
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - INTEGRAL

PAULA MALDONADO RABELO

**ANATOMIA FLORAL DE ESPÉCIES DE
BULBOPHYLLUM SECT. *MICRANTHAE*
(ORCHIDACEAE, ASPARAGALES)**



Rio Claro
2013

PAULA MALDONADO RABELO

ANATOMIA FLORAL DE ESPÉCIES DE *BULBOPHYLLUM* SECT.
MICRANTHAE (ORCHIDACEAE, ASPARAGALES)

Orientador: Alessandra Ike Coan

Coorientador: Eric de Camargo Smidt

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2013

581.4 Rabelo, Paula Maldonado
R114a Anatomia floral de espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*
(*Ochidaceae*, *Asparagales*) / Paula Maldonado Rabelo. - Rio Claro, 2013
33 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de
Rio Claro
Orientador: Alessandra Ike Coan
Coorientador: Eric de Camargo Smidt

1. Anatomia vegetal. 2. *Bulbophyllum chloroglossum*. 3.
Bulbophyllum epiphytum. 4. *Bulbophyllum mentosum*. 5. *Bulbophyllum*
micranthum. 6. *Bulbophyllum rupicolum*. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

RESUMO

Bulbophyllum, com 1876 espécies, é considerado o segundo maior gênero de angiospermas, com distribuição pantropical. Os estudos morfológicos e anatômicos florais no gênero são incipientes, com dados de ginostêmio e labelo de algumas espécies. Atualmente, são propostas seis seções para o gênero na região neotropical, dentre elas *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*, que compreende 12 espécies, distribuídas na região central da América do Sul. O presente trabalho teve por objetivo o estudo anatômico das peças florais de seis espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*, de modo a levantar caracteres que auxiliem na diferenciação das mesmas e que possam contribuir para o conhecimento anatômico e caracterização da seção. Para o levantamento dos caracteres anatômicos foram utilizadas técnicas usuais de microscopia de luz, com documentação com projeção da escala micrométrica. Os resultados aqui obtidos para *B. adiamantinum*, *B. chloroglossum*, *B. epiphytum*, *B. mentosum*, *B. micranthum* e *B. rupicolum* permitiram identificar a presença de tricomas e evidências de regiões produtoras de substâncias no labelo, que podem servir como recompensa a polinizadores. Os caracteres anatômicos que se mostraram mais significativos na caracterização das espécies foram o formato e a ornamentação das paredes periclinais externas das células epidérmicas das peças florais, bem como o número de feixes vasculares nas sépalas, dorsal e lateral, e na porção distal do labelo. As características levantadas permitem a diferenciação principalmente entre *B. epiphytum* e *B. rupicolum*, espécies muito semelhantes morfológicamente e filogeneticamente relacionadas, além de permitirem aprofundar a discussão a respeito da manutenção ou exclusão de *B. mentosum* na seção, uma vez que, apesar de dados moleculares suportarem sua inclusão, os dados aqui obtidos demonstram grandes diferenças anatômicas em comparação às demais espécies, não corroborando sua inserção em *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*.

Palavras-chave: *Bulbophyllum adiamantinum*. *B. chloroglossum*. *B. epiphytum*. *B. mentosum*. *B. micranthum*. *B. rupicolum*. Ginostêmio. Labelo.

ABSTRACT

Bulbophyllum, which comprises 1876 species, is considered the second largest genus of angiosperms, with a pantropical distribution. The morphological and anatomical floral studies in the genus are incipient, with data restricted to the gynostemium and lip of some species. Based on molecular data, six sections were recognized within *Bulbophyllum* at the Neotropics, amongst them *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*, which comprises 12 species distributed in central South America. We aimed to study the floral anatomy of six species of *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*, in order to determine useful characters to differentiate them and contribute to the anatomical characterization of the section as a whole. Floral anatomy was assessed through usual techniques of light microscopy. The data found here for *B. adiamantinum*, *B. chloroglossum*, *B. epiphytum*, *B. mentosum*, *B. micranthum* and *B. rupicolum* allowed to identify the presence of glandular trichomes and the possible presence of a secretory region on the lip, which might produce substances used as a reward to pollinators. The most significant anatomical characters to the species characterization were the shape and ornamentation of the outer periclinal walls of the epidermal cells, as well as the number of vascular bundles in dorsal and lateral sepals and at the lip. The data also allowed the differentiation between *B. epiphytum* and *B. rupicolum*, species very similar in morphology and phylogenetically related. Besides that, the data also allowed the discussion regarding the maintenance of *B. mentosum* within the section: although its inclusion is supported by molecular studies, the anatomical data here presented shows greater differences compared to the other species, not supporting its maintenance in *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*.

Key words: *Bulbophyllum adiamantinum*. *B. chloroglossum*. *B. epiphytum*. *B. mentosum*. *B. micranthum*. *B. rupicolum*. Gynostemium. Lip.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVO	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
4 RESULTADOS	10
5 DISCUSSÃO	14
6 CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21
APÊNDICE A – TABELA 1.....	24
APÊNDICE B – TABELA 2.....	25
APÊNDICE C – TABELA 3.....	27
APÊNDICE D – FIGURA 1.....	28
APÊNDICE E – FIGURA 2.....	29
APÊNDICE F – FIGURA 3	30
APÊNDICE G – FIGURA 4.....	31
APÊNDICE H – FIGURA 5.....	32

1 INTRODUÇÃO

As monocotiledôneas, com cerca de 65.000 espécies, estão distribuídas em 12 ordens (APG III, 2009). Asparagales, que compreende 15 famílias, é a segunda maior ordem dentre as monocotiledôneas, sendo considerado um grupo monofilético, embora ainda existam problemas na circunscrição de algumas famílias (APG III, 2009).

Orchidaceae, a maior (WORLD ..., 2013) e mais diversa família vegetal (DRESSLER, 1981), com cerca de 24.500 espécies (DRESSLER, 2005), insere-se em Asparagales (APG III, 2009), abrangendo cinco subfamílias (CHASE et al., 2003): Apostasioideae, Vanilloideae, Cypripedioideae, Orchidoideae e Epidendroideae. Em termos de número de espécies, Epidendroideae é a maior subfamília, contendo mais da metade de todas as espécies, cerca de 18.000 em 650 gêneros (DRESSLER, 1981). Essa subfamília compreende 16 tribos (PRIDGEON; CRIBB; CHASE, 2005), dentre as quais, Dendrobieae possui 2.263 espécies distribuídas em 21 gêneros, circunscritos em duas subtribos, Dendrobiinae e Bulbophyllinae. Bulbophyllinae compreende 1.116 espécies em 15 gêneros (DRESSLER, 1993), sendo estes *Bulbophyllum*, *Chaseella*, *Codonosiphon*, *Dactylorhynchus*, *Drymoda*, *Genyorchis*, *Hapalochilus*, *Jejosephia*, *Monomeria*, *Monosepalum*, *Pedilochilus*, *Saccoglossum*, *Sunipia*, *Tapeinoglossum* e *Trias*.

Bulbophyllum Thouars, com 1876 espécies (WORLD ..., 2013), é considerado o segundo maior gênero de angiospermas (FRODIN, 2004), com distribuição pantropical. A maior diversidade do gênero concentra-se no sudeste Asiático, ocorrendo também na Australásia e trópicos americanos (DRESSLER, 1993; SIEGERIST, 2001; VERMEULEN, 1987, 1993). Na região Neotropical, o gênero é representado por 60 espécies (SMIDT, 2007) e tem como limites de distribuição o México, ao norte e a oeste (Cordova), e o Brasil, ao sul (Rio Grande do Sul) e ao leste (Pernambuco) (SMIDT et al., 2007). A maior diversidade de espécies neotropicais encontra-se no Sudeste brasileiro, nas regiões de contato entre o Cerrado e a Floresta Atlântica (SMIDT et al., 2007).

Os estudos morfológicos e anatômicos florais em *Bulbophyllum* são escassos, tendo sido reportadas a morfologia do ginostêmio da espécie asiática *B. ecornutum* (RASMUSSEN, 1985) e a anatomia do labelo de seis espécies brasileiras, *B. epiphytum*, *B. glutinosum*, *B. regnellii*, *B. involutum*, *B. ipanemense*, *B. weddellii*, e de uma espécie asiática, *B. rothschildianum* (TEIXEIRA; BORBA; SEMIR, 2004). Além destes trabalhos, vale ressaltar os estudos realizados por Borba e Semir (1999) e Borba, Shepherd e Semir (1999), em que foram investigados os aspectos morfológicos associados aos mecanismos reprodutivos das

espécies *B. weddellii*, *B. involutum* e *B. ipanemense*, e o de Verola (2002), que relacionou a grande variação morfológica floral de sete espécies neotropicais do gênero à polinização por diferentes famílias de Diptera.

Smidt et al. (2011), com base em caracteres morfológicos e moleculares, reconhecem seis seções monofiléticas formais de *Bulbophyllum* neotropicais: *Bulbophyllaria*, *Didactyle*, *Furvescens*, *Micranthae*, *Napelli* e *Xiphizusa*. Destas, *Furvescens* é proposta pela primeira vez, e as demais, já descritas por outros autores, foram recircunscritas, tornando-se monofiléticas. *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* (SMIDT et al., 2011) corresponde a doze espécies, as quais estão distribuídas na região central da América do Sul, principalmente no Brasil (limite sul no estado do Paraná, norte e leste na Bahia) e Bolívia (limite de distribuição oeste no estado de Cochabamba).

Para o presente estudo, foram selecionadas seis espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*, totalizando uma amostragem de metade das espécies descritas para a seção. *Bulbophyllum chloroglossum* Rchb.f. & Warm., *B. mentosum* Barb.Rodr., *B. micranthum* Barb.Rodr. e *B. rupicolum* Barb.Rodr. são encontradas apenas no território brasileiro, porém com vasta distribuição, enquanto *B. epiphytum* Barb.Rodr. ocorre amplamente também para a Bolívia; *B. adiamantinum* Brade, em contrapartida, tem distribuição restrita, com endemismo no estado de Minas Gerais, sendo considerada uma espécie em perigo por ocorrer em fragmentos de uma área com menos de 5.000 km de extensão e ser registrada apenas para três localidades (SMIDT, 2007).

Nas análises realizadas a partir do estudo de Smidt et al. (2011), observa-se a formação de dois clados na seção *Micranthae*, um deles com grande suporte (formado por *B. adiamantinum* e *B. insectiferum*) e outro que representa o núcleo da seção, mas que possui espécies muito intimamente relacionadas (*B. epiphytum*, *B. chloroglossum*, *B. mucronifolium*, *B. rupicolum* e *B. micranthum*), constituindo uma politomia. Desse modo, esses dados ressaltam a importância da investigação anatômica para a determinação de caracteres, de modo a permitir o esclarecimento das similaridades entre tais espécies, e determinar possíveis sinapomorfias ou convergências devido a pressões ecológicas e ambientais.

O estudo de Smidt et al. (2011) revelou, também, uma grande incongruência na filogenia, entre dados taxonômicos moleculares e morfológicos, no que diz respeito ao posicionamento de *B. mentosum* nas seções do gênero. De acordo com este trabalho, esta espécie possui algumas características únicas, como escapo em forma de fita, enquanto o mesmo é cilíndrico em todas as demais espécies. Além disso, suas características vegetativas a aproximam da seção *Didactyle*, mas a mesma apresenta folhas suculentas, típicas das

espécies da seção *Micranthae*. Ainda, aspectos florais, como o arranjo das flores em espiral, pedicelo curto e labelo inteiro, sem lobos laterais, apenas com a margem ereta, achatado e ciliado, sugerem a inserção de *B. mentosum* na seção *Furvescens*. Nas análises de DNA feitas por Smidt et al. (2011), em contrapartida, os resultados obtidos pelos espaçadores de plastídios apontam que a espécie deve ser incluída no clado da seção *Xiphizusa*, enquanto os dados do espaçador ribossomal nuclear indicam sua inserção na seção *Micranthae*; entretanto, a análise combinada desses espaçadores aponta a inserção dessa espécie na base da seção *Micranthae*. Assim sendo, o estudo da anatomia floral de *B. mentosum* pode contribuir para o levantamento de caracteres que permitam elucidar e delimitar melhor seu posicionamento dentro das seções do gênero.

De acordo com esses dados, o estudo de caracteres anatômicos pode contribuir para a investigação dessas informações, de modo a apresentar dados que auxiliem na elucidação dessas questões e contribuam para o conhecimento anatômico e delimitação da seção.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi levantar caracteres anatômicos florais de seis espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*, de modo a contribuir para o conhecimento anatômico da seção neotropical do gênero, atentando para a investigação de evidências histológicas da presença de nectários, tricomas, osmóforos e de outras regiões produtoras de substâncias de recompensa à polinização. Buscou-se contribuir para o levantamento de caracteres anatômicos florais dentre tais espécies, de modo a fornecer dados que possam ser aplicados em análises filogenéticas futuras buscando a elucidação de politomias apontadas na seção.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O material utilizado no presente trabalho foi coletado em expedições prévias (Tabela 1), com material-testemunho depositado nos Herbários da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS) e Universidade Federal do Paraná (UPCB). As amostras foram fixadas em FAA 50 (JOHANSEN, 1940) e armazenadas em etanol 70% com algumas gotas de glicerina.

O material destinado à microscopia de luz foi incluído em historresina Leica, conforme instruções do fabricante, e seccionado com auxílio de micrótomo rotativo (RM 2245, Leica) em espessuras de 7-12 μm , com navalha de aço descartável. As secções foram coradas com Azul de Toluidina O 0,05% 1 M em tampão fosfato de sódio pH 6,8 (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1965) para análises gerais.

Foram realizados os seguintes testes histoquímicos: Ácido Periódico-Reativo de Schiff (PAS) para polissacarídeos totais (FEDER; O'BRIEN, 1968), Calcofluor White MR2 sob excitação de luz Ultra Violeta (UV) para celulose (HUGHES; MCCULLY, 1975), Coomassie Brilliant Blue 0,25% em ácido acético 7% para proteínas totais (SOUTHWORTH, 1973), IKI para amido (JOHANSEN, 1940), Vermelho de Rutênio para ácidos pécticos/mucilagem (JOHANSEN, 1940) e Vermelho Neutro sob excitação de luz UV para lipídios totais (KIRK, 1970). Controles positivos e negativos apropriados foram utilizados simultaneamente, quando aplicáveis.

A análise, interpretação, descrição e documentação dos resultados foram realizadas a partir das lâminas permanentes, através de observações anatômicas e histoquímicas realizadas em microscopia de luz e sob fluorescência. Ainda, a documentação dos aspectos mais relevantes foi feita por meio de fotodocumentação, através da captura de imagens ao fotomicroscópio com câmera acoplada e projeção de escala micrométrica.

4 RESULTADOS

As flores das seis espécies estudadas de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* possuem sépalas livres e eretas, normalmente uninervadas; pétalas eretas, planas e glabras; labelo trilobado, carnosos e normalmente glabros, com superfície verrucosa, portando lobos frontais dentiformes e eretos; coluna com estelídeos reduzidos, dentes ausentes, pé da coluna curto e estigma amplo (Fig. 1A, B).

Anatomicamente, as flores das espécies estudadas possuem muitas similaridades, com diferenças que serão destacadas a seguir. A Tabela 2 sumariza os principais caracteres anatômicos observados e os respectivos estados.

Na sépala dorsal das seis espécies estudadas, na face adaxial, as células epidérmicas são retangulares e de paredes delgadas (Fig. 2A), com exceção de *B. mentosum*, em que são espessadas (Fig. 2B); as paredes periclinais externas são convexas e com ornamentação inconspícua (Fig. 2A-C). Na face abaxial, as células epidérmicas são maiores, isodiamétricas, com paredes delgadas, sendo as periclinais externas espessadas, de formato convexo e com ornamentação conspícua (Fig. 2A-B, D), alternadas com tricomas glandulares (Fig. 2E). Estômatos foram observados apenas em *B. adiamantinum*, *B. chloroglossum* (Fig. 2F) e *B. epiphytum*. Em ambas as faces, a cutícula acompanha a ornamentação da parede periclinal externa, sendo mais espessa na face abaxial (Fig. 2D).

A margem da sépala dorsal é lisa externamente e formada por células da epiderme e do mesofilo (Fig. 2A-B). Todas as espécies apresentam mesofilo homogêneo, formado por células parenquimáticas de paredes delgadas (Fig. 2A-B, E-F). Ocorre um número variável de idioblastos com ráfides e espiraladamente espessados (Fig. 2A-B), sendo que estes últimos ocorrem em maior número em *B. mentosum*, *B. micranthum* e *B. rupicolum*. A vascularização é dada por um único feixe vascular colateral (Fig. 2A), exceto em *B. mentosum*, onde ocorrem três feixes (Fig. 2B). Em secção transversal, observa-se que o formato da sépala é plano em *B. rupicolum* (Fig. 2G), sendo curvado nas demais espécies aqui estudadas (Fig. 2A-B).

A sépala lateral das seis espécies estudadas apresenta as faces adaxial e abaxial formadas por células epidérmicas retangulares a isodiamétricas de paredes delgadas (Fig. 2H), sendo as periclinais externas convexas, discretamente ornamentadas na face adaxial (Fig. 2H) e ornamentadas na face abaxial (Fig. 2H). Ocorrem estômatos na face abaxial apenas em *B. adiamantinum*, *B. chloroglossum* (Fig. 2I) e *B. epiphytum*, enquanto tricomas foram observados em todas as espécies (Fig. 2J-K). A cutícula é geralmente conspícua na face

abaxial, acompanhando a ornamentação da parede periclinal externa das células epidérmicas (Fig. 2L).

A margem da sépala lateral é lisa, formada por células da epiderme e do mesofilo (Fig. 2H). O mesofilo da sépala lateral é similar ao da sépala dorsal, diferenciando-se pela presença de três feixes vasculares em todas as espécies (Fig. 2H), com exceção de *B. rupicolum*, que apresenta um único feixe vascular (Fig. 2M). A região da nervura principal é levemente proeminente nas espécies aqui estudadas (Fig. 2H, M).

As pétalas possuem epiderme uniestratificada, composta, na maioria das espécies, por células retangulares a isodiamétricas de paredes delgadas (Fig. 2N), sendo as periclinais externas convexas (Fig. 2N); em *B. mentosum*, as células epidérmicas são papilosas (Fig. 2O). Tanto na face adaxial quanto na abaxial, as células epidérmicas apresentam paredes periclinais externas não ornamentadas, recobertas por cutícula inconspícua em todas as espécies (Fig. 2N-O).

A pétala apresenta margem externamente lisa e, em secção transversal, é possível observar que a mesma é formada por células epidérmicas e do mesofilo (Fig. 2N-O). O mesofilo é homogêneo, formado por parênquima regular, com células de paredes delgadas, e contém apenas um feixe vascular colateral (Fig. 2N-O). Ocorrem idioblastos com ráfides e espiraladamente espessados, em número variável (Fig. 2N-O). Em *B. rupicolum*, eventualmente, pode ocorrer uma pétala extranumerária com estrutura anatômica similar àquela das outras pétalas.

Nas espécies aqui estudadas, o labelo, em toda sua extensão, apresenta epiderme uniestratificada, formada por células de paredes delgadas (Fig. 3A); a margem é predominantemente papilosa nas espécies (Fig. 3A-F), exceto em *B. rupicolum*, na qual é lisa (Fig. 3G). A cutícula confere ornamentação à ambas as faces (Fig. 3H).

Nos terços distal e mediano do labelo, tanto na face adaxial quanto na abaxial, as células epidérmicas são papilosas (Fig. 3B-D, F), podendo também ser isodiamétricas com parede periclinal externa convexa em *B. mentosum* (Fig. 3E) e *B. rupicolum* (Fig. 3G). Em *B. mentosum*, na face adaxial desta região as células epidérmicas são arredondadas e constituem uma camada frouxa, com espaços intercelulares irregulares, formando pontes intercelulares (Fig. 3I); na face abaxial, esta mesma região é formada por células epidérmicas papilosas alongadas, afiladas na porção apical, de citoplasma denso e núcleo central (Fig. 3J). Na face abaxial destas porções do labelo, em todas as espécies estudadas, estão ausentes tricomas e estômatos (Fig. 3B-G). A cutícula é delgada (Fig. 3B-F), embora seja espessa em *B. rupicolum* (Fig. 3G-H).

O mesofilo é homogêneo, formado por parênquima regular de paredes delgadas, contendo idioblastos com ráfides (Fig. 3A-G); nesta região estão ausentes idioblastos espiraladamente espessados. Testes histoquímicos evidenciaram a presença de células com amido no mesofilo. Os feixes vasculares são colaterais e em número de dois (Fig. 3C, F-G), exceto em *B. adiamantinum* e *B. epiphytum*, onde são três (Fig. 3B, D), e *B. mentosum*, onde estão ausentes nesta porção (Fig. 3E).

No terço proximal, em ambas as faces, a parede periclinal externa das células epidérmicas varia de exclusivamente papilosa em *B. adiamantinum*, *B. chloroglossum* e *B. micranthum* (Fig. 4A-C), à convexa em *B. rupicolum* (Fig. 4D), sendo convexo-papilosa em *B. epiphytum* e *B. mentosum* (Fig. 4E-F). A cutícula é espessa apenas em *B. rupicolum* (Fig. 4D). Na face adaxial, na maioria das espécies, ocorre um sulco central secretor, que é raso; o sulco é formado por células convexas ou papilosas (Fig. 4A-E), com núcleo grande e basal e citoplasma denso (Fig. 4G). Testes histoquímicos evidenciaram a presença de proteínas no citoplasma da epiderme e do tecido subepidérmico da cavidade do sulco secretor. Estômatos foram encontrados apenas na face abaxial de todas as espécies (Fig. 4D, H).

Todas as espécies estudadas apresentam, no terço proximal do labelo, dois lobos laterais, que possuem a margem papilosa (Fig. 4A-C, E), exceto *B. rupicolum* em que é lisa (Fig. 4D). *Bulbophyllum mentosum* diferencia-se por não possuir lobos (Fig. 4F) e apresentar margem do terço proximal papilosa (Fig. 4F). Devido à ausência dos lobos, *B. mentosum* apresenta sulco secretor inconspícuo, formado por células epidérmicas arredondadas, frouxamente arranjadas, com pontes intercelulares, formando espaços intercelulares irregulares (Fig. 4I); na região central do labelo de *B. mentosum*, a face abaxial é papilosa (Fig. 4F).

O mesofilo do terço proximal é homogêneo, formado por parênquima regular de paredes delgadas (Fig. 4A-F), com células contendo amido. Ocorrem idioblastos com ráfides em todas as espécies estudadas (Fig. 4A-F), enquanto que idioblastos espiraladamente espessados estão presentes apenas em *B. chloroglossum* (Fig. 4B, J) e *B. micranthum*. Ocorrem três feixes vasculares colaterais na maioria das espécies estudadas (Fig. 4B-E), com exceção de *B. adiamantinum* (Fig. 4A) e *B. mentosum* (Fig. 4F), onde ocorrem 11 feixes.

No ginostêmio, a epiderme é uniestratificada, formada por células retangulares a isodiamétricas de paredes delgadas, com paredes periclinais externas espessas, ornamentadas e que, em secção transversal, são convexas em todas as espécies analisadas (Fig. 5A); a cutícula acompanha a ornamentação das paredes periclinais externas das células epidérmicas (Fig. 5A). O mesofilo é homogêneo, formado por parênquima regular, e apresenta tanto

idioblastos com ráfides quanto idioblastos espiraladamente espessados; estes últimos em maior quantidade em *B. chloroglossum* e *B. epiphytum* (Fig. 5A).

A antera é formada por epiderme uniestratificada, papilosa e com ornamentação, recoberta por cutícula fina (Fig. 5B); o conectivo apresenta feixe vascular colateral único (Fig. 5B). O polinário contém quatro polínias, proporcionais ao tamanho da superfície estigmática, embora as duas polínias centrais sejam menores que as externas (Fig. 5B).

O estigma é raso em todas as espécies (Fig. 5C) e sua cavidade apresenta células destacadas, que não a preenchem completamente, dispostas em uma matriz mucilaginosa (Fig. 5C). Em secção longitudinal, é possível observar a formação de viscido na região do rostelo (Fig. 5C). O ovário é formado pelos três lobos internos de uma estrutura que engloba também as bases das três sépalas, na porção do ginostêmio (Fig. 5D). A epiderme do ovário é uniestratificada; na epiderme externa, as células são retangulares, com parede periclinal externa convexa, espessa e ornamentada, enquanto que na epiderme interna, as mesmas são menores e apresentam a parede periclinal convexa, delgada e não ornamentada (Fig. 5E). O mesofilo é homogêneo e formado por parênquima regular, com idioblastos espiraladamente espessados presentes em *B. adiamantinum*, *B. chloroglossum*, *B. epiphytum* e *B. rupicolum* (Fig. 5D), e idioblastos com ráfides presentes em todas as espécies, exceto em *B. chloroglossum* (Fig. 5D-E). Ocorrem três feixes vasculares colaterais, um em cada lobo (Fig. 5D).

O pé da coluna possui epiderme uniestratificada, formada por células retangulares de paredes delgadas (Fig. 5F); as paredes periclinais externas dessas células são ornamentadas e convexas (Fig. 5F-H), recobertas por uma cutícula delgada (Fig. 5F-H). O mesofilo é homogêneo, de parênquima regular, formado por células de paredes delgadas (Fig. 5F-H); idioblastos com ráfides são encontrados em todas as espécies, enquanto que aqueles espiraladamente espessados estão presentes apenas em *B. chloroglossum* (Fig. 5I).

Todas as espécies estudadas apresentaram, eventualmente, em todas as peças florais analisadas, idioblastos mistos, com parede espiraladamente espessada e ráfides no interior (Figs 2M, 5A).

Os resultados dos testes histoquímicos permitiram confirmar a natureza de alguns dos compostos presentes nas peças florais, bem como constatar alguns sítios de reação presentes nas mesmas, conforme listado na Tabela 3.

5 DISCUSSÃO

As flores das espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* aqui estudadas, além de apresentarem similaridades morfológicas já evidenciadas nos estudos taxonômicos prévios (TEIXEIRA; BORBA; SEMIR, 2004), também compartilham vários caracteres anatômicos em todas as peças, tais como: a epiderme uniestratificada, formada por células de paredes delgadas, e o mesofilo homogêneo, formado por parênquima regular, com feixes vasculares colaterais e idioblastos com ráfides.

Em todas as espécies aqui estudadas, principalmente na face abaxial das sépalas dorsal e laterais, é possível constatar a presença de cutícula relativamente espessa, além de espessamento também nas paredes periclinais externas das células epidérmicas dessas peças florais. Riederer e Schreiber (2001) afirmam que uma das maiores dificuldades das plantas terrestres é desenvolver uma barreira para o controle da perda excessiva de água, uma vez que ela deve ser eficiente, translúcida à radiação necessária à fotossíntese, flexível e capaz de se regenerar. Nesse sentido, a cutícula das plantas combina todas essas características com baixo custo energético para a planta. Dessa forma, os resultados aqui obtidos, como cutícula e parede periclinal externa das células espessas, são fatores que, certamente, estão relacionados a uma intensificação na cobertura visando evitar a perda excessiva de água pela evaporação, especialmente nessas estruturas que estão posicionadas mais externamente na flor.

Entretanto, em *B. mentosum* e *B. rupicolum*, é possível detectar o espessamento da cutícula também em outras peças florais, como pétalas, labelo, ginostêmio e pé da coluna, quando em comparação às cutículas das mesmas peças florais nas demais espécies. A cutícula conspícua pode ser explicada pelo ambiente de ocupação dessas espécies, uma vez que *B. mentosum* ocorre em campos rupestres entremeados com Caatinga na Chapada Diamantina (SMIDT, 2007), enquanto *B. rupicolum* é normalmente encontrada como rupícola nos Cerrados dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso (SMIDT, 2007); as demais espécies da seção são normalmente encontradas em ambientes rupestres de cerrado, em matas de galeria de campos rupestres ou em áreas de contato entre Mata Atlântica e Cerrado (SMIDT, 2007). Assim sendo, a intensidade solar, bem como a disponibilidade hídrica para as duas espécies em questão, podem explicar a diferença de espessura na cutícula em relação às demais espécies, atuando de forma a evitar a perda excessiva de água por evaporação.

Barthlott (1981), que estudou as características da superfície da epiderme com enfoque taxonômico em angiospermas, avaliou que os caracteres epidérmicos são apenas ligeiramente

influenciados pelas condições ambientais e, sendo assim, a elevada diversidade estrutural encontrada pode fornecer critérios valiosos para a classificação entre as espécies e também no nível de família. Desse modo, os padrões de ornamentação observados neste trabalho, na parede periclinal externa das células epidérmicas e acompanhada pela cutícula, podem constituir caracteres úteis na diferenciação das espécies. A verificação destes padrões pode ser mais bem estudada através da visualização em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), como realizado para espécies de *Bulbophyllum* sect. *Didactyle* (NUNES et al., [2013?]). Além disso, é sabido que a superfície cuticular da planta é a zona de contato primária para a aproximação de um inseto, seja para procurar alimentos, um local para depositar seus ovos ou um abrigo contra predadores, parasitas ou condições abióticas desfavoráveis (MÜLLER, 2006). Assim, a ornamentação da cutícula nas espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* aqui estudadas pode atuar refletindo a luz solar que nela incide, de modo a atrair a atenção dos polinizadores dessas espécies.

O papel da ornamentação da cutícula para atração de polinizadores é, contudo, meramente especulativo, uma vez que a maioria dos estudos referentes à polinização em *Bulbophyllum* apontam o papel dos odores como sendo majoritário na atração dos polinizadores (TEIXEIRA; BORBA; SEMIR, 2004; VEROLA, 2002). Ainda, para a confirmação dessa hipótese seria necessária a realização de estudos e testes de reflexão para analisar se de fato esse papel pode ser atribuído à cutícula e às ornamentações, bem como considerações relativas à biologia e fisiologia dos grupos de insetos que atuam como polinizadores para as espécies em questão, analisando se de fato uma possível reflexão poderia ser percebida por esses animais.

A presença de tricomas glandulares na face abaxial das sépalas é uma característica unificadora para as espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* aqui estudadas, podendo também ser esperado para as demais espécies da seção. Em *B.* sect. *Didactyle* (NUNES et al., [2013?]), tricomas muito semelhantes foram encontrados, observados também na face abaxial das sépalas, para todas as espécies estudadas. Verola (2002), em seu estudo sobre biologia reprodutiva e sistemas de polinização no gênero *Bulbophyllum*, que incluiu três espécies de *B.* sect. *Micranthae*, dentre elas *B. epiphytum*, objeto também do presente estudo, constatou a presença de odores adocicados a cítricos, para todas as espécies estudadas. Tais dados, juntamente com os indicativos de alta atividade celular, como citoplasma denso, núcleo proeminente e vacúolo grande nas células basais dos tricomas, aqui visualizados, permitem sugerir que os mesmos atuem como osmóforos nessas peças florais. Apesar da ampla gama de testes histoquímicos aqui realizados, o conteúdo celular dos tricomas não reagiu com nenhum

deles, o que dificulta a elucidação de sua composição.

Em *Bulbophyllum*, osmóforos derivados de tricomas nas flores foram detectados apenas para o labelo (TEIXEIRA; BORBA; SEMIR, 2004), tendo sido descritos como unicelulares. No presente trabalho, contudo, foram observados tricomas glandulares para as sépalas das espécies estudadas, embora não se tenha registro dos mesmos para o labelo. Desse modo, a partir dos resultados aqui obtidos, pela caracterização anatômica dos tricomas, localização dos mesmos e ausência de secreção aparente, sugere-se que, para as espécies estudadas neste trabalho, tais tricomas atuem como osmóforos. Essas evidências são inéditas para o gênero e estão sendo confirmadas em outras seções (NUNES et al., [2013?]).

A ocorrência de estômatos aparentemente funcionais na face abaxial das sépalas de *B. adiamantinum*, *B. chloroglossum* e *B. epiphytum* pode estar relacionada ao ambiente de ocupação dessas espécies. A ausência em *B. mentosum* e *B. rupicolum* pode estar ligada ao seu hábito rupícola e de ocupação no Cerrado e em campos rupestres entremeados à caatinga, evitando, assim, a perda excessiva de água pela evaporação nesses ambientes xeromórficos. Em *B. micranthum*, contudo, a ausência de estômatos não deve estar relacionada ao controle hídrico, uma vez que esta espécie ocorre normalmente como epífita em áreas de Mata Atlântica ou Cerrado. Relato para estômato em peça floral foi feito por Hew, Lee e Wong (1980), que demonstraram que em algumas espécies de orquídeas tropicais essas estruturas são não-funcionais sem qualquer relação com o controle hídrico.

No labelo das espécies estudadas foram identificadas células epidérmicas papilosas na superfície adaxial, que parecem funcionar como osmóforos, devido à presença de características anatômicas como núcleo grande e basal e citoplasma denso. Ainda, no momento da coleta das amostras, foi feito o registro de odores para as três espécies em questão, detecção confirmada anteriormente apenas para *B. epiphytum* (VEROLA, 2002). Desse modo, os dados do presente estudo corroboram os resultados previamente publicados por Teixeira, Borba e Semir (2004).

Ainda no labelo, foi constatada pela primeira vez a natureza secretora do sulco localizado na face adaxial da porção proximal do mesmo. Teixeira, Borba e Semir (2004), em seu trabalho que estudou *B. epiphytum* e outras espécies do gênero, pertencentes às seções *Didactyle* e *Napeli*, não confirmaram, para a espécie da seção *Micranthae*, a natureza do respectivo sulco como sendo secretora. Além disso, os mesmos autores revelam que, apesar da presença de néctar nas flores de *B. epiphytum*, não foram encontradas evidências histológicas que indiquem a presença de nectário no labelo desta espécie, embora Verola (2002) enfatize, em seu trabalho, a produção e o acúmulo de néctar na base do labelo em *B.*

epiphytum. Assim, Teixeira, Borba e Semir (2004) discutem a possibilidade de ocorrência do nectário em outras regiões das flores para a espécie.

No presente estudo, contudo, para todas as espécies estudadas, não foram encontradas estruturas nectaríferas em nenhuma outra peça floral, a não ser a evidência de atividade secretora presente no sulco do labelo. A superfície do labelo das espécies de *B. sect. Micranthae* aqui estudadas, ao contrário do que ocorre nas demais peças florais, não tem sua ornamentação devido à parede periclinal externas das células epidérmicas, mas sim à estriações da própria cutícula. Essa característica pode reforçar a hipótese do labelo como secretor, uma vez que a presença de paredes periclinais externas delgadas e não ornamentadas facilitaria a permeabilidade do conteúdo secretado.

Em *B. mentosum*, apesar da ausência de uma porção sulcada na face adaxial do labelo, é possível identificar uma região anatomicamente diferenciada das demais espécies, contendo células arredondadas e frouxamente arrançadas. Esse arranjo, com formação de pontes e grandes espaços intercelulares é uma característica que deve ser ressaltada na espécie estudada, não relatada previamente na literatura, mas que pode estar relacionada à secreção de compostos.

Foram encontrados idioblastos contendo ráfides e espessamentos celulósicos helicoidais para todas as espécies analisadas, sendo encontrados na maioria das peças nas espécies estudadas. A ocorrência de idioblastos com ráfides já foi extensamente documentada em Orchidaceae (ASCENSÃO et al., 2005; KOCYAN; ENDRESS, 2001; PRYCHID; RUDALL, 1999; STERN et al., 1993; STERN ; JUDD, 2001), com registros inclusive para o labelo de espécies de *Bulbophyllum* (TEIXEIRA; BORBA; SEMIR, 2004). Devido à sua ampla distribuição nas peças florais, inclusive com elevada incidência nas mesmas, é possível ressaltar seu papel principalmente na proteção mecânica contra a herbivoria.

A presença de idioblastos com espessamentos celulósicos helicoidais também já foi registrada para a família (OLATUNJI; NENGIM, 1980; PRIDGEON, 1981, 1982). De acordo com Pridgeon (1982), a denominação mais adequada para tais células seria a de idioblastos espiraladamente espessados, uma vez que geralmente não são lignificados e não parecem apresentar relação física, ontogenética ou funcional com elementos traqueais. Sua ocorrência seria uma adaptação das Orchidaceae epífitas às condições de seca (BURR; BARTHLOTT, 1991; OLATUNJI; NENGIM, 1980). Em *B. mentosum*, a grande quantidade de idioblastos espiraladamente espessados nas sépalas e pétalas pode estar relacionada à ocupação dessa espécie em ambientes de campos rupestres entremeados à caatinga, nos quais essas estruturas podem atuar na adaptação a ambientes xeromórficos. Os resultados aqui obtidos a partir da

realização do teste histoquímico com Calcofluor White MR2 permitiram confirmar a natureza celulósica dos espessamentos de parede nesses idioblastos, corroborando, assim, os dados de Pridgeon (1982) quanto à ausência de lignina para esse tipo especial de idioblastos.

Nas espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* aqui estudadas foram observados, ainda, idioblastos mistos, com espessamentos de parede e contendo ráfides. A presença deste tipo especial de idioblastos para as espécies desta seção, que ocorrem em ambiente rupestre de Cerrado ou mata de galeria de campos rupestres, sugere que talvez os dois tipos de idioblastos sejam interconversíveis e possam apresentar uma relação com a ocupação de diferentes ambientes. Tal hipótese é apenas especulativa e mais dados precisam ser levantados para propiciar qualquer conclusão.

Os dados obtidos no presente trabalho, para as espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* estudadas, demonstram uma grande similaridade e homogeneidade entre as mesmas. As espécies são muito semelhantes morfológica e anatomicamente e poucas características as diferenciam. Por isto, é notável que *B. mentosum*, tido como grupo-irmão do *core* da seção *Micranthae*, apresente muitas características distintas das demais espécies, tais como sépala dorsal com três feixes vasculares; labelo com tricomas longos na margem e onze feixes vasculares; pétalas com epiderme papilosa e com tricomas na margem. Desta forma, apesar do alto suporte molecular para a inclusão desta espécie na seção *Micranthae* (Smidt et al., 2011), os dados anatômicos aqui levantados não corroboram a manutenção da mesma na seção. Para confirmar tal sugestão, se faz necessário estudar espécies das demais seções neotropicais de *Bulbophyllum* (NUNES et al., [201-?]), verificando se *B. mentosum* se encaixaria melhor em alguma delas, como por exemplo em *B. sect. Furvescens*, como sugerido por Smidt et al. (2011).

Segundo Smidt (2007), deve haver, aparentemente, uma grande convergência floral entre *B. epiphytum* e *B. rupicolum*, espécies muito próximas entre si, distintas morfológicamente apenas pelo hábito, forma do pseudobulbo, tamanho das flores e forma e características do labelo. Recentemente, Azevedo et al. (2007) incluíram algumas populações destas espécies em seus estudos sobre variabilidade genética no gênero, e obtiveram resultados que sugerem tanto uma grande proximidade filogenética quanto eventos de introgressão; tal estudo revelou que, dentre as espécies analisadas, a variação genética intrapopulacional era relativamente elevada.

Os dados obtidos no presente trabalho, contudo, apontam que existem características únicas para *B. epiphytum* e *B. rupicolum*, e que podem auxiliar na sua diferenciação. Apesar das variações encontradas, como na ornamentação das paredes periclinais externas das células

epidérmicas, na espessura da cutícula que recobre as peças florais, e até mesmo na presença ou não de idioblastos com espessamentos celulósicos, grande parte dessas variações pode estar associada a diferenças ambientais de acordo com o hábitat em que cada espécie ocorre majoritariamente (plasticidade fenotípica). Entretanto, caracteres anatômicos como a presença de estômatos na face abaxial de *B. epiphytum* e o número de feixes vasculares na sépala lateral, que é único em *B. rupicolum* e em número de três em *B. epiphytum*, podem ser significativos na caracterização e diferenciação das mesmas.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem caracterizar e distinguir anatomicamente as espécies estudadas, e fornecem dados importantes referentes à sua anatomia e relação com adaptações ao meio em que se encontram. Ainda, foi possível identificar a presença de tricomas na face abaxial das sépalas, e evidências de regiões secretoras no labelo, que podem produzir substâncias de recompensa a polinizadores. As características encontradas permitem a diferenciação principalmente entre *B. epiphytum* e *B. rupicolum*, espécies muito semelhantes morfológicamente, além de fomentarem as discussões a respeito da manutenção ou exclusão de *B. mentosum* da espécie em *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*.

REFERÊNCIAS

- APG (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP) III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.161, p. 105-121, 2009.
- ASCENSÃO, L.; FRANCISCO, A.; COTRIM, H.; PAIS, M.S. Comparative structure of the labellum in *Ophrys fusca* and *O. lutea* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 92, p. 1059-1067, 2005.
- AZEVEDO, M.T.A.; BORBA, E.L.; SEMIR, J.; SOLFERINI, V.N. High genetic variability in Neotropical myophilous orchids. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 152, p. 33-40, 2007.
- BARTHLOTT, W. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. **Nordic Journal of Botany**, Copenhagen, v. 1, p. 345-355, 1981.
- BORBA, E.L.; SEMIR, J. Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 217, p. 197-204, 1999.
- BORBA, E.L.; SHEPHERD, G.J.; SEMIR, J. Reproductive systems and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occurring in Brazilian 'campos rupestres' vegetation. **Plant Systematics and Evolution**, New York, v. 217, p. 205-214, 1999.
- BURR, B.; BARTHLOTT, W. On a velamen-like tissue in the root cortex of orchids. **Flora**, London, v. 185, p. 313-323, 1991
- CHASE, M.W.; BARRETT, R.L.; CAMERON K.M.; FREUDENSTEIN, J.V. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: DIXON, K.M. (ed.). **Orchid conservation**. Kota Kinabalu, Malaysia: Natural History Publications, 2003. p. 69-89.
- DRESSLER, R. **The orchids: natural history and classification**. Cambridge: Harvard University Press, 1981. 332p.
- DRESSLER, R. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides Press, 1993. 316p.
- DRESSLER, R. How many orchid species? **Selbyana**, Sarasota, v. 26, p. 155-158, 2005.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 55, p. 123-142, 1968.
- FRODIN, D.G. History and concepts of big plant genera. **Taxon**, Utrecht, v. 53, p. 753, 2004.
- HEW, C. S.; LEE, G. L.; WONG, S. C. Occurrence of non-functional stomata in the flowers of tropical orchids. **Annals of Botany**, London, v. 46, p. 195-201, 1980.

HUGHES, J.; MCCULLY, M.E. The use of an optical brightener in the study of plant structure. **Biotechnic & Histochemistry**, Baltimore, v. 50, p. 319-329, 1975.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1940. 523p.

KIRK, P.W. Neutral red as a lipid fluorochrome. **Biotechnic & Histochemistry**, Baltimore, v. 45, p. 1-4, 1970.

KOCYAN, A.; ENDRESS, P.K. Floral structure and development in *Apostasia* and *Neuwiedia* (Apostasioideae) and their relationships to other Orchidaceae. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 162, p. 847-867, 2001.

MÜLLER, C. Plant–Insect interactions on cuticular surfaces. In: RIEDERER, M.; MÜLLER, C. (ed.). **Biology of plant cuticle**. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. p. 398-422.

NUNES, E.L.P., SMIDT, E.C., STÜTZEL, T., COAN, A.I. What do floral micromorphology and anatomy tell us about Neotropical *Bulbophyllum* sect. *Didactyle* (Orchidaceae: Bulbophyllinae)? **Annals of Botany**, London, [2013?]. [in press].

NUNES, E. L. P. **Morfologia e anatomia floral comparativa nas seções neotropicais de *Bulbophyllum Thouars* (Orchidaceae): levantamento de caracteres, sinapomorfias e processos evolutivos**. [201-?]. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, [201-?]. [em fase de elaboração].

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, New York, v. 59, p. 368-373, 1965.

OLATUNJI, O.A.; NENGIM, R.O. Occurrence and distribution of tracheoidal elements in the Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 80, p. 357-370, 1980.

PRIDGEON, A.M. Absorbing trichomes in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 68, p. 64-71, 1981.

PRIDGEON, A.M. Diagnostic characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 69, p. 921-938, 1982.

PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.; CHASE, M.W. **Genera orchidacearum: Epidendroideae**. New York: Oxford University Press, 2005. v. 4.

PRYCHID, C.J.; RUDALL, P.J. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: a review of their structure and systematics. **Annals of Botany**, London, v. 84, p. 725-739, 1999.

RASMUSSEN, F.N. The gynostemium of *Bulbophyllum ecornutum* (J. J. Smith) J. J. Smith (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.91, n. 4, p. 447-456, 1985.

RIEDERER, M.; SCHREIBER, L. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 363, p. 2023-2032, 2001.

SIEGERIST, E.S. ***Bulbophyllums and their allies: a grower's guide***. Portland: Timber Press, 2001. 251p.

SMIDT, E.C. **Filogenia e revisão taxonômica de *Bulbophyllum Thouars* (Orchidaceae) ocorrentes no Neotrópico**. 2007. 345f. Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2007.

SMIDT, E.C.; SILVA-PEREIRA, V.; BORBA, E.L., VAN DEN BERG, C. Richness, distribution and important areas to preserve *Bulbophyllum*. **Lankesteriana**, Cartago, v. 7, p. 107-113, 2007.

SMIDT, E.C.; BORBA, E.L.; GRAVENDEEL, B.; FISCHER, G.A.; VAN DEN BERG, C. Molecular phylogeny of the Neotropical sections of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) using the nuclear and plastid spacers. **Taxon**, Utrecht, v. 60, p. 1050-1064, 2011.

SOUTHWORTH, D. Cytochemical reactivity of pollen walls. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 21, p. 73-80, 1973.

STERN, W.L.; MORRIS, M.W.; JUDD, W.S.; PRIDGEON, A.M.; DRESSLER, R.L. Comparative vegetative anatomy and systematics of Spiranthoideae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 113, p. 161-197, 1993.

STERN, W.L.; JUDD, W.S. Comparative anatomy and systematics of Catasetinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 136, p. 153-178, 2001.

TEIXEIRA, S.D.; BORBA, E.L.; SEMIR, J. Lip anatomy and its implications for the pollination mechanisms of *Bulbophyllum* species (Orchidaceae). **Annals of Botany**, London, v. 93, p. 499-505, 2004.

THE BOARD of trustees of the Royal Botanic Gardens K: world checklist of selected plant families. 2013. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp/>>. Acesso em: 26 jun. 2013.

VERMEULEN, J.J. **Orchid Monographs 2, A taxonomic revision of the Continental African *Bulbophyllinae***. Leiden: E.J. Brill, 1987. 300p.

VERMEULEN, J.J. **Orchid Monographs 7, A taxonomic revision of *Bulbophyllum*, sections *Adenopetalum*, *Lepanthanthe*, *Macrouris*, *Pelma*, *Peltopus*, and *Uncifera* (Orchidaceae)**. Leiden: Rijksherbarium/Hortus Botanicus, 1993. 324p.

VEROLA, C.F. **Biologia floral e sistemas de reprodução em espécies de *Bulbophyllum* (Orchidaceae) ocorrentes em mata de galeria, campo rupestre e floresta estacional**. 2002. 89f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

APÊNDICE A – TABELA 1

Tabela 1 - Lista de espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* estudadas e respectivos dados de coleta.

Espécie	Dados do Coletor	Local de Coleta
<i>B. adiamantinum</i> Brade	E. C. Smidt 802	Joaquim Felício – MG
<i>B. chloroglossum</i> Rchb.f. & Warm.	W. S. Mancinelli 1129	Sengés – PR
<i>B. epiphytum</i> Barb.Rodr.	E. C. Smidt et al. s.n	Caldas – MG
<i>B. mentosum</i> Barb.Rodr.	A. Massenssini Jr s.n.	Palmeiras – BA
<i>B. micranthum</i> Barb.Rodr.	W. S. Mancinelli 1172	Tibagi – PR
<i>B. rupicolum</i> Barb.Rodr.	E.C. Smidt 741, 766	Caldas – MG

Fonte: Elaborada pela autora.

APÊNDICE B – TABELA 2

Tabela 2 - Caracteres anatômicos florais observados nas espécies estudadas de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae*.

Peças Florais/Caracteres		<i>B. adiamantinum</i>	<i>B. chloroglossum</i>	<i>B. epiphytum</i>	<i>B. mentosum</i>	<i>B. micranthum</i>	<i>B. rupicolum</i>
Formato em seção transversal		curvado	curvado	curvado	curvado	curvado	plano
Sépala Dorsal	Face adaxial	Omamentação na parede periclinal externa	+	+	+	+	+
		Formato da parede periclinal externa	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo
	Face abaxial	Omamentação na parede periclinal externa	+	+	+	+	+
		Formato da parede periclinal externa	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo
		Tricoma glandular	+	+	+	+	+
		Estômatos	+	+	-	-	-
	Mesofilo	Margem em seção transversal	E+M	E + M	E + M	E + M	E + M
		Idioblastos com ráfides	+	+	+	+	+
		Idioblastos com espessamentos	+	+	+	+	+
		Número de feixes vasculares	1	1	3	1	1
Sépala Lateral	Formato em seção transversal	curvado	curvado	curvado	curvado	curvado	curvado
	Face adaxial	Omamentação na parede periclinal externa	+	+	+	+	+
		Formato da parede periclinal externa	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo
	Face abaxial	Omamentação na parede periclinal externa	+	+	+	+	+
		Formato da parede periclinal externa	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo
		Tricoma glandular	+	+	+	+	+
		Estômatos	+	+	+	-	-
	Mesofilo	Margem em seção transversal	E + M	E + M	E + M	E + M	E + M
		Idioblastos com ráfides	+	+	+	+	+
		Idioblastos com espessamentos	+	+	+	+	+
		Número de feixes vasculares	3	3	3	3	1
Pétala	Face adaxial	Omamentação na parede periclinal externa	-	-	-	-	-
		Formato da parede periclinal externa	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo
	Face abaxial	Omamentação na parede periclinal externa	-	-	-	-	-
		Formato da parede periclinal externa	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo
	Mesofilo	Margem em seção transversal	E + M	E + M	E + M	E + M	E + M
		Idioblastos com ráfides	+	+	+	+	+
		Idioblastos com espessamentos	+	+	+	+	+
		Número de feixes vasculares	1	1	1	1	1

Labelo porções mediana e distal	Face adaxial	Omamentação na parede periclinal externa									
		papiloso	-	papiloso	-	papiloso	-	convexo	papiloso	-	convexo
	Face abaxial	Omamentação na parede periclinal externa									
		papiloso	-	papiloso	-	papiloso	-	convexo	papiloso	-	convexo
Mesofilo	Formato da parede periclinal externa										
		papilosa	+	papilosa	+	papilosa	+	papilosa	+	papilosa	+
	Margem em seção transversal										
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Mesofilo	Idioblastos com espessamentos										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Número de feixes vasculares										
		3	3	2	3	0	2	2	2	2	2
Face adaxial	Lobos laterais										
		+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
	Omamentação na parede periclinal externa										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Face abaxial	Formato da parede periclinal externa										
		papiloso	+	papiloso	+	convexo-papiloso	convexo-papiloso	convexo-papiloso	papiloso	+	convexo
	Sulco										
		+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Mesofilo	Formato parede periclinal externa do sulco										
		papiloso	+	convexo-papiloso	convexo-papiloso	convexo-papiloso	convexo-papiloso	papiloso	papiloso	convexo-papiloso	convexo-papiloso
	Margem dos lobos laterais										
		papilosa	papilosa	papilosa	papilosa	papilosa	papilosa	***	papilosa	papilosa	lisa
Face abaxial	Omamentação na parede periclinal externa										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Formato da parede periclinal externa										
		papiloso	+	papiloso	+	convexo-papiloso	convexo-papiloso	convexo-papiloso	papiloso	+	convexo
Mesofilo	Idioblastos com ráfides										
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Idioblastos com espessamentos										
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mesofilo	Estômatos										
		-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	Número de feixes vasculares										
		11	3	3	3	11	3	3	3	3	3
Epiderme ginostêmio e Coluna	Omamentação na parede periclinal externa										
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Formato da parede periclinal externa										
		convexo	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo
Antera	Viscídio										
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Epiderme coluna										
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antera	Omamentação na parede periclinal externa										
		convexo	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo	convexo
	Formato da parede periclinal externa										
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Antera	Omamentação na parede periclinal externa										
		papiloso	papiloso	papiloso	papiloso	papiloso	papiloso	papiloso	papiloso	papiloso	papiloso
	Formato da parede periclinal externa										
		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Carpelo	Número de políneas										
		4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Formato										
		raso	raso	raso	raso	raso	raso	raso	raso	raso	raso
Carpelo	Estigma										
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Cavidade preenchidas por células										
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Carpelo	Ovário										
		E externa	E externa	E externa	E externa	E externa	E externa	E externa	E externa	E externa	E externa
	Parede periclinal externa ornamentada										
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mesofilo	Idioblastos com ráfides										
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Idioblastos com espessamentos										
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mesofilo	Número de feixes vasculares										
		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Número de feixes vasculares										
		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Fonte: Elaborada pela autora.

Obs.: +, presença; -, ausência; E, epiderme; M, mesofilo; ***, dado não aplicável.

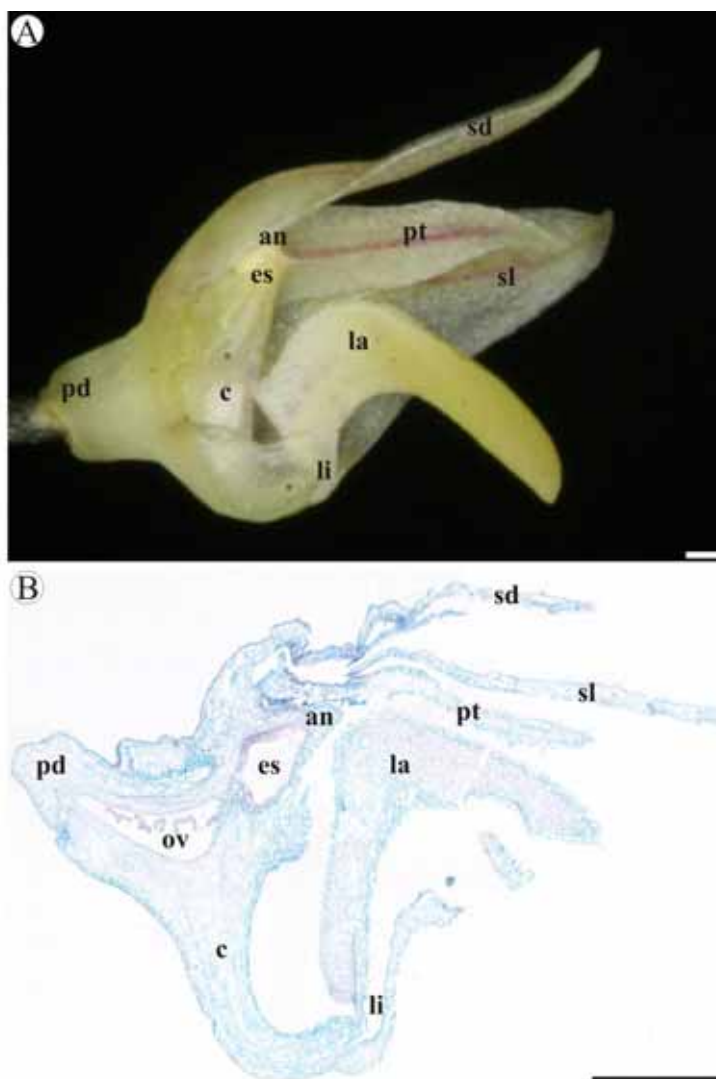
APÊNDICE C – TABELA 3

Tabela 3 - Testes histoquímicos realizados em secções de historresina para espécies de *Bulbophyllum* sect. *Micranthae* estudadas e os principais sítios de reação encontrados nas peças florais.

Testes Histoquímicos	Sítio de Reação
Calcofluor White MR2	Idioblastos espiraladamente espessados
Comassie Brilliant Blue	Citoplasma da epiderme e do tecido subepidérmico da cavidade/sulco secretor
IKI	Parênquima regular do mesofilo do labelo
PAS	Parênquima regular do mesofilo do labelo
Vermelho de Rutênio	Lamela média
Vermelho Neutro	Cutícula

Fonte: Elaborada pela autora.

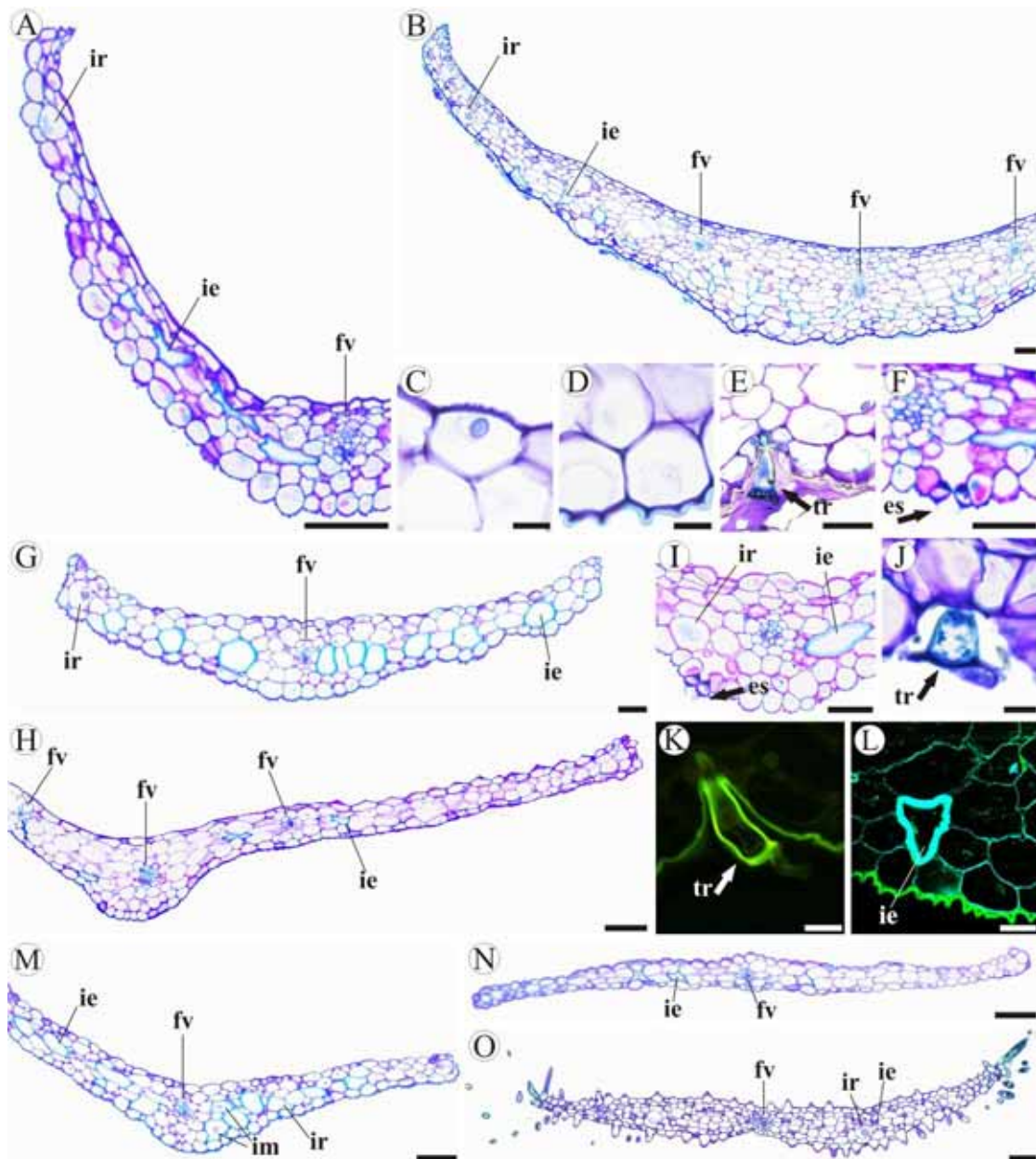
APÊNDICE D – FIGURA 1



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Morfologia e anatomia de *B. epiphytum* (A-B), em vista lateral (A) e corte longitudinal (B). A) Visão geral lateral da flor, com sépala lateral removida (Foto: E.C. Smidt). B) Visão geral da flor. an: antera, c: coluna, e: estigma, la: labelo, li: ligação do labelo com a coluna, ov: ovário, pd: pedicelo, pt: pétala, sd: sépala dorsal, sl: sépala lateral. Barras de escala: A= 1mm; B= 200µm.

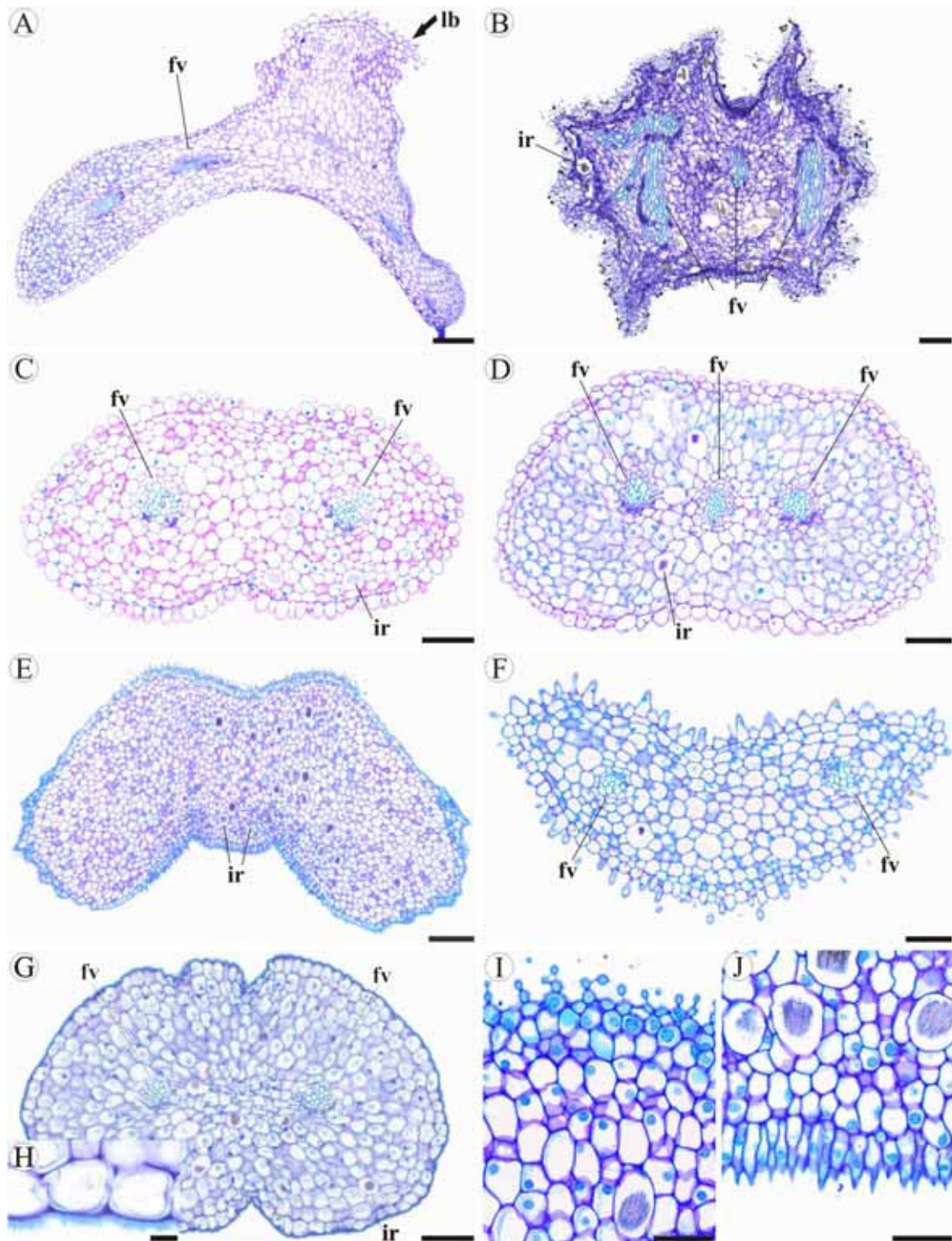
APÊNDICE E – FIGURA 2



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Anatomia da sépala e pétala de *B. chloroglossum* (A, F, I-J); *B. mentosum* (B, E, K, O), *B. epiphytum* (C-D, H, L), *B. rupicolum* (G, M) E *B. micranthum* (N), em secções transversais. A-B) Sépala dorsal. C) Detalhe da face adaxial da sépala dorsal. D) Detalhe da face abaxial da sépala dorsal. E) Detalhe do tricoma glandular na face abaxial da sépala dorsal. F) Detalhe do estômato na face abaxial da sépala dorsal. G) Sépala dorsal. H) Sépala lateral. I) Detalhe do estômato na face abaxial da sépala lateral. J) Detalhe do tricoma na face abaxial da sépala lateral. K) Detalhe do tricoma na face abaxial da sépala lateral, em fluorescência. L) Detalhe da cutícula na face abaxial e de idioblasto espiraladamente espessado na sépala lateral, em fluorescência. M) Sépala lateral. N-O) Pétala. es: estômato, fv: feixe vascular, ie: idioblasto espiraladamente espessado, im: idioblasto misto, ir: idioblasto com ráfides, tr: tricoma. Barras de escala: A-B, H, M-O= 100µm; C-D, J= 10µm; E-G, I= 50µm; K-L= 20µm.

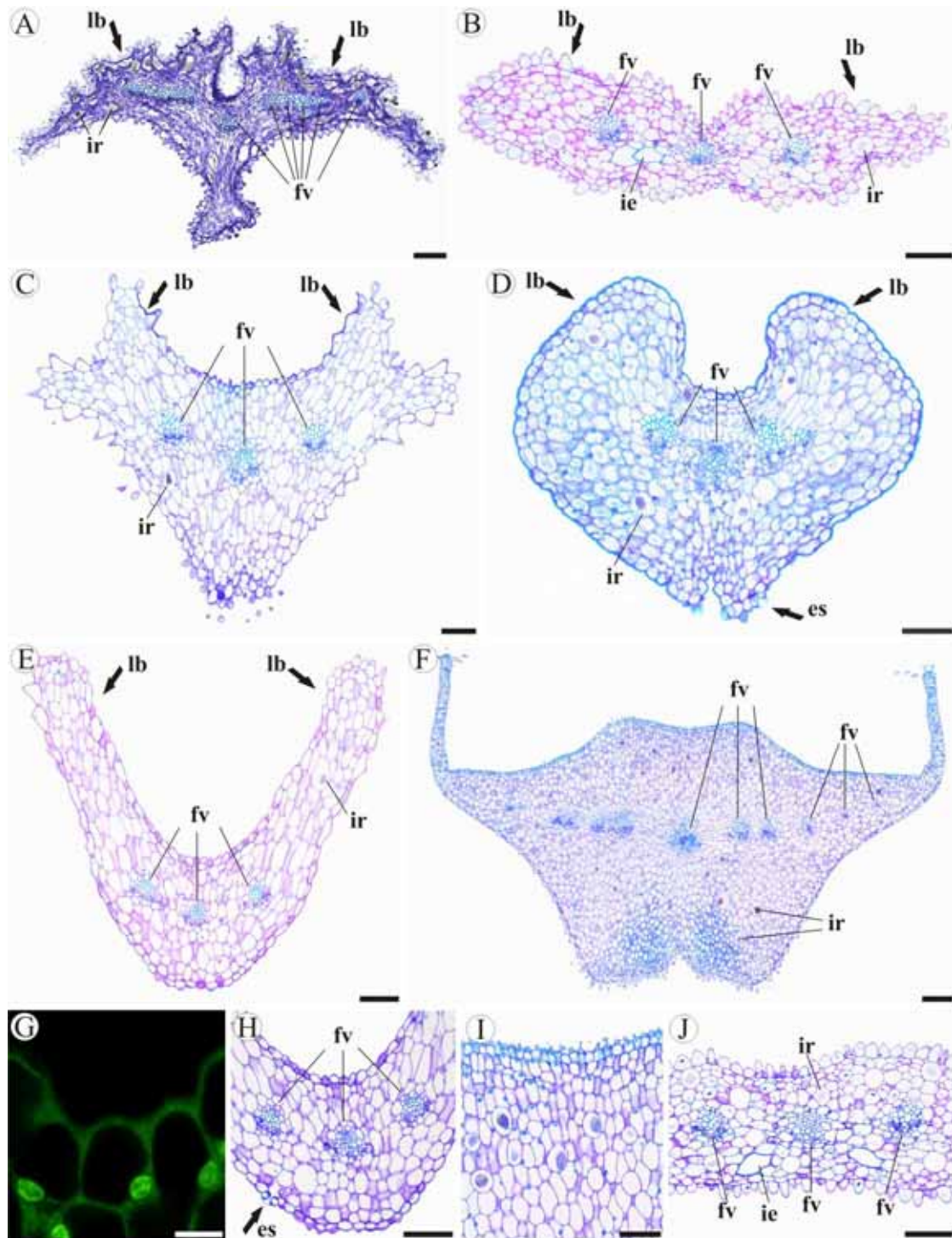
APÊNDICE F – FIGURA 3



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Anatomia do labelo de *B. epiphytum* (A, D); *B. adiamantinum* (B); *B. chloroglossum* (C); *B. mentosum* (E, I-J); *B. micranthum* (F) e *B. rupicolum* (G-H), em seções longitudinais (A) e transversais (B-J). A) Visão geral do labelo. B-G) Visão geral da porção distal-mediana do labelo. H) Detalhe da ornamentação da cutícula no labelo. I) Detalhe da face adaxial da epiderme do labelo. J) Detalhe da face abaxial da epiderme do labelo. es: estômato, fv: feixe vascular, ie: idioblasto espiraladamente espessado, ir: idioblasto com ráfides, lb: lobo lateral. Barras de escala: A, E= 200µm; B-D, F-G= 100µm; H= 10µm; I-J= 50µm.

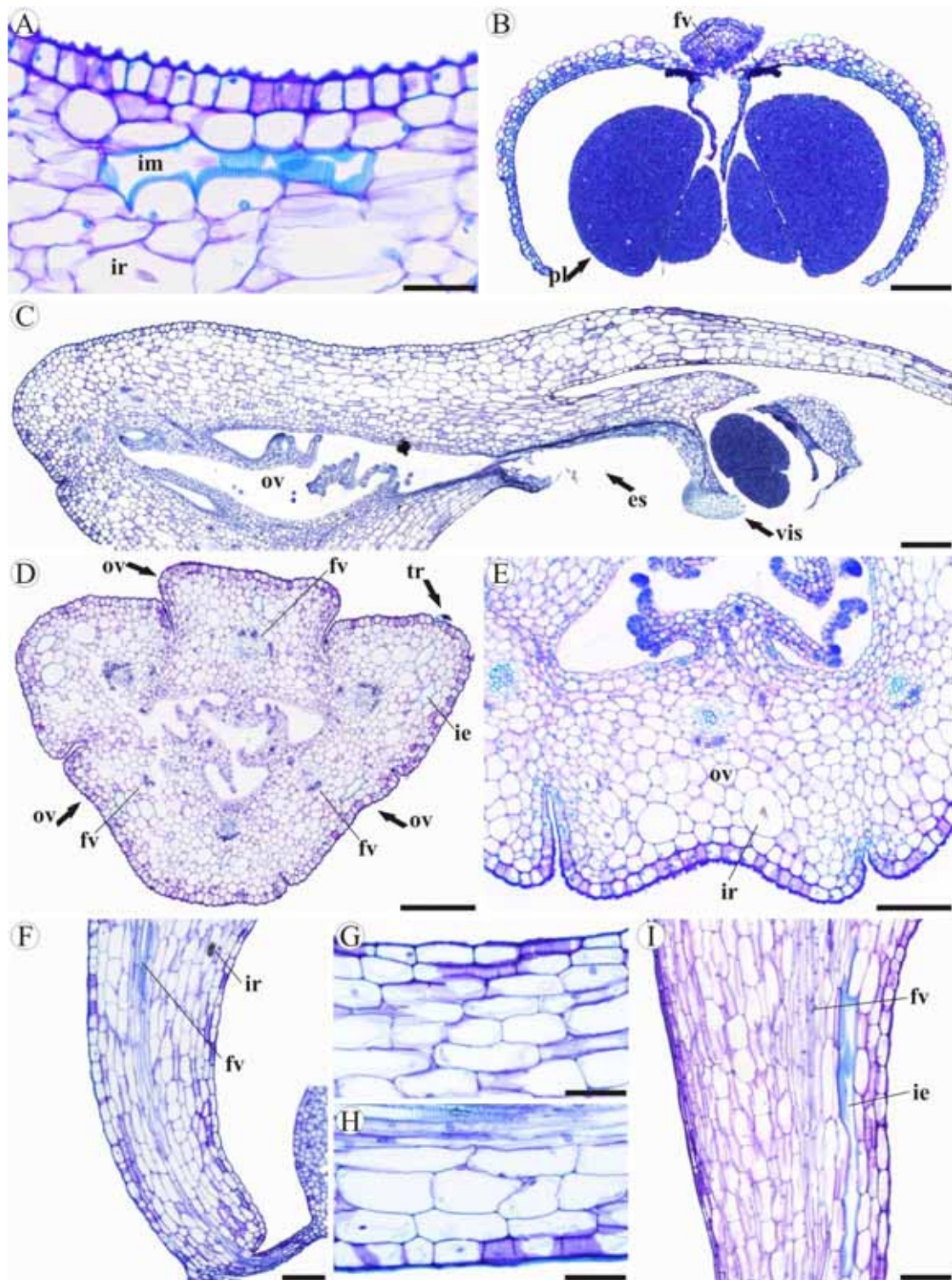
APÊNDICE G – FIGURA 4



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Anatomia do labelo de *B. adiamantinum* (A); *B. chloroglossum* (B, I); *B. micranthum* (C); *B. rupicolum* (D); *B. mentosum* (E, H) e *B. epiphytum* (F-G, J), em secções transversais. A-F) Visão geral da porção proximal do labelo. G) Detalhe das células do sulco do labelo, em fluorescência. H) Detalhe do estômato na face abaxial na região proximal do labelo. I) Detalhe da face adaxial da epiderme na porção proximal do labelo. J) Detalhe dos idioblastos com ráfides e espiraladamente espessados na porção proximal do labelo. es: estômato, fv: feixe vascular, ie: idioblasto espiraladamente espessado, ir: idioblasto com ráfide, lb: lobo lateral. Barras de escala: A-E, H-J= 100µm; F= 200µm; G= 10µm.

APÊNDICE H – FIGURA 5



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Anatomia do ginostêmio e coluna de *B. epiphytum* (A, E); *B. mentosum* (B); *B. micranthum* (C); *B. chloroglossum* (D, I); *B. rupicolum* (F-H), em seções longitudinais (A, C, F-I) e transversais (B, D-E). A) Detalhe da epiderme do ginostêmio. B) Visão geral da antera e polínias. C) Visão geral da antera, superfície estigmática e polínias, com presença de viscidio. D) Visão geral do carpelo. E) Detalhe do ovário. F) Visão geral do pé da coluna, mostrando a ligação com o labelo. G) Detalhe da face adaxial do pé da coluna. H) Detalhe da face abaxial do pé da coluna. I) Visão geral do pé da coluna. es: estômato; fv: feixe vascular, ie: idioblasto espiraladamente espessado, im: idioblasto misto, ir: idioblasto com ráfide, ov: ovário, pl: polínias. Barras de escala: A, G-H= 50µm; B-D= 200µm; E-F, I= 100µm.