



TUBO FLORAL LONGO PARA LONGAS PROBÓSCIDES: SISTEMA REPRODUTIVO E BIOLOGIA DA POLINIZAÇÃO DE *HABENARIA PAULISTANA* (ORCHIDACEAE) NA MATA ATLÂNTICA NO SUDESTE BRASILEIRO

F.W. Amorim^{1,2}

M. Sazima¹

1-Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Vegetal, Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal. 2-Autor para correspondência: amorimfelipec@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Em uma passagem clássica na história da ciência, Charles Darwin (1862) em sua obra “*On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilized by insects*”, descreveu e sugeriu alguns mecanismos pelo quais várias espécies de orquídeas são polinizadas. Entre estas, as orquídeas do gênero *Angraecum*, endêmicas da ilha de Madagascar no continente Africano tinham morfologia muito peculiar que muito lhe chamara a atenção. Estas orquídeas possuíam tubos florais na forma de cálcres muito longos, nos quais o néctar era produzido e desta forma supostamente estariam associados à biologia da polinização destas espécies. Em especial entre as orquídeas angraecoides, *Angraecum sesquipedale* com cálcres extremamente longos, os quais podiam alcançar mais de 40 cm, levaram Darwin a uma intrigante suposição para época: a de que existiria um polinizador, especificamente uma mariposa da família Sphingidae, cuja probóscide seria tão longa quanto ou longa o suficiente para acessar o néctar nesse cálcra.

Esta idéia foi duramente criticada e mesmo desacreditada pelos entomologistas da época, porém foi defendida posteriormente por Wallace (1867). Como sugerido por Darwin (1862) e Wallace (1867), o alongamento das estruturas florais e do aparelho bucal de seus visitantes ocorreria pelo fato das orquídeas necessitarem que seus visitantes florais introduzissem todo seu aparelho bucal no tubo da flor até que a cabeça tocasse nas peças reprodutivas e ocorresse a retirada e deposição das polinárias. Logo, as flores deviam ter tubos florais mais longos que as probóscides para que a polinização fosse efetivada. Por outro lado, para que este visitante pudesse maximizar o acesso ao néctar disponível, ele teria que possuir uma probóscide mais longa que o tubo floral. Este processo levaria a uma corrida evolutiva entre a planta e seu polinizador tendo como resultado, ao longo do tempo evolutivo, o surgimento de estruturas florais e de aparelhos bucais excepcionalmente longos (Darwin, 1862; mas veja Nilsson, 1988). Esta predição da existência de

uma espécie de polinizador, neste caso especificamente um esfingídeo, com uma probóscide com dimensões surpreendentes, permaneceu questionável até 1903 quando da descoberta e descrição por Rothschild & Jordan (1903) de uma espécie de esfingídeo com cerca de 22 cm de probóscide que foi batizada com o histórico nome de *Xanthopan morgani praedicta*.

Esta hipótese de coevolução entre as orquídeas angraecoides e seus polinizadores, foi corroborada por Nilsson (1988). Porém, apenas mais recentemente Wasserthal (1997), descreveu detalhadamente como *A. sesquipedale* é polinizada por *X. morgani praedicta*, no entanto propondo uma nova hipótese, a de “troca de polinizadores”, para a evolução de longos tubos florais para longas probóscides. Desde então, a íntima associação entre plantas e esfingídeos tem suscitado profundas discussões sobre o paradoxo evolutivo (coevolução *vs.* trocas de polinizadores) da ocorrência de aparatos bucais e estruturas florais extremamente longos (Alexanderson & Johnson, 2003; Nilsson, 1988; Wasserthal, 1997; Whittall & Hodges, 2007; Ennos, 2008; Hodges & Whittall, 2008).

Na América do Sul, orquídeas com longos tubos florais associados à polinização por esfingídeos estão representadas principalmente pelo gênero cosmopolita *Habenaria* (Dressler, 1990). Porém os estudos sobre a biologia reprodutiva destas espécies na América do Sul estão restritos principalmente a espécies argentinas (Galetto *et al.*, 1997; Singer & Cocucci, 1997). Para o Brasil ainda não há estudos sobre a biologia reprodutiva de espécies de *Habenaria* esfingífilas.

OBJETIVOS

Dentro deste contexto, o objetivo deste estudo foi estudar a biologia floral e o sistema reprodutivo de *Habenaria paulistana* Bat. & Biach., uma espécie estritamente esfingífila e endêmica de áreas de floresta Montana na Mata Atlântica no estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Área de estudo

O estudo foi desenvolvido entre novembro de 2008 e janeiro de 2009 em uma área de Floresta Ombrófila Densa Montana no núcleo Santa Virgínia (23°17'-23°24' S / 45°03'-45°11' W), Parque Estadual da Serra do Mar (PESM). A área total possui uma extensão de cerca de 5.000 ha e está situada entre os municípios de São Luís do Paraitinga, Cunha e Ubatuba (Velooso *et al.*, 1991). A altitude varia de 850 m a 1.100 m do nível do mar e o clima é tipo Tropical Temperado (Cwa segundo a classificação de Köppen, 1948), com precipitação média anual superior a 2.000 mm, sendo que mesmo nos meses mais secos a precipitação nunca é inferior a 60 mm (Setzer, 1966).

3.2 - Biologia floral e sistema reprodutivo

Flores e botões florais foram marcados para o acompanhamento e definição do período de antese e longevidade floral (Kearns & Inouye, 1993; Dafni *et al.*, 2005). Também foram coletadas flores e inflorescências e fixadas em álcool 70% para análises detalhadas de morfologia e morfometria floral. Para as medidas de néctar foram isoladas flores com sacos de organza de náilon e o néctar foi extraído para medidas de volume com auxílio de microcapilares de vidro e micro - seringas. A concentração equivalente em açúcares foi aferida com refratômetro manual (Kearns & Inouye, 1993). Para verificar a ocorrência de gradiente de néctar ao longo do cálc, foi realizada análise de correlação de Spearman. A receptividade estigmática foi avaliada pelo método de peroxidase, com utilização de H₂O₂ > 20% (Kearns & Inouye, 1993). Observações noturnas foram realizadas para verificação dos visitantes florais e polinizadores. Para estas observações primeiramente foram utilizadas lanternas com filtro de luz vermelha de forma a minimizar a perturbação para os possíveis visitantes (Kearns & Inouye, 1993; Dafni *et al.*, 2005). Porém, como as visitas de esfingídeos geralmente são muito raras e fortuitas, para evitar qualquer tipo de fonte de perturbação externa, foi utilizada uma máscara de visão noturna do tipo *Eyeclops® Night Vision*.

O sistema sexual foi determinado através da morfologia floral e o sistema reprodutivo foi estudado a partir de testes de polinizações controladas e observação de tubos polínicos sob microscopia de fluorescência (Martin, 1959). Em flores e botões previamente isolados com sacos de organza de náilon, foram realizados testes de autopolinizações, polinizações cruzadas e emasculação de botões para verificação de formação de frutos por agamospermia. Após os testes de polinização foram coletados pistilos e fixados em solução de Formol, Ácido Acético, Álcool Etilico 50% (FAA 50%), para o acompanhamento do crescimento de tubos polínicos em microscopia de fluorescência (Martin, 1959). O sucesso reprodutivo foi estimado pela taxa de frutos formados em condições naturais, para isso foram marcados e mantidos expostos botões e flores para a verificação da taxa de produção de frutos por polinização natural.

RESULTADOS

Habenaria paulistana Bat. & Biach. é uma espécie de

orquídea terrestre que foi descrita muito recentemente, há apenas pouco mais de dois anos. A espécie é muito rara e ocorre em densidades muito baixas, tendo sido encontrados apenas 10 indivíduos reprodutivos na área de estudos, que ocupavam campos abertos, úmidos e geralmente antropizados. As flores eram produzidas em inflorescências do tipo racemo que continham entre 10 e 22 flores. Seu mecanismo de polinização possui uma arquitetura extremamente especializada para esfingofilia, tanto em termos da presença de um cálc extremamente longo, quanto em termos da arquitetura da coluna que é organizada de maneira a promover um encaixe mecânico com a cabeça do polinizador. Na ocorrência de uma visita legítima o viscido adere firmemente aos olhos do esfingídeo que retira o par de hemipolinárias, uma em cada olho. Detalhes do mecanismo de polinização em espécies esfingófilas de *Habenaria* na Argentina foram descritos por Galetto *et al.*, (1997) e Singer & Cocucci (1997).

As flores possuem antese noturna que se inicia ao cair da noite e é acompanhada pela produção de odor intenso, adocicado e muito agradável. O estigma encontra - se receptivo desde o início da antese da flor e a superfície estigmática é altamente pegajosa, apresentando aspecto brilhoso. Por ocasião da antese as flores apresentam néctar, cujo volume varia entre 6,03 µL a 21,03 µL e a concentração entre 19% e 27%. Porém, flores não visitadas, com néctar acumulado por dois ou mais dias, alcançam volumes de até 117,50 µL e concentração de 18%. Flores com néctar acumulado apresentam uma coluna de néctar no cálc de até 130,62 mm, cujo gradiente de concentração variou de 2% na base do cálc até 28% em seu ápice. Estes valores apresentaram correlação altamente positiva, $r_s = 0,885$; $P < 0,001$. Sugere - se que a ocorrência de gradiente de concentração de açúcares em cálc de orquídeas esfingófilas, funcione como um "guia de açúcar", ou um mecanismo que induza os visitantes com longas probóscides a introduzir todo o aparelho bucal no tubo da flor até alcançar o néctar mais concentrado (Martins & Johnson, 2007).

Ao longo de seis dias não consecutivos, foram realizadas 24 horas de observações noturnas para o registro de visitantes florais. Entretanto, notou - se que nesta espécie as visitas por esfingídeos também são extremamente raras e fortuitas. Ao longo de todo esse período, foram vistas apenas três visitas, sendo duas visitas ilegítimas por uma espécie de mariposa da família Noctuidae e apenas uma única visita de esfingídeo, uma espécie do gênero *Manduca* que, no entanto não completou a visita, pois foi perturbada pelo flash fotográfico. Na área de estudos foram coletadas pelo menos sete espécies de esfingídeos com probóscides acima de 6,0 cm que podem atuar potencialmente como polinizadores desta espécie: três pertencentes ao gênero *Manduca*, *M. florestan* (6,0 cm), *M. diffissa* (7,0 cm) e *M. rustica* (13,0 cm); três pertencentes ao gênero *Coccytius*, *C. lucifer* (7,5 cm), *C. belzebuth* (8,0 cm), *C. duponchel* (8,5 cm), além de *Neococcytius cluentius* com aproximadamente 21,0 cm de probóscide. Estas espécies de esfingídeos, entretanto, são pouco abundantes, especialmente *N. cluentius* que foi representada por apenas um indivíduo num conjunto de mais de 400 indivíduos coletados na área de estudos.

Os experimentos de polinizações controladas mostraram que

a espécie é auto - compatível, porém incapaz de promover autofertilização sem a visita de um polinizador legítimo. As polinizações controladas apresentaram alta porcentagem de produção de frutos. Em tratamentos de polinização cruzada e autopolinização houve 100% de formação de frutos, em polinizações para verificar geitonogamia houve a formação de 82% frutos, ao passo que não se desenvolveram frutos por agamospermia. A formação de frutos em condições naturais foi muito baixa correspondendo a 0,068% de frutos formados.

CONCLUSÃO

Habenaria paulistana é uma espécie rara, endêmica e possui um sistema de polinização especializado. Apesar de auto - compatível, a presença de longos cálcres torna - a estritamente dependente do serviço de polinização por esfingídeos de probóscides longas. Estas mariposas por sua vez, podem ser tão raras quanto, tornando a reprodução da espécie um processo muito frágil e até mesmo vulnerável.

Agradecimentos: a diretoria do Núcleo de Santa Virgínia (NSV) inclusive pelo suporte logístico, ao Instituto Florestal e IBAMA, por permissão e autorização para a realização deste estudo no Parque Estadual da Serra do Mar. A FAPESP pela concessão de bolsa (proc. 07/58666 - 3), ao Projeto Temático Gradiente Funcional (proc. 03/12595 - 7) do programa BIOTA/FAPESP e ao CNPq.

REFERÊNCIAS

Alexanderson, R. & Johson, S.D. 2003. Pollinator - mediated selection on flower tube length in a hawkmoth - pollinated *Gladiolus* (Iridaceae). *Proceedings of the Royal Society of London B*, 269: 631 - 636.

Dafni, A; Kevan, P. G. & Husband, B. C. 2005. *Practical Pollination Biology*. Cambridge.

Darwin, C. 1862. On the various contrivances by which British and foreign are fertilized by insects. Murray, London.

Dressler, R.L. 1990. *The Orchids: natural history and classification*. Harvard University press, Cambridge, Massachusetts.

Ennos, R.A. 2008. Spurred by pollinators. *Heredity*, 100:3 - 4.

Galetto, L.; Bernadello, G & Rivera, G.L. 1997. Nectar, nectaries, flowers visitors , and breeding system in five terrestrial Orchidaceae from Central Argentina. *Journal of Plant Research*, 110: 393 - 403.

Hodges, S.A. & Whittall, J.B. 2008. One - side evolution or two? A reply to Ennos. *Heredity*, 100: 541 - 542.

Kearns, C.A. & Inouye, D.W. 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Niwot, Colorado.

Köppen, W. 1948. *Climatologia*. México: Fondo de Cultura Económica.

Martin, F.W. 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*, 34: 125 - 128.

Nilsson, L.A. 1988. Evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature*, 334, 147 - 149.

Rothschild, L.W. & Jordan, K. 1903. A revision of the Lepidopterous family Sphingidae. *Novitates Zoologicae*, 9: 1 - 972.

Setzer, J. 1966. Atlas climatológico do estado de São Paulo. Comissão Interestadual da Bacia do Paraná - Paraguai. CESP, São Paulo.

Singer, R. B. & Cocucci, A. A. 1997. Eye attached hemipollinaria in the hawkmoth and settling moth. Pollination of *Habenaria* (Orchidaceae): a study on functional morphology in five species from subtropical South America. *Botanica Acta* 110: 328 - 337.

Veloso, H. P.; Rangel Filho, A. L. R. & Lima, J. C. A. 1991. Classificação da Vegetação Brasileira, Adaptada a um Sistema Universal. IBGE, Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais.

Wallace, A.R. 1867. Creation by law. *Quaternary Journal of Science*, 4, 470-488.

Wasserthal, L.T. 1997. The pollinators of the malagasy star orchids *Angraceum sesquipedale*, *A. Sororium* and *A. compactum* and the evolution of extremely long spurs by pollinator shift. *Botanica Acta*, 110, 343 - 359.

Whittall, J.B. & Hodges, S.A. 2007. Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature*, 447: 706 - 709.