

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP  
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**Biologia floral comparada do gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth  
(Orchidaceae, Catasetinae) baseado em estudos filogenéticos**

EVELYN PEREIRA FRANKEN

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor(a) em Ciências - Área:  
Biologia Comparada

Ribeirão Preto - SP

2017

EVELYN PEREIRA FRANKEN

**Biologia floral comparada do gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth  
(Orchidaceae, Catasetinae) baseado em estudos filogenéticos**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor(a) em Ciências - Área:  
Biologia Comparada

Orientador: Prof. Dr. Emerson Ricardo Pansarin

Ribeirão Preto - SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Franken, Evelyn Pereira

Biologia floral comparada do gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth (Orchidaceae, Catasetinae) baseado em estudos filogenéticos. 141 p.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP). Área de concentração: Biologia Comparada.

Orientador: Pansarin, Emerson Ricardo.

1. Evolução. 2. Filogenia. 3. Morfo-anatomia floral. 4. Fragrância floral.

FRANKEN, E. P. **Biologia floral comparada do gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth (Orchidaceae, Catasetinae) baseado em estudos filogenéticos.** Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto para obtenção de título de Doutor(a) em Ciências - Área: Biologia Comparada.

Aprovado em: 01 / Agosto / 2017

#### Banca Examinadora

Prof. Dr. Emerson Ricardo Pansarin      Instituição: FFCLRP-USP  
Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Alessandro W. Coelho Ferreira      Instituição: Universidade Federal do Maranhão  
Julgamento: APROVADO

Dr. Fábio de Barros      Instituição: Instituto de Botânica  
Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Eduardo Custódio Gasparino      Instituição: FCAV de Jaboticabal-UNESP  
Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Carlos Alberto Garófalo      Instituição: FFCLRP-USP  
Julgamento: APROVADO

para Wolfram, Guilherme e Hiro,  
meus amados

## AGRADECIMENTOS

Ao meu marido e filho pelo apoio e por sempre me lembrarem que existe vida além do doutorado

Aos meus pais por sempre me motivarem a estudar e aprender cada vez mais

Ao meu orientador e sua esposa (Ludmila Mickeliunas Pansarin) pela amizade e todos os ensinamentos

À Silvia R. M. Pedro por ser uma ótima companhia e por toda ajuda

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM, pela concessão da bolsa de doutorado

Ao professor Leonardo Gobbo Neto e toda sua equipe pela ajuda com as análises de fragrâncias florais

Ao professor Marco A. T. Marinho e todos os demais professores das disciplinas cursadas durante o período do doutorado

À Juan F. Gómez por gentilmente ceder algumas das informações e fotografias que enriqueceram esta tese

À todos os colaboradores que auxiliaram nesta pesquisa doando material: Adriano Dalastra, Erenato Wolstein, Fabiana Ornaghi, Hilvio Alemi, Ingo Bauer, James Cristian dos Reis, Jânio Araújo Lira, José Antônio de Oliveira, Juan Fernández Gómez, Luiz Valter Brand Gomes, Mari Tereza Oliveira de Lima, Maria Cecília Rocha, Maria da Piedade Assunção Silva, Maria Solidade Soares Abreu, Patrícia Nardi Pilatti, Sérgio Alberto Queiroz Costa, Ulisses L. C. Ferreira, Valdir Andrade Silva, Wender M. Alves e Willis Silva Souza

## RESUMO

FRANKEN, E. P. **Biologia floral comparada do gênero *Catasetum* Rich. ex Kunth (Orchidaceae, Catasetinae) baseado em estudos filogenéticos.** 2017. 141 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2017.

*Catasetum* é um gênero Neotropical com cerca de 130 espécies praticamente indistinguíveis quanto à morfologia vegetativa. Suas flores são primariamente unissexuais. As flores masculinas exibem uma excepcional variação morfológica e apresentam estaminódios modificados característicos deste gênero, que é tradicionalmente citado pela polinização exclusiva por abelhas euglossine. Este estudo avaliou a evolução dos principais atributos florais em *Catasetum*. Para isso, uma hipótese filogenética foi reconstruída utilizando matrizes individuais e combinadas de DNA nuclear e plastidial. Foram sequenciadas três regiões (*ITS*, *rpS16* e *trnL-F*) para 80 espécies de *Catasetum* e 25 grupos externos. O gênero é monofilético e irmão de *Clowesia* em todas as análises. Alguns relacionamentos tiveram alto suporte. Nenhuma das classificações infragenéricas tradicionais pode ser reconhecida na filogenia. A partir deste resultado foi possível observar que a história evolutiva compreendeu várias reversões e convergências de caráter entre as espécies. O estado plesiomórfico e algumas tendências evolutivas são apresentados. As análises morfo-anatômicas e histoquímicas florais utilizaram flores frescas ou fixadas, cujo labelo foi seccionado e corado com Lugol 1% e Vermelho de Sudão III ou IV, sendo examinados através de microscopia de luz. Estas análises revelaram a tendência de aumento na complexidade do labelo apenas em flores masculinas. Também foi possível observar a relação direta entre a morfologia do labelo e a distribuição do tecido secretor. A análise de fragrâncias florais utilizou a técnica de coleta dinâmica combinada com análise via GC-MS. Essa análise confirmou o polimorfismo químico entre as espécies, embora a variabilidade interespecífica tenha sido baixa. Vários dos compostos identificados foram encontrados anteriormente na tibia traseira de machos de euglossine ou têm sua atratividade conhecida através de estudos com iscas odoríferas. Nossos resultados revelaram ausência de padrão ou tendência evolutiva na composição das fragrâncias das espécies. A pressão seletiva causada pelos polinizadores, ao escolherem as espécies a serem visitadas, tem direcionado a evolução da biologia floral deste gênero. A morfologia, a distribuição do tecido secretor dos osmóforos e a fragrância emitida são complementares, atuando em conjunto para gerar respostas etológicas específicas dos

polinizadores. A alta especificidade gerada por este mecanismo reduz o compartilhamento de polinizadores, levando ao transporte mais eficiente do pólen e diminuindo o fluxo gênico interespecífico.

Palavras-chave: Evolução. Filogenia. Morfo-anatomia floral. Fragrância floral.



## ABSTRACT

FRANKEN, E. P. **Compared floral biology of the genus *Catasetum* Rich. ex Kunth (Orchidaceae, Catasetinae) based in phylogenetic studies.** 2017. 141 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2017.

*Catasetum* is a Neotropical genus with ca. 130 species that are practically indistinguishable based on the vegetative morphology. The flowers are primarily unisexual. Male flowers have an exceptional morphological variation and possess modified staminodes as distinctive feature of this genus, which is traditionally cited as entirely pollinated by euglossine bees. The present study evaluated the evolution of the major floral features in *Catasetum*. To do that, one phylogenetical hypothesis was made using individual and combined matrices of nuclear and plastid DNA. Three regions were sequenced (*ITS*, *rpS16* and *trnL-F*) for 80 species of *Catasetum* and 25 taxa of outgroups. The genus is monophyletic and sister to *Clowesia* in all analyses. Some relationships had high support, however the phylogenetical infrageneric signal was low. None of the traditional infrageneric classifications could be recognized in the phylogeny. From this result, it was possible to observe that the evolutionary history consists on several characters reversions and convergences between species. The plesiomorphic status and some evolutionary trends were recognized. The morpho-anatomy and histochemical analysis of flowers were made with fresh or fixed flowers, whose labellum was sectioned and stained with Lugol 1% and Sudan III or IV, and analyzed with light microscopy. Those analyses reveal a trend to increase labellum complexity in male flowers. It was also possible to observe a direct relation between labellum morphology and distribution of the secretory tissue. The floral scent analysis was made with the dynamic collection technic combined with GC-MS analysis. This analysis confirmed the chemical polymorphism between species, but the interspecific variability was low. Several compounds identified were previously founded in the hind tibiae of male euglossine or have its attractiveness know. Our results revealed an absence of evolution pattern or trend in the scent composition of the species. The selective pressure caused by pollinators, when choosing species to be visited, had guided the evolution of the floral biology of this genus. The morphology, the osmophore secretory tissue distribution and the floral scent are complimentary, acting together to generate specific ethological answers of the pollinators. The high specificity created by this mechanism

decrease the sharing of pollinators, leading to a more efficient pollen transport and decreasing the interspecific gene flow.

Keywords: Evolution. Phylogeny. Floral morpho-anatomy. Floral scent.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2</b>	<b>ANÁLISES FILOGENÉTICAS</b> .....	16
2.1	INTRODUÇÃO .....	17
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
2.2.1	<i>Amostragem</i> .....	20
2.2.2	<i>Extração, amplificação e sequenciamento do DNA</i> .....	23
2.2.3	<i>Análises filogenéticas</i> .....	24
2.3	RESULTADOS .....	25
2.3.1	<i>Características gerais das matrizes</i> .....	25
2.3.2	<i>Análises individuais</i> .....	27
2.3.3	<i>Análises combinadas</i> .....	42
2.4	DISCUSSÃO .....	52
<b>3</b>	<b>ANÁLISES MORFO-ANATÔMICAS E HISTOQUÍMICAS</b> .....	56
3.1	INTRODUÇÃO .....	57
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	58
3.3	RESULTADOS .....	61
3.3.1	<i>Características gerais</i> .....	61
3.3.2	<i>Diversidade morfológica</i> .....	63
3.3.3	<i>Diversidade anatômica</i> .....	78
3.4	DISCUSSÃO .....	93
<b>4</b>	<b>ANÁLISE DE FRAGRÂNCIAS FLORAIS</b> .....	99
4.1	INTRODUÇÃO .....	100
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	102
4.2.1	<i>Coleta, análise e identificação dos voláteis florais</i> .....	102
4.2.2	<i>Análise estatística</i> .....	103
4.3	RESULTADOS .....	103
4.3.1	<i>Diversidade química dos voláteis florais</i> .....	103
4.3.2	<i>Variação interespecífica dos voláteis florais</i> .....	107
4.4	DISCUSSÃO .....	111

<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>114</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>115</b>
	<b>APÊNDICE 1 .....</b>	<b>130</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae possui aproximadamente 25.000 espécies distribuídas em cerca de 800 gêneros, sendo considerada uma das maiores famílias entre as Angiospermae (DRESSLER, 2005). Uma ampla diversidade de tipos de recursos florais e estratégias de polinização ocorre entre as orquídeas (e.g., van der PIJL; DODSON, 1966; NILSSON, 1992; DRESSLER, 1993; van der CINGEL, 2001). As peças florais são relativamente uniformes quanto ao número e arranjo de suas partes, porém elas apresentam uma grande variedade de formas, o que está relacionado com a diversidade de polinizadores e mecanismos de polinização (DRESSLER, 1993). O desenvolvimento de mecanismos de polinização altamente especializados na atração de um ou poucos polinizadores efetivos parece ser uma estratégia comum entre as orquídeas, principalmente quando falamos das espécies inclusas em Cymbidieae (Epidendroideae), onde ocorrem os mecanismos mais complexos (van der PIJL; DODSON, 1966; DRESSLER, 1993; van der CINGEL, 2001). A especialização dos mecanismos de polinização leva à formação de grupos funcionais ou síndromes, em que o conjunto de características florais (morfologia, recursos oferecidos, coloração, etc.) é associado à atração de determinado grupo de polinizador (e.g., FENSTER et al., 2004).

Durante a década de 1990 ocorreu a produção e rápido acúmulo de novas informações baseadas em sequências de DNA de plantas, incluindo orquídeas (APG II, 2003). Portanto, os trabalhos mais recentes sobre Orchidaceae se baseiam em um sistema filogenético de classificação (e.g., CAMERON et al., 1999; FREUDENSTEIN et al., 2004; GIVNISH et al., 2015), o qual atualmente divide Orchidaceae em cinco subfamílias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanilloideae, Orchidoideae e Epidendroideae. Esta última inclui a tribo Cymbidieae, que contém os táxons mais derivados em Orchidaceae (e.g., WHITTEN; NEUBIG; WILLIAMS, 2014; FREUDENSTEIN; CHASE, 2015). A subtribo Catasetinae inclui oito gêneros exclusivamente Neotropicais com características morfológicas e ecológicas muito heterogêneas, denominados *Catasetum*, *Clowesia*, *Cyanaeorchis*, *Cynoches*, *Dressleria*, *Galeandra*, *Grobya* e *Mormodes* (e.g., BATISTA et al., 2014; PÉREZ-ESCOBAR et al., 2016). Entretanto, os cinco táxons mais derivados (i.e., *Catasetum*, *Clowesia*, *Cynoches*, *Dressleria* e *Mormodes*) formam um grupo muito coeso que compartilha a mesma síndrome de polinização e várias características vegetativas (i.e., pseudobulbos com vários internós, folhas decíduas ao final da maturação do pseudobulbo, inflorescência racemosa que emerge da base do pseudobulbo, etc.) (e.g., ROMERO; CARNEVALI, 2009).

*Catasetum* Rich. ex Kunth é o maior gênero na sub-tribo Catasetinae, com aproximadamente 130 espécies distribuídas do México ao Sul do Brasil e Argentina, principalmente na Amazônia Brasileira, onde o grupo é bastante representativo (MIRANDA; LACERDA, 1992; ROMERO; CARNEVALI, 2009). As espécies são praticamente indistinguíveis quanto à morfologia vegetativa. As flores são primariamente unissexuais (estaminadas ou pistiladas) com morfologia distinta (heterantia) e determinação sexual de acordo com as características ambientais e nutricionais do indivíduo (GREGG, 1975; ROMERO; NELSON, 1986; ZIMMERMAN, 1991; ROMERO; CARNEVALI, 2009; RENNER, 2014; PEDROSO-DE-MORAIS et al. 2016). Apenas as características das flores masculinas (estaminadas) são utilizadas para diferenciar as espécies, devido à sua excepcional variação na morfologia floral. Elas são caracterizadas pela presença de dois estaminódios modificados anteriores à coluna ou ginostêmio (WALKER-LARSEN; HARDER, 2000), denominados de "antenas". Os estaminódios têm a função de disparar o polinário contra o corpo do polinizador no momento da visita. As flores femininas (pistiladas) apresentam morfologia mais simples e uniforme. As formas intermediárias (hermafroditas) são raras e não possuem função reprodutiva, pois a cavidade estigmática é seca e o polinário não apresenta conexão entre as polínias e o estipe (ROMERO, 1992; GERLACH, 2007). Os diferentes tipos de flores podem ocorrer em um mesmo indivíduo ou, às vezes, na mesma inflorescência (ROMERO, 1992; GERLACH, 2007, 2013).

*Catasetum* é um gênero tradicionalmente citado como representante da síndrome euglossinófila. Suas flores não oferecem nenhum tipo de recurso alimentar aos seus polinizadores. Elas produzem apenas fragrâncias florais (óleos voláteis), que atuam como elemento de atração e recompensa aos seus polinizadores. Para isto, estas orquídeas aproveitam um comportamento pré-existente nas abelhas, produzindo um contexto de exploração sensorial (RAMÍREZ et al., 2011; SCHIESTL, 2015). As fragrâncias são produzidas no labelo, em estruturas glandulares chamadas osmóforos (VOGEL, 1962, 1963). Este recurso é coletado exclusivamente por machos de abelhas Euglossini (Hymenoptera, Apidae), cuja visita às flores consiste em ciclos de coleta e vôo (e.g., DRESSLER, 1982; HOLLAND, 2015). Ao pousar na flor, a abelha secreta lipídeos de sua glândula cefálica labial na superfície do osmóforo, que agem como solventes não-polares para os compostos voláteis (ELTZ et al., 2007). Esta mistura é coletada através da escovação com um pente de pêlos que estas abelhas possuem nos tarsos de suas pernas anteriores. A abelha então voa, planando próximo à flor, e faz uma série de movimentos complexos com as pernas, durante os quais as fragrâncias são transferidas e armazenadas nos órgãos esponjosos presentes nas tíbias de suas

pernas posteriores (KIMSEY, 1984). A distribuição do tecido secretor no labelo deve direcionar o posicionamento da abelha para a coleta da fragrância, garantindo a deposição correta do polinário no corpo da abelha e/ou deposição das políneas no estigma da flor. Para que este processo seja viável, o polinizador precisa ser compatível com a flor, em tamanho e forma (DRESSLER, 1968).

As fragrâncias florais de *Catasetum* são consideradas parte fundamental no mecanismo de isolamento reprodutivo entre espécies simpátricas (HILLS; WILLIAMS; DODSON, 1972). A composição dos aromas consiste na mistura de substâncias com ação atrativa em diferentes proporções que são detectadas mesmo em diminutas quantidades pelos machos de euglossine, estimulando a visita de espécies particulares de abelhas (WILLIAMS; DODSON, 1972; WILLIAMS; WHITTEN, 1983). Assim, elas atraem seletivamente um ou poucos visitantes que, em sinergia com os demais filtros florais (i.e., características morfológicas), atuam como polinizadores efetivos. As fragrâncias coletadas são acumuladas ao longo da vida da abelha em seu órgão tibial, formando aromas complexos que são utilizados como pré-requisito básico para reconhecimento e seleção sexual pelas fêmeas durante a corte (ELTZ et al., 1999; ELTZ, ROUBIK; LUNAU, 2005; ZIMMERMANN; RAMÍREZ; ELTZ, 2009). A visita discriminatória baseada na fragrância floral tem importantes implicações no sucesso reprodutivo destas plantas (e.g., WILLIAMS; WHITTEN, 1983).

Estudos sobre evolução dos recursos florais e sistemas de polinização estão em expansão (e.g., COZZOLINO; WIDMER, 2005). A especialização dos mecanismos de polinização e estratégias reprodutivas em orquídeas têm como consequência um cenário muito rico para o estudo de padrões evolutivos. A combinação dos resultados dos estudos filogenéticos, morfo-anatômicos e de fragrâncias florais produziu um entendimento mais amplo das relações evolutivas entre as espécies de *Catasetum*. Estes estudos também podem ser importantes para a taxonomia do grupo, ajudando a diferenciar e caracterizar as espécies.

## **2. ANÁLISES FILOGENÉTICAS**



## 2.1 INTRODUÇÃO

Catsetinae inclui oito gêneros exclusivamente Neotropicais: *Catsetum*, *Clowesia*, *Cyanaeorchis*, *Cycnoches*, *Dressleria*, *Galeandra*, *Grobya* e *Mormodes* (e.g., BATISTA et al., 2014; PÉREZ-ESCOBAR et al., 2016). *Catsetum* Rich. ex Kunth é o maior gênero da sub-tribo Catsetinae, com aproximadamente 130 espécies distribuídas do México ao sul do Brasil e Argentina (ROMERO; CARNEVALI, 2009). Este gênero é amplamente conhecido por oferecer fragrâncias florais como recurso, que é coletado exclusivamente por machos de abelhas euglossine (e.g., van der PIJL; DODSON, 1966). Os compostos odoríferos são volatilizados e atuam na atração e recompensa para os machos destas abelhas (DODSON et al., 1969; HILLS; WILLIAMS; DODSON, 1972; GERLACH; SCHILL, 1991). Durante a coleta da fragrância, as abelhas acidentalmente tocam os estaminódios modificados das flores maculinas de *Catsetum* e o polinário é ejetado sobre seu corpo. Quando uma abelha carregando um polinário visita uma flor feminina (pistilada), as polínias são depositadas passivamente em sua cavidade estigmática (DODSON, 1962). Esse nível de especialização no mecanismo de polinização possibilita a existência de uma diversidade floral extremamente alta para o gênero (e.g. van der CINGEL, 2001), como mostrado na Figura 1.

Devido às flores de *Catsetum* serem unissexuais e as descrições das espécies serem frequentemente baseadas somente em flores masculinas, a sistemática deste gênero tem sido confusa desde sua criação em 1822 por Kunth. Após décadas de descrições de novas espécies, a primeira classificação infragenérica para este gênero foi proposta por Rolfe (1891). Este autor propôs quatro seções: *Eucatsetum*, *Myanthus*, *Ecirrhosae* e *Pseudocatsetum*. Entretanto, a delimitação de cada seção não era clara. Mansfeld (1932a, 1932b) propôs uma divisão mais compreensível, onde *Catsetum* foi segregado em dois subgêneros: *Clowesia* (= *Ecirrhosae* Rolfe) e *Orthocatsetum*. Este último dividido em duas seções baseadas nas características dos estaminódios (i.e., antenas): *Pseudocatsetum* com estaminódios rudimentares e *Meizocatsetum* (= *Eucatsetum* + *Myanthus* Rolfe) com estaminódios evidentes. *Meizocatsetum* foi dividido em duas subseções: Isoceras (com estaminódios simétricos) e Anisoceras (com estaminódios assimétricos). Dodson (1975) segregou *Clowesia* Mansf. em dois gêneros: *Clowesia* e *Dressleria*. Bicalho e Barros (1988) propuseram três subseções (Isoceras, Convergentes e Divaricatae), que incluíam 11 alianças, para a subseção Isoceras Mansf. Finalmente, Senghas (1990, 1991) propôs uma nova classificação infragenérica para *Catsetum*, na qual *Pseudocatsetum* e *Catsetum* são tratados como subgêneros. Este último com duas seções: Anisoceras e Isoceras. Historicamente, apenas três

estudos inferiram os relacionamentos evolutivos entre as espécies de *Catasetum*. Romero (1990) sugeriu *Pseudocatasetum* como clado-irmão das demais espécies do gênero. Oliveira et al. (2010) não apresentaram resultados conclusivos devido ao baixo suporte dos 10 clados observados em *Catasetum*. Fulop (2009) obteve fortes incongruências entre as quatro regiões do DNA analisadas e não foi possível resolver os relacionamentos entre as diversas espécies de *Catasetum*.

A baixa taxa de mutação observada para as regiões de DNA (principalmente plastidial) comumente utilizadas em estudos filogenéticos infragenéricos tem criado dificuldades para acessar os relacionamentos com alto suporte (e.g., WHITTEN et al., 2007; CHASE et al., 2009; CHIRON et al., 2009; NEUBIG et al., 2009; SALAZAR et al., 2016). Considerando isto, o presente trabalho produziu hipóteses filogenéticas baseadas em dados moleculares (sequências de DNA nuclear e plastidial), reconstruindo a história evolutiva entre as espécies de *Catasetum* com a melhor resolução possível. A hipótese recuperada foi utilizada para avaliar a distribuição das características morfológicas que foram previamente utilizadas para delimitar as classificações infragenéricas.



Figura 1 - Diversidade morfológica floral em *Catasetum*: A, Flor masculina de *Catasetum gardneri* Schltr. (subgênero *Pseudocatasetum*). B, Flor masculina de *Catasetum longifolium* Lindl. (subgênero *Pseudocatasetum*). C, Flor masculina de *Catasetum expansum* Rchb.f. (subgênero *Catasetum*, seção Anisoceras). D, Detalhe dos estaminódios assimétricos em flor masculina de *Catasetum gnomus* Linden & Rchb.f. (seção Anisoceras). E, Flor masculina de *Catasetum osakadianum* Silva & Oliveira (subgênero *Catasetum*, seção Isoceras, subseção Isoceras). F, Flor masculina de *Catasetum carolinianum* Miranda & Lacerda (subseção Isoceras). G, Detalhe dos estaminódios simétricos em flor masculina de *Catasetum boyi* Mansf. (subseção Isoceras). H, Flor masculina de *Catasetum ferox* Kraenzl. (subgênero *Catasetum*, seção Isoceras, subseção Divaricatae). I, Flor masculina de *Catasetum hopkinsonianum* Carr & Castro (subseção Divaricatae). J, Flor masculina de *Catasetum dupliciscutulatum* Senghas (subseção Divaricatae). K, Flor masculina de *Catasetum tigrinum* Rchb.f. (subgênero *Catasetum*, seção Isoceras, subseção Convergentes). L, Flor masculina de *Catasetum pulchrum* N.E.Brown (subseção Convergentes). M, Flores femininas de *Catasetum aff. ciliatum* (subgênero *Pseudocatasetum*). N, Flores femininas de *Catasetum saccatum* Lindl. (seção Anisoceras). O, Flores femininas de *Catasetum rivularium* Barb.Rodr. (subseção Isoceras). P, Flor feminina de *Catasetum spitzii* Hoehne (subseção incerta). Q, Vista frontal da flor feminina de *Catasetum fimbriatum* (Morren) Lindl. (subseção Convergentes). R, Vista lateral da flor feminina de *C. fimbriatum*. S, Flores hermafroditas de *Catasetum barbatum* (Lindl.) Lindl. (subseção Isoceras). Fotografias (B, E, F, G, J and P) são cortesia de Juan F. Gómez; todas as demais produzidas por Evelyn P. Franken.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Amostragem

Material fresco e seco (folhas) de 80 espécies de *Catasetum* foi utilizado na extração, amplificação e análise filogenética. As espécies foram selecionadas visando abranger toda a diversidade morfológica do gênero, compreendendo exemplares de todos os subgêneros, seções, subseções e alianças (exceto aliança *C. microglossum*). Para *C. ciliatum*, foram amostrados exemplares de duas localidades diferentes (AM e PA), por entendermos tratar-se de espécies distintas. Amostras dos demais gêneros de Catasetinae (24 amostras) e uma espécie de Cyrtopodiinae foram utilizadas como grupo externo para polarização de caracteres. As amostras frescas foram provenientes de indivíduos mantidos em cultivo no Orquidário do Laboratório de Biologia Molecular e Biosistemática de Plantas (FFCLRP/USP) em Ribeirão Preto-SP, Brasil. As amostras secas foram provenientes de orquidários particulares. Na Tabela 1 estão listadas as espécies amostradas, classificação infragenérica tradicional, demais características morfológicas, procedência e número do voucher.

Tabela 1 - Espécies analisadas, subgênero - SG (1 - *Pseudocatasetum*, 2 - *Catasetum*), seção - S (1 - Anisoceras, 2 - Isoceras), subseção - SS (1 - Isoceras, 2 - Convergentes, 3 - Divaricatae), hábito - H (1 - epífita, 2 - terrícola), período de floração - PF (1 - início do brotamento do pseudobulbo, 2 - final do brotamento ou maturação), posição da haste floral - HF (1 - ereta, 2 - arqueada, 3 - pendente), distribuição dos botões na haste floral - DB (1 - laxa, 2 - congesta), ressupinamento da flor masculina - R (1 - ressupinada, 2 - não-ressupinada), procedência e número do voucher. \* Material seco proveniente de orquidários particulares.

Espécies	SG	S	SS	H	PF	HF	DB	R	Locality	Voucher
<i>Catasetum aculeatum</i> Miranda & Lacerda*	2	2	?	1	?	2	1	1	RO	0
<i>Catasetum albovirens</i> Barb.Rodr.	2	2	2	1	1	1	1	2	PA	960
<i>Catasetum arietinum</i> Miranda & Lacerda	2	2	1	1	2	2	2	1	PE	844
<i>Catasetum ariquemense</i> Miranda & Lacerda	2	2	1	1	2	2	1	1	RO	924
<i>Catasetum atratum</i> Lindl.	2	2	3	1	1	2	1	2	SC	897
<i>Catasetum barbatum</i> (Lindl.) Lindl.	2	2	1	1	2	2	1	1	AM	952
<i>Catasetum bicolor</i> Klotzsch	2	2	1	1	1	3	1	1	oc	971
<i>Catasetum blackii</i> Pabst	2	2	1	1	1	2	1	1	oc	942
<i>Catasetum boyi</i> Mansf.	2	2	1	1	1	2	1	1	RO	925
<i>Catasetum callosum</i> Lindl.	2	2	?	1	2	2	1	1	oc	926
<i>Catasetum carolinianum</i> Miranda & Lacerda	2	2	1	1	2	2	1	1	GO	946
<i>Catasetum cernuum</i> (Lindl.) Rchb.f.	2	2	3	1	1	2	1	1	SP	564
<i>Catasetum ciliatum</i> Barb.Rodr.	1	0	0	1	2	1	1	2	PA	962
<i>Catasetum aff. ciliatum</i>	1	0	0	2	2	1	1	2	AM	516
<i>Catasetum cirrhaeoides</i> Hoehne	2	2	2	1	2	3	2	1	oc	935

<i>Catasetum complanatum</i> Miranda & Lacerda	2	2	2	1	2	3	1	1	RO	947
<i>Catasetum confusum</i> Romero	2	2	3	1	2	2	1	2	TO	836
<i>Catasetum cristatum</i> Lindl.	2	2	1	1	2	2	1	1	oc	990
<i>Catasetum denticulatum</i> Miranda	2	2	2	1	1	3	2	1	RO	949
<i>Catasetum discolor</i> (Lindl.) Lindl.	1	0	0	2	2	1	1	2	PA	814
<i>Catasetum dupliciscutulatum</i> Senghas	2	2	3	1	1	3	1	1	AC	809
<i>Catasetum expansum</i> Rchb.f.	2	1	0	1	2	2	1	1	oc	823
<i>Catasetum ferox</i> Kraenzl.	2	2	3	1	2	2	1	2	RO	930
<i>Catasetum fimbriatum</i> (Morren) Lindl.	2	2	2	1	2	2	1	1	SP	303
<i>Catasetum franchinianum</i> Lacerda*	2	2	1	1	2	2	1	1	GO	0
<i>Catasetum fuchsii</i> Dodson & Vásquez	2	2	2	1	2	1	1	1	TO	835
<i>Catasetum galeritum</i> Rchb.f.	2	2	3	1	2	1	1	2	MT	906
<i>Catasetum gardneri</i> Schltr.	1	0	0	2	2	1	1	2	PE	845
<i>Catasetum garnettianum</i> Rolfe*	2	2	1	1	2	2	1	1	AM	0
<i>Catasetum gladiatorium</i> Lacerda	2	2	1	1	2	2	1	1	GO	900
<i>Catasetum gnomus</i> Linden & Rchb.f.	2	1	0	1	2	1	1	2	AM	827
<i>Catasetum hookeri</i> Lindl.	2	2	3	1	1	1	1	2	MG	944
<i>Catasetum hopkinsonianum</i> Carr & Castro	2	2	3	1	2	2	1	2	RO	922
<i>Catasetum incurvum</i> Klotzsch	2	1	0	1	1	2	1	1	oc	938
<i>Catasetum integerrimum</i> Hook.	2	1	0	1	2	1	1	2	oc	899
<i>Catasetum juruenensis</i> Hoehne	2	2	2	1	2	2	1	1	RO	921
<i>Catasetum kleberianum</i> Braga	2	2	?	1	2	2	1	1	oc	1016
<i>Catasetum kraenzlinianum</i> Mansf.*	2	2	2	1	2	3	1	1	RO	0
<i>Catasetum labiatum</i> Barb.Rodr.	2	2	3	1	2	2	1	1	BA	910
<i>Catasetum laminatum</i> Lindl.*	2	1	0	1	2	1	1	1	oc	0
<i>Catasetum lanciferum</i> Lindl.	2	2	1	1	2	2	1	1	MG	943
<i>Catasetum longifolium</i> Lindl.	1	0	0	1	1	3	1	2	RO	928
<i>Catasetum lucis</i> Ortiz & Arango*	2	2	3	2	2	1	1	1	Colômbia	0
<i>Catasetum luridum</i> (Link) Lindl.	2	2	3	1	2	2	1	1	RJ	898
<i>Catasetum macrocarpum</i> Rich. ex Kunth	2	1	0	1	2	1	1	2	PA	819
<i>Catasetum macroglossum</i> Rchb.f.	2	1	0	1	2	1	1	2	oc	822
<i>Catasetum maculatum</i> Kunth	2	1	0	1	2	1	1	2	oc	972
<i>Catasetum maranhense</i> Lacerda & Silva	2	2	3	1	2	2	1	1	MA	951
<i>Catasetum matogrossense</i> Bicalho	2	2	2	1	2	1	1	2	MT	934
<i>Catasetum mattosianum</i> Bicalho	2	2	3	1	2	1	2	2	ES	305
<i>Catasetum multifidum</i> Miranda	2	2	1	1	2	2	1	1	PA	818
<i>Catasetum multifissum</i> Senghas	2	2	1	1	2	2	1	1	RO	916
<i>Catasetum ochraceum</i> Lindl.	2	2	3	2	1	1	1	1	oc	939
<i>Catasetum osakadianum</i> Silva & Oliveira	2	2	1	1	1	2	1	1	RO	918
<i>Catasetum osculatum</i> Lacerda & Castro	2	1	0	1	2	2	1	1	RO	920
<i>Catasetum parguazense</i> Romero & Carnevali	2	2	?	1	1	2	1	1	RO	919
<i>Catasetum pendulum</i> Dodson	2	1	0	1	2	3	2	1	oc	1020
<i>Catasetum pileatum</i> Rchb.f.	2	1	0	1	2	2	1	1	oc	860
<i>Catasetum planiceps</i> Lindl.	2	2	3	2	2	1	1	2	oc	850
<i>Catasetum punctatum</i> Rolfe	2	2	3	1	1	1	1	2	MG	907
<i>Catasetum pulchrum</i> N.E.Brown	2	2	2	1	2	3	2	1	PA	964

<i>Catasetum purum</i> Nees & Sinning	2	2	3	1	2	1	1	2	BA	847
<i>Catasetum rivularium</i> Barb.Rodr.	2	2	1	1	2	2	2	1	AM	955
<i>Catasetum rodigasianum</i> Rolfe	2	2	3	1	1	2	1	1	oc	940
<i>Catasetum rolfeanum</i> Mansf.*	2	2	?	1	1	2	1	1	PA	0
<i>Catasetum rooseveltianum</i> Hoehne	2	2	3	1	2	1	1	2	MT	929
<i>Catasetum saccatum</i> Lindl.	2	1	0	1	2	2	1	1	AC	932
<i>Catasetum schmidtianum</i> Miranda & Lacerda	2	1	0	1	2	2	1	1	MT	948
<i>Catasetum schunkei</i> Dodson & D.E.Benn.	2	2	2	1	1	2	1	1	oc	970
<i>Catasetum semicirculatum</i> Miranda	2	2	1	1	2	2	1	1	RO	909
<i>Catasetum sacco</i> (Vell.) Hoehne	2	2	3	1	2	2	1	1	SP	936
<i>Catasetum spitzii</i> Hoehne	2	2	?	1	2	2	1	1	GO	905
<i>Catasetum stenoglossum</i> Pabst*	2	2	1	1	2	2	1	1	AM	0
<i>Catasetum tabulare</i> Lindl.	2	1	0	1	1	1	1	1	oc	969
<i>Catasetum tenebrosum</i> Kraenzl.	2	2	2	1	1	1	1	1	oc	967
<i>Catasetum tigrinum</i> Rchb.f.*	2	2	2	1	1	2	1	1	MT	0
<i>Catasetum triodon</i> Rchb.f.	2	2	3	1	?	2	1	1	SC	896
<i>Catasetum tuberculatum</i> Dodson*	2	2	1	1	2	2	1	1	oc	0
<i>Catasetum vinaceum</i> (Hoehne) Hoehne	2	2	3	1	2	2	1	1	oc	861
<i>Catasetum viridiflavum</i> Hook.	2	1	0	1	1	1	1	2	oc	933
<i>Clowesia rosea</i> Lindl.	-	-	-	-	-	-	-	-	oc	1017
<i>Clowesia russelliana</i> (Hook.) Dodson	-	-	-	-	-	-	-	-	oc	973
<i>Clowesia warczewiczii</i> (Lindl. & Paxton) Dodson	-	-	-	-	-	-	-	-	oc	857
<i>Cyanaeorchis arundinae</i> (Rchb.f.) Barb.Rodr.*	-	-	-	-	-	-	-	-	MG	0
<i>Cynoches cooperi</i> Rolfe	-	-	-	-	-	-	-	-	oc	848
<i>Cynoches egertonianum</i> Batem.	-	-	-	-	-	-	-	-	oc	858
<i>Cynoches haagii</i> Barb.Rodr.	-	-	-	-	-	-	-	-	MT	927
<i>Cynoches loddigesii</i> Lindl.	-	-	-	-	-	-	-	-	oc	859
<i>Cynoches pentadactylon</i> Lindl.	-	-	-	-	-	-	-	-	RO	895
<i>Cyrtopodium andersonii</i> (Lamb ex Andrews) R.Br.	-	-	-	-	-	-	-	-	PA	1256
<i>Dressleria eburnea</i> (Rolfe) Dodson	-	-	-	-	-	-	-	-	oc	974
<i>Galeandra blanchetii</i> E.S.Rand.	-	-	-	-	-	-	-	-	MA	893
<i>Galeandra devoniana</i> Schomb. ex Lindl.	-	-	-	-	-	-	-	-	AM	520
<i>Galeandra minax</i> Rchb.f.	-	-	-	-	-	-	-	-	RO	892
<i>Galeandra montana</i> Barb.Rodr.	-	-	-	-	-	-	-	-	SP	808
<i>Grobya amherstiae</i> Lindl.	-	-	-	-	-	-	-	-	SP	605
<i>Grobya fascifera</i> Rchb.f.	-	-	-	-	-	-	-	-	oc	621
<i>Grobya galeata</i> Lindl.	-	-	-	-	-	-	-	-	oc	482
<i>Mormodes aurantiacum</i> Schltr.	-	-	-	-	-	-	-	-	oc	480
<i>Mormodes castroi</i> Salazar*	-	-	-	-	-	-	-	-	RO	0
<i>Mormodes elegans</i> Miranda*	-	-	-	-	-	-	-	-	RO	0
<i>Mormodes paraensis</i> Salazar & da Silva	-	-	-	-	-	-	-	-	PA	825
<i>Mormodes sinuatum</i> Rchb.f. & Warm.	-	-	-	-	-	-	-	-	oc	856
<i>Mormodes tapoayense</i> Miranda & Lacerda	-	-	-	-	-	-	-	-	oc	1012
<i>Mormodes warszewiczii</i> Klotzsch	-	-	-	-	-	-	-	-	AC	975

### 2.2.2 Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

O DNA total de cada espécime foi extraído de fragmentos de folhas frescas ou secas (armazenadas em sílica-gel), seguindo a técnica de cetyl-trimethylammonium-bromide (CTAB) adaptada de Doyle e Doyle (1987). Neste protocolo, os tecidos foram macerados diretamente em 1,5 ml de solução de CTAB e 10 µl de β-mercaptoetanol usando um almofariz. As amostras foram incubadas em banho-maria por uma hora. Após este período, foi adicionado clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1 e as amostras foram centrifugadas durante 5 min a 10.000 rpm. Após a centrifugação, a solução aquosa sobrenadante foi isolada. Adicionou-se isopropanol 100% e acetato de sódio 3M para precipitação do DNA. Após três dias a -20°C centrifugou-se novamente e o sobrenadante foi descartado. O precipitado resultante foi lavado duas vezes em álcool 70%, desidratado e ressuspendido em solução tampão TE por 30 min em banho-maria.

As amplificações foram conduzidas utilizando 50µL de solução de PCR + DNA diluído, contendo os seguintes reagentes: água MilliQ, betaína 5 M, buffer 10x, cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), dNTP mix e primers (forward e reverse). Os primers *ITS* (17SE/26SE; espaçador intergênico contendo as regiões ITS1, 5.8S e ITS2) do DNA nuclear (SUN et al., 1994), *rpS16* (*rpsF/rpsR2*; íntron) e *tnrL-F* (TAB-C/TAB-F; espaçador intergênico) do DNA plastidial (TABERLET et al., 1991; OXELMAN; LIDÉN; BERGLUND, 1997) foram utilizados nas reações de amplificação e sequenciamento. Após um período de 10 min de desnaturação a 99 °C no termociclador, a *Taq* DNA polimerase foi adicionada à solução de PCR a 80 °C. Foram realizados 35 ciclos com a seguinte programação: desnaturação por 30 s a 94 °C, anelamento por 30 s a 64 °C (*ITS*), 52 °C (*rpS16*) ou 56 °C (*tnrL-F*), extensão por 45 s a 72 °C; e extensão final por 3 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram purificados utilizando as colunas de PCR do tipo GFX<sup>TM</sup> (GE Health Care) de acordo com o protocolo do fabricante e estocados em freezer a -20 °C. As reações de sequenciamento foram preparadas utilizando Big Dye 3.1 (ABI), os produtos de PCR purificados e os primers mencionados acima. No termociclador, foram realizados 25 ciclos com a seguinte programação: 10 s a 96 °C, 5 s a 50 °C e 4 min a 60 °C. As amostras foram precipitadas com isopropanol 75%, desidratadas e enviadas para o sequenciamento no Departamento de Produção Vegetal da UNESP de Jaboticabal-SP. As sequências foram obtidas a partir de sequenciador automático de DNA da Applied Biosystems - modelo 3100. Os dados das sequências obtidas foram alinhados utilizando o software MAFFT versão 7 (KATO; STANDLEY, 2013). As

correções subsequentes foram realizadas manualmente, utilizando o programa BioEdit versão 5.0.9.

### 2.2.3 Análises filogenéticas

As análises por máxima parsimônia (MP) foram realizadas no programa PAUP versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2003). As buscas heurísticas foram conduzidas para as matrizes individuais de cada região (*ITS*, *rpS16* e *trnL-F*), dados concatenados do DNA plastidial (*rpS16* + *trnL-F*) e dados concatenados do DNA total (*ITS* + *rpS16* + *trnL-F*). A estratégia de busca consistiu em 1.000 réplicas de adição randômica de táxons, com múltiplas árvores salvas (MULTREES) e tree-bisection-reconnection (TBR) como algoritmo de permutação de ramos, fixando 10 árvores por réplica e salvando todas as árvores mais curtas. Os níveis de suporte para os cladogramas foram acessados através de bootstrap (BS), usando 1.000 réplicas para a estimativa (FELSENSTEIN, 1985). As porcentagens de BS foram categorizadas: valores abaixo de 50% foram considerados sem suporte e não foram projetados nos ramos da árvore de consenso, entre 50-70% com baixo suporte, 71-85% moderado e acima de 85% forte.

As análises por máxima verossimilhança (MV) foram realizadas no programa Garli versão 2.0 (ZWICKL, 2006). As buscas heurísticas foram conduzidas para as matrizes individuais de cada região (*ITS*, *rpS16* e *trnL-F*), dados concatenados do DNA plastidial (*rpS16* + *trnL-F*) e dados concatenados do DNA total (*ITS* + *rpS16* + *trnL-F*). A seleção do melhor modelo de substituição de nucleotídeos foi realizada no programa jModelTest 2.1.5 (DARRIBA et al., 2012). Dentre os 40 modelos disponíveis, os modelos evolutivos selecionados seguiram o Critério de Informação Akaike (AIC). A estratégia de busca consistiu em 5 séries de busca heurística com o padrão do programa para a recuperação da melhor topologia. Os valores de suporte (BS) foram acessados através de 200 séries não-paramétricas para a estimativa. As topologias foram acessadas no software PAUP 4.0 para gerar a árvore de consenso de regras majoritárias e obter os valores de BS. Foram utilizadas as mesmas categorias de valores para a avaliação dos valores de BS.

A análise por inferência bayesiana (IB) foi realizada no programa MrBayes versão 3.2.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003). A matriz de dados concatenados foi particionada em três categorias (*ITS*, *rpS16* e *trnL-F*), cujo modelo ótimo de evolução das sequências para cada categoria foi selecionado utilizando o programa jModeltest versão 2.1.5 (DARRIBA et al., 2012). Os modelos evolutivos selecionados seguiram o Critério de Informação Bayesiano (BIC). Quatro cadeias de Markov foram processadas simultaneamente



para três milhões de gerações e os parâmetros amostrados a cada 100 gerações. A árvore de consenso foi calculada após a remoção das primeiras 3.000 árvores, que foram consideradas como “burn-in”. Apenas os valores de probabilidade posterior (PP) acima de 50% foram projetados nos ramos da árvore de consenso.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Características gerais das matrizes

As características gerais das matrizes e modelos selecionados estão listadas nas Tabelas 2 e 3. A matriz mais variável foi *ITS* (DNA nuclear), seguida por *rpS16* e *trnL-F* (DNA plastidial), respectivamente. Em termos de qualidade de informação, os índices de consistência (IC) e retenção (IR) para as matrizes individuais das regiões do DNA plastidial (*rpS16* e *trnL-F*) tiveram resultados semelhantes e levemente melhores que a matriz do DNA nuclear (*ITS*). Foi possível recuperar os relacionamentos com alto suporte para algumas das espécies analisadas, observando o agrupamento da maioria das espécies em politomias. Nas análises individuais, cladogramas com alto suporte foram recuperados apenas para *ITS*, cuja árvore de consenso restrito apresentou melhor resolução. O DNA plastidial gerou somente relações com nenhum a moderado suporte. Nas análises combinadas, a análise de MV recuperou a árvore de consenso melhor resolvida, porém com menores valores de BS. Na análise de IB, a resolução foi menor, mas foram obtidos os melhores valores de suporte. As análises de MP recuperaram poucos relacionamentos e foram apresentadas apenas como figuras. Todas as análises recuperaram o monofiletismo para *Catasetum* com alto suporte e *Clowesia* como seu clado irmão. Entretanto, a organização dos relacionamentos entre os grupos externos diferiu entre as três regiões individuais. Não encontramos evidências de monofiletismo para as divisões e subdivisões infragenéricas tradicionalmente propostas para *Catasetum*, nem para as demais características morfológicas listadas na Tabela 1.

Tabela 2 - Parâmetros para a análise de máxima parsimônia das matrizes de sequências nucleotídicas das regiões individuais (*ITS*, *rpS16* e *trnL-F*) e combinadas (DNA plastidial e total) neste estudo.

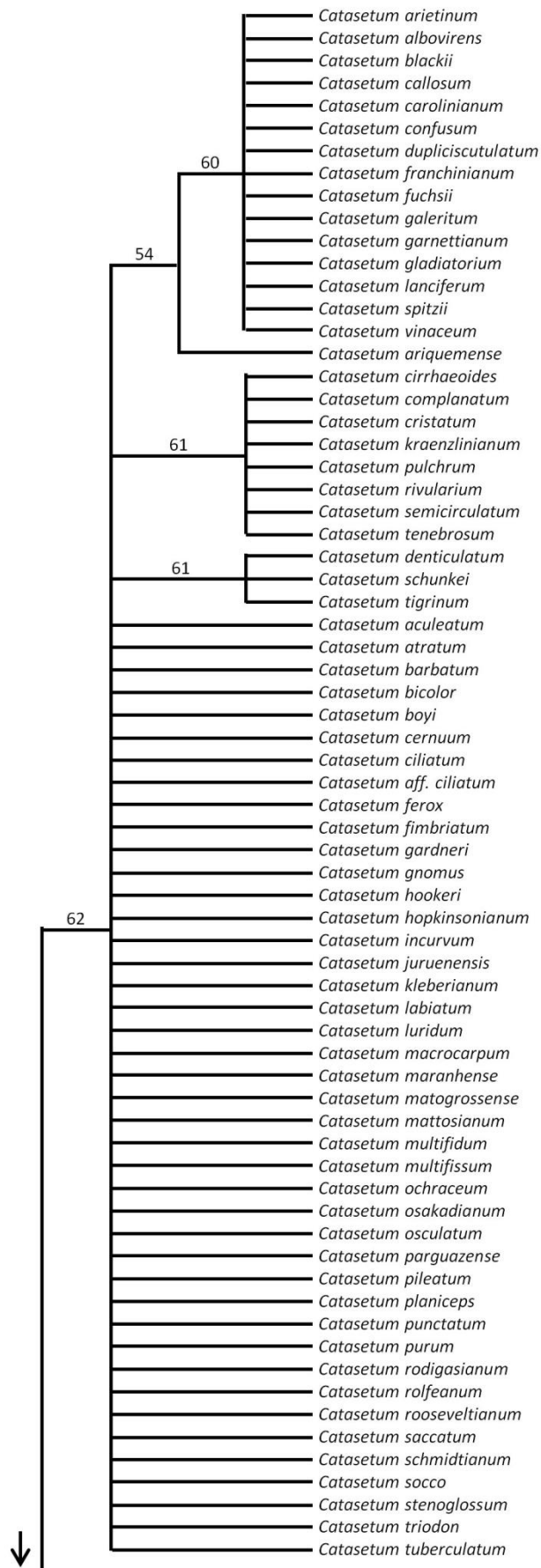
<b>Parâmetros</b>	<b><i>ITS</i></b>	<b><i>rpS16</i></b>	<b><i>trnL-F</i></b>	<b>Plastidial</b>	<b>Total</b>
Número de táxons analisados	105	105	91	91	91
Comprimento alinhado (pb)	627	709	1221	1930	2557
Número de caracteres constantes	343	575	1078	1671	2034
Caracteres variáveis não-informativos (%)	112 (17,9)	68 (9,6)	78 (6,4)	149 (7,7)	270 (10,6)
Caracteres potencialmente informativos (%)	172 (27,4)	66 (9,3)	65 (5,3)	110 (5,7)	253 (9,9)
Número de árvores mais parsimoniosas	7	10	21	23	38
Número de passos	490	171	183	332	781
Índice de consistência (CI)	0.7265	0.8655	0.8962	0.8584	0.7836
Índice de retenção (RI)	0.9046	0.9538	0.9393	0.9123	0.8687

Tabela 3 - Parâmetros para as análises de máxima verossimilhança e inferência bayesiana das matrizes de sequências nucleotídicas das regiões individuais (*ITS*, *rpS16* e *trnL-F*) e combinadas (DNA plastidial e total) neste estudo.

<b>Parâmetros</b>	<b><i>ITS</i></b>	<b><i>rpS16</i></b>	<b><i>trnL-F</i></b>	<b>Plastidial</b>	<b>Total</b>
Número de táxons analisados	105	105	91	91	91
Melhor modelo selecionado - AIC	GTR + G	GTR + G	GTR + G	GTR + G	GTR + G
Melhor modelo selecionado - BIC	GTR + G	GTR + I + G	GTR + I + G	-	-
Frequência de adenina	0.2086	0.4330	0.3978	0.4094	0.3594
Frequência de citosina	0.2688	0.1181	0.1112	0.1162	0.1532
Frequência de guanina	0.3312	0.1499	0.1383	0.1444	0.1937
Frequência de timina	0.1915	0.2990	0.3527	0.3299	0.2937
Valor- $\alpha$ da distribuição gama	0.6770	0.7040	0.2360	0.3170	0.3500
Valor de -lnL	3348.5383	1955.9278	2687.7578	4517.8456	8011.4848

### 2.3.2 Análises individuais

*ITS* - A matriz gerada para a região *ITS* foi a mais informativa, com 27,4% de caracteres potencialmente informativos. As sequências variaram de 588 a 612 pares de bases. *Catasetum* foi monofilético e irmão de *Clowesia*, ambos com alto suporte. Quatro dicotomias foram recuperadas na árvore de consenso restrito (Figuras 2 e 3). O clado basal (*C. viridiflavum* - *C. macroglossum*) apresentou alto suporte e incluiu espécies do México, América Central, Colômbia e Equador. As subdivisões para este grupo obtiveram baixo suporte. O segundo clado (*C. longifolium* + *C. discolor* + *C. lucis*) teve alto suporte e incluiu duas espécies amplamente distribuídas na Amazônia e uma espécie endêmica para a Colômbia (Amazônia Andina). O terceiro clado (*C. ciliatum* - *C. planiceps*) incluiu três espécies amazônicas. O quarto clado (*C. cirrhaeoides* - *C. triodon*), que incluiu a maioria das espécies, todas da América do Sul (biomas Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado), não obteve suporte. Este clado apresentou subdivisões com baixo ou nenhum suporte. O restante dos relacionamentos colapsou em uma politomia contendo 20 espécies.



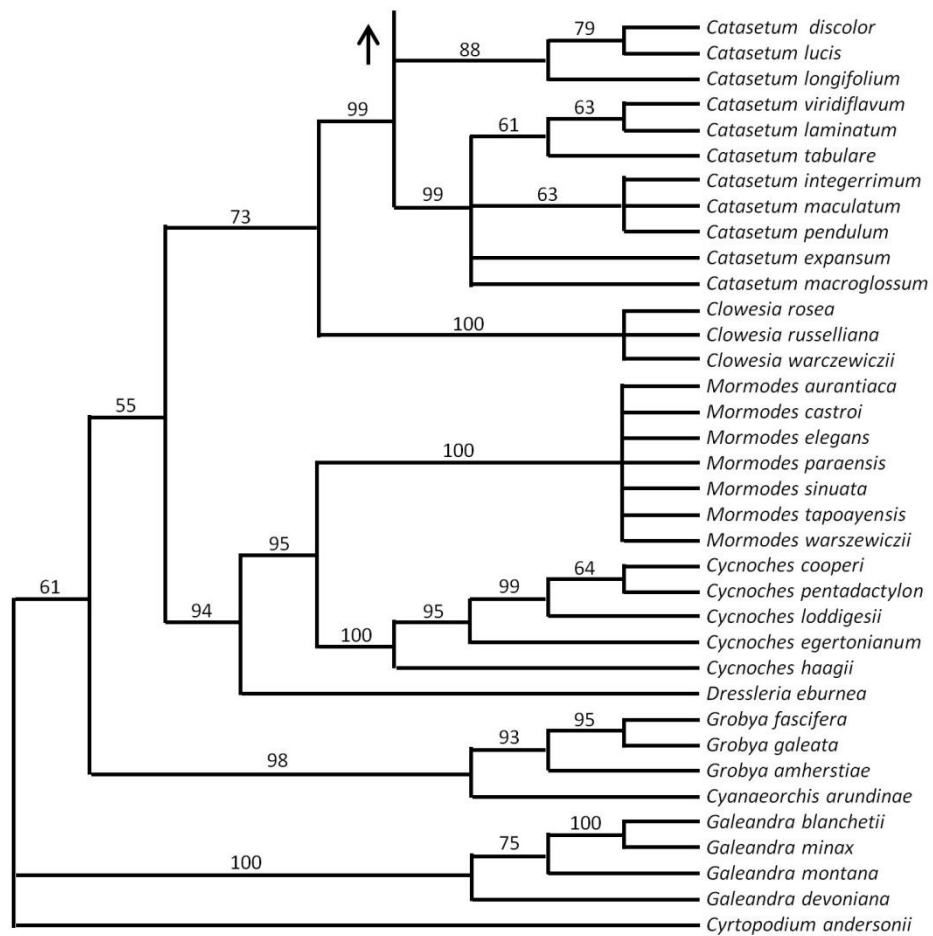
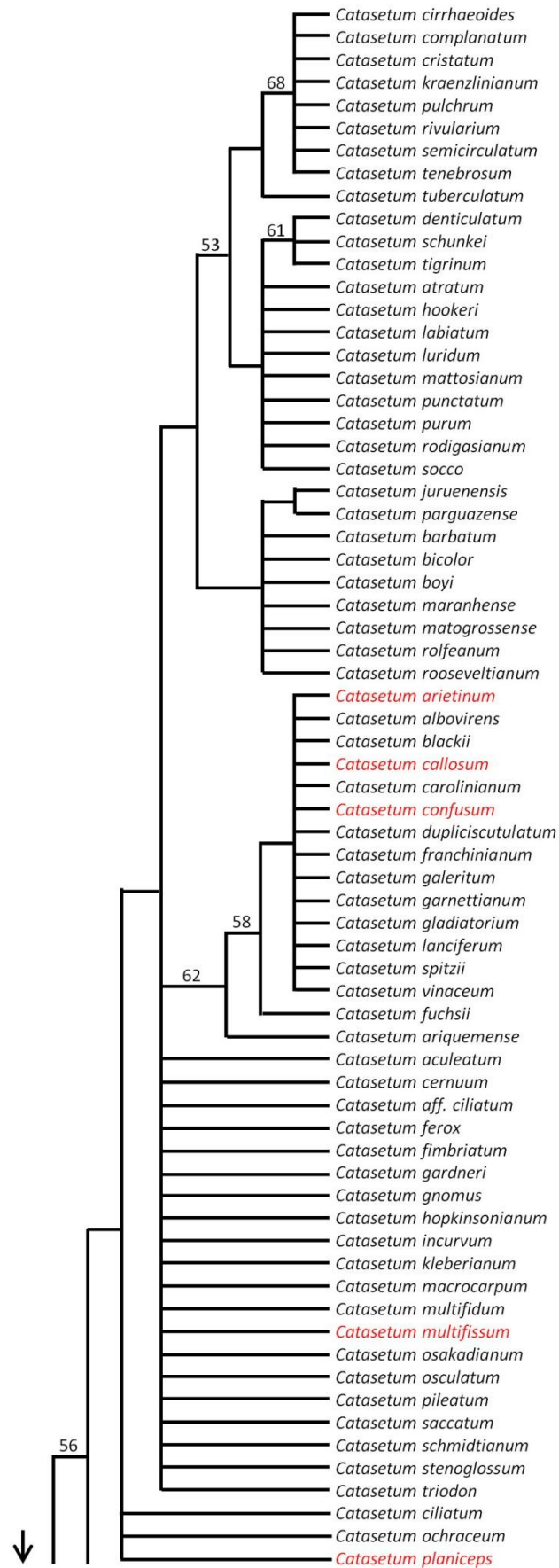


Figura 2 - Árvore de consenso restrito baseada na análise de máxima parsimônia dos fragmentos isolados para a região *ITS* (DNA nuclear). Valores de bootstrap  $\geq 50\%$  mostrados acima dos ramos.



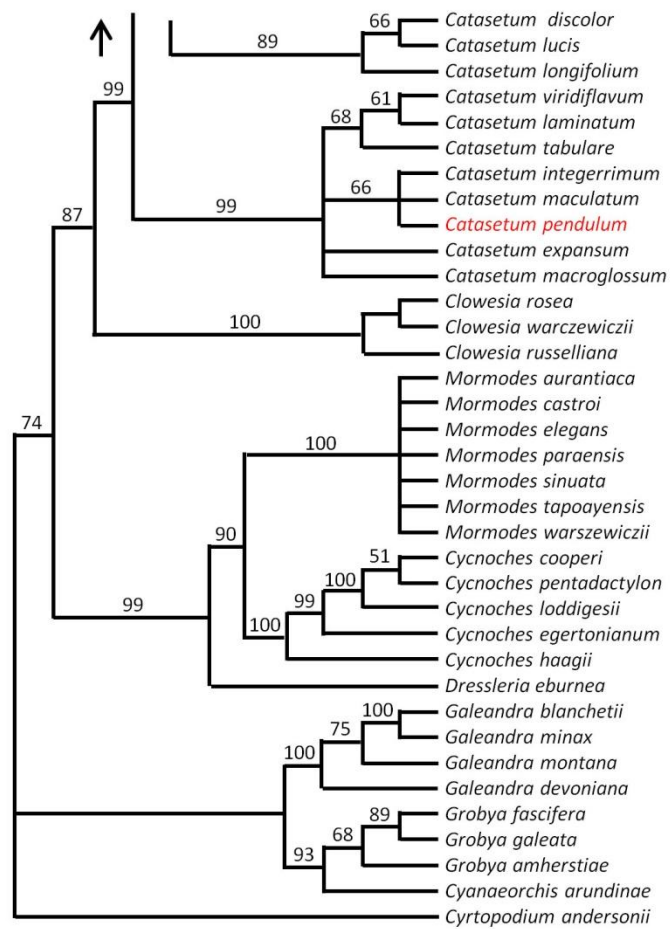
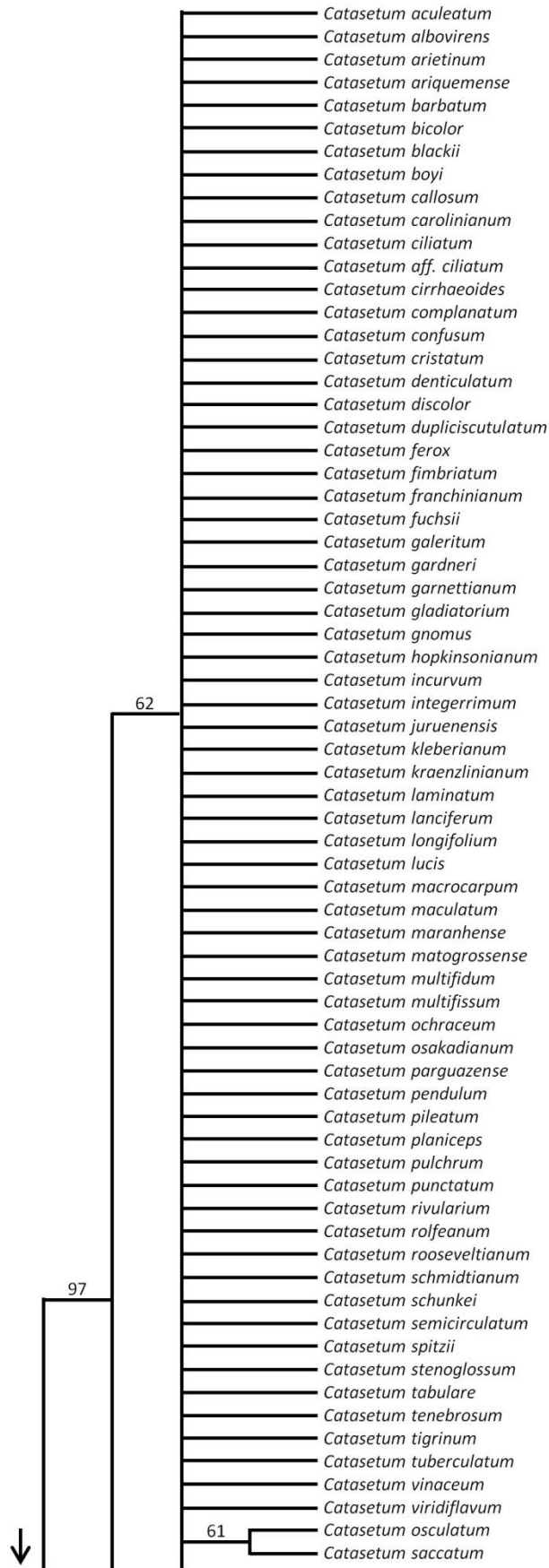


Figura 3 - Árvore de consenso restrito baseada na análise de máxima verossimilhança dos fragmentos isolados para a região *ITS* (DNA nuclear). Valores de bootstrap  $\geq 50\%$  mostrados acima dos ramos. Espécies com posicionamento distinto entre as diferentes regiões analisadas em vermelho.

*rpS16* - A matriz gerada para a região *rpS16* não foi a menos informativa (9,3% de caracteres potencialmente informativos), mas apresentou a menor resolução para *Catasetum*. As sequências variaram de 563 a 635 pares de bases. Nessa região também houve a confirmação com alto suporte do monofiletismo de *Catasetum* e sua posição como grupo-irmão de *Clowesia*. A topologia da árvore de consenso apresentou quatro dicotomias, porém as espécies destes clados colapsaram em politomias. Os poucos relacionamentos recuperados obtiveram baixo suporte. A politomia basal (*C. atratum* - *C. triodon*) apresentou 10 espécies do bioma Mata Atlântica (litoral da América do Sul). A segunda politomia (*C. arietinum* - *C. viridiflavum*) apresentou 7 espécies, sendo 4 espécies do México e América Central (*C. integerrimum*, *C. maculatum*, *C. pendulum* e *C. viridiflavum*), uma espécie do Cerrado (*C. arietinum*), uma espécie da Amazônia (*C. multifissum*) e uma espécie da Mata Atlântica (*C. punctatum*). Os três últimos biomas pertencem à América do Sul. A terceira dicotomia foi composta apenas por *C. tabulare* (espécie colombiana). A politomia terminal (*C. expansum* - *C. vinaceum*) apresentou 62 espécies e duas sub-divisões com baixo suporte, onde todas as espécies distribuem-se pelos diversos biomas da América do Sul.





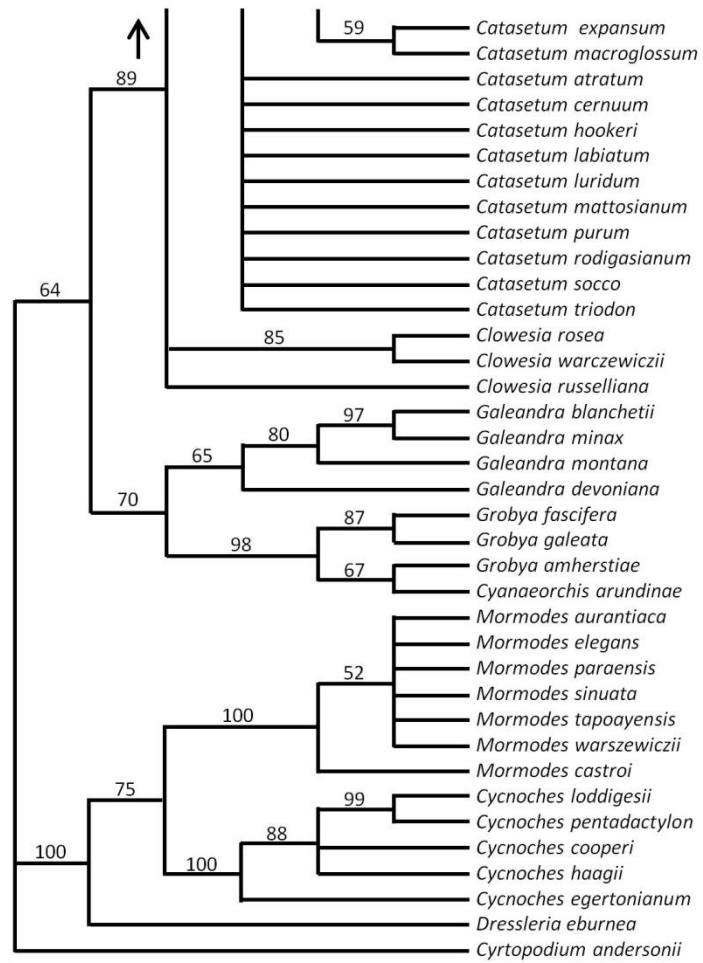
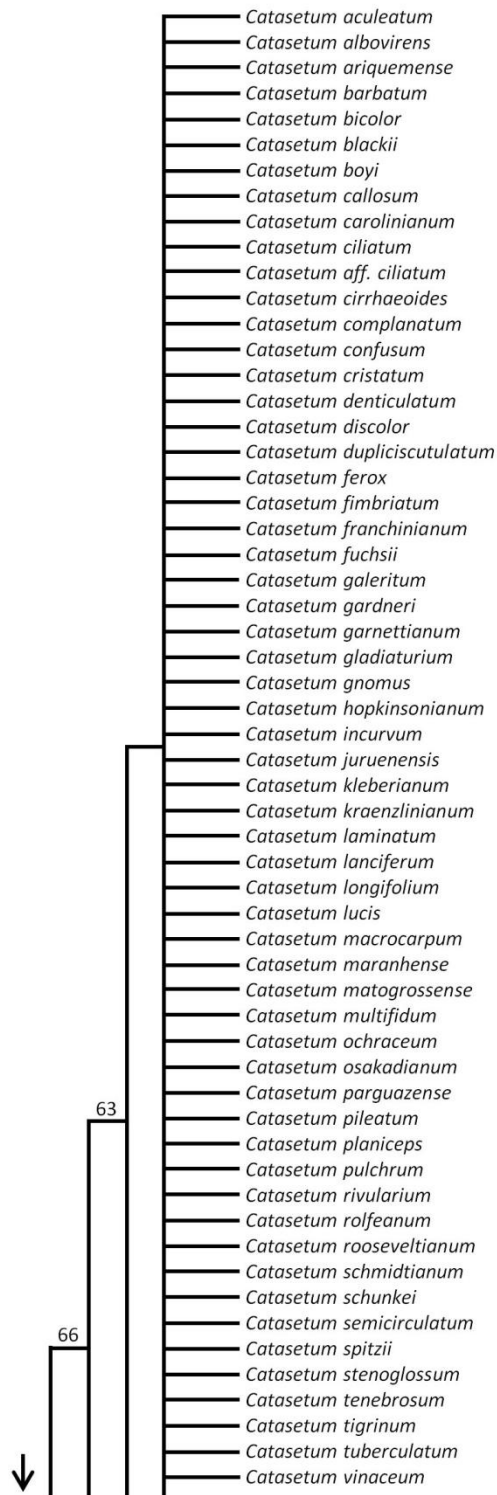


Figura 4 - Árvore de consenso restrito baseada na análise de máxima parsimônia dos fragmentos isolados para a região *rpS16* (DNA plastidial). Valores de bootstrap  $\geq 50\%$  mostrados acima dos ramos.



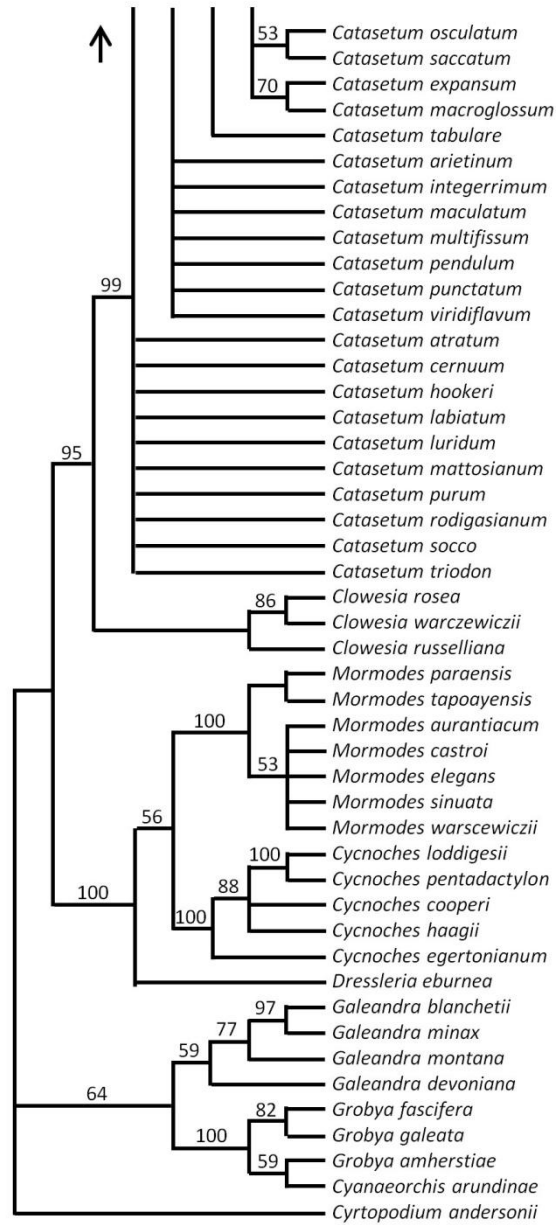
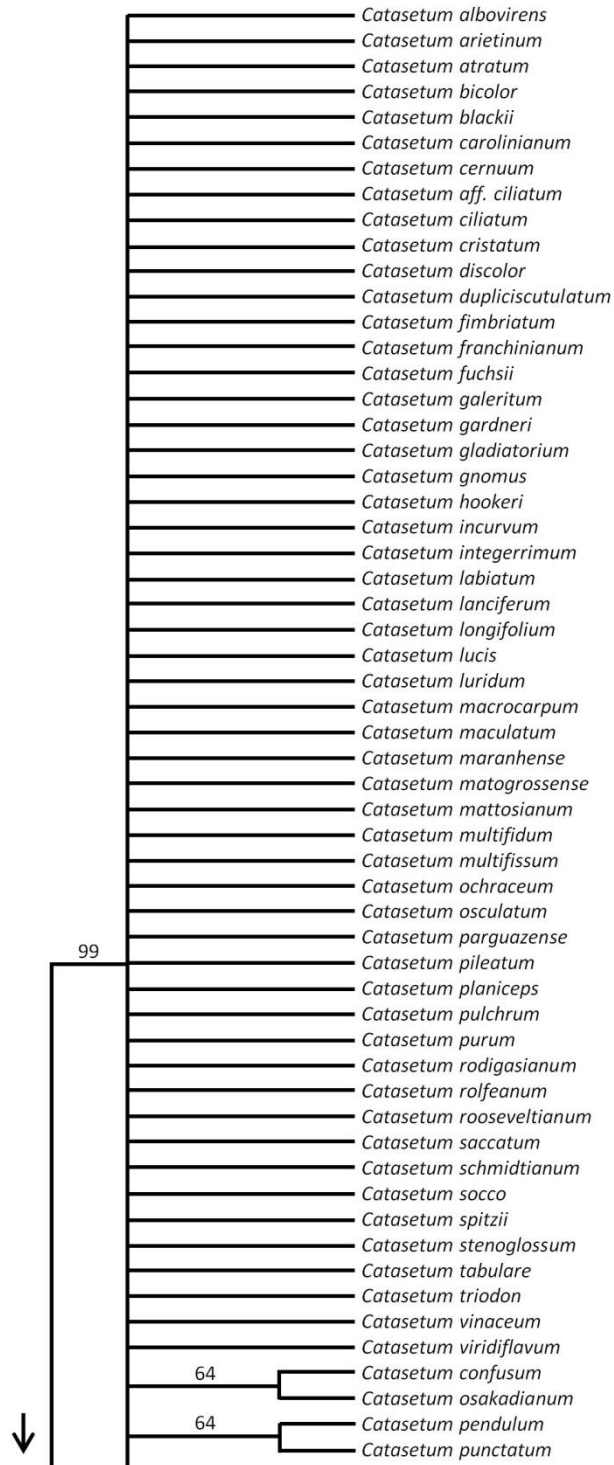


Figura 5 - Árvore de consenso restrito baseada na análise de máxima verossimilhança dos fragmentos isolados para a região *rpS16* (DNA plastidial). Valores de bootstrap  $\geq 50\%$  mostrados acima dos ramos.

*trnL-F* - A matriz gerada para a região *trnL-F* foi a menos informativa (5,3% de caracteres potencialmente informativos), embora tenha o maior número de caracteres. As sequências apresentaram uma forte variação no comprimento, sendo o menor de 378 pb (*Cycnoches haagii*) e o maior de 1.108 pb (*Catasetum arietinum*). Dois fragmentos foram considerados não-alinháveis (26 pb e 34 pb, totalizando 60 pb) e retirados do alinhamento. Um indel autapomórfico para *C. arietinum* (55 pb) também foi retirado do alinhamento. Catorze amostras apresentaram produtos de PCR heterogêneos (bandas duplas) para esta região (*Catasetum laminatum*, *C. garnettianum*, *C. tigrinum*, *Mormodes paraensis*, *M. aurantiacum*, *M. warszewiczii*, *M. tapoayensis*, *Cycnoches cooperi*, *Cyc. egertonianum*, *Cyc. loddigesii*, *Cyc. pentadactylon*, *Grobya fascifera*, *Gr. galeata* e *Cyanaeorchys arundinae*) e foram excluídas das análises individual e combinadas (MP, MV e IB). Este resultado sugere a ocorrência de anelamento do marcador em diferentes genes (sítios homólogos) ou a presença de genes duplicados para esta região em Catasetinae, as quais denominamos de "cópia curta" e "cópia longa" em referência aos diferentes comprimentos destes fragmentos.

A topologia obtida através de MV para os grupos externos e para *Catasetum* foi incongruente com as demais regiões analisadas, nas quais o tamanho dos fragmentos amplificados parece ter influenciado o resultado (Figuras 6 e 7). O parafiletismo observada para *Clowesia* provavelmente foi resultante do fato de duas espécies (*Cl. rosea* e *Cl. warszewiczii*) apresentarem cópias curtas (444 e 453 pb, respectivamente) e *Cl. russelliana* apresentar cópia longa (995 pb). *Mormodes* spp. e *Cycnoches haagii* apresentaram apenas cópias curtas, agrupando com as duas espécies de *Clowesia* com cópias curtas. *Catasetum* spp., *Galeandra* spp., *Dressleria eburnea* e *Grobya amherstiae* apresentaram cópias longas, resultando em posições incongruentes com as demais regiões analisadas em Catasetinae. Houve a confirmação do monofiletismo de *Catasetum* com alto suporte. Quanto às relações infragenéricas em *Catasetum*, todos os clados obtiveram baixo ou nenhum suporte. A topologia da árvore de consenso apresentou 8 dicotomias. Os 7 primeiros clados incluíram 23 espécies provenientes do México, Américas Central e do Sul. O clado terminal (*C. aculeatum* - *C. vinaceum*) incluiu apenas espécies Sul Americanas, distribuídas em dois subclados com baixo suporte (*C. aculeatum* - *C. tuberculatum* e *C. confusum* + *C. osakadianum*) e uma politomia contendo 33 espécies.



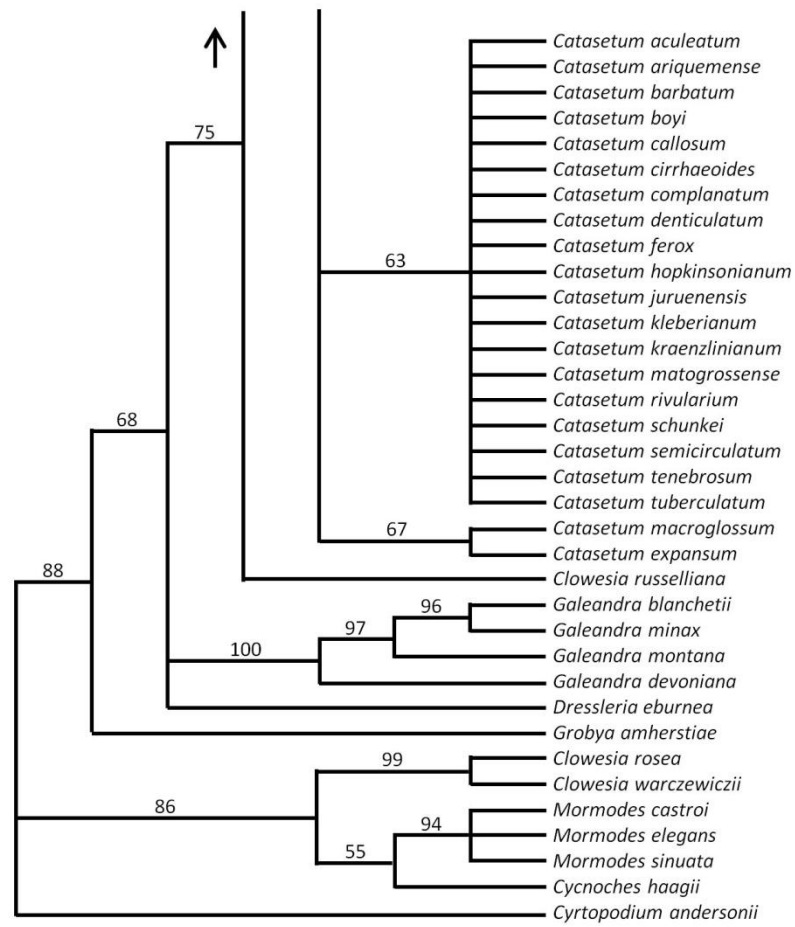
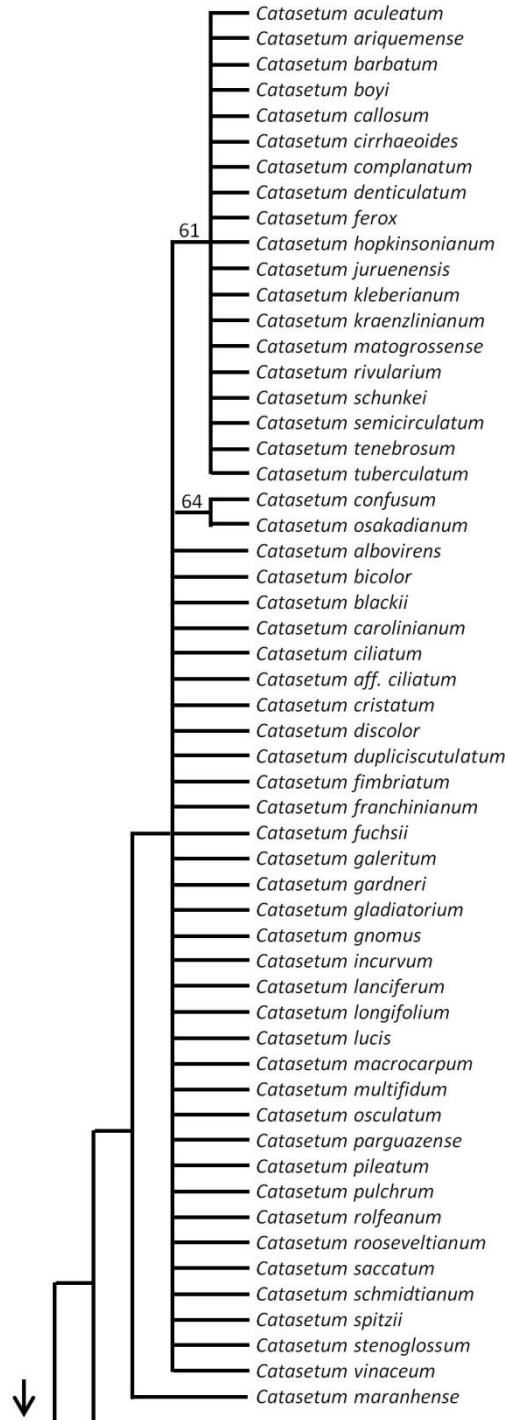


Figura 6 - Árvore de consenso restrito baseada na análise de máxima parsimônia dos fragmentos isolados para a região *tmL-F* (DNA plastidial). Valores de bootstrap  $\geq 50\%$  mostrados acima dos ramos.





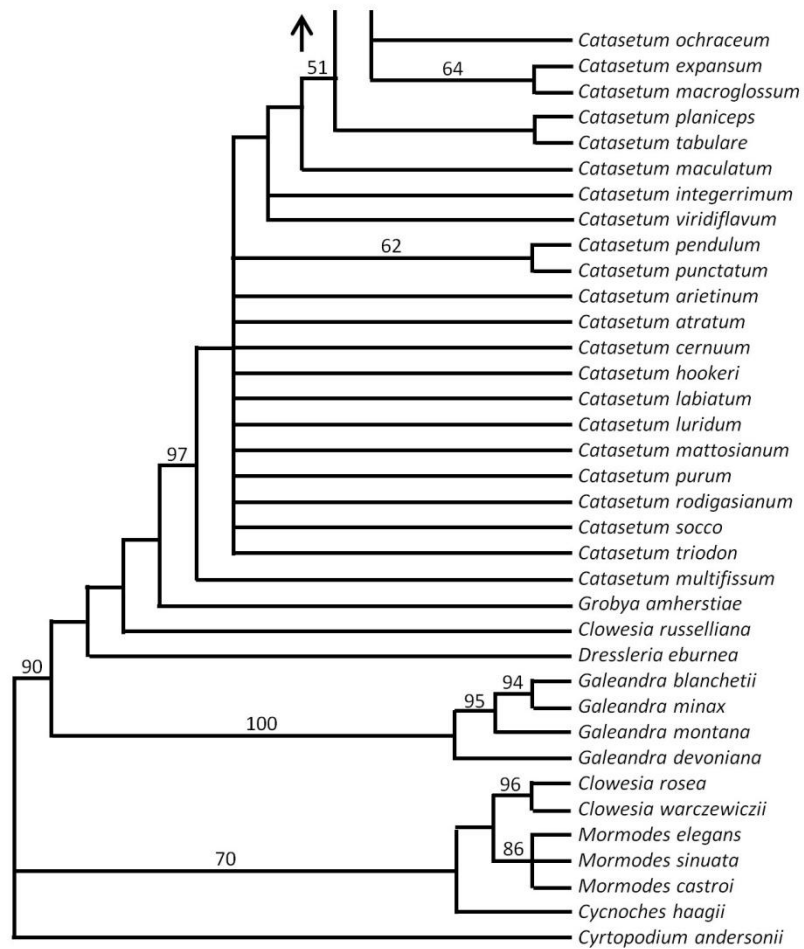
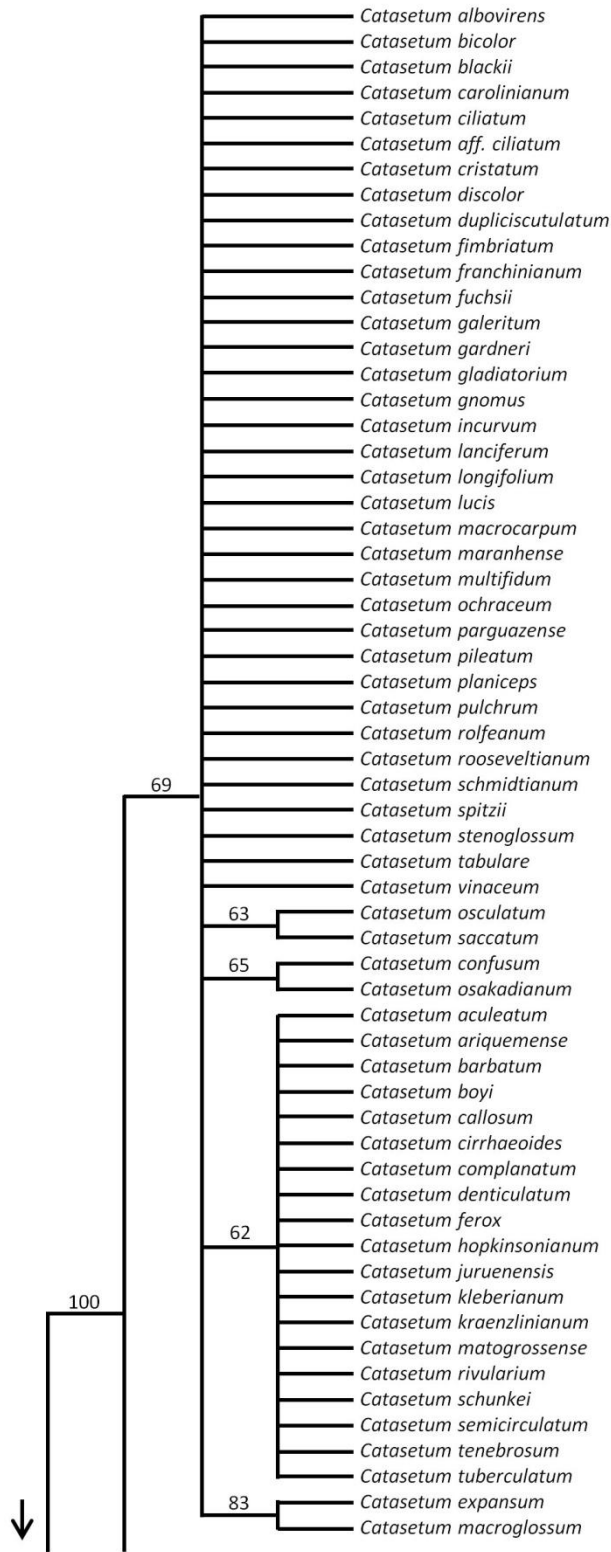


Figura 7 - Árvore de consenso restrito baseada na análise de máxima verossimilhança dos fragmentos isolados para a região *trnL-F* (DNA plastidial). Valores de bootstrap  $\geq 50\%$  mostrados acima dos ramos.

### 2.3.3 Análises combinadas

DNA plastidial - A matriz gerada para as regiões combinadas (*rpS16* + *trnL-F*) do DNA plastidial foi menos variável e informativa quando comparada à única região de DNA nuclear analisada (Figuras 8 e 9). Não foi possível confirmar o monofiletismo para *Clowesia* e *Grobya amherstiae* ficou em posição conflitante em relação às análises isoladas. Entretanto, o monofiletismo para *Catasetum* e sua posição como clado-irmão de *Cl. russelliana* obteve alto suporte. O clado basal (*C. pendulum* - *C. multifissum*) não apresentou suporte e incluiu 11 espécies da Mata Atlântica, uma do México (*C. pendulum*), uma do Cerrado (*C. arietinum*) e uma da Amazônia (*C. multifissum*). Ele foi seguido na cladogênese por espécies do México, América Central e América do Sul. O clado terminal (*C. aculeatum* - *C. vinaceum*) incluiu a maioria das espécies, todas da América do Sul (biomas Amazônia e Cerrado), sem suporte. Este clado apresentou três subdivisões com baixo suporte e uma sem suporte. O restante dos relacionamentos colapsou em uma politomia com 29 espécies. O relacionamento *C. macroglossum* + *C. expansum* foi o único com suporte moderado nesta árvore. Alguns ramos recuperados para *ITS* não estiveram presentes na topologia da árvore de DNA plastidial. O clado formado por *C. punctatum* + *C. pendulum* apresentou-se incongruente com a topologia obtida para *ITS*. A discrepância refere-se a *C. pendulum* que esteve posicionado em um clado com alto suporte para *ITS*.



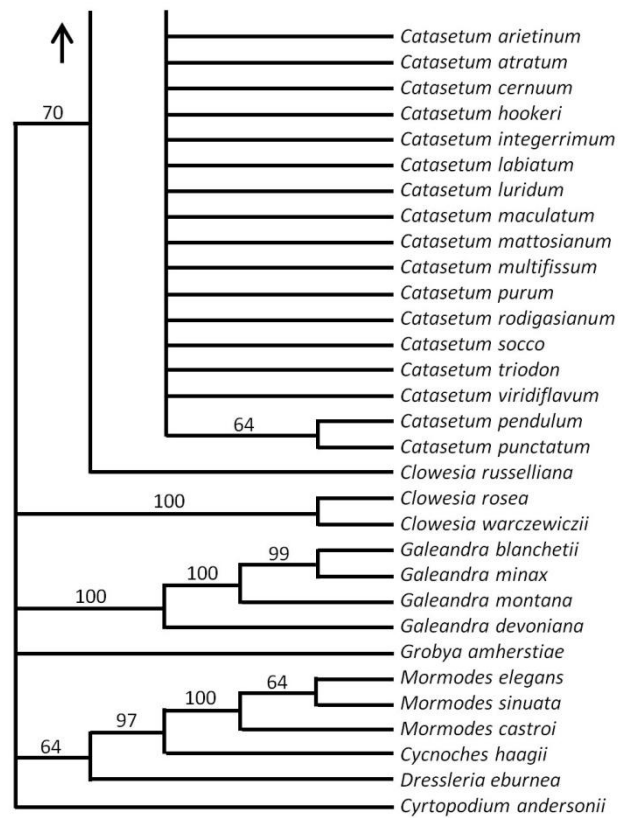
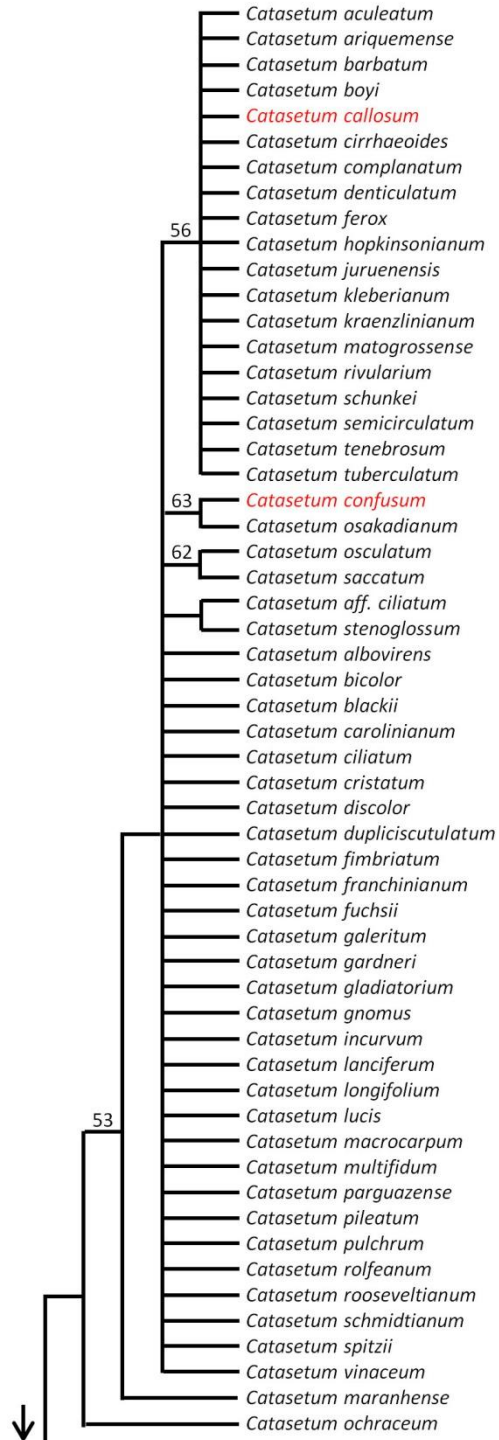


Figura 8 - Árvore de consenso restrito baseada na análise de máxima parsimônia dos fragmentos combinados para as regiões *rpS16* e *trnL-F* (DNA plastidial). Valores de bootstrap  $\geq 50\%$  mostrados acima dos ramos.



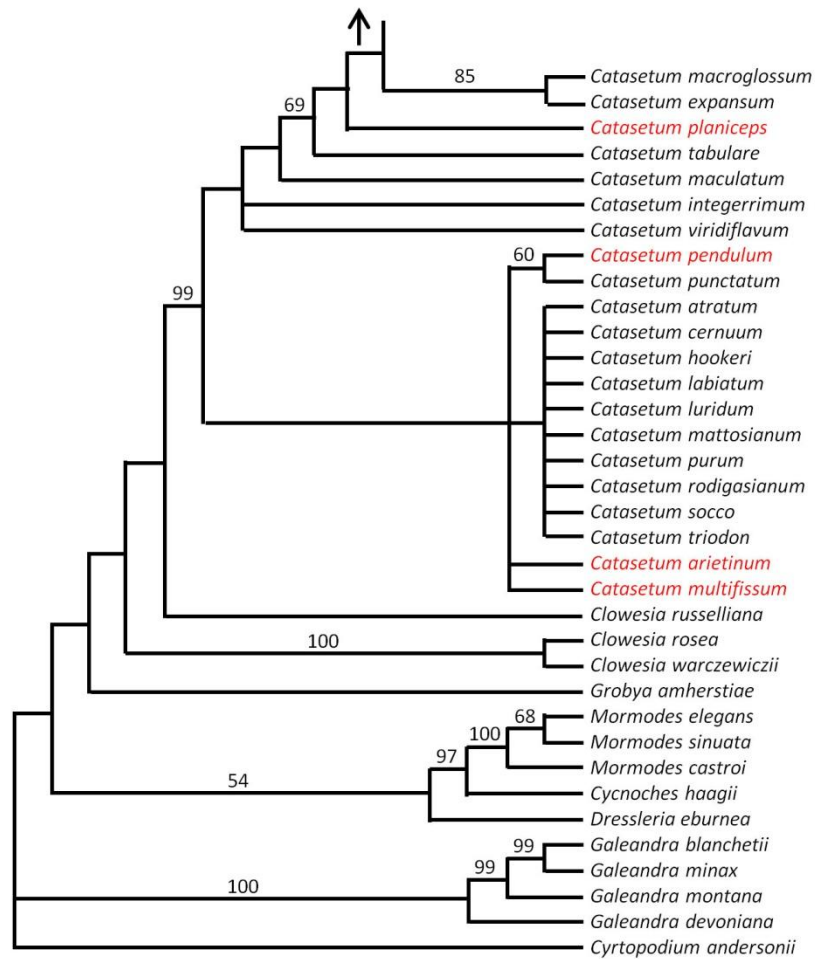
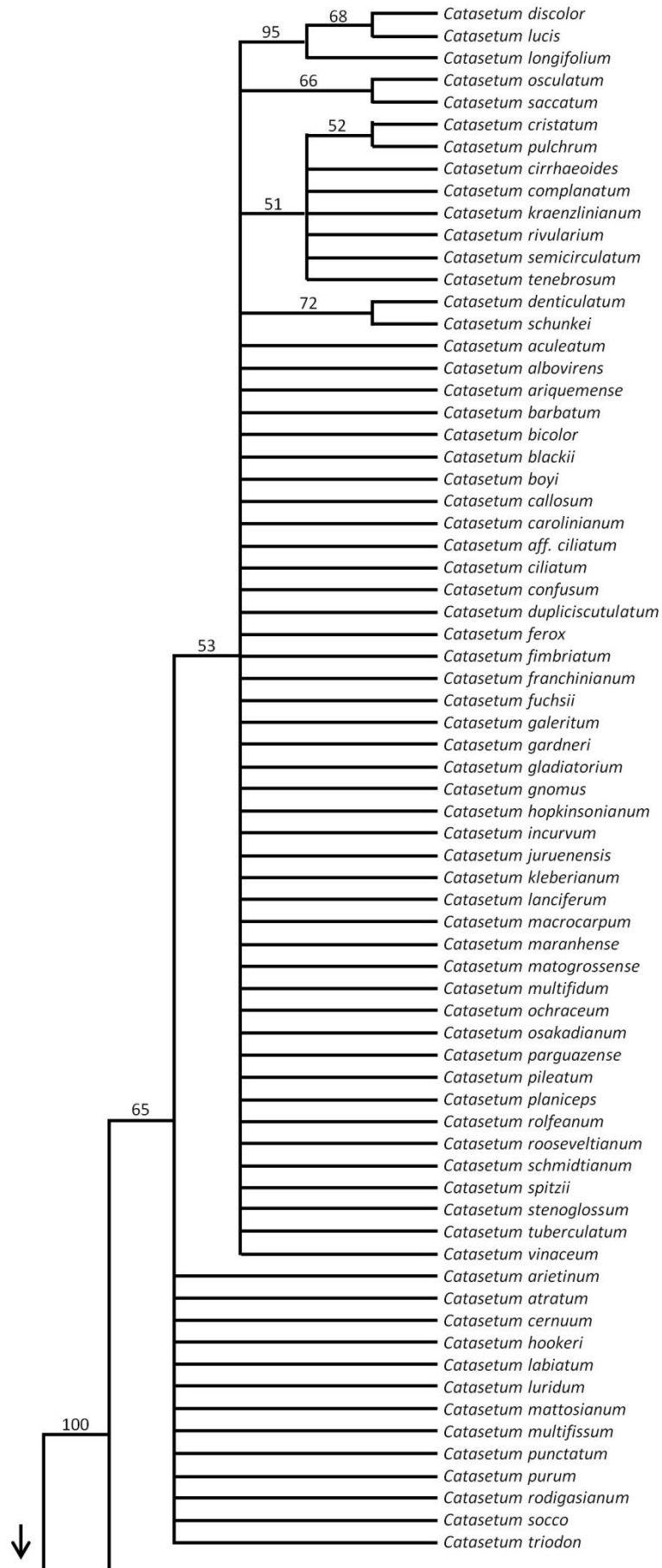


Figura 9 - Árvore de consenso restrito baseada na análise de máxima verossimilhança dos fragmentos combinados para as regiões *rpS16* e *trnL-F* (DNA plastidial). Valores de bootstrap  $\geq 50\%$  mostrados acima dos ramos. Espécies com posicionamento distinto entre as diferentes regiões analisadas em vermelho.

DNA total - As árvores baseadas na combinação dos *loci* nuclear e plastidial foram mais resolvidas e congruentes com os dados das matrizes isoladas (Figuras 10 e 11). Estas análises combinadas (MV e IB) apresentaram relacionamentos similares e não recuperaram nenhum relacionamento infragenérico que não tenha sido observado nas matrizes de dados isolados. Entretanto, alguns relacionamentos das análises individuais (nenhum com alto suporte) não foram confirmados nas análises combinadas. Isto pode ter ocorrido principalmente devido ao conflito entre as topologias dos diferentes *loci*. Os grupos externos estiveram distribuídos da seguinte maneira: *Grobya amherstiae* + *Galeandra* spp. (baixo suporte), seguido pelo clado *Dressleria eburnea* + *Cycnoches* spp. + *Mormodes* spp. (alto suporte) e o clado *Catasetum* spp. + *Clowesia* spp. (alto suporte). O monofiletismo de *Catasetum* foi fortemente suportado nas análises de MP, MV e IB. O clado incluindo *C. macroglossum* - *C. viridiflavum* foi irmão dos demais *Catasetum* com alto suporte na MP, MV e IB. Este clado incluiu espécies distribuídas do México ao Norte dos Andes, sugerindo que a linhagem ancestral de *Catasetum* tenha surgido nesta região. O clado *C. punctatum* - *C. arietinum* não apresentou suporte na MV e IB. Ele inclui 13 espécies da América do Sul (11 espécies da Mata Atlântica, *C. arietinum* do Cerrado e *C. multifissum* da Amazônia). Quando analisado sem *C. punctatum* (apresentou incongruência com suporte entre as análises nuclear e plastidial), o subclado *C. atratum* - *C. socco* aumentou o valor de suporte para 66% na MV. O clado *C. ochraceum* + *C. planiceps* incluiu duas espécies do Escudo das Guianas sem suporte em ambas as análises. *C. ciliatum* não obteve posições congruentes e suporte. O clado amazônico *C. longifolium* + *C. discolor* + *C. lucis* teve alto suporte em ambas análises, mas posições incongruentes também. O clado terminal (*C. maranhense* - *C. gardneri* ou *C. ciliatum*) não obteve suporte na MV e suporte moderado na IB. Ele incluiu a maioria das espécies, as quais são exclusivas da Amazônia e Cerrado da América do Sul (exceto *C. bicolor* que pode ser encontrado da Amazônia até o Panamá). Este grande clado apresentou subdivisões com baixo ou nenhum suporte na MV e alguns relacionamentos com alto suporte na IB. Algumas incongruências podem ser observadas, mas não apresentam suporte em uma ou ambas análises. *C. denticulatum* + *C. schunkei* e *C. osculatum* + *C. saccatum* foram os únicos relacionamentos com suporte em ambas análises. O restante dos relacionamentos colapsou em uma politomia com 10 espécies na MV e 25 na IB.





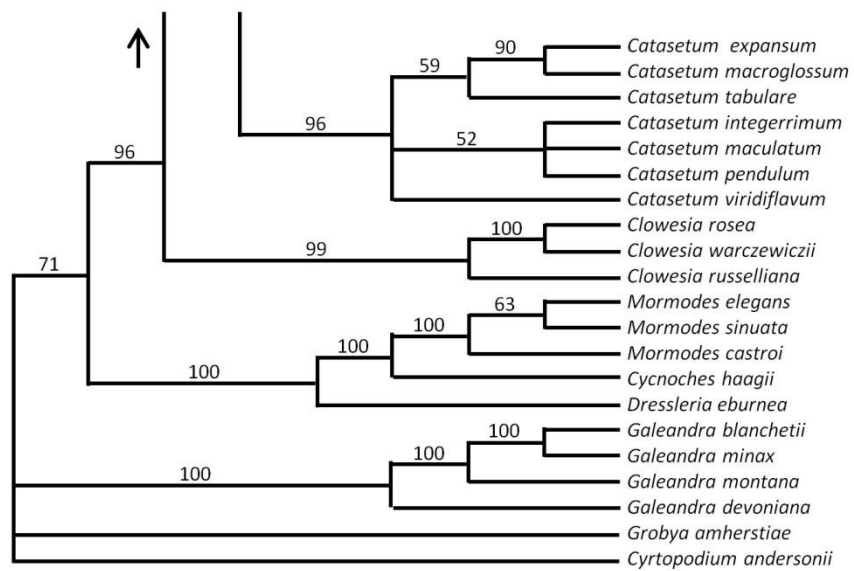
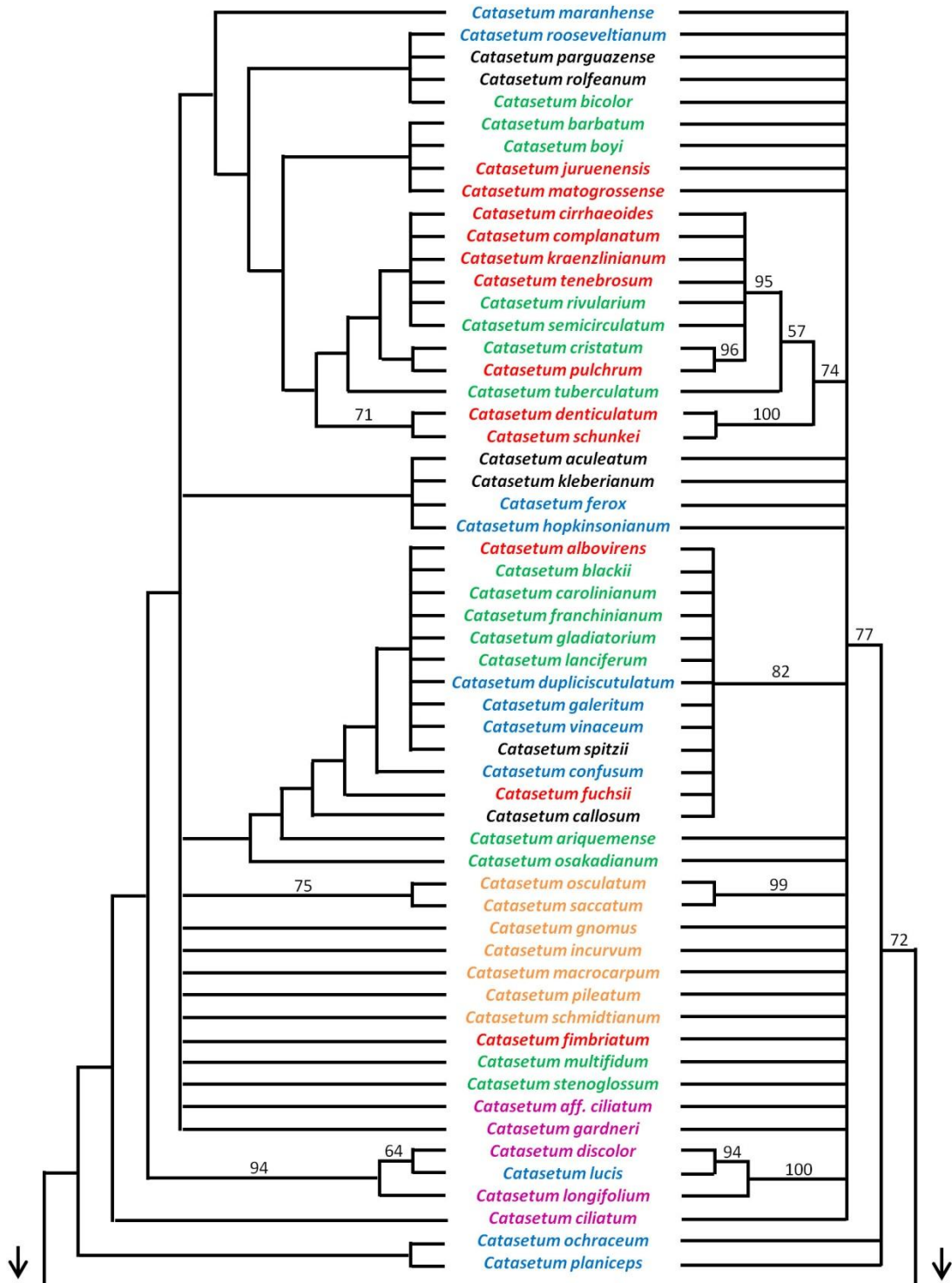


Figura 10 - Árvore de consenso restrito baseada na análise de máxima parsimônia dos fragmentos combinados para as regiões *ITS*, *rpS16* e *trnL-F* (DNA total). Valores de bootstrap  $\geq 50\%$  mostrados acima dos ramos.



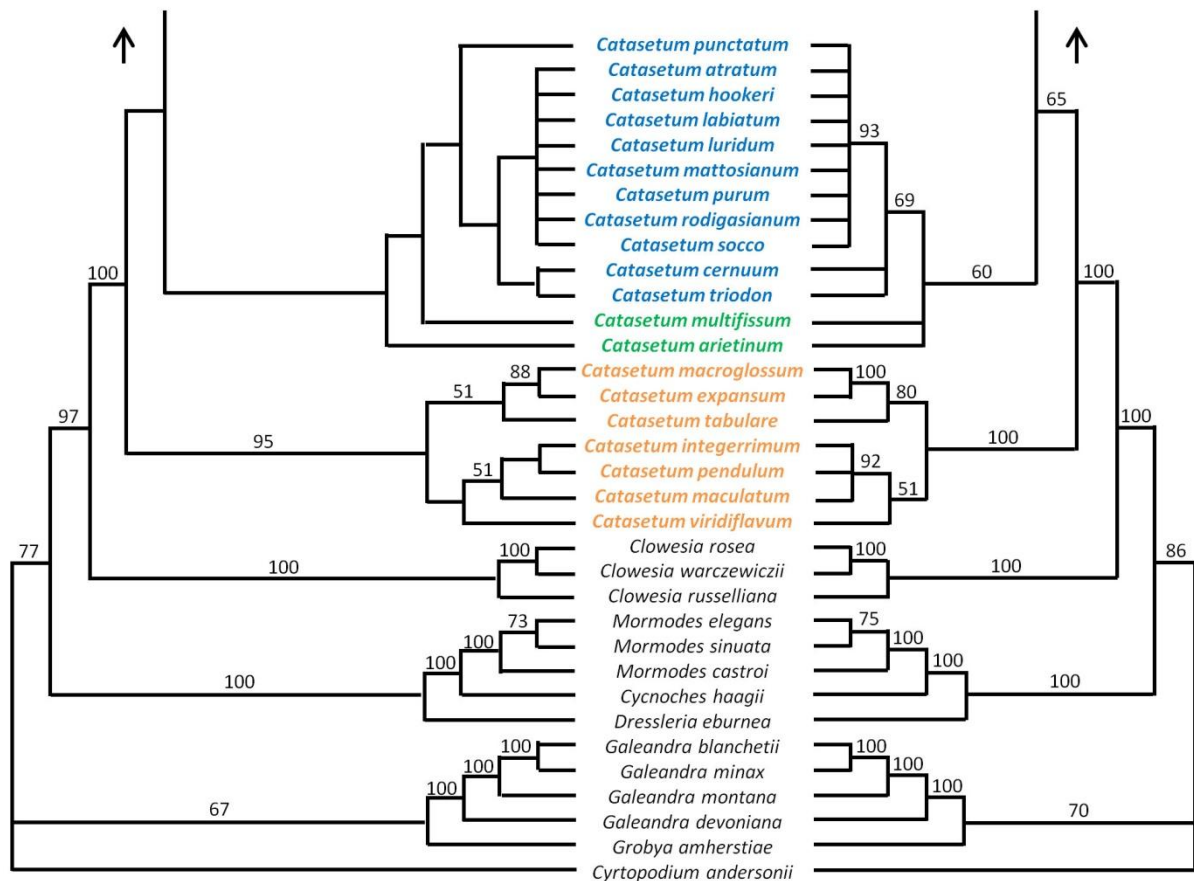


Figura 11 - Árvores de consenso restrito baseadas nas análises de máxima verossimilhança (esquerda) e inferência bayesiana (direita) dos fragmentos combinados para as regiões *ITS*, *rpS16* e *trnL-F* (DNA total). Valores de bootstrap e probabilidade posterior  $\geq 50\%$  mostrados acima dos ramos. Espécies em: Roxo - subgênero *Pseudocatasetum*; Laranja - subgênero *Catasetum*, seção Anisoceras; Verde - seção Isoceras, subseção Isoceras; Vermelho - subseção Convergentes; Azul - subseção Divaricatae; Preto - seção Isoceras, subseção incerta.

Sugerimos uma atualização das subdivisões da seção *Isoceras* na Figura 11. De acordo com nossas árvores de análises combinadas, o tamanho, a espessura e o posicionamento dos estaminódios sobre o labelo parecem ser características mais importantes que a disposição entre os estaminódios. Espécies da subseção *Divaricatae* foram caracterizadas por estaminódios longos e grossos que tocam o labelo na maior parte de seu comprimento. A subseção *Isoceras* tem estaminódios mais curtos e finos que tocam o labelo (principalmente o *callus* basal) somente com seus ápices. A subseção *Convergentes* também tem estaminódios curtos e finos, mas não tocam o labelo. Um quarto grupo morfológico (espécies em preto) foi observado com as mesmas características da sub-seção *Isoceras*, mas sem os estaminódios dispostos proximamente.

## 2.4 DISCUSSÃO

Os táxons em *Catasetinae* apresentam características morfológicas e ecológicas muito heterogêneas. *Catasetum* compartilha apenas a distribuição Neotropical com as demais *Catasetinae* e tem a presença de estaminódios modificados em antenas nas flores masculinas como principal característica distintiva (e.g., BATISTA et al., 2014; ROMERO; CARNEVALI, 2009). As análises combinadas são consistentes com estudos prévios em *Catasetinae* (e.g., PÉREZ-ESCOBAR et al., 2016), confirmando a posição de *Catasetum* como grupo-irmão de *Clowesia*. *Catasetum* emerge como monofilético em todas as análises, porém os dados moleculares não são suficientes para elucidar completamente as relações dentro deste gênero. A rápida diversificação em orquídeas pode ser responsável por isto. De fato, a baixa variação dos nucleotídeos entre regiões comumente estudadas tem sido recorrentemente registrada para *Catasetinae*, como em *Galeandra* e *Mormodes* (MONTEIRO et al., 2010; SALAZAR et al., 2016), e outras *Cymbidieae* (e.g., WHITTEN et al., 2007; KOEHLER et al., 2008; CHASE et al., 2009; NEUBIG et al., 2009).

Apesar das divergências entre as matrizes das regiões *ITS* e DNA plastidial em *Catasetum*, as topologias das árvores das duas regiões de DNA plastidial (i.e., *rpS16* e *trnL-F*) são congruentes. As divergências, assim como a ocorrência de bandas múltiplas na amplificação da região *trnL-F*, haviam sido previamente registradas para outra *Catasetinae* (SALAZAR et al., 2016) e outras *Cymbidieae* (e.g., WHITTEN; WILLIAMS; CHASE, 2000; WHITTEN et al., 2005, 2007; KOEHLER et al., 2008). De acordo com Pérez-Escobar, Balbuena e Gottschling (2016), a incongruência entre topologias nos diferentes *loci* (i.e.,

nuclear e plastidial) pode ser resultado de uma evolução divergente, revelando diferentes histórias evolutivas e taxas de substituição.

As sinapomorfias morfológicas tradicionalmente utilizadas para definir as subdivisões em *Catasetum* não são consistentes com a filogenia baseada em dados moleculares. Nenhum dos grupos considerados em classificações prévias é monofilético nas análises individuais e combinadas. Portanto, a cladogênese contrastou com a circunscrição infragenérica baseada na morfologia dos estaminódios, como previamente proposto por Rolfe (1891), Mansfeld (1932a, 1932b), Bicalho e Barros (1988) e Senghas (1990, 1991). As características dos estaminódios parecem ter sofrido várias reversões de caráter ou podem ter evoluído independentemente neste gênero. As cinco espécies pertencentes ao subgênero *Pseudocatasetum* (*C. longifolium*, *C. discolor*, *C. ciliatum*, *C. aff. ciliatum* e *C. gardneri*) estão posicionadas em clados separados. Somente *C. longifolium* e *C. discolor* estão no mesmo clado. As 14 espécies da seção *Anisoceras* (subgênero *Catasetum*) estão segregadas: sete espécies no clado basal e sete na politomia do clado terminal. As 58 espécies da seção *Isoceras* também emergem em clados separados. Até mesmo as espécies da “aliança *C. cristatum*”, que exibem grande similaridade morfológica (e.g., FRANKEN; PANSARIN; PANSARIN, 2016), estão inseridas em subclados distintos entre os *Catasetum* mais derivados. Entretanto, alguns clados podem ser definidos por sua distribuição geográfica. Segundo Batista et al. (2014), o padrão geográfico parece ser a única característica não-molecular unindo as *Catasetinae*, em detrimento da similaridade morfológica. *Mormodes* spp. e *Galeandra* spp. também apresentaram padrão geográfico de especiação, porém relacionado à morfologia. Em *Galeandra*, Monteiro et al. (2010) observaram um subclado com espécies Sul Americanas e outro com espécies mexicanas. Em *Mormodes*, Salazar et al. (2016) observou que as três seções apresentavam estrutura geográfica.

O clado *C. macroglossum* - *C. viridiflavum*, com distribuição entre o México, América Central e Norte dos Andes, é epífita com inflorescências eretas (exceto *C. pendulum*) e grandes flores, cujos estaminódios são bem desenvolvidos e assimétricos. As espécies inclusas nesse clado (i.e., *C. expansum*, *C. integerrimum*, *C. macroglossum*, *C. maculatum*, *C. pendulum*, *C. tabulare* e *C. viridiflavum*) são polinizadas pelos grandes machos de *Eulaema* (DODSON, 1962; HILLS et al., 1972; JANZEN, 1981; ACKERMAN, 1983; WARFORD; HARRELL, 1996). Características compartilhadas entre os clados Sul Americanos mais derivados são: hábito terrícola, inflorescências arqueadas ou pendentes, estaminódios simétricos ou rudimentares, e flores médias ou pequenas polinizadas por *Eufriesea* e *Euglossa*, respectivamente. Romero (1990) supôs que os estaminódios desenvolvidos seriam

derivados em *Catasetum*. Entretanto, nossos resultados sugerem estaminódios bem desenvolvidos e assimétricos, onde apenas um é funcional, como caráter plesiomórfico neste gênero. A tendência de redução no tamanho das flores parece ser uma adaptação à polinização por *Euglossa*, que tem o menor tamanho e é a euglossine mais derivada e diversa (RAMÍREZ et al., 2010).

Apesar das politomias geradas, muitos relacionamentos podem não ter emergido devido a eventos de especiação que obscurecem a cladogênese, como a introgressão, separação incompleta de linhagens e evolução reticulada (e.g., MADDISON, 1997; LINDER; RIESEBERG, 2004). Todos esses eventos podem gerar discordâncias genealógicas entre os diferentes *loci*, como as que encontramos em nossos resultados. A hibridização natural é um fenômeno particularmente comum em *Catasetum* (ROMERO; CARNEVALI, 1992). Este é um modo rápido de diferenciação fenotípica e especiação (e.g., ABBOTT et al., 2010), apresentando um papel importante na história evolutiva deste gênero, provavelmente o mais importante processo de diversificação para *Catasetum*. Não existem registros de híbridos naturais de *Catasetum* para as espécies do México e América Central (e.g., WARFORD; HARRELL, 1996). Entretanto, hibridizações e retrocruzamentos ocorrem em alta frequência entre as espécies Sul Americanas, onde encontra-se a maior diversidade do gênero (e.g., MIRANDA; LACERDA, 1992). Nessas espécies, as barreiras de isolamento reprodutivo são frequentemente frágeis, tendo em vista o grande número de híbridos naturais registrados (e.g., DODSON, 1962; ROMERO; CARNEVALI, 1990, 1991a, 1991b; PETINI-BENELLI, 2014). *Catasetum*, como a maioria das orquídeas (e.g., van der PIJL; DODSON, 1966), tem barreiras pré-polinização como principal fator evitando a ocorrência de hibridizações naturais. As barreiras conhecidas para este gênero são morfológicas (polinário depositado em diferentes locais no corpo do polinizador e incompatibilidade entre o tamanho da flor e polinizador), fenológica (separação temporal na época de floração) ou etológica (especificidade de polinizador como resultado das preferências inatas em diferentes sinais olfativos produzidos de acordo com a espécie). Barreiras pós-polinização não são conhecidas para *Catasetum*.

As linhagens híbridas produzidas pelo restabelecimento do fluxo gênico entre diferentes espécies, seja porque as barreiras não estão completamente formadas ou foram quebradas (geralmente por ação antropogênica), podem divergir dos ancestrais (especiação híbrida) ou integrar-se a eles (introgressão adaptativa). A especiação dos híbridos é possível devido à adaptação a um novo nicho de polinização (e.g., SCHIESTL; SCHLÜTER, 2009). Logo, pequenas mudanças no perfil químico das fragrâncias florais que levem à mudança na espécie do polinizador, resultam em interrupção no fluxo gênico e isolamento reprodutivo

imediate entre linhagens (e.g., van der NIET; PEAKALL; JOHNSON, 2014). A evolução das barreiras é fundamental, senão a nova linhagem híbrida irá colapsar através do fluxo gênico com seus ancestrais. Esta assimilação genética pode contribuir com a perda da diversidade de espécies. Segundo Wolf, Takebayashi e Rieseberg (2001), hibridizações podem levar à extinção de populações ou espécies rapidamente. Esta complexa história evolutiva nos impede de prever as tendências futuras para a atual diversidade de *Catsetum*.

### **3. ANÁLISES MORFO-ANATÔMICAS E HISTOQUÍMICAS**



### 3.1 INTRODUÇÃO

O gênero *Catasetum* L. C. Rich. ex Kunth (Orchidaceae) tem aproximadamente 130 espécies distribuídas principalmente na região tropical das Américas Central e Sul (ROMERO; CARNEVALI, 2009). A maioria das espécies ocorre na Amazônia Brasileira, onde o gênero é bem representado (e.g., MIRANDA; LACERDA, 1992). As espécies de *Catasetum* são praticamente indistinguíveis quanto à morfologia vegetativa. As flores normalmente são unissexuais (estaminadas ou pistiladas) com morfologia distinta (heterantia) e determinação sexual de acordo com as características ambientais e nutricionais do indivíduo (GREGG, 1975; ROMERO; NELSON, 1986; ZIMMERMAN, 1991; ROMERO, 1992; GERLACH, 2007, 2013). O gênero tem como característica distintiva a presença de dois estaminódios modificados anteriores à coluna em flores masculinas, cuja função consiste em ejetar o polinário contra o corpo do polinizador no momento da visita.

As flores de *Catasetum* não oferecem nenhum tipo de recurso alimentar aos seus polinizadores. Elas produzem apenas fragrâncias florais (óleos voláteis), que atuam tanto como elemento de atração como recurso floral aos seus polinizadores. Estes óleos voláteis são produzidos em estruturas denominadas osmóforos (VOGEL, 1962). Em Orchidaceae, dois tipos de osmóforos têm sido registrados: epidermal e glandular. Os osmóforos epidermais são formados por uma única camada de células epidermais não diferenciadas ou papilas uni/multicelulares (e.g., TEIXEIRA; BORBA; SEMIR, 2004; PANSARIN; CASTRO; SAZIMA, 2009). Os osmóforos glandulares têm estrutura mais complexa, formados por uma epiderme e várias camadas de parênquima subjacente (e.g., EFFMERT et al., 2006). Ambos os tipos ocorrem frequentemente em regiões modificadas do perianto. Algumas vezes eles não são morfologicamente perceptíveis, em outros casos eles são distinguíveis apenas por diferentes colorações nos locais onde estão situados nas flores (e.g., VOGEL, 1990). As células dos osmóforos possuem núcleo grande, citoplasma denso, grande quantidade de amido e alto número de mitocôndrias e outras organelas. A maioria destas características é encontrada em tecidos com alta atividade metabólica, o que está relacionada ao processo secretor (FAHN, 2000).

Há mais de 50 anos é conhecido que as espécies de *Catasetum* são polinizadas por machos de abelhas Euglossini, que coletam fragrâncias nas flores (VOGEL, 1963). Neste caso, os compostos presentes nas fragrâncias são coletados com uma estrutura de pêlos duros presente em suas pernas anteriores e armazenados em suas tíbias traseiras (e.g., ELTZ et al., 1999). Essas fragrâncias consistem principalmente de uma variedade de terpenóides e

aromáticos que geralmente possuem composição espécie-específica (e.g., HILLS; WILLIAMS; DODSON, 1972). Durante a coleta da fragrância, as abelhas tocam acidentalmente os estaminódios das flores masculinas, ativando o mecanismo de ejeção do polinário, que é depositado no corpo da abelha. Quando esta visita uma flor feminina, pode ocorrer a deposição das polínias na cavidade estigmática (e.g., DODSON, 1962; DRESSLER, 1968). A localização do osmóforo e a arquitetura floral são fundamentais para o sucesso no processo de polinização e consequente formação do fruto, orientando o posicionamento correto do polinizador abaixo da coluna para a deposição do polinário.

Estudos sobre estrutura anatômica dos osmóforos têm sido conduzidos em poucas espécies de vários gêneros de orquídeas não relacionados. O trabalho mais completo foi realizado por Vogel (1990), com a descrição da anatomia floral de diversas orquídeas, incluindo três espécies de *Catasetum*. Apenas dois trabalhos com Stanhopeinae e outro com Catasetinae investigaram as variações anatômicas infragenéricas destas glândulas florais e relacionaram seu contexto evolutivo. Curry et al. (1991) observaram que a pressão seletiva favoreceu o desenvolvimento de osmóforos mais elaborados e a redução do número de flores na inflorescência de *Stanhopea* spp. Pansarin, Pansarin e Sazima (2014) observaram que apenas a morfologia floral e a distribuição dos osmóforos no labelo variaram entre as espécies de *Cirrhaea*. Uribe-Holguin (2016) observou que a distribuição de alguns estados de caráter anatômicos em *Cycnoches* spp. indicam potenciais sinapomorfias dentro do gênero.

Desde o trabalho de Vogel (1963), apenas um artigo sobre as glândulas florais de *Catasetum* foi publicado como parte desta tese por Franken, Pansarin e Pansarin (2016), no qual foram descritos os osmóforos do grupo "*Catasetum cristatum*". Não existem informações disponíveis sobre a diversidade do tecido secretor para todo o gênero *Catasetum*, nem sobre a evolução das estruturas secretoras. Baseado nesses argumentos, este capítulo descreve a diversidade de osmóforos para *Catasetum*, detalhando as estruturas e os tecidos envolvidos na secreção de fragrâncias. Utilizando as árvores filogenéticas obtidas na seção 2 desta tese, foi possível inferir a evolução das variações anatômicas florais em *Catasetum*.

### 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Quarenta e uma espécies de *Catasetum* foram analisadas (Tabela 1). Os espécimes foram coletados em áreas naturais do Brasil ou comprados em orquidários comerciais e cultivados no Orquidário do Laboratório de Biologia Molecular e Biossistemática de Plantas (LBMBP-FFCLRP-USP). Em alguns casos, mais de um indivíduo com a mesma procedência

foi analisado. O material testemunho encontra-se depositado no laboratório supracitado e registrado no SpeciesLink. As características morfológicas foram examinadas sob estereomicroscópio binocular. Para isto, foram utilizadas flores masculinas e femininas frescas ou fixadas em solução de formaldeído-ácido acético-etanol (FAA 50%) e armazenadas em solução de etanol 50%. Para determinar a localização dos osmóforos em cada espécie, apenas as flores frescas foram utilizadas, sendo coletadas durante a produção da fragrância (2 a 5 dias após a antese, no período diurno) de cada exemplar. Elas foram imersas em Vermelho Neutro Aquoso 0,1% (água/volume) por 1-24 horas (VOGEL, 1962). Adicionalmente, os labelos foram longitudinalmente seccionados com lâmina e imersos em solução de Lugol 1% por 1-10 min para localizar o tecido secretor através da presença de amido. Os testes histoquímicos para confirmar a natureza da secreção foram realizados em secções longitudinais e transversais do labelo e corados com Vermelho de Sudão III ou IV (PEARSE, 1985) e Lugol 1% (HINCHMAN, 1973). As soluções alcoólicas Vermelho de Sudão III e IV apresentam alta afinidade com lipídeos, corando as gotículas de óleo imersas no citosol de vermelho-alaranjado. A solução de Lugol 1% reage com o amido contido nos amiloplastos, produzindo coloração azul escuro-preta como resultado da ligação entre o amido e o iodo contido na solução. As observações anatômicas utilizaram microscópio de luz Leica DM500. Imagens com no mínimo 600 dpi de resolução foram capturadas com câmera digital (modelo Leica ICC50) acoplada ao microscópio. A terminologia utilizada para a morfologia das células epidérmicas está de acordo com Koch et al. (2008) e dos apêndices epidérmicos de acordo com Werker (2000). As espécies anatomicamente descritas por Franken, Pansarin e Pansarin (2016) constam no Apêndice 1 e não serão redescritas aqui. A cladogênese utilizada obedece à árvore combinada total recuperada através da análise de inferência bayesiana apresentada na seção 2 desta tese. Esta árvore apresentou quatro cladogramas, denominados nesta seção por Clado A (*C. macroglossum* - *C. viridiflavum*), B (*C. punctatum* - *C. arietinum*), C (*C. ochraceum* + *C. planiceps*) e D (*C. maranhense* - *C. ciliatum*).

Tabela 1 - Espécies analisadas, procedência (Estados brasileiros ou orquidário comercial - oc), clado filogenético, sexo da flor (Masculina/Feminina), número de exemplares analisados (N), preservação da amostra e número do voucher.

<b>Espécie</b>	<b>Procedência</b>	<b>Clado</b>	<b>Sexo</b>	<b>N</b>	<b>Preservação</b>	<b>Voucher</b>
<i>Catasetum albovirens</i> Barb.Rodr.	PA	D	M	1	Fresca	960
<i>Catasetum atratum</i> Lindl.	SC	B	M	1	Fresca	897
<i>Catasetum bicolor</i> Klotzsch	oc	D	M	1	Fresca	971
<i>Catasetum boyi</i> Mansf.	RO	D	M	1	Fresca	925

<i>Catasetum cernuum</i> (Lindl.) Rchb.f.	SP	B	M	2	Fresca	564, 810
<i>Catasetum aff. ciliatum</i>	AM	D	M	2	Fresca	307
<i>Catasetum ciliatum</i> Barb.Rodr.	PA	D	M	1	Fixada	962
<i>Catasetum cirrhaeoides</i> Hoehne	oc	D	M	1	Fresca	935
<i>Catasetum complanatum</i> Miranda & Lacerda	RO	D	M	2	Fresca	947
<i>Catasetum confusum</i> Romero	TO	D	M	1	Fresca	836
<i>Catasetum denticulatum</i> Miranda	RO	D	M	2	Fresca	915, 949
<i>Catasetum discolor</i> (Lindl.) Lindl.	PA, RO	D	M	2	Fresca	813, 931
<i>Catasetum dupliciscutulatum</i> Senghas	AC	D	M	1	Fixada	809
<i>Catasetum expansum</i> Rchb.f.	oc	A	M	1	Fresca	823
<i>Catasetum fimbriatum</i> (Morren) Lindl.	MS, SP	D	M / F	4	Fresca	302, 304, 729, 806
<i>Catasetum fuchsii</i> Dodson & Vásquez	TO, oc	D	M	1	Fresca	835
<i>Catasetum gardneri</i> Schltr.	PE	D	M	2	Fresca	845, 937
<i>Catasetum gnomus</i> Linden & Rchb.f.	AM, RO	D	M	3	Fresca	820, 827, 912
<i>Catasetum hopkinsonianum</i> Carr & Castro	RO	D	M	1	Fresca	922
<i>Catasetum integerrimum</i> Hook.	oc	A	M	1	Fresca	899
<i>Catasetum juruenensis</i> Hoehne	MT, RO	D	M	1	Fresca	921
<i>Catasetum luridum</i> (Link) Lindl.	RJ	B	M	1	Fresca	898
<i>Catasetum macrocarpum</i> Rich. ex Kunth	MA, PA, TO	D	M	3	Fresca	812, 816, 834, 849, 963
<i>Catasetum macroglossum</i> Rchb.f.	oc	A	M	1	Fresca	822
<i>Catasetum maranhense</i> Lacerda & Silva	MA	D	M	1	Fresca	951
<i>Catasetum matogrossense</i> Bicalho	MT	D	M	2	Fresca	934
<i>Catasetum mattosianum</i> Bicalho	ES	B	M	1	Fresca	305
<i>Catasetum ochraceum</i> Lindl.	oc	C	M	1	Fresca	939
<i>Catasetum osculatum</i> Lacerda & Castro	MT, RO	D	M	3	Fresca	894, 920, 999
<i>Catasetum parguazense</i> Romero & Carnevali	RO	D	M	1	Fresca	919
<i>Catasetum pileatum</i> Rchb.f.	oc	D	M	1	Fresca	860
<i>Catasetum planiceps</i> Lindl.	oc	C	M	1	Fresca	850
<i>Catasetum pulchrum</i> N.E.Brown	PA	D	M	1	Fresca	964
<i>Catasetum purum</i> Nees & Sinning	BA	B	M	1	Fresca	847
<i>Catasetum rooseveltianum</i> Hoehne	MT	D	M	1	Fresca	929
<i>Catasetum saccatum</i> Lindl.	AC	D	M	1	Fresca	932
<i>Catasetum schmidtianum</i> Miranda & Lacerda	MT	D	M	1	Fresca	948
<i>Catasetum socco</i> (Vell.) Hoehne	SP	B	M	1	Fresca	936
<i>Catasetum tenebrosum</i> Kraenzl.	oc	D	M	1	Fixada	967
<i>Catasetum vinaceum</i> (Hoehne) Hoehne	oc	D	M	1	Fresca	861
<i>Catasetum viridiflavum</i> Hook.	Colômbia	A	M	1	Fixada	1014

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Características gerais

A morfologia do labelo das flores masculinas é muito diversificada entre as espécies de *Catasetum*. De modo geral, o formato varia entre galeiforme, côncavo, cônico e lobado, relativamente plano e alongado. Todas as espécies analisadas possuem uma cavidade saquiforme, que ocupa completa ou parcialmente a área do labelo. As margens do labelo variam de lisas a ciliadas. Nas flores femininas o labelo é sempre galeiforme e sem fímbrias ou cílios nas margens. Apesar da diversidade morfológica observada para o labelo, os osmóforos sempre estão localizados em sua superfície adaxial em flores masculinas e femininas. O tecido secretor cobre completamente esta superfície, sendo composto por uma epiderme e várias camadas de parênquima subepidérmico. Após a camada glandular ocorrem os feixes vasculares, o parênquima não-secretor e a epiderme abaxial (Figura 1). Nas flores masculinas, o tecido secretor pode formar estruturas glandulares como rugas (pequenas protruções), espessamentos (aglomerações contendo maior número de camadas) e calosidades (dobramentos formando ornamentações). Estas estruturas sempre estão posicionadas abaixo ou entre os estaminódios da coluna. Nas demais áreas do labelo, o tecido secretor é homogêneo (contendo poucas camadas de células) e a superfície tende a ser lisa. A maioria das espécies apresenta leves cristas (ondulações) em sua superfície causadas pela presença dos grossos feixes vasculares que fazem o transporte de metabólitos necessário para a produção de fragrâncias (Figura 1C). Variações na morfologia das células epidérmicas foram observadas apenas em flores masculinas. Nas poucas espécies em que obtivemos flores femininas, a superfície adaxial sempre apresenta cristas bastante proeminentes e o tecido secretor não forma estruturas glandulares (homogeneamente distribuído em poucas camadas). Em todas as flores analisadas (masculinas e femininas) as células do parênquima glandular são maiores que as epidérmicas e anisodiamétricas, variando em número de camadas de acordo com a espécie. O parênquima não-secretor geralmente apresenta espaços intercelulares que conferem um aspecto "esponjoso" a este tecido (Figura 1C). A epiderme abaxial sempre apresenta a superfície lisa e células com superfície hemiesférica e paredes anticlinais poligonais (Figura 1D). Idioblastos contendo rafídeos foram observados no tecido secretor de todas as espécies analisadas, exceto *C. purum* (Figura 1F).

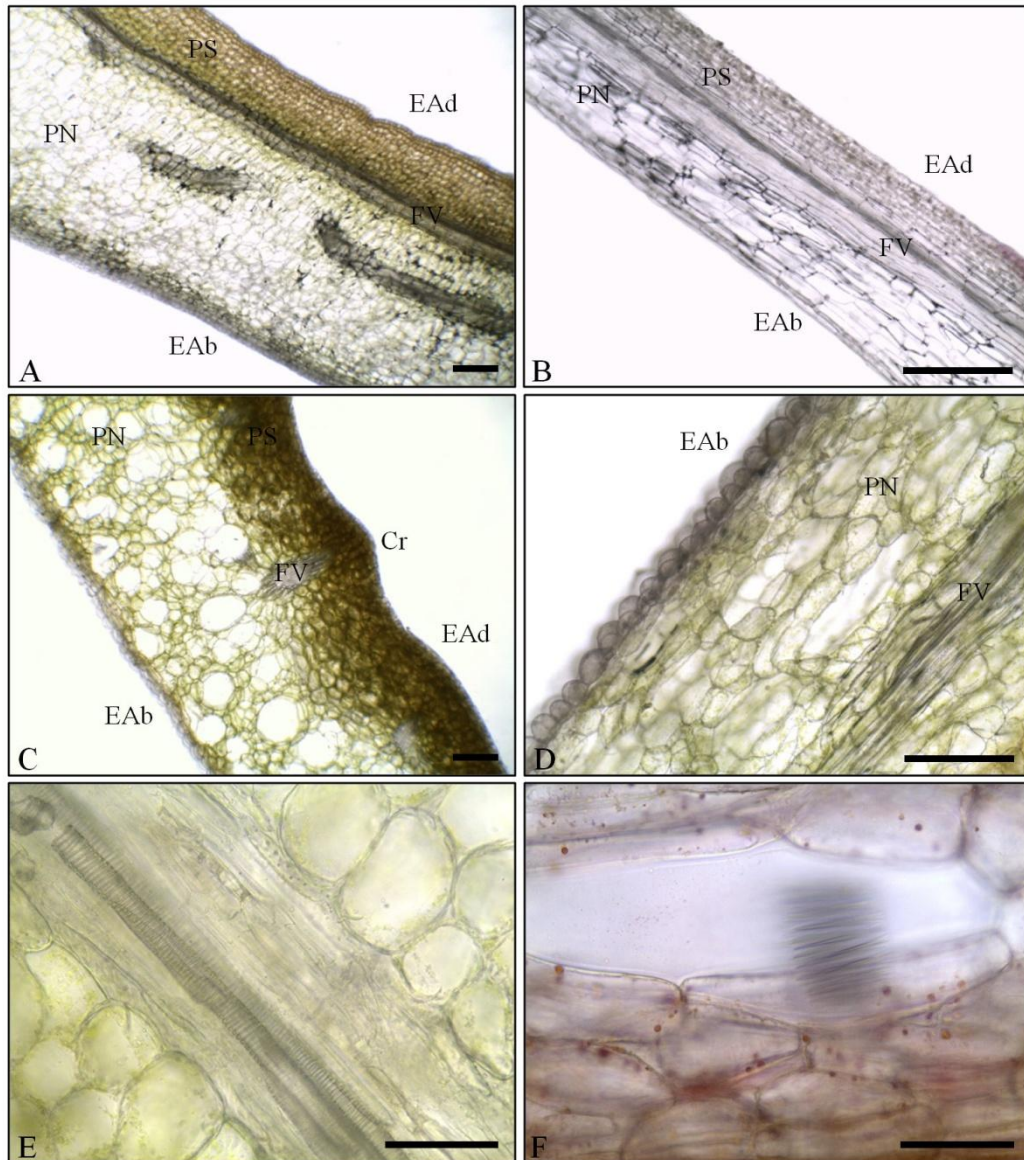


Figura 1 - Anatomia geral do labelo de *Catasetum*: A, Corte longitudinal em *C. purum*. B, Corte longitudinal em *C. bicolor*. C, Corte transversal em *C. planiceps*. D, Detalhe da epiderme abaxial em *C. matogrossense*. E, Detalhe dos feixes vasculares em *C. integerrimum*. F, Idioblasto contendo rafídeos em *C. macrocarpum*. Escala: A - D = 200  $\mu$ m; E - F = 50  $\mu$ m. EAd = epiderme adaxial; PS = parênquima secretor; FV = feixe vascular; PN = parênquima não-secretor; EAb = epiderme abaxial; Cr = crista.

### 3.3.2 Diversidade morfológica

Foram analisadas 4 espécies (apenas flores masculinas) para o Clado A (Figura 2). Em *C. integerrimum*, *C. macroglossum* e *C. viridiflavum* o labelo galeiforme envolve os estaminódios da coluna e suas margens são majoritariamente lisas. Nestas espécies a superfície adaxial possui leves cristas percorrendo todo o labelo. Em *C. integerrimum* não ocorre a formação de estruturas glandulares. Em *C. macroglossum* existe um espessamento com superfície lisa no ápice do labelo, posicionado em frente ao ápice do estaminódio funcional. Em *C. viridiflavum* existe um espessamento com superfície rugosa localizado no fundo do labelo, em frente a uma pequena cavidade saquiforme e ao ápice do estaminódio funcional. *C. expansum* possui labelo relativamente plano com uma calosidade rugosa extremamente espessa também posicionada em frente à cavidade saquiforme e ao ápice do estaminódio funcional. As margens de seu labelo são levemente serrilhadas.

Foram analisadas 6 espécies (apenas flores masculinas) para o Clado B (Figuras 3 e 4). O labelo destas espécies varia de côncavo a galeiforme com a maior parte da extensão de ambos estaminódios tocando sua superfície. A superfície adaxial é majoritariamente lisa, porém existem cristas na metade basal do labelo. *C. purum* e *C. mattosianum* também possuem rugas nesta região do labelo. Quatro espécies têm espessamentos no ápice do labelo, sendo rugosa em *C. atratum* e lisa em *C. luridum*, *C. mattosianum* e *C. cernuum*. *C. purum* apresenta o tecido secretor homogeneamente distribuído, embora existam áreas do labelo com diferentes espessuras. Quase todas as espécies (exceto *C. luridum*) têm as margens do labelo serrilhadas.

Foram analisadas as duas espécies (apenas flores masculinas de *C. ochraceum* e *C. planiceps*) do Clado C (Figura 5). Ambas espécies têm labelo galeiforme. A superfície adaxial é majoritariamente lisa, porém existem leves cristas na metade basal do labelo. Não ocorre a formação de estruturas glandulares. As margens dos labelos são levemente serrilhadas.



Figura 2 - Morfologia floral das espécies do clado A da filogenia de *Catasetum*: A, Vista frontal de *C. expansum* com detalhe dos estaminódios assimétricos. B, Seção longitudinal do labelo de *C. expansum*; acima coloração natural e abaixo amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. C, Vista frontal de *C. integerrimum*. D, Vista lateral de *C. integerrimum*. E, Seção longitudinal do labelo de *C. integerrimum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. F, Vista lateral de *C. macroglossum*. G, Seção longitudinal do labelo de *C. macroglossum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. H, Flores de *C. viridiflavum*. Escala = 1 cm. CS = cavidade saquiforme; E = espessamento do tecido secretor; C = calosidade. Fotografia H produzida por Eerika Schulz (retirado da internet: [https://www.flickr.com/photos/eerikas\\_bilder/5249110895](https://www.flickr.com/photos/eerikas_bilder/5249110895)).



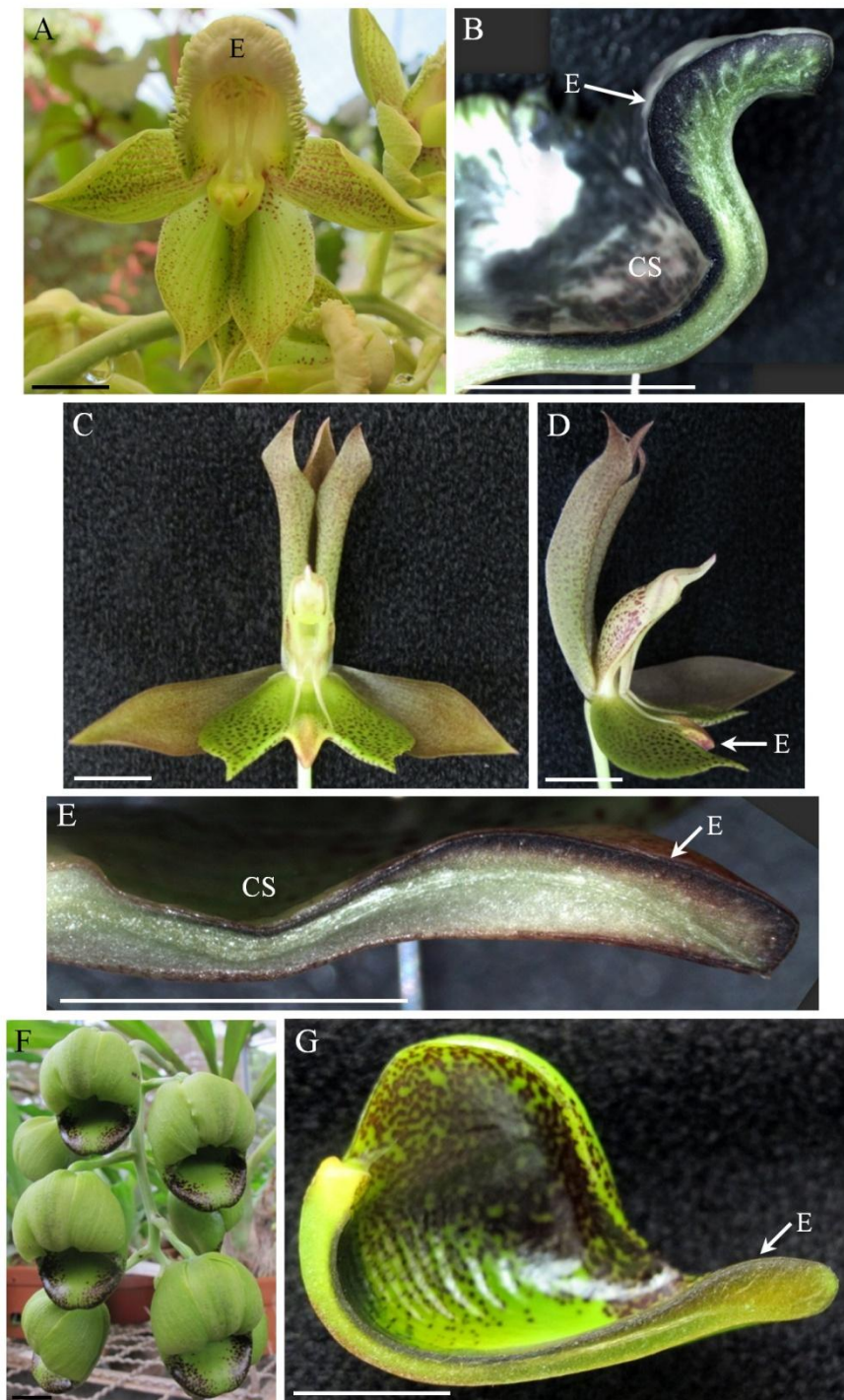


Figura 3 - Morfologia floral das espécies do clado B da filogenia de *Catasetum*: A, Vista frontal de *C. atratum*. B, Seção longitudinal do labelo de *C. atratum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. C, Vista frontal de *C. cernuum*. D, Vista lateral de *C. cernuum*. E, Seção longitudinal do labelo de *C. cernuum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. F, Flores de *C. luridum*. G, Seção longitudinal do labelo de *C. luridum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. Escala = 1 cm. CS = cavidade saquiforme; E = espessamento do tecido secretor.

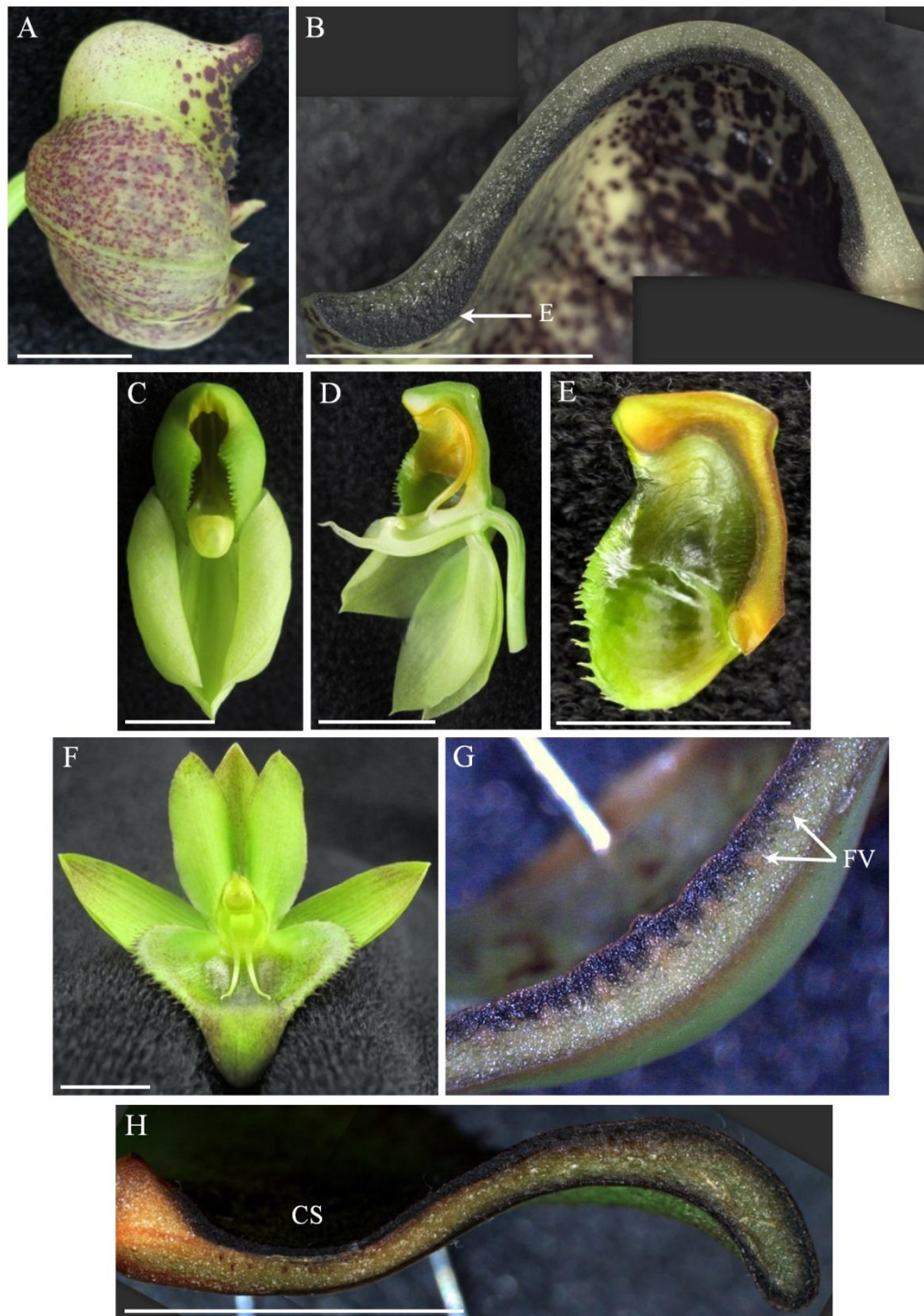


Figura 4 - Morfologia floral das espécies do clado B da filogenia de *Catasetum*: A, Vista lateral de *C. mattosianum*. B, Seção longitudinal do labelo de *C. mattosianum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. C, Vista frontal de *C. purum*. D, Vista lateral de *C. purum* com labelo seccionado. E, Seção longitudinal do labelo de *C. purum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de marrom com Lugol 1%. F, Vista frontal de *C. socco*. G, Detalhe da seção transversal do labelo de *C. socco* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. H, Seção longitudinal do labelo de *C. socco* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. Escala = 1 cm. CS = cavidade saquiforme; E = espessamento do tecido secretor; FV = feixes vasculares.

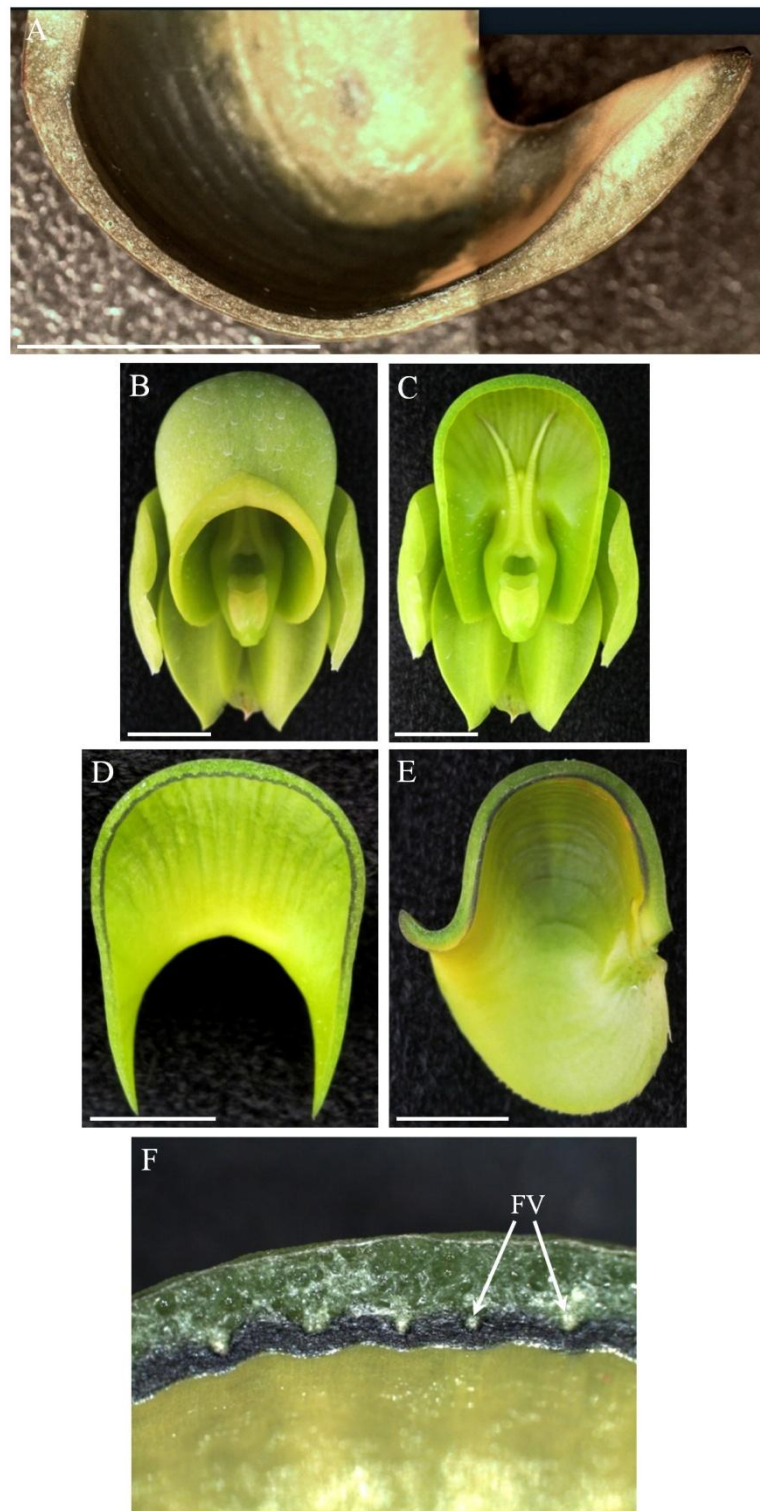


Figura 5 - Morfologia floral das espécies do clado C da filogenia de *Catasetum*: A, Seção longitudinal do labelo de *C. ochraceum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. B, Vista frontal de *C. planiceps*. C, Vista frontal de *C. planiceps* com labelo seccionado evidenciando os estaminódios simétricos. D, Seção transversal do labelo de *C. planiceps* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. E, Seção longitudinal do labelo de *C. planiceps* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. F, Detalhe da seção transversal do labelo de *C. planiceps* evidenciando cristas e tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. Escala = 1 cm. FV = feixes vasculares.

Foram analisadas vinte e nove espécies para o Clado D. A maioria dos exemplares teve apenas flores masculinas analisadas, porém para *C. fimbriatum* também foram analisadas flores femininas. A morfologia e anatomia do labelo apresentaram extensas variações, cujas características serão descritas de acordo com o sub-clado. Para o subclado *C. cirrhaeoides* - *C. schunkei* foram analisadas 5 espécies (Figura 6). Em *C. cirrhaeoides*, *C. complanatum* e *C. pulchrum* o labelo é galeiforme com dois espessamentos do tecido secretor, um basal posicionado abaixo dos ápices unidos de seus curtos estaminódios e outro apical. A superfície adaxial é majoritariamente lisa, porém existem leves cristas em toda a sua extensão. As margens do labelo são lisas. Em *C. denticulatum* o labelo é côncavo, apresentando dois espessamentos, um basal rugoso posicionado abaixo dos ápices unidos de seus curtos estaminódios e outro apical liso. O restante da superfície adaxial é liso. As margens do labelo possuem apêndices digitiformes (denominados "dentículos" na descrição original da espécie). Em *C. tenebrosum* o labelo é relativamente plano com duas calosidades, sendo uma basal rugosa posicionada abaixo dos ápices unidos de seus curtos estaminódios e outra apical lisa. As margens do labelo são serrilhadas e existe uma leve cavidade saquiforme central.

O subclado *C. albovirens* - *C. callosum* teve 5 espécies analisadas (Figuras 7 e 8). Em *C. albovirens* e *C. fuchsii* o labelo é galeiforme e não ocorre a formação de estruturas glandulares. A superfície adaxial é majoritariamente lisa, porém existem cristas em toda sua extensão. As margens dos labelos também são majoritariamente lisas. Em *C. confusum* o labelo é galeiforme, porém em seu interior existe um espessamento apical liso e uma calosidade basal em forma de ferradura, contornando os longos estaminódios. A superfície adaxial é lisa e as margens do labelo são levemente serrilhadas. Em *C. vinaceum* o labelo é côncavo e apresenta um espessamento em seu ápice. A superfície adaxial é lisa e as margens do labelo são serrilhadas. Em *C. dupliciscutulatum* o labelo é côncavo com um espessamento apical rugoso e uma calosidade contendo dois cornos posicionado no interior da cavidade saquiforme, separando seus longos estaminódios. A superfície adaxial é lisa e as margens do labelo são serrilhadas.

O subclado *C. osculatum* + *C. saccatum* teve as duas espécies analisadas (Figura 8). Ambas apresentam o labelo côncavo com as bordas retrorsas. Uma calosidade contorna a entrada da cavidade saquiforme. A superfície adaxial é lisa e as margens do labelo são ciliadas.



Figura 6 - Morfologia floral das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Vista frontal e lateral de *C. cirrhaeoides*. B, Seção longitudinal do labelo de *C. cirrhaeoides* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. C, Vista frontal de *C. complanatum*. D, Vista lateral de *C. complanatum*. E, Seção longitudinal do labelo de *C. complanatum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. F, Vista lateral de *C. pulchrum*. G, Vista frontal de *C. pulchrum*. H, Seção longitudinal do labelo de *C. pulchrum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. I, Vista frontal de *C. denticulatum* com detalhe da seção longitudinal do labelo evidenciando amido contido no tecido secretor corado de marrom com Lugol 1%. J, Vista frontal de *C. tenebrosum*. Escala = 1 cm. CS = cavidade saquiforme; E = espessamento do tecido secretor; C = calosidade. Fotografia J produzida por ian (retirado da internet: <http://www.rv-orchidworks.com/orchidtalk/orchids-other-genera-bloom/31991-catasetum-tenebrosum.html>).



Figura 7 - Morfologia floral das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Vista frontal de *C. albovirens*. B, Vista lateral de *C. albovirens*. C, Vista frontal de *C. fuchsii*. D, Vista lateral de *C. confusum*. E, Vista frontal de *C. confusum* com detalhe de sua calosidade basal. F, Vista lateral de *C. fuchsii*. G, Seção longitudinal do labelo de *C. confusum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. H, Seção longitudinal do labelo de *C. albovirens* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. I, Seção longitudinal do labelo de *C. fuchsii* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. Escala = 1 cm. E = espessamento do tecido secretor.

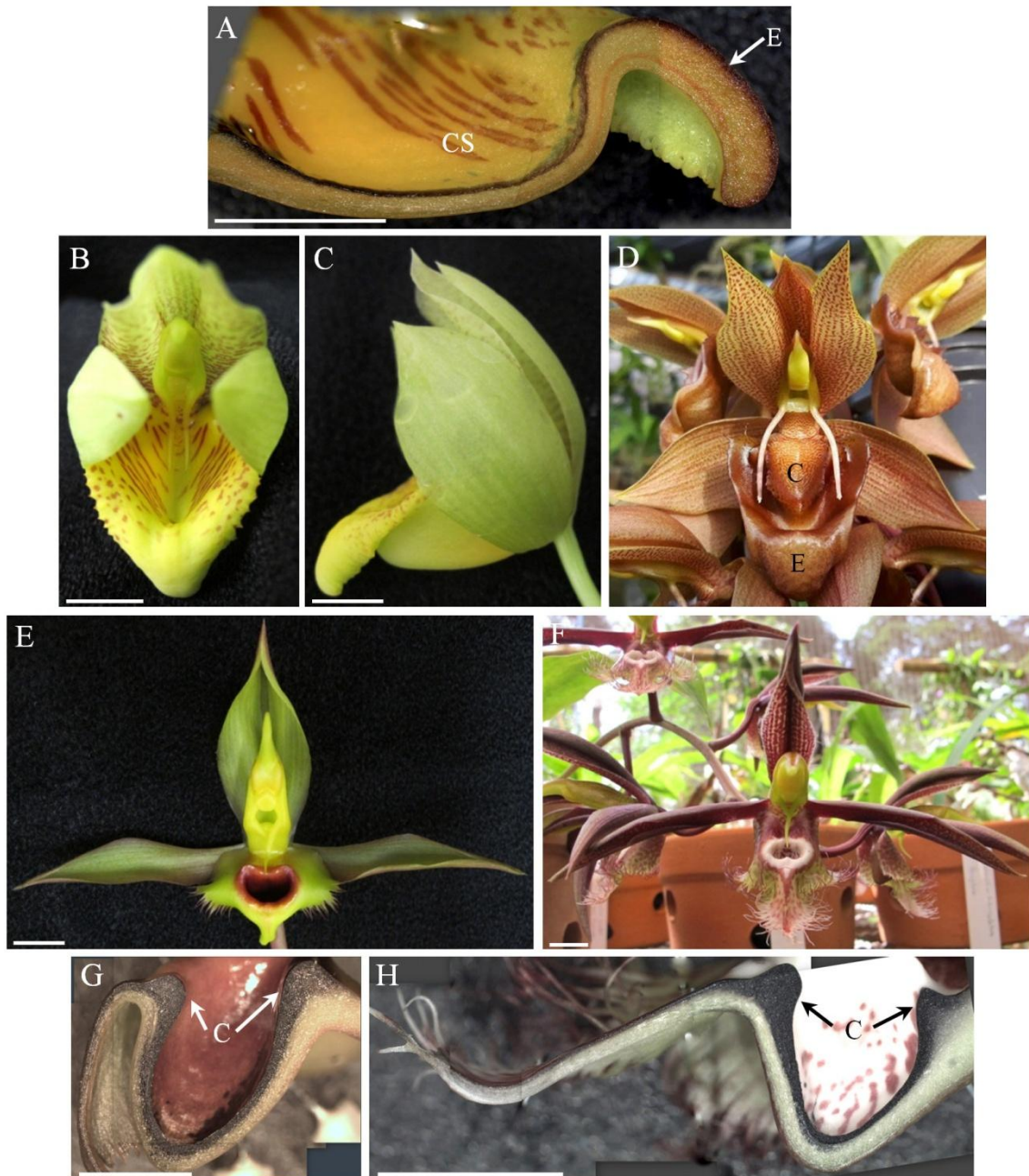


Figura 8 - Morfologia floral das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Seção longitudinal do labelo de *C. vinaceum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. B, Vista frontal de *C. vinaceum*. C, Vista lateral de *C. vinaceum*. D, Vista frontal de *C. dupliciscutulatum*. E, Vista frontal de *C. osculatum*. F, Vista frontal de *C. saccatum*. G, Seção longitudinal do labelo de *C. osculatum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. H, Seção longitudinal do labelo de *C. saccatum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. Escala = 1 cm. CS = cavidade saquiforme; E = espessamento do tecido secretor; C = calosidade. Fotografia D cedida por Juan F. Gómez.

O subclado *C. discolor* - *C. longifolium* teve apenas uma espécie analisada (Figura 9). Em *C. discolor* o labelo é galeiforme e não ocorre a formação de estruturas glandulares. A superfície adaxial é lisa e as margens do labelo são serrilhadas.

As demais espécies do clado D ficaram colapsadas em uma grande politomia, das quais 15 espécies foram analisadas (Figuras 9 a 12). Em *C. aff. ciliatum* e *C. gardneri* o labelo é galeiforme e não ocorre a formação de estruturas glandulares. A superfície adaxial é lisa e as margens do labelo são ciliadas. Em *C. ciliatum* o labelo é côncavo e triangular, não ocorrendo a formação de estruturas glandulares. A superfície adaxial é lisa e apresenta tricomas em sua metade apical. As margens do labelo são ciliadas. Em *C. gnomus* o labelo é côncavo com as bordas retrorsas e margens serrilhadas. Em *C. schmidtianum* o labelo é côncavo com as bordas apenas dobradas e margens ciliadas. Em ambas espécies ocorre uma calosidade posicionada na dobra do tecido entre a borda e a cavidade saquiforme, sendo mais evidente no ápice do labelo, em frente ao ápice do estaminódio funcional. Em *C. pileatum* o labelo é côncavo com um espessamento posicionado em frente à cavidade saquiforme. Em *C. macrocarpum* o labelo é galeiforme e apresenta um espessamento em seu ápice. Nestas últimas quatro espécies, a superfície adaxial é lisa (*C. gnomus* e *C. macrocarpum*) ou apresenta rugas, que podem cobrir toda a sua extensão (*C. schmidtianum*) ou localizadas apenas na borda do labelo (*C. pileatum*). Em *C. maranhense* e *C. hopkinsonianum* o labelo é galeiforme com margens parcialmente serrilhadas (*C. maranhense*) ou completamente lisas (*C. hopkinsonianum*). Ambas espécies têm cristas na superfície adaxial, porém *C. hopkinsonianum* ainda apresenta rugas na base do labelo (abaixo dos longos estaminódios). Em *C. rooseveltianum* o labelo é côncavo com as margens extremamente engrossadas, superfície adaxial e margens lisas. Nestas três espécies o tecido secretor está homeogeneamente distribuído (exceto nas rugas de *C. hopkinsonianum*), embora as margens do labelo sejam bastante espessas em *C. hopkinsonianum* e *C. rooseveltianum*. Em *C. paraguayense* e *C. juruenensis* o labelo é triangular e quase plano com uma cavidade saquiforme central. As margens do labelo possuem apêndices digitiformes em ambas espécies, cuja denominação utilizada na descrição original é "ciliada e grosseiramente verrucosa" para *C. paraguayense* e "dentículos" para *C. juruenensis*, respectivamente. Uma calosidade basal e um espessamento rugoso apical estão presentes em *C. paraguayense*. Dois espessamentos estão presentes em *C. juruenensis*, sendo um apical muito sutil e um basal bastante espesso. A superfície adaxial é lisa em *C. paraguayense* ou apresenta cristas em *C. juruenensis*. Em *C. matogrossense* o labelo é galeiforme e não ocorre a formação de estruturas glandulares. A superfície adaxial apresenta cristas em toda sua extensão e rugas na



metade basal do labelo, posicionadas em frete ao ápice dos estaminódios. Nas flores masculinas de *C. fimbriatum* o labelo é côncavo com a borda enrolada apenas no ápice e margens fimbriadas. Uma calosidade ocorre no ápice do labelo, posicionada em frente ao ápice dos estaminódios convergentes. Nas flores femininas desta espécie o labelo é galeiforme com as margens predominantemente lisas. Não ocorre a formação de estruturas glandulares. A superfície adaxial em flores de ambos sexos possuem cristas, porém muito mais proeminentes nas flores femininas. *C. bicolor* e *C. boyi* têm o labelo diminuto, cônico e lobado composto por poucas camadas de células. Em *C. bicolor* existem duas calosidades compridas e laterais no interior do labelo, envolvendo os estaminódios. Em *C. boyi* existe uma calosidade basal no interior do labelo, em forma de ferradura, envolvendo os estaminódios. Em ambas espécies apenas o ápice dos estaminódios toca o fundo da cavidade saquiforme. As margens dos lobos são lisas em *C. bicolor* e serrilhadas em *C. boyi*.



Figura 9 - Morfologia floral das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Vista frontal de *C. discolor*. B, Seção longitudinal do labelo de *C. discolor* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. C, Vista frontal de *C. ciliatum*. D, Vista frontal de *C. aff. ciliatum*. E, Seção longitudinal do labelo de *C. aff. ciliatum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. F, Vista frontal de *C. gardneri*. G, Seção longitudinal do labelo de *C. gardneri* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. H, Vista lateral de *C. discolor*. I, Vista lateral de *C. aff. ciliatum*. J, Vista lateral de *C. gardneri*. Escala = 1 cm. Fotografia C cedida por Juan F. Gómez .



Figura 10 - Morfologia floral das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Vista frontal de *C. gnomus*. B, Vista frontal de *C. schmidtianum*. C, Seção longitudinal do labelo de *C. gnomus* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. D, Seção longitudinal do labelo de *C. schmidtianum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. E, Vista frontal de *C. pileatum*. F, Vista frontal de *C. macrocarpum* com detalhe dos estaminódios no interior do labelo. G, Vista lateral de *C. macrocarpum*. H, Seção longitudinal do labelo de *C. pileatum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. I, Seção longitudinal do labelo de *C. macrocarpum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. Escala = 1 cm. CS = cavidade saquiforme; E = espessamento do tecido secretor; C = calosidade.

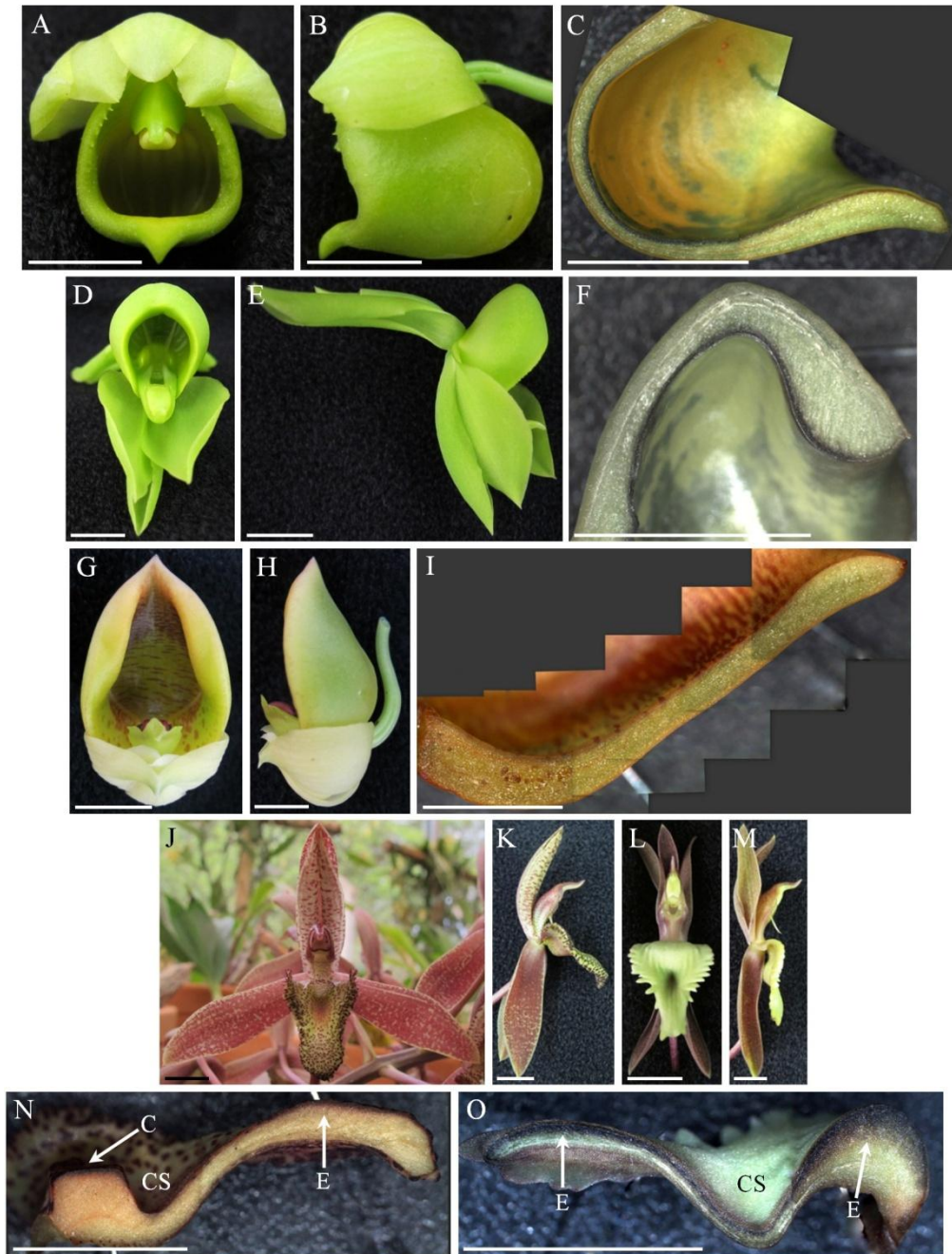


Figura 11 - Morfologia floral das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Vista frontal de *C. maranhense*. B, Vista lateral de *C. maranhense*. C, Seção longitudinal do labelo de *C. maranhense* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. D, Vista frontal de *C. hopkinsonianum*. E, Vista lateral de *C. hopkinsonianum*. F, Seção longitudinal do labelo de *C. hopkinsonianum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. G, Vista frontal de *C. rooseveltianum*. H, Vista lateral de *C. rooseveltianum*. I, Seção longitudinal do labelo de *C. rooseveltianum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de marrom com Lugol 1%. J, Vista frontal de *C. paraguayense*. K, Vista lateral de *C. paraguayense*. L, Vista frontal de *C. juruenensis*. M, Vista lateral de *C. juruenensis*. N, Seção longitudinal do labelo de *C. paraguayense* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. O, Seção longitudinal do labelo de *C. juruenensis* evidenciando tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. Escala = 1 cm. CS = cavidade saquiforme; E = espessamento do tecido secretor; C = calosidade.



Figura 12 - Morfologia floral das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Vista frontal de *C. matogrossense*. B, Vista lateral de *C. matogrossense*. C, Seção longitudinal do labelo de *C. matogrossense* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. D, Vista frontal de flor masculina de *C. fimbriatum* com detalhe dos estaminódios convergentes. E, Vista lateral de flor masculina de *C. fimbriatum*. F, Seção longitudinal do labelo de flor masculina de *C. fimbriatum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. G, Vista frontal de flor feminina de *C. fimbriatum*. H, Vista lateral de flor feminina de *C. fimbriatum*. I, Seção longitudinal do labelo de flor feminina de *C. fimbriatum* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1% e com detalhe de suas

proeminentes cristas. J, Vista frontal de *C. bicolor*. K, Vista lateral de *C. bicolor*. L, Detalhe do interior do labelo e estaminódios de *C. bicolor*. M, Vista frontal de *C. boyi*. N, Vista lateral de *C. boyi* (sépala seccionada para melhor visualização do labelo). O, Seção longitudinal do labelo de *C. bicolor* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de marrom com Lugol 1%. P, Seção longitudinal do labelo de *C. boyi* evidenciando amido contido no tecido secretor corado de preto com Lugol 1%. Escala = 1 cm. CS = cavidade saquiiforme; C = calosidade.

---

### 3.3.3 Diversidade anatômica

Clado A (Figura 13) - Os osmóforos de *C. expansum*, *C. macroglossum* e *C. integerrimum* apresentaram células epidérmicas com superfície tabular e paredes anticlinais tetragonais, seguidas por cerca de 15 camadas de parênquima secretor (exceto em estruturas glandulares).

Clado B (Figuras 14 e 15) - Os osmóforos são compostos por células epidérmicas com superfície tabular (*C. atratum*, *C. cernuum* e *C. luridum*) ou convexa (*C. mattosianum*, *C. purum* e *C. socco*) e paredes anticlinais tetragonais, seguidas por cerca de 15 camadas de parênquima secretor (exceto em estruturas glandulares). Em *C. luridum*, *C. mattosianum* e *C. socco*, próximo ao ápice do labelo, a superfície das células epidérmicas gradativamente muda de forma (aumento da curvatura) e apresentam a superfície papilosa em seu ápice.

Clado C (Figura 16) - O osmóforo de *C. planiceps* apresenta células epidérmicas com superfície convexa e paredes anticlinais tetragonais em toda sua extensão. O osmóforo de *C. ochraceum* apresenta células epidérmicas com superfície convexa e paredes anticlinais tetragonais na porção basal do labelo. A superfície destas células gradativamente aumenta a curvatura, sendo papilosas na porção apical do labelo. O parênquima secretor de ambas espécies é composto por cerca de 10 camadas.

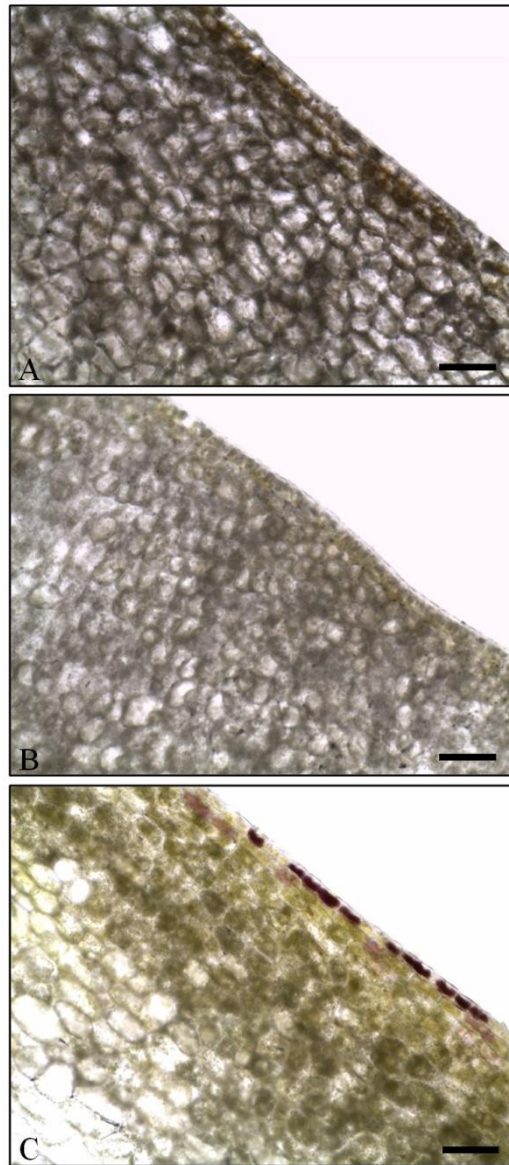


Figura 13 - Anatomia labelar das espécies do clado A da filogenia de *Catasetum*: A, Seção longitudinal de *C. expansum*. B, Seção longitudinal de *C. macroglossum*. C, Seção longitudinal de *C. integerrimum*. Escala = 100  $\mu\text{m}$ .

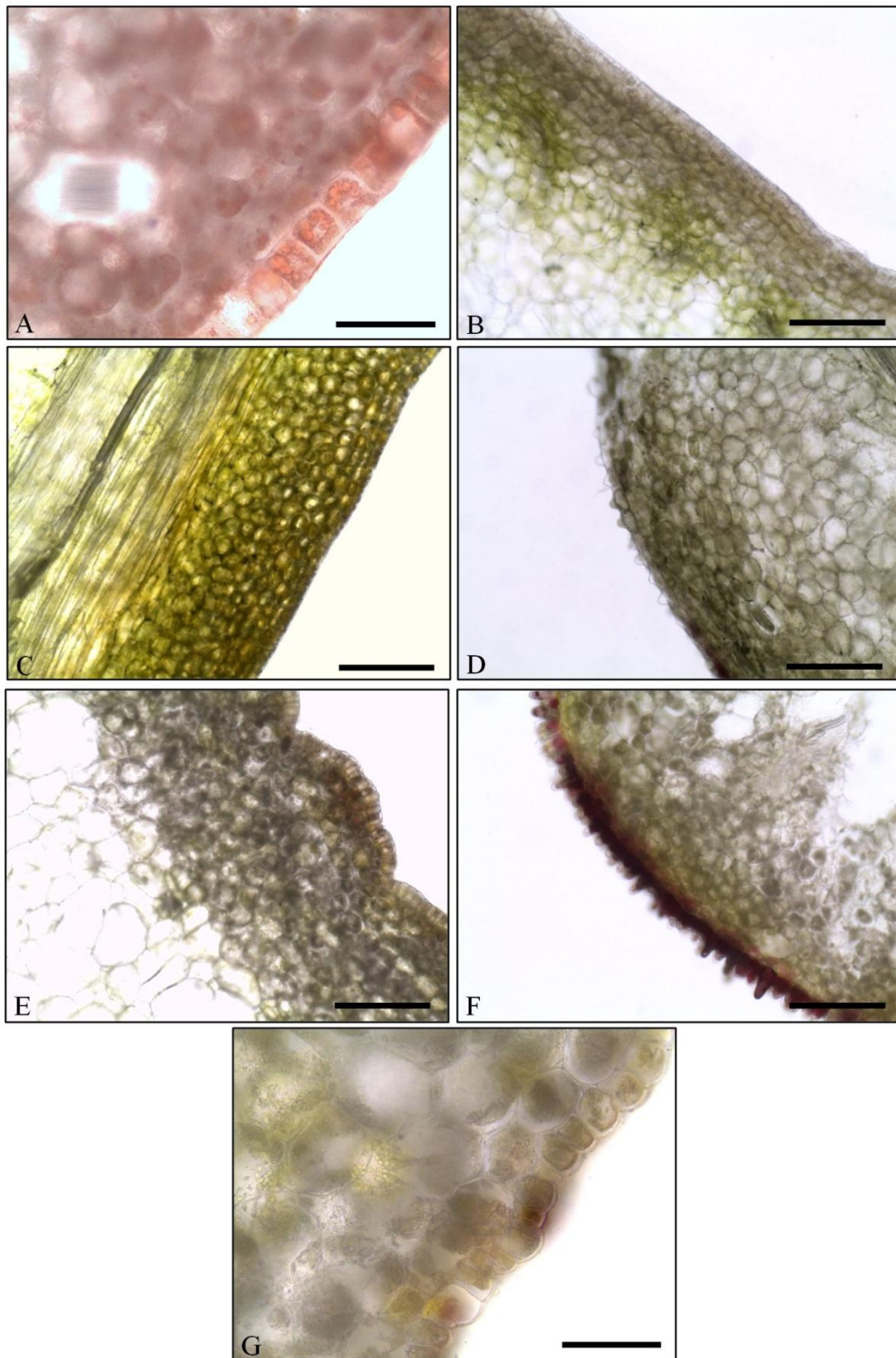


Figura 14 - Anatomia labelar das espécies do clado B da filogenia de *Catasetum*: A, Seção longitudinal de *C. atratum* (corado com Vermelho de Sudão III). B, Seção longitudinal de *C. cernuum*. C, Seção longitudinal de *C. luridum*. D, Seção longitudinal do ápice em *C. luridum*. E, Seção longitudinal da metade basal em *C. mattosianum* evidenciando as rugas. F, Seção longitudinal do ápice em *C. mattosianum*. G, Seção longitudinal de *C. mattosianum*. Escala: A e G = 50  $\mu$ m; B - F = 200  $\mu$ m.



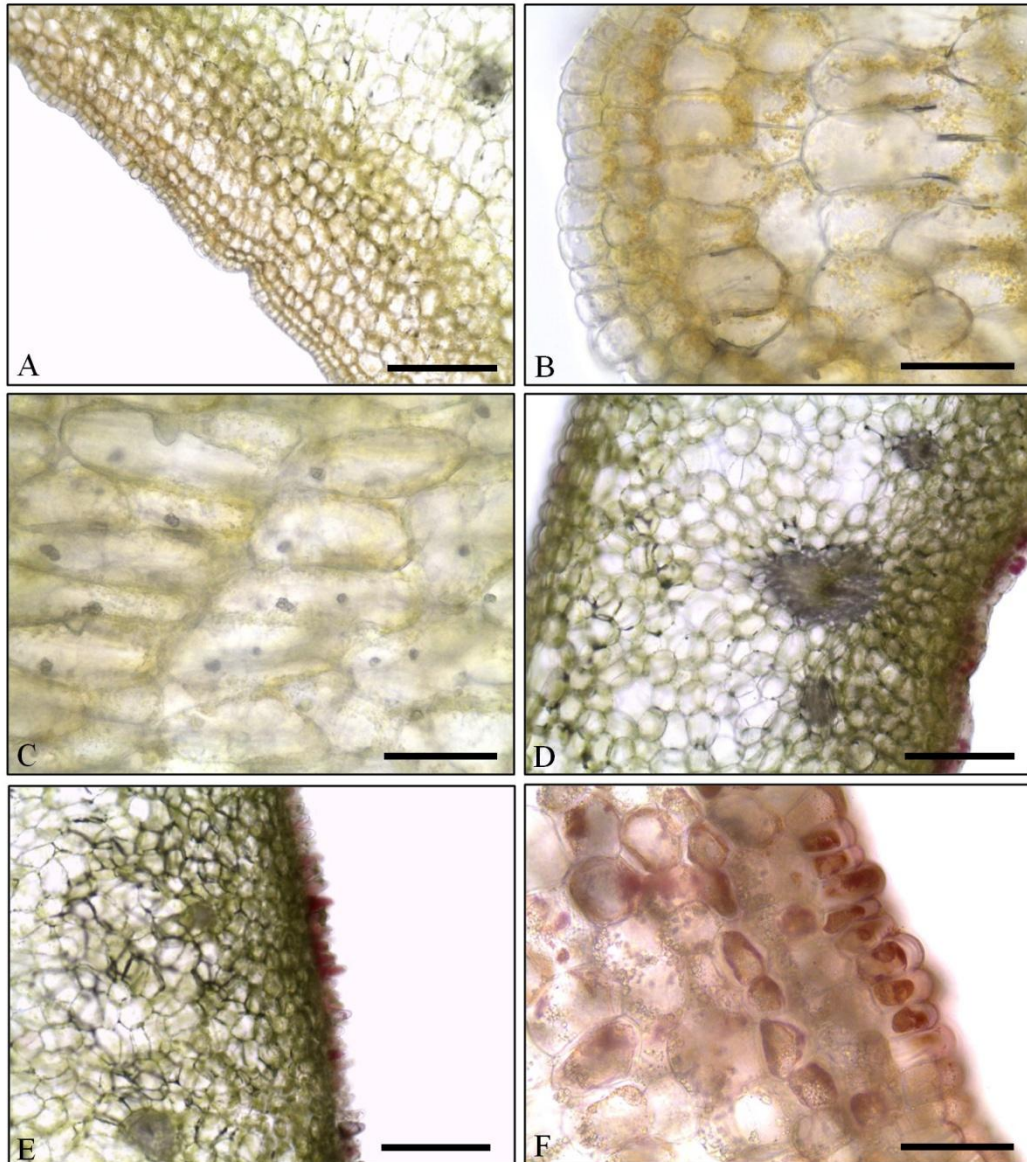


Figura 15 - Anatomia labelar das espécies do clado B da filogenia de *Catasetum*: A, Seção longitudinal de *C. purum*. B, Seção longitudinal da metade basal em *C. purum* evidenciando ruga. C, Seção longitudinal de *C. purum* evidenciando drusas. D, Seção transversal de *C. socco*. E, Seção longitudinal do ápice em *C. socco*. F, Seção longitudinal de *C. socco* (corado com Vermelho de Sudão III). Escala: A, D e E = 200  $\mu\text{m}$ ; B, C e F = 50  $\mu\text{m}$ .

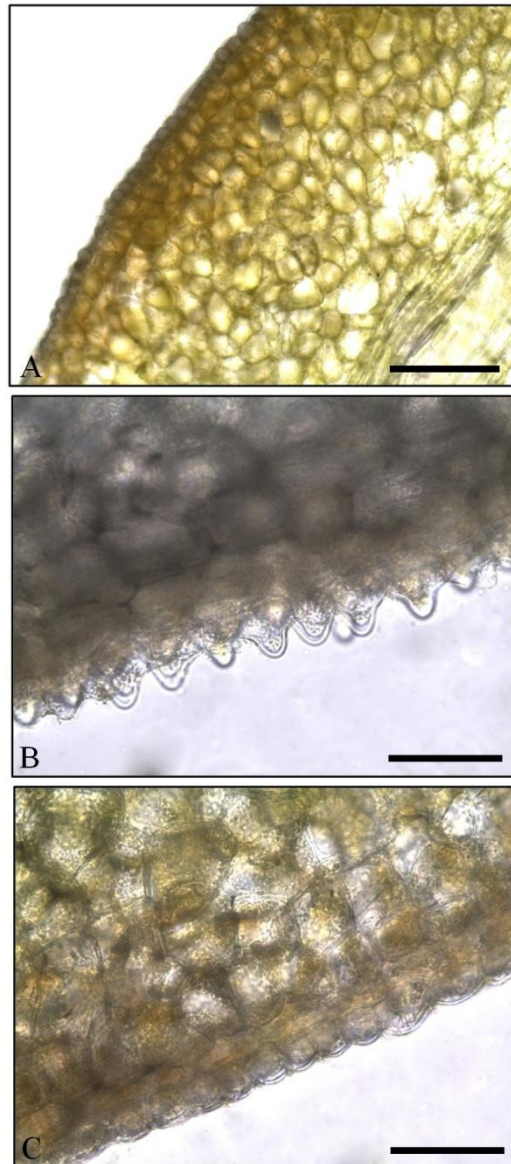


Figura 16 - Anatomia labelar das espécies do clado C da filogenia de *Catasetum*: A, Seção longitudinal de *C. planiceps*. B, Seção longitudinal da metade apical em *C. ochraceum*. C, Seção longitudinal da metade basal em *C. ochraceum*. Escala: A = 200  $\mu\text{m}$ ; B e C = 50  $\mu\text{m}$ .

Clado D - Subclado *C. cirrhaeoides* - *C. schunkei* (Figuras 17 e 18): Os osmóforos em *C. complanatum* e *C. pulchrum* possuem células epidérmicas tabulares e tetragonais sobre o espessamento, tornando-se gradativamente tetragonais-alongadas nas demais áreas, exceto nas margens do labelo onde são papilosas e tetragonais. Em *C. cirrhaeoides* o osmóforo apresenta células epidérmicas convexas e tetragonais em sua maior parte (inclusive no espessamento), que aumentam de curvatura próximo ao ápice do labelo, onde também são papilosas. O parênquima secretor nestas três espécies é composto por cerca de 6 camadas (exceto nas calosidades). O osmóforo em *C. denticulatum* apresenta células epidérmicas convexas e tetragonais em sua maior parte, gradativamente tornando-se hemiesféricas no espessamento apical e papilosas nos apêndices digitiformes.

Subclado *C. albovirens* - *C. callosum* (Figuras 18 e 19): O osmóforo de *C. albovirens* tem células epidermais hemiesféricas e tetragonais e cerca de 8 camadas de parênquima secretor em toda sua extensão. O osmóforo de *C. fuchsii* tem células epidermais tabulares e tetragonais e cerca de 8 camadas de parênquima secretor no terço basal, abaixo dos ápices unidos de seus curtos estaminódios. No restante de sua extensão, as células epidérmicas gradativamente aumentam em comprimento e passam a ser tetragonais-alongadas com cerca de 3 camadas de parênquima secretor. O osmóforo de *C. confusum* apresenta células epidérmicas convexas e tetragonais, seguidas por cerca de 6 camadas de parênquima secretor (exceto no espessamento). O osmóforo de *C. vinaceum* tem células epidermais hemiesféricas e tetragonais na metade basal, que gradativamente aumentam a curvatura e tornam-se papilosas sobre o espessamento. O parênquima secretor contém cerca de 6 camadas (exceto no espessamento).

Subclado *C. osculatum* + *C. saccatum* (Figura 19): Os osmóforos de ambas espécies possuem células epidérmicas tabulares e tetragonais, seguidas por cerca de 10 camadas de parênquima secretor (exceto nas calosidades).

Subclado *C. discolor* - *C. longifolium* (Figura 19): O osmóforo de *C. discolor* apresenta epiderme com tricomas glandulares, multicelulares e não-ramificados na metade apical que gradativamente diminuem de tamanho até células papilosas na base do labelo. Os tricomas são compostos por células unisseriadas, não-diferenciadas, curtas e levemente cônicas. O parênquima secretor é composto por cerca de 10 camadas.

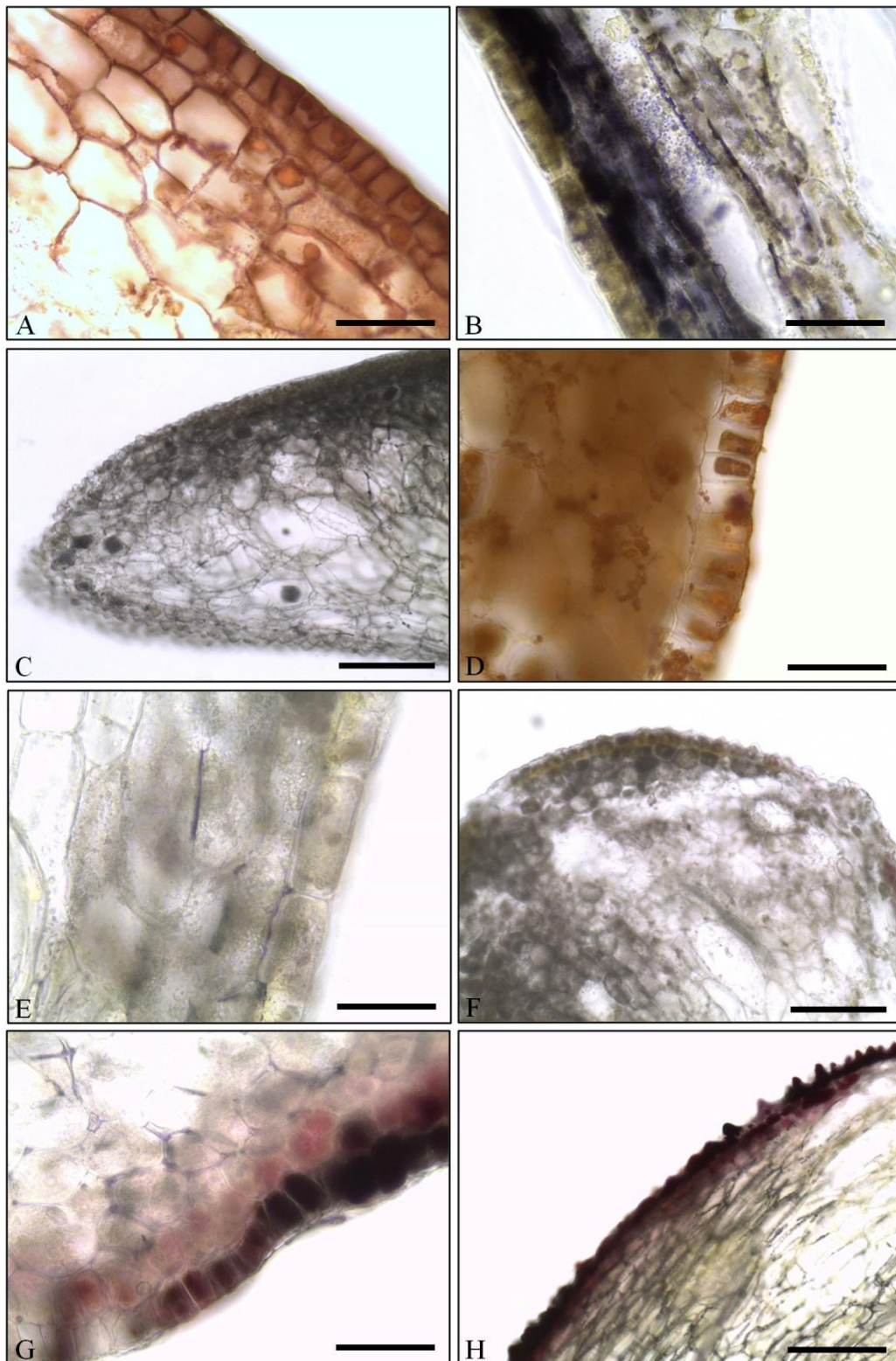


Figura 17 - Anatomia labelar das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Seção longitudinal do espessamento em *C. complanatum* (corado com Vermelho de Sudão IV). B, Seção longitudinal de *C. complanatum* (corado com Lugol 1%). C, Seção longitudinal do ápice em *C. complanatum*. D, Seção longitudinal do espessamento em *C. pulchrum* (corado com Vermelho de Sudão III). E, Seção longitudinal de *C. pulchrum*. F, Seção longitudinal do ápice em *C. pulchrum*. G, Seção longitudinal de *C. cirrhaeoides*. H, Seção longitudinal do ápice em *C. cirrhaeoides*. Escala: A, B, D, E, G e H = 50  $\mu$ m; C e F = 200  $\mu$ m.

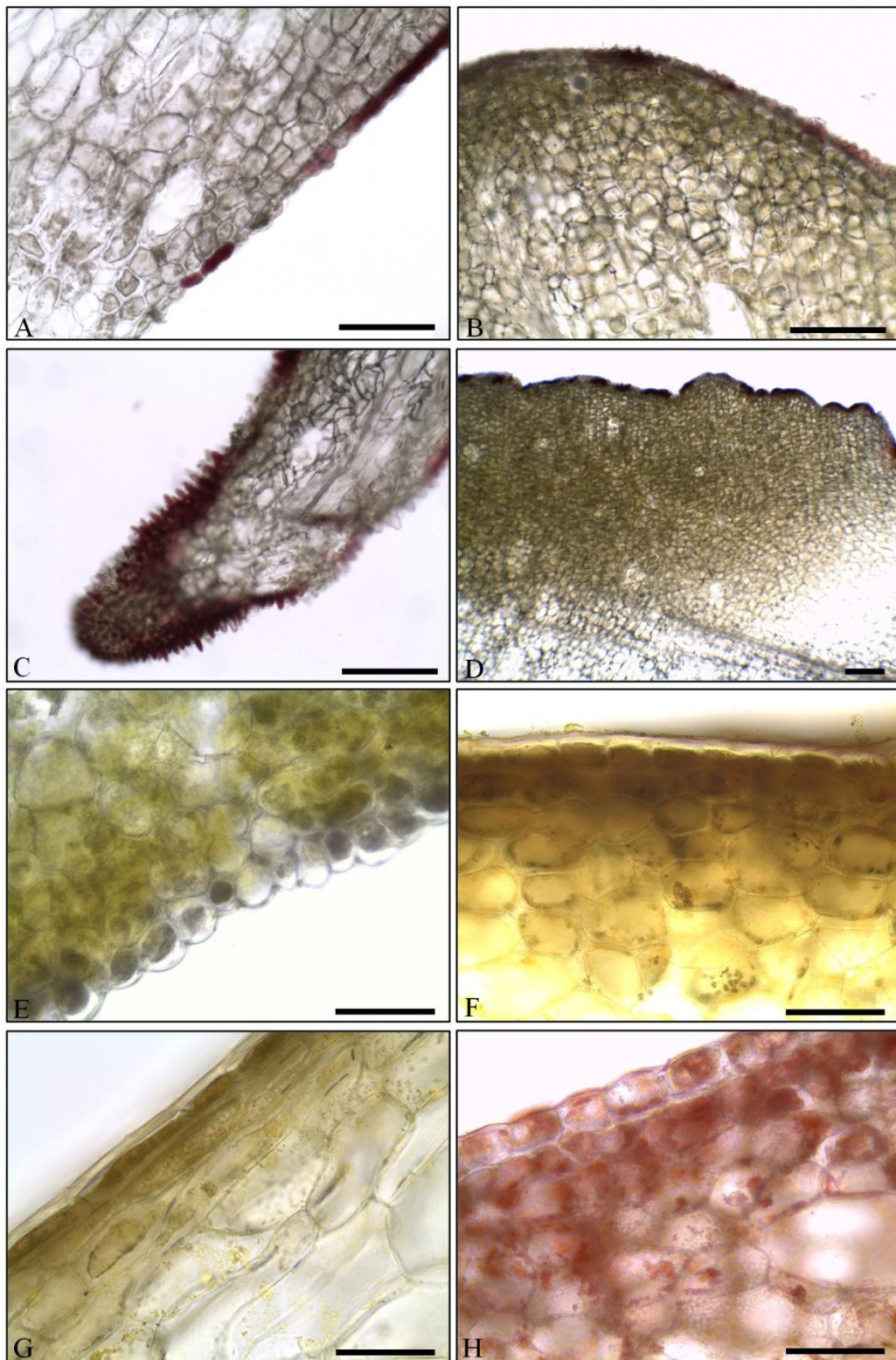


Figura 18 - Anatomia labelar das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Seção longitudinal de *C. denticulatum*. B, Seção longitudinal do espessamento apical em *C. denticulatum*. C, Seção longitudinal de apêndice digitiforme em *C. denticulatum*. D, Seção longitudinal do espessamento basal em *C. denticulatum* evidenciando as rugas. E, Seção longitudinal de *C. albovirens*. F, Seção longitudinal da região basal em *C. fuchsii* (corado com Lugol 1%). G, Seção longitudinal de *C. fuchsii* (corado com Lugol 1%). H, Seção longitudinal de *C. confusum* (corado com Vermelho de Sudão IV). Escala: A - D = 200  $\mu$ m; E - H = 50  $\mu$ m.

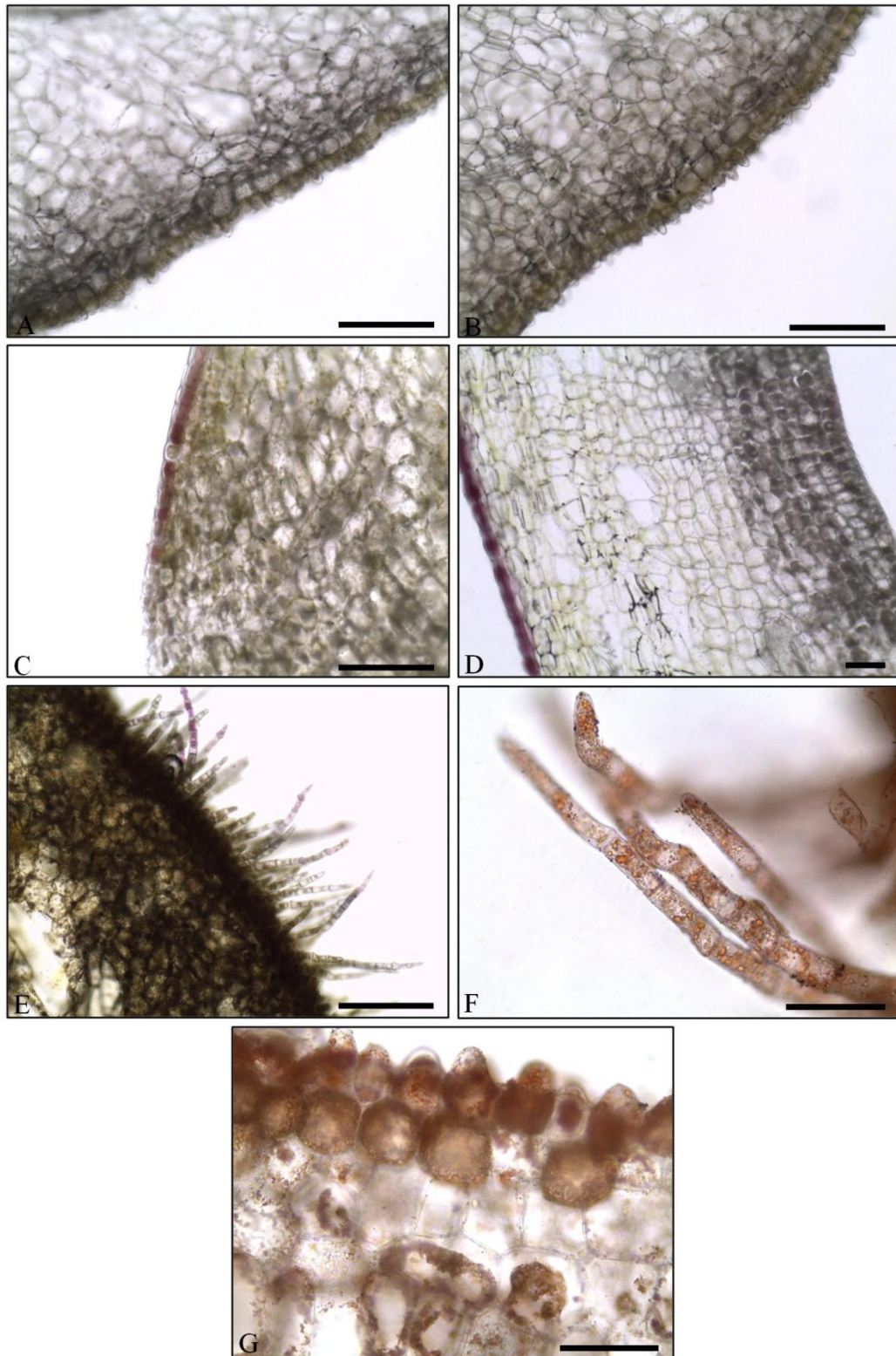


Figura 19 - Anatomia labelar das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Seção longitudinal da metade basal em *C. vinaceum*. B, Seção longitudinal do ápice em *C. vinaceum*. C, Seção longitudinal de *C. osculatum*. D, Seção longitudinal de *C. saccatum*. E, Seção longitudinal do ápice em *C. discolor* (corado com Lugol 1%). F, Tricomas glandulares de *C. discolor* evidenciando gotículas de óleo em seu interior (corado com Vermelho de Sudão III). G, Seção longitudinal da região basal em *C. discolor* (corado com Vermelho de Sudão III). Escala: A - E = 200  $\mu$ m; F - G = 50  $\mu$ m.

Politomia (Figuras 20 a 23): Os osmóforos de *C. aff. ciliatum* e *C. gardneri* apresentam epiderme com longos tricomas glandulares, multicelulares e não-ramificados na metade apical que gradativamente diminuem de tamanho até células hemiesféricas em *C. aff. ciliatum* ou tabulares com esparsas papilas em *C. gardneri* na base do labelo. Os tricomas são compostos por células unisseriadas, não-diferenciadas, alongadas e estreitas. O parênquima secretor é composto por cerca de 10 camadas. Os osmóforos de *C. gnomus*, *C. schmidtianum*, *C. pileatum* e *C. macrocarpum* apresentam células epidérmicas tabulares a convexas e tetragonais em toda sua extensão, seguidas por cerca de 15 camadas de parênquima secretor (exceto nas estruturas glandulares). Os osmóforos em *C. maranhense* e *C. rooseveltianum* apresentam células epidérmicas convexas e tetragonais em toda sua extensão, porém em *C. rooseveltianum* ocorrem esparsas papilas nas margens do labelo. O parênquima secretor nestas duas espécies possui cerca de 8 camadas na porção basal (abaixo dos estaminódios) e cerca de 4 camadas na porção apical do labelo. O osmóforo em *C. hopkinsonianum* apresenta células epidérmicas tabulares e tetragonais, seguidas por cerca de 8 camadas de parênquima secretor (exceto nas rugas). O osmóforo em *C. paraguayense* apresenta células epidérmicas tabulares e tetragonais com esparsas papilas na calosidade basal, tabulares com saliência convexa e tetragonais-alongadas na cavidade saquiforme, gradativamente diminuindo o comprimento em direção ao ápice, e papilosas e tetragonais sobre o espessamento apical. O parênquima secretor é composto por cerca de 8 camadas (exceto nas estruturas glandulares). O osmóforo em *C. juruenensis* apresenta células epidérmicas papilosas e tetragonais em toda sua extensão, seguidas por cerca de 7 camadas de parênquima secretor (exceto nos espessamentos). O parênquima não-secretor é compacto com espaços intercelulares ausentes (exceto no espessamento basal). O osmóforo de *C. matogrossense* apresenta células epidérmicas convexas e tetragonais com parênquima secretor contendo cerca de 7 camadas (exceto nas rugas). Os osmóforos em *C. fimbriatum* apresentam células epidérmicas tabulares e tetragonais nas flores femininas. Nas flores masculinas a epiderme é papilosa e tetragonal. Cerca de 8 camadas de parênquima secretor ocorrem em ambas as flores (exceto na calosidade de flores masculinas). Os osmóforos apresentam células epidérmicas convexas e tetragonais em *C. bicolor* e papilosas e tetragonais em *C. boyi*. Em ambas espécies ocorrem cerca de 6 camadas de parênquima secretor (exceto nas calosidades) e o parênquima não-secretor é compacto (espaços intercelulares ausentes).

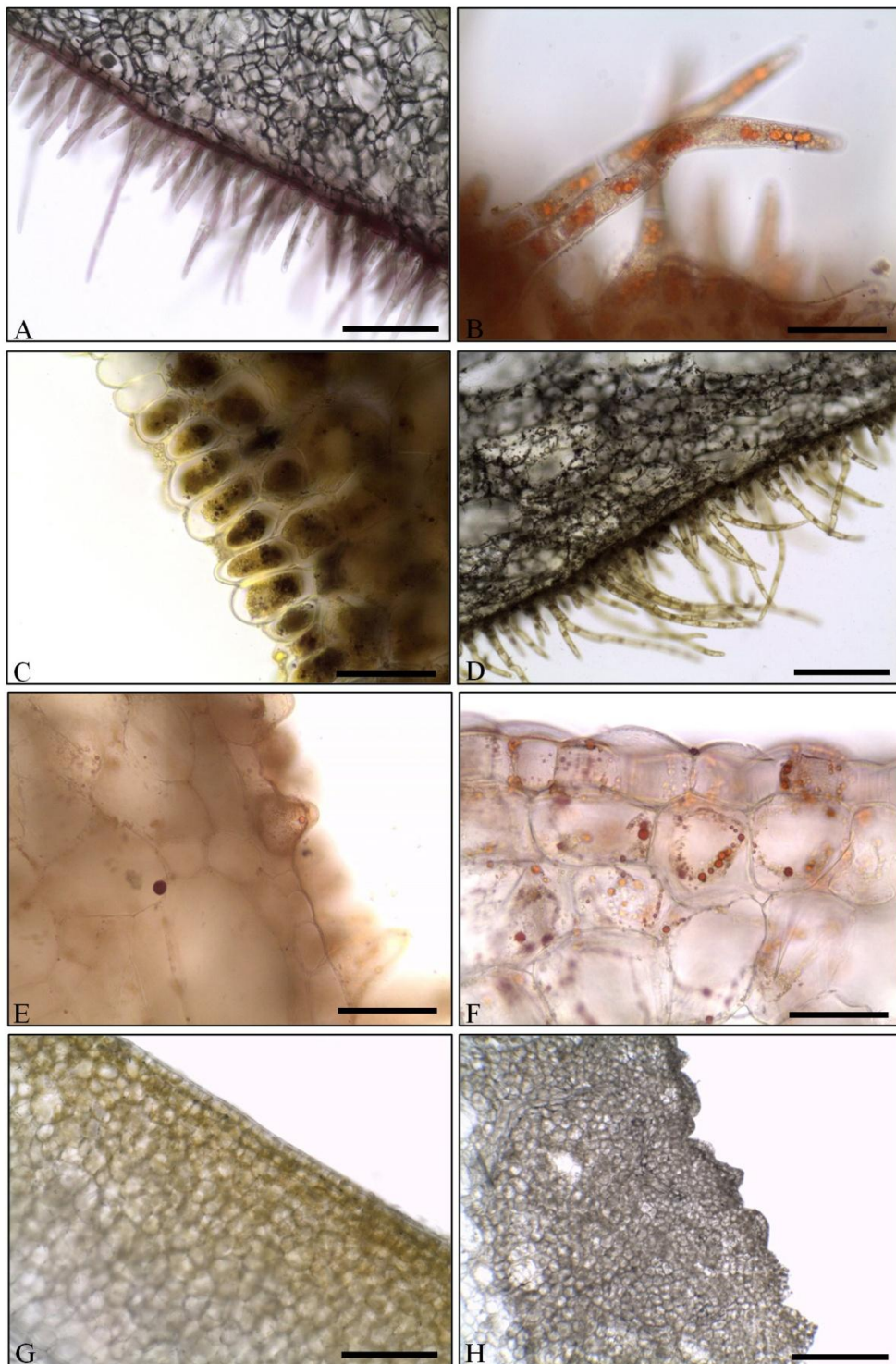


Figura 20 - Anatomia labelar das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Seção longitudinal do ápice em *C. aff. ciliatum*. B, Tricomas glandulares de *C. aff. ciliatum* evidenciando gotículas de óleo em seu interior (corado com Vermelho de Sudão III). C, Seção longitudinal da região basal em *C. aff. ciliatum* (corado com Lugol 1%). D, Seção longitudinal do ápice em *C. gardneri* (corado com Lugol 1%). E, Seção longitudinal da região basal em *C. gardneri* (corado com Vermelho de Sudão III). F, Seção longitudinal de *C. macrocarpum* evidenciando gotículas de óleo (corado com Vermelho de Sudão III). G, Seção longitudinal da cavidade saquiforme em *C. pileatum*. H, Seção longitudinal da borda em *C. pileatum* evidenciando as rugas. Escala: A, D, G e H = 200  $\mu$ m; B, C, E e F = 50  $\mu$ m.



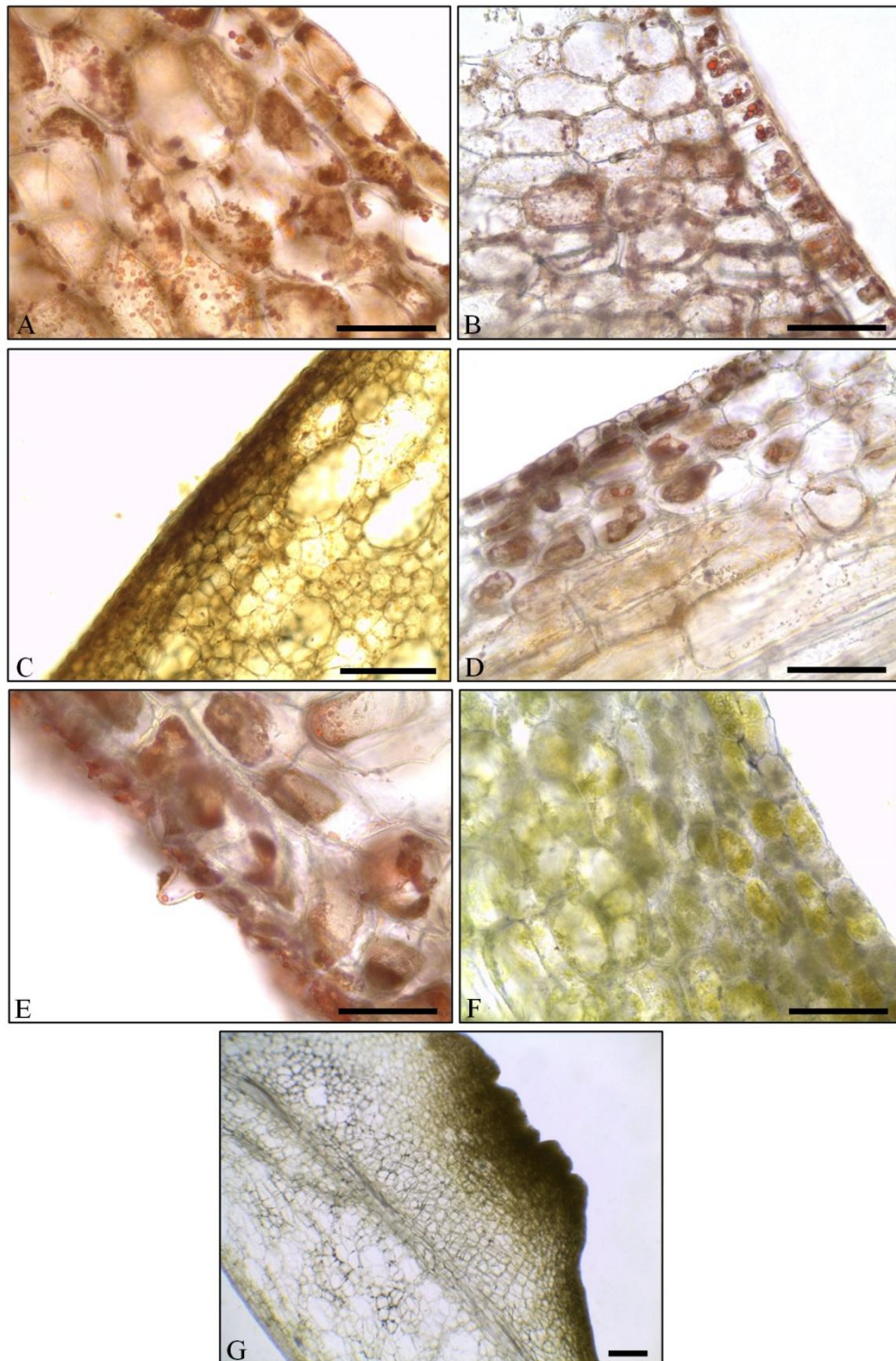


Figura 21 - Anatomia labelar das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Seção longitudinal de *C. gnomus* (corado com Vermelho de Sudão IV). B, Seção longitudinal de *C. schmidtianum* (corado com Vermelho de Sudão III). C, Seção longitudinal de *C. maranhense* (corado com Lugol 1%). D, Seção longitudinal de *C. rooseveltianum* (corado com Vermelho de Sudão III). E, Seção longitudinal da margem em *C. rooseveltianum* evidenciando papila (corado com Vermelho de Sudão III). F, Seção longitudinal de *C. hopkinsonianum*. G, Seção longitudinal da região basal em *C. hopkinsonianum* evidenciando as rugas. Escala: A, B, D, E e F = 50  $\mu\text{m}$ ; C e G = 200  $\mu\text{m}$ .

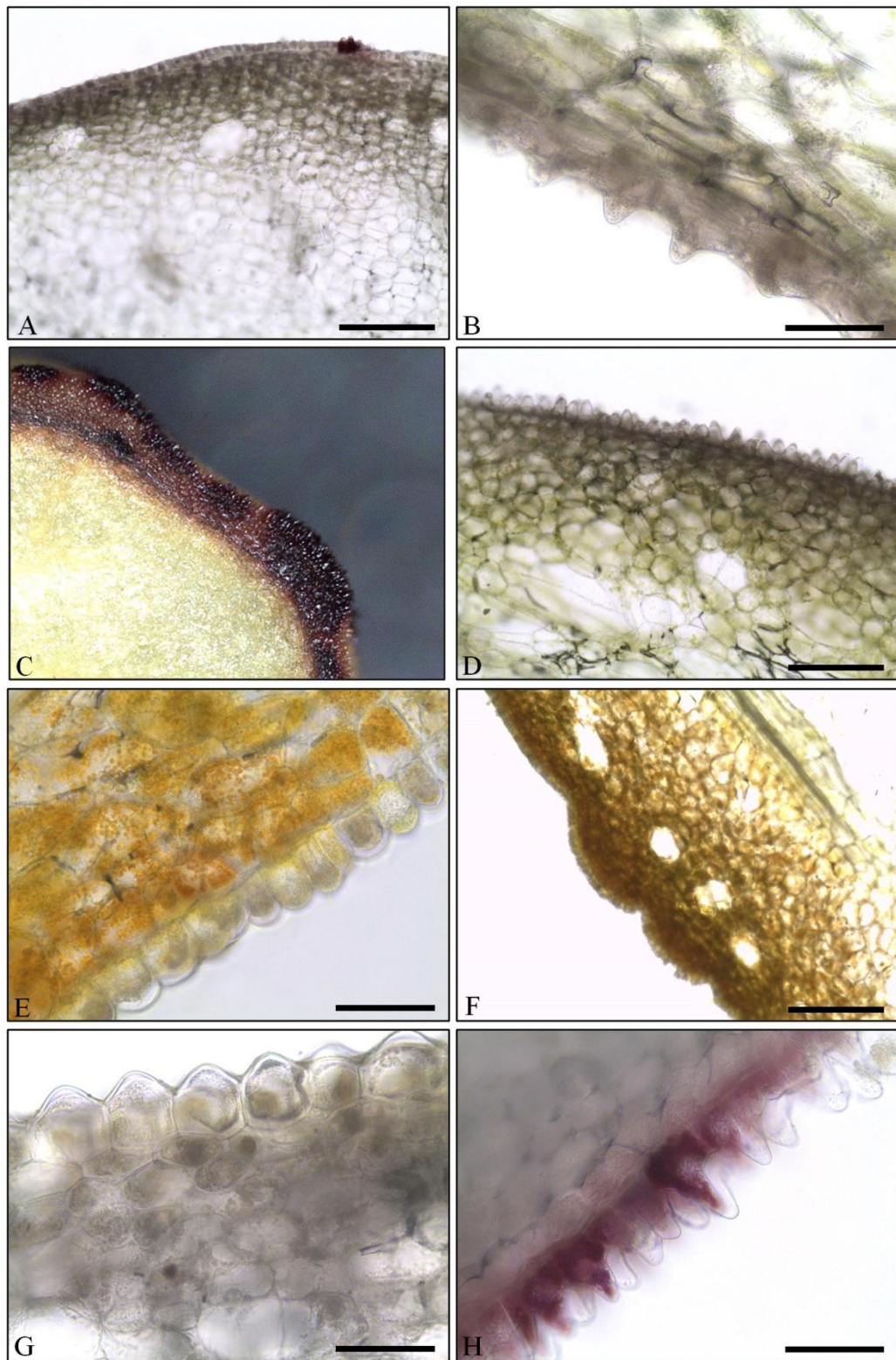


Figura 22 - Anatomia labelar das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Seção longitudinal da calosidade basal em *C. parguazense*. B, Seção longitudinal da cavidade saquiforme em *C. parguazense*. C, Seção do ápice em *C. parguazense*. D, Seção longitudinal de *C. juruenensis*. E, Seção longitudinal de *C. matogrossense*. F, Seção longitudinal da região basal em *C. matogrossense* evidenciando as rugas. G, Seção longitudinal de *C. bicolor*. H, Seção longitudinal de *C. boyi*. Escala: A, D e F = 200  $\mu\text{m}$ ; B, E, G e H = 50  $\mu\text{m}$ .

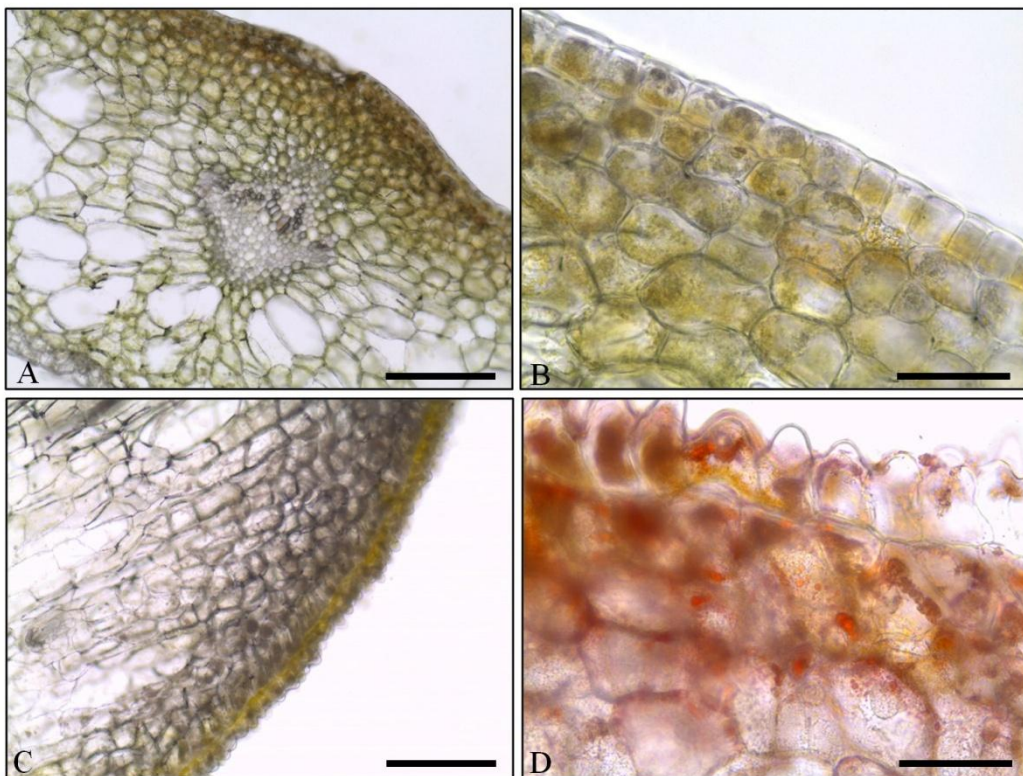


Figura 23 - Anatomia labelar das espécies do clado D da filogenia de *Catasetum*: A, Seção transversal em flor feminina de *C. fimbriatum*. B, Seção longitudinal em flor feminina de *C. fimbriatum*. C, Seção longitudinal da calosidade em flor masculina de *C. fimbriatum*. D, Seção longitudinal da cavidade saquiiforme em flor masculina de *C. fimbriatum*. Escala: A e C = 200  $\mu\text{m}$ ; B e D = 50  $\mu\text{m}$ .

A ausência de absorção da coloração de vermelho neutro em algumas espécies, gerou resultado falso-negativo (Figura 24A). Em outros casos, o tecido secretor foi marcado apenas parcialmente (Figuras 24B e 24C). Isto pode indicar diferenças cuticulares entre as espécies. Em todas as espécies analisadas (flores masculinas e femininas) as células da epiderme e do parênquima são ricas em gotículas de óleo (coradas de vermelho-alaranjado com Vermelho de Sudão III e IV) em toda a extensão do osmóforo, confirmando a natureza lipofílica da secreção. Uma grande quantidade de amido foi detectada no parênquima subepidérmico (corados de azul escuro-preto com Lugol 1%). No início da produção da fragrância, os amiloplastos estão agregados e preenchem quase todo o espaço intercelular. Após poucos dias estas reservas são utilizadas, sobrando apenas pequenos grãos de amido. Em algumas espécies (*C. ochraceum*, *C. rooseveltianum*, *C. matogrossense* e *C. maranhense*) o amido parece não reagir muito bem com o Lugol, apresentando apenas coloração amarelada-amarronzada.

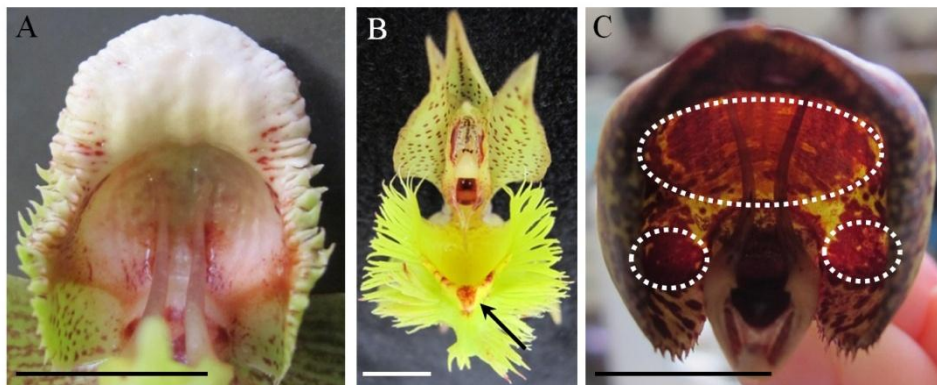


Figura 24 - Teste histoquímico com Vermelho Neutro Aquoso 0,1% em labelo de *Catasetum*: A, Resultado falso-negativo em *C. atratum*. B, Resultado parcialmente positivo em flor masculina de *C. fimbriatum*. C, Resultado parcialmente positivo em *C. mattosianum*. Escala = 1 cm. Seta e círculos evidenciando a região corada positivamente.

### 3.4 DISCUSSÃO

*Catasetum* oferece fragrâncias florais como recurso, atraindo machos de abelhas euglossine como polinizadores. Suas flores são adaptadas para a produção e emissão de compostos químicos, com a finalidade de atrair as abelhas por longas distâncias. Logo, a diversificação na morfologia floral em *Catasetum* é resultante da pressão seletiva estar concentrada principalmente no labelo. Esta é a única peça floral que produz recurso e, portanto, está diretamente associada com a polinização. As demais pétalas e sépalas não apresentam variações morfológicas relevantes, porém não existem estudos sobre sua possível participação na sinalização visual para os polinizadores. O osmóforo reveste completamente a superfície adaxial do labelo neste gênero, contrastando com a distribuição mais restrita observada nas demais orquídeas com síndrome euglossinófila que tiveram estas glândulas descritas em detalhes. Em *Cynoches* (Catasetinae) e *Cirrhaea* (Stanhopeinae), os osmóforos ocupam apenas determinadas áreas da superfície adaxial do labelo (PANSARIN; BITTRICH; AMARAL, 2006; ANTON; KAMINSKA; STPICZYNSKA, 2012; URIBE-HOLGUIN, 2016). As flores de *Stanhopea* spp. e *Gongora bufonia* Lindl. (Stanhopeinae) apresentam o labelo diferenciado em três regiões (i.e., hipoquilo, mesoquilo e epiquilo), porém o osmóforo tem sua distribuição restrita ao hipoquilo (STERN; CURRY; PRIDGEON, 1987; CURRY et al., 1991; PANSARIN; AMARAL, 2009; ANTON; KAMINSKA; STPICZYNSKA, 2012; ADACHI; MACHADO; GUIMARÃES, 2015). Em *Sievekingia marsupialis* Dodson e *S. suavis* Rchb.f. (Stanhopeinae) o labelo é menos diferenciado que em *Stanhopea* e *Gongora*, apresentando o osmóforo na base de uma pequena bolsa localizada atrás do *callus* (CURRY et al., 1991).

Os clados dentro de *Catasetum* são sustentados por características morfológicas e anatômicas, sendo alguns estados de caráter exclusivos para determinados clados. O caráter plesiomórfico para a morfologia labelar em flores masculinas de *Catasetum* (Clado A) parece ser a forma galeiforme com a presença de cristas na superfície adaxial. Todas as demais variações são derivadas. Portanto, podemos supor que a morfologia floral ancestral seria muito parecida com uma flor feminina, cuja morfologia parece sofrer forte pressão seletiva e permanece praticamente inalterada durante toda a história evolutiva deste gênero (GERLACH, 2013). Elas sempre têm o ovário bem desenvolvido, labelo galeiforme e não-ressupinado, coluna sem estaminódios, compacta e curta com o estigma ventral em forma de fenda transversal em seu ápice (ROMERO; CARNEVALI, 2009; GERLACH, 2013). Segundo Gerlach (2007), todas as flores femininas de *Catasetum* têm antera decídua com

polinário rudimentar. Possivelmente esta característica é um vestígio da origem bissexual (hermafrodita) em *Catasetinae* (PÉREZ-ESCOBAR et al., 2016). No clado D (mais derivado) a morfologia labelar em flores masculinas apresentou extensas variações, possivelmente pelo fato de este clado concentrar a maior parte das espécies. A origem híbrida de algumas espécies é morfologicamente perceptível, o que talvez seja o motivo da alta diversidade morfológica em alguns subclados.

De acordo com nossas análises, as mudanças na morfologia do labelo em *Catasetum* compreenderam: aumento na complexidade do labelo/osmóforo apenas em flores masculinas e consequente progressão na diferenciação entre as flores masculinas e femininas. A mesma tendência ocorre em *Cycnoches* (PÉREZ-ESCOBAR et al., 2016). Gerlach (2007, 2013) descreve que as duas seções tradicionais para *Cycnoches* foram baseadas no grau de similaridade entre flores masculinas e femininas; a seção *Cycnoches* apresenta alta similaridade entre ambas as flores e em *Heterantheae* elas são bastante diferentes morfologicamente. Entretanto, Uribe-Holguin (2016) explica que estas seções não são monofiléticas e podem ter ocorrido reversões de caráter. Os demais estudos sobre evolução infragenérica em orquídeas com síndrome euglossinófila que citam modificações na morfologia labelar referem-se a *Stanhopeinae*, portanto, as plantas não apresentam dimorfismo sexual. Dodson e Frymire (1961) e Williams e Whitten (1999) observaram o aumento na complexidade do labelo de *Stanhopea* spp. durante a evolução do gênero, com as espécies basais apresentando o labelo pouco diferenciado e as espécies mais derivadas apresentando o epiquilo articulado e o mesoquilo com um par de cornos que se projetam para a frente. Pansarin, Pansarin e Sazima (2014) observaram que apenas o lobo mediano do labelo de *Cirrhaea* spp. apresenta variações morfológicas. Isso é suficiente para que o polinário de algumas espécies seja aderido em diferentes locais na perna da abelha. Entretanto, não observamos nenhum tipo de adaptação morfológica em *Catasetum* que resulte em deposição do polinário em diferentes locais do corpo da abelha, como registrado por Dressler (1968) e Romero (1990).

A morfologia do labelo está diretamente associada à distribuição do tecido secretor em *Catasetum*. Ambas características atuam conjuntamente para o sucesso no mecanismo de polinização, orientando o polinizador abaixo da coluna para a deposição precisa do polinário. Assim, o aumento na complexidade do labelo em flores masculinas é acompanhado pelo desenvolvimento de estruturas glandulares nos osmóforos. Existe uma clara tendência evolutiva de abertura do labelo, que gradativamente passa de uma estrutura fechada (galeiforme) para mais aberta (demais formas). Mesmo as espécies mais derivadas ainda

carregam vestígios desta estrutura ancestral na forma de uma cavidade saquiforme. Seguindo as mudanças na morfologia do labelo, os tecidos que compõem os osmóforos progressivamente passam a aglomerar-se em determinadas áreas. As estruturas originadas (rugas, espessamentos e calosidades), por sua vez, têm sua distribuição associada ao posicionamento dos estaminódios da coluna. Dodson (1962) já havia percebido esta relação e descreveu que "as antenas estão localizadas sobre o ponto [...] onde o odor é emitido com mais força". É possível que estas estruturas produzam maior quantidade de fragrância, conduzindo o polinizador para o toque acidental nos estaminódios durante a coleta do recurso. Estudos infragenéricos que investigaram o contexto evolutivo das variações labelo/osmóforo são raros. Uribe-Holguin (2016) observou que as mudanças morfológicas do labelo são seguidas pela distribuição dos osmóforos, os quais encontram-se distribuídos apenas no *callus* e margens das espécies basais, passando aos *calli* e apêndices marginais das espécies mais derivadas em *Cycnoches*. Pansarin, Pansarin e Sazima (2014) também observaram que a distribuição do osmóforo no labelo variou seguindo as modificações na morfologia floral em *Cirrhaea*. As espécies mais derivadas deste gênero desenvolveram uma protuberância cilíndrica onde o tecido secretor se acumula. Curry et al. (1991) explicaram que as espécies basais de *Stanhopea* apresentam a superfície do osmóforo relativamente lisa, oferecendo menor área para dispersão de fragrâncias, enquanto as superfícies mais convolutas estão presentes nas espécies mais derivadas.

As mudanças morfológicas e variações labelo/osmóforo também refletem a diversificação da epiderme em flores masculinas de *Catasetum*, que incluiu mudanças não apenas na morfologia destas células, mas também em sua distribuição pelo labelo. A presença de variações na morfologia de células epidérmicas havia sido registrada anteriormente para este gênero (FRANKEN; PANSARIN; PANSARIN, 2016). Entretanto, com o estudo de um maior número de espécies, pudemos observar mudanças na distribuição das diferentes morfologias celulares pela superfície adaxial do labelo. Aparentemente estas características possuem relevância evolutiva. Inicialmente, as células epidérmicas (tabulares e tetragonais) são uniformemente distribuídas (caráter plesiomórfico). Seguindo a cladogênese, surgem espécies em que as células epidérmicas gradativamente mudam de forma da base ao ápice do labelo. As espécies mais derivadas apresentam um mosaico de diferentes formas de células epidérmicas para cada região do labelo. Adachi, Machado e Guimarães (2015) também observaram variação na morfologia em células epidérmicas do osmóforo de *Gongora bufonia* Lindl., cuja localização está restrita ao hipoquilo do labelo. Nesta região as células papilosas decrescem em altura da superfície dorsal para a ventral.

Em flores masculinas de espécies que tradicionalmente pertenciam ao subgênero *Pseudocatasetum*, as células epidérmicas possuem projeções de sua parede, formando tricomas glandulares. Estes apêndices filiformes estão localizados na porção apical do labelo e podem interferir no comportamento do polinizador, levando-o a pousar na coluna das flores masculinas destas espécies e coletar a fragrância na porção basal do labelo (DRESSLER, 1968; ROMERO, 1990). Nesta posição o polinizador toca a face da coluna e o estipe é liberado. Segundo Romero (1990), a liberação do estipe somente expõe o viscido para fora da cavidade estigmática. O polinário permanece anexado à coluna pela antera. Nesta posição, o viscido é passivamente aderido ao ventre torácico da abelha enquanto ela coleta a fragrância. Tricomas multicelulares, unisseriados e não-ramificados foram registrados por Davies e Stpiczynska (2008, 2011) para espécies de Zygotetaliinae (*Stenia* cf. *saccata* Garay, *Chaubardia klugii* (C. Schweinf.) Garay, *Chaubardia surinamensis* Rchb.f. e *Euryblema andreae* (Ortíz) Dressler) possivelmente polinizadas por machos de abelhas euglossine, mas não confirmaram sua atuação como osmóforos. Entretanto, a literatura é limitada quanto à presença, ausência e distribuição dos tricomas glandulares em órgãos e tecidos florais (EFFMERT et al., 2006). Esta característica pode ter surgido em sucessivos eventos de poliploidização em *Catasetum* (*Pseudocatasetum* é grupo parafilético), uma vez que a poliploidia tem sido relacionada aos tricomas glandulares em flores (WERKER, 2000). Evidências de poliploidia já haviam sido registradas para algumas destas espécies. Enquanto o número de cromossomos  $2n=54$  é o mais comum para o gênero e possivelmente seja seu caráter plesiomórfico (registrado para *C. integerrimum*), para *C. ciliatum*, *C. discolor* e *C. gardneri* foi registrado  $2n=108$  (MOORE, 1973; FÉLIX; GUERRA, 2000; OLIVEIRA; BARROS; FORNI-MARTINS, 2013).

As emergências filiformes presentes em flores masculinas de *Catasetum* foram descritas por Franken, Pansarin e Pansarin (2016) e constituem o primeiro registro de emergências atuando como osmóforos em orquídeas com síndrome euglossinófila. Estes autores descreveram que estes apêndices epidérmicos são compostos por células secretoras e finos feixes vasculares, apresentando diversas variações. A epiderme pode ser total ou parcialmente composta por células lisas (tabulares) ou completamente compostas por células papilosas. Nas figuras apresentadas é possível observar que estes apêndices epidérmicos podem ainda ser ramificados ou não e apresentar o ápice arredondado ou acuminado. Entretanto, como não se tratava de um estudo comparativo, estas estruturas foram descritas como fimbrias (mesma denominação utilizada na descrição das espécies). Estruturalmente as emergências filiformes diferem de margens do labelo com simples fendas ou partições



(fimbriadas ou ciliadas), principalmente pela presença de vascularização. Possivelmente os apêndices labelares descritos por Uribe-Holguin (2016) para *Cycnoches* sejam estruturas similares às registrada para *Catasetum*. Ambos gêneros podem sofrer a mesma pressão seletiva, uma vez que possuem a mesma síndrome, e apresentar convergência neste caráter. Sanguinetti et al. (2012) também descreveram emergências atuando como osmóforos para *Chloraea membranacea* Lindl., porém estas orquídeas são polinizadas por engano por machos e fêmeas de abelhas Augochlorini (Halictidae). As projeções descritas por estes autores diferem das encontradas em *Catasetum*, apresentando uma cabeça clavada contendo as células secretoras e um talo com células distintamente alongadas e não secretoras, sem vascularização. A presença das emergências filiformes em espécies de diferentes sub-clados em *Catasetum* também as caracteriza como homoplasias convergentes, ocorrendo não apenas nas espécies da antiga "aliança *C. cristatum*", como também em *C. franchinianum* e *C. schunkei*. Possivelmente os curtos apêndices digitiformes observados em *C. denticulatum*, *C. paraguayense* e *C. juruenensis* sejam uma pré-condição ou condição intermediária no desenvolvimento das emergências filiformes.

Contrastando com a diversidade da epiderme, o parênquima secretor parece ser uma simplesiomorfia para *Catasetum* quanto à morfologia celular. Entretanto, ele pode ter o número de camadas homogêneo (caráter plesiomórfico) ou variável de acordo com a posição no labelo em flores masculinas, sendo mais espesso em estruturas glandulares ou abaixo dos estaminódios. Em flores femininas, o parênquima secretor esteve homogeneamente distribuído, possivelmente devido ao posicionamento da abelha dentro do labelo não ser um fator limitante na polinização. A recepção da polínia no estigma é passiva. Segundo Dodson (1962), quando a abelha (com o polinário aderido ao seu corpo) entra no labelo, o polinário fica posicionado para baixo, alinhando as políneas com a cavidade estigmática. Quando a abelha retorna para deixar a flor (após a coleta da fragrância), uma ou ambas polínias ficam presas na cavidade estigmática. Adicionalmente, não observamos nenhuma modificação relevante neste tecido entre flores masculinas e femininas de *C. fimbriatum*, na qual ambos sexos apresentaram o mesmo número de camadas (exceto *callus* das flores masculinas). Isso pode indicar uma maior intensidade na emissão de voláteis em flores masculinas, uma vez que as flores femininas geralmente apresentam maior longevidade com a mesma disponibilidade de amiloplastos (reserva energética) (ROMERO; CARNEVALI, 2009; MILET-PINHEIRO et al., 2015).

Além do tecido glandular (osmóforo) do labelo, o parênquima não-secretor adjacente também variou entre as espécies de *Catasetum*. Este tecido geralmente apresenta grandes

espaços intercelulares em ambos os sexos das flores. Entretanto, no clado D (derivado) ocorreram espécies cujos espaços intercelulares inexistem apenas em flores masculinas, sendo mais compactos. Franken, Pansarin e Pansarin (2016) haviam observado esta característica para a "aliança *C. cristatum*". Estas espécies não são relacionadas, estando posicionadas em diferentes subclados na filogenia. Esta apomorfia também seria uma homoplasia convergente entre as espécies.

Os osmóforos são importantes estruturas no processo de polinização de várias orquídeas, especialmente nas que apresentam a síndrome euglossinófila, onde o sucesso reprodutivo depende da fragrância floral emitida por eles. Estudos sobre o contexto evolutivo das variações morfo-anatômicas infragenéricas em orquídeas ajudam a compreender a relação com os polinizadores e o padrão de diversificação dos gêneros. As características morfológicas e anatômicas labelares de *Catasetum* apresentaram diversidade surpreendente, tornando claro o nível de complexidade envolvido neste mecanismo de polinização. Entretanto, estudos micromorfológicos tornam-se necessários para avaliar as possíveis diferenças cuticulares entre as espécies e o modo de emissão dos voláteis.

## **4. ANÁLISE DE FRAGRÂNCIAS FLORAIS**

## 4.1 INTRODUÇÃO

As interações entre plantas e polinizadores são mediadas por sinalizações florais que estimulam as visitas. As orquídeas geralmente estão hiper-dispersas no meio, possuem tamanho reduzido e limitada produção de flores (ACKERMAN, 1986; BENZING, 1990). Todas estas restrições são contornadas pela produção de sinais visuais e olfativos por estas plantas. A emissão de fragrâncias florais, também denominadas de compostos orgânicos voláteis (VOCs), ajuda os polinizadores a encontrá-las, atraindo-os por longas distâncias, e efetivar sua reprodução sexual (JANZEN, 1971; WILLIAMS; DODSON, 1972; RAGUSO, 2008). Estes semioquímicos são misturas de compostos voláteis sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas a partir de simples precursores do metabolismo primário, utilizando uma elaborada sequência de reações catalizadas por enzimas específicas (e.g., HARTMANN, 2007). Os compostos volatilizam sob baixa pressão de vapor e têm baixo peso molecular, pertencendo a diferentes classes químicas originadas por diferentes vias biossintéticas (e.g., DUDAREVA; PICHERSKY; GERSHENZON, 2004; KNUDSEN et al., 2006). Somente alguns dos compostos odoríferos são biologicamente ativos e a visita do polinizador pode ser baseada na presença de um composto incomum ou na combinação de proporções distintas de dois ou mais compostos ativos comuns (SCHIESTL; MARION-POLL, 2001; RAGUSO, 2008).

O desenvolvimento de mecanismos de polinização altamente especializados na atração de um ou poucos polinizadores efetivos parece ser uma estratégia comum entre as orquídeas, principalmente quando falamos das espécies inclusas em Cymbidieae (Epidendroideae), em que ocorrem os mecanismos mais complexos (van der PIJL; DODSON, 1966; DRESSLER, 1993; van der CINGEL, 2001). A especialização destes mecanismos leva à formação de síndromes, nas quais o conjunto de características florais (incluindo as fragrâncias) é associado à atração de determinado grupo de polinizador (FENSTER et al., 2004; DOBSON, 2006). A síndrome euglossinófila é amplamente difundida entre as orquídeas e caracterizada pela ausência de recursos alimentares, havendo a produção exclusiva de fragrâncias florais especializadas que são coletadas por machos de abelhas Euglossini (e.g., DODSON et al., 1969; DRESSLER, 1982; ACKERMAN, 1983). A fragrância atua não apenas como sinalização, mas representa a própria recompensa para estas abelhas, consistindo em misturas pouco complexas contendo 10 ou menos diferentes compostos majoritários (WILLIAMS; WHITTEN, 1983; GERLACH; SCHILL, 1991). As abelhas coletam as fragrâncias escovando a superfície secretora com um denso pente de pêlos modificados presente em suas pernas

anteriores e as acumulam ao longo da vida em estruturas esponjosas localizadas em suas pernas posteriores (i.e., órgão tibial), formando misturas complexas (e.g., ELTZ et al., 1999). Essas misturas são utilizadas como feromônio, atuando como pré-requisito básico para o reconhecimento e seleção sexual de conspecíficos durante a corte (ZIMMERMANN; RAMÍREZ; ELTZ, 2009). Para isso, os polinizadores atuam como agentes seletivos, escolhendo as fragrâncias a serem adquiridas através da preferência inata por determinados compostos, refinamento desta preferência através do aprendizado (aspectos quantitativos) e restrição da coleta de compostos indesejáveis (feedback negativo), garantindo a formação de misturas específicas (ELTZ; ROUBIK; LUNAU, 2005). A visita discriminatória baseada na fragrância floral tem importantes implicações no sucesso reprodutivo das plantas (e.g., WILLIAMS; WHITTEN, 1983).

*Catasetum* L. C. Rich. ex Kunth (Catasetinae) é um entre os vários gêneros de orquídeas Neotropicais polinizados por machos de abelhas euglossine. O gênero inclui aproximadamente 130 espécies distribuídas principalmente na região tropical das Américas Central e do Sul (ROMERO; CARNEVALI, 2009). As flores normalmente são unissexuais com morfologia distinta (heterantia) e determinação sexual de acordo com as características ambientais e nutricionais do indivíduo (GREGG, 1975; ROMERO; NELSON, 1986; ZIMMERMAN, 1991; ROMERO, 1992; GERLACH, 2007, 2013). As espécies simpátricas utilizam as fragrâncias florais como parte fundamental no mecanismo de isolamento reprodutivo (HILLS; WILLIAMS; DODSON, 1972). A composição destes aromas consiste na mistura de substâncias com ação atrativa e repelente em diferentes proporções que são detectados mesmo em diminutas quantidades pelos machos de euglossine (WILLIAMS; DODSON, 1972; WILLIAMS; WHITTEN, 1983). Assim, elas atraem espécies particulares de abelhas que, em sinergia com os demais filtros florais (i.e., características morfológicas), atuam como polinizadores efetivos.

As fragrâncias florais parecem ter papel central na diversificação em *Catasetum*. Qualquer mutação ou hibridização que resulte em mudança na composição das fragrâncias gera mudança no polinizador e impede o fluxo gênico, contribuindo para a origem de novas linhagens (SCHIESTL; SCHLÜTER, 2009; van der NIET; PEAKALL; JOHNSON, 2014). Estudos anteriores sobre a composição das fragrâncias em *Catasetum* foram realizados em um grupo muito pequeno de espécies. Além disso, as poucas informações disponíveis sobre a evolução infragenérica da sinalização química entre flores de orquídeas euglossinófilas e polinizadores baseada em dados moleculares concentra-se em apenas dois gêneros de Stanhopeinae (WILLIAMS; WHITTEN, 1999; HETHERINGTON-RAUTH; RAMÍREZ,

2016). Considerando isto, este capítulo descreve a diversidade de compostos voláteis florais e analisa as variações interespecíficas qualitativas nas fragrâncias de *Catasetum*. Adicionalmente, também analisamos a formação de quimiotipos entre as espécies e observamos sua possível relação com a cladogênese presente na seção 2 desta tese.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 Coleta, análise e identificação dos voláteis florais

Os voláteis florais foram coletados em indivíduos únicos pertencentes a 33 espécies de *Catasetum* (Tabela 1). A amostragem foi realizada em plantas mantidas sob cultivo no Orquidário do Laboratório de Biologia Molecular e Bioquímica de Plantas (LBMBP-FFCLRP-USP) e conduzidas durante o período em que os voláteis florais são perceptíveis ao nariz humano (10:00 às 13:30, após 2-5 dias da antese). As amostras foram obtidas através de técnica de coleta dinâmica combinada com cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Para isso, as flores foram submetidas ao aprisionamento num sistema de captação, onde o ar de entrada era filtrado por um tubo contendo 0,5 g de carvão ativado. O sistema de captação consistiu na utilização de duas flores colocadas em balão de vidro inerte e uma bomba à vácuo para aspirar o ar no entorno das amostras durante 60 minutos (balão de vidro) ou 3 horas (saco de polyester). A captação dos voláteis ocorreu quando o ar aspirado passou através de um tubo contendo o polímero adsorvente Porapak™ Q (malha 50-80, SUPELCO, Bellefonte, PA, EUA), antes de ser expelido. Este polímero contendo os voláteis foi eluído em acetato de etila (700 µL) e a solução resultante armazenada a -80°C, até a análise via GC-MS.

Os compostos voláteis foram analisados utilizando um cromatógrafo de fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (modelo Shimadzu QP2010S). O equipamento possuía fonte de ionização por elétrons (EI) e analisador tipo quadrupolo. Utilizou-se o modo de injeção *splitless* sob temperatura de 250°C na fonte (fluxo de emissão de 60 uA e energia de ionização de 70 eV). A coluna utilizada foi do tipo sílica fundida com fase estacionária DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com volume de injeção de 1,0 µL e hélio como gás de arraste. O aquecimento teve programação de temperatura de 100-300°C a 3°C/min, durante 60 minutos. Os sinais obtidos por GC-MS foram analisados com o software GC Solution e utilizados para a identificação estrutural das substâncias através de comparação entre os padrões de fragmentação obtidos nos espectros de massas e os espectros das bibliotecas de

dados NIST8, WILEY 7 e FFNSC 1.3. Adicionalmente, os dados obtidos foram comparados com o índice de retenção relativa (IRR) determinado pela equação de Kovats a partir dos tempos de retenção de cada *n*-alcano da série homóloga (C9-C22), que foi injetado no cromatógrafo por via úmida utilizando o mesmo método de operação do cromatógrafo.

#### 4.2.2 Análise estatística

A composição das fragrâncias em *Catasetum* foi acessada através de análise multivariada realizada no programa R 3.3.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016), utilizando o pacote 'vegan' 2.4-3 (OKSANEN et al., 2017). Para isto, foi criada uma matriz binária (presença/ausência), na qual todos os compostos presentes possuíam o mesmo valor. A similaridade na composição das fragrâncias entre as espécies de *Catasetum* foi acessada pelo método de ordenação por análise de componentes principais (PCA), utilizando a função 'rda'. Os quimiotipos formados entre as espécies de *Catasetum* foram acessados utilizando o método de classificação por agrupamento hierárquico aglomerativo (i.e., unweighted pair-group method using arithmetic averages - UPGMA). Para isto, foi utilizada a função 'hclust' no modo 'average'. A cladogênese utilizada para fins comparativos com os resultados do UPGMA obedece à árvore combinada total recuperada através da análise de inferência bayesiana apresentada na seção 2 desta tese. Esta árvore apresentou quatro clados, denominados nesta seção por Clados A (*C. macroglossum* - *C. viridiflavum*), B (*C. punctatum* - *C. arietinum*), C (*C. ochraceum* + *C. planiceps*) e D (*C. maranhense* - *C. ciliatum*).

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Diversidade química dos voláteis florais

Foram detectados e identificados 52 compostos orgânicos voláteis pertencentes a três classes químicas distintas, sendo 41 terpenóides (30 monoterpenos e 11 sesquiterpenos), 10 benzenóides/fenilpropanóides e uma substância nitrogenada (Tabela 1). Os voláteis identificados são originados por apenas duas vias biossintéticas (via do mevalonato e via do shikimato) e apresentam pequena variabilidade estrutural, com vários isômeros identificados. O índice de retenção de Kovats (KI) dos compostos variou de 927 a 1587. O número total de voláteis florais por indivíduo variou de 1 a 14, com média de 5,51 compostos/indivíduo. As espécies com maior diversidade de compostos em suas fragrâncias foram *C. macrocarpum*, *C.*

*discolor*, *C. expansum*, *C. maranhense* e *C. albovirens*, com 14, 12, 12, 11 e 10 compostos majoritários, respectivamente. Poucos compostos foram compartilhados entre múltiplas espécies, com apenas 12 compostos identificados em cinco ou mais espécies. Os compostos  $\alpha$ -pineno, sabineno, eucaliptol e  $\beta$ -mirceno, todos monoterpênicos de baixo peso molecular (KI=933 a 1032), foram os mais frequentes. Entretanto, a maioria dos compostos foi registrada para apenas uma ou duas espécies.







#### 4.3.2 Variação interespecífica dos voláteis florais

A análise dos dados revelou pequena variação interespecífica na composição das fragrâncias em *Catasetum*, não havendo a formação de agrupamentos de espécies evidente (Figura 1). Foram formados 5 quimiotipos de fragrâncias entre as espécies, porém com pouca dissimilaridade entre eles (Figuras 2 e 3). Os quimiotipos foram distintos pela presença de determinados compostos que foram identificados na maioria das espécies constituintes: 1 - 2,4-dimetil-acetofenona, acetato de nerila e (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno; 2 -  $\alpha$ -tujeno,  $\alpha$ -pineno, sabineno,  $\beta$ -pineno e eucaliptol; 3 - linalol; 4 -  $\alpha$ -pineno, sabineno,  $\beta$ -pineno e indol; 5 -  $\alpha$ -pineno, sabineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno e eucaliptol. Entretanto, nenhum composto esteve presente em todas as espécies de seu grupo de fragrância. A presença dos terpenóides variou entre os quimiotipos: no grupo 1 a maioria dos compostos identificados nas espécies eram sesquiterpenos; nos grupos 2 e 3 a maioria era de monoterpenos, nos grupos 4 e 5 houve um equilíbrio entre os dois tipos de terpenóides. Adicionalmente, foi possível observar que nos quimiotipos 1 e 3 prevaleceram espécies com poucos compostos em suas fragrâncias (média de 4,4 e 3,8 compostos, respectivamente) e no quimiotipo 2 espécies com muitos compostos (média de 7,3).

A distribuição dos quimiotipos foi heterogênea quando comparada à cladogênese, sugerindo convergência química das fragrâncias florais. No quimiotipo 1 constam espécies pertencentes aos clados 2 (*C. arietinum* e *C. cernuum*) e 4 (*C. albovirens*, *C. ariquemense*, *C. barbatum*, *C. bicolor* e *C. cirrhaeoides*) da cladogênese. No quimiotipo 2 constam espécies dos clados 1 (*C. expansum*) e 4 (*C. complanatum*, *C. confusum*, *C. cristatum*, *C. denticulatum* e *C. discolor*). No quimiotipo 3 constam espécies dos clados 2 (*C. luridum*) e 4 (*C. fimbriatum*, *C. gardneri*, *C. hopkinsonianum*, *C. juruenensis* e *C. lanciferum*). No quimiotipo 4 constam espécies dos clados 1 (*C. macroglossum*), 2 (*C. mattosianum* e *C. multifissum*) e 4 (*C. macrocarpum*, *C. maranhense* e *C. multifidum*). No quimiotipo 5 constam espécies dos clados 2 (*C. purum*), 3 (*C. planiceps*) e 4 (*C. pileatum*, *C. pulchrum*, *C. rooseveltianum*, *C. saccatum*, *C. semicirculatum* e *C. vinaceum*).

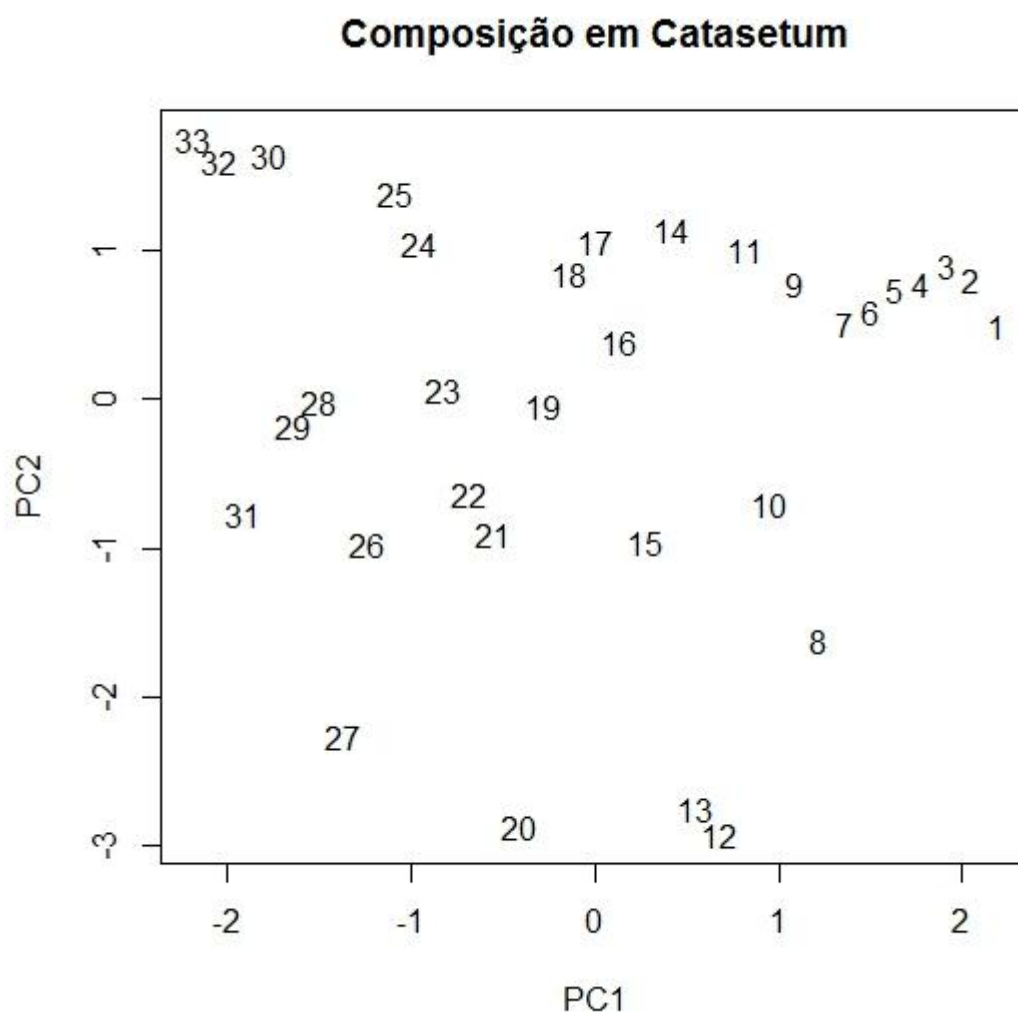


Figura 1 - Análise de componentes principais (PCA) das fragrâncias florais presentes em 33 espécies de *Catasetum*. Numeração das espécies de acordo com a Tabela 1.

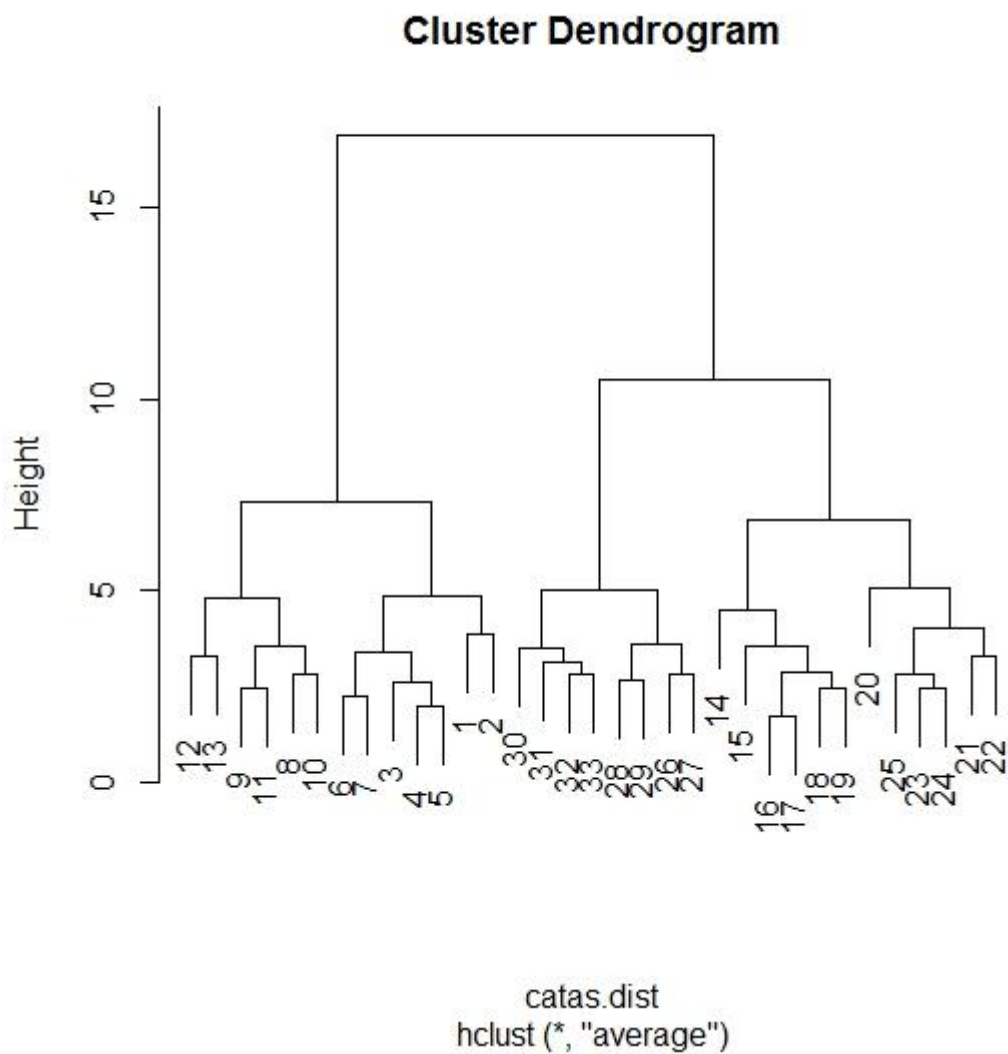


Figura 2 - Agrupamento aglomerativo (UPGMA) da composição das fragrâncias florais presentes em 33 espécies de *Catsetum*. Numeração das espécies de acordo com a Tabela 1.

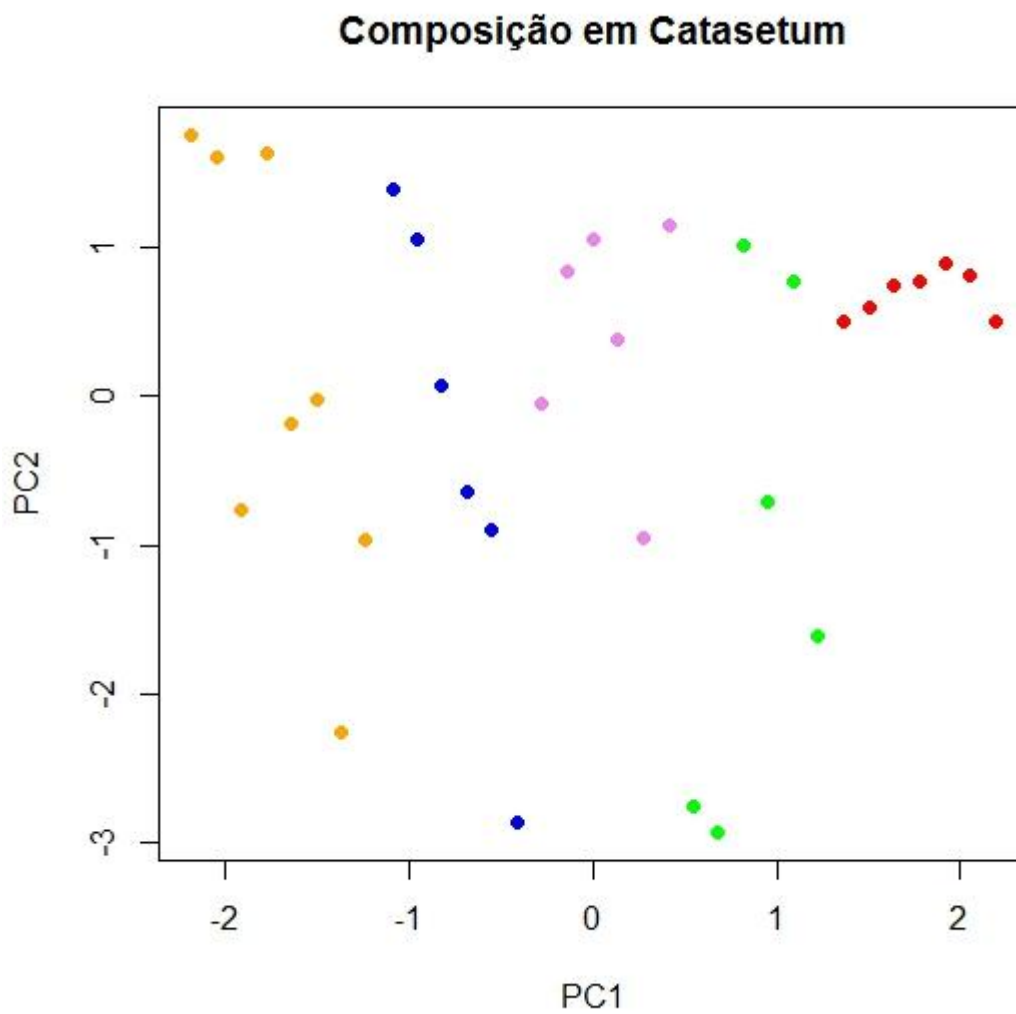


Figura 3 - Análise de componentes principais (PCA) das fragrâncias florais presentes em 33 espécies de *Catasetum* com quimiotipos mostrados em cores (1 - vermelho, 2 - verde, 3 - lilás, 4 - azul, 5 - laranja).

#### 4.4 DISCUSSÃO

As fragrâncias florais são fundamentais para assegurar a reprodução sexual das orquídeas euglossinófilas, atraindo e manipulando o comportamento do polinizador (e.g., RAGUSO, 2008). Variações qualitativas e quantitativas na composição destes aromas são comuns entre espécies proximamente relacionadas (e.g., KNUDSEN et al., 2006). A variação qualitativa refere-se ao número e identidade dos compostos que diferem em suas propriedades químicas e físicas, sendo a volatilidade a característica mais importante num contexto de sinalização química. Entre os compostos detectados, nenhum foi exclusivo para *Catasetum*. Muitos deles são comumente encontrados em outras orquídeas euglossinófilas (e.g., GERLACH; SCHILL, 1991). Inclusive, alguns são tão amplamente produzidos (i.e., limoneno, (*E*)- $\beta$ -ocimeno,  $\beta$ -mirceno, linalol,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, álcool benzílico e  $\beta$ -cariofileno), que ocorrem em mais de 50% das fanerógamas (KNUDSEN et al., 2006). Entretanto, o polimorfismo químico envolve também as funções biológicas dos compostos que estão misturados nas fragrâncias, os quais podem ser biologicamente ativos (atrativos ou repelentes) ou não-ativos e muito pouco se conhece sobre a maneira como eles são percebidos pelos polinizadores, não havendo uma relação entre a predominância de certos compostos e sua atratividade (e.g., CHITTKA; RAINE, 2006; SCHIESTL, 2015). Vários dos compostos voláteis emitidos por *Catasetum* foram extraídos da tibia traseira de machos de euglossine (ELTZ et al., 1999; ELTZ; ROUBIK; LUNAU, 2005; ZIMMERMANN; RAMÍREZ; ELTZ, 2009; MITKO et al., 2016) ou têm sua atratividade conhecida através da utilização de iscas odoríferas com compostos puros em campo (e.g., WILLIAMS; WHITTEN, 1983), sugerindo que as abelhas os coletam ativamente.

Embora hajam diferenças substanciais entre os nossos resultados e os obtidos em estudos anteriores, em todos foi observada uma baixa variabilidade interespecífica na composição das fragrâncias. Hills, Williams e Dodson (1972), Williams e Whitten (1983) e Gerlach e Schill (1991) analisaram um total de 20 espécies de *Catasetum*, detectando 53 compostos voláteis florais (apenas 27 identificados). Os compostos mais comuns nestes estudos foram:  $\alpha$ -pineno, eucaliptol (=1,8-cineol), limoneno, acetato benzílico, carvona e  $\alpha$ -felandreno. Recentemente, Milet-Pinheiro et al. (2015) detectaram 99 compostos em 18 indivíduos de apenas uma espécie de *Catasetum* (i.e., *C. uncatum*). Apesar da disparidade qualitativa quando comparado aos resultados de estudos anteriores, a maioria dos compostos aparece somente como traços (91 compostos com >1% do volume total da amostra) e apenas 8 compostos são majoritários (dois compostos correspondem a 49,8% do volume total das

amostras). Estas diferenças ocorrem devido às múltiplas metodologias utilizadas. Segundo Raguso e Pellmyr (1998), a comparação direta entre estudos torna-se impossível devido à ausência de padronização, ocorrendo variações nas condições do material vegetal utilizado e de coleta, variações no método de coleta e preparação da amostra e variações nos parâmetros da técnica de GC-MS. Além da variação intraespecífica naturalmente observada em nível inter- ou intrapopulacional (e.g., KNUDSEN, 2002; DÖTTERL; WOLFE; JÜRGENS, 2005; MANT; PEAKALL; SCHIESTL, 2005).

A composição das fragrâncias florais não parece seguir um padrão evolutivo em *Catasetum*. Resultados semelhantes foram encontrados em *Stanhopea* e *Gongora*, nos quais a distribuição dos grupos de fragrâncias foi majoritariamente heterogênea entre os cladogramas (WILLIAMS; WHITTEN, 1999; HETHERINGTON-RAUTH; RAMÍREZ, 2016). Apenas um quimiotipo correspondeu ao clado da filogenia em *Stanhopea* e nenhum em *Gongora*. Isto indica que as fragrâncias florais evoluem facilmente entre espécies proximamente relacionadas, apresentando várias apomorfias e reversões de caráter dentro de um mesmo clado infragenérico. A alta diversidade e complexidade das famílias de genes que transcrevem os compostos voláteis permitem uma alta plasticidade fenotípica entre as fragrâncias emitidas, possibilitando que variações ocorram em resposta à seleção imposta pelos polinizadores. Mudanças na composição das fragrâncias são possíveis não apenas devido ao surgimento de novos genes (e, conseqüentemente, novos compostos) através de cópias paralogas, mas principalmente por mudanças regulatórias ou ausência de atividade enzimática causada pela perda da expressão gênica (e.g., XIANG et al., 2007). Portanto, cada população de plantas possui um conjunto único de compostos secundários (inclusive fragrâncias florais) bem adaptados às demandas particulares de seu nicho ecológico (HARTMANN, 2007).

A rápida diversificação dos genes do metabolismo secundário das plantas provavelmente facilitou a origem e diversificação da síndrome euglossinófila em orquídeas, através da especialização deste mecanismo de polinização. As orquídeas com esta síndrome, incluindo *Catasetum*, utilizam as fragrâncias florais como principal componente no isolamento reprodutivo entre as espécies simpátricas devido à total dependência dos machos de euglossine para sua reprodução (e.g., DODSON et al., 1969; GREGG, 1983; GERLACH; SCHILL, 1989). Eles escolhem as orquídeas a serem visitadas pela presença de compostos biologicamente ativos particulares, reduzindo a variabilidade destes compostos nas espécies de orquídeas em que ocorrem (e.g., SALZMANN et al., 2007). A pressão seletiva resultante desta visita discriminatória atua diferentemente entre compostos ativos e não-ativos,



formando um mosaico evolutivo das fragrâncias (e.g., SCHIESTL, 2015). Entretanto, as mais de 200 espécies de euglossine são compartilhadas entre mais de 600 espécies de orquídeas euglossinófilas (e.g., ACKERMAN, 1983; RAMÍREZ et al., 2010). Isso é possível devido à atuação dos demais filtros florais que, em conjunto com a fragrância, impedem o fluxo gênico entre as espécies e possibilitam o compartilhamento de nicho (e.g., DRESSLER, 1968; PANSARIN; PANSARIN, 2011; NUNES et al., 2017). O comportamento do polinizador também interfere neste mecanismo. Segundo Carvalho e Machado (2002), duas espécies de *Eulaema* (i.e., *E. bombiformis* e *E. nigrita*) visitam as flores de *C. macrocarpum*, porém *E. nigrita* não remove o polinário pois não apresenta o comportamento de entrada no labelo galeiforme. Portanto, a seleção disruptiva, originada por mudanças na composição das fragrâncias florais e mediada pela consequente mudança na espécie do polinizador, quando acompanhada pela divergência nas demais características florais, resulta em diversificação (SCHIESTL; SCHLÜTER, 2009; van de NIET; PEAKALL; JOHNSON, 2012).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou a evolução dos principais filtros florais em *Catsetum*, caracterizando extensivamente a diversidade do gênero. A partir dos resultados foi possível observar que a história evolutiva compreendeu várias reversões e convergências de caráter entre as espécies. Foi possível confirmar o monofiletismo e as plesiomorfias do gênero, revelando algumas tendências, como a redução do tamanho das flores/polinizadores, aumento na complexidade do labelo apenas em flores masculinas e consequente progressão na diferenciação entre flores masculinas e femininas, presença de polimorfismo químico com baixa variabilidade interespecífica e não relacionado à cladogênese, etc. A pressão seletiva causada pelos polinizadores, ao escolherem as espécies a serem visitadas, tem direcionado a evolução da biologia floral neste gênero. A morfologia, a distribuição do tecido secretor e a fragrância emitida são complementares, atuando em conjunto para gerar respostas etológicas específicas dos polinizadores. A alta especificidade gerada por este mecanismo reduz o compartilhamento de polinizadores, levando ao transporte mais eficiente do pólen e diminuindo o fluxo gênico interespecífico. Portanto, existem evidências consistentes de que estes três filtros florais atuam como barreiras de isolamento reprodutivo entre espécies simpátricas, divergindo entre as linhagens.

Foram compiladas informações muito fragmentadas na literatura, além de registrar características florais nunca antes descritas para as espécies. Atualizamos o conhecimento infragênico, possibilitando que as subdivisões tradicionais e as características que as delimitam sejam reavaliadas. Procuramos abranger ao máximo as espécies brasileiras. Embora a maioria das espécies de *Catsetum* seja endêmica do Brasil, poucas haviam sido analisadas em estudos anteriores.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, R. J.; HEGARTY, M. J.; HISCOCK, S. J.; BRANNAN, A. C. Homoploid hybrid speciation in action. **Taxon**, v. 59, p. 1375-1386, 2010.

ACKERMAN, J. D. Specificity and mutual dependency of the orchid-euglossine bee interaction. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 20, p. 301-314, 1983.

\_\_\_\_\_. Coping with the epiphytic existence: pollination strategies. **Selbyana**, v. 9, p. 52-60, 1986.

ADACHI, S. A.; MACHADO, S. R.; GUIMARÃES, E. Structural and ultrastructural characterization of the floral lip in *Gongora bufonia* (Orchidaceae): understanding the slip-and-fall pollination mechanism. **Botany**, v. 93, p. 759-768, 2015.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.

ANTON, S.; KAMINSKA, M.; STPICZYNSKA, M. Comparative structure of the osmophores in the flower of *Stanhopea graveolens* Lindley and *Cycnoches chlorochilon* Klotzsch (Orchidaceae). **Acta Agrobotanica**, v. 65, p. 11-22, 2012.

BATISTA, J. A. N.; MOTA, A. C. M.; PROITE, K.; BIANCHETTI, L. B.; ROMERO-GONZÁLEZ, G.A.; ESPINOZA, H. M. H.; SALAZAR, G.A. Molecular phylogenetics of Neotropical *Cyanaeorchis* (Cymbidieae, Epidendroideae, Orchidaceae): geographical rather than morphological similarities plus a new species. **Phytotaxa**, v. 156, p. 251-272, 2014.

BENZING, D.H. **Vascular epiphytes: general biology and related biota**. New York: Cambridge University Press, 1990.

BICALHO, H. D.; BARROS, F. On the taxonomy of *Catasetum* subsection *Isoceras*. **Lindleyana**, v. 3, p. 87-92, 1988.

CAMERON, K. M.; CHASE, M. W.; WHITTEN, M. W.; KORES, P. J.; JARREL, D. C.; ALBERT, V. A.; YUKUWAMA, T.; HILLS, H. G.; GOLDMAN, D. H. A phylogenetic analysis of Orchidaceae: a evidence from rbcL nucleotide sequences. **American Journal of Botany**, v. 86, p. 208-224, 1999.

CARVALHO, R.; MACHADO, I. C. Pollination of *Catasetum macrocarpum* (Orchidaceae) by *Eulaema bombiformis* (Euglossini). **Lindleyana**, v. 17, p. 85-90, 2002.

CHASE, M. W.; WILLIAMS, N. H.; FARIA, A. D.; NEUBIG, K. M.; AMARAL, M. C.; WHITTEN, W. M. Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. **Annals of Botany**, v. 104, p. 387-402, 2009.

CHIRON, G. R.; OLIVEIRA, R. P.; SANTOS, T. M.; BELLVERT, F.; BERTRAND, C.; van den BERG, C. Phylogeny and evolution of *Baptistonia* (Orchidaceae, Oncidiinae) based on molecular analyses, morphology and floral oil evidences. **Plant Systematics and Evolution**, v. 281, p. 35-49, 2009.

CHITTKA, L.; RAINE, N. E. Recognition of flowers by pollinators. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 428-435, 2006.

van der CINGEL, N. A. **An atlas of orchid pollination - America, Africa, Asia and Australia**. Rotterdam: A. A. Balkema Publishers, 2001.

COZZOLINO, S.; WIDMER, A. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, p. 487-494, 2005.

CURRY, K. J.; MCDOWELL, L. M.; JUDD, W. S.; STERN, W. L. Osmophores, floral features, and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 78, p. 610-623, 1991.

DAVIES, K. L.; STPICZYNSKA, M. Labellar micromorphology of two euglossine-pollinated orchid genera; *Scuticaria* Lindl. and *Dichaeae* Lindl. **Annals of Botany**, v. 102, p. 805-824, 2008.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Comparative labellar micromorphology of Zygopetalinae (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 108, p. 945-964, 2011.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, p. 772, 2012.

DOBSON, H. E. M. Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. In: DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. (Eds.). **Biology of floral scent**. p. 147-198. Boca Raton: CRC Press, 2006.

DODSON, C. H. Pollination and variation in the subtribe Catasetinae (Orchidaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 49, p. 35-56, 1962.

\_\_\_\_\_. *Dressleria* and *Clowesia*: a new genus and an old one revived in the Catasetinae. **Selbyana**, v. 1, p. 130-137, 1975.

\_\_\_\_\_; DRESSLER, R. L.; HILLS, H. G.; ADAMS, R. M.; WILLIAMS, N. H. Biologically active compounds in orchid fragrances. **Science**, v. 164, p. 1243-1249, 1969.

\_\_\_\_\_; FRYMIRE, G. P. Preliminary studies in the genus *Stanhopea* (Orchidaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 48, p. 137-173, 1961.

DÖTTERL, S.; WOLFE, L. M.; JÜRGENS, A. Qualitative and quantitative analyses of flower scent in *Silene latifolia*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 203-213, 2005.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. S. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DRESSLER, R. L. Pollination by euglossine bees. **Evolution**, v. 22, p. 202-210, 1968.

\_\_\_\_\_. Biology of the orchid bees (Euglossini). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 13, p. 373-394, 1982.

\_\_\_\_\_. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Oregon: Dioscorides Press, 1993.

\_\_\_\_\_. How many orchid species? **Selbyana**, v. 26, p. 155-158, 2005.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1893-1902, 2004.

EFFMERT, U.; BUSS, D.; ROHRBECK, D.; PIECHULLA, B. Localization of the synthesis and emission of scent compounds within the flower. In: DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. (Eds.). **Biology of floral scent**. p. 105-124. Boca Raton: CRC Press, 2006.

ELTZ, T.; ROUBIK, D. W.; LUNAU, K. Experience-dependent choices ensure species-specific fragrance accumulation in male orchid bees. **Behaviour Ecology and Sociobiology**, v. 59, p. 149-156, 2005.

\_\_\_\_\_; WHITTEN, W. M.; ROUBIK, D. W.; LINSENMAYER, K. E. Fragrance collection, storage, and accumulation by individual male orchid bees. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, p. 157-176, 1999.

\_\_\_\_\_; ZIMMERMANN, Y.; HAFTMANN, J.; TWELE, R.; FRANCKE, W.; QUEZADA-EUAN, J. J. G.; LUNAU, K. Enflourage, lipid recycling and the origin of perfume collection in orchid bees. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 274, p. 2843-2848, 2007.

FAHN, A. Structure and function of secretory cells. **Advances in Botanical Research**, v. 31, p. 37-75, 2000.

FÉLIX, L. P.; GUERRA, M. Cytogenetics and cytotaxonomy of some Brazilian species of cymbidioid orchids. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 957-978, 2000.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FENSTER, C. B.; ARMBRUSTER, W. S.; WILSON, P.; DUDASH, M. R.; THOMSON, J.D. Pollination syndromes and floral specialization. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, v. 35, p. 375-403, 2004.

FRANKEN, E. P.; PANSARIN, L. M.; PANSARIN, E. R. Osmophore diversity in the *Catasetum cristatum* alliance (Orchidaceae: Catasetinae). **Lankesteriana**, v. 16, p. 317-327, 2016.

FREUDENSTEIN, J. V.; van den BERG, C.; GOLDMAN, D. H.; KORES, P. J.; MOLVRAY, M.; CHASE, M. W. An expanded plastid DNA phylogeny of Orchidaceae and analyses of Jackknife branch support strategy. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 149-157, 2004.

\_\_\_\_\_; CHASE, M. W. Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification. **Annals of Botany**, v. 115, p. 665-681, 2015.

FULOP, D. **Biomechanics, pollination, and evolution of *Catasetum* (Catasetinae, Orchidaceae)**. Cambridge: Harvard University, 2009.

GERLACH, G. The true sexual life of *Catasetum* and *Cycnoches*. **Caesiana**, v. 28, p. 57-62, 2007.

\_\_\_\_\_. La pesadilla de Lindley - La biología sexual de *Catasetum* y *Cycnoches*. **Lankesteriana**, v. 13, p. 39-46, 2013.

\_\_\_\_\_; SCHILL, R. Composition of orchid scents attracting euglossine bees. **Botanica Acta**, v. 104, p. 379-391, 1991.

GIVNISH, T. J.; SPALINK, D.; AMES, M.; LYON, S. P.; HUNTER, S. J.; ZULUAGA, A.; ILES, W. J. D.; CLEMENTS, M. A.; ARROYO, M. T. K.; LEEBENS-MACK, J.; ENDARA, L.; KRIEBEL, R.; NEUBIG, K. M.; WHITTEN, W. M.; WILLIAMS, N. H.; CAMERON, K. M. Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. **Proceedings of The Royal Society B**, v. 282, p. 1-10, 2015.

GREGG, K. B. The effect of light intensity on sex expression in species of *Cycnoches* and *Catasetum* (Orchidaceae). **Selbyana**, v. 2, p. 212-223, 1975.

\_\_\_\_\_. Variation in floral fragrances and morphology: Incipient speciation in *Cycnoches*? **Botanical Gazette**, v. 144, p. 566-576, 1983.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2831-2846, 2007.

HETHERINGTON-RAUTH, M. C.; RAMÍREZ, S. R. Evolution and diversity of floral scent chemistry in the euglossine bee-pollinated orchid genus *Gongora*. **Annals of Botany**, v. 118, p. 135-148, 2016.

HILLS, H. G.; WILLIAMS, N. H.; DODSON, C. H. Floral fragrances and isolation mechanisms in the genus *Catasetum* (Orchidaceae). **Biotropica**, v. 4, p. 61-76, 1972.

HINCHMAN, R. R. A permanent iodine stain–mountant combination for starch in plant tissues. **Stain Technology**, v. 48, p. 344–346, 1973.

HOLLAND, P. W. H. Observations on fragrance collection behaviour of euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 59, p. 62-64, 2015.

JANZEN, D. H. Euglossine bees as long-distance pollinators of tropical plants. **Science**, v. 171, p. 203-205, 1971.

\_\_\_\_\_. Bee arrival at two Costa Rican female *Catasetum* orchid inflorescences, and a hypothesis on euglossine population structure. **Oikos**, v. 36, p. 177-183, 1981.

KATO, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 772-780, 2013.

KIMSEY, L. S. The behavioural and structural aspects of grooming and related activities in euglossine bees (Hymenoptera, Apidae). **Journal of Zoology**, v. 204, p. 541-550, 1984.



KNUDSEN, J. T. Variation in floral scent composition within and between populations of *Geonoma macrostachys* (Arecaceae) in the western Amazon. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 1772-1778, 2002.

\_\_\_\_\_; ERIKSSON, R.; GERSHENZON, J. Diversity and distribution of floral scent. **The Botanical Review**, v. 72, p. 1-120, 2006.

KOCH, K.; BHUSHAN, B.; BARTHLOTT, W. Diversity of structure, morphology and wetting of plant surfaces. **Soft Matter**, v. 4, p. 1943-1963, 2008.

KOEHLER, S.; CABRAL, J. S.; WHITTEN, W. M.; WILLIAMS, N. H.; SINGER, R. B.; NEUBIG, K. M.; GUERRA, M.; SOUZA, A. P.; AMARAL, M. C. E. Molecular phylogeny of the Neotropical genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): species delimitation and insights into chromosome evolution. **Annals of Botany**, v. 102, p. 491-507, 2008.

LINDER, C. R.; RIESEBERG, L. H. Reconstructing patterns of reticulate evolution in plants. **American Journal of Botany**, v. 91, p. 1700-1708, 2004.

MADDISON, W. P. Gene trees in species trees. **Systematic Biology**, v. 46, p. 523-536, 1997.

MANSFELD, R. Die Gattung *Catasetum* L. C. Rich. **Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis**, v. 30, p. 257-275, 1932a.

\_\_\_\_\_. Die Gattung *Catasetum* L. C. Rich. **Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis**, v. 31, p. 99-125, 1932b.

MANT, J.; PEAKALL, R. SCHIESTL, F. P. Does selection on floral odor promote differentiation among populations and species of the sexually deceptive orchid genus *Ophrys*? **Evolution**, v. 59, p. 1449-1463, 2005.

MILET-PINHEIRO, P.; NAVARRO, D. M. A. F.; DÖTTERL, S.; CARVALHO, A. T.; PINTO, C. E.; AYASSE, M.; SCHLINDWEIN, C. Pollination biology in the dioecious orchid *Catasetum uncatum*: How does floral scent influence the behaviour of pollinators? **Phytochemistry**, v. 116, p. 149-161, 2015.

MIRANDA, F. E.; LACERDA, K. G. Estudos em Catasetinae (Orchidaceae) – 1. **Bradea**, v. 6, p. 45-60, 1992.

MITKO, L.; WEBER, M. J.; RAMÍREZ, S. R.; HEDENSTRÖM, E.; WCISLO, W. T.; ELTZ, T. Olfactory specialization for perfume collection in male orchid bees. **Journal of Experimental Biology**, v. 219, p. 1467-1475, 2016.

MONTEIRO, S. H. N.; SELBACH-SCHNADELBACH, A.; OLIVEIRA, R. P.; VAN DEN BERG, C. Molecular phylogenetics of *Galeandra* (Orchidaceae: Catasetinae) based on plastid and nuclear DNA sequences. **Systematic Botany**, v. 35, p. 476-486, 2010.

MOORE, R. J. Index to plant chromosome numbers 1967-1971. **Regnum Vegetabile**, v. 90, p. 1-539, 1973.

NEUBIG, K. M.; WILLIAMS, N. H.; WHITTEN, W. M.; PUPULIN, F. Molecular phylogenetics and the evolution of fruit and leaf morphology of *Dichaea* (Orchidaceae: Zygopetalinae). **Annals of Botany**, v. 104, p. 457-467, 2009.

van der NIET, T.; PEAKALL, R.; JOHNSON, S. D. Pollinator-driven ecological speciation in plants: new evidence and future perspectives. **Annals of Botany**, v. 113, p. 199-211, 2014.

NILSSON, L. A. Orchid pollination biology. **TREE**, v. 7, p. 255-259, 1992.

NUNES, C. E. P.; GERLACH, G.; BANDEIRA, K. D. O.; GOBBO-NETO, L.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Two orchids, one scent? Floral volatiles of *Catasetum cernuum* and *Gongora bufonia* suggest convergent evolution to a unique pollination niche. **Flora**, v. 232, p. 207-216, 2017.

OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; FRIENDLY, M.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MCGLINN, D.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; SZOECs, E.; WAGNER, H. **Package 'vegan': community ecology package**. Version 2.4-3. 2017.

OLIVEIRA, L. V. R.; FARIA, R. T.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; SANTOS, M. O.; CARVALHO, V. P. Genetic analysis of species in the genus *Catasetum* (Orchidaceae) using RAPD markers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 357-387, 2010.

OLIVEIRA, V. M.; de BARROS, F.; FORNI-MARTINS, E. R. Chromosome numbers and karyotypes of *Catasetum* species (Orchidaceae). **Plant Biosystems**, v. 148, p. 499-507, 2013.

OXELMAN, B.; LIDÉN, M.; BERGLUND, D. Chloroplast rpS16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 206, p. 393-410, 1997.

PANSARIN, E. R.; AMARAL, M. C. E. Reproductive biology and pollination of southeastern Brazilian *Stanhopea* Frost ex Hook. (Orchidaceae). **Flora**, v. 204, p. 238-249, 2009.

\_\_\_\_\_; BITTRICH, V.; AMARAL, M. C. E. At daybreak - Reproductive biology and isolating mechanisms of *Cirrhaea dependens* (Orchidaceae). **Plant Biology**, v. 8, p. 494-502, 2006.

\_\_\_\_\_; PANSARIN, L. M. Reproductive biology of *Trichocentrum pumilum*: an orchid pollinated by oil-collecting bees. **Plant Biology**, v. 13, p. 576-581, 2011.

PANSARIN, L. M.; CASTRO, M. M.; SAZIMA, M. Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 159, p. 408-415, 2009.

\_\_\_\_\_; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Osmophore structure and phylogeny of *Cirrhaea* (Orchidaceae, Stanhopeinae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 176, p. 369-383, 2014.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1985.

PEDROSO-DE-MORAIS, C.; SOUZA-LEAL, T.; SAONCELLA, A. L.; ALMEIDA, M. Floral sexual differentiation in *Catasetum fimbriatum* (Catasetinae, Orchidaceae) exposed to different light intensities. **Lankesteriana**, v. 16, p. 47-56, 2016.

PÉREZ-ESCOBAR, O. A.; BALBUENA, J. A.; GOTTSCHLING, M. Rumbling orchids: how to assess divergent evolution between chloroplast endosymbionts and the nuclear host. **Systematic Biology**, v. 65, p. 51-65, 2016.

\_\_\_\_\_; GOTTSCHLING, M.; WHITTEN, W.M.; SALAZAR, G.; GERLACH, G. Sex and the Catasetinae (Darwin's favourite orchids). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 97, p. 1-10, 2016.

PETINI-BENELLI, A. Novelties in *Catasetum* (Orchidaceae) in the state of Rondônia, Brazil. **Feddes Repertorium**, v. 125, p. 14-24, 2014.

van der PIJL, L.; DODSON CH. **Orchid flowers: Their pollination and evolution**. Miami: Coral Gables, 1966.

RAGUSO, R. A. Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 39, p. 549-569, 2008.

\_\_\_\_\_; PELLMYR, O. Dynamic headspace analysis of floral volatiles: a comparison of methods. **Oikos**, v. 81, p. 238-254, 1998.

RAMÍREZ, S. R.; ELTZ, T.; FUJIWARA, M. K.; GERLACH, G.; GOLDMAN-HUERTAS, B.; TSUTSUI, N. D.; PIERCE, N. E. Asynchronous diversification in a specialized plant-pollinator mutualism. **Science**, v. 333, p. 1742-1746, 2011.

\_\_\_\_\_; ROUBIK, D. W.; SKOV, C.; PIERCE, N. E. Phylogeny, diversification patterns and historical biogeography of euglossine orchid bees. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 100, p. 552-572, 2010.

RENNER, S. S. The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. **American Journal of Botany**, v. 101, p. 1588-1596, 2014.

ROLFE, R. A. On the sexual forms of *Catasetum* with special references to the researchers of Darwin and others. **Journal of the Linnean Society – Botany**, v. 27, p. 206-225, 1891.

ROMERO, G. A. Phylogenetic studies in subtribe Catasetinae. **Lindleyana**, v. 5, p. 160-181, 1990.

\_\_\_\_\_. Non-functional flowers in *Catasetum* orchids (Catasetinae, Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 109, p. 305-313, 1992.

\_\_\_\_\_; CARNEVALI, G. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela - 1. *Catasetum* x *tapiriceps* Rchb.f. **American Orchid Society Bulletin**, v. 59, p. 1214-1220, 1990.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela - 2. *Catasetum* x *dunstervillei* G. Romero & Carnevali. **American Orchid Society Bulletin**, v. 60, p. 115-120, 1991a.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela - 3. *Catasetum* x *roseoalbum* (Hook.) Lindl. and *C. x wendlingeri* Foldats. **American Orchid Society Bulletin**, v. 60, p. 770-774, 1991b.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. *Catasetum* natural hybrids from southern Venezuela - 4. Biology and nomenclature. **American Orchid Society Bulletin**, v. 61, p. 334-360, 1992.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. *Catasetum*. In: PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (Eds.). **Genera Orchidacearum, Epidendroideae - Part II**. p. 13-18. New York: Oxford University Press, 2009.

\_\_\_\_\_; NELSON, C. E. Sexual Dimorphism in *Catasetum* Orchids: Forcible Pollen Emplacement and Male Flower Competition. **Science**, v. 232, p. 1538-1540, 1986.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003.

SALAZAR, G. A.; CABRERA, L. I.; GERLACH, G.; HÁGSATER, E.; CHASE, M. W. Phylogenetic relationships in *Mormodes* (Orchidaceae, Cymbidieae, Catasetinae) inferred from nuclear and plastid DNA sequences and morphology. **Phytotaxa**, v. 263, p. 18-30, 2016.

SALZMANN, C. C.; NARDELLA, A. M.; COZZOLINO, S.; SCHIESTL, F. P. Variability in floral scent in rewarding and deceptive orchids: the signature of pollinator-imposed selection? **Annals of Botany**, v. 100, p. 757-765, 2007.

SANGUINETTI, A.; BUZATTO, C. R.; PEDRON, M.; DAVIES, K. L.; FERREIRA, P. M. A.; MALDONADO, S.; SINGER, R. B. Floral features, pollination biology and breeding system of *Chloraea membranacea* Lindl. (Orchidaceae: Chloraeinae). **Annals of Botany**, v. 110, p. 1607-1621, 2012.

SCHIESTL, F. P. Ecology and evolution of floral volatile-mediated information transfer in plants. **New Phytologist**, v. 206, p. 571-577. 2015.

\_\_\_\_\_; MARION-POLL, F. Detection of physiologically active flower volatiles using gas chromatography coupled with electroantennography. In: JACKSON, J. F.; LINSKENS, H. F.; INMAN, R. B. (Eds.). **Molecular methods of plant analysis - Volume 21**, p. 171-198. Berlin: Springer-Verlag, 2002.

\_\_\_\_\_; SCHLÜTER, P. M. Floral isolation, specialized pollination, and pollinator behavior in orchids. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 425-446, 2009.

SENGHAS, K. Einige neue Arten aus der Subtribus Catasetinae I - *Catasetum* sektion Anisoceras. **Die Orchidee**, v. 41, p. 212-218, 1990.

\_\_\_\_\_. Einige neue Arten aus der Subtribus Catasetinae II- *Catasetum* sektion Isoceras. **Die Orchidee**, v. 42, p. 19-24, 1991.

STERN, W. L.; CURRY, K. J.; PRIDGEON, A. M. Osmophores of *Stanhopea* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 74, p. 1323- 1331, 1987.

SUN, Y.; SKINNER, D. Z.; LIANG, G. H.; HULBERT, S. H. Phylogenetic analysis of *Sorgum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, p. 26-32, 1994.

SWOFFORD, D. L. PAUP V 4.0b10. **Phylogenetic analysis using parcimony and other methods**. Sinauer Associates, Sunderland, 2003.

TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, v. 17, p. 1105-1109, 1991.

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

URIBE-HOLGUIN, C. **Morphology and anatomy of osmophores in *Cycnoches* Lindl. (Orchidaceae, Catasetinae) and their utility in phylogenetics**. Munich: Ludwig Maximilian University, 2016.

VOGEL, S. Die Duftdrüsen der Orchideen. **Akademie der Wissenschaften und der Literatur, Mainz, Abhandlung der Mathematisch - Naturwissenschaftliche Klasse**, v. 10, p. 598-763, 1962.

\_\_\_\_\_. Das sexuelle Anlockungsprinzip der Catasetinen- und Stanhopeen-Blüten und die wahre Funktion ihres sogenannten Futtergewebes. **Österreichische Botanische Zeitschrift**, v. 100, p. 308-337, 1963.

\_\_\_\_\_. **The role of scent glands in pollination**. New Delhi: Amerind Publishing Co., 1990.

WALKER-LARSEN, J.; HARDER, L. D. The evolution of staminodes in Angiosperms: patterns of stamen reduction, loss, and functional re-invention. **American Journal of Botany**, v. 87, p. 1367-1384, 2000.

WARFORD, N. M.; HARRELL, B. Pollination, osmophores, and gender expression of *Catasetum pendulum*. **Orchid Digest**, v. 60 p. 74-78, 1996.

WERKER, E. Trichome diversity and development. **Advances in Botanical Research**, v. 31, p. 1-35, 2000.

WHITTEN, W. M.; BLANCO, M. A.; WILLIAMS, N. H.; KOEHLER, S.; CARNEVALI, G.; SINGER, R. B.; ENDARA, L.; NEUBIG, K. M. Molecular phylogenetics of *Maxillaria* and related genera (Orchidaceae: Cymbidieae) based on combined molecular data sets. **American Journal of Botany**, v. 94, p. 1860-1889, 2007.

\_\_\_\_\_; NEUBIG, K. M.; WILLIAMS, N. H. Generic and subtribal relationships in Neotropical Cymbidieae (Orchidaceae) based on *matK/ycf1* plastid data. **Lankesteriana**, v. 13, p. 375-392, 2014.

\_\_\_\_\_; WILLIAMS, N. H.; CHASE, M. W. Subtribal and generic relationships of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. **American Journal of Botany**, v. 87, p. 1842-1856, 2000.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_; DRESSLER, R. L.; GERLACH, G.; PUPULIN F. Generic relationships of Zygopetalinae (Orchidaceae: Cymbidieae): combined molecular evidence. **Lankesteriana**, v. 5, p. 87-107, 2005.

WILLIAMS, N. H.; DODSON, C. H. Selective attraction of male euglossine bees to orchid floral fragrances and its importance in long distance pollen flow. **Evolution**, v. 26, p. 84-95, 1972.

\_\_\_\_\_; WHITTEN, M. Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sesquidecade. **Biological Bulletin**, v. 164, p. 355-395, 1983.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Molecular phylogeny and floral fragrances of male euglossine bee-pollinated orchids: A study of *Stanhopea* (Orchidaceae). **Plant Species Biology**, v. 14, p. 129-136, 1999.



WOLF, D. E.; TAKEBAYASHI, N.; RIESEBERG, L. H. Predicting the risk of extinction through hybridization. **Conservation Biology**, v. 15, p. 1039-1053, 2001.

XIANG, L.; MILC, J. A.; PECCHIONI, N.; CHEN, L.-Q. Genetic aspects of floral fragrances in plants. **Biochemistry**, v. 72, p. 351-358, 2007.

ZIMMERMAN, J. K. Ecological correlates of labile expression in the orchid *Catasetum viridiflavum*. **Ecology**, v. 72, p. 597-608, 1991.

ZIMMERMANN, Y.; RAMÍREZ, S. R.; ELTZ, T. Chemical niche differentiation among sympatric species of orchid bees. **Ecology**, v. 90, p. 2994-3008, 2009.

ZWICKL, D. J. **Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion**. Austin: University of Texas, 2006.

## **APÊNDICE 1**