

**Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Biologia**

**A BAIXA FRUTIFICAÇÃO NATURAL E OS MECANISMOS
ENVOLVIDOS NA REPRODUÇÃO DE ORQUÍDEAS
POLINIZADAS POR ENGANO**

Artur Antunes Maciel

2016

Artur Antunes Maciel

**A BAIXA FRUTIFICAÇÃO NATURAL E OS MECANISMOS
ENVOLVIDOS NA REPRODUÇÃO DE ORQUÍDEAS
POLINIZADAS POR ENGANO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais.

Orientador

Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira

Co-orientador

Dr. Vinícius Lourenço Garcia de Brito

UBERLÂNDIA
Fevereiro - 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M152b Maciel, Artur Antunes, 1991
2016 A baixa frutificação natural e os mecanismos envolvidos na
reprodução de orquídeas polinizadas por engano [recurso eletrônico] /
Artur Antunes Maciel. - 2016.

Orientador: Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira.

Coorientador: Vinícius Lourenço Garcia de Brito.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos
Naturais.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1336>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ecologia. 2. Polinização. 3. Orquídea. 4. Plantas - Reprodução. I.
Oliveira, Paulo Eugênio Alves Macedo de, 1959, (Orient.). II. Brito,
Vinícius Lourenço Garcia de, 1985, (Coorient.). III. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e
Conservação de Recursos Naturais. IV. Título.

CDU: 574

Artur Antunes Maciel

**A BAIXA FRUTIFICAÇÃO NATURAL E OS MECANISMOS
ENVOLVIDOS NA REPRODUÇÃO DE ORQUÍDEAS
POLINIZADAS POR ENGANO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2016

Prof. Dr. André Rodrigo Rech UFVJM

Prof.^a Dr.^a Solange Cristina Augusto UFU

Prof. Dr. Paulo Eugênio Alves Macedo de Oliveira
UFU
(Orientador)

Dr. Vinícius Lourenço Garcia de Brito
UFU
(Coorientador)

UBERLÂNDIA
Fevereiro - 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à Deus, pela saúde e pela oportunidade de poder lutar pelas pessoas e razões as quais acredito.

Aos meu pais, Júlio Cesar e Sandra, pela educação, caráter, amor e o apoio incondicional em todas as fases da minha vida.

Aos meus irmãos, Maxwell e Túlio, pelas risadas, aprendizados, conversas e brigas que me fizeram crescer.

Ao professor Paulo Eugênio e ao Vinícius Brito, pela confiança, paciência e aprendizado ao longo desses anos.

Ao Senhor Milton de Almeida Magalhães Junior, proprietário da Fazenda Preciosa, pela confiança, apoio e gentileza em permitir a realização dessa pesquisa em uma das áreas do estudo.

À toda equipe do LECA pela ajuda na preparação e identificação das abelhas e ao professor Hamilton Kikuti por ceder a estufa para realizar o trabalho.

Ao João Custódio, pela imensurável colaboração em todas as etapas dessa pesquisa.

Às instituições que apoiaram ao longo de todo o trabalho CAPES, CNPq e UFU.

E por fim, gostaria de agradecer à minha segunda família, os meus amigos, que de várias formas me ajudaram a construir os caminhos para que eu alcançasse esse objetivo.

“Sozinho se chega mais rápido, mas em grupo se chega mais longe”

Autor desconhecido

ÍNDICE

| | Página |
|--|---------------|
| RESUMO..... | vi |
| ABSTRACT..... | vii |
| INTRODUÇÃO GERAL..... | 01 |
| CAPÍTULO 1: On the low reproductive success of two <i>Cyrtopodium</i> species (Orchidaceae: Cyrtopodiinae): the relative roles of biotic and abiotic pollination..... | 03 |
| Resumo..... | 04 |
| Abstract..... | 05 |
| Introduction..... | 06 |
| Materials and Methods..... | 08 |
| Results..... | 11 |
| Discussion..... | 12 |
| Concluding remarks..... | 15 |
| References..... | 15 |
| Figures and Tables..... | 19 |
| CAPÍTULO 2: Os efeitos negativos dos pilhadores de pólen e da chuva aumentam o sucesso reprodutivo de uma orquídea enganosa..... | 24 |
| Resumo..... | 25 |
| Abstract..... | 26 |
| Introdução..... | 27 |
| Materiais e Métodos..... | 28 |
| Resultados..... | 31 |
| Discussão..... | 33 |
| Referências Bibliográficas..... | 37 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 38 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES..... | 39 |

RESUMO

MACIEL, A. A. 2016. A baixa frutificação natural e os mecanismos envolvidos na reprodução de orquídeas polinizadas por engano. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais. UFU. Uberlândia-MG. 47p.

A polinização por engodo é caracterizada quando o polinizador realiza a transferência de pólen sem receber nenhuma recompensa. Essa interação antagonística está presente em 7500 espécies de angiospermas e possui uma considerável estabilidade evolutiva. Como consequência do engano e da capacidade de aprendizagem dos polinizadores, essas plantas apresentam baixas taxas reprodutivas e algumas desenvolveram mecanismos auxiliares de reprodução. Neste trabalho objetivou-se descrever a biologia reprodutiva de duas espécies sem recursos florais, bem como avaliar a existência e importância de mecanismos autógamos na reprodução dessas espécies. Além disso, avaliou-se em casa de vegetação os efeitos da florivoria e da precipitação sobre a longevidade das flores e formação de frutos. A pesquisa foi conduzida com *Cyrtopodium hatschbachii* e *C. paludicolum* em veredas de Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Os resultados mostraram que ambas são espécies autocompatíveis mas não autógamas, i.e. não possuem nenhum mecanismo de reprodução por apomixia, nem de autogamia espontânea. As duas espécies estudadas possuem apenas uma espécie de polinizador, abelhas da tribo Centridini e possuem taxas de frutificação natural e sucesso reprodutivo extremamente baixas. Apenas *Cyrtopodium hatschbachii* foi capaz de produzir frutos por autogamia mediada pela chuva, o que compreendeu cerca de 10% dos frutos formados. Além disso, para esta espécie, foi registrado em casa de vegetação que a precipitação e a florivoria reduzem a longevidade das flores. Porém, ao avaliar a interação entre esses dois fatores, foi possível verificar um novo mecanismo de polinização, uma forma de autogamia mediado pela chuva e potencializado pelo herbívoro floral. Esse fenômeno foi responsável pela conversão de 18,9% das flores em frutos, o que pode ser ainda maior em condições naturais. Isso ressalta a importância de incluir todos os fatores e interações que podem de alguma forma afetar a reprodução em estudos que avaliam o sucesso reprodutivo.

Palavras-chave: autopolinização pela chuva, orquídea sem recurso, engodo alimentar generalizado, segurança reprodutiva, sistema reprodutivo, florivoria, herbivoria floral, polinização, *Cyrtopodium*, Orchidaceae, longevidade floral, chuva.

ABSTRACT

MACIEL, A. A. 2016. Low natural fruit set and the mechanisms involved in reproduction of deceptive orchids. Master's Thesis in Ecology and Conservation of Natural Resources. UFU. Uberlândia-MG. 47p

Deceptive pollination is characterized by the pollen transfer by a pollinator without any reward. This antagonistic interaction is present in 7,500 species of angiosperms and has considerable evolutionary stability. As a result of deception and learning ability of pollinators, these plants have low reproductive rates and often present auxiliary mechanisms. This study aimed to describe the reproductive biology of two rewardless species, and to assess the existence and importance of autogamous mechanisms in their reproduction. In addition, it evaluated the effects of florivory and rain fall on the longevity of flowers and fruit set in a greenhouse experiment. The research was conducted with *Cyrtopodium hatschbachii* and *C. paludicolum* occurring in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. The results showed that both are self-fertile and non-autogamous species, i.e. have no mechanism for apomictic reproduction or spontaneous autogamy. The two had only one species of pollinator bees belonging to the Centridini tribe and had extremely low fruit set rates and reproductive success. Only *Cyrtopodium hatschbachii* was capable of producing fruits after rain-assisted pollination, which comprised about 10% of the fruits. In addition, for this species it was recorded in a greenhouse experiment that precipitation and florivory reduced the longevity of flowers. However, when assessing the interaction between these two effects, we found a new mechanism of pollination, a form of autogamy mediated by rain and enhanced by floral herbivory. This phenomenon was responsible for conversion of 18.9% of the flowers into fruits, which can be even higher under natural conditions. This highlights the importance of including, in all the factors and interactions that can somehow affect reproduction in studies evaluating the reproductive success of the plants.

Keywords: rain-assisted pollination, orchid nonrewarding, generalized food deception, reproductive assurance, breeding system, florivory, floral herbivory, pollination, *Cyrtopodium*, Orchidaceae, floral longevity, rain.

INTRODUÇÃO GERAL

A polinização pode ser definida como o ato da transferência de células reprodutivas masculinas ao receptor feminino de outra (ou da mesma) flor da mesma espécie. Esse processo pode ocorrer basicamente por dois fatores: abióticos, quando a polinização é realizada pelo vento ou pela água por exemplo, ou bióticos, quando a transferência de pólen é feita por animais tais como insetos, aves ou morcegos. A polinização feita por animais é responsável por favorecer cerca de 308.000 espécies de plantas, o que compreende aproximadamente 87,5% de todas as espécies botânicas descritas, incluindo as espécies cultivadas pelo homem (RECH *et al.*, 2014). Isso revela a grande importância dos estudos de polinização não apenas pela ótica economia, mas também pela incalculável importância ecológica envolvendo essa interação.

De forma geral, a polinização é reconhecida como uma interação mutualística onde a planta recebe o benefício da transferência de pólen ao passo que o polinizador é recompensado. Todavia, cerca de 7500 espécies de angiospermas, representadas em 33 famílias, não oferecerem nenhum tipo de recurso aos seus polinizadores, os atraindo por engano (RENNER, 2006). Nesse tipo de engodo, são conhecidas várias vantagens para a planta, principalmente energética (THAKAR *et al.*, 2003), ao ter o serviço de polinização garantido sem ter que pagar por ele com recursos florais como pólen ou néctar. Porém, para vários parâmetros reprodutivos essas plantas apresentam valores muito baixos quando comparadas com plantas que oferecem recursos. Por exemplo, a taxa de frutificação natural das plantas polinizadas por engano é duas vezes menor quando comparadas com as plantas com recompensas florais (NEILAND & WILCOCK, 1998). Além disso, a frequência de visitas dos polinizadores é muito baixa nas flores de engodo (CALVO, 1990), pois eles podem aprender a evitar estas flores (GUMBERT & KUNZE, 2001) e com isso o sucesso reprodutivo é reduzido. Com a baixa frequência de visitação e baixa frutificação, espécies polinizadas por engodo comumente dependem de mecanismo de autogamia, como autopolinização espontânea, mediada ou não por fatores bióticos ou abióticos (PANSARIN *et al.*, 2008a; FAN *et al.*, 2012).

A evolução do engodo, principalmente na família Orchidaceae, é algo que tem sido bastante investigado. Várias hipóteses já foram propostas para explicar a estabilidade evolutiva dessas interações, mas nenhuma hipótese isoladamente foi capaz de abarcar toda a complexidade envolvida nesses processos (JERSÁKOVÁ *et al.*, 2006). Segundo a revisão desses autores, a hipótese mais aceita, da promoção da polinização cruzada, aponta a

abundância dos polinizadores como um ponto chave. Quando são abundantes existe uma maior qualidade de sementes provenientes da maior eficiência de transferência de pólen da polinização cruzada e essa condição é favorecida. Já quando são raros, as vantagens são contrabalançadas pela baixa quantidade de sementes o que pode favorecer o surgimento de recursos ou mecanismos de autogamia.

O gênero *Cyrtopodium* é composto por espécies que não oferecem recursos e formam poucos frutos em condições naturais, como consequência da baixa visitação dos polinizadores (PEMBERTON & LIU, 2008; PANSARIN *et al.*, 2008a; DUTRA *et al.*, 2009; LIU & PEMBERTON, 2010). Uma das poucas espécies estudadas do gênero, *C. pollyphyllum*, é capaz assegurar sua reprodução através de um processo de autogamia facultativa mediada pela chuva (PANSARIN *et al.*, 2008b). Mas até que ponto as outras espécies do grupo dependem de polinizadores bióticos ou abióticos para assegurar sua reprodução ainda requer mais estudos. Desta forma, conhecer a biologia reprodutiva dessas espécies, bem como avaliar e comparar a importância dos polinizadores e dos processos de autogamia pode auxiliar no entendimento da estabilidade evolutiva das orquídeas enganosas. Logo, o objetivo deste trabalho foi descrever a biologia reprodutiva de duas espécies de *Cyrtopodium* do Cerrado e investigar a existência e importância de mecanismos complementares de autogamia na reprodução dessas espécies.

A dissertação está organizada em dois capítulos: no primeiro foi investigada a biologia reprodutiva de duas orquídeas polinizadas por engodo e definidos os papéis dos polinizadores bióticos e abióticos na segurança reprodutiva das espécies; no segundo foi testado experimentalmente o efeito da herbivoria floral e da chuva sobre a autogamia numa das espécies estudadas.

CAPÍTULO 1

On the low reproductive success of two *Cyrtopodium* species (Orchidaceae: Cyrtopodiinae): the relative roles of biotic and abiotic pollination

RESUMO

MACIEL, A. A. 2016. O baixo sucesso reprodutivo de duas espécies de *Cyrtopodium* (orchidaceae: cyrtopodiinae): o papel relativo da polinização biótica e abiótica.

O engano é adotado como estratégia reprodutiva em quase um terço das espécies de orquídeas, com o engano alimentar generalizado sendo o mais comum ($\approx 90\%$). Devido à limitação de polinização, estas espécies sem recursos tendem a apresentar um reduzido sucesso reprodutivo, quando comparadas com as suas homólogas com recompensas florais. Nestes sistemas, as espécies que apresentem auto-compatibilidade seguido por mecanismos alternativos de autogamia podem compensar eventos de polinização cruzada bióticos baixos. Este é o caso de auto-polinização mediada pela chuva, um mecanismo raro em orquídeas. Neste estudo, foi investigado a biologia reprodutiva de duas espécies congênicas: *Cyrtopodium hatschbachii* e *C. paludicolum*. Investigou-se se as populações sofrem limitação de polinização e / ou depressão por endogamia, examinando polinizadores, bem como sucessos masculinos e femininos. Também foi verificado se a polinização mediada pela chuva ocorrem nestas espécies, determinando o papel relativo dos polinizadores e da chuva no conjunto global de frutos. Ambas as espécies são alógamas e auto-compatíveis. A frutificação natural, no entanto, foi muito baixa, não ultrapassando 1,40% durante os três anos de observações. Este sucesso feminino baixo pode resultar da rara visitação de polinizadores seguido por uma alta especificidade, com ambas as espécies sendo polinizadas por uma única espécie de abelha. Embora autofecundação espontânea não ocorrer para qualquer das espécies, verificamos frutos formados pela ação da chuva em *C. hatschbachii*. Devido ao acúmulo de água, o polinário desliza para o estigma, promovendo a autofecundação em aproximadamente 10% dos frutos. Ao contrário de *C. paludicolum*, *C. hatschbachii* não apresenta depressão endogâmica ou baixa formação de sementes de frutos de autopolinização. Apesar de rara, a polinização pela chuva é relevante pois, frutos oriundos da ação da chuva podem conferir uma segurança reprodutiva, especialmente em circunstâncias de limitação de polinizadores. Por fim, a estratégia de engano foi confirmada para outras espécies deste gênero estudado. Além disso, foi relatado o segundo caso de auto-polinização mediada pela chuva em *Cyrtopodium*, sugerindo que esse fenômeno pode ser mais comum do que anteriormente previsto.

Palavras-chave: autopolinização pela chuva, orquídea sem recurso, engodo alimentar generalizado, segurança reprodutiva, sistema reprodutivo.

ON THE LOW REPRODUCTIVE SUCCESS OF TWO *CYRTOPODIUM* SPECIES (ORCHIDACEAE: CYRTOPODIINAE): THE
RELATIVE ROLES OF BIOTIC AND ABIOTIC POLLINATION.

Artur Antunes Maciel¹; Paulo Eugênio Oliveira²

¹Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais,
Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

²Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia.

Abstract

Deception is adopted as reproductive strategy in nearly one third of orchid species, with generalized food deception being the most common ($\approx 90\%$). Due to pollination limitation, these rewardless species tend to exhibit reduced reproductive success when compared with their rewarding counterparts. In these systems, species that present self-compatibility followed by alternative mechanisms of autogamy may compensate such low biotic cross-pollination events. This is the case of rain-assisted self-pollination, a rare mechanism in orchids. In this study, we investigate the reproductive biology of two terrestrial congener species: *Cyrtopodium hatschbachii* and *C. paludicolum*. We explored if populations suffer pollination limitation and/or inbreeding depression, examining pollinators as well as male and female successes. We also ascertain if rain-assisted pollination occur in these species, determining the relative role of pollinators and rain in the overall fruit set. Both species are xenogamous and self-compatible. Natural fruit set, however, is quite low, not exceeding 1.40% during three years of observation. This low female success may result from the reduced frequency of pollinator visitation followed by a high pollinator specificity, with both species being pollinated by its single specialist bee. Although spontaneous selfing did not occur for either species, we verified fruits formed by rain action in *C. hatschbachii*. Due to water accumulation, pollinarium slips towards the stigma, promoting selfing in approximately 10% of fruits. Unlike *C. paludicolum*, *C. hatschbachii* does not present inbreeding depression or reduced seed formation after selfing. Rain-assisted fruits may confer reproductive assurance for this later species, especially under circumstances of pollinator limitation. Overall, we confirm deception strategy for other species of this

understudied genus. In addition, we report the second case of rain-assisted self-pollination in *Cyrtopodium*, suggesting that it may be more widespread than previously thought.

Keywords: rain-assisted self-pollination, rewardless orchids, generalized food deception, reproductive assurance, breeding system

1. Introduction

The huge diversity of orchids has been associated to their intimate and complex interactions with pollinators, apparently driven by selection for outcrossing (Tremblay, 1992; Cozzolino and Widmer, 2005). Even though, most orchids set much more flowers than fruits, especially the rewardless species (Tremblay et al., 2005), which comprise about one-third of the diversity of this large family (Ackerman, 1986; Nilsson, 1992; Cozzolino and Widmer, 2005). In fact, mean reproductive success of non-rewarding species (20.7%) is nearly half when compared those offering legitimate reward (37.1%) (Tremblay et al., 2005; see also Neiland and Wilcock, 1998).

Even lacking edible rewards, most rewardless orchids persist as mimics, exploiting sensory biases of pollinators through several mechanisms (Jersáková et al., 2006). Remarkably, from the 7500 angiosperm species estimated as deceptive, around 6500 are orchids (Renner, 2006). Pollination by deceit in this family may occur through sexual, brood site or food mimics (Jersáková et al., 2006). Generalized food deception (i.e. exploiting pollinators innate food-foraging behaviour by displaying the general appearance of a potential food resource without mimicking specific models) is by far the most common mechanism, occurring in nearly 90% of all deceptive orchids (Ackerman, 1986; Nilsson, 1992; Jersáková et al., 2006). Paradoxically, while extremely common, food mimic species are the least efficient in setting fruits (Tremblay et al., 2005).

Cross-pollination in deceptive species is achieved by decreasing visitation period of pollinators and/or discouraging recurrent visits at the flower or inflorescence levels (Nilsson, 1992; Johnson et al., 2003). On the other hand, given that innate preferences for floral traits are quickly overruled by learning (Biernaskie et al., 2009), after naïve pollinators attempted to explore a couple food deceptive flowers, they keep visiting only rewarding species and avoid the non-rewarding (Dafni and Ivri, 1981; Schiestl and Schlüter, 2009). This reduced

pollinator service window may decrease reproductive success of deceptive orchids (Neiland and Wilcock, 1998; Tremblay et al., 2005). In addition, the low fruit set may be further reduced if considered that most species do not self-pollinate, and therefore are unable to reproduce if their specific pollinators are scarce (Tremblay et al., 2005). Under this framework, in generalized food-deceptive self-compatible species, alternative mechanisms of inbreeding may be gainful under circumstances of pollinator limitation.

Despite being less effective, some orchid genera are exclusively food-deceptive. Apparently, this is the case of *Cyrtopodium* (Catasetinae) (Pemberton and Liu, 2008; Pansarin et al., 2008a; Dutra et al., 2009; Liu and Pemberton, 2010), which comprises around 50 species distributed throughout the Americas, with the peak of species richness occurring in Brazil (39 species), especially within the core Cerrado biome (29 species) (Romero-González et al., 2008). However, no species occurring in this diversity centre had its reproductive biology investigated. Unfortunately, although presenting showy flowers, species of the genus have never received much attention (Romero-González et al., 2008). To date, only two species were studied with respect to pollination biology: *Cyrtopodium punctatum*, from Florida (Pemberton and Liu, 2008; Dutra et al., 2009) and *Cyrtopodium polyphyllum*, from Atlantic rainforest of Brazil (Pansarin et al., 2008a; Liu and Pemberton, 2010).

This latter species presents occasional rain-assisted self-pollination (*sensu* Pansarin et al., 2008b), a rare phenomenon in orchids. Rain water on stigma forms a viscous drop contacting the pollinarium, that slides towards the stigma after the viscous drop shrink due to evaporation, promoting selfing (Pansarin et al., 2008b). Despite occurring only in a few flowers, this may be an important strategy assuring fruit set when pollinator visits are scarce (Pansarin et al., 2008a, b). Notwithstanding, natural history traits of other congeneric species are simply unknown.

As a first step towards filling this knowledge gap, we investigated the reproductive biology of two syntopic *Cyrtopodium* species from the diversity centre of the genus. We aimed (i) to confirm if these species are rewardless and (ii) to determine their breeding system, investigating if these populations suffer inbreeding depression. We also (iii) investigate potential pollinators and pollination limitation, determining plants male and female successes. Ultimately, we (iv) examine rain-assisted self-pollination as a strategy to increase fruit set, determining the relative role of pollinators and rain in the overall fruit set.

2. Materials and Methods

2.1. Studied species

Cyrtopodium hatschbachii Pabst and *Cyrtopodium paludicolum* Hoehne are found in wet meadows, presenting terrestrial habitat (Romero-González et al., 2008). Both species occur in Brazil Southeast and Midwest, with *C. hatschbachii* distribution extending to Paraguay and Argentina while *C. paludicolum* to Bolivia (Romero-González et al., 2008). Brazilian populations are found in veredas, one of the plant formations of the Cerrado biome characterized by a dense herb-subshrub dominant stratum, with scattered small trees and the buriti palm (*Mauritia flexuosa* L. f.) (Araújo et al., 2002).

2.2. Studied sites

Fieldwork was carried out between August 2011 and June 2013 in two veredas located in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Data on *C. hatschbachii* and *C. paludicolum* Hoehne were respectively collected in the Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU) (18°60'S, 48°18'W) and in the margins of the MGC-455 road (19°03'S, 48°21'W) (see vereda 2 in Araújo et al., 2002). For both veredas, climate is seasonal, with warmer rainy and colder dry seasons (Kottek et al., 2006). Mean annual rainfall is 1474 mm and in the rainy season (October-March), monthly average is superior to 190 mm (Queiroz and Assunção, 2013).

2.3. Floral surveys and reproductive system

For each species, we collected 15 newly opened flowers from different individuals and dissected then under stereomicroscope searching for any floral reward. We investigated the breeding system of *C. hatschbachii* in 2011 and *C. paludicolum* in 2012. In the field, individuals with previously bagged buds had their flowers subjected to the following treatments of controlled pollination (*sensu* Kearns and Inouye, 1993): 1) self-pollination: the pollinia were removed and inserted into the stigma of the same flower; 2) cross-pollination: the pollinia of an individual were inserted in the stigma of other, at least 10m distant; 3) spontaneous self-pollination: buds were only marked and bagged, without any further treatment; 4) emasculation: the pollinia were removed, with no posterior manipulation. In *C. hatschbachii*, these procedures were applied to 12 flowering plants, using four flowers per individual for each treatment, totalling 16 flowers per individual. In *C. paludicolum*, we surveyed 10 plants, three flowers for each treatment per individual, totalling 12 flowers per

individual. We determined the self-incompatibility index using the ratio between the percentage of fruits resulting from self-pollination and cross-pollination (ISI *sensu* Bullock, 1985) and assumed that the species is self-incompatible if the obtained ISI was lower than 0.20.

As a control group, marked flowers on unbagged inflorescences remained exposed to pollinators in order to estimate rates of fruit formation by natural pollination (open-pollination). For this purpose, in 2011 and 2012, respectively 33 (1069 flowers) and 31 (1459 flowers) *C. hatschbachii* individuals had their fruit set rates monitored. For *C. paludicolum*, we followed 21 individuals in 2012 (794 flowers) and 2013 (1110 flowers). In these control groups, we also observed if these species present rain-assisted self-pollination by inspecting the pollinia deposition process in the stigma, especially after rain. Flowers were considered pollinated by rain when the entire pollinarium was found in the stigmatic surface. We considered rain-assisted self-pollination only depositions that successfully formed fruits.

For *C. hatschbachii*, we estimated seed viability for treatments that originated fruits, examining six, eight and seven fruits, respectively from self, cross and open-pollination groups (rain-assisted fruits not included). We applied the tetrazolium test by submitting seeds from fresh fruits to 1% 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride solution, wherein developed embryos are stained red and rudimentary ones remain unstained (*sensu* Grabe, 1970). We analysed 200 seeds per fruit and classified then as viable (stained) or non-viable, and mono or polyembryonic (two or more embryos stained).

2.4. Floral visitors and reproductive success

In order to investigate floral visitors, field observations were carried out during 24 days in September 2012 (*C. hatschbachii*) and other 24 in March 2013 (*C. paludicolum*). During the first two days, observations were performed between 7–18h while in the following, during the activity peak of visitors (10–14h), totalling 100 hours of observation for each species. Observations were performed by the same person, at about two meters from the focal plants. An observation day was performed in one single individual (12 individuals, two days per individual). After visitation, invertebrates were captured and mounted. We discriminated pollinators from other visitors by noticing the presence of the pollinia attached to the back of their heads after visitation. Based on other *Cyrtopodium* pollination systems, we did not consider pollinators those visitors with pollinia in other body parts (see

Pansarin et al., 2008a; Pemberton and Liu, 2008; Liu and Pemberton, 2010). For each visitor, we recorded its identity, size (*sensu* Frankie et al., 1983), duration and total number of visits. Floral visitors were deposited in the LECA (Laboratório de Ecologia e Comportamento de Abelhas), at Universidade Federal de Uberlândia. In order to investigate occurrence of nocturnal pollination, intact flowers were marked at the end of the day and analysed in the following morning (10 inflorescences, 10 flowers per inflorescence).

In 2012, reproductive success was investigated by inspecting non-manipulated flowers at the end of anthesis (15 *C. hatschbachii* and 31 *C. paludicolum* individuals). Male reproductive success was inferred through the ratio between the number of pollinia removal and the total number of flowers. On the other hand, female reproductive success was estimated by the number of pollinia depositions on the stigmatic surface in relation to the number of flowers.

2.5. Statistical analysis

We investigated fruit set differences between treatments that originated fruits (self, cross and open-pollination [including rain-assisted]; see results) by applying a GLMM (General Linear Mixed Model) for each species using the package *lme4* (Bates et al., 2014). Number of flowers and year of collection were treated as random effects. Due to our unbalanced data, we adjusted a 'Type II' sum of squares (Langsrud, 2003) using the package *car* (Fox and Weisberg, 2011). Whenever significant results were obtained, we performed planned comparison through the package *multcomp*, using the 'mcp function' (Hothorn et al., 2007). Specifically, inbreeding depression was investigated by comparing fruit set rates between self and cross-pollination while pollinator limitation by comparing cross and open-pollination groups.

Seed viability differences were investigated through one-way ANOVA, taking self, cross and open-pollination as treatment levels. We assessed differences between male and female reproductive successes (log+1 corrected) by fitting a GLMM (General Linear Mixed Model) for each species treating number of flowers surveyed as random effect. In all analysis, data distribution was examined by inspecting homogeneity of residual vs. fitted values plots (Zuur et al., 2009). All analyses were performed in R statistical environment (R Development Core Team, 2015).

3. Results

Cyrtopodium hatschbachii and *C. paludicum* flower once a year, respectively in August-October and February-April. Just after or even during flowering, these species began a new cycle of vegetative growth. *Cyrtopodium hatschbachii* displayed lilac-pinkish flowers with obovate petals and sepals and labellum with yellowish center (Fig. 1A). *Cyrtopodium paludicum* showed yellow flowers with obovate petals, ovate-lanceolate sepals undulate on the margins and labellum with reddish centre (Fig. 1B). Both species presented a three-lobed labellum with a central callus. In *C. hatschbachii*, pink spots were mainly found in the labellum while in *C. paludicum*, red spots may occur all over the flower. Both species are rewardless and present weak fragrance. Each flower present two hard pollinia. Anthesis of the 4–6 cm flowers began at dawn and flower lifespan was around ten days. Each plant generally displayed one inflorescence organized in raceme, and flowers began to open from bottom to top. *C. hatschbachii* inflorescences presented a mean \pm SD of 39.5 ± 21.03 flowers ($n = 64$) while *C. paludicum* 45.33 ± 24.83 ($n = 42$).

No fruits were formed after spontaneous self-pollination or emasculation treatments, indicating that these species require pollinator agents for fruit and seed production (Table 1). Concerning treatments that set fruits, there were significant differences in both species, *C. hatschbachii* ($\chi^2 = 12.41$; $df = 2$; $p = 0.002$) and *C. paludicum* ($\chi^2 = 29.71$; $df = 2$; $p < 0.001$). In the first, self and cross-pollination did not differ in fruit set ($z = 0.85$; $p = 0.577$) while cross vs. open-pollination did so ($z = 3.15$; $p = 0.003$; Fig. 2A). On the other hand, *C. paludicum* cross-pollination fruit-set differed both from self ($z = 2.48$; $p = 0.025$) and open-pollination ($z = 5.45$; $p < 0.001$; Fig. 2B). For both species and in different years, natural fruit set was low, and did not surpass 1.40% (biotic + rain pollination).

Despite fruits from self-pollination showed lower seed viability proportion than those from cross and open-pollinations (Table 2), these differences were not significant ($F_{2,18} = 1.96$, $p = 0.17$). In all treatments, seeds with two embryos occurred (Fig. 1C), but they did not reach 0.25% of total number of seeds.

Both species are sexual, but self-compatible (ISI *C. hatschbachii*: 0.78; *C. paludicum*: 0.61). Although spontaneous selfing did not occur for any species, we verified fruits formed by rain-assisted self-pollination in *C. hatschbachii* (Figs. 1D and E), wherein the pollinarium was found to slid into the stigmatic surface. Rain-assisted fruits were two out of 15 in 2011

and two out of 20 in 2012, respectively 13.33% and 10% of overall natural fruit set (see Table 1).

Number of visits was quite low, especially concerning pollinators (Table 3). These visitors never revisited the same flower and usually left the inflorescence after probing one or two flowers. Only *Epicharis (Epicharis) bicolor* had *C. hatschbachii* pollinia attached to its body. In *C. paludicolum*, *Centris (ptilotopus) scopipes* and *Epicharis (Epicharana) flava* removed pollinia. However, this later is probably not a pollinator because pollinia were found on the lateral part of the thorax, leading to a lower chance of deposition on the stigma of another flower. The pollination mechanism is quite quick, starting with the bee landing directly in the labellum, already beneath column. When the wings stop beating, the bee's mass forces the labellum articulation downwards, directing the pollinator to a vertical position. Thereby, the posterior part of the bee's head is slipped on the viscidium surface, removing the pollinarium. Immediately after, pollinator leaves the flower with pollinia attached to its head.

During observations, we noticed that large bodied bees frequently approached inflorescences, flying around and leaving it without visiting any flower, especially at the end of flowering season/period. We also observed the occurrence of *Trigona spinipes* pollen robbers, especially in *C. hatschbachii* flowers. In most of these cases, these visitors consumed floral parts, especially the anther cap and the pollinia. For both species, we did not record any nocturnal pollination or pollinia removal.

The reproductive success was low for both species. In *C. hatschbachii*, male success occurred in only 12.08% (mean \pm SD: 2.40 ± 2.29) of flowers and female in 6.38% (1.27 ± 1.49). For *C. paludicolum*, pollinia removal occurred in 23.34% (2.32 ± 2.41) and deposition in 5.68% (0.54 ± 0.85). Male reproductive success was higher than female in both, *C. hatschbachii* ($\chi^2 = 5.26$; $df = 1$; $p = 0.021$; Fig. 2C) and *C. paludicolum* ($\chi^2 = 22.45$; $df = 1$; $p < 0.001$; Fig. 2D).

4. Discussion

Cyrtopodium hatschbachii and *C. paludicolum* are self-compatible, non-apomictic species, dependent on biotic pollination, as recorded for *C. polyphyllum* (Pansarin et al., 2008a; Liu and Pemberton, 2010) and *C. punctatum* (Pemberton and Liu, 2008; Dutra et al.,

2009). *Cyrtopodium hatschbachii* does not seem to suffer inbreeding depression. On the other hand, there was a lower fruit-set in *C. paludicolum* after self-pollination.

Natural fruit set frequency presented a large discrepancy when compared to cross-pollination, suggesting that these species are strongly pollinator-limited. As species are rewardless, low fructification occurred due to reduced visitation of pollinators. Fruit-set may be further hindered by the fact that both species require pollination by relatively specialized large bees, reducing the number of pollination possibilities. Due to the high degree of orchid specialization, it was suggested that most species (60-70 %) are assisted by a single pollinator species (Tremblay et al., 2005). However, generalized food deceptive orchids usually enhance their reproductive success by attracting and deceiving a guild of available pollinators (Cozzolino et al., 2004; Cozzolino and Widmer, 2005), being more generalist than food reward, scent reward and sexually deceptive species (Schiestl and Schlüter, 2009). This does not appear to be the case of *Cyrtopodium*, which are species visited by only one (this study; Liu and Robert Pemberton, 2010) or two bee species (Pansarin et al., 2008a; Pemberton and Liu, 2008). This reduced pollinator diversity may also contribute to the low reproductive success of the genus, since bee individuals learn to avoid and do not visit flowers anymore, leaving the plant without pollinator agents. Even though, based on our floral observations on pollinator behavior, the few fruits set by biotic pollination are outcrossed and probably not geitonogamous.

Previously studies report Centridini oil-collecting bees as *Cyrtopodium* pollinators (Pansarin et al., 2008a; Pemberton and Liu, 2008; Liu and Pemberton, 2010). These bees try to obtain oil rewards from the callus of the labellum (Pemberton and Liu, 2008), which contains osmophores responsible for secreting lipophilous fragrance compounds (Pansarin et al., 2008a). In fact, it was suggested that reproductive success in *Cyrtopodium* may be related to the proximity to oil rewarding model plants, pollinated by oil collecting bees (Pansarin et al., 2008a; Pemberton and Liu, 2008). This may shed some light in the biotic pollination mechanism of *C. hatschbachii* and *C. paludicolum*, which are pollinated by oil collecting bees, probably in a system influenced by neighboring plant species (Maciel *et al.*, *in prep.*). However, the pollinator behavior is also important in male reproductive success, since other large bodied bees visited flowers, but were unable to remove the pollinarium.

We recorded one pollinia deposition for each two removals in *C. hatschbachii* and one deposition every four removals in *C. paludicolum*. However, when pollinia deposition

rates (*C. hatschbachii*: 6.38%; *C. paludicum*: 5.68%) are compared with open pollination annual average frequency (*C. hatschbachii*: 1.22%; *C. paludicum*: 0.81%), we found that not every deposition leads to fruit set. This may occur due to the non-optimal rates of fertilization (see treatments), which are common in the genus (Pansarin et al., 2008a; Pemberton and Liu, 2008; Dutra et al., 2009; but see Liu and Pemberton, 2010) and lead fruit set frequency to be even more reduced.

Since biotic pollination frequency is extremely low, alternative mechanisms of increasing fruit set are valuable for the final reproductive output balance. As studied species are self-compatible, they may reproduce through allogamy and autogamy. Some orchid species may present autonomous self-pollination as a strategy to increase reproductive output (Catling, 1990). Although we did not find this mechanism for any studied species, we report facultative rain-assisted self-pollination in *C. hatschbachii*. Besides *Cyrtopodium*, three other rain-assisted self-pollination mechanisms have been described in Orchidaceae. In *Oeceoclades maculata*, rain leads anther cap to fall through physical disturbance, curving the stipe downwards and contacting the exposed pollinia to the stigma (González-Díaz and Ackerman, 1988; Aguiar et al., 2012). A similar mechanism of anther cap pullout occur in *Acampe rigida*, but afterwards raindrops bounce upward the pollinia, which is then pulled back by the stipes straight to the stigma (Fan et al., 2012). Finally, during flower lifespan of *Liparis loeselii*, the anther cap raises due to tissue degeneration, leaving pollen masses suspended; thereafter, water flow or a droplet gradually shrinking by evaporation deposit the pollinia into the stigma (Catling, 1980). In *Cyrtopodium*, rain pollination mechanism differs from those former examples because anther cap remains, not being removed or raised. Furthermore, raindrop lets mechanical action do not deposit pollinia in the stigma, which occurs only mediated by the viscous droplet evaporation, leading the entire pollinarium to slid down into the stigma (see Pansarin et al., 2008b).

In this study, we found that, although rain pollination was rare in *C. hatschbachii* (occurring in 0.16% of all flowers), it was responsible by approximately 10% of annual fruit set in this species. Unlike *C. paludicum*, *C. hatschbachii* does not present reduced fruit set when selfed. In addition, seed formation of inbred did not differ from outbred fruits. Furthermore, *C. hatschbachii* fruit set under self and cross-pollination treatments were lower than that of *C. paludicum*. Therefore, facultative rain-assisted self-pollination may

confer reproductive assurance to this pollinator-limited species, especially when considering that each fruit may contain thousands of viable seeds.

Studied species flowering periods present similar precipitation patterns (Queiroz and Assunção, 2013), but we never found a rain pollinated fruit of *C. paludicolum*. This species may not present rain-assisted pollinated probably due to morphological constrains. Apparently, there is a specific susceptibility for fruit formation by rain. For instance, in *C. polyphyllum*, fruit formation assisted by rain may reach 2.2% of overall flowers (Pansarin et al., 2008b) while in *C. punctatum* it has never been observed (Pemberton and Liu, 2008; Dutra et al., 2009). To date, it is still unclear which factor may contribute to this mechanism, but flower age, variations in stigma and column morphology and flower position in the inflorescence may be somehow responsible (Pansarin et al., 2008a, b).

5. Concluding remarks

In this study, we report that the self-compatible *C. hatschbachii* and *C. paludicolum* mainly reproduce by allogamy. Pollinators are large bodied bees of the Centridini tribe, which visit flowers with low frequency. Like other rewardless orchids, species studied here present low reproductive success as well as natural fruit set rates. We confirm deception strategy and pollinator limitation for two other *Cyrtopodium* species from the diversity centre of the genus. In *C. hatschbachii*, though, additional fruit set may be assured by rain action. This is the second report of facultative rain-assisted self-pollination in *Cyrtopodium*, indicating that this mechanism of reproductive assurance may be more widespread than previously thought.

Acknowledgements

We are grateful to the LECA staff for bee identification and Milton de Almeida Magalhães Junior for allowing us studying *C. paludicolum* on his property.

References

Ackerman, J.D., 1986. Mechanisms and evolution of food deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* 1, 108–113.

Aguiar, J.M.R.B.V., Pansarin, L.M., Ackerman, J.D., Pansarin, E.R., (2012). Biotic versus abiotic pollination in *Oeceoclades maculata* (Lindl.) Lindl.(Orchidaceae). *Plant Spec. Biol.* 27, 86–95.

<https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2011.00330.x>

Araújo, G.M., Barbosa, A.A.A., Arantes, A.A., Amaral, A.F., 2002. Composição florística de veredas no Município de Uberlândia, MG. *Rev. Bras. Bot.* 25, 475–493.

<https://doi.org/10.1590/S0100-84042002012000012>

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R.H.B., Singmann, H., et al., 2014. Package ‘lme4’. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Biernaskie, J.M., Walker, S.C., Gegear, R.J., 2009. Bumblebees learn to forage like bayesians. *Am. Nat.* 174, 413–423.

<https://doi.org/10.1086/603629>

Bullock, S.H., 1985. Breeding Systems in the Flora of a Tropical Deciduous Forest in Mexico. *Biotropica* 17, 287–301.

<https://doi.org/10.2307/2388591>

Catling, P.M., 1980. Rain-assisted autogamy in *Liparis loeselii* (L.) LC Rich.(Orchidaceae). *B. Torrey. Bot. Club.* 107, 525–529.

<https://doi.org/10.2307/2484083>

Catling, P.M., 1990. Auto-pollination in the Orchidaceae. In: Arditti, J. (Ed.), *Orchid biology, reviews and perspectives*. Timber Press, Oregon, pp. 121–158.

Cozzolino, S., D'Emérico, S., Widmer, A., 2004. Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271, S259–S262.

<https://doi.org/10.1098/rsbl.2004.0166>

Cozzolino, S., Widmer, A., 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception?. *Trends Ecol. Evol.* 20, 487–494.

<https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.06.004>

Dafni, A., Ivri, Y., 1981. Floral mimicry between *Orchis israelitica* Baumann and Dafni (Orchidaceae) and *Bellevalia flexuosa* Boiss. (Liliaceae). *Oecologia* 49, 229–232.

<https://doi.org/10.1007/BF00349193>

Dutra, D., Kane, M.E., Adams, C.R., Richardson, L., 2009. Reproductive biology of *Cyrtopodium punctatum* in situ: implications for conservation of an endangered Florida orchid. *Plant Spec. Biol.* 24, 92–103.

<https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2009.00242.x>

Fan, X.L., Barrett, S.C.H., Lin, H., Chen, L. L., Zhou, X., Gao, J.Y., 2012. Rain pollination provides reproductive assurance in a deceptive orchid. *Ann. Bot.* 110, 953–958.

<https://doi.org/10.1093/aob/mcs165>

Fox, J.A., Weisberg, S., 2011. The car package. In: *An R companion to applied regression*, Sage Publications, USA.

Frankie, G.W., Harber, W.A., Opler, P.A., Bawa, K.N., 1983. Characteristics and organisation of the large bee pollination system in the Costa Rican dry forest. In: Jones, C.E., Little, R.J. (Eds), *Handbook of experimental pollination biology*. Van Nostrand, New York, pp. 411–447.

González-Díaz, N., Ackerman, J.D., (1988). Pollination, fruit set, and seed production in the orchid, *Oeceoclades maculata*. *Lindleyana* 3, 150–155.

Grabe, D.F., 1970. Tetrazolium testing handbook for agricultural seeds. In: *The Tetrazolium Testing Committee of the Association of Official Seed Analysts (Eds.)*, Contribution number 29 to the handbook on seed testing. North Brunswick, New Jersey, pp. 1–29.

Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., 2007. The MULTCOMP package, v. 0.992-8. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

Jersáková, J., Johnson, S.D., Kindlmann, P., 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biol. Rev.* 81, 219–235.

<https://doi.org/10.1017/S1464793105006986>

Johnson, S.D., Peter, C.I., Nilsson, L.A., Ågren J., 2003. Pollination success in a deceptive orchid is enhanced by co-occurring rewarding magnet plants. *Ecology* 84, 2919–2927.

<https://doi.org/10.1890/02-0471>

Kearns, C.A., Inouye, D.W., 1993. *Techniques for Pollination Biologists*. University Press of Colorado, Niwot.

Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B., Rubel, F., 2006. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol. Z.* 15, 259–263.

<https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>

Langsrud, Ø, 2003. ANOVA for unbalanced data: Use Type II instead of Type III sums of squares. *Stat. Comput.* 13: 163–167.

Liu, H., Pemberton, R., 2010. Pollination of an invasive orchid, *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae), by an invasive oil-collecting bee, *Centris nitida*, in southern Florida. *Botany* 88, 290–295.

<https://doi.org/10.1139/B10-017>

Neiland, M.R.M., Wilcock, C.C., 1998. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. *Am. J. Bot.* 85, 1657–1671.

<https://doi.org/10.2307/2446499>

Nilsson, L.A., 1992. Orchid pollination biology. *Trends Ecol. Evol.* 7, 255–259.

[https://doi.org/10.1016/0169-5347\(92\)90170-G](https://doi.org/10.1016/0169-5347(92)90170-G)

Pansarin, L.M., Pansarin, E.R., Sazima, M., 2008a. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit. *Plant Biol.*, 10, 650–659.

<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00060.x>

Pansarin, L.M., Pansarin, E.R., Sazima, M., 2008b. Facultative autogamy in *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae) through a rain-assisted pollination mechanism. *Aust. J. Bot.* 56, 363–367.

<https://doi.org/10.1071/BT07135>

Pemberton, R.W., Liu, H., 2008. Potential of invasive and native solitary specialist bee pollinators to help restore the rare cowhorn orchid (*Cyrtopodium punctatum*) in Florida. *Biol. Conserv.* 141, 1758–1764.

<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.04.016>

Queiroz, A.T., Assunção, W.L., 2013. Análise geoestatística das precipitações na Fazenda Letreiro (Uberlândia-MG). *Braz. Geo. J. Geo. Hum. R. Med.* 4, 448–476.

R Core Team 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Renner, S.S., 2006. Rewardless flowers in the Angiosperms and the role of insect cognition in their evolution. In: Waser, N.M., Ollerton, J. (Eds.), *Plant-Pollinator Interactions: From Specialization to Generalization*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 123–144.

Romero-González, G.A., Batista, J.A.N., Bianchetti, L.B., 2008. A synopsis of the genus *Cyrtopodium* (Catasetinae: Orchidaceae). *Harvard Pap. Bot.* 13, 189–206.

[https://doi.org/10.3100/1043-4534\(2008\)13\[189:ASOTGC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3100/1043-4534(2008)13[189:ASOTGC]2.0.CO;2)

Schiestl, F.P., Schlüter, P.M., 2009. Floral isolation, specialized pollination, and pollinator behavior in orchids. *Annu. Rev. Entomol.* 54, 425–446.

<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090603>

Tremblay, R.L., 1992. Trends in the pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. *Can. J. Botany* 70, 642–650.

<https://doi.org/10.1139/b92-083>

Tremblay, R.L., Ackerman, J.D., Zimmerman, J.K., Calvo, R.N., 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biol. J. Linn. Soc.* 84, 1–54.

<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00400.x>

Zuur, A., Ieno, E.N., Walker, N., Saveliev, A.A., Smith, G.M., 2009. *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer, New York.

<https://doi.org/10.1007/978-0-387-87458-6>

Figures and tables

Table 1 Fruit set (in %) of *Cyrtopodium hatschbachii* and *Cyrtopodium paludicum* after controlled pollination considering the total number of flowers surveyed (mean number of fruits \pm SD is expressed inside parenthesis). Letters differentiate data collected in 2011 (^a), 2012 (^b) and 2013 (^c).

| Treatment | Fruit set rates | |
|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | <i>C. hatschbachii</i> | <i>C. paludicum</i> |
| Self-pollination | 29.16% (1.17 \pm 0.93) | 53.33% (1.6 \pm 1.17) |
| Cross-pollination | 37.50% (1.5 \pm 1.38) | 86.66% (2.6 \pm 0.97) |
| Emasculation | 0% | 0% |
| Spontaneous self-pollination | 0% | 0% |
| Open-pollination | 1.21% (0.39 \pm 0.79) ^a | 0.37% (0.14 \pm 0.36) ^b |
| | 1.23% (0.58 \pm 0.95) ^b | 1.26% (0.67 \pm 1.15) ^c |
| Rain-assisted | 0.19% (0.06 \pm 0.24) ^a | 0% |
| | 0.14% (0.06 \pm 0.24) ^b | 0% |

Table 2 Proportion of viable and polyembryonic seeds per treatment in *C. hatschbachii* (mean number of seeds \pm SD is expressed inside parenthesis).

| Treatment | Viable seeds | Polyembryony |
|-------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Self-pollination | 53.83% (124.17 \pm 49.02) | 0.08% (0.17 \pm 0.41) |
| Cross-pollination | 66.88% (153.37 \pm 41.64) | 0.12% (0.25 \pm 0.46) |
| Open-pollination | 73.79% (172.14 \pm 41.36) | 0.21% (0.43 \pm 0.79) |

Table 3 Floral visitors of *Cyrtopodium hatschbachii* and *Cyrtopodium paludicolum* and number of visits. Size refers to small (S), medium (M) and large (L) sized bees. Classification include: P – pollinators (visitors with pollinia in the head), NP – non-pollinators (visitors with pollinia in other body parts), OV – other visitors (visitors that did not remove pollinia) and Rb – pollen robbers.

| Visitors | Visits | Size | Classification |
|--|--------|------|----------------|
| <i>Cyrtopodium hatschbachii</i> | | | |
| Apidae | | | |
| <i>Epicharis (Epicharis) bicolor</i> Smith 1854 | 4 | L | P |
| <i>Trigona spinipes</i> Fabricius 1793 | 95 | S | Rb |
| <i>Xylocopa suspecta</i> Moure and Camargo 1988 | 3 | L | OV |
| <i>Centris</i> sp. | 3 | M | OV |
| <i>Exomalopsis</i> sp. | 1 | S | OV |
| sp1 | 1 | S | OV |
| Trochilidae | | | |
| sp2 | 2 | L | OV |
| <i>Cyrtopodium paludicolum</i> | | | |
| Apidae | | | |
| <i>Bombus</i> sp. | 13 | L | OV |
| <i>Tetrapedia</i> cf. <i>diversipes</i> | 9 | S | OV |
| <i>Centris (Ptilotopus) scopipes</i> Friese 1899 | 6 | L | P |
| <i>Epicharis (Epicharana) flava</i> Friese 1900 | 6 | L | NP |
| <i>Centris</i> sp. | 6 | M | OV |
| <i>Trigona spinipes</i> Fabricius 1793 | 2 | S | Rb |
| sp3 | 2 | S | OV |

Fig. 1. Flowers of *Cyrtopodium hatschbachii* (A) and *Cyrtopodium paludicum* (B). *Cyrtopodium hatschbachii* seeds with one (black arrow), two (grey arrow) or without embryos (white arrow) (C). Isolated column demonstrating the intact arrangement of pollinarium (Pol), rostellum (Ro) and stigma (St) of a newly opened flower (D). Rain-assisted self-pollinated flower demonstrating the pollinia together with the anther cap slipped into the stigmatic surface (E). Scale bar: 1cm (A, B); 500 μ m (C); 0.5cm (D, E).

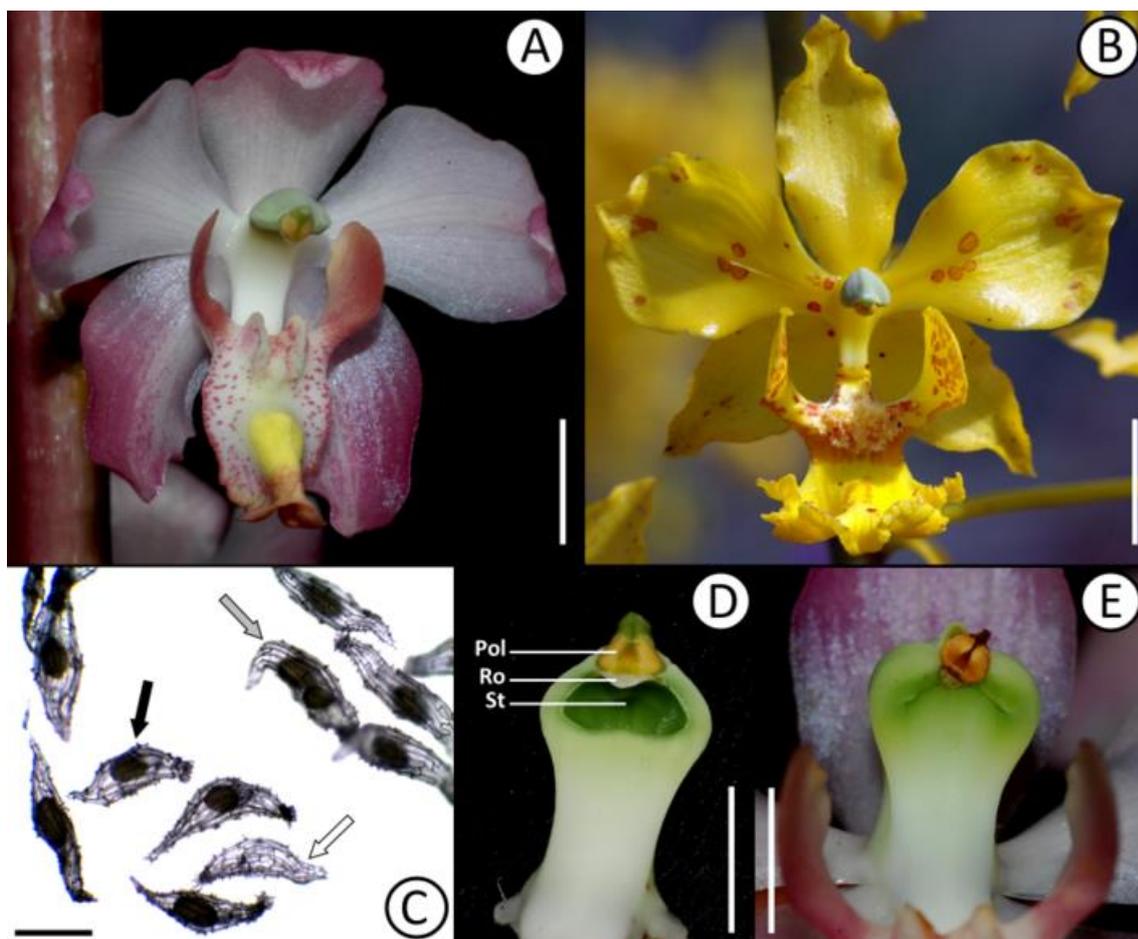
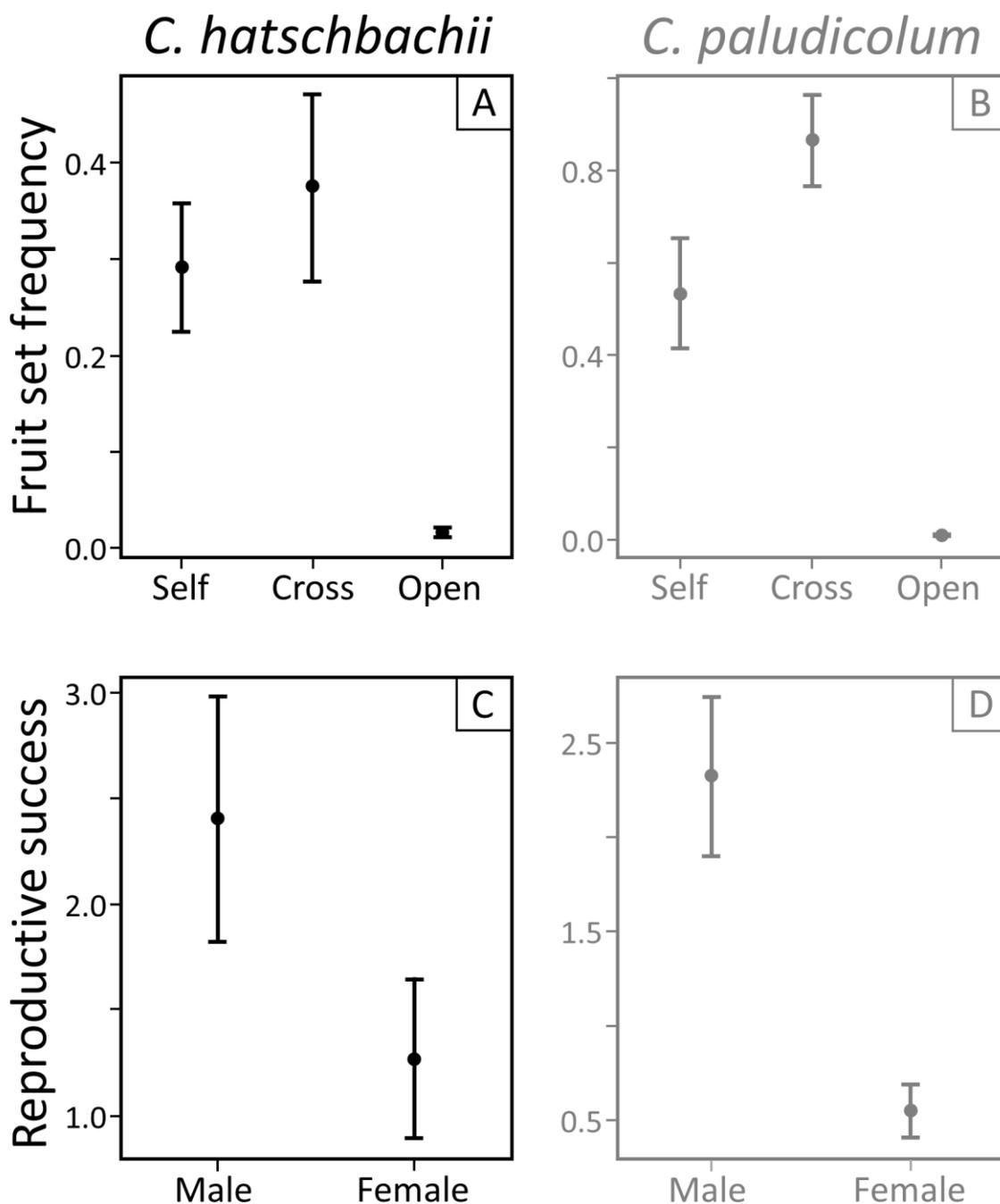


Fig. 2. Fruit set frequency (fruits per flowers) of *Cyrtopodium hatschbachii* (A) and *Cyrtopodium paludicolum* (B) under self, cross and open-pollination treatments. Male and female reproductive success of *Cyrtopodium hatschbachii* (C) and *Cyrtopodium paludicolum* (D). The points show means and the line segments are CI 95%.



CAPÍTULO 2

Os efeitos dos pilhadores de pólen e da chuva aumentam o sucesso reprodutivo de uma orquídea polinizada por engano

RESUMO

Maciel, A. A. 2016. Os efeitos dos pilhadores de pólen e da chuva aumentam o sucesso reprodutivo de uma orquídea enganosa.

O sucesso reprodutivo das plantas com flores é influenciado por vários fatores. A herbivoria floral e a chuva são em geral fatores que reduzem o êxito reprodutivo das angiospermas. Em plantas que não oferecem recompensas florais, nas quais o sucesso reprodutivo já é naturalmente baixo, esses efeitos podem ser ainda mais severos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da chuva e da florivoria sobre a longevidade e frutificação de orquídeas enganosas. Para isso, indivíduos de *Cyrtopodium hatschbachii* foram translocados para casa de vegetação de vidro e foram realizados tratamentos simulando a chuva e a florivoria recebidos em campo de forma isolada e em conjunto. Foi verificado que a chuva reduz pela metade o tempo de vida útil da flor e a florivoria reduz ainda mais a longevidade das flores. Porém, a interação entre a chuva e a florivoria resultou num processo capaz de promover a autopolinização de 37% das flores das quais em 18,9% houve a formação e maturação de frutos. Esse mecanismo de autopolinização mediado pela chuva e potencializado pelo herbívoro floral pode ser considerado uma estratégia essencial para a segurança reprodutiva desta espécie e fortalece a importância de testar todos os fatores e interações possíveis que podem influenciar o sucesso reprodutivo das plantas.

Palavras-chave: florivoria, herbivoria floral, polinização, *Cyrtopodium*, Orchidaceae, autopolinização, segurança reprodutiva, longevidade floral, chuva.

ABSTRACT

Maciel, A. A. 2016. The effects of pollen robbers and rain increase the reproductive success of a deceptive orchid.

The reproductive success of flowering plants is influenced by many factors. The floral herbivory and rain are factors that reduce the reproductive success of angiosperms. On floral nonrewarding flowers plants, in which the reproductive success is already naturally low, these effects can be more severe. This study aimed to evaluate the effect of rain and florivory on longevity and reproductive success of deceptive orchids. For this, *Cyrtopodium hatschbachii* individuals were transported to glass greenhouse and treatments were performed simulating rain and florivory received in the field of isolation and the interaction between them. It was found that the rain halves the lifespan of the flower and the florivory further reduces the longevity of flowers. The interaction between rain and florivory resulted in a process that promotes self-pollination of 37% of the flowers and 18.9% was the formation and maturation of fruits. This self-pollination mechanism mediated by rain and enhanced by floral herbivory can be considered a key strategy for reproductive assurance of the species and strengthens the importance of testing the interactions that can influence the reproductive success of the plants.

Keywords: florivory, floral herbivory, pollination, *Cyrtopodium*, Orchidaceae, self-pollination, reproductive assurance, floral longevity, rain.

INTRODUÇÃO

O serviço de polinização realizado pelos animais é responsável por favorecer a reprodução de 87,5% das espécies de plantas com flores (RECH *et al.*, 2014). Todavia, alguns fatores podem alterar a frequência dessa interação e ocasionar mudanças no êxito reprodutivo dessas plantas. A herbivoria floral, ou florivoria, é um fator que tem ganhado cada mais importância nesse contexto por ter mostrado severos efeitos negativos sobre a reprodução das angiospermas (MCCALL & IRWIN, 2006). Os herbívoros florais podem afetar o êxito reprodutivo das plantas de forma direta ao consumir as próprias unidades reprodutivas, como os grãos de pólen e óvulos, ou por aumentar a remoção de pólen sem aumentar a deposição no estigma (HARGREAVES *et al.*, 2009; KRUPNIK & WEIS, 1999). De forma indireta, os herbívoros florais também podem afetar o êxito reprodutivo das plantas ao consumir partes das flores tornando-as menos atrativas e reduzindo as visitas dos polinizadores (MOTHERSHEAD & MARQUIS, 2000; BOTTO-MAHAN *et al.*, 2011).

A chuva é outro fator capaz de afetar a reprodução das angiospermas de diferentes maneiras. Uma delas é pela redução da longevidade do pólen. Alguns autores verificaram através de testes de viabilidade polínica em 80 espécies de angiospermas, de 46 famílias diferentes, que a longevidade do pólen exposto à chuva é extremamente menor do que quando estes são protegidos da água (MAO & HUANG, 2009). Outra maneira é através da mudança no tempo de vida útil da flor. As flores não polinizadas e não expostas à chuva podem durar quase duas vezes mais do que as flores não polinizadas em condições naturais (VEGA & MARQUES, 2014).

Percebe-se então que de forma geral, tanto a florivoria quanto a precipitação são fatores que afetam negativamente o sucesso reprodutivo das plantas. Sendo assim, eles poderiam ter um efeito ainda mais expressivo em plantas que naturalmente já possuem valores baixos para atributos reprodutivos, como é o caso das plantas sem recompensas florais. Atualmente são reconhecidas cerca de 7500 espécies de angiospermas, representadas em 33 famílias, que não oferecerem nenhum tipo de recurso aos seus polinizadores, os atraindo por engano (RENNER, 2006). Neste tipo de engodo, para vários parâmetros reprodutivos essas plantas apresentam valores muito baixos quando comparadas com plantas que efetivamente oferecem recursos. Por exemplo, a taxa de frutificação natural das plantas polinizadas por engano é duas vezes menor quando comparadas com as plantas com recompensas florais (NEILAND & WILCOCK, 1998). Além disso, as visitas dos polinizadores são muito baixas (CALVO, 1990), pois eles podem aprender a evitar as flores

enganosas (GUMBERT & KUNZE, 2001) e com isso reduzir o sucesso reprodutivo dessas espécies.

Como compensação para as baixas taxas reprodutivas, algumas adaptações são essenciais para aumentar as chances de polinização das plantas sem recursos. A maior longevidade das flores não polinizadas é apontada como um exemplo disso, pois o maior tempo de vida da flor aumenta a chance de visita do polinizador (RATHCAKE, 2003; ASHMAN & SCHOEN, 1994). E a manutenção das flores intactas é outro fator importante para aumentar a probabilidade de visitas dos polinizadores visualmente orientados, uma vez que flores danificadas são evitadas por esses animais (HALL, 2009). Desta forma, esse trabalho teve como objetivo avaliar experimentalmente o efeito dos fatores que influenciam negativamente a longevidade e a aparência das flores sobre o sucesso reprodutivo de plantas polinizadas por engano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Espécie estudada

O estudo foi realizado com *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst, uma orquídea encontrada do Sudeste e Sul do Brasil até o Paraguai (BARROS *et al.*, 2014). O florescimento de *C. hatschbachii* ocorre de agosto a novembro e no bioma Cerrado a espécie ocorre em solos alagados de campos úmidos e veredas (MENEZES, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2002; BATISTA & BIANCHETTI, 2003). Essa espécie não oferece recursos florais, não possui nenhum mecanismo espontâneo de formação de frutos e depende de uma única espécie de abelha para transferência de pólen (Capítulo 1). Ainda que uma parcela dos frutos seja formada por autopolinização facultativa mediada pela chuva (ver PANSARIN *et al.*, 2008a), as taxas de frutificação natural são muito baixas, reflexo da raridade de visitas do polinizador. Em contrapartida, o visitante floral mais frequente dessa espécie é um pilhador de pólen, que é 23 vezes mais frequente que o polinizador. No entanto, são raras as vezes que esse pilhador consegue de fato consumir a polínia, na maioria das vezes ele apenas consome a capa da antera e perturba/danifica as estruturas do polinário (Figura 1B, C e D).

Local de estudo

O estudo foi realizado de agosto a novembro de 2013 com uma população de plantas da Reserva Particular do Patrimônio Natural do Clube Caça e Pesca Itororó de Uberlândia (CCPIU) (18°60' S e 48°18' W). Nesse local as veredas são caracterizadas por um denso

estrato herbáceo-subarbusivo dominante, entremeado por pequenas árvores e por palmeiras Buriti, *Mauritia flexuosa* L. f. (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Experimento

Para testar os efeitos da precipitação e da florivoria sobre a reprodução e controlar o acesso de qualquer visitante floral, translocamos 10 indivíduos de *C. hatschbachii* com botões pequenos da população do CCPIU para casa de vegetação de vidro do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG-UFU), no Campus Umuarama em Uberlândia, Minas Gerais.

Todos os indivíduos foram submetidos à 4 tratamentos. O primeiro tratamento foi chamado de Herbivoria e nesse grupo houve a simulação da herbivoria por *Trigona spinipes* (Figura 1A). Embora, em campo a ação da abelha perturbasse a posição e estrutura do polinário, para que houvesse um padrão dentro do tratamento, as flores tiveram apenas a capa da antera removida, sem danificar ou perturbar nenhuma estrutura do polinário. Para o segundo e terceiro tratamentos, houve a aplicação de chuva artificial (ver os detalhes da estimativa no fim dessa secção). De 4 em 4 dias, cada flor destes tratamentos recebeu 12ml de água, divididos em 12 aplicações de 1ml, com intervalos de 10 minutos entre cada aplicação, totalizando 120 minutos de exposição à chuva artificial. Para aumentar o realismo, foi utilizado um pulverizador de jardim e apenas uma pessoa realizou as aplicações. Flores não manipuladas expostas à chuva artificial formaram o segundo grupo, chamado Chuva. Já o terceiro tratamento foi a interação dos dois primeiros fatores, havendo a simulação de herbivoria e a exposição à chuva artificial, e por isso foi chamado de Herbivoria+Chuva. O último tratamento foi o Controle, onde as flores permaneceram intactas (Figura 2A) durante toda antese sem exposição à água nem herbivoria. Para todos os indivíduos, os tratamentos foram realizados no primeiro dia da antese e alternados ao longo da inflorescência de forma que se obteve uma amostra de 109 flores para Herbivoria, 100 para Chuva, 97 para Herbivoria+Chuva e 90 para Controle.

Ao longo do experimento, registrou-se a duração da antese da cada flor e o número de colunas entumecidas (Figura 2B), como indicativo do desenvolvimento inicial do fruto. Além disso, foi quantificado ao fim da época reprodutiva o número de frutos completamente formados (Figura 2C). Para verificar se havia diferenças significativas entre os tratamentos foi utilizado o teste de Análise de Variância para um fator (ANOVA) e em seguida o teste de comparação múltipla de Tukey. Após o experimento todos os indivíduos de *C. hatschbachii* foram devolvidos ao seu local de origem.

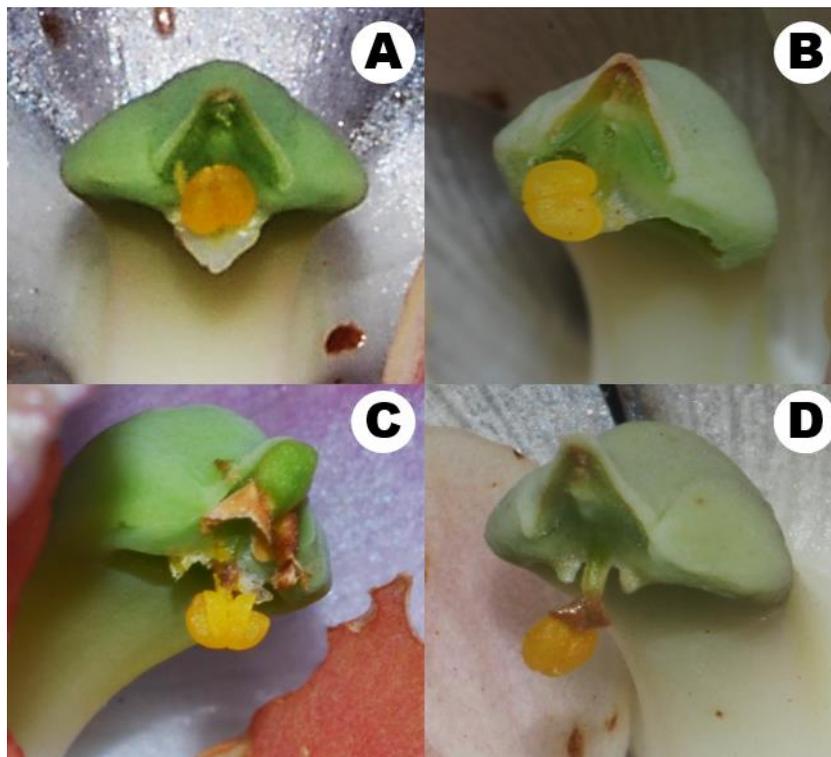


FIGURA 1. Comparação entre a herbivoria natural por *Trigona spinipes* Fabricius 1793 e herbivoria artificial em flores de *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst. Em A está a herbivoria artificial e em B, C e D herbivoria natural causada pela abelha. Note que a intensidade do dano é variável: a capa da antera pode ser parcialmente (C) ou totalmente consumida (B e D). Além disso, o dano na estrutura do polinário também varia, ocasionando a redução da distância entre a polínia e a superfície do estigma (C e D).

Chuva artificial

Os tratamentos de chuva artificial tentaram reproduzir aproximadamente as condições de campo. Para estimar a quantidade de chuva que as flores de *C. hatschbachii* receberiam em campo foram utilizados dados médios da estação pluviométrica da Fazenda Letreiro de 1975 a 2010 (QUEIROZ & ASSUNÇÃO, 2013). Os dados dessa estação foram escolhidos por ela estar a menos de 13 km da população estudada. Através da soma das médias pluviométricas para cada mês de floração da orquídea (de agosto a novembro) obteve-se 359mm. Para esse período houve, em média, 28 dias com chuva. Assim, a razão entre o total de dias da floração (120) pelos dias com chuva (28), permitiu verificar que em média chove de 4,28 em 4,28 dias. Já a razão do volume de chuva dos 4 meses (359mm) pelo número de dias com chuva (28 dias) permitiu inferir que cada dia com chuva atinge em média 12,82mm. Ao considerar que a flor dessa orquídea tem 3,5 cm de diâmetro e área de 9,62 cm², conclui-se que cada flor

recebe 12,33 ml de água em cada evento chuvoso. Então, para facilitar a dinâmica do experimento aproximamos os valores para 4 dias o intervalo entre chuvas e 12ml de água por dia chuvoso.



FIGURA 2. Diferentes fases reprodutivas de *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst em casa de vegetação. Em A um flor intacta, em B a coluna entumescida, marcando o início da formação do fruto, e em C um fruto em desenvolvimento.

RESULTADOS

Com os dados obtidos foi possível observar um efeito significativo da chuva artificial e da herbivoria sobre a duração da antese ($F_{3,392}=270,99$; $p<0,001$). As flores do controle foram as mais longevas, com duração maior que 8 dias (Figura 3B). Em seguida, o tratamento Chuva com cerca de 4 dias e as flores que menos duraram foram as que sofreram a simulação de herbivoria com antese perfazendo aproximadamente de 3 dias.

Após o experimento na casa de vegetação foi verificado que nenhuma flor dos tratamentos Chuva, Controle e Herbivoria teve a coluna entumescida e, conseqüentemente formou fruto. Já para o tratamento que simula herbivoria junto com a aplicação de chuva

artificial 37,0% das flores tiveram a coluna entumecida e desse total 18,9% formaram fruto (Figura 3A). Em termos de eficiência de frutificação para esse tratamento, em 34 flores onde ocorreu o processo de autopolinização, 18 formaram frutos, totalizando 52,9%.

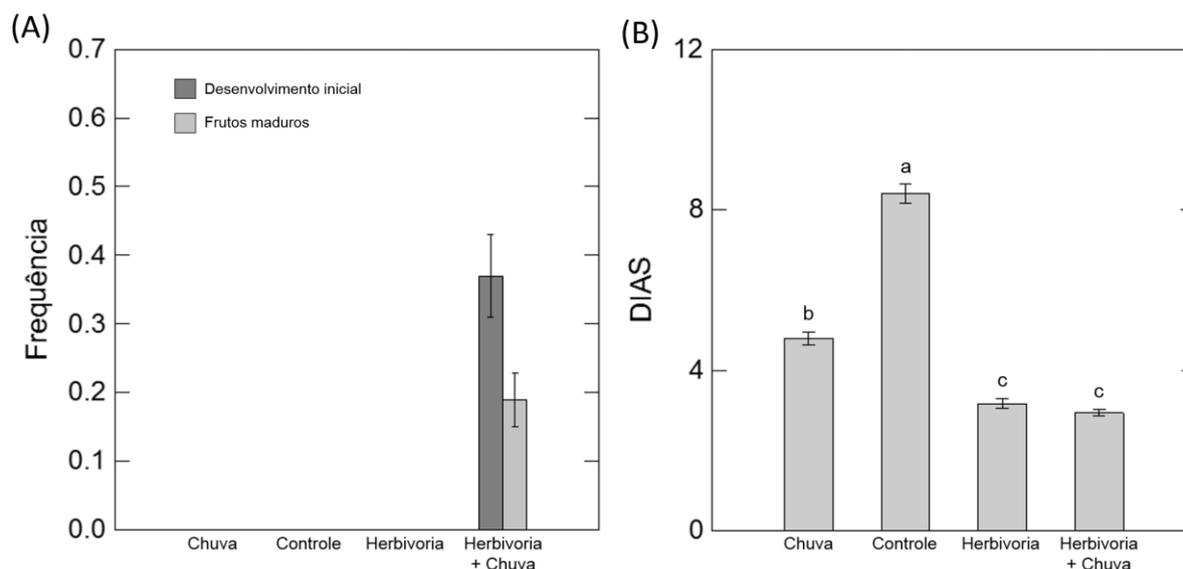


Figura 3. Resultado dos experimentos de autogamia em casa de vegetação para *Cyrtopodium hastchbachii* Pabst. Em A está representado a frequência de flores que iniciaram o desenvolvimento do fruto e atingiram a maturidade. Em B a duração da antese (em dias) para cada tratamento. Letras sobrescritas diferentes significam diferença significativa pelo teste de Tukey à 5% de significância. A barra de erro representa o desvio padrão.

Todo o processo de autopolinização (Figura 4) durou aproximadamente 3 horas. Teve início logo após a terceira aplicação da chuva artificial, quando foi possível verificar um acúmulo significativo de água junto ao polinário (Figura 4C). Com isso, a polínia começou a aumentar seu volume (Figura 4E e 4F) e a forçar a estrutura adesiva do polinário, principalmente o viscido. Com cerca de 20 minutos já é possível visualizar o polinário escorregando em direção ao estigma (Figura 4G) e passados mais 20 minutos a polínia entrou em contato com a superfície do estigma (Figura 4H) promovendo a autopolinização mediada pela chuva e facilitada pela ação de *Trigona spinipes*.



Figura 4. Mecanismo de autopolinização mediada pela chuva e potencializada pela herbivoria em *Cyrtopodium hatschbachii* Pabst. Todas as figuras são da mesma flor em diferentes estágios. Em A houve apenas a simulação da herbivoria, seguido pela primeira aplicação de chuva artificial (B). Na sequência a segunda (C) e a terceira aplicação (D), com o início do entumescimento das polínias. Em E a décima primeira aplicação e em F a última, note as polínias bastante entumescidas e consequentemente com uma massa maior. Após 20 minutos o viciúo perde aderência e a polínia escorrega (G). Após 40 minutos já é possível ver a polínia totalmente em contato com a superfície estigmática (H) caracterizando uma autopolinização.

DISCUSSÃO

Os resultados aqui obtidos mostram um efeito negativo da precipitação sobre a longevidade das flores, semelhante ao encontrado em outros casos com orquídeas. Para três espécies de *Epidendrum* autocompatíveis do sul do Equador verificou-se que as flores intactas não polinizadas protegidas da chuva podem durar quase o dobro de dias em relação às flores expostas as condições naturais (VEGA & MARQUES, 2014). Além disso, a chuva pode diminuir a atividade de forrageamento dos polinizadores (PANSARIN et al., 2008b). Desta forma, esses dois efeitos resultam num menor tempo de vida útil da flor e menor atividade do polinizador, o que pode reduzir severamente o sucesso reprodutivo das plantas, principalmente das flores sem recursos. Isto corrobora o proposto por Sprengel (1793), o

primeiro pesquisador a reconhecer que a chuva no período de floração, poderia ter efeitos negativos na interação entre planta e polinizador e consequentemente no sucesso reprodutivo das plantas.

Existem poucas informações sobre a florivoria em *Cyrtopodium*. No único caso registrado constatou-se que 44,80% das flores de *Cyrtopodium eugenii* sofrem herbivoria floral (HALL, 2009). Esse valor é bem superior a florivoria apresentada em outras espécies de orquídeas, como por exemplo em *Epidendrum denticulatum* onde a florivoria ocorre em 6,47% das flores (ALMEIDA & FIGUEIREDO, 2003). Ainda em *C. eugenii* verificou-se que 15% das flores sofrem efeito direto dos herbívoros florais por consumirem suas estruturas sexuais. Quando a herbivoria ocorre no labelo, em cerca de 20,50% dos casos, o sucesso reprodutivo é severamente reduzido (HALL, 2009). Isso acontece porque os sinais visuais são as principais formas de atração dos polinizadores em sistemas de polinização por engano alimentar (SCHLÜTER & SCHIESTL, 2008). Além do consumo das estruturas sexuais e da redução da atratividade das flores, com base nos resultados encontrados a florivoria pode apresentar mais um tipo de efeito negativo sobre o êxito reprodutivo das plantas. Os resultados deste trabalho mostraram que a herbivoria floral, mesmo de forma branda, reduziu em mais da metade o tempo de vida das flores de *Cyrtopodium hatschbachii* (Figura 3). Esse efeito também pode levar, de forma indireta, a redução do sucesso reprodutivo, pela menor exposição temporal das flores ao polinizador. Desta forma, os efeitos da herbivoria floral sobre a reprodução das plantas podem ser muito mais severos do que o esperado, ainda mais em se tratando de plantas polinizadas por engano.

Embora os fatores chuva e florivoria tenham claramente efeitos negativos sobre a reprodução das plantas, foi inusitado verificar que os dois fatores ocorrendo simultaneamente podem ter um efeito positivo (Figura 3). Em plantas que naturalmente apresentam baixas taxas de frutificação, como é caso das plantas sem recursos florais, mecanismos que auxiliem na formação de frutos podem ser essenciais para garantir a reprodução dessas espécies. Estudos com *Cyrtopodium pollyphyllum* mostraram uma frutificação natural variando de 1 e 2% (PANSARIN *et al.*, 2008b), para *C. eugenii* 4,6; 2,5 e 2,4% (NUNES, 2009) e para *C. hatsbachii* 1,40 e 1,37% (Maciel *et al.*, dados não publicados). Desta forma, em espécies desse gênero, cada fruto adicionado à população pode contribuir de forma significativa para a segurança reprodutiva da espécie. Vale destacar que a frutificação pelo processo de autopolinização mediada pela chuva e potencializada pelo herbívoro pode ser ainda mais alta do que a apresentada por três motivos. Primeiro, a herbivoria floral simulada no experimento ocasionou um distúrbio muito mais brando do que comparado com o causado pela abelha.

Esses distúrbios mais intensos podem reduzir ainda mais a distância entre a antera e o estigma, aumentando as chances de polinização. Segundo, o intervalo entre chuvas na casa de vegetação (4 dias) foi superior ao tempo de vida das flores que recebem a simulação de florivoria (3 dias). Como os tratamentos foram realizados sempre no primeiro dia da antese, um número considerável de flores do tratamento Chuva+Herbivoria foi submetido a simulação da herbivoria, porém murchou antes que recebesse a chuva artificial. Por último, o florívoro que causa o distúrbio inicial para esse processo de polinização é o mais frequente visitante floral e supera as visitas do polinizador em mais de 20 vezes (ver Capítulo 1). Frente a isso, é possível que os frutos oriundos desse processo de autopolinização sejam superiores ao número de frutos resultantes da polinização por abelhas.

O processo de autopolinização mediado pela chuva e potencializado pelo herbívoro floral é diferente do processo que ocorre apenas com a chuva descrito para *Cyrtopodium pollyphyllum* (PANSARIN *et al.*, 2008a) e também registrado em *C. hatschbachii* (Maciel *et al.*, ver capítulo 1). Para que esse mecanismo ocorra é necessário que uma gota de chuva se acumule na superfície estigmática, criando uma gota viscosa que entra em contato com o polinário. Em seguida, a antera fica entumescida e à medida que a água da gota evapora e reduz sua área, o polinário é movido para a superfície do estigma, promovendo a autopolinização. Esse processo pode durar de 7 a 9 dias e cerca de 33,7% das flores nas quais o processo ocorre são convertidas em frutos. Já quando há a participação do herbívoro floral, um distúrbio inicial do inseto é responsável por potencializar a ação da chuva. Isso permite que a chuva desloque o polinário para a superfície do estigma em aproximadamente 3 horas (Figura 4). Além de reduzir o tempo, esse processo é mais eficiente em termos de frutificação, visto que 52,9% das flores manipuladas nessa condição resultaram em frutos.

Esses resultados também permitem discutir a importância de incluir nos estudos de polinização a interação entre fatores que interferem no sucesso reprodutivo. Para esse mesmo experimento aqui apresentado, se não fosse incluído uma categoria que permitisse testar a interação entre a herbivoria floral e a chuva, haveria apenas efeitos negativos sobre o sucesso reprodutivo da orquídea. O que evidentemente não se mostrou verdadeiro e mais do que isso, ao testar a interação registrou-se um novo mecanismo de polinização, que pode ser essencial para assegurar a reprodução de *C. hatschbachii*.

Através deste trabalho foi possível verificar que tanto a chuva quanto a florivoria reduzem significativamente a longevidades das flores, o que pode resultar em fortes prejuízos à reprodução da espécie. Porém, ao testar a interação, quando esses dois fatores ocorrem de forma simultânea, um número expressivo de frutos foi gerado por um processo de

autopolinização mediado pela chuva e potencializado pelo herbívoro floral. O que pode assegurar a reprodução dessa orquídea polinizada por engano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M.; FIGUEIREDO, R. A. Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a Brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, n. 4, p. 551-558, 2003.
<https://doi.org/10.1590/S1519-69842003000400002>

ASHMAN, T. L.; SCHOEN, D. J. How long should flowers live? **Nature**, v. 371, n. 6500, p. 788-791, 1994.
<https://doi.org/10.1038/371788a0>

ARAÚJO, G. M.; BARBOSA, A. A. A.; ARANTES, A. A.; AMARAL, A. F. Composição florística de veredas no Município de Uberlândia, MG. **Revista brasileira de botânica**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 475-493, 2002.
<https://doi.org/10.1590/S0100-84042002012000012>

BARROS, F. de; VINHOS, F.; RODRIGUES, V.T.; BARBERENA, F.F.V.A.; FRAGA, C.N.; PESSOA, E.M.; FORSTER, W.; MENINI NETO, L. Orchidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB179>>. Acesso em: 02 Fev. 2014.

BATISTA, J. A. N.; BIANCHETTI, L. B. Lista atualizada das Orchidaceae do Distrito Federal, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 183-201, 2003.
<https://doi.org/10.1590/S0102-33062003000200003>

BOTTO-MAHAN, C.; RAMÍREZ, P. A.; OSSA, C. G.; MEDEL, R.; OJEDA-CAMACHO, M.; GONZÁLEZ, A. V. Floral herbivory affects female reproductive success and pollinator visitation in the perennial herb *Alstroemeria ligtu* (Alstroemeriaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 172, n. 9, p. 1130-1136, 2011.
<https://doi.org/10.1086/662029>

CALVO, R. N. Inflorescence size and fruit distribution among individuals in three orchid species. **American Journal of Botany**, p. 1378-1381, 1990.
<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1990.tb11389.x>

GUMBERT, A.; KUNZE, J. Colour similarity to rewarding model plants affects pollination in a food deceptive orchid, *Orchis boryi*. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 72, n. 3, p. 419-433, 2001.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2001.tb01328.x>

HALL, C. F. **Orchidaceae do Parque estadual da Serra de Caldas Novas, Goiás, Brasil**. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em ecologia e evolução) - Programa de Pós-graduação em ecologia e evolução, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

HARGREAVES, A. L.; HARDER, L. D.; JOHNSON, S. D. Consumptive emasculation: the ecological and evolutionary consequences of pollen theft. **Biological Reviews**, v. 84, n. 2, p. 259-276, 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00074.x>

KRUPNICK, G. A.; WEIS, A. E. The effect of floral herbivory on male and female reproductive success in *Isomeris arborea*. **Ecology**, v. 80, n. 1, p. 135-149, 1999.

[https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1999\)080\[0135:TEOFHO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1999)080[0135:TEOFHO]2.0.CO;2)

MAO, Y. Y.; HUANG, S. Q. Pollen resistance to water in 80 angiosperm species: flower structures protect rain - susceptible pollen. **New Phytologist**, v. 183, n. 3, p. 892-899, 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02925.x>

MCCALL, A. C.; IRWIN, R. E. Florivory: the intersection of pollination and herbivory. **Ecology letters**, v. 9, n. 12, p. 1351-1365, 2006.

<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00975.x>

MENEZES, L. C. **Orquídeas/orchids genus *Cyrtopodium*: espécies brasileiras, brazilian species**. Brasília. Ed. IBAMA, 2000. 208 p.

MOTHERSHEAD, K.; MARQUIS, R. J. Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant-pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. **Ecology**, v. 81, n. 1, p. 30-40, 2000.

[https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[0030:FIOHTI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[0030:FIOHTI]2.0.CO;2)

NEILAND, M. R. M.; WILCOCK, C. C. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. **American Journal of Botany**, v. 85, n. 12, p. 1657-1671, 1998.

<https://doi.org/10.2307/2446499>

NUNES, C. de M. C. **Fenologia, biologia floral e germinação *in vitro* de *Cyrtopodium eugenii* Rchb. F. & Warm. (Orchidaceae)**. 2009. 85 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Programa de Pós-graduação em Agronomia: genética e melhoramento de plantas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

PANSARIN, L. M.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Facultative autogamy in *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae) through a rain-assisted pollination mechanism. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 56, p. 363-367, 2008a.

<https://doi.org/10.1071/BT07135>

PANSARIN, L. M.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a *Cyrtopodiinae* pollinated by deceit. **Plant Biology**, v. 10, n. 5, p. 650-659, 2008b.

<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00060.x>

QUEIROZ, M. A. T; ASSUNÇÃO, W. L. Análise geoestatística das precipitações na Fazenda Letreiro (Uberlândia-MG). **Brazilian Geographical Journal: Geosciences and Humanities research medium**, Ituiutaba, v. 4, n. 2, p. 448-476, 2013.

RATHCKE, B. J. Floral longevity and reproductive assurance: seasonal patterns and an experimental test with *Kalmia latifolia* (Ericaceae). **American Journal of Botany**, v. 90, n. 9, p. 1328-1332, 2003.

<https://doi.org/10.3732/ajb.90.9.1328>

RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. 527 p.

RENNER S. S. Rewardless flowers in the angiosperms and the role of insect cognition in their evolution. In: WASER N. M.; OLLERTON J. editors. **Plant–pollinator interactions: from specialization to generalization**. Chicago: University of Chicago Press; 2006. pp. 123–144.

SCHLÜTER, P. M.; SCHIESTL, F. P. Molecular mechanisms of floral mimicry in orchids. **Trends in plant science**, v. 13, n. 5, p. 228-235, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.02.008>

SPRENGEL, C. K. **Das entdeckte Geheimnis der Natur im Bau und in der Befruchtung der Blumen** (Reprinted 1972). New York: Wheldon and Wesley, 1793.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.50179>

VEGA, Y.; MARQUES, I. Both biotic and abiotic factors influence floral longevity in three species of *Epidendrum* (Orchidaceae). **Plant Species Biology**, 2014.
<https://doi.org/10.1111/1442-1984.12046>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo foi possível descrever a biologia reprodutiva de duas espécies de orquídeas que não oferecerem recursos florais. Os resultados mostraram que *Cyrtopodium hatschbachii* e *C. paludicolum* são espécies autocompatíveis, mas não autógamas, i. e. não desenvolvem frutos por autogamia espontânea nem por mecanismos apomíticos. Ambas foram polinizadas por uma única espécie da tribo Centridini, *Centris (Ptilotopus) scopipes* para *C. paludicolum* e *Epicharis (Epicharis) bicolor* para *C. hatschbachii*. Devido à ausência de recursos florais e a capacidade de aprendizagem dos polinizadores, a visitação foi extremamente baixa, assim como a formação de frutos. Como compensação dessa limitação polínica, cerca de 10% dos frutos de *C. hatschbachii* são oriundos de um mecanismo de autopolinização mediado pela chuva. Apesar de resultar em poucos frutos, o elevado número de sementes torna esse mecanismo essencial para a segurança reprodutiva dessa espécie. Já para *C. paludicolum* nenhum caso de autopolinização facilitada pela chuva foi verificado.

Utilizando um experimento em casa de vegetação com *C. hatschbachii* foi registrado que a longevidade das flores é afetada pela ação da chuva e da herbivoria floral. Em condições isoladas da ação da água e da florivoria as flores podem durar em média 8 dias. Com a exposição à água, o tempo de vida da flor foi reduzido pela metade e quando a ação do

florívoro é simulada a longevidade atingiu aproximadamente 3 dias. Esses resultados permitem inferir que a ação da chuva ou dos herbívoros florais reduziram o sucesso reprodutivo da orquídea, uma vez que flores longevas é uma característica que aumenta a chance de visita dos polinizadores em plantas sem recursos. Porém, quando a chuva e a florivoria ocorrem simultaneamente acontece um novo mecanismo de polinização, a autopolinização mediada pela chuva facilitada pelo herbívoro floral. Diferente do mecanismo de autogamia facultativa mediada pela chuva descrita para *C. pollyphyllum*, esse novo mecanismo ocorre muito mais rápido (em torno de 3 horas) e é responsável pela frutificação de 18,9%. Porém, algumas implicações do experimento na casa de vegetação, como a subestimativa da herbivoria floral e falta de sincronia no tratamento Herbivoria+Chuva, indicam que esse efeito sinérgico pode ser ainda mais expressivo.

Por fim, com base nas baixas taxas de frutificação registradas para mais duas espécies de *Cyrtopodium* é possível indicar que talvez este seja um padrão para o gênero. Além disso, o segundo caso de autogamia facultativa mediada a chuva no gênero e o novo mecanismo de autopolinização descrito apontam que a polinização abiótica tem um papel importante na segurança reprodutiva dessas espécies. Logo é possível que mecanismos semelhantes sejam encontrados em outras espécies do gênero e provavelmente em outras espécies que não oferecem recompensas florais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS COMPLEMENTARES

CALVO, R. N. Inflorescence size and fruit distribution among individuals in three orchid species. **American Journal of Botany**, p. 1378-1381, 1990.
<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1990.tb11389.x>

DUTRA, D.; KANE, M. E.; ADAMS, C. R.; RICHARDSON, L. Reproductive biology of *Cyrtopodium punctatum* in situ: implications for conservation of an endangered Florida orchid. **Plant species biology**, v. 24, n. 2, p. 92-103, 2009.
<https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2009.00242.x>

FAN, X. L.; BARRETT, S. C.; LIN, H.; CHEN, L. L.; ZHOU, X.; GAO, J. Y. Rain pollination provides reproductive assurance in a deceptive orchid. **Annals of botany**, v. 110, n. 5, p. 953-958, 2012.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcs165>

GUMBERT, A.; KUNZE, J. Colour similarity to rewarding model plants affects pollination in a food deceptive orchid, *Orchis boryi*. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 72, n. 3, p. 419-433, 2001.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2001.tb01328.x>

JERSÁKOVÁ, J.; JOHNSON, S. D.; KINDLMANN, P. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. **Biological Reviews**, v. 81, n. 02, p. 219-235, 2006.

<https://doi.org/10.1017/S1464793105006986>

LIU, H.; PEMBERTON, R. Pollination of an invasive orchid, *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae), by an invasive oil-collecting bee, *Centris nitida*, in southern Florida. **Botany**, v. 88, n. 3, p. 290-295, 2010.

<https://doi.org/10.1139/B10-017>

NEILAND, M. R. M.; WILCOCK, C. C. Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. **American Journal of Botany**, v. 85, n. 12, p. 1657-1671, 1998.

<https://doi.org/10.2307/2446499>

PANSARIN, L. M.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Facultative autogamy in *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae) through a rain-assisted pollination mechanism. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 56, p. 363-367, 2008a.

<https://doi.org/10.1071/BT07135>

PANSARIN, L. M.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit. **Plant Biology**, v. 10, n. 5, p. 650-659, 2008b.

<https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00060.x>

PEMBERTON, R. W.; LIU, H. Potential of invasive and native solitary specialist bee pollinators to help restore the rare cowhorn orchid (*Cyrtopodium punctatum*) in Florida. **Biological conservation**, v. 141, n. 7, p. 1758-1764, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.04.016>

RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E.; MACHADO, I. C. **Biologia da Polinização**. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. 527 p.

RENNER S. S. Rewardless flowers in the angiosperms and the role of insect cognition in their evolution. In: WASER N. M.; OLLERTON J. editors. **Plant–pollinator interactions: from specialization to generalization**. Chicago: University of Chicago Press; 2006. pp. 123–144.

THAKAR, J. D., KUNTE, K., CHAUHAN, A. K., WATVE, A. V., & WATVE, M. G. Nectarless flowers: ecological correlates and evolutionary stability. **Oecologia**, v. 136, n. 4, p. 565-570, 2003.

<https://doi.org/10.1007/s00442-003-1304-6>