, K.W.; LIU, Z.J.; HUANG, L.; LI, L.Q.; CHEN, L.J.; TANG, G.D. 2006. Self-fertilization strategy in an orchid. Nature 441:945-946.
- LLOYD, D.G.; SCHOEN, D.J. 1992. Self and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. International Journal of Plant Science 153: 358-369.
- MARTENS, P. 1926. L'autogamie chez l'orchis et chez quelques autres Orchidées. Bulletin de la Société Royale de Botanique de Belgique 59:69-88.
- MARTIN, F.N. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. Stain Technology 4:125-128.
- MICHENEAU, C; FOURNEL, J; GAUVIN-BIALECKI, A; PAILLER, T. 2008. Auto-pollination in a long-spurred endemic orchid (*Jumellea stenophylla*) on Reunion Island (Mascarene Archipelago, Indian Ocean). Plant Systematics and Evolution 272:11-22.
- MOBOT. 2013. Disponível em: <http://www.tropicos.org/Name/23516446?tab=distribution> Acessado em 10 mai. 2013.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403:853-858.
- NEILAND, M.R.M.; WILCOCK, C.C. 1998. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. American Journal of Botany 85:1657-1671.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma 59:368-373.

- PANSARIN, E.R.; PANSARIN, L.M. 2010. The family Orchidaceae in the Serra do Japi, São Paulo state, Brazil. Viena: Springer, 290p.
- PEDERSEN, H.; EHLERS, B.K. 2000. Local evolution of obligate autogamy in *Epipactis helleborine* subsp. *neerlandica* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 223:173-183.
- RBGK- ROYAL BOTANIC GARDENS, KEW. 2013. World Checklist of Monocotyledons. Disponível em: <http://apps.keew.org/wcsp/incfamilies.do> Acessado em 10 mai. 2013.
- RIBEIRO, M.C.; METZGER, J.P.; MARTENSEN, A.C.; PONZONI, F.J.; HIROTA, M.M. 2009. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142:1141-1153.
- SCHOEN, D.J.; BROWN, A.H.D. 1991. Whole- and part-flower self-pollination in *Glycine clandestine* and *G. argyrea* and the evolution of autogamy. *Evolution* 45:1665-1674.
- SCHUELLER, S.K. 2004. Self-pollination in island and mainland populations of the introduced hummingbird-pollinated plant, *Nicotiana glauca* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 91:672-681.
- SILVA-JUNIOR, W.M.; MARTINS, S.V.; SILVA, A. F.; MARCO-JUNIOR, P. 2004. Regeneração natural de espécies arbustivo-arborea em dois trechos e uma Floresta Estacional Semidecidual, Viçosa, MG. *Scientia Forestalis* 66:169-179.
- SINGER, R.B.; COCUCCI, A.A. 1999. Pollination mechanism in southern Brazilian orchids which are exclusively or mainly pollinated by halictid bees. *Plant Systematics and Evolution* 217:101-117.
- SINGER, R.B.; SAZIMA, M. 1999. The pollination mechanism in the Pelexia alliance (Orchidaceae: Spiranthinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 131:249-262.
- SINGER, R. B.; SAZIMA, M. 2000. The pollination of *Stenorrhynchos lanceolatus* (Aublet) L. C. Rich. (Orchidaceae: Spiranthinae) by hummingbirds in Southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 223:221-227.
- TALALAJ, L; BRZOSKO, E. 2008. Selfing potential in *Epipactis palustris*, *E. helleborine* and *E. atrorubens* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 276:21-29.
- TREMBLAY, R.L.; ACKERMAN, J.D.; ZIMMERMAN, J.K.; CALVO, R. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* 84:1-54.
- UEDA, K.; YOSHIOKA, S. 1976. Cell wall development of *Micrasterias americana*, especially in isotonic and hypertonic solutions. *Journal of Cell Science* 21:617-631.
- van DER PIJL, L.; DODSON, C.H. 1966. *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Coral Gables: University of Miami Press, 214p.
- VOGEL, S. 1990. *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. Washington, DC: Smithsonian Institution Libraries & The national Science Foundation, 202p.
- WHEELWRIGHT, N.T.; DUKESHIRE, E.E.; FONTAINE, J.B.; GUTOW, S.H.; MOELLER, D.A.; SCHUETZ, J.G.; SMITH, T.M.; RODGERS, S.L.; ZINK, A.G. 2006. Pollinator limitation, autogamy and minimal inbreeding depression in insect-pollinated plants on a boreal island. *American Midland Naturalist* 155:19-38.

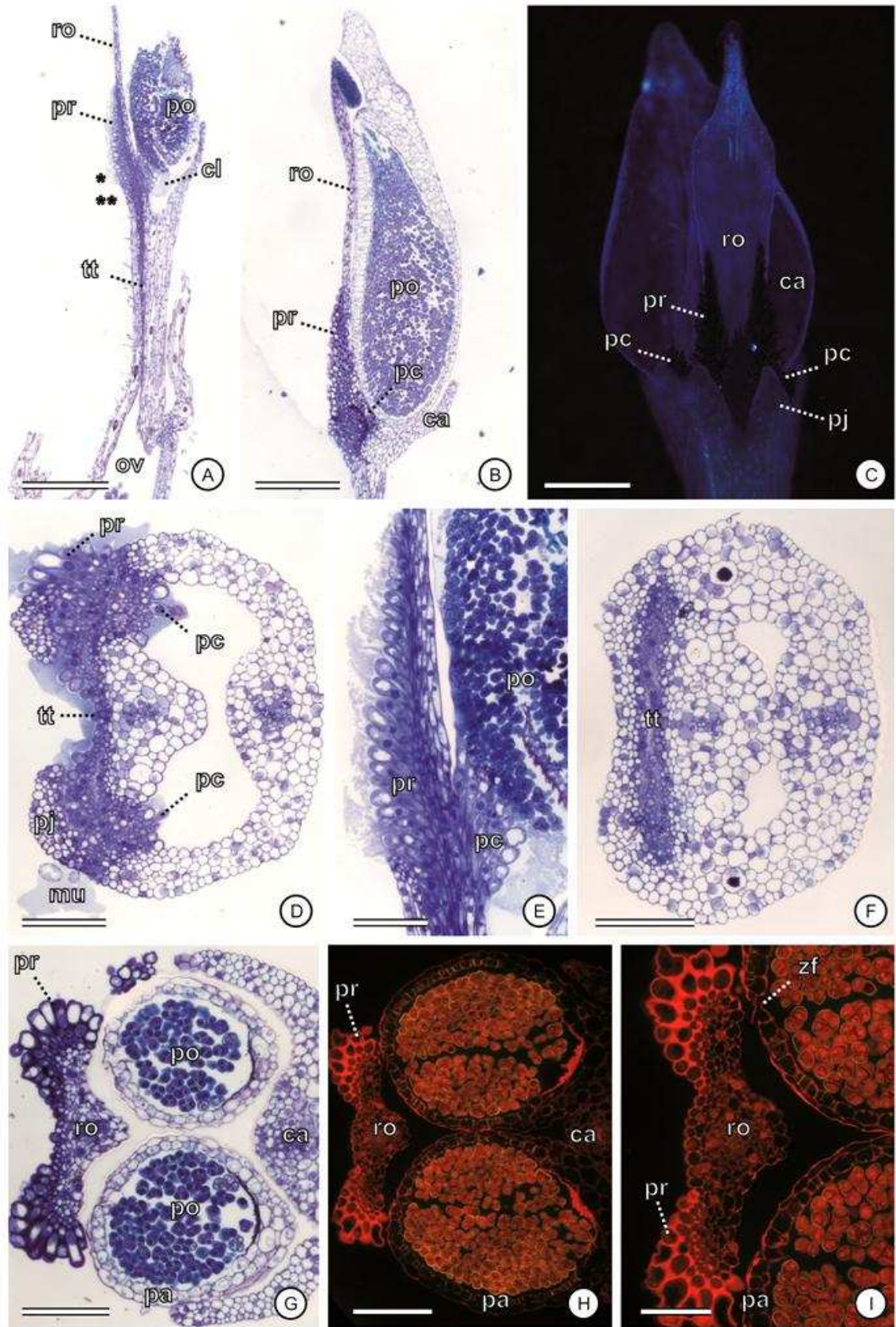


Figura 1: Coluna de *Cyclopogon variegatus*. **A:** Em secção longitudinal e porção superior do ovário de botões em pré-antese (barra= 500 μm). **B:** Secção longitudinal da antera em botões jovens (barra= 500 μm). **C:** Face ventral do ápice da coluna; observa-se o capuz da antera, o rostelo, faixas de papilas do rostelo e conjuntos de papilas do

interior da cavidade do clinândrio em botões em pré-antese (coloração com azul de anilina) (barra= 500 μm). **D:** Secção transversal da coluna na base do rostelo (* Fig. 1A); observam-se regiões papilosas externa (faixas de papilas do rostelo) e interna (papilas do interior da cavidade do clinândrio) em flores em antese (barra= 200 μm). **E:** Secção longitudinal do ápice da coluna (detalhe Fig. 1A), com papilas do interior da cavidade do clinândrio adjacentes à base da polínia, em botões em pré-antese (barra= 200 μm). **F:** Secção transversal da coluna (**Fig. 1A); note o tecido transmissor em flores em antese (barra= 200 μm). **G:** Secção transversal da antera no terço basal do rostelo; observam-se parede da antera íntegra e faixas de papilas do rostelo em botões jovens (barra= 200 μm). **H:** Secção transversal da antera no terço basal do rostelo; note mucilagem (coloração laranja com coriofina) nas faixas de papilas do rostelo e parede da antera em botões jovens (barra= 200 μm). **I:** Detalhe da Fig. 1H para mostrar mucilagem nas papilas do rostelo e zona de fragilidade na parede da antera (barra= 200 μm). ca: capuz da antera, cl: cavidade do clinândrio, mu: mucilagem, ov: ovário, pa: parede da antera, pc: papilas do interior da cavidade do clinândrio, pj: projeções do ápice da coluna, po: polinário; pr: faixas de papilas do rostelo, ro: rostelo, tt: tecido transmissor, vi: viscido, zf: zona de fragilidade.

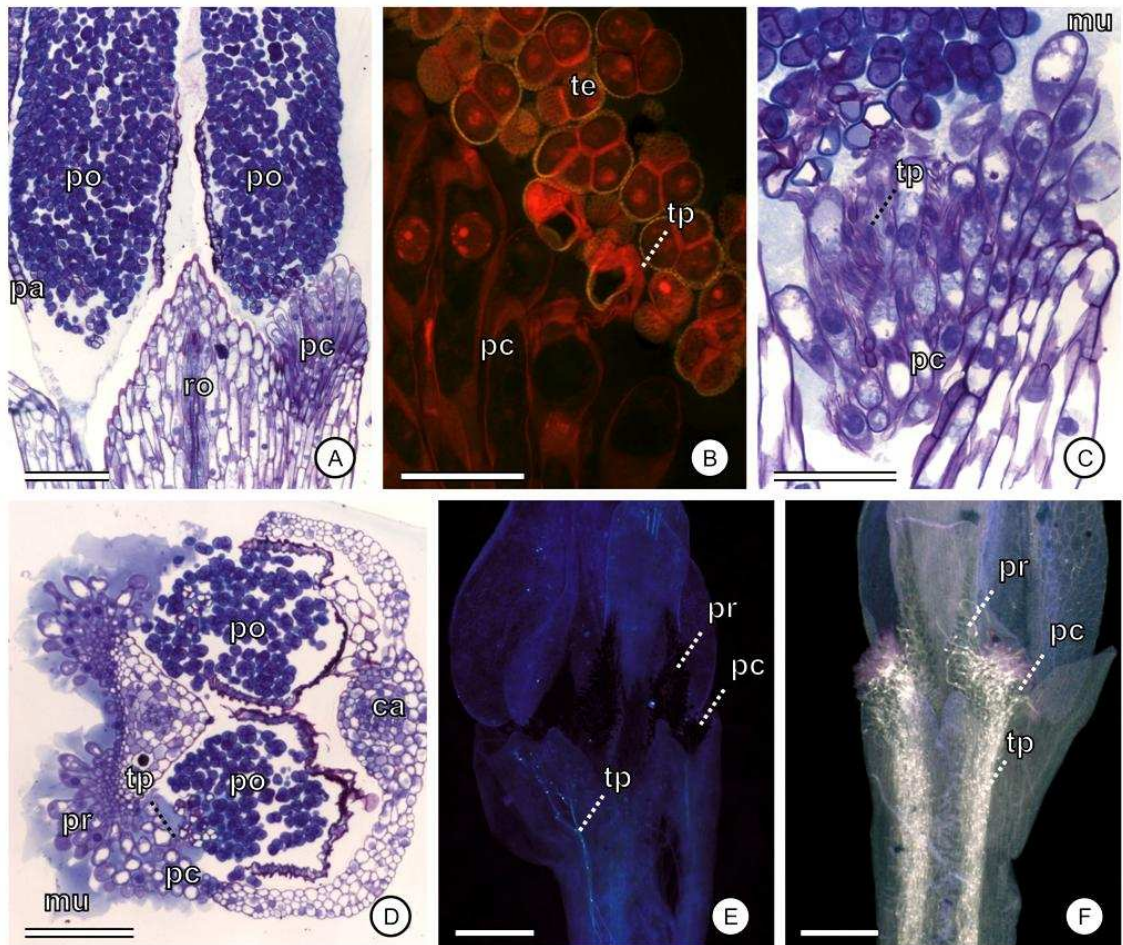


Figura 2: Mecanismo de autopolinização em *Cyclopogon variegatus*. **A:** Secção longitudinal da coluna; note o contato entre as papilas do interior da cavidade do clinândrio e as tétrades após a ruptura da parede da antera em botões em pré-antese (barra= 200 μm). **B:** Secção longitudinal das papilas do interior da cavidade clinândrio (coloração com corifosfina), com tétrades e tubos polínicos em botões em pré-antese (barra= 100 μm). **C:** Secção longitudinal das papilas do interior da cavidade clinândrio, com tétrades e muitos tubos polínicos em flores em antese (barra= 100 μm). **D:** Secção transversal da antera próxima à base do rostelo; observam-se as faixas de papilas do rostelo, os conjuntos de papilas do interior da cavidade do clinândrio, o acúmulo de mucilagem e parede da antera rompida em flores em antese (barra= 200 μm). **E:** Face ventral da coluna com poucos tubos polínicos em botões em pré-antese (coloração com azul de anilina) (barra= 500 μm). **F:** Face ventral da coluna com dois feixes de tubos polínicos, nas extremidades laterais da coluna, oriundos dos dois conjuntos de papilas do interior da cavidade do clinândrio em flores em antese (coloração com azul de anilina) (barra= 500 μm). ca: capuz da antera, mu: mucilagem, pa: parede da antera, pc: papilas do interior da cavidade do clinândrio, po: polinário; pr: faixas de papilas do rostelo, ro: rostelo, te: tétrades, tp: tubos polínicos.

CONCLUSÕES GERAIS

- No sub-bosque da Mata do Paraíso foram encontrados cinco sistemas sexuais: hermafroditismo, dioícia, monoícia, andromonoícia e ginomonoícia. O hábito de crescimento e os estádios sucessionais interferiram na distribuição dos sistemas sexuais. As análises da frequência e da abundância dos sistemas sexuais demonstraram que a distribuição do hábito está relacionada à distribuição dos sistemas sexuais. Os estádios sucessionais não interferiram na distribuição das frequências dos sistemas sexuais, enquanto as abundâncias foram determinadas pelos estádios.
- Em *Corymborkis flava* a receptividade estigmática das flores foi observada do primeiro ao quarto dia de antese. A frutificação das flores mais velhas (terceiro e quarto dias) foi menor que a das jovens, indicando que a idade da flor afeta o sucesso reprodutivo. Para estudos de biologia reprodutiva de orquídeas com flores longevas, como as de *C. flava*, são recomendadas polinizações manuais ao longo da antese para avaliar o grau máximo de receptividade estigmática, além do período de receptividade.
- *Cyclopogon variegatus* apresentou a morfologia funcional da coluna distinta das demais espécies de Spiranthoideae. O estigma, inédito em Orchidaceae, é representado por dois conjuntos de papilas no interior da cavidade do clinândrio. Estas papilas produzem mucilagem e estão adjacentes à base da polínia e em contato com as tétrades, promovendo a germinação dos grãos de pólen, em botões florais na pré-antese. Por isso, não há hercogamia e a autogamia é obrigatória. Esse processo de autopolinização é aqui descrito pela primeira vez. A autogamia em *C. variegatus* favoreceu o estabelecimento de uma população na área de estudo, onde os polinizadores estão ausentes.
- Os resultados demonstram que o sub-bosque apresenta diversidade de estratégias reprodutivas, que garantem a sobrevivência das suas espécies em ambientes com diferentes níveis de perturbação.