

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de
Recursos Naturais

Ana Cristina Atala Alves

ANATOMIA ECOLÓGICA DE ORCHIDACEAE JUSS. DO PARQUE
ESTADUAL DO IBITIPOCA, MG, BRASIL

Juiz de Fora
2015

Ana Cristina Atala Alves

ANATOMIA ECOLÓGICA DE ORCHIDACEAE JUSS. DO PARQUE
ESTADUAL DO IBITIPOCA, MG, BRASIL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Ecologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Menini Neto

Juiz de Fora
2015

“Porque a cabeça da gente é uma só, e as coisas que há e que estão para haver são demais de muitas, muito maiores diferentes, e a gente tem de necessitar de aumentar a cabeça para o total.”

— Guimarães Rosa

Aos meus pais, Rosa e Antônio, que sempre me apoiaram na ânsia de trilhar caminhos mais longos, de mergulhar profundamente e de alçar voos distantes.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder saúde e forças para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta, que depositou toda sua confiança em meu potencial para desenvolver este trabalho, meus sinceros agradecimentos por essa oportunidade.

À estimada amiga, e técnica do laboratório de Anatomia Vegetal (antes de mais nada) e Fitoquímica, Flávia Bonizol Ferrari, que esteve presente ao meu lado por todo o percurso do meu doutorado, auxiliando-me, mas, acima de tudo, compartilhando seus ricos conhecimentos das técnicas de Anatomia. Agradeço por tudo que aprendi com você e pela amizade que se consolidou ao longo desses anos de convivência. Nossas conversas, nossas gargalhadas e sua companhia nos serões até às 23h, com certeza, tornaram tudo mais leve!

Ao meu coorientador Prof. Dr. Luiz Menini Neto, agradeço pelo acompanhamento nas excursões ao Parque Estadual do Ibitipoca para reconhecimento a campo das espécies de orquídeas do presente trabalho e pela identificação das mesmas. Obrigada pelas correções e valiosas contribuições nos resumos enviados para os congressos e na redação desta tese.

À Prof.^a Dr.^a Nádia Silvia Somavilla que gentilmente transferiu parte do material desta tese para realização da MEV na Universidade Federal de Brasília. Agradeço também pela ajuda no embocamento do material, pelo empréstimo da navalha para secção do mesmo e dos inúmeros compostos fornecidos para síntese dos reagentes utilizados nos testes histoquímicos. Obrigada também pelo esclarecimento de dúvidas, pela convivência agradável e pela boa vontade sempre em ajudar.

À Prof.^a Dr.^a Patrícia Elaine Almeida, do Laboratório de Biologia Celular-UFJF, pelo acompanhamento na Microscopia confocal para auxílio na análise das gotículas lipídicas dos elaióforos das flores das *Oncidiuns* e pela ajuda na análise dos resultados da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

À Prof.^a Dr.^a Rossana Melo pelo incentivo, pelo apoio quanto à utilização do laboratório de Biologia Celular-UFJF e pelo esclarecimento de dúvidas.

À Prof.^a Dr.^a Priscila De Faria, do Laboratório de Bioquímica-UFJF, por tão gentilmente conceder o uso do Microscópio Confocal e às colegas Danielle Marconato e Priscila Farani pelo acompanhamento nas análises.

Ao Prof. Dr. Saulo Marçal e à Aryane Reis, do Laboratório de Biologia-UFJF, pelo auxílio na técnica de maceração de material vegetal e pelo acompanhamento na Microscopia de radiação Ultra-violeta.

Ao Prof. Dr. Richard Michael Grazul e ao doutorando Arthur Girardi Carpane, do Departamento de Química-UFJF, que realizaram as análises químicas das flores de *Oncidium donianum* Bateman ex W. Baxter e *Oncidium warmingii* Rchb.f. e auxiliaram na interpretação dos resultados.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela realização da Microscopia Eletrônica de Transmissão em parte do material da tese.

À Fiocruz, pelas imagens realizadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão, e em especial ao técnico José Luiz Mazzei, pelas análises químicas.

À prof.^a Dr.^a Luciana Moreira Chedier pelos esclarecimentos na metodologia da preparação do material para análise química.

Ao Instituto Estadual de Florestas pelo consentimento de licença para coleta.

Aos gestores do Parque Estadual do Ibitipoca, João Carlos Lima de Oliveira e Rose Belcavelo, e a todos os funcionários do PEIB, pelo apoio nas excursões e nas estadias no mesmo.

Aos professores do Departamento de Botânica-UFJF, e ao querido amigo Wanderson Ribeiro, obrigada pela convivência agradável e pelo incentivo. Agradeço, em especial à prof.^a Dr.^a Andrea Luiz Ponzio, que, desde o início, quando ainda eu estava pensando em realizar este doutorado, mostrou-se disponível para ajudar no que fosse preciso; obrigada pelo empréstimo da Câmara Clara e do microscópio acoplado à ocular milimetrada do laboratório de Briófitas e, também, pelas inúmeras conversas. Meu agradecimento carinhoso à prof.^a Dr.^a Fátima Salimena pelo empréstimo de sua sala para a redação desta tese e pelas conversas construtivas. Ao amigo prof. Dr. Vinícius Dittrich pelo incentivo e pela boa vontade sempre em ajudar. Ao prof. Dr. Paulo Henrique Peixoto, meu agradecimento pela utilização de equipamentos eletroeletrônicos do Laboratório de Fisiologia Vegetal.

Aos colegas da turma do doutorado e aos colegas do laboratório que vem e que vão, foi muito bom conhecer todos vocês. Ao colega e doutorando Rafael Marques Almeida pela boa vontade e auxílio na tradução dos artigos.

Aos professores, vinculados ao programa de pós-graduação (PGEcol), que tive o prazer de compartilhar conhecimentos e aos funcionários, Rosimar Adriana Cezário e Júlio César Gomes Graça, pela prontidão sempre em ajudar.

À Capes pela bolsa de estudos e à UFJF pelo suporte para a realização desta pesquisa.

Aos membros da banca pela gentileza em aceitar o convite para participarem da defesa e pelas sugestões para melhorias do presente trabalho.

Aos meus familiares pela compreensão de minha ausência em momentos não compartilhados. À minha mãe por ser meu braço forte nas horas de sufoco e ao meu pai pelo apoio de sempre. Ao David, que é um biólogo nato, obrigada pelo auxílio nas coletas e pela paciência. À minha lindinha, Isabela, que nasceu e cresceu junto com esta tese, ensinando-me tantas coisas, principalmente, a ter fé e coragem para acreditar que tudo é possível quando temos amor envolvido naquilo que fazemos. Seu sorriso, sua docilidade e companhia, estimada filha, foram combustível poderoso para os momentos de cansaço!

Às lindas orquídeas que investiguei e a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização e o sucesso deste trabalho.

RESUMO

A anatomia ecológica vegetal investiga estratégias adaptativas das plantas quanto ao local que habitam. As folhas são os órgãos vegetativos com maior plasticidade fenotípica em resposta aos fatores ambientais: radiação solar, temperatura, umidade relativa do ar e velocidade do vento. As flores apresentam pistas de como ocorrem interações químicas com seus polinizadores. O Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB), Minas Gerais, Brasil, apresenta um mosaico de fitofisionomias, e suas respectivas condições edafoclimáticas podem influenciar na adaptação das Orchidaceae, família de plantas mais representativa do parque, quanto à estrutura e química das folhas e dos recursos florais. Objetivou-se verificar: 1- A estrutura do elaióforo e a composição química de sua secreção em *Oncidium donianum* Bateman ex W.H.Baxter e *O. warmingii* Rchb.f.; 2- As adaptações morfo-anatômicas, fisiológicas e químicas das folhas das orquídeas *Hadrolaelia coccinea* (Lindl.) Chiron, *Pleurothallis rubens* Lindl. e *Prosthechea pachysepala* (Klotzsch) Chiron & V.P. Castro no interior (I) e na borda (B) da nanofloresta nebulosa; 3- As adaptações morfo-anatômicas, fisiológicas e químicas das folhas das orquídeas *Zygopetalum maculatum* (Kunth) Garay e *Epidendrum secundum* Jacq. em duas cotas altimétricas, à 1200 e 1784m. Aferições climáticas foram realizadas com o termohigrógrafo Instrutherm Thall 300 em todas as fitofisionomias estudadas nas quatro estações do ano. Elaióforos de flores jovens, maduras e senescentes de *O. donianum* e de *O. warmingii* foram coletados para análises morfo-anatômicas, microscópicas de varredura, confocal de varredura à laser, transmissão e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Para as análises morfo-anatômicas foram coletadas folhas de *H. coccinea*, *P. rubens*, *P. pachysepala* no I e B; e folhas de *Z. maculatum* e *E. secundum*, em diferentes altitudes. Quantificação de clorofilas, testes histoquímicos e análises químicas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD) foram realizadas em três folhas coletadas de três indivíduos de cada espécie por fitofisionomia. O índice de plasticidade fenotípica (IPF) foi calculado para cada variável morfológica, anatômica e fisiológica. Para avaliar as diferenças de cada variável entre as duas fitofisionomias utilizou-se teste t-student ou teste não paramétrico de Mann-Whitney. A radiação solar global ($\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) foi maior na B em comparação ao I. Os elaióforos de *O. donianum* e de *O. warmingii* são do tipo epidermal e secretam material lipídico representado quimicamente por hidrocarbonetos de cadeia longa. *Hadrolaelia coccinea* e *P. pachysepala* apresentaram respostas morfo-anatômicas semelhantes, configurando tipos funcionais similares. *Pleurothallis rubens* apresentou diferenças significativas apenas para três variáveis no inverno e duas no verão. Maiores teores de flavonoides foram produzidos por *P. pachysepala* e *P. rubens* na B, como resposta fotoprotetora. Diferenças significativas para produção de flavonoides foram observadas apenas nas estações verão e inverno, com maiores produções no I e B, respectivamente, para *P. pachysepala* e o contrário para *P. rubens*, o que provavelmente esteja relacionado à defesa constitutiva na primeira e fotoproteção na segunda. *Hadrolaelia coccinea* foi a orquídea de maior IPF, o que possibilita maiores sobrevivência às oscilações climáticas e amplitude de distribuição geográfica. A umidade relativa do ar e a velocidade do vento foram maiores na alta altitude. *Zygopetalum maculatum* e *E. secundum* apresentaram respostas adaptativas diferenciadas quanto às cotas altimétricas. Maiores teores de flavonoides foram produzidos por *Z. maculatum* na baixa altitude como resposta ao maior estresse hídrico. *Epidendrum secundum* obteve maior IPF. Este trabalho gerou contribuições para a compreensão da dinâmica das adaptações das orquídeas no PEIB e para adoção de medidas preventivas à sua conservação e ao ecossistema no qual elas se encontram.

Palavras-chave: elaióforo, flavonoides, folhas, orquídeas, plasticidade fenotípica

ABSTRACT

Plant ecological anatomy investigates plants adaptive strategies as to the place they inhabit. The leaves are the vegetative organs of higher phenotypic plasticity in response to environmental factors: solar radiation, temperature, relative humidity and wind speed. The flowers have important clues as occurring chemical interactions with their pollinators. The Ibitipoca State Park (PEIB), MG, Brazil, presents a mosaic of vegetation types, and their soil and weather conditions may influence the adaptation of Orchidaceae, family most representative plants of the park. The goals were to assess: 1- The structure of the elaiophore and the chemical composition of its secretion in *Oncidium donianum* Bateman ex W.H.Baxter and *O. warmingii* Rchb.f. of the PEIB; 2- The morphological, anatomical, physiological and chemical leaves adaptations of orchids *Hadrolaelia coccinea* (Lindl.) Chiron, *Pleurothallis rubens* Lindl. and *Prosthechea pachysepala* (Klotzsch) Chiron & VP Castro inside and on the edge of nebular nanofloresta of PEIB; 3- The morphological, anatomical, physiological and chemical leaves adaptations of orchids *Zigopetalum maculatum* (Kunth) Garay and *Epidendrum secundum* Jacq. in two elevations, the 1200 and 1784m, of PEIB. Climate measurements were performed with Instrutherm Thal 300 thermohygrograph, in all vegetation types studied in the four seasons. Elaiophores of young, mature and senescent flowers of *O. donianum* and *O. warmingii* were collected for morphological and anatomical analysis, as well as for analyses with scanning confocal microscope, laser scanning microscope, transmission microscope and gas chromatography-mass spectrometry (GCMS). For morphological and anatomical analyzes were collected *H. coccinea*, *P. rubens*, *P. pachysepala* leaves in the nebular nanofloresta and edge; and *Z. maculatum* e *E. secundum* leaves at different altitudes. Quantification of chlorophylls, histochemical tests and chemical analysis by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detector (HPLC-DAD) were conducted in three leaves collected from three individuals of each species per vegetation type. The phenotypic plasticity index (IPF) was calculated for each morphological, anatomical and physiological variable. To assess the significant difference of each variable between the two vegetation types we used Student t test or nonparametric Mann-Whitney. The global solar radiation ($\mu\text{mmolm}^{-2}\text{s}^{-1}$) was higher at the edge compared to nanofloresta nebular. The elaiophores of *O. donianum* and *O. warmingii* are epidermal and secrete lipid material chemically represented by long chain hydrocarbons. Higher flavonoid content was produced by *P. pachysepala* and *P. rubens* at the edge, as photoprotective response. The flavonoid synthesis was statistically significant only in the summer and winter seasons, with higher yields and inside edge, respectively, for *P. pachysepala* and the opposite to *P. rubens*, which is probably related to the constitutive defense in the first and the second photoprotection. *Hadrolaelia coccinea* was the most IPF, so most likely to survive the environmental fluctuations and shows greater geographical distribution. The relative humidity and wind speed were higher at 1784m. *Zigopetalum maculatum* and *E. secundum* showed different adaptive responses regarding altitudes. Higher average content of flavonoids was produced by *Z. maculatum* at the 1200m. *Epidendrum secundum* detected the higher IPF. This work led to contributions to the understanding of the dynamics of adaptations of orchids in PEIB and to adopt preventive measures for its conservation and ecosystem in which they operate.

Key words: elaiophore, flavonoids, leaves, orchids, phenotypic plasticity

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	- alta altitude
AFE	- área foliar específica
B	- borda
BA	- baixa altitude
CA	- conteúdo de água
CAB	- cutícula da face abaxial
CAD	- cutícula da face adaxial
<i>Carot</i>	- carotenoides
<i>Cl a</i>	- clorofila a
<i>Cl a/b</i>	- proporção clorofila a por clorofila b
CLAE-DAD	- cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo
CG-EM	- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
<i>Cl b</i>	- clorofila b
<i>Cl t</i>	- clorofila total
<i>Cl t/Carot</i>	- proporção clorofila total por carotenoides
EAB	- face abaxial da epiderme
EAD	- face adaxial da epiderme
FAA	- formaldeído, ácido acético e álcool
GS	- grau de suculência
HAB	- hipoderme da face abaxial
HAD	- hipoderme da face adaxial
IPF	- índice de plasticidade fenotípica
LT	- lâmina total
MF	- massa foliar
MF	- massa foliar específica
MH	- mesofilo homogêneo
MS	- massa seca
Pl a	- IPF para as variáveis anatômicas
Pl f	- IPF para as variáveis fisiológicas
Pl m	- IPF para as variáveis morfológicas
PL	- parênquima lacunoso
PP	- parênquima paliçádico
RMN	- Ressonância magnética nuclear

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1. *Oncidium donianum* Bateman ex W. Baxter: (A) Vista frontal da flor. MEV: (B) Aspecto geral do calo. (C) Detalhe do ápice da projeção do calo com glóbulo (Gl). (D) Glóbulo maximizado. (E) Ápice da projeção do calo com espessamento da parede anticlinal da epiderme, conferindo aspecto de rede e papilas. (F) Detalhe da cutícula do elaióforo distendida pelo acúmulo de secreção e espessamento da parede anticlinal, conferindo aspecto de rede. Microscopia de luz. Secção longitudinal do elaióforo: (G) Detalhe do ápice da projeção do calo. AP= ápice da projeção; C= calo; E= células epidérmicas; L= labelo; P= papilas; Pa= parênquima; ponta de seta= parede anticlinal espessada; R= idioblastos com ráfides; Se= células subepidérmicas; St= estômato; Δ= sépala dorsal; ■= pétala lateral; ●= sépala lateral; seta= distensão da cutícula; Vb= feixe vascular; *= tábula infraestigmática. Barras de escala: A= 2 mm; B= 1 mm; C, D= 100 μm; E, F=10μm; G= 50 μm..... 43
- Figura 2. *Oncidium warmingii* Rchb.f.: (A) Vista frontal da flor. (B) Detalhe da flor com destaque para o calo. MEV: (C) Aspecto geral do calo. (D) Ápice da projeção com glóbulos. (E) Glóbulos entre células epidérmicas comuns e papilosas. (F) Detalhe da cutícula distendida de célula secretora do elaióforo. Microscopia de luz de tecido fresco de elaióforo: (G) Ápice da projeção do elaióforo apresentando glóbulo lipídico após reação com Sudan III. (H) Papilas cônicas cobertas por secreção lipídica após reação com Sulfato Azul do Nilo. (I) Glóbulos lipídicos espalhados pela epiderme do ápice da projeção do calo em corte paradérmico. Microscopia Confocal de fluorescência: (J) Vista frontal do ápice da projeção do calo com gotículas lipídicas após reação com vermelho neutro. Microscopia de luz de secções longitudinais do elaióforo: (K) Ápice da projeção do calo. (L) Papilas cônicas cobertas por secreção lipídica. Δ= sépala dorsal; ■= pétala lateral; ●= sépala lateral; L= labelo; *= tábula infraestigmática; C= calo; P= papila; AP= ápice da projeção do calo; Gl= glóbulo; St= estômato; seta branca= distensão da cutícula; E= células epidérmicas; Ld= gotícula lipídica; Se= células subepidérmicas; Pa= parênquima; R= idioblastos com ráfides; Vb= feixe vascular. Barras de escala: A e B= 2 mm; C= 1 mm; D, H, I, L= 100 μm; E, F, J= 10 μm; G= 50 μm; K= 150 μm..... 44
- Figura 3. *Oncidium donianum* Bateman ex W. Baxter: microscopia confocal de fluorescência – marcação com BODIPY no ápice da projeção do calo. (A) (D) (G) DIC - Contraste de interface diferencial. (B) (E) (H) Imagens confocal. (C) (F) (I) Sobreposição. Ld= gotícula lipídica; S= acúmulo de material lipídico entre cutícula e parede da célula secretora. Barras de escala: A-C, G-I= 50 μm; D-F= 25 μm..... 45
- Figura 4. *Oncidium warmingii* Rchb.f.: microscopia confocal de fluorescência - marcação com BODIPY no ápice da projeção do calo. (A) (B) (C)

Macerado de células do ápice da projeção do calo. (D) (E) (F) Papilas cônicas cobertas por secreção e gotículas lipídicas. (G) (H) (I) Células epidérmicas com gotículas lipídicas. (A) (D) (G) Contraste de interface diferencial (DIC). (B) (E) (H) Imagens confocal. (C) (F) (I) Sobreposição. Ld= gotícula lipídica; S= secreção; E= células epidérmicas; P= papilas. Barras de escala: A-E= 25 µm; G-H= 10 µm.....

46

- Figura 5. *Oncidium donianum* Bateman ex W. Baxter: MET de células do ápice da projeção do calo. (A) Gotículas lipídicas, membranas intravacuolares e dictiossomos espalhados pelo citoplasma. (B) Elaioplasto com estroma de formato alongado, material osmiofílico entre os elementos estruturais da parede celular e detalhe de comunicação entre paredes de células epidérmicas. (C) Gotículas lipídicas próximas ao plasmalema. (D) Detalhe de elaioplasto ovalado, contendo numerosas gotículas lipídicas. (E) Detalhe de elaioplasto arredondado com plastoglobulinas. (F) Acúmulo de secreção eletrônica-densa próximo ao plasmalema. Ld= gotícula lipídica; Cw= parede celular; Di= dictiossomo; El = elaioplasto; Mf= membranas intravacuolares; Pg= plastoglobulina; S= secreção eletrônica-densa; seta= material osmiofílico; ponta de seta= campo primário de pontuação. Barras de escala: A e B= 2 µm; C, D e F= 1 µm; E= 0,5 µm.....

47

- Figura 6. *Oncidium warmingii* Rchb.f.: MET de células do ápice da projeção do calo. (A) Citoplasma parietal com mitocôndrias e vesícula secretora. (B) Gotículas lipídicas espalhadas pelo citoplasma ao redor do elaioplasto com estroma altamente osmiofílico. (C) Gotículas lipídicas e dictiossomos espalhados pelo citoplasma. (D) Fusão da membrana plasmática celular com membrana da vesícula secretora para realizar exsudação. (E) Material osmiofílico entre os elementos estruturais da parede celular. m= mitocôndria; Cw= parede celular; Vs= vesícula secretora; El = elaioplasto; Ld= gotícula lipídica; Di= dictiossomo; S= secreção eletrônica-densa; seta= material osmiofílico. Barras de escala: A= 1 µm; B, E= 0,5 µm; C, D= 0, 2 µm.....

48

- Figura 7. Cromatograma (A) de flores maduras de *Oncidium warmingii* Rchb.f., destacando contaminante de fitalato e substância majoritária com seu respectivo espectro de massas (B) com fragmentos em m/Z 43, 57, 71, 85, 99, 113 u.m.a.....

49

- Figura 8. Quantificação relativa e comparativa do hidrocarboneto majoritário obtido das áreas provenientes dos cromatogramas em CG-EM das amostras de *Oncidium warmingii* Rchb.f. (OW), referência do eixo y da esquerda, e das amostras de *Oncidium donianum* Bateman ex W. Baxter (OD), referência do eixo y da direita. Barra de erros corresponde ao desvio padrão da área do hidrocarboneto nas três idades de flores em separado para cada espécie.....

49

Capítulo 2

- Figura 1. A-C. Condições climáticas do Parque Estadual do Ibitipoca, relativas à radiação solar global ou luminosidade, temperatura e umidade, respectivamente, aferidas em quatro estações do ano, durante o período de

	julho de 2013 a maio de 2014. B= borda e I = interior de floresta.....	85
Figura 2.	Comparação da radiação solar global entre Juiz de Fora e os locais de estudo no Parque Estadual do Ibitipoca, borda (B) e interior de floresta (I) entre julho de 2013 a maio de 2014.....	86
Figura 3.	Comparação da temperatura entre Juiz de Fora e os locais de estudo no Parque Estadual do Ibitipoca, borda (B) e interior de floresta (I) entre julho de 2013 a maio de 2014.....	86
Figura 4.	Comparação da umidade relativa do ar entre Juiz de Fora e os locais de estudo no Parque Estadual do Ibitipoca, borda (B) e interior de floresta (I) entre julho de 2013 a maio de 2014.....	87
Figura 5.	Comparação da pluviosidade entre Juiz de Fora e o Parque Estadual do Ibitipoca no período de março de 2011 a dezembro de 2013.....	87
Figura 6.	Fitofisionomias estudadas no Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB). A e B. Aspecto geral da borda (B). C e D. Aspecto geral do interior (I) de nanofloresta nebulosa.....	88
Figura 7.	<i>Hadrolaelia coccinea</i> (Lindl.) Chiron. A. Aspecto geral. B. Borda. C. Interior da mata. D, F, J e K. Cortes transversais da lâmina foliar corados com azul de astra e fucsina básica. F. Corte transversal da lâmina foliar mostrando resultado de teste histoquímico com floroglucinol. G-I. Cortes transversais da lâmina foliar mostrando cutícula destacada por Sudan III. K. Detalhe do feixe vascular. L e M. Face adaxial (L) e abaxial (M) da lâmina foliar em vista paradérmica, corados com fucsina básica. EAD= face adaxial da epiderme; HAD= hipoderme da face adaxial; PP= parênquima paliçádico; PL= parênquima lacunoso; HAB= hipoderme da face abaxial; EAB= face abaxial da epiderme; Fv= Feixe vascular X= xilema; F= floema; Fi = fibras; seta preta= cutícula; cabeça de seta preta= célula esclerificada de origem pericíclica; seta branca= flanges cuticulares da parede anticlinal; cabeça de seta branca= espessamento esclerificado; *= depósito de cutina das células-guarda; ■= câmara supraestomática. Barras de escala: D, E, G, H, J, L e M= 100 µm; F, I, N = 25 µm; k= 150µm.....	89
Figura 8.	<i>Prosthechea pachysepala</i> (Klotzsch) Chiron e V. P. Castro. A. Aspecto geral. B. Borda. C. Interior da mata. D-G, K-L. Cortes transversais da lâmina foliar. D. Destaque da cutícula e dos cristais de flavonoides da face adaxial da folha sem coloração. E. Corte transversal da lâmina foliar corado com Azul de toluidina. F-G. Corte transversal da lâmina foliar corado com azul de astra e fucsina básica. G. Detalhe do feixe vascular. H-J. Face adaxial (H) e abaxial (J) da lâmina foliar em vista paradérmica, corados com Fucsina básica. K-L. Corte transversal da lâmina foliar com cristais de flavonoides após reação com hidróxido e amônia (K) e após reação com hidróxido de Sódio (L). EAD= face adaxial da epiderme; HAD= hipoderme da face adaxial; MH= mesofilo homogêneo; EAB= face abaxial da epiderme; En= endoderme; Fv= Feixe vascular; X= xilema; F= floema; Fi = fibras; seta preta= cutícula; cabeça de seta preta=	

	cristas estomáticas; cabeça de seta branca= cristal de flavonóide; seta branca= células esclerificadas de origem pericícia; *= espessamento celulósico das células-guarda. Barras de escala: D, J= 150 µm; E= 25 µm; F, G-H; K-L= 100 µm; I = 50 µm.....	90
Figura 9.	<i>Pleurothallis rubens</i> Lindl. A. Aspecto geral. B. Borda. C. Interior da mata. D-H. Cortes transversais da lâmina foliar. D-E. Cortes transversais da lâmina foliar mostrando cutícula destacada por Sudan III. F-I. Cortes transversais corados com azul de astra e fucsina básica. J-L. Face adaxial (J) e abaxial (K) da lâmina foliar em vista paradérmica, corados com Fucsina básica. . EAD= face adaxial da epiderme; HAD= hipoderme face adaxial; MH= mesofilo homogêneo; HAB= hipoderme face abaxial; EAB= face abaxial da epiderme; seta preta= cutícula; cabeça de seta preta= crista estomática; cabeça de seta branca= cicatriz de inserção de tricoma; *= deposição de cutina nas células-guarda; BS= barra de espessamento; CS= câmara subestomática; Fv= Feixe vascular; X= xilema; F= floema; Fi = fibras. Barras de escala: D-E, G, H-L= 100 µm; = F= 25 µm.....	91
Figura 10.	A-D. Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos brutos de folhas de <i>Prosthechea pachysepala</i> utilizando-se $\lambda = 335$ nm e seus respectivos espectros UV no verão (A), outono (B), inverno (I) e primavera (P).....	96
Figura 11.	A-D. Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos brutos de folhas de <i>Pleurothallis rubens</i> utilizando-se $\lambda = 335$ nm e seus respectivos espectros UV no verão (A), outono (B), inverno (I) e primavera (P).....	97
Capítulo 3		
Figura 1.	A-B. Condições climáticas do Parque Estadual do Ibitipoca, relativas à velocidade do vento e à umidade, respectivamente, aferidas em quatro estações do ano, durante o período de julho de 2013 a maio de 2014. BA= baixa altitude e AA = alta altitude.....	119
Figura 2.	Comparação da radiação solar global entre Juiz de Fora e os locais de estudo no Parque Estadual do Ibitipoca, baixa altitude (BA) e alta altitude (AA) entre julho de 2013 a maio de 2014.....	120
Figura 3.	Comparação da temperatura entre Juiz de Fora e os locais de estudo no Parque Estadual do Ibitipoca, baixa altitude (BA) e alta altitude (AA) entre julho de 2013 a maio de 2014.....	120
Figura 4.	Comparação da umidade relativa do ar entre Juiz de Fora e os locais de estudo no Parque Estadual do Ibitipoca, baixa altitude (BA) e alta altitude (AA) entre julho de 2013 a maio de 2014.....	121
Figura 5.	Comparação da velocidade do vento entre Juiz de Fora, o Parque Estadual do Ibitipoca e as fitofisionomias da baixa altitude (BA) e alta altitude (AA) no período de março de 2011 a dezembro de 2013.....	121

- Figura 6. A. Aspecto geral Baixa Altitude (BA) e B. Aspecto geral Alta Altitude (AA) do PEIB. C e D. Hábito e detalhe da flor de *Zygopetalum maculatum*, respectivamente; E e F. Hábito e detalhe da flor de *Epidendrum secundum*, respectivamente..... 122
- Figura 7. A-G. *Zygopetalum maculatum* (Kunth) Garay. A-C. Cortes transversais da lâmina foliar mostrando cutícula destacada por Sudan III. C. Detalhe do estômato. D. Corte transversal da lâmina foliar corado com azul de astra e fucsina básica. E-G. Face adaxial (E) e abaxial (F-G) da lâmina foliar em vista paradérmica, corados com fucsina básica. H-L. *Epidendrum secundum* Jacq. H-J. Cortes transversais da lâmina foliar corados com azul de astra e fucsina básica. K e L. Face adaxial (K) e abaxial (L) da lâmina foliar em vista paradérmica, coradas com fucsina básica. EAD= face adaxial da epiderme; HAD= hipoderme da face adaxial; MH= mesofilo homogêneo; EAB= face abaxial da epiderme; Fv= Feixe vascular; X= xilema; F= floema; Fi = fibras; ES= espaço intercelular; seta preta= cutícula; cabeça de seta preta= espessamento parietal na região de contato entre as células guarda; seta branca= idioblasto com espessamento lignificado de parede secundária em espiral; cabeça de seta branca= espessamento reticulado secundário de idioblasto traqueodal; *= espessamento de cutina. Barras de escalas: A, B, D e H= 150 μm ; C, G, I e J= 100 μm ; E, F, K e L= 75 μm 123
- Figura 8. A-D. Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos brutos de folhas de *Zygopetalum maculatum* utilizando-se $\lambda=335$ nm e seus respectivos espectros UV no verão (A), outono (B), inverno (I) e primavera (P)..... 127

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.	Parâmetros utilizados para as análises da composição química em <i>Oncidium donianum</i> e <i>O. warmingii</i>	42
-----------	--	----

Capítulo 2

Tabela 1.	Valores médios, respectivos desvios-padrão (entre parênteses) e coeficientes de variação das variáveis ambientais, luminosidade (LUM - $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), temperatura (TEMP - °C) e umidade relativa do ar (UMID - % RH) (n=3), nas fitofisionomias, borda (B) e interior de mata (I), nas estações verão, outono, inverno e primavera. Letras diferentes para cada estação e para a mesma variável por linha significam que os valores são estatisticamente significativos ($p < 0,05$).....	85
-----------	--	----

Tabela 2.	Valores médios, respectivos desvios-padrão (entre parênteses) e coeficientes de variação das características morfológicas (n=10), anatômicas (n=30) e clorofilas (n=3) das folhas de <i>Hadrolaelia coccinea</i> nas diferentes fitofisionomias do Parque Estadual do Ibitipoca na borda (B) e interior (I), nas estações do ano: verão (V) e inverno (I). MF: massa fresca; MS: massa seca; TMS= teor de matéria seca; CA= conteúdo de água; AF: área foliar; AFE: área foliar específica; MEF: massa específica foliar; GS: grau de suculência; espessuras (μm) das CAD: cutícula da face adaxial da epiderme; EAD: face adaxial da epiderme; HAD: hipoderme face adaxial, PP: parênquima paliçádico; PL: parênquima lacunoso; HAB: hipoderme face abaxial; EAB: face abaxial da epiderme; CAB: cutícula da face abaxial; LT: lâmina total; DE: densidade estomática; concentrações de clorofila a: cl a; clorofila b: cl b; clorofila total: cl t; clorofila a/b: cl a/b; carotenoides: Carot e clorofila total/carotenoides: cl t/carot. Letras diferentes para a mesma variável/linha significam que os valores são estatisticamente significativos ($p < 0,05$).....	92
-----------	---	----

Tabela 3.	Valores médios, respectivos desvios-padrão (entre parênteses) e coeficientes de variação das características morfológicas (n=30), anatômicas (n=90) e clorofilas (n=3) das folhas de <i>Prosthechea pachysepala</i> nas diferentes fitofisionomias do Parque Estadual do Ibitipoca na borda (B) e interior (I), nas estações do ano: verão (V) e inverno (I). MF: massa fresca; MS: massa seca; TMS: teor de matéria seca; CA: conteúdo de água; AF: área foliar; AFE: área foliar específica; MEF: massa específica foliar; GS: grau de suculência; espessuras (μm) das CAD: cutícula da face adaxial da epiderme; EAD: face adaxial da epiderme; HAD: hipoderme da face adaxial; MH: mesofilo homogêneo; EAB: face abaxial da epiderme; CAB: cutícula da face abaxial; LT: lâmina total; DE: densidade estomática; concentrações de clorofila a: cl a; clorofila b: cl b; clorofila total: cl t; clorofila a/b: cl a/b; carotenoides: Carot e clorofila total/carotenoides: cl t/carot. Letras diferentes para a mesma variável/ linha significam que os valores são estatisticamente significativos ($p < 0,05$).....	93
-----------	---	----

Tabela 4.	Valores médios, respectivos desvios-padrão (entre parênteses) e coeficientes de variação das características morfológicas (n=10), anatômicas (n=30) e clorofilas (n=3) das folhas de <i>Pleurothallis rubens</i> nas diferentes fitofisionomias do Parque Estadual do Ibitipoca na borda (B) e interior (I), nas estações do ano: verão (V) e inverno (I). MF: massa fresca; MS: massa seca; TMS= teor de matéria seca; CA= conteúdo de água; AF: área foliar; AFE: área foliar específica; MEF: massa específica foliar; GS: grau de suculência; espessuras (μm) das CAD: cutícula da face adaxial da epiderme; EAD: face adaxial da epiderme; HAD: hipoderme da face adaxial; MH: mesofilo homogêneo; HAB: hipoderme da face abaxial; EAB: face abaxial da epiderme; CAB: cutícula da face abaxial; LT: lâmina total; DE: densidade estomática; concentrações de clorofila a: cl <i>a</i> ; clorofila b: cl <i>b</i> ; clorofila total: cl <i>t</i> ; clorofila a/b: cl <i>a/b</i> ; carotenoides: <i>Carot</i> e clorofila total/carotenoides: cl <i>t/carot</i> . Letras diferentes para a mesma variável/ linha significam que os valores são estatisticamente significativos ($p < 0,05$).....	94
Tabela 5.	Quantidade relativa de flavonoides detectada a 335 nm por estação do ano nas fitofisionomias borda (B) e interior (I) de nanofloresta. Quantidade relativa destacada (*) corresponde ao maior valor estatisticamente significativo.....	95
Tabela 6.	Valores médios dos Índices de plasticidades (IP) das variáveis morfológicas (m), anatômicas (a) e fisiológicas (f); Índice de plasticidade fenotípica (IPF) total das espécies <i>Hadrolaelia coccinea</i> , <i>Prosthechea pachysepala</i> e <i>Pleurothallis rubens</i> e Índice de plasticidade fenotípica (IPF) total para cada grupo de variáveis.....	95
Capítulo 3		
Tabela 1.	Valores médios, respectivos desvios-padrão (entre parênteses) e coeficientes de variação das variáveis ambientais, luminosidade ($\text{LUM} - \mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), temperatura (TEMP - °C), umidade relativa do ar (UMID - % RH) e velocidade do vento (VEL V – m/s) (n=3), nas fitofisionomias, baixa altitude (BA) e alta altitude (AA), nas estações verão, outono, inverno e primavera. Letras diferentes para cada estação e para a mesma variável por linha significam que os valores são estatisticamente significativos ($p < 0,05$).....	119
Tabela 2.	Valores médios, respectivos desvios-padrão (entre parênteses) e coeficientes de variação das características morfológicas (n=30), anatômicas (n=90) e clorofilas (n=3) das folhas de <i>Zygopetalum maculatum</i> nas diferentes fitofisionomias do Parque Estadual do Ibitipoca na baixa altitude (BA) e alta altitude (AA), nas estações do ano: verão (V) e inverno (I). MF: massa fresca; MS: massa seca; TMS= teor de matéria seca; CA= conteúdo de água; AF: área foliar; AFE: área foliar específica; MEF: massa específica foliar; GS: grau de suculência; espessuras (μm) das CAD: cutícula da face adaxial da epiderme; EAD: face adaxial da epiderme; HAD: hipoderme da face adaxial; MH: mesofilo homogêneo; EAB: face abaxial da epiderme; CAB: cutícula da face abaxial; LT: lâmina total; DE: densidade estomática; concentrações de clorofila a: cl <i>a</i> ;	

clorofila b: cl *b*; clorofila total: cl *t*; clorofila a/b: cl *a/b*; carotenoides: *Carot* e clorofila total/carotenoides: cl *t/carot*. Letras diferentes para a mesma variável/ linha significam que os valores são estatisticamente significativos ($p < 0,05$)..... 124

Tabela 3. Valores médios, respectivos desvios-padrão (entre parênteses) e coeficientes de variação das características morfológicas (n=30), anatômicas (n=90) e clorofilas (n=3) das folhas de *Epidendrum secundum* nas diferentes fitofisionomias do Parque Estadual do Ibitipoca na baixa altitude (BA) e alta altitude (AA), nas estações do ano: verão (V) e inverno (I). MF: massa fresca; MS: massa seca; TMS= teor de matéria seca; CA= conteúdo de água; AF: área foliar; AFE: área foliar específica; MEF: massa específica foliar; GS: grau de suculência; espessuras (μm) das CAD: cutícula da face adaxial da epiderme; EAD: face adaxial da epiderme; HAD: hipoderme da face adaxial; MH: mesofilo homogêneo; EAB: face abaxial da epiderme; CAB: cutícula da face abaxial; LT: lâmina total; DE: densidade estomática; concentrações de clorofila a: cl *a*; clorofila b: cl *b*; clorofila total: cl *t*; clorofila a/b: cl *a/b*; carotenoides: *Carot* e clorofila total/carotenoides: cl *t/carot*. Letras diferentes para a mesma variável/ linha significam que os valores são estatisticamente significativos ($p < 0,05$)..... 125

Tabela 4. Quantidade relativa de flavonoides detectada a 335 nm por estação do ano nas fitofisionomias baixa altitude (BA) e alta altitude (AA). Quantidade relativa destacada (*) corresponde ao maior valor estatisticamente significativo..... 126

Tabela 5. Valores médios dos Índices de plasticidades (IP) das variáveis morfológicas (m), anatômicas (a) e fisiológicas (f); Índice de plasticidade fenotípica (IPF) total das espécies *Zygopetalum maculatum* e *Epidendrum secundum* e Índice de plasticidade fenotípica (IPF) total para cada grupo de variáveis..... 126

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, ULTRAESTRUTURAL E QUÍMICA DAS SECREÇÕES DE ELAIÓFOROS DE <i>ONCIDIUM DONIANUM</i> BATEMAN EX W.H.BAXTER E <i>ONCIDIUM WARMINGII</i> RCHB. F. (ONCIDIINAE: ORCHIDACEAE)	25
2.1 RESUMO.....	25
2.2 INTRODUÇÃO.....	26
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.3.1 Local de coleta e espécies estudadas.....	28
2.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	29
2.3.3 Histoquímica.....	29
2.3.4 Embocamento do material.....	29
2.3.5 Dimensionamento das células epidérmicas dos elaióforos.....	30
2.3.6 Microscopia confocal de varredura à laser.....	30
2.3.7 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	31
2.3.8 Análise química.....	31
2.4 RESULTADOS.....	32
2.4.1 Morfologia e anatomia.....	32
2.4.2 Microscopia confocal de varredura à laser e histoquímica.....	32
2.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão.....	33
2.4.4 Análise química por CG-EM.....	33
2.5 DISCUSSÃO.....	35
2.6 CONSIDERAÇÕES.....	41
3. CAPÍTULO 2 – EFEITO DE BORDA NA ADAPTAÇÃO MORFOANATÔMICA FOLIAR E QUÍMICA DE ORCHIDACEAE EM NANOFLORESTA NEBULAR NA SERRA DA MANTIQUEIRA, MINAS GERAIS, BRASIL	50
3.1 RESUMO.....	50
3.2 INTRODUÇÃO.....	51
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.3.1 Local de coleta e espécies estudadas.....	54
3.3.2 Aferições climáticas.....	56
3.3.3 Procedimentos de coleta do material de estudo.....	56
3.3.4 Análises morfológicas externas e anatômicas.....	57
3.3.5 Testes histoquímicos.....	58
3.3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD).....	59
3.3.7 Quantificação de clorofilas.....	60
3.3.8 Cálculo do índice de plasticidade fenotípica.....	60
3.3.9 Análise estatística.....	61
3.4 RESULTADOS.....	61
3.4.1 Aferições climáticas.....	61
3.4.2 Descrição da morfologia externa e anatomia da lâmina foliar.....	63

3.4.2.1 <i>Hadrolaelia coccinea</i> (Lindl.) Chiron & V. P. Castro.....	63
3.4.2.2 <i>Prosthechea pachysepala</i> (Klotzsch) Chiron e V. P. Castro.....	64
3.4.2.3 <i>Pleurothallis rubens</i> Lindl.....	64
3.4.3 Testes histoquímicos.....	65
3.4.4 Respostas biótico-quantitativas.....	65
3.4.5 Produção de metabólitos especiais.....	66
3.4.6 Índice de plasticidade fenotípica.....	67
3.5 DISCUSSÃO.....	67
3.6 CONSIDERAÇÕES.....	84

4. CAPÍTULO 3 – ADAPTAÇÃO MORFOANATÔMICA FOLIAR E QUÍMICA DE ORCHIDACEAE EM COTAS ALTIMÉTRICAS DISTINTAS NO PARQUE ESTADUAL DO IBITIPOCA – MG..... 98

4.1 RESUMO.....	98
4.2 INTRODUÇÃO.....	99
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	101
4.3.1 Local de coleta e espécies estudadas.....	101
4.3.2 Aferições climáticas.....	102
4.3.3 Procedimentos de coleta do material de estudo.....	103
4.3.4 Análises morfológicas externas e anatômicas.....	103
4.3.5 Testes histoquímicos.....	105
4.3.6. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD).....	105
4.3.7 Quantificação de clorofilas.....	106
4.3.8 Cálculo do índice de plasticidade fenotípica.....	107
4.3.9 Análise estatística.....	107
4.4 RESULTADOS.....	108
4.4.1 Aferições climáticas.....	108
4.4.2 Descrição da morfologia externa e anatomia da lâmina foliar.....	109
4.4.2.1 <i>Zygopetalum maculatum</i> (Kunth) Garay.....	109
4.4.2.2 <i>Epidendrum secundum</i> Jacq.....	109
4.4.3 Testes histoquímicos.....	110
4.4.4 Produção de metabólitos especiais.....	110
4.4.5 Respostas biótico-quantitativas.....	111
4.4.6 Índice de plasticidade fenotípica.....	111
4.5 DISCUSSÃO.....	112
4.6 CONSIDERAÇÕES.....	118

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 128

REFERÊNCIAS..... 130

1. INTRODUÇÃO

Orchidaceae compreende cerca de 24.500 espécies (CHASE, 2005; DRESSLER, 2005). O Brasil é o terceiro país com maior diversidade em orquídeas, atrás apenas da Colômbia e do Equador (PABST; DUNGS, 1975; DRESSLER, 1981; BARROS, 1996), onde são encontrados aproximadamente 236 gêneros e 2.528 espécies distribuídos em diversos tipos de vegetação (ZAPPI et al., 2015).

Nos campos rupestres do Brasil, vegetação predominante do Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB) (SALIMENA-PIRES, 1997; RODELA; TARIFA, 2001), foi registrado alto número de endemismos (GENTRY, 1992; GIULIETTI et al., 2000) e grande diversidade de espécies de orquídeas (HARLEY; SIMMONS, 1986; GIULIETTI et al., 1987; PERON, 1989; PIRANI et al., 1994; STANNARD, 1995; MENEZES; GIULIETTI, 2000; ZAPPI et al., 2003; PIRANI et al., 2003; SALIMENA et al., 2006; MENINI NETO et al., 2007; MENINI NETO et al., 2009; ABREU et al., 2011). Os campos rupestres ocorrem predominantemente na Cadeia do Espinhaço (Minas Gerais e Bahia) e serras adjacentes, bem como em disjunções no estado de Goiás e no sul de Minas Gerais (sobretudo na Serra da Mantiqueira) em altitudes acima de 1.000 m; estão associados a uma considerável frequência de afloramentos rochosos que se caracterizam pela redução da profundidade do solo, tornando-o pedregoso ou arenoso (GIULIETTI; PIRANI, 1988; MENEZES; GIULIETTI, 2000). Nessa fisionomia, é predominante um estrato herbáceo, aproximadamente contínuo, com arbustos ou subarbustos esparsos, apresentando folhas espessas, coriáceas e sempre verdes, além de convergência morfológica entre muitas famílias (MENEZES; GIULIETTI, 2000).

Especificamente no Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB), localizado na Zona da Mata, sudeste de Minas Gerais, região da Serra da Mantiqueira, (21°40'-21°44'S e 43°52'-43°55'W), as Orchidaceae se destacam como a família com o maior número de representantes, perfazendo um total de 126 espécies (FORZZA et al., 2013).

As orquídeas possuem uma das flores mais especializadas nas estratégias de interação inseto-plantas, resultante de um processo de coevolução que levou milhões de anos para se estabelecer (VAN DER PIJL; DODSON, 1969; JUDD et al., 2009). Sabe-se que essas estratégias são voltadas para maximizar a eficiência da polinização, investindo-se, por exemplo, na diversidade de recompensas que as flores podem oferecer: néctar, resina, cera ou óleo (PROCTOR; YEO, 1975; PROCTOR et al., 1996).

Orchidaceae é subdividida em cinco subfamílias: Apostasioideae, Vanilloideae, Cyrtopodioideae, Orchidoideae e Epidendroideae (PRIDGEON et al., 1999; DRESSLER, 2005). Dentre as cinco subfamílias Epidendroideae é a mais representativa com cerca de 80% do total de espécies e onde está posicionada a subtribo Oncidiinae (DRESSLER, 2005; PRIDGEON et al., 2005), cujas flores comumente são portadoras de elaióforos, ou seja, glândulas produtoras e secretoras de óleo (STPICZYŃSKA; DAVIES, 2008; ALISCIONI et al., 2009; DAVIES; STPICZYŃSKA, 2009).

Como recompensa floral ao polinizador, o óleo apresenta valor energético até oito vezes superior ao néctar (BUCHMANN, 1987; HILLER; WITTMANN, 1994), servindo para alimentação e criação de larvas e para compactar e impermeabilizar as paredes das células de cria (HILLER; WITTMANN, 1994; COCUCCHI et al., 2000).

Em flores de orquídeas pertencentes à subtribo Oncidiinae, presentes no PEIB, acredita-se também que ocorram elaióforos. Contudo, não existem registros científicos de estudos com essas orquídeas, relacionados à morfoanatomia e ultraestrutura dos elaióforos, e à investigação química das recompensas florais por elas produzidas.

Quanto ao hábito, a maioria das orquídeas é epífita, embora existam espécies terrícolas, rupícolas e saprofíticas (DRESSLER, 1993). Essa diversidade de hábitos é que possibilita a ocupação dessas espécies em diferentes tipos de ecossistemas e fitofisionomias (HOEHNE, 1949) e, conseqüentemente, a adaptação a diversas condições ambientais (BENZING, 1987).

Apesar da predominância dos campos rupestres, o PEIB é caracterizado por um mosaico de fitofisionomias (ANDRADE; SOUSA, 1995; SALIMENA-PIRES, 1997; RODELA; TARIFA, 2001; DIAS et al., 2002; FORZZA et al., 2013), sendo cada qual peculiar quanto às condições climáticas relacionadas à temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade e velocidade do vento (RODELA; TARIFA, 2002). Dentre as sete fitofisionomias identificadas no Parque, segundo sistema de classificação adotado por Oliveira-Filho et al. (2013), neste trabalho, selecionou-se arbustal nebuloso, nanofloresta nebulosa, campina lenhosa nebulosa e campina nebulosa, representadas aqui por Borda (B), Interior de floresta (I), Baixa Altitude (BA) e Alta Altitude (AA), respectivamente.

Corroborando as informações supracitadas, no PEIB observou-se que indivíduos de uma mesma espécie de orquídea podem ser encontrados em diferentes fitofisionomias (L. MENINI NETO, comunicação pessoal). Tal fato, possivelmente influencia nesses indivíduos o desenvolvimento de caracteres morfoanatômicos e de ajustes fisiológicos (PRICE et al., 2003), que os possibilitam se adaptar e sobreviver à cada condição ambiental (GRATANI,

1996; PINTADO et al., 1997; GRATANI et al., 2003; ZUNZUNEGUI et al., 2011), dependendo da amplitude de sua plasticidade fenotípica (SCHLICHTING, 2002; SULTAN, 2004; VALLADARES et al., 2006; GRATANI, 2014).

Pesquisas comprovaram que fatores abióticos (luminosidade, umidade relativa do ar, temperatura e velocidade do vento) contribuem para variações na morfologia e na anatomia da lâmina foliar (DENGLER, 1980; FAHN; CUTLER, 1992; DICKISON, 2000; LARCHER, 2000; GRATANI et al., 2006; KÖRNER, 2007; SCHEEPENS et al., 2010; GRATANI et al. 2012; TIWARI et al., 2013), constatando que, pelo fato de as folhas serem os órgãos das plantas que ficam mais expostos às condições ambientais, elas sofrem ajustes morfológicos e fisiológicos a fim de maximizar seus processos fotossintéticos (LEWIS, 1972; LICHTENTHALER et al., 1981; 1982; HIROSE; WERGER, 1987; MARQUES et al., 1999; CUSHMAN, 2001; HIKOSAKA, 2005; SACK et al., 2006; YOSHIMURA, 2010).

Embora estudos de anatomia vegetal assumam maior importância quando associados a aspectos ecológicos, fisiológicos e taxonômicos (SEGATTO et al., 2004), poucos trabalhos com alguma inferência ecológica a respeito das adaptações das orquídeas brasileiras nas variadas formações vegetacionais que compõe o país são conhecidos, destacando-se os de Braga (1977), Bonates e Braga (1992), Bonates (1993), Scatena e Nunes (1996), Oliveira e Sajo (2001), Silva et al. (2006), Moreira et al. (2009), Silva et al. (2010) e Moreira et al. (2013).

Adicionalmente às respostas morfoanatômicas que as plantas podem apresentar aos fatores ambientais, elas podem produzir substâncias químicas diferenciadas em quantidade e qualidade em decorrência da sazonalidade de coleta (EVANS, 1996; GOBBO-NETO; LOPES, 2007) e, também, como defesa às oscilações de temperatura, umidade, radiação solar, ataque de pestes ou patógenos (SHEWRY; LUCAS, 1997; DE WIT, 2007). Exemplos de substâncias relacionadas à defesa química são: os alcaloides, os fenóis, os flavonoides e as saponinas, que apresentam múltiplas potencialidades de cura para diversos males, com ação antiulcerogênica, antibacteriana, anticolesterolêmica, anti-inflamatória, hipoglicemiante, e de fotoproteção (SHIRWAIKAR et al., 2004; ZUANAZZI, 2004; STAHL et al., 2006; GASPI et al., 2011). No âmbito das investigações químicas de orquídeas da Região Neotropical, os flavonoides foram os constituintes que se destacaram com maior ocorrência (PRIDGEON et al., 2009; CARRERA et al., 2014).

Uma vez que o PEIB é a menor Unidade de Conservação (UC) do estado de Minas Gerais, cuja principal formação vegetacional é o campo rupestre (VITTA, 2002), e a quarta UC mais visitada do Brasil (RODELA, 1998; VITTA, 2002; BOTELHO, 2006), o nível de

predação biológica pode se tornar elevado caso os visitantes não estejam suficientemente conscientizados sobre a importância de se conservar e proteger os ambientes naturais nele contidos. Ao mesmo tempo, a fragilidade dos solos e o endemismo de espécies de plantas e líquens existentes, tornam o turismo a maior pressão antrópica sobre o PEIB (COSTA et al., 1998). Dessa forma, esta UC caracteriza-se como uma das áreas prioritárias para a conservação da flora mineira, citada na categoria de importância biológica especial, no mais alto nível adotado (DRUMMOND et al., 2005).

Portanto, o presente trabalho almeja à compreensão do equilíbrio existente entre as plantas, os animais e o meio ambiente, o que resulta no entendimento de que todos são interdependentes. A divulgação dos dados gerados por este trabalho pretende contribuir para a conservação das espécies estudadas, bem como para a valorização de um dos mais ricos e belos cenários naturais de nosso país, representado pelo Parque Estadual do Ibitipoca.

1.1 OBJETIVO GERAL

Compreender através da anatomia ecológica os processos envolvidos na interação flor-polinizador de *Oncidium donianum* Bateman ex W. Baxter e *Oncidium warmingii* Rchb.f., e na plasticidade foliar de *Hadrolaelia coccinea* (Lindl.) Chiron & V. P. Castro, *Prosthechea pachysepala* (Vell.) W. E. (Higgins), *Pleurothallis rubens* Lindl., *Zygopetalum maculatum* (Kunth) Garay e *Epidendrum secundum* Jacq. a diferentes fitofisionomias do Parque Estadual do Ibitipoca, MG.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a existência de substâncias produzidas como recompensa floral aos polinizadores, analisá-las quimicamente e descrever a morfoanatomia e a ultraestrutura da região produtora da recompensa floral em *Oncidium donianum* Bateman ex W. Baxter e *Oncidium warmingii* Rchb.f. (Orchidaceae) do Parque Estadual do Ibitipoca, MG;

- Investigar as respostas morfoanatômicas, fisiológicas e químicas adaptativas de folhas de *Hadrolaelia coccinea* (Lindl.) Chiron & V.P. Castro, *Pleurothallis rubens* Lindl. e *Prosthechea pachysepala* (Vell.) W.E. (Higgins) (Orchidaceae) quanto à sazonalidade nas fitofisionomias borda e interior das florestas nebulares do Parque Estadual do Ibitipoca, MG;

- Investigar as respostas morfoanatômicas, fisiológicas e químicas adaptativas de folhas de *Zygopetalum maculatum* (Kunth) Garay e *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) quanto à sazonalidade nas fitofisionomias dos extremos de altitudes do Parque Estadual do Ibitipoca, MG.

2. CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, ULTRAESTRUTURAL E QUÍMICA DAS SECREÇÕES DE ELAIÓFOROS DE *ONCIDIUM DONIANUM* BATEMAN EX W.H.BAXTER E *ONCIDIUM WARMINGII* RCHB. F. (ONCIDIINAE: ORCHIDACEAE)

2.1 RESUMO

O conhecimento das características morfológicas, anatômicas e químicas de glândulas produtoras de óleo, tais como os elaióforos, é a chave para a compreensão das complexas relações entre flor-polinizador em Orchidaceae. Neste trabalho, foi analisada a estrutura do elaióforo e a composição química de sua secreção em *Oncidium donianum* Bateman ex W.H.Baxter e *O. warmingii* Rchb.f., duas espécies pouco estudadas de Oncidiinae. A localização dos elaióforos foi determinada por testes histoquímicos e pela microscopia confocal com o uso de BODIPY 505/515. A morfologia, a anatomia e os processos de secreção dos elaióforos de *O. donianum* e *O. warmingii* foram estudados através de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. A secreção do elaióforo foi quimicamente determinada por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Nas duas espécies, os elaióforos foram classificados como epidermal, e a cutícula, frequentemente, apareceu distendida devido ao acúmulo de secreção abaixo dela. Histoquímica e microscopia confocal indicaram material lipídico acumulado no calo do labelo. Análises químicas da secreção do elaióforo, nas duas espécies, indicaram presença de hidrocarbonetos de cadeia longa, que, possivelmente, representam fragmentos de diacilgliceróis. Ao contrário de outras espécies de Oncidiinae, que apenas mimetizam as estruturas secretoras de espécies de Malpighiaceae, embora sem produção de óleo, as duas espécies estudadas apresentaram óleo como recompensa para atração de polinizadores.

Palavras-chave: anatomia, gotículas lipídicas, labelo, microscopia eletrônica de varredura, ultraestrutura

2.2 INTRODUÇÃO

A ecologia química das orquídeas é representada pelas fortes interações de causa e efeito estabelecidas entre flor-polinizador, resultantes de um processo de coevolução que levou milhões de anos para se estabelecer (VAN DER PIJL; DODSON, 1969; WILLIAMS, 1982; JUDD et al., 2009). A atração exercida pela cor, aroma, morfologia e recompensas florais contribuem para a transferência do pólen aos polinizadores, e vice-versa. Nesse sentido, dentre as Orchidaceae, a subtribo Oncidiinae destaca-se por apresentar diversidade nas estratégias de polinização (NEUBIG et al., 2012), investindo-se, por exemplo, numa variedade de recompensas florais para atrair o polinizador: néctar, resina, cera ou óleos (VAN DER PIJL; DODSON, 1969; PROCTOR; YEO, 1975; DRESSLER, 1981; PROCTOR et al., 1996), sendo, geralmente, cada uma dessas recompensas específicas a cada flor (HARBORNE, 1993) e à espécie de polinizador (DAVIES et al., 2003). Dentre as recompensas, o óleo, que é a mais nutritiva, geralmente é produzido em glândulas florais especializadas conhecidas como elaióforos, que podem ocorrer em *Oncidium donianum* Bateman ex W.H.Baxter e *O. warmingii* Rchb.f., duas espécies de Oncidiinae pouco estudadas.

Apesar de ter sido demonstrado que *Oncidium s.l.* não é um gênero monofilético, a circunscrição ampla foi adotada neste trabalho em virtude da existência de várias propostas de posicionamento em gêneros distintos, resultando em grande instabilidade nomenclatural. Apenas nos últimos dez anos ambas as espécies foram posicionadas em três gêneros distintos (*Ampliglossum*, *Coppensia* e *Gomesa*), inexistindo consenso entre os taxonomistas (DOCHA NETO et al., 2006; BAPTISTA; DOCHA NETO, 2006; CHASE et al., 2009).

Algumas espécies de *Oncidium s.l.*, incluindo as duas estudadas no presente trabalho, apresentam estruturas morfológicas florais que sugerem produção de óleo, tais como tábula infraestigmática e calo (VOGEL, 1974; DRESSLER, 1981; ENDRESS, 1994; SINGER; COCUCCHI, 1999). No entanto, a existência de óleo como recompensa floral não foi ainda confirmada para *O. donianum* e *O. warmingii*.

A tábula infraestigmática, comum à maioria das espécies de *Oncidium* é uma estrutura em forma de almofada, localizada abaixo do estigma, que deriva da fusão de uma porção do labelo com uma porção da coluna e é fortemente prensada pelas mandíbulas das abelhas na tentativa de coletar óleo da flor com suas pernas (DRESSLER, 1981). O calo é uma estrutura comum a algumas espécies de Oncidiinae (SINGER; COCUCCHI, 1999; DAVIES;

STPICZYŃSKA, 2008; DAVIES et al., 2014); situa-se na base do labelo e pode apresentar regiões constituídas por glândulas produtoras e secretoras de óleos não voláteis, denominadas elaióforos (VOGEL, 1974; ENDRESS, 1994; PANSARIN et al., 2009), que classificam-se em três tipos: epidermal, tricomáceo (VOGEL, 1974), ou misto, em que coexistem os dois tipos (PANSARIN et al., 2009).

Dentre as espécies de Oncidiinae, elaióforo epidermal é predominante em *Oncidium* sp. (STPICZYŃSKA et al., 2007; STPICZYŃSKA; DAVIES, 2008), similarmente àquele encontrado nas flores de Malpighiaceae (STPICZYŃSKA et al., 2007), uma das famílias mais representativas em termos de produção de óleo como recompensa floral (BUCHMANN, 1987; MACHADO, 2004; ALVES-DOS-SANTOS et al., 2007). Representantes do gênero *Byrsonima* sp. (Malpighiaceae), coexistindo com *O. donianum* e *O. warmingii* na área de estudo do PEIB, sugerem que essa semelhança possa representar mimetismo das *Oncidium* sp. quanto às flores ou estruturas florais produtoras de óleo das Malpighiaceae (CHASE et al., 2009), o que é geralmente atribuído à convergência evolutiva (SINGER; COCUCCI, 1999; VAN DER CINGEL, 2001; SINGER et al., 2006; STPICZYŃSKA et al., 2007; DAVIES; STPICZYŃSKA, 2008), indicando polinização por engodo, ou seja, sem o oferecimento de recompensa floral ao polinizador. Contudo, existe a possibilidade de *O. donianum* e *O. warmingii* produzirem óleo como recompensa floral, como foi observado em outras espécies do gênero (TORRETTA et al., 2011).

Diversos tipos de abelhas fêmeas são especializadas na coleta de óleo, tais como as pertencentes às tribos Centridini, Tapinotaspidini e Tetrapediini (Apidae), que já foram registradas polinizando representantes de Malpighiaceae, portadores de glândulas oleíferas (COCUCCI et al., 2000; ALVES-DOS-SANTOS et al., 2002). Nesse universo, indivíduos dos gêneros *Epicharis*, *Monoeca* e *Tetrapedia* são observados, frequentemente, transportando polinários de *Oncidium* (ALVES-DOS-SANTOS et al., 2002). Fêmeas de *Centris trigonoides* Lepeletier, 1841 (Apidae: Centridini) foram observadas forrageando óleo floral em calo de *Oncidium bifolium* Sims (tratado pelos autores como *Gomesa bifolia* (Sims) M.W. Chase & N.H. Williams) (TORRETTA et al., 2011). Tais observações aumentam as possibilidades de *O. donianum* e *O. warmingii* produzirem óleo como recompensa.

Estudos morfológicos, anatômicos e de identificação das substâncias químicas secretadas pelos elaióforos têm demonstrado relevância para a compreensão das interações entre flor-polinizador em Orchidaceae (VOGEL, 1974; SINGER; COCUCCI, 1999; REIS et al., 2003, 2000; ASCENSÃO et al., 2005 REIS et al., 2006; DAVIES; STPICZYŃSKA, 2009; BLANCO et al., 2013; DAVIES et al., 2014).

Objetivou-se, com este trabalho, testar a hipótese de que *O. donianum* e *O. warmingii* produzem óleo como recompensa floral ao polinizador, através da descrição da estrutura e ultraestrutura de seus elaióforos e da identificação química da composição das substâncias produzidas por eles.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Local de coleta e espécies estudadas

Flores de *O. donianum* e de *O. warmingii* foram coletadas em ambiente de campo rupestre e em transição com florestas nebulares, em solo arenoso, raramente pedregoso, em uma unidade de conservação (UC) localizada no sudeste do estado de Minas Gerais, Brasil, o Parque Estadual de Ibitipoca (PEIB) (21°40'-21°44'S, 43°52'-43°55'W). Essa UC é uma das mais visitadas do Brasil (FORZZA et al., 2013) e compõe uma das áreas prioritárias para a conservação da flora no estado, citada no nível mais alto na categoria de importância biológica especial (DRUMMOND et al., 2005). Material testemunho de *O. donianum* e *O. warmingii* estão depositadas no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) sob os números CESJ 48668 e CESJ 27315, respectivamente.

Oncidium donianum é uma erva terrícola endêmica do Brasil, ocorrente nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (BARROS et al., 2015). Apresenta pseudobulbos ovoides, robustos e frequentemente semienterrados. As inflorescências não apresentam fragrância perceptível aos humanos, são densas do tipo panícula e estão localizadas na extremidade do escapo, que é ereto e tem cerca de 1 m de comprimento. A flor tem cerca de 2 cm de diâmetro, apresenta sépalas e pétalas amarelas, maculadas de castanho, labelo amarelo, trilobado com lobos laterais pintalgados de vermelho e tábula infraestigmática amarela. O calo, localizado no disco do labelo, entre os lobos laterais, é alvo pintalgado de creme (Figura 1A). A floração ocorre nos meses de outubro e novembro. *Oncidium warmingii* é uma erva terrícola ou epífita accidental, encontrada na Venezuela e Brasil (GOVAERTS, 2015). No Brasil, ocorre na Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (BARROS et al., 2015). Apresenta pseudobulbos ovoides e escapo floral longo e pendente, com flores espaçadas entre si de 10 a 20 cm. As flores não apresentam fragrância perceptível aos humanos, têm cerca de 3 cm de diâmetro, com pétalas e sépalas

creme com máculas atropurpúreas, labelo alvo maculado externamente de vináceo, trilobado com lobos laterais amarelos maculados de púrpura e lobo mediano alvo, maculado de púrpura, e tábula infraestigmática alva. O calo, localizado no disco do labelo, entre os lobos laterais, é alvo levemente pintalgado de vermelho (Figura 4A). A floração ocorre a partir do final do mês de setembro até meados de janeiro. É citada como vulnerável na lista vermelha das Espécies Ameaçadas da Flora de Minas Gerais (SANO et al., 2008).

2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Estudos envolvendo Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizados fixando-se dois calos de flores maduras de cada espécie em solução de glutaraldeído 2,5% preparados em tampão fosfato 0,5M, pH 7,4. Posteriormente, as amostras foram fixadas com tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em série acetônica, secas ao ponto crítico e cobertas com ouro (SOUZA, 1988). Posteriormente, o material foi analisado e fotografado em microscópio eletrônico de varredura (modelo JEOL JSM 7001F - voltagem 15 kV) da Universidade Federal de Brasília.

2.3.3 Histoquímica

Para auxílio na identificação da composição das substâncias sintetizadas pelos elaióforos dos calos frescos das flores maduras de *O. warmingii*, testes histoquímicos foram realizados em cortes histológicos dos mesmos empregando-se lugol (BERLYN; MIKSCHE, 1976), sudan III (SASS, 1951), sulfato azul do Nilo (CAIN, 1947), vermelho de Rutênio (LANGERON, 1949) e vermelho neutro sob luz ultravioleta (CLARK, 1981), confirmando a presença ou não de amido, lipídios, lipídios ácidos e neutros, mucilagem e lipídios totais, respectivamente. Controles padrões foram feitos para todas as análises.

2.3.4 Emblocamento do material

Três calos de flores maduras de três indivíduos de cada espécie foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% preparados em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,2-7,4 (BOZZOLA; RUSSELL, 1992) por 24 horas, lavados no mesmo tampão fosfato, submetidos

ao processo de desidratação em série etanólica (JOHANSEN, 1940) e embebidos em historresina (glicol metacrilato, Leica®), conforme recomendação do fabricante. O material emblocado foi seccionado (espessura 2-5µm) em micrótomo rotativo manual (modelo Tokyo 422, Erma Optical Works, Japão), corado com Azul de Toluidina O aquosa (O'BRIEN et al., 1964). As lâminas foram montadas com verniz vitral incolor 500® (PAIVA et al., 2006). A análise e a descrição das secções foram realizadas com auxílio de microscópio ótico Axio Lab A1 da Carl Zeiss, com câmera digital AxioCam ERc 5s acoplada. O material foi documentado através do software AxioVision.

2.3.5 Dimensionamento das células epidérmicas dos elaióforos

Em secções longitudinais de três elaióforos de flores maduras de três indivíduos de *Oncidium donianum* e *O. warmingii* foram aferidas a altura e a largura das células epidérmicas. O valor final foi resultante da média aritmética de cada dimensão (n=3).

2.3.6 Microscopia Confocal de Varredura à Laser

Três calos de flores maduras de *Oncidium donianum* e *O. warmingii*, previamente fixados em Karnovsky, por 48 horas, e conservados em Tampão Fosfato a 0,1 Molar, foram submetidos à enzima Pectinase-Celulase, por 4 horas em banho-maria à temperatura de 37°C, para rompimento da parede celular. Posteriormente, o material foi macerado, montado em lâminas com Vecta Shield DAPI e marcados com reagente BODIPY 505/515 de afinidade específica para lipídios neutros (HAUGLAND, 1996).

As lâminas foram analisadas em Microscópio Confocal de Varredura à Laser (TCS SP5, Leica, Alemanha) da Universidade Federal de Juiz de Fora. O macerado marcado com BODIPY foi excitado por Laser de Argônio na faixa de 488 nm e as bandas de emissão foram capturadas na região de 515 nm. A marcação com DAPI foi excitada a 405 nm e o espectro de emissão capturado na região entre 440 e 490 nm. As imagens foram processadas por meio do software Leica Application Suite (LAS 260).

2.3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a investigação da ultraestrutura, calos em triplicata de flores maduras de três indivíduos de cada espécie foram fragmentados com lâmina de barbear até, no máximo, 2 mm de espessura, fixados em Karnovsky por 48 horas e conservados em Tampão Fosfato a 0,1 Molar (pH 7,2). Esses fragmentos foram submetidos ao fixador secundário tetróxido de ósmio, específico para lipídios e facilitador no contraste dos mesmos, por aproximadamente 90 min. Em seguida, os fragmentos foram desidratados até álcool absoluto e acetona P.A., incluídos em Araldite Pura em estufa (60°C) por 24 horas para polimerização. Secções ultrafinas (60nm), processadas na Universidade Federal de Minas Gerais, foram depositadas em uma tela de cobre (200 ou 300 mesh), contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e levadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão da FIOCRUZ-RJ para serem digitalizadas e fotografadas (80 Kv) (STEVENS; LOWE, 1995; GARTNER; HIATT, 1999).

2.3.8 Análise química

Para a análise química foi utilizada cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas, sendo *O. donianum* analisada na Plataforma Analítica de Farmanguinhos-FIOCRUZ-RJ (Hewlett-Packard 6890) e *O. warmingii* no Departamento de Química da UFJF (GCMS-QP2010 Plus; Shimadzu). As análises químicas de cada espécie foram realizadas em equipamentos diferentes, mas referenciadas por mesma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos saturados de 8-26, 28 e 30 carbonos. Foram avaliadas substâncias secretadas por calos de flores de *O. donianum* e de *O. warmingii* em três estágios de desenvolvimento (jovens, em início da expansão das peças florais após a fase de botão; maduras, com as peças florais totalmente expandidas e senescentes, com sinais de necrose e abscisão das peças florais), com três repetições em três indivíduos, totalizando nove amostras por espécie, sendo as substâncias obtidas das amostras diluídas em 1 mL de hexano P.A. redestilado. As análises foram realizadas com injetores automáticos, de acordo com os parâmetros apresentados na tabela 1.

Com base na comparação da porcentagem das áreas dos cromatogramas correspondentes a substância exsudada, foi possível calcular, proporcionalmente, pelo programa Excel, a quantidade relativa da substância por idade de desenvolvimento floral, nos

estágios jovem, maduro e senescente em três repetições, com obtenção de desvio padrão da média.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Morfologia e anatomia

A morfologia do calo de *O. donianum* é similar a de *O. warmingii* e com auxílio da MEV foi possível identificá-lo com diversas projeções (Figuras 1A, B e 2A-C). Nas duas espécies, foram observadas papilas em formato cônico com estriações, por toda a superfície, com exceção do ápice das projeções dos calos (Figuras 1B, E e 2C, E). Secreção na forma de glóbulos lipídicos foi encontrada na superfície do ápice da projeção (Figura 1C) e próximo às papilas (Figura 2E). Em *O. donianum*, as células epidérmicas do ápice da projeção do calo apresentaram paredes anticlinais espessadas, conferindo aspecto em rede (Figuras 1E, F). Distensão da cutícula foi observada no ápice da projeção do calo nas duas espécies (Figuras 1F e 2F).

Em secção longitudinal, as projeções dos calos de *O. donianum* e de *O. warmingii* apresentaram uma camada de células epidérmicas em formato cuboide, com dimensões médias de 40µm x 25µm em *O. donianum*, e de 35µm x 25µm em *O. warmingii*, caracteristicamente como células secretoras, portando citoplasma intensamente corado com azul de toluidina, núcleos avolumados e centralmente localizados; interna à epiderme há uma a duas camadas de células menores com citoplasma corado com azul de toluidina e um tecido parenquimático mais interno, com feixes vasculares colaterais e idioblastos com ráfides (Figuras 1G e 2K). Estômato foi observado ao longo da projeção do calo de *O. donianum*, (Figura 1G). Secreção foi observada na superfície das papilas de *O. warmingii* (Figura 2L). *Oncidium donianum* e *O. warmingii* apresentam elaióforos do tipo epidermal, localizados no ápice das projeções do calo (Figuras 1G e 2K).

2.4.2 Microscopia Confocal de Varredura à Laser e histoquímica

A Microscopia Confocal de Varredura à Laser confirmou a presença de gotículas lipídicas e secreção lipídica, marcadas pelo reagente BODIPY, nas células dos elaióforos das

duas espécies (Figuras 3A-I e 4A-I). Gotículas lipídicas e deposição de material foram observadas nas papilas do calo de *O. warmingii* (Figura 4D-F).

Os elaióforos de *O. warmingii* em contato com sudan III apresentaram material lipídico (Figura 4G). Sulfato azul do Nilo e vermelho neutro também indicaram a presença de lipídios nas papilas e células da epiderme do elaióforo (Figuras 4H-J).

2.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A análise da ultraestrutura das células epiteliais secretoras dos elaióforos de *O. donianum* e de *O. warmingii* permitiu identificar: citoplasma denso, retículo endoplasmático liso, membranas intravacuolares, dictiossomas, mitocôndrias, gotículas lipídicas, secreção eletrônica-densa e elaioplastos com estroma altamente osmiofílico, ovalados com gotículas lipídicas e arredondados com plastoglobulinas (Figuras 5A, B, D e E e 6A-E).

Em *O. donianum*, observou-se plasmodesmos em campo primário de pontuação na parede celular e acúmulo de secreção eletrônica-densa próximo à parede celular (Figura 5B, F). Em *O. warmingii*, verificou-se vesícula secretora e fusão da membrana da vesícula secretora com a membrana plasmática para liberação de secreção (Figura 6A, D). Material osmiofílico foi observado entre os elementos estruturais da parede celular nas duas espécies (Figuras 5B e 6E).

2.4.4 Análise química por CG-EM

Apesar de os cromatógrafos empregados terem sido diferentes para as duas espécies estudadas, os tipos de colunas utilizadas para a análise química foram iguais para *O. donianum* e *O. warmingii* e permitiram a detecção de uma mesma substância majoritária (hidrocarboneto de cadeia longa) no exsudato das flores, que, monitorada pelo mesmo padrão de hidrocarbonetos, apresentou tempo de retenção correspondente a moléculas com 28 a 29 carbonos e fragmentação de massas típica de hidrocarbonetos com fragmentos em m/Z 43, 57, 71, 85, 99, 113 u.m.a (Figura 7), além de outros fragmentos esporádicos que mantiveram desacoplamento de CH_2 .

Quanto à quantidade relativa por idade da substância produzida pelos elaióforos de *O. donianum* e *O. warmingii*, observou-se uma tendência de diminuição da secreção do

hidrocarboneto no estágio senescente para as duas espécies, sendo significativa para *O. warmingii* (OW) (Figura 8).

2.5 DISCUSSÃO

Elaióforos de *O. donianum* e *O. warmingii* localizam-se sobre o calo do labelo, o que é comum para espécies da subtribo Oncidiinae, ocorrendo em *Gomesa bifolia* (Sims) M.W. Chase & N.H. Williams, *Gomesa longipes* (Lindl.) M.W. Chase & N.H. Williams, *Oncidium heteranthum* Poepp. & Endl. var. *album*, *Oncidium loefgrenii* Cogn., *Ornithophora radicans* (Rchb.f.) Garay & Pabst e *Vitekorchis excavata* (Lindl.) Romowicz & Szlach (PACEK; STPICZYŃSKA, 2007; STPICZYŃSKA et al., 2007; STPICZYŃSKA; DAVIES, 2008; ALISCIONI et al., 2009; DAVIES; STPICZYŃSKA, 2009; GOMIZ et al., 2013; STPICZYŃSKA et al., 2013; DAVIES et al., 2014).

Para a maioria das Oncidiinae, assim como para *O. donianum* e *O. warmingii*, foi identificado elaióforo do tipo epidermal. Exceções ocorreram em algumas espécies de *Lockhartia* Hook. e *Ornithocephalus* Hook., com elaióforos do tipo tricomáceo, e em *Baptistonia* Barb. Rodr., *G. longipes*, *O. heteranthum*, *V. excavata*, com elaióforo do tipo misto (ALISCIONI et al., 2009; CHIRON, 2010; PACEK et al., 2012; BLANCO et al., 2013; DAVIES et al., 2014).

A posição do elaióforo e sua morfologia podem relacionar-se ao tamanho dos polinizadores. Orquídeas com elaióforos epidermais provavelmente são polinizadas por insetos maiores que fixam suas mandíbulas à tábula infraestigmática e usam seu primeiro ou segundo par de pernas para escovar os elaióforos que estão lateralmente pareados. Ao contrário, orquídeas com elaióforos do tipo tricomáceo, localizados num calo central abaixo da tábula infraestigmática, podem ser visitadas por abelhas menores, que o escovam de forma suave (PACEK; STPICZYŃSKA, 2007). No presente estudo, os elaióforos das orquídeas pesquisadas apresentaram as duas características, são do tipo epidermal, como no primeiro caso, mas estão posicionados em um calo centralmente localizado.

Os elaióforos das diversas espécies de orquídeas já estudadas apresentaram-se variáveis em termos morfológicos, encontrando-os com forma de borboleta, como em *Oncidium oxyceras* (Königer & J.G. Weinm.) M.W. Chase & N.H. Williams (STPICZYŃSKA et al., 2013), ou com ausência de uma forma definida, como em *Cyrtochilum meirax* (Rchb.f.) Dalström, *Gomesa recurva* R.Br. e *Rhetinantha* M.A.

BLANCO (subtribo Maxillariinae) (STPICZYŃSKA et al., 2007; DAVIES; STPICZYŃSKA, 2012; DAVIES et al., 2014). Os elaióforos de *O. donianum* e de *O. warmingii* encontram-se concentrados nas projeções digitiformes dos calos, como registrado para *G. bifolia* (ALISCIONI et al., 2009), *G. longipes* e *V. excavata* (DAVIES et al., 2014), sendo classificados como tuberculados.

As gotículas lipídicas ocorrentes na epiderme dos elaióforos de *O. donianum* e *O. warmingii* e na região papilosa desta última espécie também foram registradas para *G. longipes* (DAVIES et al., 2014). Lipídios na superfície do elaióforo podem conferir brilho, como observado nos calos de *O. donianum* e *O. warmingii*, o que contribui para o aumento da reflexão da luz e, conseqüentemente, para atração dos polinizadores. Adicionalmente às propriedades reflectivas, a natureza hidrofóbica dos lipídios pode proteger o botão floral da dessecação no estágio inicial de desenvolvimento (PACEK; STPICZYŃSKA, 2007). Papilas com cutícula estriadas também foram observadas em *G. bifolia* (ALISCIONI et al., 2009).

No processo de exsudação dos elaióforos de muitas orquídeas é comum a ocorrência de distensão da cutícula como resultado de acúmulo de material lipídico entre esta camada e a parede da célula secretora (STPICZYŃSKA; DAVIES, 2008; PACEK et al., 2012; BLANCO et al., 2013), o que, com frequência, resulta na formação de bolhas ou intumescimentos na superfície cuticular. Em seqüência às interações flor-polinizador, o inseto, em busca das recompensas florais, raspa a cutícula, deixando marcas de quebras ou ranhuras em sua superfície. Através da MEV, foram observadas regiões de intumescimentos, ou distensão de cutícula, na superfície dos elaióforos de *O. donianum* e *O. warmingii*, mas não foi possível detectar ranhuras em suas cutículas, como relatado também em *Oncidium trulliferum* Lindl., *O. loefgrenii*, *Rudolfiella picta* (Schltr.) Hoehne, *G. recurva*, *Zygostates lunata* Lindl., e em algumas espécies de *Maxillaria* Ruiz & Pav. (DAVIES et al., 2003; PACEK; STPICZYŃSKA, 2007; STPICZYŃSKA et al., 2007; DAVIES; STPICZYŃSKA, 2008; STPICZYŃSKA; DAVIES 2008; PACEK et al., 2012). Possivelmente, nessas espécies, como em *O. donianum* e *O. warmingii*, o material lipídico torna-se acessível ao polinizador, pois sua passagem ocorre através da parede e da cutícula como pequenas moléculas que se reagrupam, formando os glóbulos lipídicos, acima da superfície do elaióforo; permanecendo a cutícula intacta, a qual é mais fina nas regiões de secreção (PORSCH, 1905; DAVIES et al., 2003). De fato, nas espécies em estudo, foi constatada a presença de pequenos glóbulos na superfície dos elaióforos, em consequência de material osmiofílico que atravessou a parede celular. Esse processo também é comum em algumas espécies de *Maxillaria* e em *G. bifolia* (DAVIES et al., 2003; ALISCIONI et al., 2009).

A anatomia dos elaióforos de *O. donianum* e *O. warmingii* revelou-se bastante semelhante entre si e tipicamente comum à encontrada em outras espécies de *Oncidium* (STPICZYŃSKA et al., 2013), sendo que o ápice da projeção do calo em secção longitudinal apresentou uma camada de células epidérmicas secretoras em formato cuboide, com dimensões médias menores em *O. warmingii* do que em *O. donianum*. Elaióforos com células epidérmicas em paliçadas foi registrado para as espécies de orquídeas investigadas por Davies e Stpiczyńska (2008) e Stpiczyńska et al. (2013) com células epidérmicas de formato cuboide nos elaióforos dos calos de *G. longipes*, *O. heteranthum*, *V. excavata* (DAVIES et al., 2014). Uma a duas camadas de células subepidérmicas menores de forma retangular a irregular e um tecido parenquimático localizado logo abaixo com feixes vasculares colaterais e idioblastos com ráfides em seus vacúolos, como identificado para as duas espécies deste trabalho, também foram observadas em *Gomesa echinata* (Barb.Rodr.) M.W. Chase & N. H. Williams e *G. ranifera* (Lindl.) M.W.Chase & N.H.Williams (STPICZYŃSKA et al., 2013).

Alguns autores consideraram que abaixo da epiderme secretora do elaióforo há uma camada única de pequenas células parenquimáticas compactadas, constituídas de grãos de amido ou gotículas lipídicas, que funciona como suporte para o processo secretor, denominada parênquima subsecretor (PACEK; STPICZYŃSKA, 2007; STPICZYŃSKA et al., 2007; STPICZYŃSKA; DAVIES, 2008; PACEK et al., 2012). Neste estudo, as células localizadas abaixo da epiderme do elaióforo, denominadas nos elaióforos das orquídeas investigadas por Stpiczyńska et al. (2013) como subepiteliais, aparentaram-se mais com as células epidérmicas, do que com as células parenquimáticas, quanto ao conteúdo citoplasmático denso corado, indicando alta atividade metabólica e participação na síntese de material lipídico.

Os elaióforos foram identificados pelo posicionamento das células secretoras no calo do labelo, confirmada pela anatomia e pelos testes histoquímicos, que permitiram localizar o material secretado. Dessa forma, contatou-se material lipídico na superfície epidérmica das projeções do calo centralmente localizado no labelo, igualmente ao ocorrido em *G. recurva* e *O. loefgrenii*, e ao contrário do observado em *Oncidium paranaense* Kraenzl. e *Trichocentrum cavendishianum* (Bateman) M.W. Chase & N.H. Williams, em que os elaióforos ocorreram nos lobos laterais do labelo (SINGER; COCUCCI, 1999; STPICZYŃSKA et al., 2007).

Os testes histoquímicos realizados nos calos frescos de *O. warmingii* revelaram-se positivos para: Sudan III, como na maioria dos estudos realizados com elaióforos de diversas espécies de orquídeas; Sulfato Azul do Nilo e Vermelho Neutro, como ocorrido em *O. pubes*

Lindl. e *O. flexuosum* Sims. (FARIA, 2004). Secreção de lipídios neutros foi também confirmada com o uso do reagente Auramine O nos tricomas de *Lockhartia lunifera* (Lindl.) Rchb.f. e *L. verrucosa* Lindl. ex Rchb.f. (BLANCO et al., 2013). Resultados negativos dos testes histoquímicos com *O. warmingii* foram verificados para: lugol, como ocorrido em *Oncidium cheiroporum* Rchb.f. e *Grobysa amherstiae* Lindl., e Vermelho de Rutênio, como ocorrido em *G. amherstiae* (PACEK; STPICZYŃSKA, 2007; PANSARIN et al., 2009). Verificou-se, no entanto, que em diversas espécies de orquídeas, seus elaióforos não apresentaram padrão quanto às substâncias exsudadas.

Os resultados da MET, no presente estudo e nos revisados, permitiram constatar que as células secretoras dos elaióforos das orquídeas apresentam organelas semelhantes, sendo comum a presença de mitocôndrias, dictiossomas, retículo endoplasmático liso, membranas intravacuolares, elaioplastos e gotículas lipídicas. Retículo endoplasmático liso e elaioplastos estão relacionados à síntese e ao armazenamento de material lipídico pelas plantas, respectivamente (STUMPF, 1980; VAN DER SCHOOT et al., 2011; CHAPMAN et al., 2012), não sendo diferente para *O. donianum* e *O. warmingii*, devido à abundância dessas organelas nas células secretoras e pela constatação de material lipídico secretado na superfície dos elaióforos, fato também observado em *O. radicans*, *T. cavendishianum*, *G. recurva* e *O. loefgrenii* (STPICZYŃSKA et al., 2007; STPICZYŃSKA; DAVIES, 2008).

Elaioplastos são plastídios detectados na maioria das Oncidiinae já investigadas (STPICZYŃSKA et al., 2007) e, normalmente, se diferenciam ao longo do amadurecimento da flor, sendo caracteristicamente ricos em plastoglobulinas, no período da antese, e em gotículas lipídicas, no decorrer do amadurecimento da flor (DAVIES; STPICZYŃSKA, 2009). Apesar da presença de plastoglobulinas ser comum em elaióforos no início do desenvolvimento floral, observou-se essas estruturas em flores maduras de *O. donianum* e *O. warmingii*. Elaioplastos com plastoglobulinas podem estar envolvidos na produção de substâncias voláteis (PACEK et al., 2012), encontradas em alguns táxons de Oncidiinae que exalam fragrância, por exemplo, *Z. lunata* (STPICZYŃSKA et al., 2007; DAVIES; STPICZYŃSKA, 2008; STPICZYŃSKA; DAVIES, 2008); e/ou associados a glândulas que exalam odor para atrair polinizadores, denominadas osmóforos (MICKELIUNAS et al., 2006), encontrados em flores de *G. amherstiae* (PANSARIN et al., 2009). Contudo, em *O. donianum* e *O. warmingii* não foi possível detectar odor em nenhum dos estádios de desenvolvimento da flor.

Identificou-se em *O. donianum* e *O. warmingii* elaioplastos ovados com gotículas lipídicas e alongados ou arredondados com material osmiofílico ou plastoglobulinas. Em

Zygostates grandiflora (Lindl.) Mansf. e *G. recurva*, os elaioplastos foram mais ou menos esféricos (STPICZYŃSKA et al., 2007; STPICZYŃSKA; DAVIES, 2008); em *Phymatidium tillandsioides* Barb.Rodr. e *Z. grandiflora* apresentaram formato alongado ou foram menos regular na forma (PACEK et al., 2012).

Grãos de amido podem ser convertidos em açúcar para compor o néctar e/ou são importantes fontes de energia para processos metabólicos intensos, sendo, comumente, utilizados no início do desenvolvimento das flores e relacionados com emissão de material volátil (FAHN, 1979). Amiloplastos podem também se diferenciar em elaioplastos a partir do início da antese, como ocorreu em *Ornithocephalus gladius* Hook. (PACEK et al., 2012). Não foram detectados grãos de amido nas duas espécies estudadas, provavelmente pelo fato das análises anatômicas e ultraestruturais. Em contrapartida, mesmo utilizando-se flores no período de antese, *G. amherstiae* não apresentou grãos de amido (PANSARIN et al., 2009), como observado nos elaióforos de *O. cheiophorum* e *Ornithocephalus kruegeri* Rchb.f. (PACEK; STPICZYŃSKA, 2007).

Vacúolos autofágicos, cujas membranas delimitantes originaram-se das cisternas do retículo endoplasmático liso, ou da invaginação do tonoplasto, são também denominados membranas intravacuolares, e foram encontradas em abundância na ultraestrutura celular de *O. donianum*, *O. warmingii*, e também em *Lockhartia oerstedii* Rchb.f., *T. cavendishianum*, *Oncidium ornithorhynchum* H.B.K. e *O. trulliferum* (STPICZYŃSKA et al., 2007; STPICZYŃSKA; DAVIES, 2008; DAVIES; STPICZYŃSKA, 2009; BLANCO et al., 2013). A ocorrência dessas organelas relaciona-se a processos de reciclagem celular e renovação do retículo endoplasmático liso, processos essenciais na síntese lipídica (DAVIES et al., 2014).

O material lipídico sintetizado nas células secretoras pode ser transportado do citoplasma até a membrana plasmática por duas vias: ao longo de endomembranas do retículo endoplasmático ou através de vesículas formadas pelo retículo endoplasmático (VAN DER SCHOOT et al., 2011), as quais foram constatadas em *O. warmingii* e também nos estudos com *O. ornithorhynchum*, *T. cavendishianum* e *Z. lunata* (STPICZYŃSKA et al., 2007; DAVIES; STPICZYŃSKA, 2009; PACEK et al., 2012). A excreção de material lipídico, em *O. warmingii*, pareceu ser facilitado pelo processo de fusão da membrana da vesícula secretora com a membrana plasmática, fenômeno observado também em *Oncidium amazonicum* (Schltr.) M.W.Chase & N.H.Williams, indicando possibilidade de secreção granulócrica nesta espécie (PACEK et al., 2012).

O transporte de substâncias entre células secretoras adjacentes da epiderme do elaióforo se dá através de plasmodesmos nos campos primários de pontoação, visualizados

para *O. donianum* e também em *V. excavata*, *O. oxyceras*, *L. lunifera*, *L. oerstedii* e *L. verrucosa* (BLANCO et al., 2013; STPICZYŃSKA et al., 2013; DAVIES et al., 2014).

Quanto ao transporte de material através da parede tangencial da célula secretora, a presença de cavidades na parede facilita o acúmulo e a passagem de substâncias hidrofóbicas, como os lipídios, mas elas não foram observadas em *O. donianum*, *O. warmingii*, *G. echinata*, *O. flexuosum*, *O. radicans*, *G. ranifera*, *G. recurva*, *Gomesa riograndensis* (Cogn.) M.W.Chase & N.H.Williams, *Gomesa varicosa* (Lindl.) M.W.Chase & N.H.Williams, embora existam relatos de sua ocorrência em *G. bifolia*, *O. loefgrenii*, *Gomesa venusta* (Drapiez) M.W.Chase & N.H.Williams, *O. cheirophorum* e *O. ornithorhynchum* (PACEK; STPICZYŃSKA, 2007; STPICZYŃSKA et al., 2007; STPICZYŃSKA; DAVIES, 2008; ALISCIONI et al., 2009; DAVIES; STPICZYŃSKA, 2009; GOMIZ et al., 2013; STPICZYŃSKA et al. 2013).

Além da presença de glóbulos lipídicos dispersos no citoplasma, material eletrônico também foi visualizado pela MET nas duas espécies de *Oncidium*, semelhante ao constatado para *Lockhartia* spp. (BLANCO et al., 2013), o que pode indicar secreção de natureza heterogênea para essas espécies. Material na superfície papilosa do elaióforo foi observado, através da MEV, em *O. warmingii*. Essas observações também foram constatadas pela MET para *Maxillaria notylioglossa* Rchb. f. (subtribo Maxillarinae), orquídea que produz secreção heterogênea constituída por cera (DAVIES et al., 2003).

Uma relevância da caracterização química das secreções florais relaciona-se ao fato de que a maioria das espécies vegetais produtoras de lipídios são compatíveis exclusivamente com polinização que envolve abelhas coletoras de óleo (SILVERA, 2002), pertencentes, principalmente, às famílias Apidae e Melittidae (BUCHMANN, 1987; MICHENER, 2000), sendo as abelhas que coletam óleo de orquídeas do novo mundo dos gêneros *Centris*, *Paratetrapedia* and *Tetrapedia* (BUCHMANN, 1987; SINGER; COCUCCHI, 1999; MACHADO, 2004).

Na maioria das plantas, lipídios são estocados na forma de diacilgliceróis (DAVIES et al., 1991; CHAPMAN et al., 2012), que, comumente, são encontrados em sementes e frutos (MURPHY, 1993), existindo poucas outras formas alternativas de estocagem. Um exemplo é a reserva lipídica encontrada em sementes de *Simmondsia chinensis* (Link) C.K. Schneid. (Simmondsiaceae), na forma de cera líquida, consistindo de uma longa cadeia de álcool esterificado com ácido graxo (TOBARES et al., 2003).

Foram encontrados como componentes relacionados com os exsudatos dos elaióforos: aminoácidos, glucose, carotenoides, substâncias fenólicas, glicosídeos, terpenoides não

voláteis e saponinas (VOGEL, 1974; BUCHMANN, 1987; REIS et al. 2000; SILVERA, 2002; REIS et al., 2006). Estudos químicos da composição de recompensas florais de espécies de Oncidiinae - *O. pubes*, *O. radicans* e *P. tillandsioides* (REIS et al., 2000, 2003, 2006) constataram que o material lipídico secretado pelas flores oleíferas é comumente incolor e consiste, predominantemente, de diacilglicerois, ácidos graxos saturados, parafinas, ésteres e hidrocarbonetos; identificando como principais os diacilglicerois assimetricamente substituídos nas posições três e sete do ácido graxo por um grupo acetoxi, ou por um grupo hidroxila.

Nas duas espécies estudadas observou-se semelhança quanto à composição química das secreções florais. A análise por CG-EM apresentou padrão de fragmentação de massas característico de hidrocarbonetos de cadeia longa, resultado semelhante ao encontrado para *G. amherstiae*: ácidos graxos, porém de cadeia curta, sendo o mais abundante o ácido graxo octadecanoico (MICKELIUNAS, 2007).

Nem sempre a quantidade e a qualidade do óleo produzido é a mesma entre membros do mesmo gênero (SILVERA, 2002). Reis et al. (2006) detectaram diferentes composições químicas nas secreções florais de *P. tillandsioides*, com presença de acilglicerois, e *Phymatidium delicatulum* Lindl., com predominância de hidrocarbonetos lineares relativamente simples; sendo estes últimos também encontrados para *O. donianum* e *O. warmingii*.

Finalizando, as análises por intermédio de técnicas de microscopia e histoquímica indicaram presença de lipídios e CG-EM indicou presença de hidrocarbonetos nos elaióforos de ambas as espécies, que, possivelmente, representam fragmentos de diacilglicerois, o que corrobora as observações de Reis et al. (2000, 2003, 2006). Estes resultados sugerem que *O. donianum* e *O. warmingii* produzem óleos não voláteis como recompensa floral para polinizadores, em vez de apenas mimetizar estruturas secretoras de Malpighiaceae tão frequentemente observadas em algumas Oncidiinae.

2.6 CONSIDERAÇÕES

O presente trabalho confirmou a hipótese inicialmente levantada de que *O. donianum* e *O. warmingii* produzem óleo como recompensa floral ao polinizador e não apenas mimetizam as estruturas florais das Malpighiaceae. Identificou-se o tipo de elaióforo de *O. donianum* e de *O. warmingii*, sua dinâmica de secreção e parte da constituição química desta. Esses resultados são subsídios a estudos relacionados à polinização dessas orquídeas, o que contribui para conservação destas espécies, considerando o *status* de vulnerabilidade do *habitat* em que elas se encontram, o PEIB, uma das UC mais visitadas do Brasil, e a situação de *O. warmingii* na lista vermelha das Espécies Ameaçadas da Flora de Minas Gerais.

Tabela 1 – Parâmetros utilizados para as análises da composição química em *Oncidium donianum* e *O. warmingii*

	<i>Oncidium donianum</i>	<i>Oncidium warmingii</i>
Coluna	Coluna de sílica fundida (5% difenil difenil, 95% dimetil polisiloxano) HP-5 (30 m x 0,25 mm e 0,25 mm de espessura de filme)	Coluna Restek Rtx-5MS®, (5% difenil dimetil polisiloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm I.D.)
Gás de arraste (Hélio)	Fluxo de 0,5 mL/min, por 60 minutos e injeção de 1mL da amostra e variação de temperatura de 2 °C/min (70 °C a 290 °C)	Fluxo de 1 mL/min, temperatura inicial do forno: 70°C foi mantida por 3 min, e posteriormente elevada à 10°C/min até 240°C. Essa temperatura foi posteriormente elevada a 300°C com duração de 9 min
Temperaturas	Injetor de 270 °C e no detector de 300 °C, acoplado à espectrômetro de massas Hewlett-Packard 5972	A temperatura do íon alcançada foi 300°C, a interface CG-EM foi também mantida a 300°C, e cessada a 5 min. antes do início da detecção por CG-EM
Parâmetros de operação do EM	70 eV, fonte de íons 250 °C equipado com EI	70 eV
Configuração do quadrupolo	Seleção de íons com m/z de 40 a 700	rastreados entre 40 – 700 AMU

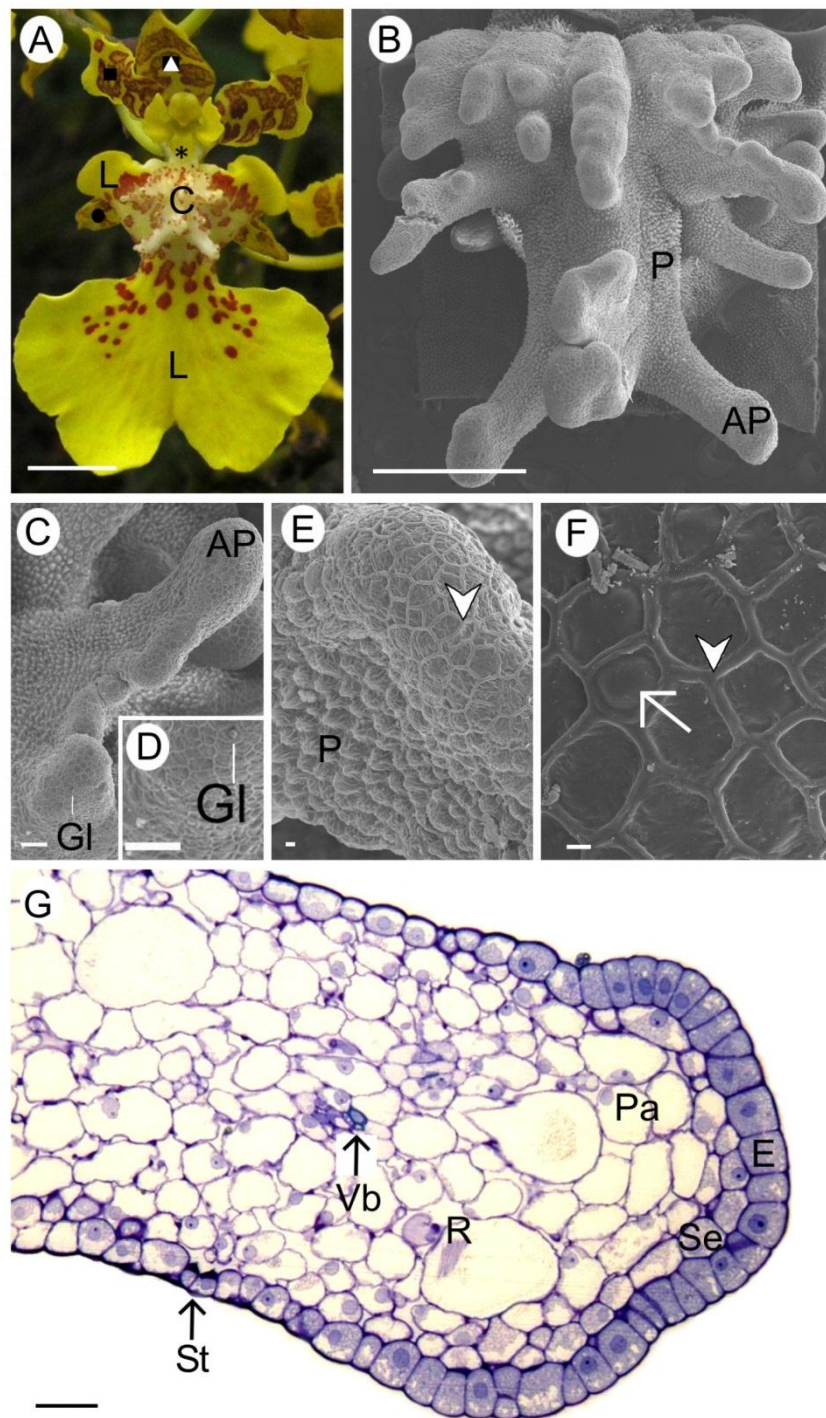


Figura 1 - *Oncidium donianum* Bateman ex W. Baxter: (A) Vista frontal da flor. MEV: (B) Aspecto geral do calo. (C) Detalhe do ápice da projeção do calo com glóbulo (Gl). (D) Glóbulo maximizado. (E) Ápice da projeção do calo com espessamento da parede anticlinal da epiderme, conferindo aspecto de rede e papilas. (F) Detalhe da cutícula do elaióforo distendida pelo acúmulo de secreção e espessamento da parede anticlinal, conferindo aspecto de rede. Microscopia de luz. Secção longitudinal do elaióforo: (G) Detalhe do ápice da projeção do calo. AP= ápice da projeção; C= calo; E= células epidérmicas; L= labelo; P= papilas; Pa= parênquima; ponta de seta= parede anticlinal espessada; R= idioblastos com ráfides; Se= células subepidérmicas; St= estômato; Δ = sépala dorsal; \blacksquare = pétala lateral; \bullet = sépala lateral; seta= distensão da cutícula; Vb= feixe vascular; *= tábula infraestigmática. Barras de escala: A= 2 mm; B= 1 mm; C, D= 100 μ m; E, F= 10 μ m; G= 50 μ m

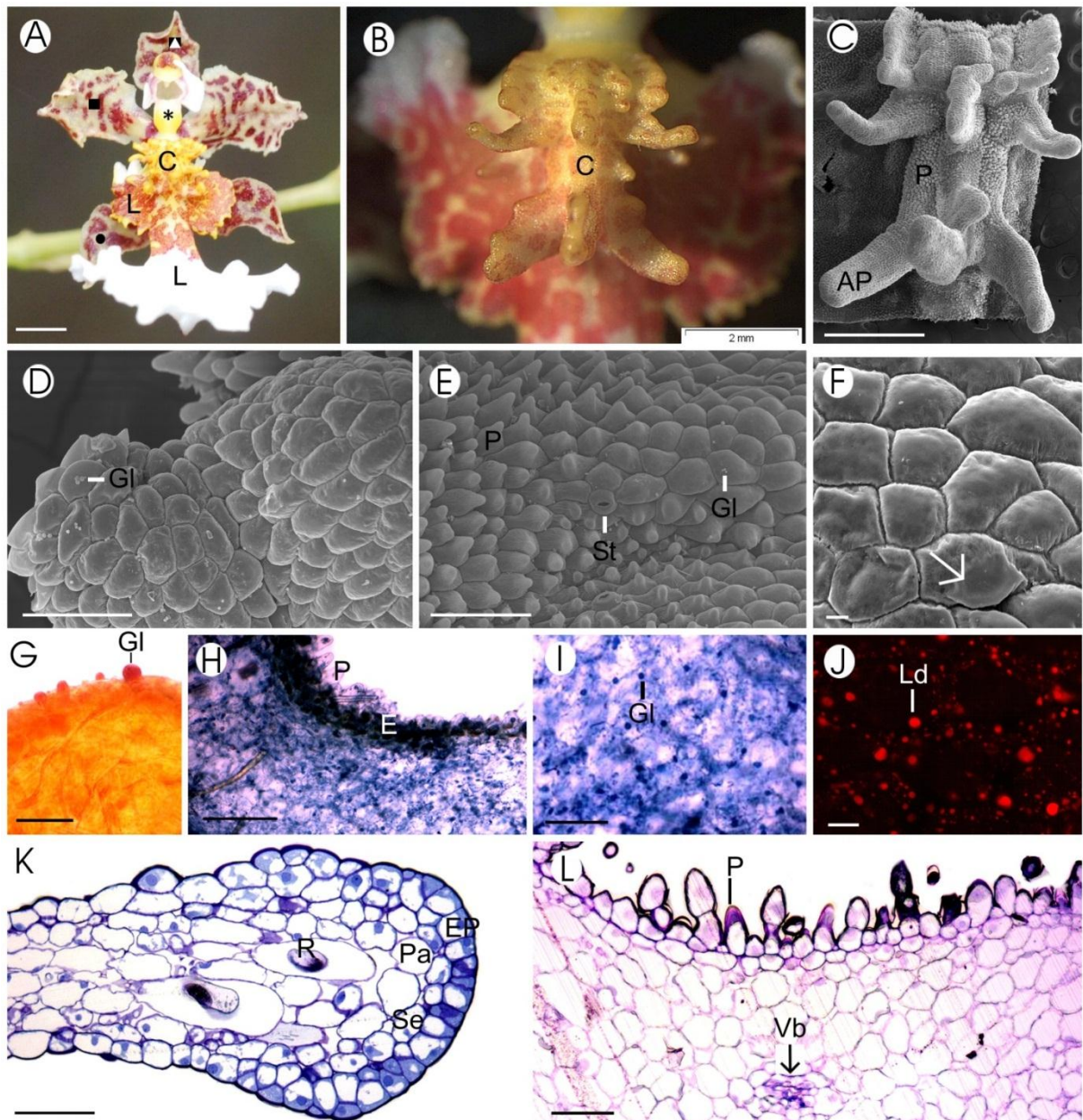


Figura 2 - *Oncidium warmingii* Rchb.f.: (A) Vista frontal da flor. (B) Detalhe da flor com destaque para o calo. MEV: (C) Aspecto geral do calo. (D) Ápice da projeção com glóbulos. (E) Glóbulos entre células epidérmicas comuns e papilosas. (F) Detalhe da cutícula distendida de célula secretora do elaióforo. Microscopia de luz de tecido fresco de elaióforo: (G) Ápice da projeção do elaióforo apresentando glóbulo lipídico após reação com Sudan III. (H) Papilas cônicas cobertas por secreção lipídica após reação com Sulfato Azul do Nilo. (I) Glóbulos lipídicos espalhados pela epiderme do ápice da projeção do calo em corte paradérmico. Microscopia Confocal de fluorescência: (J) Vista frontal do ápice da projeção do calo com gotículas lipídicas após reação com vermelho neutro. Microscopia de luz de seções longitudinais do elaióforo: (K) Ápice da projeção do calo. (L) Papilas cônicas cobertas por secreção lipídica. Δ = sépala dorsal; \blacksquare = pétala lateral; \bullet = sépala lateral; L= labelo; *= tábula infraestigmática; C= calo; P= papila; AP= ápice da projeção do calo; Gl= glóbulo; St= estômato; seta branca= distensão da cutícula; E= células epidérmicas; Ld= gotícula lipídica; Se= células subepidérmicas; Pa= parênquima; R= idioblastos com ráfides; Vb= feixe vascular. Barras de escala: A e B= 2 mm; C= 1 mm; D, H, I, L= 100 μ m; E, F, J= 10 μ m; G= 50 μ m; K= 150 μ m

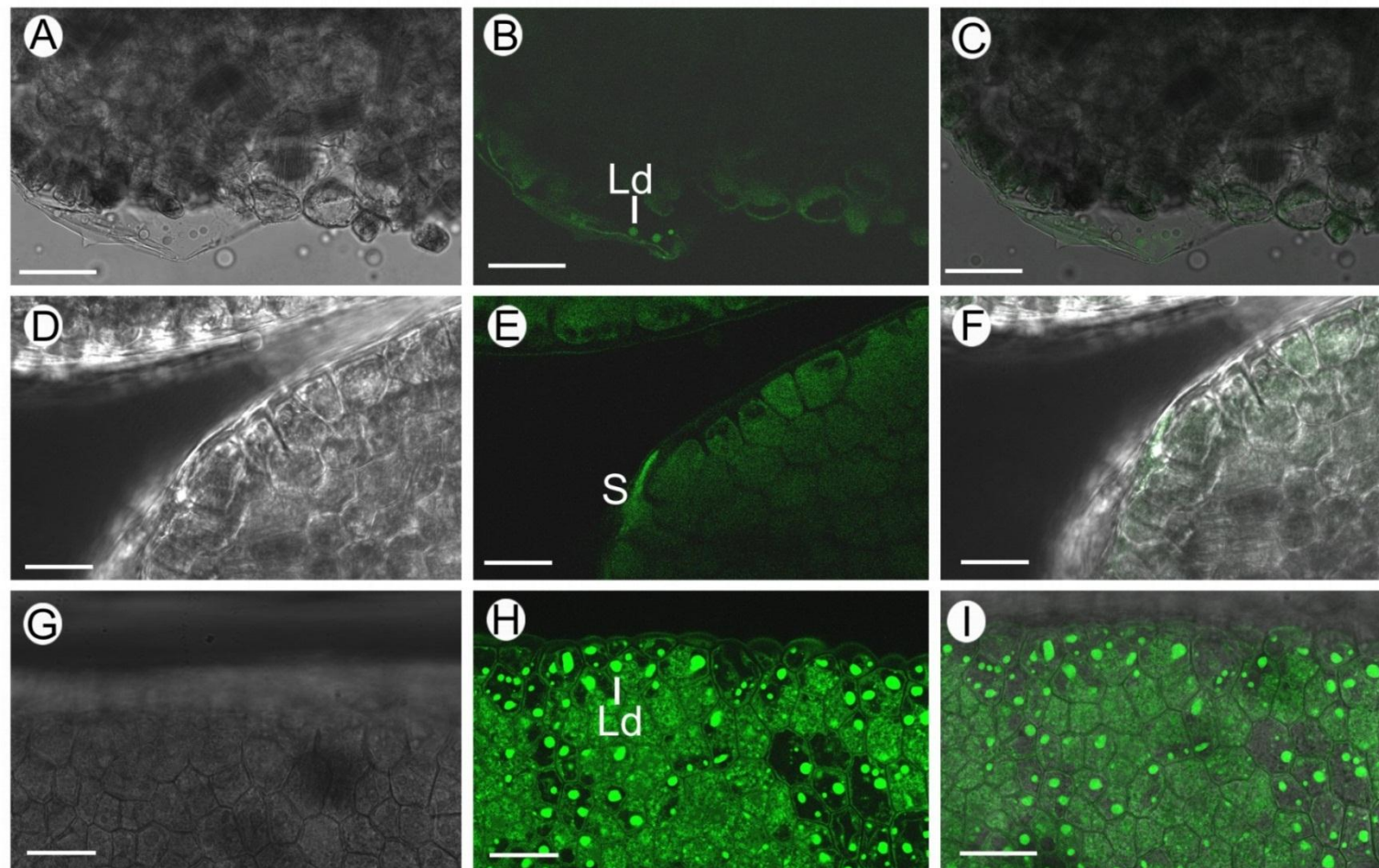


Figura 3 - *Oncidium donianum* Bateman ex W. Baxter: microscopia confocal de fluorescência – marcação com BODIPY no ápice da projeção do calo. (A) (D) (G) DIC - Contraste de interface diferencial. (B) (E) (H) Imagens confocal. (C) (F) (I) Sobreposição. Ld= gotícula lipídica; S= acúmulo de material lipídico entre cutícula e parede da célula secretora. Barras de escala: A-C, G-I= 50 µm; D-F= 25 µm

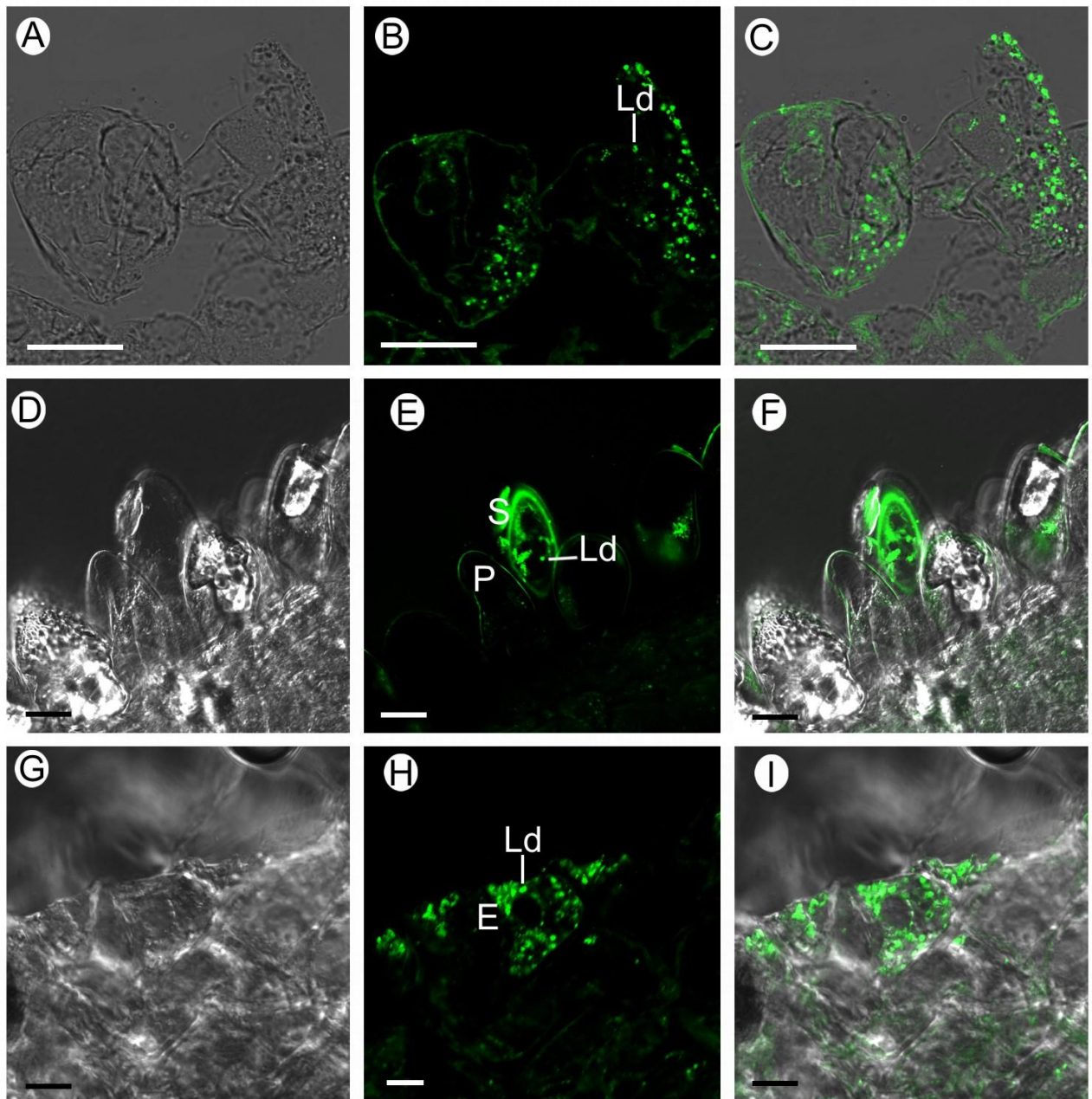


Figura 4 - *Oncidium warmingii* Rchb.f.: microscopia confocal de fluorescência -marcação com BODIPY no ápice da projeção do calo. (A) (B) (C) Macerado de células do ápice da projeção do calo. (D) (E) (F) Papilas cônicas cobertas por secreção e gotículas lipídicas. (G) (H) (I) Células epidérmicas com gotículas lipídicas. (A) (D) (G) Contraste de interface diferencial (DIC). (B) (E) (H) Imagens confocal. (C) (F) (I) Sobreposição. Ld= gotícula lipídica; S= secreção; E= células epidérmicas; P= papilas. Barras de escala: A-E= 25 μ m; G-H= 10 μ m

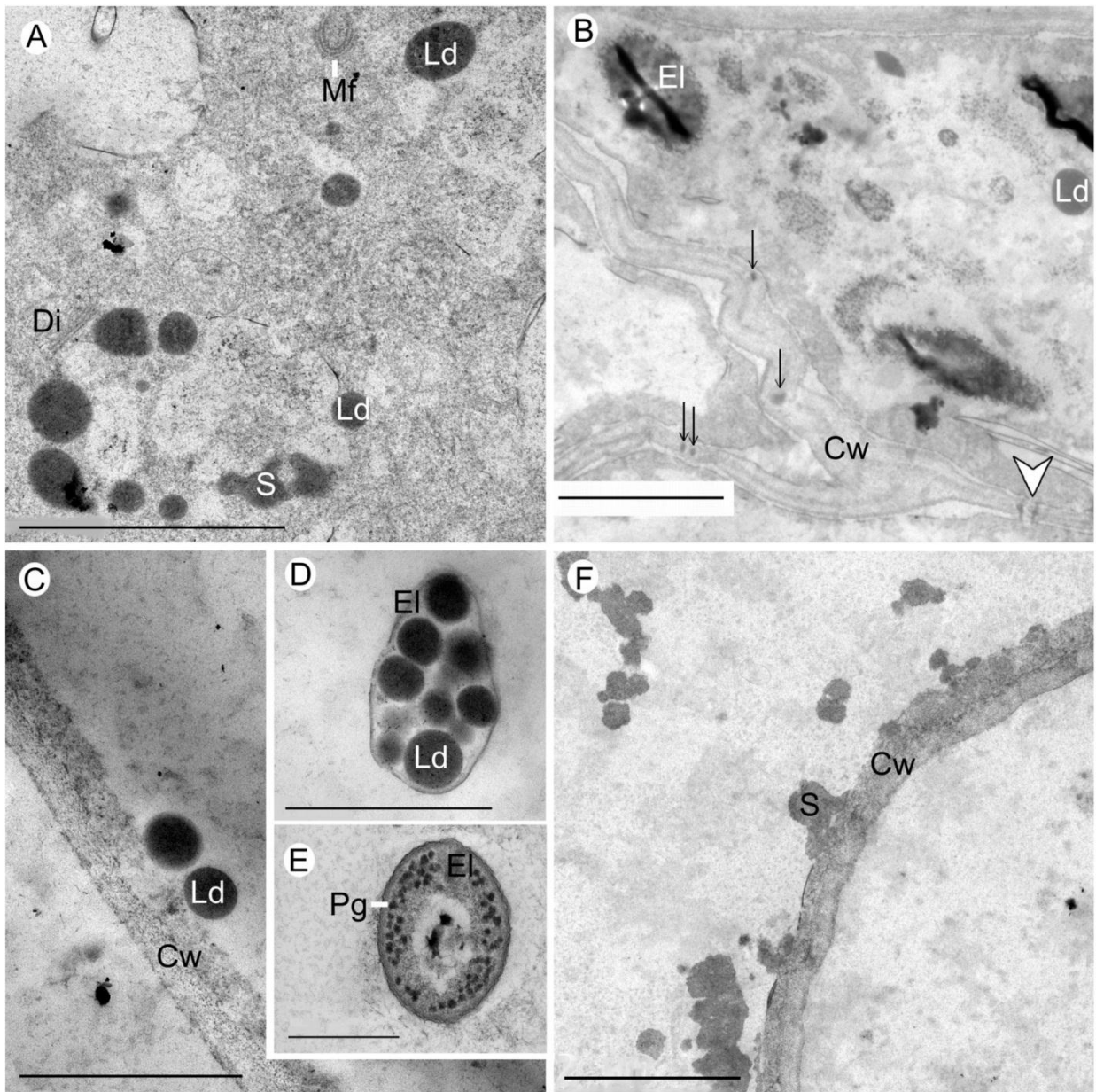


Figura 5 - *Oncidium donianum* Bateman ex W. Baxter: MET de células do ápice da projeção do calo. (A) Gotículas lipídicas, membranas intravacuolares e dictiossomos espalhados pelo citoplasma. (B) Elaioplasto com estroma de formato alongado, material osmiofílico entre os elementos estruturais da parede celular e detalhe de comunicação entre paredes de células epidérmicas. (C) Gotículas lipídicas próximas ao plasmalema. (D) Detalhe de elaioplasto ovalado, contendo numerosas gotículas lipídicas. (E) Detalhe de elaioplasto arredondado com plastoglobulinas. (F) Acúmulo de secreção eletrônica próxima ao plasmalema. Ld= gotícula lipídica; Cw= parede celular; Di= dictiossomo; El = elaioplasto; Mf= membranas intravacuolares; Pg= plastoglobulina; S= secreção eletrônica; seta= material osmiofílico; ponta de seta= campo primário de pontoação. Barras de escala: A e B= 2 μ m; C, D e F= 1 μ m; E= 0,5 μ m

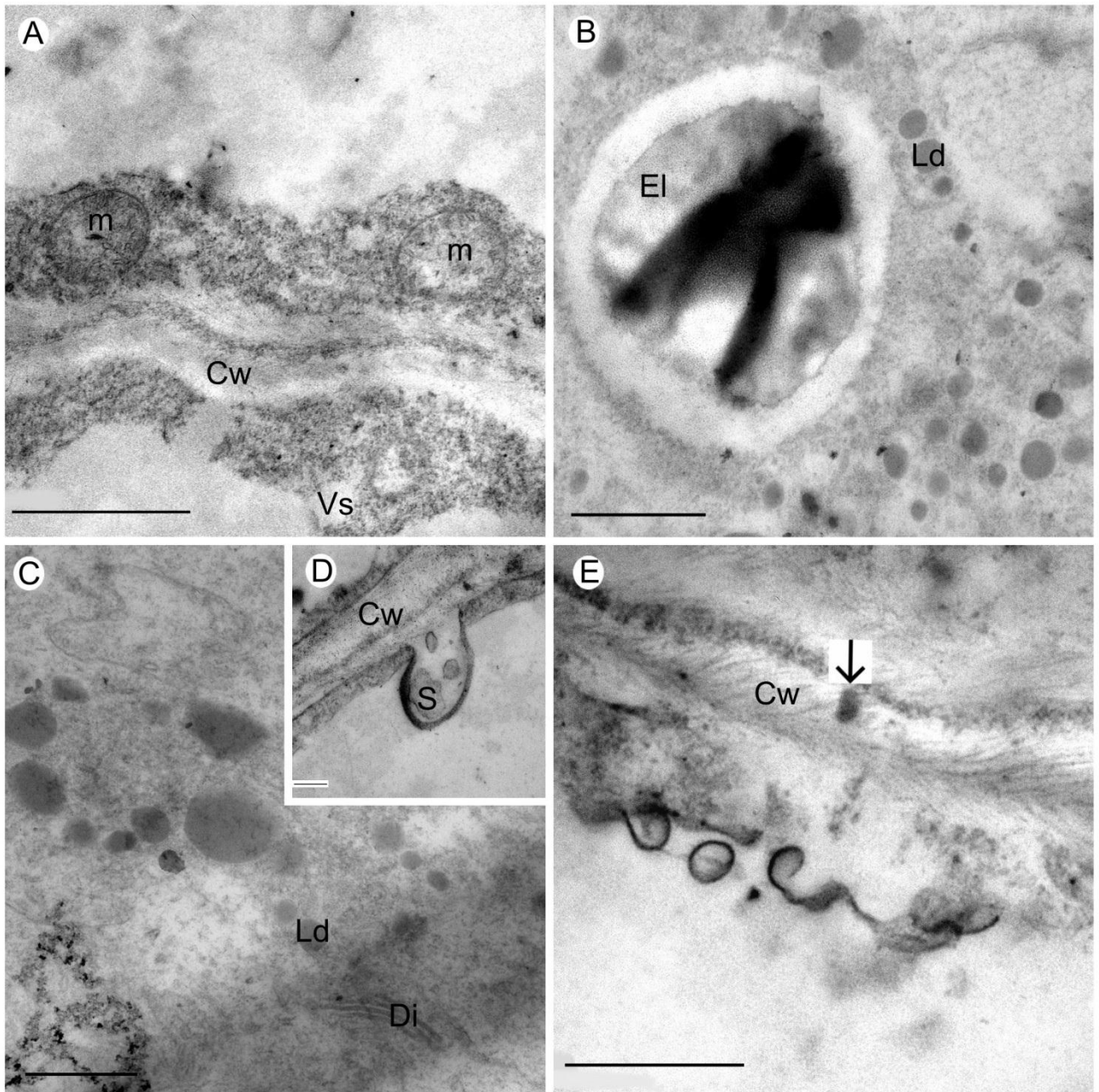


Figure 6 - *Oncidium warmingii* Rchb.f.: MET de células do ápice da projeção do calo. (A) Citoplasma parietal com mitocôndrias e vesícula secretora. (B) Gotículas lipídicas espalhadas pelo citoplasma ao redor do elaioplasto com estroma altamente osmiofílico. (C) Gotículas lipídicas e dictiossomos espalhados pelo citoplasma. (D) Fusão da membrana plasmática celular com membrana da vesícula secretora para realizar exsudação. (E) Material osmiofílico entre os elementos estruturais da parede celular. m= mitocôndria; Cw= parede celular; Vs= vesícula secretora; El = elaioplasto; Ld= gotícula lipídica; Di= dictiossomo; S= secreção eletrônica-densa; seta= material osmiofílico. Barras de escala: A= 1 μ m; B, E= 0,5 μ m; C, D= 0, 2 μ m

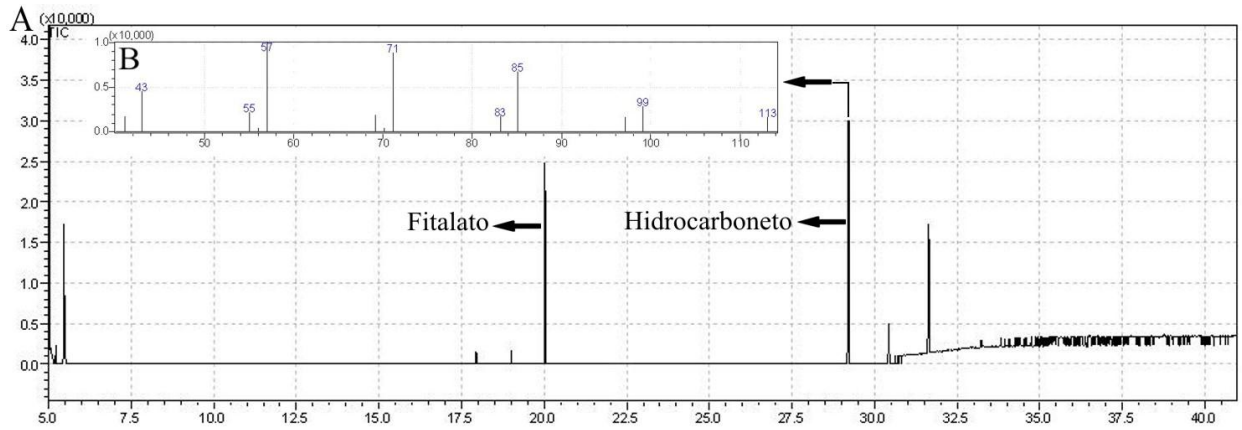


Figura 7. Cromatograma (A) de flores maduras de *Oncidium warmingii* Rchb.f., destacando contaminante de fitalato e substância majoritária com seu respectivo espectro de massas (B) com fragmentos em m/Z 43, 57, 71, 85, 99, 113 u.m.a.

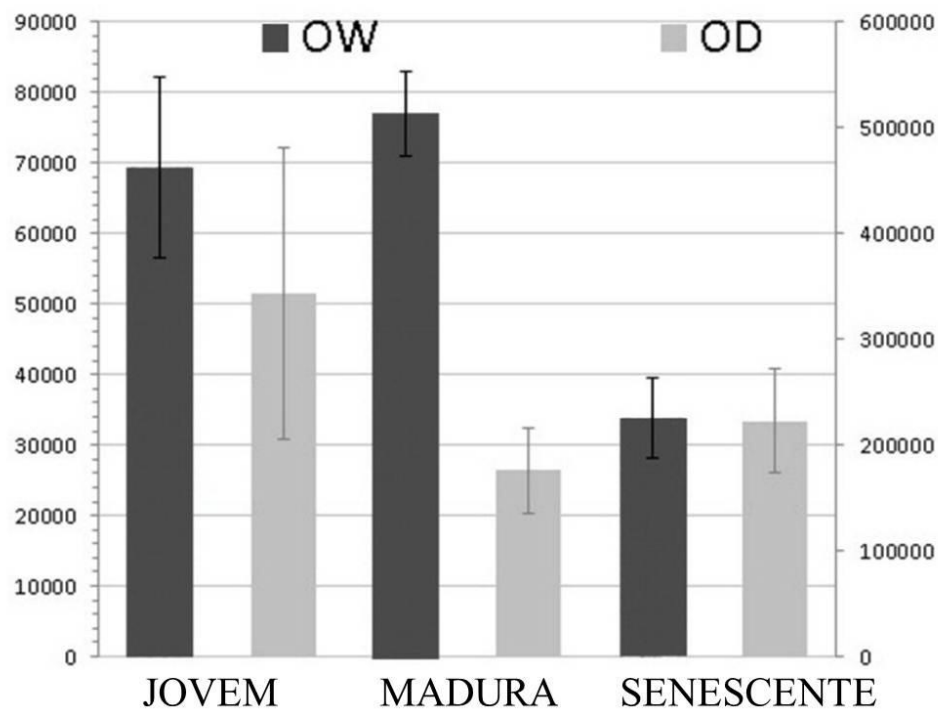


Figura 8. Quantificação relativa e comparativa do hidrocarboneto majoritário obtido das áreas provenientes dos cromatogramas em CG-EM das amostras de *Oncidium warmingii* Rchb.f. (OW), referência do eixo y da esquerda, e das amostras de *Oncidium donianum* Bateman ex W. Baxter (OD), referência do eixo y da direita. Barra de erros corresponde ao desvio padrão da área do hidrocarboneto nas três idades de flores em separado para cada espécie

3. CAPÍTULO 2 – EFEITO DE BORDA NA ADAPTAÇÃO MORFOANATÔMICA FOLIAR E QUÍMICA DE ORCHIDACEAE EM NANOFLORESTA NEBULAR NA SERRA DA MANTIQUEIRA, MINAS GERAIS, BRASIL

3.1 RESUMO

A fragmentação florestal é o processo no qual um *habitat* contínuo é dividido em mosaicos vegetacionais, sendo uma das consequências a formação de bordas com condições ambientais climáticas diferentes das encontradas na floresta. Uma alternativa para se medir os efeitos diretos da fragmentação é analisar as respostas morfológicas, fisiológicas e químicas de plantas que dominam o fragmento. O Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB), localizado na Serra da Mantiqueira, é caracterizado por constituir um mosaico de fitofisionomias onde Orchidaceae apresenta diversidade de hábito, o que possibilita adaptação a variantes ambientais. As orquídeas *Hadrolaelia coccinea* (Lindl.) Chiron, *Prosthechea pachysepala* (Klotzsch) Chiron e V.P. Castro e *Pleurothallis rubens* Lindl. podem apresentar respostas morfoanatômicas, fisiológicas e químicas frente às variações ambientais encontradas na borda e no interior da nanofloresta nebulosa no PEIB. Objetivou-se verificar se existem diferenças quanto às condições climáticas entre borda e interior de nanofloresta no PEIB, e como se manifestam os atributos foliares (morfológicos, fisiológicos e químicos) de *H. coccinea*, *P. pachysepala* e *P. rubens*, em relação à adaptação nestas condições climáticas. Aferições climáticas foram realizadas com o Termo-Higro-Anemômetro Luxímetro Digital Portátil Modelo Thal-300, nas fitofisionomias estudadas do PEIB, nas quatro estações do ano. Para as análises morfoanatômicas foram coletadas dez ou trinta folhas adultas para cada dez indivíduos de *H. coccinea*, *P. rubens* e *P. pachysepala* na borda e no interior da nanofloresta nebulosa. Para as análises de clorofilas, histoquímicas e químicas através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) foram coletadas três folhas de três indivíduos de cada espécie por fitofisionomia. O índice de plasticidade fenotípica (IPF) foi calculado para cada variável morfológica, anatômica e fisiológica. Para avaliar as diferenças de cada variável entre as duas fitofisionomias utilizou-se o teste t-student ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney. A radiação solar global ($\mu\text{mmol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) foi maior na borda que no interior da nanofloresta nebulosa. *Hadrolaelia coccinea* e *P. pachysepala* apresentaram respostas morfoanatômicas similares, configurando os mesmos tipos funcionais. *Pleurothallis rubens* apresentou diferenças significativas apenas para três variáveis no inverno e duas no verão. O sistema cromatográfico empregado destacou a classe química dos flavonoides em *P. pachysepala* e *P. rubens*, sendo os maiores valores detectados na borda, o que pode ser considerado uma resposta fotoprotetora. A síntese de flavonoides diferiu significativamente apenas nas estações verão e inverno, com maiores produções no interior e na borda, respectivamente, para *P. pachysepala* e o contrário para *P. rubens*, o que provavelmente está relacionado à defesa constitutiva na primeira e fotoproteção na segunda. *Hadrolaelia coccinea* foi a espécie de maior IPF, o que lhe confere maiores chances de sobrevivência às oscilações ambientais e distribuição geográfica. Este trabalho abre novos caminhos para pesquisas voltadas à associação da ecologia à química, uma vez que as diferenças observadas nos teores de flavonoides possibilitaram uma análise conjunta da dinâmica da produtividade de metabólitos especiais com a adaptabilidade dessas espécies quanto ao seu metabolismo primário.

Palavras-chave: ecologia química, flavonoides, plasticidade fenotípica, Orchidaceae, PEIB.

3. 2 INTRODUÇÃO

Fragmentos florestais são resultados de alterações no *habitat* original que podem ser oriundos de processos ou barreiras naturais, por exemplo: flutuações climáticas, causando expansão ou retração de determinados tipos de vegetação; heterogeneidade dos solos, conferindo restrição do tipo de vegetação a um solo específico; topografia, delimitando ilhas de vegetação peculiar a um local elevado, dentre outros (VIANA, 1990; BARROS, 2006). Dessa forma, a fragmentação é o processo no qual um *habitat* contínuo é fragmentado em manchas, ou pequenas áreas, geralmente, formando mosaicos na paisagem, com características abióticas peculiares (SHAFER, 1990; MURCIA, 1995; SCARIOT et al., 2005).

Uma das principais consequências da fragmentação florestal é a formação de bordas, regiões de transição entre o que restou da vegetação original e a região modificada (matriz) (PRIMACK et al., 2001; LIMA-RIBEIRO, 2008), que contribuem para que as espécies estejam sujeitas às condições ambientais climáticas diferentes das encontradas na floresta (MURCIA, 1995), como maior intensidade de radiação, altas temperaturas e redução na umidade relativa do ar (KAPOS, 1989; ESSEEN, 1994; JOSE et al., 1996; BERNARDI; BUDKE, 2010; HOLANDA et al., 2010; MULLER et al., 2010; RIGUEIRA et al., 2012). Com o passar do tempo, as novas condições climáticas existentes nas bordas dos fragmentos contribuem para o estabelecimento de uma comunidade vegetal distinta da comunidade do interior (RODRIGUES; NASCIMENTO, 2006). Uma das alternativas para se medir os efeitos diretos da fragmentação é a análise das respostas morfológicas, fisiológicas e químicas de espécies de plantas que dominam o fragmento (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2009; RAMOS et al., 2013).

A Serra da Mantiqueira é uma das maiores cadeias de montanhas do leste sul-americano e ocupa uma extensa área da região Sudeste do Brasil, sendo um dos principais núcleos da Floresta Atlântica brasileira (RIZZINI, 1997). Nessa região, localiza-se o Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB), caracterizado por constituir um mosaico de fitofisionomias (ANDRADE; SOUSA, 1995; SALIMENA-PIRES, 1997; RODELA; TARIFA, 2001; DIAS et al., 2002; FORZZA et al., 2013), cada qual peculiar quanto às condições climáticas relacionadas à temperatura, umidade relativa do ar e radiação solar (RODELA; TARIFA, 2002). No PEIB, Orchidaceae se destaca como a família com o maior número de representantes, perfazendo 126 espécies (MENINI NETO et al., 2007; FORZZA et al., 2013).

Uma característica ecologicamente importante das orquídeas é a diversidade de hábito. A maioria delas é epífita, embora encontram-se espécies terrícolas, rupícolas e saprófitas (DRESSLER, 1993). Essa condição possibilita a ocupação por Orchidaceae a diferentes tipos de ecossistemas e fitofisionomias (HOEHNE, 1949) e, conseqüentemente, sua adaptação às variantes ambientais (BENZING, 1987).

No curso da evolução das plantas, as folhas apresentaram-se como os órgãos mais plásticos às mudanças ambientais (GUAN et al., 2011), com possibilidades de ajuste fotossintético, contribuindo positivamente com o crescimento e com o metabolismo da planta (VENDRAMINI et al., 2002; VIOLLE et al. 2007; PANDEY et al. 2009; SANCHES et al., 2009). Traços ou atributos foliares, como área, massa seca, espessura foliar e concentrações de clorofilas, representam e refletem muito bem a influência do ambiente sobre as plantas e suas adaptações a esse ambiente (NAVAS; GARNIER, 2002; HANBA et al., 2002; SCHLÜTER et al., 2003; CALVO-ALVARADO et al., 2008; DUNBAR-CO et al., 2009).

A plasticidade fenotípica representa a capacidade de um indivíduo em ajustar o seu fenótipo, através da manifestação de características que lhe são impróprias geneticamente e/ou acentuar/atenuar outras que lhe são comuns, possibilitando melhor aproveitamento dos recursos do meio (EPSTEIN, 1972; SCHILICHTING, 1986; HUTCHINGS, 1989; BELL; LECHOWICZ, 1994). Contudo, dentro de um genótipo, que é único para cada espécie, há limites para a amplitude de respostas fenotípicas (BRADSHAW, 1965), sendo que algumas espécies modificam-se bastante como uma resposta ao meio e outras pouco podem se modificar.

Primariamente às respostas morfoanatômicas e fisiológicas que as plantas podem apresentar frente às variações ambientais, elas podem responder quimicamente, produzindo tipos e quantidades diferenciadas de metabólitos especiais (EVANS, 1996; YAO et al., 2005; GOBBO-NETO; LOPES, 2007), atuando na defesa às oscilações de temperatura, umidade e radiação solar (SHEWRY; LUCAS, 1997; DE WIT, 2007). Os metabólitos especiais apresentam importantes funções ecológicas nas plantas fornecendo, por exemplo, proteção contra insetos herbívoros e patógenos, contribuindo para sua interação com agentes polinizadores e dispersores de sementes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; TAIZ; ZEIGER, 2009). Dentre os diversos metabólitos relacionadas à defesa química, podendo apresentar múltiplos benefícios à planta, citam-se as substâncias nitrogenadas, os terpenoides e os flavonoides (DEWICK, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2009). Este último, por exemplo, também possui atividade fotoprotetora (ZUANAZZI, 2004; STAHL et al., 2006; GASPI et al., 2011).

As orquídeas *Hadrolaelia coccinea* (Lindl.) Chiron, *Prosthechea pachysepala* (Klotzsch) Chiron e V.P. Castro e *Pleurothallis rubens* Lindl. apresentam indivíduos que podem ser encontrados em diferentes fitofisionomias no PEIB, sendo que diferenças morfológicas em suas folhas foram percebidas inicialmente entre estas fitofisionomias (L. MENINI NETO, comunicação pessoal), incluindo-se interior de floresta e transição da floresta com o campo rupestre no PEIB, ou áreas de borda, regiões representadas, respectivamente, pelas fitofisionomias de nanofloresta nebulosa e arbustal nebulosa. Tal fato, possivelmente, influencie nessas espécies o desenvolvimento de caracteres morfoanatômicos e/ou de ajustes fisiológicos (PRICE et al., 2003) e químicos, facilitando sua adaptação e sobrevivência às condições ambientais presentes em cada fitofisionomia (GRATANI, 1996; PINTADO et al., 1997; GRATANI et al., 2003; ZUNZUNEGUI et al., 2011), dependendo da amplitude da plasticidade fenotípica de cada espécie estudada (SCHLICHTING, 2002; SULTAN, 2004; VALLADARES et al., 2006; GRATANI, 2014).

Corroborando essas considerações, a ocorrência de variações anatômicas em orquídeas em resposta a microambientes de luz distintos, como na borda e no interior da floresta nebulosa, foi destacada, anteriormente, em estudos de adaptações estruturais de epífitas simpátricas em regiões de campo rupestre (MOREIRA et al., 2013).

Nesse contexto, a magnitude das respostas morfológicas, funcionais/estruturais e químicas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007) que uma espécie apresenta, pode contribuir para a exploração de nichos diversos, ampliando suas possibilidades de distribuição geográfica (SULTAN, 1995, 2000; BRADSHAW, 2006) e de conservação (SCARIOT et al., 2005), o que para a orquídea *H. coccinea* é particularmente importante, pois a mesma se encontra em perigo de extinção, segunda a Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas de Extinção da Flora de Minas Gerais (SANO et al., 2008).

A fim de contribuir com dados referentes à adaptação das orquídeas *H. coccinea*, *P. pachysepala* e *P. rubens* nas bordas e no interior das nanoflorestas do PEIB, objetivou-se verificar se existem diferenças quanto às condições climáticas (radiação solar global, temperatura e umidade relativa do ar) entre as duas fitofisionomias que compõem essas regiões, e investigar as respostas morfoanatômicas e fisiológicas, e a sazonalidade da composição química das folhas dessas espécies em cada uma dessas fitofisionomias.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Local de estudo e espécies pesquisadas

Todo o material botânico analisado e as fitofisionomias estudadas neste trabalho localizam-se no PEIB, situado no sudeste do Estado de Minas Gerais (21°40'-21°44'S, 43°52'-43°55'W), abrangendo os municípios de Bias Fortes, Lima Duarte e Santa Rita do Ibitipoca (OLIVEIRA-FILHO et al., 2013). O PEIB, uma das unidades de conservação mais visitadas do Brasil (FORZZA et al., 2013), encontra-se inserido na Serra da Mantiqueira, área prioritária para a proteção de mananciais e de importância biológica especial (CONSERVATION INTERNACIONAL DO BRASIL, 2000; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2002; DRUMMOND et al., 2005).

O clima da região de Ibitipoca foi classificado como tropical de altitude mesotérmico (Cwb), segundo classificação de Köppen (1948), com inverno frio e seco e chuvas elevadas no verão.

A vegetação predominante do PEIB compreende os campos rupestres (SALIMENA-PIRES, 1997; RODELA; TARIFA, 2001), atualmente nomeada como vegetação savano-campestre (OLIVEIRA-FILHO, 2009). Contudo, o parque é caracterizado por um mosaico de fitofisionomias (ANDRADE; SOUSA, 1995; SALIMENA-PIRES, 1997; RODELA; TARIFA, 2001; DIAS et al., 2002; OLIVEIRA-FILHO et al., 2013), peculiares quanto às condições climáticas (RODELA; TARIFA, 2002). Os fragmentos florestais selecionados para este estudo foram originados por processos naturais, principalmente relacionados ao desnível do relevo, e correspondem aos remanescentes ou áreas não contínuas de nanoflorestas, um tipo de fitofisionomia do PEIB (OLIVEIRA-FILHO et al., 2013).

Neste estudo, *Hadrolaelia coccinea*, *Prosthechea pachysepala* e *Pleurothallis rubens* foram coletadas no arbustal nebuloso e na nanofloresta nebulosa, segundo classificação adotada por Oliveira-Filho et al. (2013), para denominar o que é chamado nesse estudo de borda (B) e interior de floresta (I), respectivamente (Figura 6).

O arbustal nebuloso, ou B, compreende um adensamento de caules de arbustos cujas copas alcançam entre 1 e 3 m de altura; árvores emergentes (< 3m) podem ocorrer esparsamente; não há revestimento campestre sobre o solo, que se caracteriza em arenoso derivado do quartzito ou pedregoso formado sobre saprolito de xisto, com possível ocorrência

de afloramentos rochosos em seu interior. Representa uma transição das nanoflorestas para as savanas e campos (OLIVEIRA-FILHO et al., 2013).

A nanofloresta nebulosa, ou I, comporta árvores que formam um dossel mais ou menos contínuo a uma altura entre 3 e 5 m, com árvores emergentes esparsas de até 10 m; o tronco das árvores apresenta uma notável fitomassa de epífitas e a folhagem comporta líquens epífitos (OLIVEIRA-FILHO et al., 2013). Essa vegetação perfaz a maior parte da cobertura florestal do PEIB (15,6% da superfície do parque) e são também denominadas mata ciliar (RODELA; TARIFA, 2001) ou mata de galeria (SALIMENA-PIRES, 1997; DIAS et al., 2002). Os solos das nanoflorestas são derivados de quartzito, caracterizando-se por serem rasos e pobres em minerais (DIAS et al., 2002). As nanoflorestas selecionadas para o presente estudo situam-se em depressões do terreno, associadas às entradas de cavernas e ao fundo dos vales.

Hadrolaelia coccinea é epífito, até ca. 15 cm compr. Apresenta pseudobulbo unifoliado, ereto, fusiforme a subsférico, 0,5-5 cm compr.; folhas coriáceas ou carnosas, largo a estreitamente elípticas ou oblongas, 1-9 x 1-3 cm, ápice obtuso; flor solitária, ressupinada, vermelha, às vezes vermelho-alaranjadas (BUZATTO et al., 2010). Distribuía-se originalmente desde o Nordeste da Argentina, em Misiones, onde hoje encontra-se extinta (CORREA, 1996), até os estados das regiões Sudeste e Sul do Brasil (BARROS et al., 2015). É encontrada, em geral, nas florestas nebulares (interior e borda), acima de 800 m de altitude, e com frequência em florestas de Araucária, em ambientes saturados de umidade e regularmente expostos a nevoeiro (BUZATTO et al., 2010). Floresce no verão. Sua polinização é realizada por beija-flores de diversas espécies. Está citada na Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas de Extinção da Flora de Minas Gerais com o *status* de “Em Perigo” (SANO et al., 2008).

Prosthechea pachysepala é uma erva epífito facultativa, de grande porte. Os pseudobulbos são fusiformes, comprimidos, verdes, 10-24 cm compr. Apresenta duas a quatro folhas apicais, 12-24 x 3-4,5 cm, verde-escuras, oblongas, ápice agudo. Inflorescência apical, com até 40 flores não ressupinadas. As flores apresentam antese sucessiva com sépalas e pétalas amarelas a amarelo-esverdeadas, densamente pintalgadas de vináceo (MILLER et al., 2006). Encontra-se distribuída por toda a Região Neotropical. Habita ambientes de luz filtrada, com boa umidade e movimento de ar suave. Não tolera sombreamento extremo. Floresce na primavera, de setembro a dezembro. A polinização é realizada por abelhas (VAN DER CINGEL, 2001). É especialmente coletada por colecionadores pelo seu valor ornamental (BARROS et al., 2011).

Pleurothallis rubens é epífita, cespitosa, frequentemente com touceiras de mais de vinte folhas. Cada caule da touceira é cilíndrico e fino, unifoliado, até ca. 13 cm compr. Folhas coriáceas, 3-13 x 1-2,5 cm, ápice tridentado. A inflorescência surge do ápice do caule, portando entre 15 a 20 flores amarelo-esverdeadas. As flores apresentam antese simultânea (MENINI NETO et al., 2007). No Brasil ocorre nos estados das regiões Sudeste (exceto Espírito Santo) e Sul, além de Pernambuco e Bahia, nos domínios da Caatinga, Cerrado e Floresta Atlântica (BARROS et al., 2015). Floresce entre abril e maio (BASTOS; VAN DER BERG, 2012).

3.3.2 Aferições climáticas

Através de um aparelho Termo-Higro-Anemômetro Luxímetro Digital Portátil Modelo Thal 300, marca Instrutherm, foram aferidas: a radiação solar global ($\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e a umidade relativa do ar (% RH), nas quatro estações do ano: inverno (agosto de 2013); primavera (outubro de 2013); verão (janeiro de 2014) e outono (maio de 2014). Em cada estação, foi realizado um dia de aferições climáticas em três turnos: manhã (8h30 a 11h30); meio-dia (12h05 a 13h) e tarde (14h50 a 17h20). O intervalo, em cada turno de aferição, foi necessário devido ao deslocamento no PEIB.

Dados climáticos de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar (% RH) e precipitação (mm) dos anos 2011 (março) a 2013 (dezembro), com ausência de medições entre fevereiro a abril de 2013, foram aferidos próximos ao Centro de informação do PEIB e fornecidos pelos gestores do Parque, e dados climáticos de radiação (kJ/m^2), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar (% RH) e precipitação (mm) dos anos 2011 a 2014, aferidos pela Estação Climatológica Convencional da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), foram utilizados a fim de comparação com as aferições realizadas com o Thal 300 nas fitofisionomias B e I do PEIB.

3.3.3 Procedimentos de coleta do material de estudo

Folhas maduras e totalmente expandidas de *H. coccinea*, *P. pachysepala* e *P. rubens* foram coletadas nas fitofisionomias B e I. No momento da coleta, as folhas foram acondicionadas em sacos plásticos pretos para as análises morfoanatómicas, e em envelopes de papel para as análises químicas e de quantificação de clorofilas, devidamente identificadas e armazenadas em caixa térmica.

Material testemunho de *H. coccinea*, *P. pachysepala* e *P. rubens* estão depositadas no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) sob os números CESJ 26463, CES 48667 e CESJ 41031, respectivamente.

3.3.4 Análises morfológicas externas e anatômicas

Para as análises morfológicas externas e anatômicas foram coletadas 10 folhas de *H. coccinea* e de *P. rubens* e, 30 folhas entre os 3° e 4° nós (sentido ápice-base dos ramos da planta) de *P. pachysepala*, de 10 indivíduos de cada espécie nas duas fitofisionomias estudadas, no verão, em 8 de fevereiro de 2012, e inverno, em 23 de julho de 2013. Para *H. coccinea* e *P. rubens* foram coletadas as únicas folhas que brotam nos ápices dos caules.

Nessas folhas, retirou-se da região central do terço médio, incluindo a nervura central, uma área equivalente a um quadrado de 1,3 cm de lado que foi fixado em FAA 70% (1:1:18 v/v) por 24 horas e conservado em álcool 70% (JOHANSEN, 1940), para posteriores medições anatômicas. Após a obtenção dessas áreas, aferiu-se nessas folhas a massa fresca (MF) (g). As folhas, posteriormente, foram prensadas entre jornal e secas em estufa a temperatura de 65°C até atingirem massa constante, correspondente à massa seca (MS) (g). As massas fresca e seca foram mensuradas com auxílio de balança analítica de precisão (AY220, Marte com $ie = 0,001g$). A área foliar (AF) (cm^2) foi medida pelo programa Image J, a partir da imagem digitalizada.

Com os resultados obtidos das medidas supracitadas, foram aferidos o conteúdo de água (CA) (MF-MS g), o teor de matéria seca (TMS) ($100 \times MS/MF$), a área foliar específica (AFE) ($AF/MS \text{ cm}^2 \cdot g^{-1}$) (WITKOWSKI; LAMONT, 1991), a massa foliar específica (MFE) ($MS/AF \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$), representando o índice de esclerofilia (IE), em que $IE \geq 0,6$ indica esclerófilas, conforme Rizzini (1976), e o grau de suculência (GS) ($MF-MS/AF \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$). O tamanho foliar seguiu a classificação de Webb (1959).

A densidade estomática ($n^\circ \cdot \text{mm}^{-2}$) foi obtida clarificando-se as folhas com hipoclorito de sódio 40%. Utilizou-se três campos por folha, totalizando trinta campos para *H. coccinea* e *P. rubens* e noventa campos para *P. pachysepala* para cada fitofisionomia. A densidade estomática foi determinada através da contagem de estômatos situada numa área de 1 mm^2 , em microscópio de luz óptico Olympus BX 41, com câmara clara acoplada. A classificação dos estômatos seguiu terminologia adotada por Rasmussen (1987).

Para análise qualitativa da superfície epidérmica, amostras da região mediana das folhas das três espécies em cada fitofisionomia foram dissociadas de acordo com a técnica de

Franklin (1946), que consiste em solução de água oxigenada 30 volumes e ácido acético glacial, na proporção de 1:1, em estufa a 60°C, até a completa clarificação e dissociação do material. Em seguida, o material foi lavado e corado com fucsina básica, sendo montado em gelatina glicerinada (KAISER, 1880) e vedado com lamínula e esmalte de unha incolor.

Para a mensuração de tecidos do limbo foliar, utilizaram-se regiões do terço médio foliar, representadas pelos fragmentos conservados em álcool 70%, de dez folhas de *H. coccinea* e de *P. rubens* e de trinta folhas de *P. pachysepala* por tratamento. Para a montagem de lâminas temporárias, referentes a essa análise, o material vegetal fixado foi seccionado transversalmente com lâmina de barbear e montado em água.

Nas secções transversais da região mediana dos limbos foliares foram medidas as espessuras (μm) da cutícula da face adaxial (CAD), epiderme da face adaxial (EAD), hipoderme da face adaxial (HAD), dos parênquimas paliçádico (PP) e lacunoso (PL), do mesofilo homogêneo (MH), da hipoderme da face abaxial (HAB), epiderme da face abaxial (EAB), da cutícula da face abaxial (CAB) e da espessura total da lâmina (LT). As medições foram realizadas em microscópio de luz óptico Olympus BX 41 com ocular milimetrada. As espessuras foram definidas pela média de três mensurações por folha. A espessura da cutícula foi classificada conforme proposto por MORRIS et al. (1996): pouco espessa (menor que 3 μm); moderadamente espessa (de 3-10 μm) e espessa (acima de 10 μm).

Para a análise qualitativa dos limbos, lâminas temporárias foram confeccionadas a partir de cortes à mão livre, corados com azul de astra e fucsina básica e montados em gelatina glicerinada; lâminas permanentes foram preparadas a partir do material processado e incluído em historresina (Leica®), segundo orientação do fabricante. As secções foram feitas em micrótomo de rotação com navalha de aço, com 5 μm de espessura. As lâminas foram coradas com azul de toluidina (O'BRIEN; MCCULLY, 1981). A análise e a descrição do material vegetal montado em lâmina foram realizadas através de microscópio de luz Axio Lab A1 Carl Zeiss, com câmera digital AxioCam ERc 5s acoplada. O material foi documentado através do software AxioVision.

A descrição das estruturas anatômicas foi realizada de acordo com Pridgeon (1982; 1986), Stern e Carlsward (2009) e Stern (2014).

3.3.5 Testes histoquímicos

Testes histoquímicos foram realizados em folhas frescas das três espécies com os reagentes lugol (JENSEN, 1962), sudan III (SASS, 1951), cloreto férrico (JOHANSEN,

1940), floroglucinol acidificado (FOSTER, 1949) e vermelho de rutênio (LANGERON, 1949) para verificação de presença de amido, substâncias lipofílicas, substâncias fenólicas, lignina e mucilagem, respectivamente. Presença de cristais de flavonoides foi avaliada através dos testes de solubilidade em hidróxido de sódio a 5% e insolubilidade em hidróxido de amônia (METCALFE; CHALK, 1979). Controles sem reagentes foram realizados para todas as análises.

3.3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD)

Para a análise química por CLAE-DAD foram coletadas três folhas de três representantes de cada espécie na B e I (1 folha/indivíduo/fitofisionomia), inicialmente para uma investigação dos perfis cromatográficos dessas espécies nas estações verão e inverno de 2013. A partir dessa análise preliminar foi verificado que *P. rubens* e *P. pachysepala* apresentaram perfis cromatográficos satisfatórios à presença de substâncias fenólicas e para essas espécies foram realizadas coletas em cada estação do ano de 2014, nos meses de janeiro (verão); maio (outono); julho (inverno) e outubro (primavera).

As folhas, após as coletas, foram fracionadas, secas em estufa a 48°C, até atingirem peso constante, pesadas em balança analítica AY220, Marte com $ie = 0,001g$, e submetidas à extração com metanol, sempre mantendo-se proporção de 100mg/ml, por três vezes consecutivas. O extrato bruto obtido após evaporação do solvente foi submetido à CLAE-DAD, em sistema acetonitrila:água e coluna de fase reversa, com análise realizada pela Plataforma Analítica de Farmanguinhos (FIOCRUZ-RJ).

Os extratos obtidos das amostras foram analisados no equipamento Shimadzu com duas bombas LC-10A, desgaseificador DGU-12A, injetor automático SIL-10AD, forno de colunas CTO-10A e detector por arranjo de diodos SPD-M10AVP. Os dados foram adquiridos por interface SCL-10A. Aquisição de dados e controle foram realizados pelo programa Shimadzu CLASS-VP versão 6.13 SP2. Foram injetados 5, 10 ou 20 μL de cada amostra em coluna Supelcosil – C18- 25 cm x 4,6 mm – 5 μm , na presença de coluna guarda do tipo supelcoguard, LC 18 – 2 cm. Foi utilizado um sistema com gradiente linear que consistiu de uma fase móvel: TFA 0,05% em água, iniciando a 5% de acetonitrila e em 60 min chegando a 65% de acetonitrila, 65% a 100% de acetonitrila (60 – 70 min), mantendo os 100% até 80 min. Foi realizado um monitoramento utilizando-se o detector UV em varredura

entre 200 a 400 nm, sendo selecionadas as leituras a 220, 270, 335 e 360 nm, das quais posteriormente foi priorizado para comparação química o comprimento de onda a 335 nm.

Para o isolamento da substância majoritária detectada em *P. pachysepala* foi obtido extrato bruto metanólico das folhas, do qual, por partição líquido/líquido, foi obtida a fração em acetato de etila com presença preponderante do flavonoide. Auxiliando este isolamento foram realizadas cromatografias em camada delgada, utilizando-se o revelador NP-PEG, na busca do flavonoide. Após seu isolamento, foram utilizadas análises espectrométricas na plataforma Analítica de Far-Manguinhos, FIOCRUZ-RJ, à saber: ultra-violeta, infravermelho, ressonância nuclear magnética de Hidrogênio e Carbono, além das técnicas bidimensionais de interação H-H e H-C

3.3.7 Quantificação de Clorofilas

Para a quantificação das clorofilas e testes histoquímicos foram coletadas: 1 folha de 3 indivíduos de cada espécie em cada fitofisionomia estudada (1 folha/indivíduo/fitofisionomia). Para determinação e extração das concentrações de clorofilas *a*, *b* e carotenoides, foram retirados discos foliares de uma folha de cada 3 indivíduos com diâmetro de 1,5 cm, pesados em balança analítica de precisão (Mettler Toledo AB204-S) e macerados em 25 mL de acetona 80% (v/v). Em seguida, o extrato foi filtrado e as leituras de absorvância das amostras foram realizadas em cubetas com auxílio de espectrofotômetro (Femto 700S), considerando-se a densidade ótica medida em comprimentos de onda de 663, 647 e 470 nm (LICHTENTHALER, 1987).

3.3.8 Cálculo do índice de plasticidade fenotípica

O índice de plasticidade fenotípica (IPF) foi calculado para cada uma das variáveis: morfológicas (m), anatômicas (a) e fisiológicas (f), e para cada grupo de variáveis (IP a, IP m e IP f), para as três espécies, comparando-se B e I, nas estações verão e inverno, de acordo com Valladares et al. (2000, 2006), onde: $IPF = (\text{máximo} - \text{mínimo}) / \text{máximo}$. O índice de plasticidade total para cada espécie foi calculado pela média entre IP a, IP m e IP f (VALLADARES et al., 2000).

O índice de plasticidade (IP) varia dentro de uma escala de 0 a 1, sendo consideradas muito plásticas as variáveis com $IP > 0,6$ e não plásticas, cujo IP é próximo de 0 (VALLADARES et al., 2006).

3.3.9 Análise estatística

Foram realizados os testes de Shapiro-Wilk, para averiguação da distribuição normal dos dados e o teste de Levene para averiguação da homocedasticidade das amostras. Quando a distribuição dos dados das amostras não foi normal e/ou as amostras dos grupos não foram homogêneas, aplicou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney (ZAR, 1984).

O nível de significância das variáveis quantitativas, morfológicas, anatômicas, fisiológicas e químicas de *H. coccinea*, *P. pachysepala* e *P. rubens* e variáveis climáticas, radiação solar global, temperatura e umidade relativa do ar, foi calculado para as respectivas estações do ano separadamente e em conjunto, somando os dados das estações, pelo teste t-student a 5% de significância. Os valores médios, respectivos desvios-padrão e coeficientes de variação de todas as variáveis foram calculados. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa STATISTICA 7.0 (StatSoft®).

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Aferições climáticas

Para o presente estudo foi necessário o detalhamento climático específico das fitofisionomias, por isso o uso da mensuração manual (aparelho Thal 300). As medidas climáticas pontuais efetuadas pelo Thal 300 necessitaram contextualização com medições mais periódicas, aferidas rotineiramente no PEIB, fornecidas por seus gestores. Entretanto, as medidas no PEIB, que se iniciaram em março de 2011, sofreram falhas e foram interrompidas em novembro de 2013. Como, as medidas com o Thal 300 foram realizadas entre julho de 2013 a maio de 2014, foi necessária a busca de dados climáticos periódicos na estação climatológica mais próxima, que foi a da Universidade Federal de Juiz de Fora. Assim, os dados climáticos obtidos a partir de 2011, tanto da UFJF quanto do PEIB, permitiram comparação e demonstraram maior amplitude de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação para o PEIB. Os dados pontuais obtidos pelo Thal 300, entre julho de 2013 e maio de 2014 demonstraram amplitudes mais próximas às medidas fornecidas pelo PEIB, como esperado. As medidas específicas das fitofisionomias (pelo Thal 300) se mostraram relevantes pelo comportamento climático coerente observado (Figuras 1 a 4).

De forma geral, comparando-se as condições climáticas registradas nas fitofisionomias referentes à B e I, observou-se que somente a variável radiação solar global apresentou média

maior (54,72 %) e estatisticamente significativa na B. As variáveis temperatura e umidade relativa do ar pouco se diferenciaram entre as duas fitofisionomias, não apresentando médias estatisticamente significativas, com a primeira apenas 5,31 % maior na B e a segunda 9,26 % maior no I (Figura 1 A-C; Tabela 1).

Ao se comparar as estações do ano quanto à radiação solar, a única estação em que não houve diferença significativa entre B e I foi o verão. Em todas as outras três estações, a radiação foi significativamente maior na B (Tabela 1).

Comparando-se as medidas aferidas pelo Thal 300 com as obtidas na estação climatológica de Juiz de Fora, observamos que os valores referentes à radiação no I se aproximaram aos de Juiz de Fora, mas os da B foram superiores. Em Juiz de Fora, no verão, comparando-se às demais estações, a radiação foi mais intensa, com exceção do ano de 2011 em que maior intensidade de radiação foi observada no inverno. No PEIB, maior intensidade da radiação foi observada no início da primavera na B e no outono no I. Adicionalmente, não houve diferença estatisticamente significativa da radiação solar entre as duas fitofisionomias (Figura 2).

Comparando-se os dados climáticos obtidos através do Thal 300 com os dados fornecidos pelo PEIB e pela estação climatológica da Universidade Federal de Juiz de Fora, quanto à temperatura e umidade relativa do ar, observam-se que os valores médios aferidos pelo Thal 300, foram similares às medidas climáticas fornecidas pelo PEIB. Os valores máximos e mínimos da temperatura e da umidade relativa do ar no PEIB oscilaram muito mais que em Juiz de Fora, onde foram mais constantes. Os valores obtidos pelo Thal 300 referentes à temperatura, foram mais próximos às temperaturas máximas no PEIB e os valores referentes à umidade, foram mais próximos das mínimas no PEIB (Figuras 3 e 4).

Dentre as quatro estações, as menores médias de umidade relativa do ar (37% na B e 39,23% no I), registradas pelo Thal 300, foram observadas no verão.

Entre março de 2011 a dezembro de 2013, a precipitação em Juiz de Fora foi similar à do PEIB, com exceção do período entre novembro e dezembro de 2011, em que precipitação no PEIB foi mais elevada. Neste mesmo período, a precipitação também foi maior quando comparada aos anos seguintes, contribuindo com anos de 2013 e 2014 mais secos no PEIB (Figura 5).

3.4.2 Descrição da morfologia externa e anatomia da lâmina foliar

3.4.2.1 *Hadrolaelia coccinea* (Lindl.) Chiron & V. P. Castro

Folha ovada, elíptica ou oblonga, carnosa, coriácea, glabra, com nervação paralelinérvea, séssil, cresce rente ao forófito, nanófila (dimensões 2,9-7,3 × 0,9-1,3 cm), com base e ápice arredondados, margem inteira e presença de pequena bainha (Figura 7A-C).

Em secção transversal, a folha apresenta cutícula espessa em ambas as faces da epiderme, sendo sempre mais espessa na face adaxial (Tabela 2, Figura 7D-E, G-H). A epiderme é uniestratificada em ambas as faces (Figura 7E, G-H), com as células apresentando espessamento das paredes periclinais na face adaxial (Figura 7D) e flanges cuticulares na face abaxial (Figura 7F, H).

Estômatos situam-se no mesmo nível das demais células epidérmicas. As células-guarda apresentam depósito de cutina nas paredes, representados por depósito de cutina, em contato com o ostíolo e a câmara subestomática (Figura 7H-I). Cristas estomáticas ocorrem sobre o poro estomático, formando uma câmara supraestomática (Figura 7H). Interna à epiderme, ocorre uma hipoderme parenquimatosa, com algumas células de parede esclerificada, com uma a duas camadas de células voltadas para a face adaxial e três a quatro camadas de células voltadas para a face abaxial (Figura 7D-E, J). Os espessamentos esclerificados são em forma de “U” (Figura 7D) ou tendem a encobrir por completo algumas células da hipoderme abaxial (Figura 7E). O mesofilo é dorsiventral, com parênquima paliçádico constituído por aproximadamente oito camadas de células e o parênquima lacunoso por sete camadas de células (Figura 7J). Células esclerificadas de origem pericíclica e agrupamentos de fibras ocorrem associados ao floema dos feixes vasculares colaterais (Figura 7K), que estão alinhados na região central do mesofilo (Figura 7J), próximos ao parênquima lacunoso e entremeados na hipoderme da face abaxial (Figura 7E, I).

A folha é hipoestomática e, em vista frontal observam-se estômatos tetracíticos ou, raramente, anomocíticos (Figura 7M). Em ambas as faces da folha, as células epidérmicas apresentam formato poligonal, com parede anticlinal reta (Figura 7L-N). Na face abaxial observam-se pontos entre as células, que representam as flanges cuticulares da parede anticlinal (Figura 7N).

3.4.2.2 *Prosthechea pachysepala* (Klotzsch) Chiron e V. P. Castro

Folha elíptica ou oblonga, coriácea, glabra, ereta, notófila (dimensões 24 cm x 4,5 cm), com base levemente atenuada, ápice agudo e levemente revoluto, margem inteira, com coloração verde-escura e presença de bainha. Apresenta duas a quatro folhas apicais, com filotaxia oposta cruzada (Figura 8A-C).

Em secção transversal, a folha apresenta cutícula moderadamente espessa em ambas as faces da epiderme com a espessura da cutícula da face adaxial sempre maior que a da face abaxial. A epiderme é uniestratificada, com células mais altas na face adaxial (Tabela 3; Figura 8D-E). Na região da nervura central, interna à epiderme da face adaxial há uma hipoderme aquífera, constituída por células anticlinalmente alongadas que se conectam à endoderme do feixe vascular colateral de maior calibre, seguida por um mesofilo homogêneo (Figura 8F, K-L). Agrupamento de fibras ocorre associado ao floema dos feixes vasculares colaterais de maior e menor calibres (Figura 8F-G) e isolado, na intersecção da hipoderme e do mesofilo próximo à face abaxial e no mesofilo próximo à face abaxial (Figura 8E-F).

A folha é hipoestomática, e através de corte paradérmico observam-se estômatos tetracíticos ou, raramente, anomocíticos (Figura 8J). Em ambas as faces da folha, as células epidérmicas apresentam formato poligonal, com parede anticlinal reta a levemente ondulada (Figura 8H-J). Cristais de flavonoides estão presentes em abundância em ambas as faces da epiderme e por todo mesofilo (Figura 8D, I, K).

3.4.2.3 *Pleurothallis rubens* Lindl.

Folha elíptica-oblonga ou abovada, carnosa, mais ou menos coriácea, séssil, ereta, micrófila (dimensões 9-15 × 3-4 cm), com base obtusa, ápice arredondado, margem inteira, com coloração verde-claro (Figura 9A-C).

Em secção transversal, a folha apresenta cutícula espessa em ambas as faces da epiderme, sendo mais espessa na face adaxial (Tabela 4; Figura 9D-E). A epiderme é uniestratificada e apresenta, em ambas as faces, depressões semelhantes à inserção de tricomas (Figura 9F, H). Alguns estômatos estão situados em um nível abaixo das demais células epidérmicas, apresentam câmara subestomática e células-guardas constituídas de cristas estomáticas com formação de câmara supraestomática (Figura 9E, G). As células guardas e as células subsidiárias apresentam reforço de cutina nas paredes voltadas para as câmaras supra e subestomática (Figura 9E). Interna à epiderme, em ambas as faces, ocorre uma hipoderme aquífera com células envoltas por barras de espessamento de natureza

celulósica (Figura 9G-I). A hipoderme da face adaxial apresenta seis camadas de células com formato alongado intercalado com células de formato arredondado e a hipoderme da face abaxial é constituída por apenas uma camada de células alongadas (Figura 9H). Entre as hipodermes há um mesofilo homogêneo, com células isodiamétricas (Figura 9F-H). Feixes vasculares do tipo colateral e feixes vasculares menores encontram-se envoltos por células esclerificadas e estão alinhados na região central do mesofilo (Figura 9G-H).

A folha é hipoestomática, e através de corte paradérmico observam-se estômatos tetracíticos (Figura 9L). Em ambas as faces, as células epidérmicas apresentam formato poligonal, com parede anticlinal reta (Figura 9J-L) e ocorrem cicatrizes, aparentemente resultantes da presença de tricomas (Figura 9K).

3.4.3 Testes histoquímicos

Os testes histoquímicos foram positivos para ligninas, destacando-se grupos de fibras e espessamentos secundários das paredes de algumas células da hipoderme de *H. coccinea* com floroglucinol acidificado (Figura 7E), e para as substâncias lipofílicas, destacando-se a cutícula com sudan III (Figuras 7 G-I e 9D-E).

Confirmou-se, através da solubilidade em hidróxido de sódio a 5% e da insolubilidade em hidróxido de amônia, que as estruturas cristalíferas de *P. pachysepala* são cristais de flavonoide, os quais apresentam-se distribuídos por toda a lâmina foliar (Figura 8D, I, K).

3.4.4 Respostas biótico-quantitativas

Comparando-se as respostas obtidas para *H. coccinea*, *P. pachysepala* e *P. rubens* na B e no I, nas estações verão e inverno, constatou-se que cada uma destas espécies apresentaram estratégias diferenciadas quanto às variáveis morfológicas externas e internas, fisiológicas e químicas, não sendo possível definir um padrão de resposta comum às três espécies (Tabelas 2, 3 e 4).

Comparando-se a B e o I como uma análise geral, ou seja, considerando-se os valores obtidos a partir das coletas de verão e inverno, conjuntamente, *H. coccinea* e *P. pachysepala* apresentaram respostas similares para as variáveis AFE, MEF, CAD, HAD, PP, MH e LT, todas, com exceção de AFE, com valores maiores e estatisticamente significativos na B. *Pleurothallis rubens* não apresentou diferenças significativas para nenhuma variável analisada entre B e I.

Entre *H. coccinea* e *P. pachysepala*, respectivamente, a AFE foi significativamente maior 43,42% e 43,04% no I; a MFE foi significativamente maior 71,43% e 50% na B; a espessura da CAD foi significativamente maior 27,78% e 30,71% na B; a espessura da HAD foi significativamente maior 31,13% e 29,09% na B; a espessura do PP foi 30,26% e a espessura do MH foi 13,29% maiores na B e a espessura da LT foi significativamente maior 21,97% e 14,87% na B.

Hadrolaelia coccinea apresentou diferenças significativas, entre B e I, além das anteriormente citadas, também para MS, HAB, ABE e CAB, sendo CAD, HAD, PP, ABE e LT também significativamente diferentes nas duas estações. A variável AF apresentou diferenças significativas somente no verão. As variáveis conteúdo de Cl *a* e Cl *t/carot* apresentaram diferenças significativas somente no inverno. Houve diferenças significativas apenas nas estações verão e inverno para o conteúdo de Cl *b* (Tabela 2).

Prosthechea pachysepala apresentou diferenças significativas entre B e I, além das anteriormente citadas, também para MS, TMS, CA, AF, DE e *Carot*, sendo que as variáveis TMS, AFE, MEF, HAD e LT apresentaram diferenças significativas também nas duas estações. A espessura da ADE apresentou diferença significativa somente no verão (Tabela 3).

Pleurothallis rubens apresentou diferenças significativas apenas no inverno para TMS, AFE, MFE, ADE e DE (Tabela 4).

3.4.5 Produção de metabólitos especiais

Dentre as diferentes substâncias detectadas a partir das análises no sistema cromatográfico empregado, destacou-se o grupo químico dos flavonoides em *P. pachysepala* e *P. rubens* (Figuras 10 e 11). *Hadrolaelia coccinea* não apresentou perfil cromatográfico relevante em relação a substâncias detectadas nas três repetições dentre as fitofisionomias comparadas.

Comparando-se os ambientes de B e I, desconsiderando-se as épocas de coleta, na B foi encontrado maior teor de flavonoides, porém sem diferenças significativas para *P. pachysepala* e *P. rubens*.

Comparando-se a síntese de flavonoides entre B e I, nas quatro estações analisadas, diferenças significativas foram observadas apenas nas estações verão e inverno, com maiores produções no I e B, respectivamente, para *P. pachysepala* e o contrário para *P. rubens* (Tabela 5).

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , além das técnicas bidimensionais de interação H-H e H-C permitem afirmar que o flavonoide isolado de *P. pachysepala* é uma flavona C-glicosilada (dados não publicados) e que o mesmo corresponde à substância majoritária detectada nesta planta por CLAE.

3.4.6 Índice de plasticidade fenotípica

Os resultados referentes ao cálculo do índice de plasticidade fenotípica (IPF) para *H. coccinea*, *P. pachysepala* e *P. rubens* indicaram que entre as três espécies, a que apresentou maior plasticidade fenotípica para os três grupos de variáveis analisadas, morfológicas, anatômicas e fisiológicas, foi *H. coccinea* (IP=0,31), seguida de *P. pachysepala* (IP= 0,23) e de *P. rubens* (IP = 0,14). O índice geral de plasticidade das três espécies foi 0,22 (Tabela 6).

Em todas as espécies, as variáveis anatômicas foram as menos plásticas quando comparadas aos outros grupos de variáveis. Para *H. coccinea* e *P. rubens*, tem-se: $\text{IP a} < \text{IP m} < \text{IP f}$ e para *P. pachysepala* tem-se: $\text{IP a} < \text{IP f} < \text{IP m}$.

Pleurothallis rubens foi a espécie que apresentou o maior número de variáveis não plásticas (com $\text{IP} < 0,1$), sendo elas: GS, HAD, MH, ABE, LT, *Cl a* e *Cl t*. Em seguida, destacou-se *P. pachysepala* com as seguintes variáveis não plásticas: GS, ADE, ABE e *Cl t/carot*. E *H. coccinea* apresentou como variáveis não plásticas apenas ADE e DE.

3.5 DISCUSSÃO

Dentre as três variáveis climáticas analisadas, a radiação foi a que, possivelmente, mais influenciou nas respostas adaptativas das três espécies de orquídeas nas fitofisionomias correspondentes à B e ao I. Resultados semelhantes a este foram constatados em dois estudos sobre efeito de borda e sua influência no microclima e nas características morfológicas externas, anatômicas e fisiológicas das folhas de *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae), localizadas em uma floresta estacional semidecidual no Sul de Minas Gerais (MELO et al., 2013) e de *Polylepis cuadrijuga* Bitter (Rosaceae), localizadas no Páramo de la Rusia na Colombia (RAMOS et al., 2013). Nesses estudos, a umidade do ar não variou significativamente entre as áreas estudadas e a temperatura variou apenas no segundo trabalho. Valladares et al. (2000), Kelly et al. (2009) e Mengarda et al. (2012) avaliaram a

influência dos fatores ambientais nas respostas adaptativas das plantas e a luz foi o fator que influenciou significativamente nessas respostas, resultados semelhantes ao do presente estudo.

Como resposta à fitofisionomia com maior intensidade luminosa, as três espécies de orquídeas apresentaram maiores valores médios para CAD, ADE, PP, MH, CAB e LT na B. Esse incremento no acúmulo de tecidos foliares como uma resposta das plantas ao ambiente com maior luminosidade foi comprovado nos estudos de Fermino Jr. et al. (2004), Lima Jr. et al. (2006), Pereira et al. (2009), Craven et al. (2010) e Rossato e Kolb (2010).

No verão, a ausência de diferença significativa na luminosidade entre as fitofisionomias foi, possivelmente, devido ao fato de que nessa época, parte da vegetação semidecíduifólia das nanoflorestas (OLIVEIRA-FILHO, 2009) torna-se mais densa, com possibilidades de aumento no sombreamento também na B, aproximando-se o nível de irradiância entre os dois ambientes. Essa observação está de acordo com um estudo sobre fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do Sudeste do Brasil, no qual constatou-se que a produção de folhas obteve valores máximos no período mais úmido, entre novembro e março, acima de 80% das espécies (TALORA; MORELLATO, 2000).

Na primavera, os maiores valores médios de radiação obtidos podem ter relação com a fenologia das espécies que, nessa época do ano, provavelmente, ainda não recuperaram por completo a reposição das folhas perdidas na estação anterior e estão investindo energia na reprodução, através da produção de flores, que na maior parte das espécies arbóreas de formação secundária da Floresta Atlântica ocorre no período de outubro a janeiro (REITZ et al., 1978; LORENZI, 1992; CARVALHO, 1994; LORENZI, 1998; MANTOVANI et al., 2003). Tais condições aumentam a possibilidade de menos folhas no dossel, contribuindo com maior incidência de luz nestas fitofisionomias.

Registros realizados pela estação meteorológica do PEIB, no ano de 2002, mostraram que a média das temperaturas mínimas foi 11,75°C e das máximas foi 25,5°C (DIAS et al., 2002), enquanto que as médias aferidas no período de 2011 a 2013, foram 13°C e 28°C, respectivamente. De acordo com esses dados, ocorreu um aumento da temperatura média no PEIB de aproximadamente de 1,25 a 2,5 graus em dez anos. Se esse aumento da temperatura no PEIB for uma consequência do aquecimento global, o que demandaria um monitoramento mais detalhado das condições climáticas por um período de tempo maior, a fauna e a flora dessa unidade de conservação poderão sofrer sérios riscos de sobrevivência, pois, segundo Salis et al. (1995), espécies típicas de áreas mais elevadas da Floresta Atlântica da Região Sudeste do Brasil tenderiam a desaparecer como consequência das mudanças globais referentes à elevação da temperatura.

As menores médias de umidade relativa do ar (37% na B e 39,23% no I), registradas no verão, pelo Thal 300, encontraram correspondência com as menores taxas pluviométricas registradas pelo PEIB, entre novembro de 2013 a janeiro de 2014, em comparação ao ano anterior. Considerando, que o clima característico da região do PEIB apresenta verões amenos e regimes de precipitação com ciclos bem definidos, com verão chuvoso e inverno seco, sendo junho, julho e agosto os meses mais secos e novembro, dezembro e janeiro os mais chuvosos, com precipitações médias anuais de 1.395 mm (KÖPPEN, 1948), no período de realização deste trabalho, ocorreu uma seca atípica no verão, influenciando em maiores médias para temperatura nessa estação, em relação às outras, e em médias muito baixas para umidade relativa do ar, mesmo no I.

Hadrolaelia coccinea e *P. rubens* apresentaram, de forma mais expressiva, caracteres xeromorfos como uma resposta ao déficit hídrico associado ao hábito de vida epifítico obrigatório (ZHANG et al., 2005; HAO et al., 2010; WATKINS; CARDELÚS, 2012) em que se encontravam nas fitofisionomias estudadas do PEIB. Os caracteres xeromorfos se expressaram morfológicamente pelo tamanho reduzido das folhas, nanófilas, em *H. coccinea*, e micrófilas, em *P. rubens*; pela suculência e pelos altos valores da espessura da lâmina foliar (Tabelas 2, 4). Em nível anatômico, os caracteres xeromorfos de destaque foram a presença de cutícula espessa em ambas as faces da epiderme, estômatos com câmaras supraestomática, e em comum com *P. pachysepala*, apresentaram hipodermes, agrupamento de fibras no mesofilo, e folha hipoestomática, características comuns às orquídeas e/ou xerófitas investigadas nos trabalhos de Arditti (1992), Fahn e Cutler (1992), Scatena e Nunes (1996), Oliveira e Sajo (1999a), Silva e Milaneze-Gutierrez (2004), Smidt et al. (2013), Durmuşkahya et al. (2015) e Piazza et al. (2015).

A hipoderme de *H. coccinea* é esclerificada, enquanto nas outras duas espécies ela é aquífera, e em *P. rubens* a hipoderme é constituída de células envoltas por barras de espessamento de natureza celulósica. Dentre os caracteres vegetativos de maior importância taxonômica para as espécies de Pleurothallidinae, subtribo a qual pertence *P. rubens*, estão os idioblastos de paredes espessadas no mesofilo das folhas (PRIDGEON, 1982), os quais são amplamente observados em Orchidaceae (FOSTER, 1956; OLATUNJI; NENGIM, 1980; FERREIRA, 1992; SCATENA; NUNES, 1996; GRAVENDEEL et al. 2014; STERN, 2014; PIAZZA et al., 2015). Para as espécies de *Pleurothallis*, é comum a diferenciação do tipo e da composição química desses espessamentos, com possibilidades de serem utilizadas na taxonomia do grupo. Em *Pleurothallis smithiana* Lindl., o parênquima do velame apresentou idioblastos com espessamento de parede secundária, representado por linhas largas

(OLIVEIRA; SAJO, 1999b) e em *Pleurothallis rupestris* Lindl., o parênquima aquífero, que conferiu aspecto suculento à folha, apresentou idioblastos com espessamentos helicoidais de lignina (SCATENA; NUNES, 1996). Em contraposição, em *P. rubens* não foi identificado um parênquima clorofiliano aquífero, mas sim uma hipoderme aquífera (pela ausência de cloroplastos nessa estrutura), com células constituídas de barras de espessamento de natureza celulósica, uma vez que esse espessamento não reagiu positivamente ao teste histoquímico com floroglucinol acidificado e, na dupla coloração, não corou com fucsina básica. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles observados nas orquídeas investigadas por Ferreira (1992) para o tipo de espessamento, que igualmente não foi denominado helicoidal (porque os espessamentos não têm distribuição em espiral) e por Pridgeon (1982), para natureza celulósica do espessamento. As possíveis funções exercidas por esses espessamentos são a retenção de água e/ou o suporte mecânico do mesófilo, evitando o colapso celular durante a dessecação (OLATUNJI; NENGIM, 1980; PRIDGEON, 1982; HOLTZMEIER et al. 1998).

Outra característica de importância taxonômica para Pleurothalidinae, observada em *P. rubens*, foi a presença de cicatrizes na superfície foliar (PRIDGEON, 1982), que podem representar vestígios de tricomas efêmeros (têm sua célula basal despreendida da epiderme na folha jovem, permanecendo visível na folha madura apenas uma ligeira descoloração), semelhantes aos constatados por Pridgeon (1982), em folhas jovens de *Pleurothallis alexandrae* Schltr., e por Piazza et al. (2015), em folhas jovens de *Bulbophyllum* seção *Didactyle* (Lindl.) Cogn. e *Bulbophyllum* seção *Xiphizusa* Rchb.f. A ocorrência de tricomas foliares para Orchidaceae foi verificada em algumas subtribos da subfamília Epidendroideae, como Pleurothalidinae (BENZING; PRIDGEON, 1981; 1982; 1983; SCATENA; NUNES, 1996; SILVA et al., 2006) e Dendrobiineae (MORRIS et al., 1996), e em alguns gêneros, como *Maxillaria* (HOLTZMEIER et al., 1998), *Stanhopea* (STERN; WHITTEN, 1999) e *Bulbophyllum* (MOHANA RAO; KHASIM, 1987; SMIDT et al., 2013). Sua função de secreção foi sugerida por Pridgeon (1981) e Holtzmeier et al. (1998), sendo que Piazza et al. (2015) confirmaram secreção de polissacarídeos totais pelas células apicais. Sua presença somente na folha jovem e a queda na folha adulta, reforçam a função adicional de proteção contra a desidratação (FAHN, 1986; MAYEKISO et al., 2008; VENTRELLA; MARINHO, 2008).

Prosthechea pachysepala não é uma epífita obrigatória (HIGGINS, 2003), o que, provavelmente, contribuiu para expressão mais sutil dos caracteres xeromorfos em relação às espécies anteriores, evidenciados pelo desenvolvimento, por exemplo, de cutículas

moderadamente espessas, folhas notófilas e mais delgadas. Por outro lado, essa espécie apresentou agrupamento de fibras no mesofilo, semelhante às duas espécies supracitadas e hipoderme aquífera como em *P. rubens*.

A presença de parênquima esclerificado em *P. pachysepala* e em *H. coccinea*, é, provavelmente, uma consequência relacionada ao hábito de vida epifítico dessas espécies no PEIB, devido à escassez de água e de nutrientes (HANDRO, 1966; HARIDASSAN, 2000). Nessas espécies, observa-se um investimento energético, na construção de uma parede secundária lignificada espessada, representado pela abundância de grupos de fibras distribuídos no mesofilo foliar e associados aos feixes vasculares das folhas, peculiaridades que distinguem a maioria das Epidendroideae, subfamília a que pertencem as orquídeas analisadas no presente estudo (PRIDGEON et al., 1999, 2005). O reforço de lignina contribui para a manutenção da estrutura foliar nos períodos de déficit hídrico (TURNER, 1994; BOUDET, 1998), que em *P. rubens* foi possibilitado pela predominância do parênquima aquífero que mantém a turgidez das células a partir do espessamento celulósico.

O reforço de lignina contribui também para uma tendência ao escleromorfismo. Contudo, tomando-se por base o índice de esclerofilia adotado por Rizzini (1976), nenhuma das espécies estudadas é considerada esclerófila, sendo *H. coccinea*, dentre as três, a que apresentou maiores índices para essa característica. Ao estudarem a anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl., Zanenga-Godoy e Costa (2003) observaram feixes vasculares colaterais, acompanhados por bainha de fibras e também relacionaram esse fato à adaptação dessas plantas à economia de água. A presença de esclerênquima está ainda associada à conservação de nutrientes na planta, à prevenção de danos, ao crescimento lento e à longevidade das folhas (TURNER, 1994; CORNELISSEN et al., 2003; WYKA et al., 2007; LAUGHLIN et al., 2012), o que também se observou para *H. coccinea*, com indivíduos no PEIB que podem portar folhas produzidas há mais de quinze anos (L. MENINI NETO, comunicação pessoal).

Todas as espécies incluídas nesse estudo apresentaram folhas hipoestomáticas, uma característica vantajosa para o hábito de vida epifítico das orquídeas estudadas neste trabalho, pois contribuem para diminuição das taxas de evapotranspiração, por estarem os estômatos mais protegidos na folha (DICKISON, 2000). Tanto na B como no I, as folhas das três espécies estudadas foram hipoestomáticas, associando esta característica mais a um padrão geneticamente fixado, de valor taxonômico, do que a uma resposta ecológica. A mesma observação foi obtida para as microorquídeas *Ornithocephalus* e *Psygmorchis* Dodson & Dressler, em que o caráter hipoestomático encontrado foi considerado um fator endógeno das

plantas, sendo, portanto, independente das condições ambientais a que elas estavam sujeitas (COLLETA; SILVA, 2008). A mudança no posicionamento dos estômatos entre as faces foliares, em resposta a variações ambientais, parece ocorrer somente em espécies que apresentam alta capacidade de adaptação, como observado em um estudo de ecoanatomia foliar de espécies arbóreas árvores e arbustos dos distritos Chaqueños e Serranos da Argentina, em que *Lycium cestroides* Schldl. (Solanaceae) desenvolveu folhas hipostomáticas ou anfiestomáticas, como adaptação a ambiente temperado úmido ou a subtropical seco, respectivamente (ARAMBARRI et al., 2011).

Os estômatos de Orchidaceae foram identificados como anomocíticos, tetracíticos, actinocíticos, anisocíticos, paracíticos ou ciclocíticos (WILLIAMS, 1979; PRIDGEON, 1982; RASMUSSEN, 1987; SCATENA; NUNES, 1996; ZANENGA-GODOY; COSTA, 2003; SILVA et al. 2006; SEIXAS et al., 2012). Contudo, a condição tetracítica, encontrada no presente trabalho, é padrão para numerosas famílias de monocotiledôneas (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELO-GUERREIRO, 2003), sendo esse tipo de estômato comumente diagnosticado nas mais diversas orquídeas estudadas por Moreira et al. (2013) e Smidt et al. (2013), Gravendeel et al. (2014) e Piazza et al. (2015).

Observou-se, no presente trabalho, que a média de estômatos encontrada nas folhas de *H. coccinea* foi de 6,31; nas folhas de *P. rubens* foi de 2,74 e nas folhas de *P. pachysepala* foi de 10,15. Entre as três espécies, a média encontrada para *P. rubens* foi a mais baixa, o que relaciona-se ao caráter mais suculento de suas folhas, resultante da hipoderme aquífera espessa que ocupou 76,45 % do limbo foliar. Esses resultados corroboram a densidade estomática comumente encontrada para espécies de Orchidaceae, em que o número médio de estômatos por unidade de área (mm^2) varia numa faixa de 2–17 (SINGH; SINGH, 1974), e que, especificamente, as espécies xerófitas suculentas possuem menos estômatos por unidade de área em relação às não suculentas (FAHN; CUTLER, 1992).

A suculência apresentada por algumas orquídeas é comumente relacionada à fotossíntese CAM (metabolismo ácido das crassuláceas), como observado em espécies de *Bulbophyllum* e *Dendrobium* (WITHNER et al., 1974). As epífitas *H. coccinea* e *P. rubens* apresentaram graus de suculência 84,78% e 71,74% maiores em relação a *P. pachysepala*, além de caracteres anatômicos foliares relacionados ao xerofitismo, como cutículas e folhas espessas e formação de câmaras supraestomáticas, que auxiliam no aumento da resistência à perda d'água pela via epidérmica (KRAMER; KOZLOWKSI, 1979; TURNER; KRAMER, 1980; SALISBURY, 1996; LARCHER, 2000).

Apesar de, no presente estudo, não terem sido realizados estudos específicos para se confirmar o tipo de fotossíntese realizado por essas espécies, Widholzer e Oliveira (1994) consideram *H. coccinea* uma orquídea do tipo CAM. Esse mecanismo fisiológico pode atuar como uma via alternativa em períodos de déficit hídrico, levando em consideração ainda que, entre 50 a 60% das Orchidaceae epífitas apresentam esse tipo de metabolismo (LARCHER, 2000), e nas florestas úmidas, como é o caso das nanoflorestas nebulares do PEIB, Orchidaceae possui um grande número de gêneros com representantes CAM (MEDINA, 1996). Por serem as plantas CAM especialmente adaptadas a ambientes áridos, essa suposição encontra respaldo ainda no fato de que, além das epífitas viverem em condições microclimáticas que muito facilmente tornam-se áridas (COUTINHO, 1964; LÜTTGE, 1997), o PEIB, geralmente, apresenta temperaturas diurnas elevadas que declinam bruscamente durante a noite, o que torna vantajosa a abertura dos estômatos dessas espécies no turno noturno, evitando o ressecamento foliar pelo excesso de perda de água por transpiração em períodos quentes do dia (GRAVENDEEL et al., 2004; LÜTTGE, 2004; SCATENA; SEGECIN, 2005).

Em resposta aos testes histoquímicos, a presença de idioblastos contendo cristais de flavonoides destacou-se em *P. pachysepala*. Estruturas muito similares a esses cristais foram observadas na epiderme e no parênquima das folhas e na espata de *Anthurium gracile* (Rudge) Lindl. e *Anthurium minarum* Mayo & Sakuragui (Araceae), sendo que testes histoquímicos identificaram a diosmina, como o flavonóide preponderante na composição química desses cristais (MANTOVANI et al., 2010). Apesar de não pertencerem à Orchidaceae, a similaridade entre essas espécies e *P. pachysepala*, quanto a presença dos cristais, demonstra certa convergência evolutiva (indicando, por exemplo, alguma função protetora desses cristais), considerando, ainda, que *A. minarum* também ocorre no mesmo tipo de ambiente, sendo, inclusive, uma espécie epífita facultativa nas nanoflorestas do PEIB. Oliveira-Pires et al. (2003), estudando a anatomia das folhas e raízes de espécies de *Prosthechea* sp. (Orchidaceae), citaram a presença de estruturas cristalinas morfológicamente semelhantes às que Mantovani et al. (2010) se referiram, denominando-as cristais de flavonoides.

No presente trabalho, o isolamento do flavonoide de *P. pachysepala*, permitiu a identificação de uma flavona C-glicosilada (dados não publicados), ainda em fase de elucidação estrutural. Esse procedimento permitiu a afirmação de que se trata de grupo químico flavonoídico, já que apenas a análise por CLAE com detecção por UV não permitiria essa afirmação. Bhattacharyya et al. (2006) isolou vitexina, uma flavona C-glicosilada, do extrato hidroalcoólico da orquídea *Encyclia longifolia* Schltr., encontrada em áreas costeiras

do leste do Brasil. Flavonoides pertencentes ao grupo das vitexinas são comumente encontrados em Orchidaceae (WILLIAMS, 1979). A presença desse flavonoide em *P. pachysepala*, no presente estudo, foi supostamente relacionada à função de defesa contra herbivoria, o que corrobora um estudo de anatomia de folha e raiz de *Prosthechea moojenii* (Pabst) W. E. Higgins e *P. silvana* Cath. & V. P. Castro (SEIXAS et al., 2012). Cristais de flavonoides também apresentam importância taxonômica e no estudo de Oliveira-Pires et al. (2003), sua presença/ausência foi usada para separar os gêneros, *Encyclia* e *Prosthechea*, ambos pertencentes à subfamília Epidendroideae, sendo sua presença diagnosticada para *Prosthechea* sp.

Comparando-se as respostas adaptativas das orquídeas aos ambientes de B e I, observaram-se, para a maioria das variáveis analisadas, respostas similares quanto às estações e à análise geral (considerando-se os valores obtidos a partir das duas coletas). Dessa forma, maior ênfase foi dada na discussão para as variáveis que encontraram-se nessa última situação.

As respostas similares para *H. coccinea* e *P. pachysepala* quanto AFE, MFE, CAD, HAD, PP, MH e LT demonstraram que, além dessas espécies compartilharem estratégias ecológicas em comum, o que segundo Cornelissen et al. (2003) configura tipos funcionais iguais, esses atributos foram mais eficientes para compreensão das adaptações destas plantas nos ambientes de estudo.

Os maiores valores (estatisticamente significativos) para as variáveis AF e AFE no interior da floresta indicam que, em condições de maior sombreamento, uma folha mais larga confere maior eficiência na captação de fótons e, conseqüentemente, maior abastecimento de energia luminosa para os processos fotossintéticos da planta (SOUZA; VÁLIO, 2003; DUZ et al., 2004; ALERIC; KIRKMAN, 2005; LICHTENTALER et al., 2007; KELLY et al., 2009; FINI et al., 2010). AEF representa a proporção entre a superfície de captura de luz construída pela planta e o investimento por unidade de massa seca foliar, sendo essa relação dependente do tamanho da folha (PAN et al., 2013). Dessa forma, maiores valores para AFE são geralmente associados a uma alta taxa de crescimento relativo do vegetal (HUNT; CORNELISSEN, 1997), e quando acompanhados por menores espessuras da LT, como ocorreu em *P. pachysepala*, sugerem estratégia de crescimento mais rápido, com menores tempo de vida e alocação de tecido para adquirir energia em curto período de tempo, favorecendo a herbivoria (REICH et al., 1997).

Em um estudo conduzido em Roma, sob condições climáticas típicas do Mediterrâneo, em que se compararam as respostas adaptativas de folhas de três espécies de arbustos de

Cistus, que apresentavam dimorfismo foliar sazonal, maiores valores médios para AF e para AFE foram constatados na estação chuvosa, correspondente ao inverno no mediterrâneo (CATONI et al., 2012). A maior disponibilidade hídrica contribui para maior expansão foliar, diminuindo a suscetibilidade de danos ao aparato fotossintético, decorrentes de processos de evapotranspiração mais intensos, com maior possibilidade de investimento na construção de massa verde foliar (GRATANI; VARONE, 2004).

A MFE é uma variável morfológica que pode representar o desenvolvimento de esclerênquima e está diretamente relacionada à maior disponibilidade de luz no ambiente de crescimento e desenvolvimento das folhas (EVANS; POORTER, 2001; ARANDA et al., 2004; VENEKLAAS; OUDEN, 2005; STERCK et al., 2006; SANCHES et al., 2009; LIMA et al., 2010). Dessa forma, as alterações estruturais foliares expressas por esse atributo – maior massa seca e menor área foliar (Tabelas 2, 3 e 4), estão entre os principais componentes para se interpretar a aclimação dos vegetais às condições de sol e sombra (ARANDA et al., 2004; FENG et al., 2004). Como o esclerênquima exerce a função principal de suporte aos outros tecidos foliares, prevenindo-os de possíveis danos causados por colapso celular devido à dessecação que as plantas expostas à maior aridez enfrentam (METCALFE; CHALK, 1979), a tendência é que esses tecidos sejam sintetizados em maior quantidade em ambientes sujeitos à maior radiação, como na B. Alto valor de MFE (expresso pelo MS/AF) ocorreu em consequência da diminuição da AF e aumento da LT no ambiente de B. Essa estratégia foi adotada para se aumentar a quantidade e a eficiência do aparato fotossintético por unidade de área, representado pelos mais espessos PP em *H. coccinea* e MH em *P. pachysepala*, também na B, através de melhor regulação da difusão luminosa e gasosa dentro da folha (DICKISON, 2000; POORTER, 2001; ARANDA et al., 2004; TERASHIMA et al., 2006; ROSSATTO; KOLB, 2010).

A maior quantidade de lignina em *H. coccinea*, na B, é uma consequência dos maiores valores para HAD e HAB neste ambiente, já que a hipoderme é esclerificada em ambas as faces. O desenvolvimento de uma hipoderme mais espessa, nesse caso, além de conferir maior sustentação à folha, possivelmente, esteja relacionada à maior proteção ao clorênquima contra a foto-oxidação das clorofilas, por causa da radiação solar mais intensa.

A hipoderme de *P. pachysepala*, que é aquífera, teve seu maior desenvolvimento na B, pois a probabilidade de sofrer dessecação nesse ambiente, devido à maior radiação, é elevada, sendo o acúmulo de água nas folhas vantajoso nesse local. As epífitas são dependentes de chuvas esporádicas para o suprimento hídrico em seu *habitat* natural, de modo que, para sobreviverem ao estresse dos períodos secos, desenvolvem geralmente um parênquima

aquífero (ABRAHAN; VATSALA, 1981; FERREIRA et al., 1994), que, por sua vez, também pode-se relacionar ao metabolismo do tipo CAM, conferindo um local específico para armazenar o ácido málico que é produzido durante a noite, sem alterar o pH das células (WIDHOLZER; OLIVEIRA, 1994; LÜTTGE, 2004). A hipoderme de *H. coccinea* é esclerificada, porém essa espécie apresenta mesofilo de grande proporção. Dessa forma, as espécies estudadas apresentam estratégias diferenciadas quanto à sustentação, com relevância de parênquima esclerificado, em *H. coccinea*, parênquima armazenador de água, em *P. pachysepala* e espessamentos celulósicos nos idioblastos de *P. rubens*.

Cutícula mais espessa nas folhas das plantas de *H. coccinea* e *P. pachysepala* localizadas na B está relacionada à fotoproteção e, devido à sua natureza lipídica, contribuiu adicionalmente para minimizar a perda excessiva de água por transpiração, representando uma barreira hidrofóbica, como um importante mecanismo de tolerância ao déficit hídrico, mais propício em ambientes com maior radiação (METCALFE; CHALK, 1979; CUTTER, 1987; MAUSETH, 1988; FAHN; CUTLER, 1992; FAHMY, 1997; LARCHER, 2000; HLWATIKA; BHAT, 2002; CASTRO et al., 2009).

As variáveis anatômicas CAD, HAD, PP, ABE e LT podem ser consideradas mais representativas quanto à adaptação de *H. coccinea* nos ambientes de estudo, pois, quando comparadas, variaram, igualmente, nas duas estações e reforçaram o mesmo resultado quanto à análise conjunta.

Em *H. coccinea*, as maiores espessuras do PP e da ABE, nas folhas da borda, refletiram em maior espessura da LT. As médias das espessuras da LT, encontradas para *H. coccinea* e *P. rubens*, foram similares entre si e superiores à LT de *P. pachysepala* e de outras plantas xerófilas, que variaram, em média, entre 0,273 a 0,578 mm (SOBRADO; MEDINA, 1980; MEDINA et al., 1990; TURNER et al., 1995). Em ambientes sujeitos à maior radiação, como a B, o incremento de PP indica maior investimento na construção de tecidos fotossintetizantes, o que contribui para maior eficiência fotossintética pela capacidade de fixação de maior quantidade de CO₂ (CASTRO et al., 2009), aumentando as chances de sobrevivência e reprodução da planta.

Células epidérmicas maiores, como as encontradas para *H. coccinea* na B, podem se relacionar a diversas funções como armazenamento de água, acúmulo de íons e pigmentos, melhor direcionamento da luz para o interior da folha e, conseqüentemente, contribuir para o aumento da capacidade fotossintética (SEVGI et al., 2012). O maior tamanho das células epidérmicas da face abaxial, que está em contato com o forófito e mais sombreada que a face adaxial, parece estar relacionado a um maior armazenamento de água em comparação com as

células epidérmicas da outra face, que, por sua vez, estão sujeitas à maiores radiação e perda de água. A maior estocagem de água pelas células epidérmicas da face abaxial torna-se vantajosa para a manutenção da temperatura foliar e da eficiência da fotossíntese.

No estudo que analisou a variabilidade ambiental e as respostas fisiológicas de *P. cuadrijuga* em um ambiente fragmentado no Páramo de la Rusia na Colombia (RAMOS et al., 2013), similarmente ao constatado neste trabalho para *H. coccinea* e *P. pachysepala*, na B, as folhas apresentaram maior espessura e menor AFE, embora as quantidades de clorofilas não se diferenciaram em relação ao I para *P. pachysepala* e *P. rubens*.

Geralmente, folhas sombreadas, como as do I, possuem maiores teores de clorofila do que folhas que crescem a pleno sol (GONÇALVES et al., 2001; LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001; ALVARENGA et al. 2003; REGO; POSSAMAI, 2006; MARTINAZZO et al., 2007). Em concordância ao encontrado na presente pesquisa para *H. coccinea*, um estudo sobre o efeito do ambiente de luz nas concentrações dos pigmentos fotossintéticos das espécies *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. (Fabaceae) constatou que maiores teores de clorofilas (*a*, *b* e total) foram produzidos em local mais sombreado (GONÇALVES et al., 2001). A clorofila *b* tem a função de absorver a luz em comprimentos de onda mais longos, típicos de ambientes sombreados (TAIZ; ZEIGER, 2009). Por sua vez, a clorofila *a* recebe energia luminosa da clorofila *b* e atua nas reações fotoquímicas da fotossíntese, maximizando a eficiência no uso da luz, facilitando o mecanismo de adaptação à condição de menor intensidade luminosa (SCALON et al., 2002). As clorofilas *a* e *b* absorvem energia luminosa em comprimentos de onda diferentes, embora atuem conjuntamente (GONÇALVES et al., 2001; TAIZ; ZEIGER, 2009). Dessa forma, uma planta com concentrações elevadas de clorofilas é capaz de atingir taxas fotossintéticas mais altas, pelo seu maior potencial de captação de *quanta* por unidade de tempo, como um mecanismo compensatório à menor quantidade de luz em ambientes menos iluminados (REGO; POSSAMAI, 2006; MARTINAZZO et al., 2007).

Em ambiente mais luminoso, como na B, as clorofilas possuem a tendência de sofrerem mais foto-oxidação e, conseqüentemente, serem degradadas, em um ritmo geralmente superior a sua síntese (STREIT et al., 2005). Os carotenoides, por sua vez, agem em conjunto com as clorofilas, prevenindo os processos de foto-oxidação das mesmas (TAIZ; ZEIGER, 2009), e sua maior produção encontrada no I para *P. pachysepala* acompanhou a maior síntese de clorofilas também nesse ambiente, possivelmente como um fator de prevenção à sua degradação.

Para *P. pachysepala*, foi encontrado maior TMS na B em ambas as estações e na análise conjunta, conforme já discutido para esclerificação encontrada por MFE. Em contrapartida, o maior TMS para *P. rubens* foi encontrado no I, no inverno, o que apresenta relação com GS, que foi não significativo e menor nesse ambiente. A relação entre TMS e GS foi observada em gramíneas, onde folhas mais suculentas apresentaram menor TMS quando cultivadas em ambiente de sombra (ERIKSEN; WHITNEY, 1981; SMITH; WHITEMAN, 1983; SAMARAKOON et al., 1990; CARVALHO et al., 1995).

Maior DE para as folhas de *P. rubens* no I no verão, é um resultado atípico para ambientes sombreados de matas, pois os maiores valores de DE normalmente são encontrados em condições de maior incidência luminosa (ALLARD et al., 1991; ABRANS et al., 1992; CASTRO et al., 1998; CAO, 2000; DUZ et al., 2004; FERMINO JR. et al., 2004), como encontrado para *P. pachysepala*, conferindo maior controle sobre a transpiração devido à redução na perda de água, com abertura e fechamento mais rápidos dos estômatos em condições mais favoráveis (RÔÇAS et al., 2001). Porém, é importante considerar que a DE é um parâmetro que pode ser taxonômico, podendo variar com a idade da planta (RICHARDSON et al., 2000) e/ou com as condições ambientais (CASTRO et al., 2009). Esse resultado para DE em *P. rubens*, pode ser compreendido se considerarmos que as folhas dessa espécie epifítica no interior da floresta estavam sujeitas aos *sunflecks*, pequenas aberturas na estrutura do dossel da floresta por onde passa a luz (PEARCY; WAY, 2012; WAY; PEARCY, 2012; SMITH; BERRY, 2013), pelo fato de terem a estratégia de buscar uma maior exposição à luz, habitando, preferencialmente, maiores alturas nos troncos das árvores (FURTADO; MENINI NETO, 2015), em comparação às outras espécies de orquídeas estudadas.

Os *sunflecks* podem causar danos de superaquecimento em uma folha, embora esse processo possa ser reversível pela redução na quantidade de energia luminosa que atinge a folha em resposta ao ângulo foliar, principalmente durante períodos de fluxos de maior densidade de luz e temperatura do ar (MEDINA et al., 1978; LARCHER, 2000) e/ou através de uma condutância estomática mais eficiente, atuando de forma mais eficaz contra perda excessiva de água e no controle da temperatura foliar (SCHYMANSKI et al., 2013). Tais situações foram observadas nesse estudo, uma vez que as folhas de *P. rubens* também apresentam orientação em ângulos de aproximadamente 90° em relação aos galhos. Outro fator que pode ter contribuído para essa resposta, com o aumento da radiação nos galhos das árvores habitados por *P. rubens* no I, foi o regime de renovação das folhas, que pode ocorrer nas nanoflorestas, uma vez que cerca de 30% da massa foliar é liberada na estação seca e ou

fria (OLIVEIRA-FILHO, 2009). Essa mesma observação, referente à transmissão de radiação solar durante o inverno pelo ambiente de mata, condicionada pelo aspecto semidecíduo da vegetação arbórea, cuja perda de parte das folhas no período mais seco e mais frio do ano diminui sensivelmente a cobertura proporcionada pelo dossel, permitindo que uma maior quantidade de radiação solar penetre no I, foi feita por Cestaro (1988), Schumacher (1992) e Hernandez et al. (2004).

O sistema cromatográfico empregado no presente trabalho indicou relevância de flavonoides dentre as principais substâncias detectadas nos extratos das folhas de *P. pachysepala* e *P. rubens*. Orquidáceas da Região Neotropical, como as investigadas no presente estudo, geralmente, são quimicamente caracterizadas por apresentarem quantidades relevantes de flavonoides (PRIDGEON et al., 1999, 2001, 2003, 2006, 2009; CARRERA et al., 2014). É possível, ainda, que os flavonoides sejam produzidos em todos os órgãos da planta (KOES; QUATTROCCHIO, 1994), conforme relatado para *Prosthechea* sp. por Pabst et al. (1981) e Higgins (1997).

No presente estudo, não foram observadas diferenças qualitativas quanto aos perfis cromatográficos obtidos. Dessa forma, optou-se, primordialmente, pela análise quantitativa dessas substâncias, uma vez que diferenças quantitativas no perfil flavonoídico podem representar categorias de variações intraespecíficas tão importantes quanto às diferenças qualitativas (BOHM, 1987).

Os flavonoides são um dos grupos de substâncias fenólicas mais encontradas no reino vegetal (ZUANAZZI, 2004), podendo apresentar proteção à planta contra fatores bióticos (herbívoros, patógenos) e abióticos (radiação UV, aquecimento) (HANLEY; LAMONT, 2002; AMARAL et al., 2004; MIERZIAK et al., 2014), sendo, frequentemente, citados na literatura devido à ação antioxidante e aos benefícios proporcionados a saúde humana (ANDROUTSOPOULOS et al., 2010; LISA et al., 2010).

No presente trabalho, comparando-se B e I, como uma análise geral, ou seja, aumentando-se o n amostral, considerando-se os valores obtidos a partir das coletas de todas as estações conjuntamente, os maiores valores médios das quantidades de flavonoides encontrados na B, ambiente mais luminoso, para *P. pachysepala* e *P. rubens*, indicam sua função fotoprotetora. De acordo com Xie et al. (2011) e Kanazawa et al. (2012), a síntese de flavonoides aumenta consideravelmente em resposta ao aumento da radiação UV, como um mecanismo de resposta primária das plantas às condições de estresse, seguidos, posteriormente, por outros mecanismos relacionados à estrutura do vegetal, como a lignificação, por exemplo (JANSEN et al., 1998). A biossíntese de lignina é estimulada por

diversos estresses abióticos e bióticos, podendo ser um importante mecanismo que contribui na resistência a estes processos (MOURA et al., 2010).

Ao mesmo tempo em que a produção dos flavonoides é controlada por enzimas da rota biossintética dos arilpropanóides (fenilalanina amônia-liase e chalcona sintase, dentre outras), que possuem sua expressão gênica induzida pela luz (BHARTI; KHURANA, 1997), flavonoides acumulados nos tecidos superficiais do vegetal (tais como epiderme, subepiderme, tricomas, cutícula e material epicuticular) são utilizados pela planta como filtros, absorvendo radiação UV-B sem alterar a radiação fotossinteticamente ativa (BIEZA; LOIS, 2001).

Para *P. pachysepala*, maiores teores de flavonoides produzidos no verão, no I, e no inverno, na B, provavelmente estejam relacionados à defesa constitutiva dessa espécie, ou seja, defesa que está presente na planta sem que qualquer problema tenha se apresentado (KARBAN; BALDWIN, 1997; WAR et al., 2012). Dessa forma, conjectura-se que esses flavonoides se acumulam proporcionalmente ao desenvolvimento da área foliar, que foi significativamente maior no verão, no I, e apresentou maior média, no inverno, na B. Além disso, provavelmente, esses flavonoides, que se apresentam na forma de cristais, vão se acumulando, ao longo do desenvolvimento lento das folhas de *P. pachysepala*, contribuindo para maior proteção à planta. McKey (1979) considera que a velocidade de expansão foliar possui relação com o teor de defesas encontrado nas folhas, possivelmente, por que o investimento em metabolismo especial pode ser menor em plantas com expansão foliar rápida (RHOADES; CATES, 1976), ao passo que ramos que crescem mais lentamente tendem a possuir maiores quantidades de defesas químicas (REHR et al., 1973; ORIANI; JANZEN, 1974).

Os processos de herbivoria também podem promover diversificação na produção de substâncias químicas de defesa nas plantas, eficientes contra o ataque de patógenos, como flavonas, flavonóis e flavanonas, conforme ocorreu com folhas atacadas de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl (Fabaceae) (OLIVEIRA et al., 2006). Corroborando esses resultados, Soares et al. (2000), verificaram que folhas sadias e folhas atacadas de *Rollinia laurifolia* Schdtl. (Annonaceae), apresentavam perfis flavônicos distintos, mostrando que as amostras herbivoradas possuíam maior diversificação de metabólitos secundários, indicando resposta qualitativa. Contudo, no presente trabalho, nos 24 perfis cromatográficos analisados (oriundos das análises nas quatro estações do ano, em dois ambientes, com três repetições) foram detectados sempre dois flavonoides para *P. pachysepala* e apenas um flavonoide para *P. rubens*, demonstrando estabilidade qualitativa.

Prosthechea pachysepala apresentou maior quantidade de flavonoides nas plantas da B apenas no inverno, o que corrobora um estudo realizado no Sul do Brasil, cujo objetivo foi detectar e comparar as taxas de herbivoria em diferentes áreas de Floresta Ombrófila Densa decorrentes do efeito de borda, comprovando-se que a maioria das áreas de B são mais susceptíveis a ataques por insetos herbívoros quando comparadas aos ambientes de I (FLOR et al., 2015). A região de B é mais exposta e mais sujeita às perturbações externas, e pode apresentar alterações em seu microclima, ocasionando algum tipo de estresse para as plantas (MURCIA, 1995), o que influenciaria na variação da síntese de flavonoides (TREUTTER, 2006). No verão, estação mais chuvosa e quente do ano, possivelmente, a maior quantidade de flavonoides encontrada no I, foi consequência do maior desenvolvimento da área foliar, atuando como uma defesa constitutiva (SILVA et al., 2011).

Maior quantidade relativa de flavonoides para *P. pachysepala* e *P. rubens*, quanto à análise geral, foi identificada na B, o que pode ser caracterizado como uma resposta fotoprotetora. É amplamente conhecido para esse grupo químico as ações antioxidante e fotoprotetora, como relatado nos trabalhos de Ropke et al. (2003), Said et al. (2007) e Hengari et al. (2014). Os resultados do presente trabalho corroboram uma pesquisa que quantificou sazonalmente a produção dos flavonoides C-glicosilados (isoorientina e isovitexina), flavonas obtidas das folhas de *Cecropia glaziovii* Sneth (Urticaceae) em um período de dois anos. Nesta pesquisa, constatou-se que os dois flavonoides C-glicosilados apresentaram uma quantidade máxima de produção nas estações mais quentes e com fotoperíodos mais longos: primavera e verão (novembro a março), o que foi atribuído à atividade fotoprotetora dos mesmos, como defesa ao vegetal (COSTA et al. 2014).

A maior quantidade relativa de flavonoides detectada para *P. rubens*, na B, no verão, e no interior, no inverno, pode ser interpretada como uma resposta fotoprotetora dessas substâncias, pois no verão o valor médio da luminosidade foi maior na B e, no inverno, apesar de a maior luminosidade também ter sido encontrada na B, foi observado o hábito de *P. rubens* de se desenvolver nas copas das árvores no I, possibilitando o efeito dos *sunflecks*, o que foi corroborado pelos aspectos anatômicos. Essa estratégia não foi observada na B, ou seja, as plantas localizadas em estratos mais baixos das árvores, receberam sombreamento adicional proveniente dos troncos, quando no inverno foi observada escassez de dossel foliar devido ao hábito subcaducifólio da floresta estudada. Tal observação reforça a atividade fotoprotetora desses metabólitos, pela ação de absorver e/ou dissipar a energia solar, reduzindo assim, os danos aos tecidos mais internos causados pela radiação UV-B, considerações que estão de acordo com os estudos realizados, quanto à síntese de flavonoides

em resposta à luminosidade por Evans (1991), Vitti e Brito (1999), Larcher (2000), Calixto (2001) e Gouinguéné e Turlings (2002).

É amplamente sabido que alguns traços morfoanatômicos foliares desempenham função de fotoproteção à planta em associação com maior acúmulo de metabólitos especiais, a exemplo da produção de flavonoides (MARGARIS, 1981). Em ambientes sujeitos à maior radiação, com a probabilidade de perder mais água, pode ocorrer desenvolvimento de camadas mais espessas de cutículas e de ceras epicuticulares (LEON; BUKOVAC, 1978; LIAKOURA et al., 1999, RICHARDSON; BERLYN, 2002), além de também ocorrer maior quantidade de esclerênquima, para sustentação da folha e prevenção quanto ao murchamento, respostas observadas para *P. rubens*, considerando os maiores valores para TMS e MFE no I, no inverno.

As duas espécies de orquídeas apresentaram mecanismos de defesa química diferenciados quanto ao ambiente e à estação do ano. Em *P. pachysepala*, a produção diferenciada de flavonoides, entre as duas estações, pode estar relacionada à defesa constitutiva cumulativa, corroborada pelo acúmulo de cristais diagnosticado pelos testes histoquímicos. Já em *P. rubens*, a produção diferenciada do flavonoide foi uma resposta fotoprotetora, conforme a comprovação de seu maior teor em ambientes/estação do ano sujeitos à maior radiação.

O índice de plasticidade fenotípica (IPF) é um bom preditor de como as espécies encontram-se adaptadas a um determinado local (BALAGUER et al., 2001; VALLADARES et al., 2000, 2005) e, neste trabalho, auxiliou na análise de como as três orquídeas estão adaptadas às duas fitofisionomias e às suas peculiaridades quanto às condições climáticas.

Dentre os três grupos de variáveis, morfológico, anatômico e fisiológico, o menor IPF foi constatado para a média das variáveis anatômicas nas três espécies, portanto as diferenças anatômicas nas folhas das orquídeas, entre os ambientes, foram menores do que os outros grupos de variáveis, demonstrando ser pequena a variação nos atributos foliares anatômicos dessas espécies na borda e no interior de floresta. Estudos de adaptação das espécies aos ambientes que consideram o cálculo do IPF são recentes e ainda escassos; dentre eles, citam-se os de Catoni et al. (2012, 2015). No primeiro trabalho, ao analisar a adaptação de três espécies de *Cistus* (Cistaceae) em condições ambientais típicas do mediterrâneo, observou-se que o IPF para as variáveis anatômicas (PI a) foram menores, seguidos pelas variáveis morfológicas e fisiológicas, apresentando semelhança ao presente trabalho também em relação aos valores das médias de plasticidade para cada grupo de variáveis, com PI m = 0,21; PI a = 0,13 e PI f = 0,38. No segundo trabalho, os autores verificaram o IPF de *Corylus*

avellana var. *macrotruncus* Zernov (Betulaceae) em ambientes de sombra e sol de uma floresta decídua de Siro Negri, uma reserva natural da Itália, e constataram para esse índice o valor de 0,33, ou seja, muito parecido com o de *H. coccinea* (0,31). Com base no resultado para *C. avellana*, os autores consideraram que essa espécie apresentou alta plasticidade e, portanto, maior capacidade de distribuição geográfica. De acordo com a metodologia adotada no presente trabalho, esse valor para IPF não indicaria uma plasticidade muito alta para *C. avellana*.

Na literatura, é amplamente difundido que espécies diferentes apresentam amplitudes de plasticidade fenotípica diferenciadas (SULTAN, 1995, 2003; SCHLICHTING, 1986), conforme observado ocorrido nas orquídeas estudadas nesse trabalho, uma vez que o fenótipo é moldado pela associação das condições ambientais com o genótipo (SCHLICHTING, 2002), que é única em cada espécie.

A maior média de plasticidade fenotípica das variáveis fisiológicas, como foi encontrada para *H. coccinea* e *P. rubens*, demonstra potencial das espécies para colonização de áreas abertas (NIINEMETS; VALLADARES, 2004) ou em estágios iniciais de sucessão (WALTERS; REICH, 1999), pois se relaciona a maiores possibilidade de ajuste instantâneo das trocas gasosas frente aos fatores estressantes (ZUNZUNEGUI et al., 2011). Já a maior média para plasticidade das variáveis morfológicas, ocorrida em *P. pachysepala*, confere um aumento da capacidade da planta de sobreviver e crescer em ambientes de interior de floresta (VALLADARES et al., 2002), pois esse tipo de plasticidade faz parte do mecanismo de aquisição de recompensas (exemplo: ampla área foliar) em ambientes de baixa luminosidade (NAVAS; GARNIER, 2002; HERR-TUROFF; ZEDLER, 2007).

Entre as três espécies, a que apresentou menor plasticidade fenotípica para os três grupos de variáveis analisadas (anatômicas, morfológicas e fisiológicas) foi *P. rubens*, com sete variáveis consideradas não plásticas ($IP < 0,1$) contra três em *H. coccinea* e quatro em *P. pachysepala*, caracterizando-a, dentro desse grupo de espécies de orquídeas, como a mais seletiva quanto às condições climáticas para adaptação. *Hadrolaelia coccinea* foi a espécie de maior IPF, mostrando-se com maiores chances de sobrevivência às oscilações ambientais que as demais, o que possibilita distribuição geográfica mais abrangente (SOOLANAYAKANAHALLY et al., 2009). Esta é uma constatação bastante relevante, uma vez que funcionários e guias do Parque do Ibitipoca relataram que essa espécie sofreu com a coleta predatória exercida pelos visitantes, tendo seu número reduzido visivelmente nos últimos anos, em virtude de seu alto potencial ornamental e pequeno tamanho, o que facilita sua retirada do local (MENINI NETO et al., 2007). O sucesso de espécies de maior

plasticidade fenotípica deve-se ao fato de que, ao longo do tempo, nos ambientes adversos, os genótipos e/ou espécimes mais bem adaptados a situações estressantes, são constantemente selecionados (KNUTZEN et al., 2015).

3. 6 CONSIDERAÇÕES

As diferenças foliares observadas nas orquídeas *H. coccinea*, *P. pachysepala* e *P. rubens* no presente estudo, em resposta a cada fitofisionomia e estação do ano, apresentaram plasticidade morfológica, anatômica, fisiológica e química diferenciadas para as três espécies, comprovando que elas possuem diferentes amplitudes de respostas fenotípicas quanto à adaptabilidade às condições ambientais decorrentes do processo de fragmentação nas nanoflorestas do PEIB.

Este trabalho gerou contribuições para a compreensão da ecologia química dessas orquídeas do PEIB, uma vez que não há pesquisas relacionadas à influência das condições ambientais peculiares das fitofisionomias estudadas sobre a produção de metabólitos secundários pelas espécies vegetais investigadas, sobretudo quanto à produção de flavonoides. Dessa forma, o presente estudo abre novos caminhos para pesquisas voltadas à associação da morfoanatomia à química, uma vez que as diferenças observadas nos teores relativos de flavonoides detectados possibilitaram uma análise conjunta da dinâmica da produtividade de metabólitos especiais com a adaptabilidade dessas espécies quanto ao seu metabolismo primário.

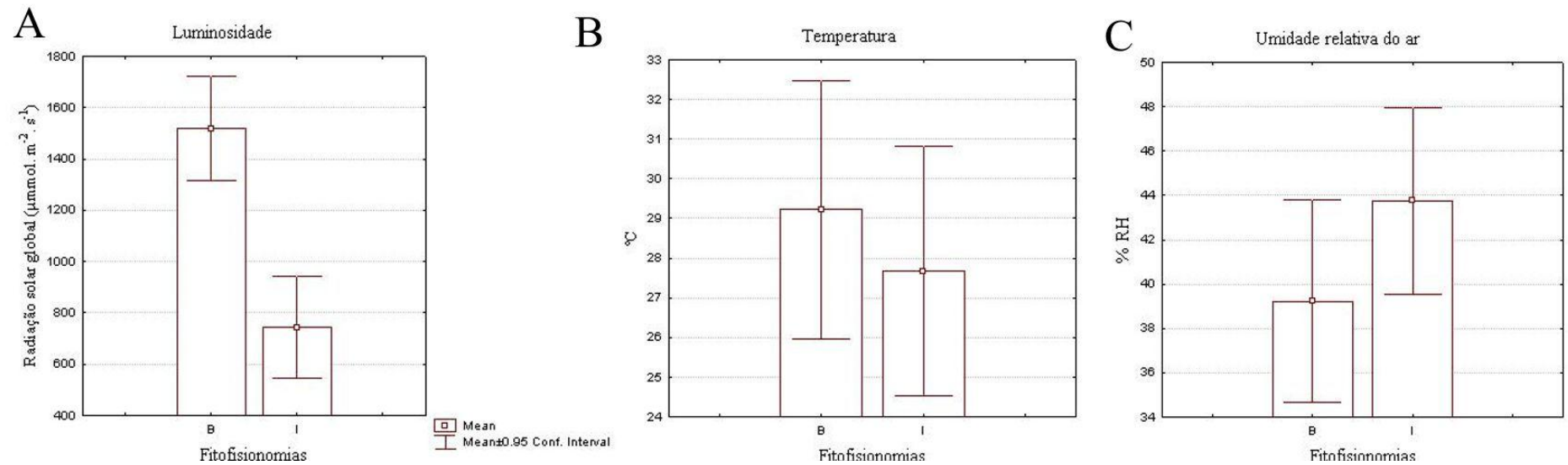


Figura 1. A-C. Condições climáticas do Parque Estadual do Ibitipoca, relativas à radiação solar global ou luminosidade, temperatura e umidade, respectivamente, aferidas em quatro estações do ano, durante o período de julho de 2013 a maio de 2014. B= borda e I = interior de mata

Tabela 1- Valores médios, respectivos desvios-padrão (entre parênteses) e coeficientes de variação das variáveis ambientais, luminosidade (LUM - $\mu\text{mol. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), temperatura (TEMP - $^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar (UMID - % RH) (n=3), nas fitofisionomias, borda (B) e interior de mata (I), nas estações verão, outono, inverno e primavera. Letras diferentes para cada estação e para a mesma variável por linha significam que os valores são estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

	B verão	CV%	I verão	CV%	B outono	CV%	I outono	CV%	B inverno	CV%	I inverno	CV%	B primavera	CV%	I primavera	CV%
LUM	1400 ($\pm 542, 24$) a	0.39	635 ($\pm 357,18$) a	0.56	1508 ($\pm 206,57$) a	0.14	748.5 ($\pm 335,38$) b	0.45	1489 ($\pm 314,22$) a	0.21	434.7 ($\pm 52,49$) b	0.12	1676.33 ($\pm 253,9$) a	0.15	932.33 ($\pm 305,65$) b	0.33
TEMP	33.83 ($\pm 4,62$) a	0.14	32.8 ($\pm 4,76$) a	0.15	26 ($\pm 3,86$) a	0.15	23.3 ($\pm 2,36$) a	0.1	25.07 ($\pm 3,75$) a	0.15	24.47 ($\pm 2,97$) a	0.12	32 ($\pm 2,91$) a	0.09	30.13 ($\pm 2,28$) a	0.08
UMID	37 ($\pm 11,58$) a	0.31	39.23 ($\pm 11,22$) a	0.29	40.3 ($\pm 7,61$) a	0.19	44.8 ($\pm 4,45$) a	0.1	39.23 ($\pm 7,61$) a	0.19	47.23 ($\pm 3,39$) a	0.07	40.37 ($\pm 4,6$) a	0.11	43.73 ($\pm 5,98$) a	0.14

Radiação solar global ($\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

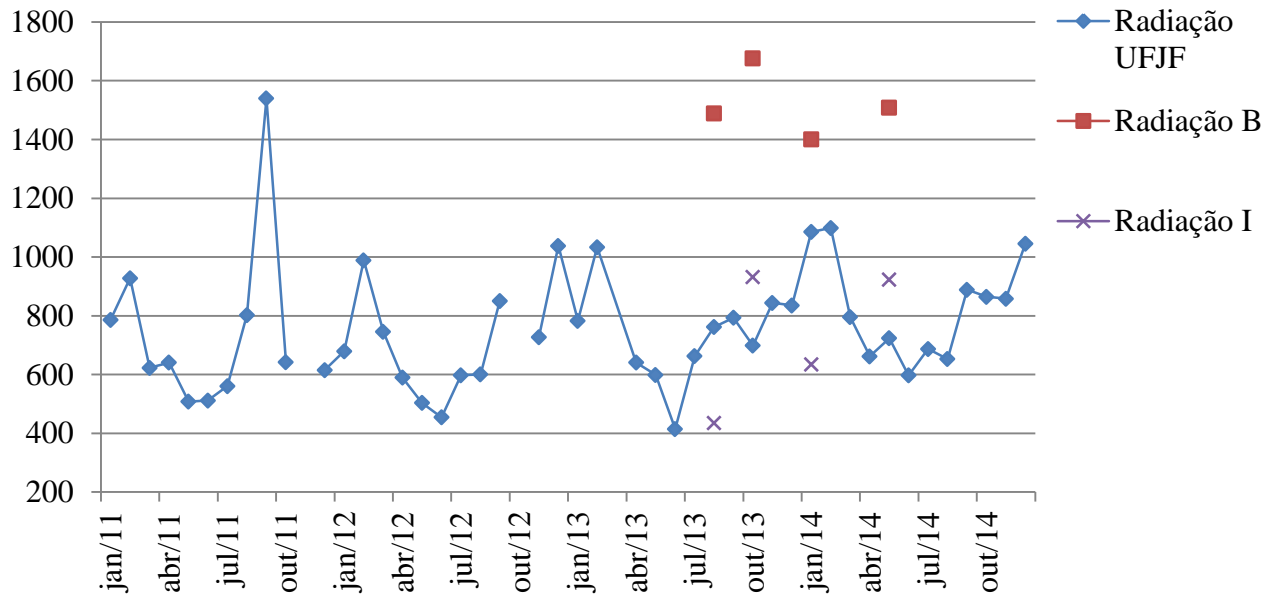


Figura 2. Comparação da radiação solar global entre Juiz de Fora e os locais de estudo no Parque Estadual do Ibitipoca, borda (B) e interior de floresta (I) entre julho de 2013 a maio de 2014

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)

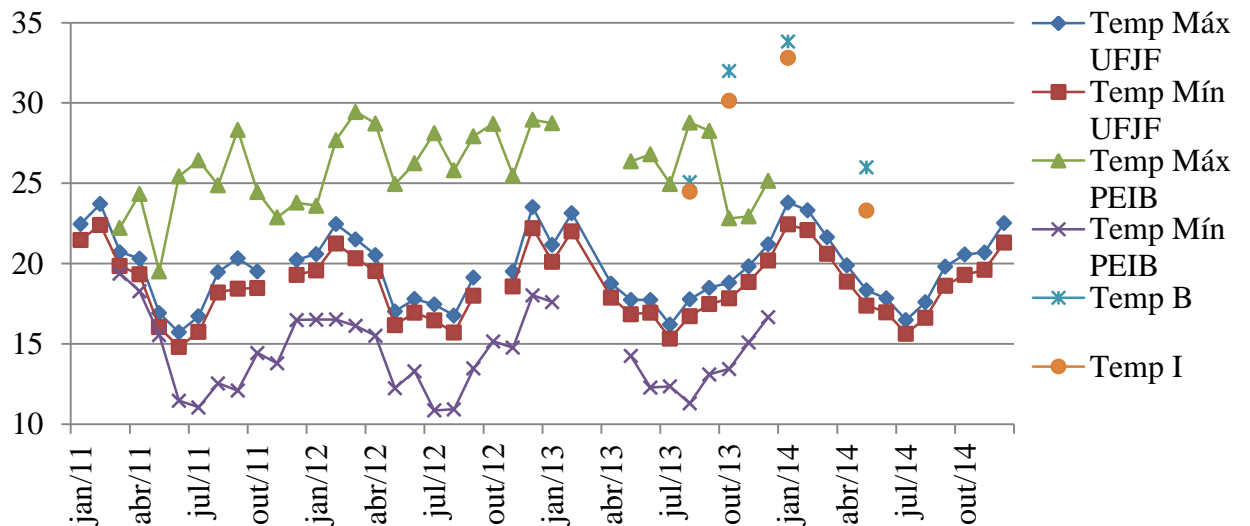


Figura 3. Comparação da temperatura entre Juiz de Fora e os locais de estudo no Parque Estadual do Ibitipoca, borda (B) e interior de floresta (I) entre julho de 2013 a maio de 2014

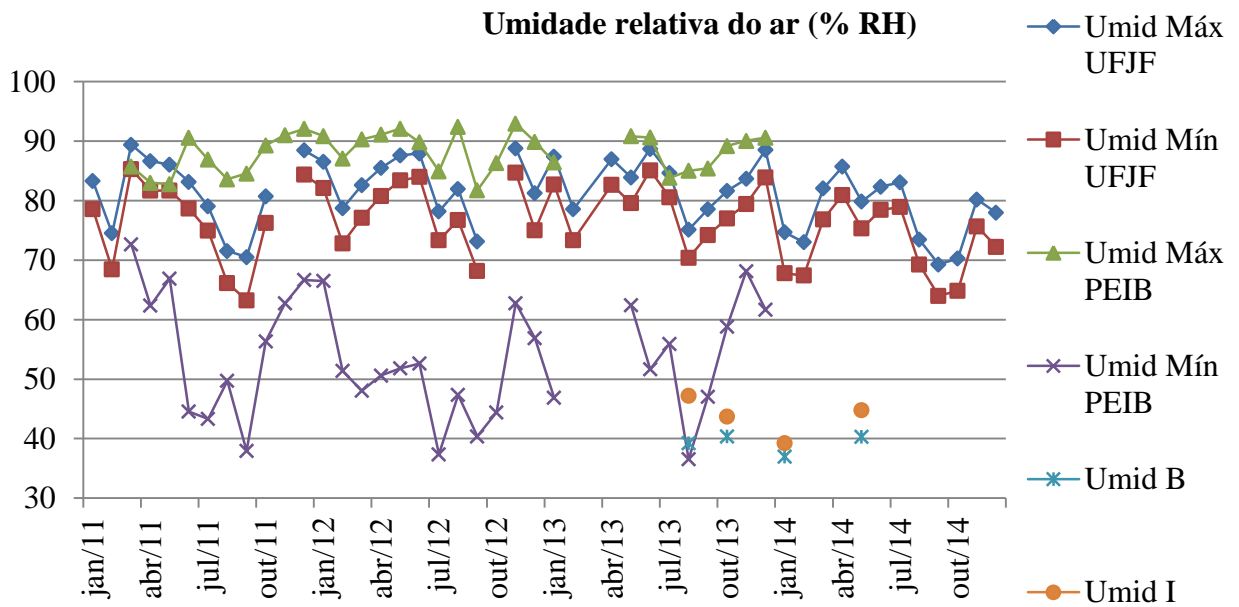


Figura 4. Comparação da umidade relativa do ar entre Juiz de Fora e os locais de estudo no Parque Estadual do Ibitipoca, borda (B) e interior de floresta (I) entre julho de 2013 a maio de 2014

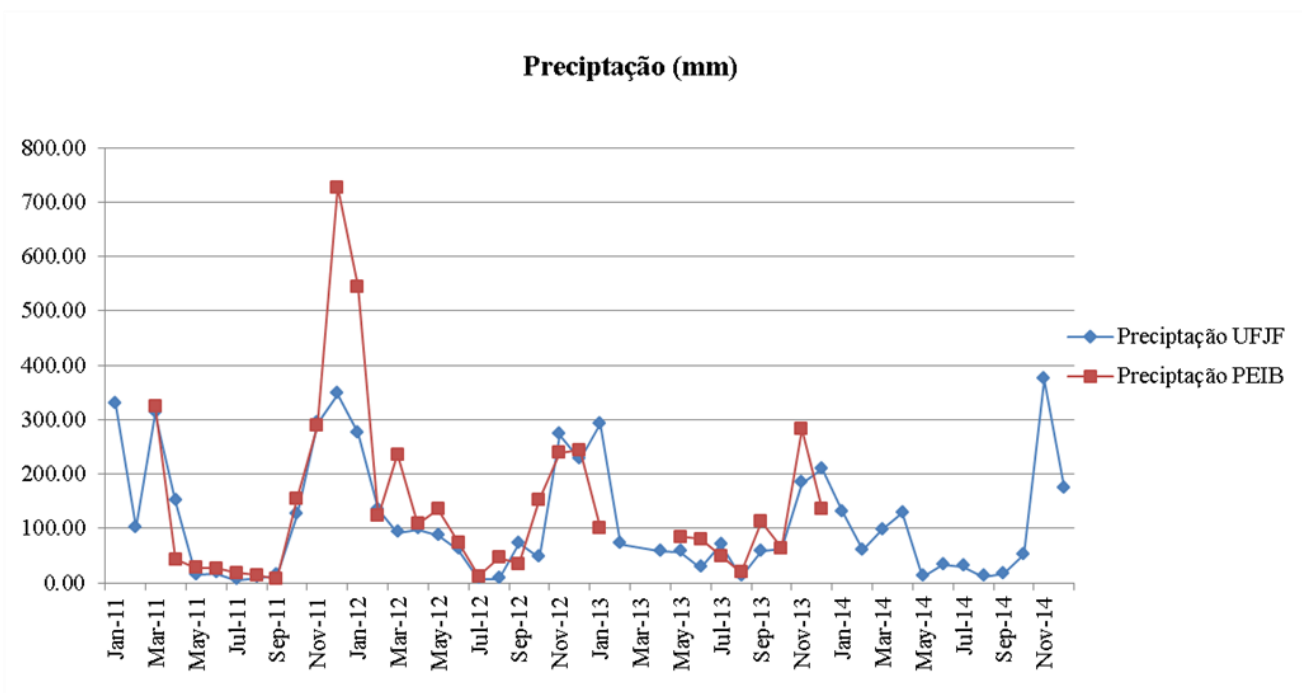


Figura 5. Comparação da pluviosidade entre Juiz de Fora e o Parque Estadual do Ibitipoca no período de março de 2011 a dezembro de 2013



Figura 6. Fitofisionomias estudadas no Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB). A e B. Aspecto geral da borda (B). C e D. Aspecto geral do interior (I) de nanofloresta nebular

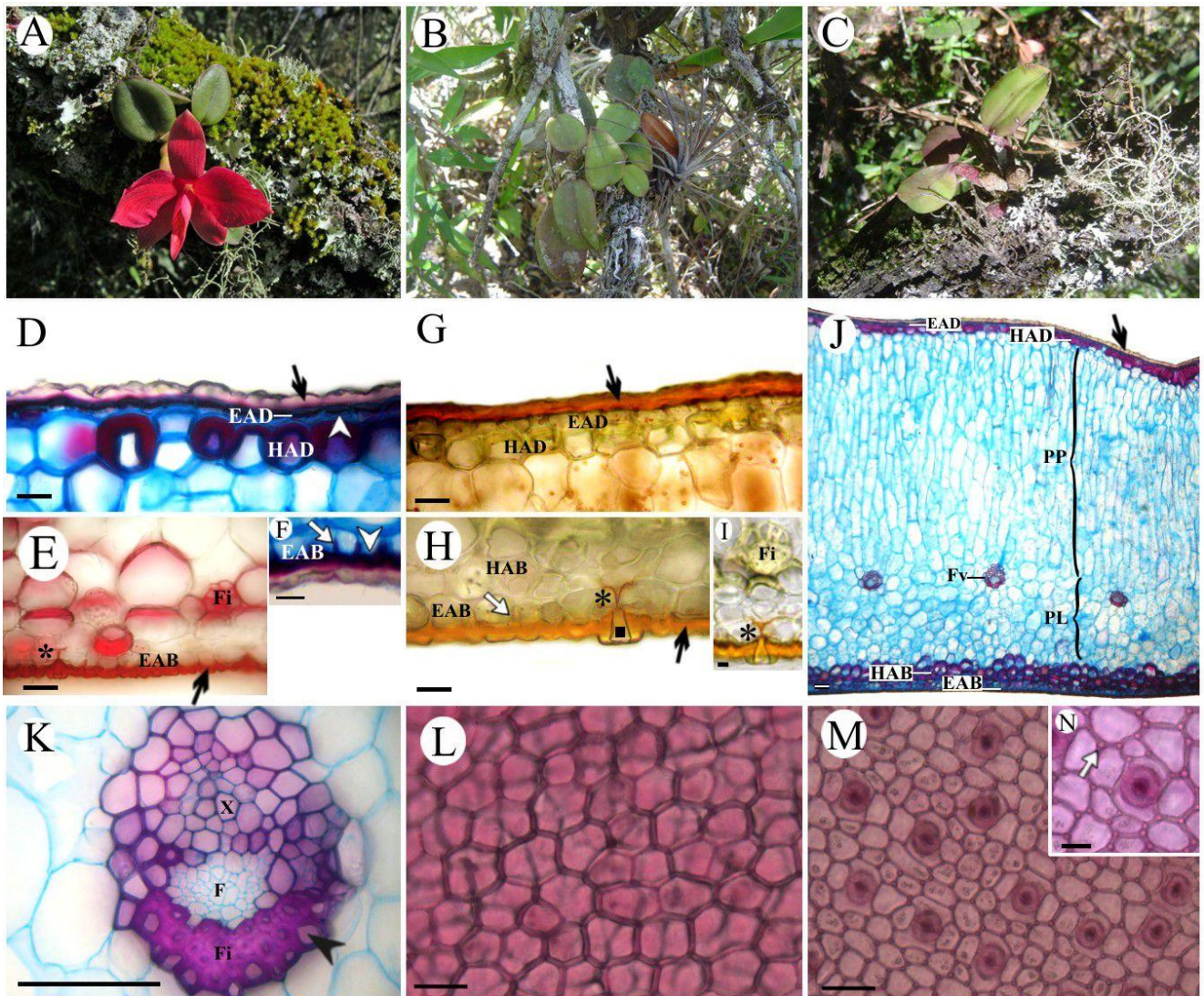


Figura 7. *Hadrolaelia coccinea* (Lindl.) Chiron. A. Aspecto geral. B. Borda. C. Interior da mata. D, F, J e K. Cortes transversais da lâmina foliar corados com azul de astra e fucsina básica. F. Corte transversal da lâmina foliar mostrando resultado de teste histoquímico com floroglucinol. G-I. Cortes transversais da lâmina foliar mostrando cutícula destacada por Sudan III. K. Detalhe do feixe vascular. L e M. Face adaxial (L) e abaxial (M) da lâmina foliar em vista paradérmica, corados com fucsina básica. EAD= face adaxial da epiderme; HAD= hipoderme da face adaxial; PP= parênquima paliádico; PL= parênquima lacunoso; HAB= hipoderme da face abaxial; EAB= face abaxial da epiderme; Fv= Feixe vascular X= xilema; F= floema; Fi = fibras; seta preta= cutícula; cabeça de seta preta= célula esclerificada de origem pericíclica; seta branca= flanges cuticulares da parede anticlinal; cabeça de seta branca= espessamento esclerificado; *= depósito de cutina das células-guarda; ■= câmara supraestomática. Barras de escala: D, E, G, H, J, L e M= 100 μ m; F, I, N = 25 μ m; k= 150 μ m

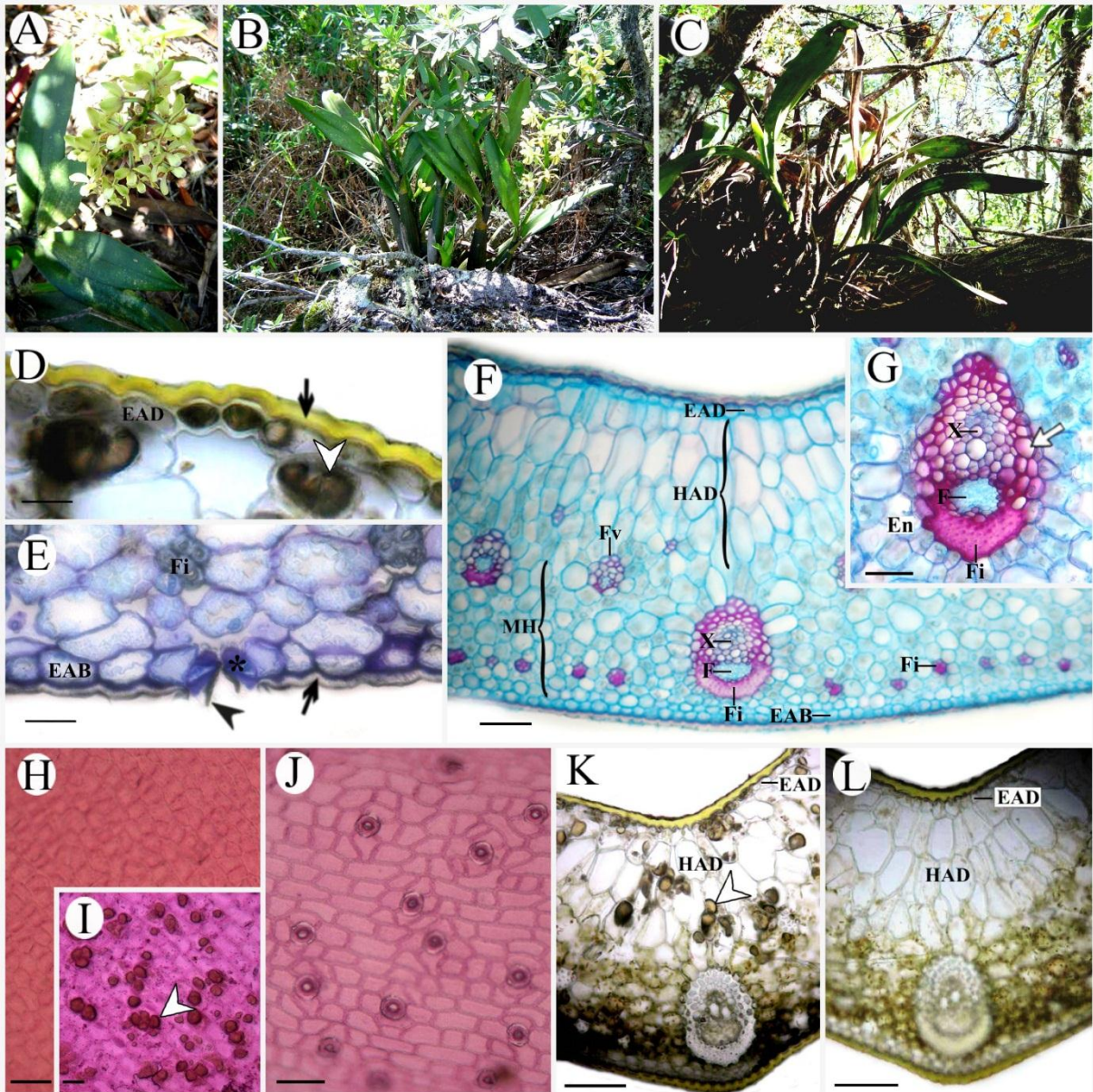


Figura 8. *Prosthechea pachysepala* (Klotzsch) Chiron e V. P. Castro. A. Aspecto geral. B. Borda. C. Interior da mata. D-G, K-L. Cortes transversais da lâmina foliar. D. Destaque da cutícula e dos cristais de flavonoides da face adaxial da folha sem coloração. E. Corte transversal da lâmina foliar corado com Azul de toluidina. F-G. Corte transversal da lâmina foliar corado com azul de astra e fucsina básica. G. Detalhe do feixe vascular. H-J. Face adaxial (H) e abaxial (J) da lâmina foliar em vista paradérmica, corados com Fucsina básica. K-L. Corte transversal da lâmina foliar com cristais de flavonoides após reação com hidróxido e amônia (K) e após reação com hidróxido de Sódio (L). EAD= face adaxial da epiderme; HAD= hipoderme da face adaxial; MH= mesofilo homogêneo; EAB= face abaxial da epiderme; En= endoderme; Fv= Feixe vascular; X= xilema; F= floema; Fi = fibras; seta preta= cutícula; cabeça de seta preta= cristas estomáticas; cabeça de seta branca= cristal de flavonóide; seta branca= células esclerificadas de origem periclília; *= espessamento celulósico das células-guarda. Barras de escala: D, J= 150 μ m; E= 25 μ m; F, G-H; K-L= 100 μ m; I= 50 μ m

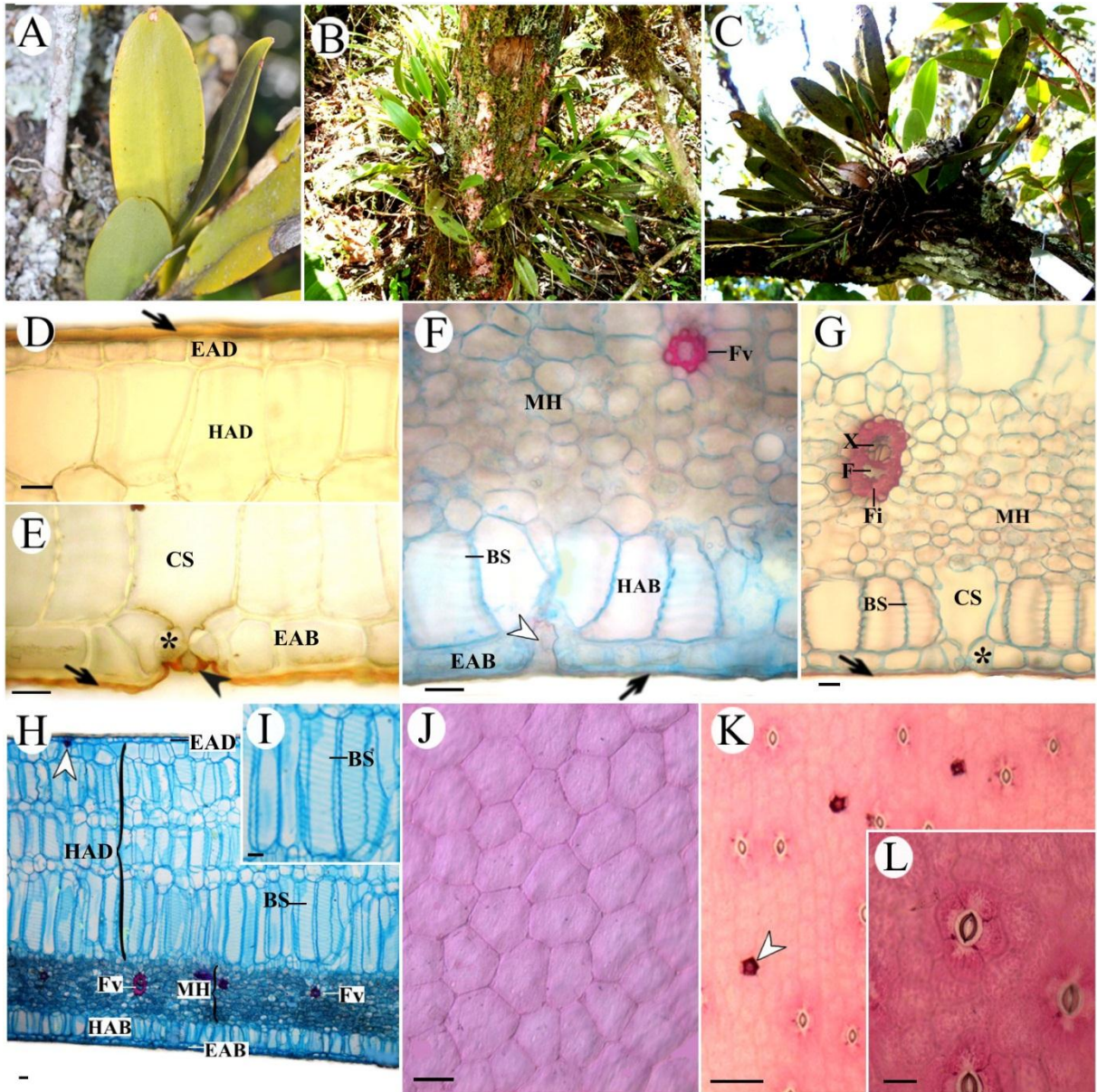


Figura 9. *Pleurothallis rubens* Lindl. A. Aspecto geral. B. Borda. C. Interior da mata. D-H. Cortes transversais da lâmina foliar. D-E. Cortes transversais da lâmina foliar mostrando cutícula destacada por Sudan III. F-I. Cortes transversais corados com azul de astra e fucsina básica. J-L. Face adaxial (J) e abaxial (K) da lâmina foliar em vista paradérmica, corados com fucsina básica. EAD= face adaxial da epiderme; HAD= hipoderme face adaxial; MH= mesofilo homogêneo; HAB= hipoderme face abaxial; EAB= face abaxial da epiderme; seta preta= cutícula; cabeça de seta preta= crista estomática; cabeça de seta branca= cicatriz de inserção de tricoma; *= deposição de cutina nas células-guarda; BS= barra de espessamento; CS= câmara subestomática; Fv= Feixe vascular; X= xilema; F= floema; Fi = fibras. Barras de escala: D-E, G, H-L= 100 µm; = F= 25 µm

Tabela 4 - Valores médios, respectivos desvios-padrão (entre parênteses) e coeficientes de variação das características morfológicas (n=10), anatômicas (n=30) e clorofilas (n=3) das folhas de *Pleurothallis rubens* nas diferentes fitofisionomias do Parque Estadual do Ibitipoca na borda (B) e interior (I), nas estações do ano: verão (V) e inverno (I). MF: massa fresca; MS: massa seca; TMS= teor de matéria seca; CA= conteúdo de água; AF: área foliar; AFE: área foliar específica; MEF: massa específica foliar; GS: grau de suculência; espessuras (μm) das CAD: cutícula da face adaxial da epiderme; EAD: face adaxial da epiderme; HAD: hipoderme da face adaxial; MH: mesofilo homogêneo; HAB: hipoderme da face abaxial; EAB: face abaxial da epiderme; CAB: cutícula da face abaxial; LT: lâmina total; DE: densidade estomática; concentrações de clorofila a: cl a; clorofila b: cl b; clorofila total: cl t; clorofila a/b: cl a/b; carotenoides: *Carot* e clorofila total/carotenoides: cl t/*carot*. Letras diferentes para a mesma variável/ linha significam que os valores são estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

	BV	CV (%)	IV	CV (%)	BI	CV (%)	II	CV (%)	B	CV (%)	I	CV (%)	IP
MF	2,62 (\pm 1,13) a	0,43	2,87 (\pm 1,22) a	0,43	1,92 (\pm 0,62) a	0,32	1,75 (\pm 0,45) a	0,26	2,27 (\pm 0,96) a	0,42	2,31 (\pm 1,06) a	0,46	0,37
MS	0,23 (\pm 0,1) a	0,41	0,27 (\pm 0,11) a	0,42	0,26 (\pm 0,11) a	0,42	0,4 (\pm 0,21) a	0,51	0,24 (\pm 0,1) a	0,41	0,33 (\pm 0,17) a	0,52	0,43
TMS	9,01 (\pm 1,39) a	0,15	9,57 (\pm 1,54) a	0,16	13,33 (\pm 3,44) a	0,26	22,98 (\pm 10,77) b	0,47	11,17 (\pm 3,38) a	0,3	16,28 (\pm 10,17) a	0,62	0,42
CA	2,39 (\pm 1,04) a	0,44	2,6 (\pm 1,11) a	0,43	1,66 (\pm 0,53) a	0,32	1,35 (\pm 0,43) a	0,32	2,02 (\pm 0,89) a	0,44	1,97 (\pm 1,04) a	0,53	0,38
AF	7,82 (\pm 3,2) a	0,41	8,96 (\pm 3,37) a	0,38	9,53 (\pm 2,53) a	0,27	9,19 (\pm 2,17) a	0,24	8,67 (\pm 2,94) a	0,34	9,07 (\pm 2,76) a	0,3	0,37
AFE	34,63 (\pm 8,49) a	0,25	35,22 (\pm 8,82) a	0,25	40,48 (\pm 11,74) a	0,29	27,08 (\pm 10,89) b	0,4	37,55 (\pm 10,42) a	0,28	31,15 (\pm 10,51) a	0,34	0,46
MEF	0,03 (\pm 0,01) a	0,2	0,03 (\pm 0,01) a	0,25	0,03 (\pm 0,01) a	0,27	0,04 (\pm 0,02) b	0,47	0,03 (\pm 0,01) a	0,24	0,04 (\pm 0,02) a	0,45	0,42
GS	0,3 (\pm 0,04) a	0,12	0,29 (\pm 0,07) a	0,26	0,17 (\pm 0,01) a	0,08	0,15 (\pm 0,03) a	0,21	0,24 (\pm 0,07) a	0,31	0,22 (\pm 0,09) a	0,42	0,08
Pl m	0,13												
CAD	17,17 (\pm 7,27) a	0,42	15,83 (\pm 4,56) a	0,29	18 (\pm 3,11) a	0,17	15,25 (\pm 2,49) a	0,16	17,58 (\pm 5,56) a	0,32	15,54 (\pm 3,66) a	0,24	0,37
EAD	43 (\pm 13,26) a	0,32	41,33 (\pm 7,98) a	0,19	52,5 (\pm 11,73) a	0,22	42 (\pm 10,14) b	0,24	47,75 (\pm 13,48) a	0,28	41,67 (\pm 9,05) a	0,22	0,11
HAD	1652,83 (\pm 528,59) a	0,32	1675,5 (\pm 286,26) a	0,17	1631,5 (\pm 344,63) a	0,21	1652,5 (\pm 254,48) a	0,15	1642,17 (\pm 442,53) a	0,27	1664 (\pm 268,78) a	0,16	0,01
MH	445 (\pm 114,64) a	0,26	442,33 (\pm 45,29) a	0,1	463,67 (\pm 53,11) a	0,11	423,67 (\pm 37,69) a	0,09	454,33 (\pm 89,07) a	0,2	433 (\pm 42,37) a	0,1	0,07
HAB	140 (\pm 37,65) a	0,27	148,5 (\pm 30,85) a	0,21	132,83 (\pm 23,95) a	0,18	119,83 (\pm 15,17) a	0,13	136,42 (\pm 31,49) a	0,23	134,17 (\pm 28,11) a	0,21	0,12
EAB	36,5 (\pm 17,08) a	0,47	40,33 (\pm 6,42) a	0,16	45,33 (\pm 6,56) a	0,14	38,83 (\pm 7,06) a	0,18	40,92 (\pm 13,58) a	0,33	39,58 (\pm 6,74) a	0,17	0,10
CAB	8,83 (\pm 3,39) a	0,38	7,83 (\pm 3,39) a	0,43	5,67 (\pm) a	0,31	5,17 (\pm 0,91) a	0,18	7,25 (\pm 3,11) a	0,43	6,5 (\pm 2,81) a	0,43	0,26
LT	2343,33 (\pm 686,12) a	0,29	2371,67 (\pm 300,17) a	0,13	2349,5 (\pm 324,55) a	0,14	2293,67 (\pm 273,66) a	0,12	2346,42 (\pm 532,14) a	0,23	2332,67 (\pm 287,48) a	0,12	0,02
DE	2,6 (\pm 0,72) a	0,28	2,27 (\pm 0,45) a	0,2	2,4 (\pm 0,72) a	0,3	3,7 (\pm 2,25) b	0,61	2,5 (\pm 0,72) a	0,3	2,98 (\pm 1,76) a	0,61	0,24
Pl a	0,12												
Cl a	0,17 (\pm 0,13) a	0,73	0,2 (\pm 0) a	0,02	0,2 (\pm 0,02) a	0,09	0,21 (\pm 0,01) a	0,05	0,19 (\pm 0,08) a	0,44	0,21 (\pm 0,01) a	0,05	0,09
Cl b	0,04 (\pm 0,04) a	1,04	0,02 (\pm 0,02) a	0,79	0,1 (\pm 0,02) a	0,16	0,12 (\pm 0) a	0,03	0,07 (\pm 0,04) a	0,64	0,07 (\pm 0,06) a	0,81	0,32
Cl t	0,21 (\pm 0,16) a	0,79	0,22 (\pm 0,02) a	0,07	0,31 (\pm 0,02) a	0,06	0,33 (\pm 0,01) a	0,04	0,26 (\pm 0,12) a	0,46	0,28 (\pm 0,06) a	0,23	0,06
Cl a/b	5,90 (\pm 2,37) a	0,40	14,76 (\pm 8,14) a	0,55	2,01 (\pm 0,39) a	0,19	1,76 (\pm 0,05) a	0,03	3,96 (\pm 2,62) a	0,66	8,26 (\pm 8,78) a	0,47	0,36
Carot	0,1 (\pm 0,06) a	0,60	0,13 (\pm 0,01) a	0,05	0,05 (\pm 0,01) a	0,18	0,05 (\pm 0) a	0,01	0,08 (\pm 0,05) a	0,59	0,09 (\pm 0,04) a	0,47	0,13
Cl t/<i>Carot</i>	1,98 (\pm 0,37) a	0,19	1,7 (\pm 0,16) a	0,09	5,84 (\pm 0,9) a	0,16	6,32 (\pm 0,3) a	0,05	3,91 (\pm 2,2) a	0,56	4,01 (\pm 2,54) a	0,63	0,11
Pl f	0,18												

Tabela 5 - Quantidade relativa de flavonoides detectada a 335 nm por estação do ano nas fitofisionomias borda (B) e interior (I) de nanofloresta. Quantidade relativa destacada (*) corresponde ao maior valor estatisticamente significativo

Estações do ano	<i>Prosthechea pachysepala</i>		<i>Pleurothallis rubens</i>	
	Borda	Interior	Borda	Interior
Verão	529.706,3	2.597.469,3 *	3.863.833,7 *	446.794,6
Outono	63.496.656,3	26.595.063,8	21.611.197,4	6.425.457,1
Inverno	4.099.265,9 *	2.096.053,1	1.548.139,7	9.796.655,3 *
Primavera	2.012.486,3	1.586.504,1	6.215.145,2	2.597.105,3

Tabela 6 - Valores médios dos Índices de plasticidades (IP) das variáveis morfológicas (m), anatômicas (a) e fisiológicas (f); Índice de plasticidade fenotípica (IPF) total das espécies *Hadrolaelia coccinea*, *Prosthechea pachysepala* e *Pleurothallis rubens* e Índice de plasticidade fenotípica (IPF) total para cada grupo de variáveis

	<i>Hadrolaelia coccinea</i>	<i>Prosthechea pachysepala</i>	<i>Pleurothallis rubens</i>	IPF Total
IP m	0,34	0,29	0,13	0,25
IP a	0,21	0,19	0,12	0,17
IP f	0,4	0,22	0,18	0,26
IPF Total	0,31	0,23	0,14	0,22

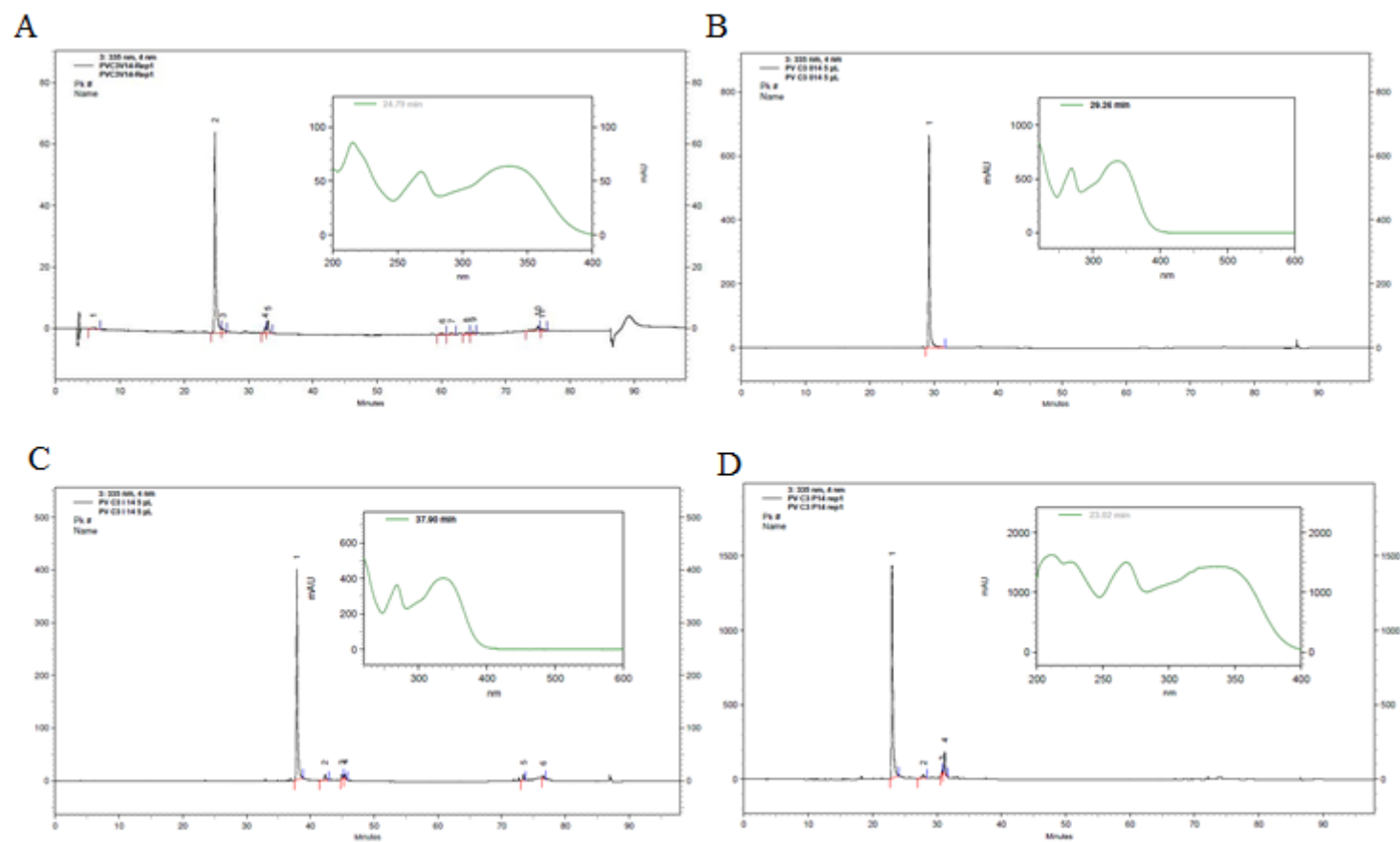


Figura 10. A-D. Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos brutos de folhas de *Prosthechea pachysepala* utilizando-se $\lambda = 335$ nm e seus respectivos espectros UV no verão (A), outono (B), inverno (I) e primavera (P)

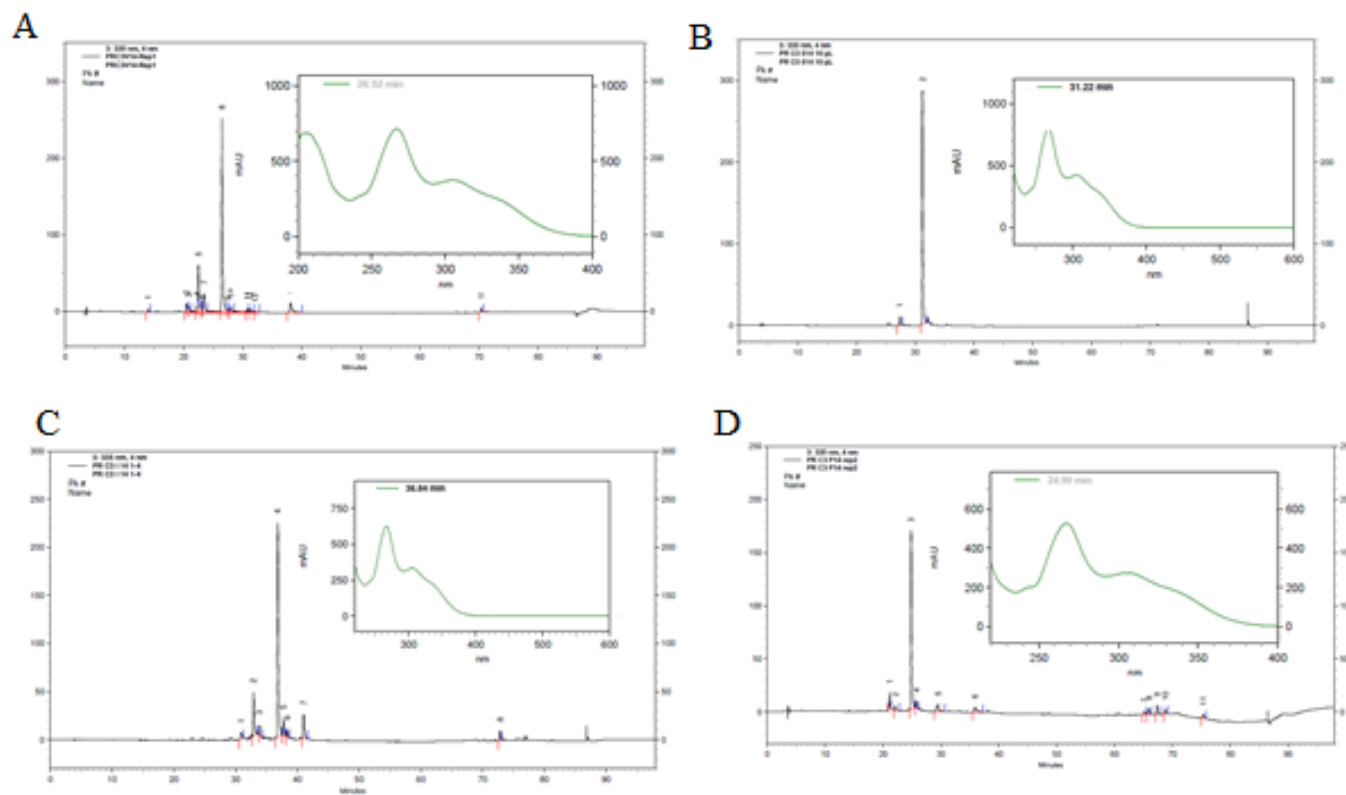


Figura 11. A-D. Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos brutos de folhas de *Pleurothallis rubens* utilizando-se $\lambda=335$ nm e seus respectivos espectros UV no verão (A), outono (B), inverno (I) e primavera (P)

4. CAPÍTULO 3 – ADAPTAÇÃO MORFOANATÔMICA FOLIAR E QUÍMICA DE ORCHIDACEAE EM COTAS ALTIMÉTRICAS DISTINTAS NO PARQUE ESTADUAL DO IBITIPOCA – MG

4.1 RESUMO

A família Orchidaceae destaca-se por adaptar-se às mais diversas condições ambientais, tendo em vista, sua ampla distribuição mundial. A elevação do relevo tem se apresentado como um importante fator na distribuição das orquídeas. No Brasil, Orchidaceae destaca-se entre as famílias de maior diversidade que habitam os campos rupestres e de altitude, bem como as diferentes formações vegetacionais que compõem o Complexo da Mantiqueira, incluindo-se nessa região, o Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB). As orquídeas *Zygopetalum maculatum* (Kunth) Garay e *Epidendrum secundum* Jacq., no PEIB estão distribuídas ao longo de um gradiente altitudinal entre 1000 e 1784m. À medida que o relevo se inclina, as condições ambientais modificam-se bruscamente a curtas distâncias e os extremos de altitude ficam sujeitos a diferentes temperatura, umidade, velocidade e intensidade dos ventos, fatores que podem induzir na folha, órgão mais plástico do vegetal, adaptações através de respostas morfológicas, fisiológicas e químicas que possibilitem uma melhor condição de sobrevivência local da planta. Objetivou-se com o presente trabalho investigar a influência de duas diferentes cotas altimétricas do PEIB, e suas respectivas condições climáticas, na adaptação das orquídeas *Z. maculatum* e *E. secundum*, a partir das análises morfoanatômica, fisiológica e química de suas folhas. Aferições climáticas foram realizadas com o aparelho Instrutherm Thal 300, nas duas diferentes altitudes estudadas do PEIB nas quatro estações do ano. Para as análises morfoanatômicas foram coletadas trinta folhas adultas para cada dez indivíduos de *Z. maculatum* e *E. secundum* nas duas diferentes altitudes. Para quantificação das clorofilas, análises histoquímicas e químicas, através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD), foram coletadas três folhas de três indivíduos de cada espécie por altitude. O índice de plasticidade fenotípica (IPF) foi calculado para cada variável morfológica, anatômica e fisiológica. Para avaliar a diferença significativa de cada variável entre as duas fitofisionomias utilizou-se teste t-student ou teste não paramétrico de Mann-Whitney. A umidade relativa do ar e a velocidade do vento foram significativamente maiores na alta altitude em comparação à baixa. *Zygopetalum maculatum* e *E. secundum* apresentaram respostas adaptativas diferenciadas quanto às cotas altimétricas. Maior teor médio de flavonoides foi encontrado em *Z. maculatum* na baixa altitude como resposta ao maior déficit hídrico. Em *E. secundum*, não foi detectado flavonoides, mas maior IPF para um maior número de variáveis em relação à *Z. maculatum*. Essa estratégia foi corroborada pela maior amplitude de distribuição geográfica registrada para *E. secundum*.

Palavras-chave: anatomia, flavonoides, orquídeas, plasticidade fenotípica, velocidade do vento.

4.2 INTRODUÇÃO

A família Orchidaceae destaca-se por se adaptar às mais diversas condições ambientais, tendo em vista, sua ampla distribuição mundial (PABST; DUNGS, 1975; HUNT, 1985; DRESSLER, 1993; SMITH et al., 2004). Dentre as estratégias adaptativas relacionadas aos aspectos morfoanatômicos e fisiológicos, que aumentam as chances de sobrevivência das orquídeas, principalmente quanto à escassez de água, destacam-se raízes aéreas com epiderme multisseriada, caules modificados em pseudobulbos e tecidos foliares aquíferos (HOEHNE, 1949; ESAU, 1974; BENZING, 1995; TOSCANO-DE-BRITO; CRIBB, 2005; APEZZATO-DA-GLÓRIA; HAYASHI, 2006; MOREIRA; ISAIAS, 2008; SILVA et al., 2010). A associação de fatores climáticos com as condições edáficas contribuem para amplitude de dispersão das espécies (CLARK et al., 1999; OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000; SCUDELLER et al., 2001; PHILLIPS et al., 2003; LASSUEUR et al., 2006), embora, a elevação do relevo se apresente como um importante fator na distribuição das mesmas (WANG et al., 2015).

Algumas orquídeas se adaptam muito bem a altitudes elevadas, com registros de sua ocorrência em locais de até 2.600 metros (WILLIAMS, 1980; HIGGINS, 2003). No Brasil, Orchidaceae destaca-se entre as famílias de maior diversidade (ABREU et al., 2011), ocorrendo nos campos rupestres e de altitude (GIULIETTI et al., 1987; ZAPPI et al., 2003; ALVES; KOLBEK, 2009), bem como nas diferentes formações vegetacionais que compõem o Complexo da Mantiqueira, incluindo-se, nessa região, o Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB) (MENINI NETO et al., 2007). Várias espécies de orquídeas podem ocorrer em dois ou mais tipos de formações vegetacionais (PANSARIN; PANSARIN, 2008), como é o caso das espécies *Zygopetalum maculatum* (Kunth) Garay e *Epidendrum secundum* Jacq., que no PEIB, encontram-se distribuídas ao longo de um gradiente altitudinal, entre 1000 e 1784m (L. MENINI NETO, comunicação pessoal).

À medida que o relevo se inclina, as condições ambientais modificam-se bruscamente a curtas distâncias (PAN et al., 2013). Os extremos de altitude ficam sujeitos a diferentes temperatura, umidade, luminosidade, disponibilidade de nutrientes no solo, velocidade e intensidade dos ventos (VALENTE et al., 2011; PAN et al., 2013), fatores que podem induzir na folha, órgão mais plástico do vegetal, adaptações estruturais que possibilitem uma melhor condição de sobrevivência local para a planta (THOMPSON et al., 1992; DICKISON, 2000; KOFIDIS et al., 2003; GUAN et al., 2011). As plantas podem variar morfológicamente,

fisiologicamente e quimicamente em relação à altitude, especificamente, quanto à espessura do mesófilo e da lâmina da folha, à área foliar, à área específica foliar, ao volume celular, ao espessamento da cutícula, à condutividade estomática e à produção de metabólitos secundários (RÔÇAS et al., 2001; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MACEK et al., 2009; MA et al., 2012).

Estudos relacionados à anatomia foliar, voltados a análises macro e micromorfológicas, têm assumido maior importância quando associados a aspectos ecológicos (BIERAS; SAJO, 2004; KOCSIS et al., 2004; SEGATTO et al., 2004; SOMAVILLA; GOMES et al., 2009; GRACIANO-RIBEIRO, 2011), auxiliando o entendimento de caracteres que se desenvolvem em resposta aos *habitats* ocupados (PIAZZA et al., 2015). Contudo, mesmo considerando que diferentes gradientes altitudinais apresentam-se como poderosos experimentos naturais que permitem testar as respostas ecológicas da biota quanto às influências geofísicas (KÖRNER, 2007), poucos trabalhos fornecem inferências ecológicas relacionadas às adaptações das plantas a diferentes altitudes, destacando-se, dentre os mais recentes, os artigos de Ma et al. (2012), Molina-Montenegro et al. (2012), Read et al. (2014) e Rajsnerová et al. (2015). No entanto, nenhum destes trabalhos aborda Orchidaceae.

A ocorrência de uma determinada espécie em ambientes diferenciados quanto às condições climáticas, como as orquídeas terrestres *Z. maculatum* e *E. secundum* localizadas em extremos de altitude no PEIB, pode contribuir para o desenvolvimento de caracteres morfoanatômicos, e/ou de ajustes fisiológicos (PRICE et al., 2003) e químicos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007) que possibilitam habitarem à cada extremo de altitude (GRATANI, 1996; PINTADO et al., 1997; GRATANI et al., 2003; ZUNZUNEGUI et al., 2011), dependendo da amplitude de sua plasticidade fenotípica (SCHLICHTING, 2002; SULTAN, 2004; VALLADARES et al., 2006; GRATANI, 2014).

Objetivou-se, no presente trabalho, investigar a influência de diferentes cotas altimétricas do PEIB, e suas respectivas condições climáticas, na adaptação das orquídeas *Z. maculatum* e *E. secundum*, a partir de análises morfoanatômicas, fisiológicas e químicas de suas folhas.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Local de coleta e espécies estudadas

Todo o material botânico analisado e as fitofisionomias estudadas neste trabalho localizam-se no Parque Estadual do Ibitipoca (PEIB), unidade de conservação (UC), situada no sudeste do estado de Minas Gerais (coordenadas 21°40'-21°44'S, 43°52'-43°55'W), abrangendo os municípios de Lima Duarte, Santa Rita do Ibitipoca e Bias Fortes (RODELA, 1998).

O PEIB é uma das UC's mais visitadas do Brasil (FORZZA et al., 2013), compondo uma das áreas prioritárias para a conservação da flora no Estado, citada no nível mais alto na categoria de importância biológica especial (DRUMMOND et al., 2005). O clima da região de Ibitipoca foi classificado como tropical de altitude mesotérmico, Cwb, segundo a classificação de Köppen (1948), com inverno frio e seco e chuvas elevadas no verão. A pluviosidade anual média é de 2248 mm a 1350 metros de altitude dentro do PEIB (RODELA; TARIFA, 2002). As formas de relevo se caracterizam por escarpas altas ou colinas, com altitudes médias de aproximadamente 1200 a 1800 m (CETEC, 1983). O ponto mais alto da Serra do Ibitipoca é o pico do Ibitipoca (ou Lombada), com 1782 m (CORRÊA NETO et al., 1993).

No PEIB, *Z. maculatum* e *E. secundum* localizam-se nas fitofisionomias caracterizadas como campina lenhosa nebulosa e campina nebulosa, segundo classificação adotada por Oliveira-Filho et al. (2013) para denominar o que é chamado, neste trabalho, de baixa altitude (BA), à 1200 m, e alta altitude (AA), à 1784 m, respectivamente (Figura 1 A e B). A campina lenhosa nebulosa, ou BA, é composta por subarbustos latifoliados e ervas de vida curta a perenes, compondo uma sinúcia mais ou menos contínua, podem ocorrer arbustos esparsos e árvores isoladas. A campina nebulosa, ou AA, é formada por ervas de vida curta a perenes que formam uma sinúcia compacta a esparsa. Podem ocorrer subarbustos e arbustos espalhados, mas árvores são muito raras ou ausentes (OLIVEIRA-FILHO et al., 2013). A diferença entre as duas fitofisionomias é que na campina lenhosa, subarbustos e ervas ocorrem de forma expressiva, enquanto na campina, subarbustos são esparsos ou ausentes, além de predominarem ervas graminoides ou não no relvado. Nas campinas, consideradas campo rupestre propriamente dito (SALIMENA-PIRES; 1997; RODELA; TARIFA, 2001), o solo é pouco desenvolvido, quimicamente pobre e pouco flocculado (ROCHA, 2013), fato

importante, uma vez que as duas espécies estudadas no presente trabalho apresentam hábito terrícola.

Zygopetalum maculatum (subfamília Epidendroideae, subtribo Zygopetalinae) é uma planta perene, saxícola, terrícola, epífita ou rupícola; apresenta pseudobulbo oblongo-ovoide que sustenta suas folhas, que são simples, com ou sem distinção entre lâmina e bainha, e se dispõem de forma alterna, espiralada ou dística no caule. Variam de membranáceas a carnosas e possuem formas variadas. Em geral, as lâminas são dorsiventrais, e alguns representantes possuem lâminas ensiformes e outros, cilíndricas (SCHULTZ, 1968; SOUZA; LORENZI, 2005). Comumente encontrada em borda de floresta ombrófila densa, mata nebulosa e campo de altitude. Floresce no verão e no outono (DRESSLER, 1993; SPRUNGER, 1996; ROMANINI; BARROS, 2008) (Figura 1C e D).

Epidendrum secundum (subfamília Epidendroideae, subtribo Laeliinae) é uma erva perene, terrícola ou epífita com rizoma inconspícuo. Caule ereto, carnoso, cilíndrico, verde, coberto pelas bainhas das folhas, 6-20-foliado. Folhas (dimensões 5-8 × 1-2 cm), dísticas, sésseis, sub-eretas, lanceoladas, verdes, coriáceas, ápice agudo, articulada com as bainhas. Inflorescência em racemo terminal, ereta (AZEVEDO; BERG, 2007). Possui ampla distribuição geográfica, sendo conhecida por toda região Neotropical (PINHEIRO; BARROS, 2007). No Brasil, ocorre no Norte (Roraima, Amapá, Pará, Amazonas, Tocantins), Nordeste (Ceará, Pernambuco, Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro), Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (BARROS et al., 2010). Cresce em locais ensolarados, com substratos pedregosos e arenosos, especialmente em afloramentos rochosos. Ocorre também no interior da mata, em área impactada. Floresce de março a agosto, frutificando a partir de junho (Figura 1E e F). Seus indivíduos são muito variáveis, tanto na forma como no tamanho e cor das flores (HOEHNE, 1953; PABST; DUNGS, 1977; PRIDGEON et al., 2005).

4.3.2 Aferições climáticas

Através de um aparelho Termo-Higro-Anemômetro Luxímetro Digital Portátil Modelo Thal 300, marca Instrutherm, foram aferidas a radiação solar global ($\mu\text{mol. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$), a temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e a umidade relativa do ar (% RH), nas quatro estações do ano: inverno – 30 de agosto de 2013; primavera – 25 de outubro de 2013; verão - 15 de janeiro de 2014 e outono – 1º de maio de 2014.

Em cada estação, foi realizado um dia de aferições climáticas em três turnos por fitofisionomia: manhã (8h30 às 11h30); meio-dia (12h05 às 13h) e tarde (14h50 às 17h20). Em cada fitofisionomia foram aferidas 10 medições para cada variável climática. Esse intervalo de aferição foi necessário devido ao tempo de deslocamento dentro do PEIB.

Dados climáticos de temperatura (°C), umidade relativa do ar (% RH) e velocidade do vento (m/s), dos anos 2011 a 2013, aferidos próximos ao Centro de informação do PEIB, foram fornecidos pelos gestores do Parque, e dados climáticos de radiação (kJ/m²), temperatura (°C), umidade relativa do ar (% RH) e velocidade do vento (m/s), dos anos 2011 a 2014, aferidos pela Estação Climatológica Convencional da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Esses dados foram utilizados a fim de comparação com as aferições realizadas com o Thal 300 nas fitofisionomias que compõem BA e AA do PEIB (Figuras 1- 4).

4.3.3 Procedimentos de coleta do material de estudo

Folhas maduras e totalmente expandidas de *Z. maculatum* e *E. secundum*, todas de hábito terrícola, foram coletadas nas fitofisionomias de BA e AA. As folhas, no momento da coleta, foram acondicionadas em sacos plásticos pretos, para as análises morfoanatômicas, e/ou em envelopes de papel, para as análises químicas e para quantificação de clorofilas. As amostras foram devidamente identificadas e armazenadas em caixa de isopor com gelo, a fim de se evitar a degradação das clorofilas.

Material testemunho de *Z. maculatum* e *E. secundum* estão depositadas no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ) sob os números CESJ 26472 e CESJ 60798, respectivamente.

4.3.4 Análises morfológicas externas e anatômicas

Para as análises morfológicas externas e anatômicas foram coletadas 30 folhas de *Z. maculatum* e 30 folhas de *E. secundum*, entre os 3° e 4° nós (sentido ápice-base dos ramos da planta), de 10 indivíduos de cada espécie, em cada fitofisionomia estudada, nas estações verão, em 08 de fevereiro de 2012, e inverno, em 23 de julho de 2013.

Nessas folhas, retirou-se da região central do terço médio, incluindo a nervura central, uma área equivalente a um quadrado de lado 1,3 cm que foi fixado em FAA 70% (1:1:18 v/v) por 24 horas e conservado em álcool 70% (JOHANSEN, 1940), para posteriores medições anatômicas. Após a retirada dessas áreas, aferiu-se nessas folhas a massa fresca (MF) (g). As folhas, posteriormente, foram prensadas entre jornal e secas em estufa a temperatura de 65°C

até atingirem massa constante, correspondente à massa seca (MS) (g). As massas fresca e seca foram mensuradas com auxílio de balança analítica de precisão (AY220, Marte com ie = 0,001g). A área foliar (AF) (cm²) foi determinada pelo programa Image J, a partir de imagens digitalizadas.

Com os resultados obtidos das medidas supracitadas, foram determinados o conteúdo de água (CA) (MF-MS g), teor de matéria seca (TMS) (100xMS/MF), área específica foliar (AEF) (AF/MS cm².g⁻¹) (WITKOWSKI; LAMONT, 1991), massa específica foliar (MEF) (MS/AF g.cm⁻²), representando o índice de esclerofilia (IE), em que $IE \geq 0,6$ indica esclerófilas, conforme Rizzini (1976) e o grau de suculência (GS) (MF-MS/AF g.cm⁻²). O tamanho foliar seguiu a classificação de Webb (1959).

A densidade estomática (n°. mm⁻²) foi obtida após clarificação das folhas em hipoclorito de sódio 40%. Utilizou-se três campos por folha, totalizando 90 campos para *Z. maculatum* e *E. secundum* para cada fitofisionomia. A densidade estomática foi determinada através da contagem de estômatos presentes numa área de 1 mm², empregando-se microscópio de luz Olympus BX 41, com câmara clara acoplada. A classificação dos estômatos seguiu a terminologia adotada por Rasmussen (1987).

Para as análises qualitativas da superfície epidérmica, amostras da região mediana das folhas de *Z. maculatum* e *E. secundum* de cada fitofisionomia foram dissociadas segundo a técnica de Franklin (1946), que consiste na imersão em solução de água oxigenada 30 volumes e ácido acético glacial, na proporção de 1:1 (v/v) em estufa a 60°C, até o material ficar completamente clarificado e dissociado. Em seguida, o material foi lavado e corado com fucsina básica, sendo montado em gelatina glicerizada (KAISER, 1880) e vedado com lamínula e esmalte de unha incolor.

Para a mensuração de tecidos do limbo, utilizaram-se regiões do terço médio foliar, a partir dos fragmentos conservados em álcool 70%, de trinta folhas de *Z. maculatum* e *E. secundum*, por tratamento. Para a montagem de lâminas temporárias, referentes a esta análise, o material vegetal fixado foi seccionado transversalmente com lâmina de barbear e montado em água.

Nos cortes transversais, à mão livre, da região mediana dos limbos foram medidas as espessuras (µm) da cutícula da face adaxial da epiderme (CAD), epiderme da face adaxial (EAD), da hipoderme da face adaxial (HAD), dos mesófilo (MH) ou parênquima (PA), da hipoderme da face abaxial (HAB), epiderme da face abaxial (EAB), da cutícula da face abaxial da epiderme (CAB) e da espessura total da lâmina (LT). As medições foram realizadas em microscópio de luz Olympus BX 41 com ocular milimetrada. As espessuras

foram definidas pela média de três mensurações por folha. A espessura da cutícula foi classificada conforme proposto por Morris et al. (1996): pouco espessa (menor que 3 μm); moderadamente espessa (de 3-10 μm) e espessa (acima de 10 μm).

Para a análise qualitativa dos limbos, lâminas temporárias foram confeccionadas a partir de cortes à mão livre, corados com azul de astra e fucsina básica e montados em gelatina glicerinada; lâminas permanentes foram preparadas a partir do material processado e incluído em historresina (Leica®), segundo orientação do fabricante. As secções foram feitas em micrótomo de rotação com navalha de aço, com 5 μm de espessura. As lâminas foram coradas com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964). As análises e a descrição do material vegetal montado em lâmina foram realizadas através de microscópio de luz Axio Lab A1 da Carl Zeiss, com câmera digital AxioCam ERc 5s acoplada. O material foi documentado no software AxioVision.

A descrição das estruturas anatômicas foi realizada de acordo com Olatunji e Nengim (1980); Pridgeon (1982); Stern et al. (2004); Stern e Carlsward (2009) e Stern (2014).

4.3.5 Testes histoquímicos

Testes histoquímicos foram realizados em folhas frescas de *Z. maculatum* e *E. secundum* com os reagentes lugol (JENSEN, 1962), sudan III (SASS, 1951), cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) e floroglucinol acidificado (FOSTER, 1949) e vermelho de rutênio (LANGERON, 1949) para verificação de presença de amido, substâncias lipofílicas, substâncias fenólicas, lignina e mucilagem, respectivamente.

4.3.6 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD)

Para a análise química por CLAE-DAD foram coletadas três folhas de três representantes de *Z. maculatum* e *E. secundum* em BA e AA (1 folha/indivíduo/fitofisionomia), inicialmente para uma investigação dos perfis cromatográficos dessas espécies nas estações verão e inverno de 2013. A partir dessa análise preliminar, observou-se que *Z. maculatum* apresentou perfil cromatográfico relevante em relação à presença de flavonoides e para esta espécie foram realizadas coletas em cada estação do ano de 2014 nos meses de janeiro (verão); maio (outono); julho (inverno) e outubro (primavera).

As folhas, após as coletas, foram fracionadas, secas em estufa a 48°C, até atingirem peso constante, pesadas em balança analítica (AY220, Marte) com $ie = 0,001g$, e submetidas à extração com metanol P.A., sempre mantendo-se proporção de 100mg/ml, por três vezes consecutivas. O extrato bruto obtido após evaporação do solvente foi submetido à CLAE, com análise realizada pela Plataforma de Metodologia Analítica de Farmanguinhos (FIOCRUZ-RJ).

Os extratos obtidos das amostras foram analisados no equipamento Shimadzu com duas bombas LC-10A, desgaseificador DGU-12A, injetor automático SIL-10AD, forno de colunas CTO-10A e detector por arranjo de diodos SPD-M10AVP. Os dados foram adquiridos por interface SCL-10A. Aquisição de dados e controle pelo programa Shimadzu CLASS-VP versão 6.13 SP2. Foram injetados 5, 10 ou 20 μL de cada amostra em coluna Supelcosil – C18- 25 cm x 4,6 mm – 5 μm , na presença de coluna guarda do tipo supelcoguard, LC 18 – 2 cm. Foi utilizado um sistema com gradiente linear que consistiu de uma fase móvel: TFA 0,05% em água, iniciando a 5% de acetonitrila e em 60 min chegando a 65% de acetonitrila, 65% a 100% de acetonitrila (60 – 70 min), mantendo os 100% até 80 min. Foi realizado um monitoramento utilizando-se o detector UV em varredura entre 200 a 400 nm, sendo selecionadas as leituras a 220, 270, 335 e 360 nm, das quais posteriormente foi priorizado para comparação química o comprimento de onda a 335 nm.

4.3.7 Quantificação de Clorofilas

Para a quantificação das clorofilas e testes histoquímicos foram coletadas uma folha de três indivíduos de cada espécie (*Z. maculatum* e *E. secundum*) em cada fitofisionomia estudada (1 folha/indivíduo/fitofisionomia). Para determinação e extração das concentrações de clorofilas *a*, *b* e carotenoides, foram retirados discos foliares de uma folha de cada três indivíduos com diâmetro de 1,5 cm, pesados em balança analítica de precisão (Mettler Toledo AB204-S) e macerados em 25 mL de acetona 80% (v/v). Em seguida, o extrato foi filtrado e as leituras das absorbâncias das amostras foram realizadas em cubetas com auxílio de espectrofotômetro (Femto 700S), considerando-se a densidade ótica medida em comprimentos de onda de 663, 647 e 470 nm (LICHTENTHALER, 1987).

4.3.8 Cálculo do índice de plasticidade fenotípica

O índice de plasticidade fenotípica (IPF) foi calculado para cada uma das variáveis: morfológicas (m), anatômicas (a) e fisiológicas (f), e para cada grupo de variáveis (IP a, IP m e IP f), para *Z. maculatum* e *E. secundum*, comparando-se baixa altitude e alta altitude, nas estações verão e inverno, de acordo com Valladares et al. (2000; 2006), onde: $IPF = (\text{máximo} - \text{mínimo}) / \text{máximo}$. O índice de plasticidade total para cada espécie foi calculado pela média entre IP a, IP m e IP f (VALLADARES et al., 2000).

O índice de plasticidade (IP) varia em uma escala de 0 a 1, sendo consideradas muito plásticas as variáveis com $IP > 0,6$ e não plásticas, cujo IP é próximo de 0 (VALLADARES et al., 2006).

4.3.9 Análise Estatística

Foram realizados os testes de Shapiro-Wilk, para averiguação da distribuição normal dos dados e o teste de Levene para averiguação da homocedasticidade das amostras. Quando a distribuição dos dados das amostras não foi normal e/ou as amostras dos grupos não foram homogêneas, aplicou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney (ZAR, 1984).

O nível de significância das variáveis quantitativas, morfológicas, anatômicas, fisiológicas e químicas de *Z. maculatum* e *E. secundum* e variáveis climáticas, radiação solar global, temperatura, umidade relativa do ar e velocidade do vento, foi calculado para as respectivas estações do ano separadamente e em conjunto, somando os dados das estações, pelo teste t-student a 5% de significância. Os valores médios, respectivos desvios-padrão e coeficientes de variação de todas as variáveis foram calculados. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa STATISTICA 7.0 (StatSoft®).

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Aferições climáticas

Conforme justificado e observado nos resultados do capítulo 2, as aferições climáticas do PEIB estiveram com amplitudes climáticas mais extremas que os dados obtidos na estação climatológica da UFJF e as aferições pontuais realizadas nas fitofisionomias (Thal 300), tiveram amplitudes extremas, sendo coerentes e mantendo, na grande maioria das medições, valores constantes, independente da época do ano, exceto na medição de verão onde houve inversão com maiores valores de temperatura em AA, provavelmente devido à também inversão desses valores para radiação solar.

De forma geral, comparando-se as condições climáticas registradas nas fitofisionomias referentes à baixa e alta altitude, foi observado que a umidade relativa do ar e a velocidade do vento apresentaram médias, 25,94% e 70,68%, respectivamente, maiores e estatisticamente significativas na alta altitude. A variável luminosidade foi muito semelhante nos dois ambientes e a temperatura do ar apresentou valor médio 20,92% superior na baixa altitude (Figuras 1-5; Tabela 1).

Ao se compararem as estações do ano quanto à umidade relativa do ar, a única estação em que houve diferença significativa entre os dois ambientes foi a primavera, com UR AR 26,84% maior na alta altitude. A velocidade do vento foi estatisticamente maior na alta altitude em todas as estações (Tabela 1).

Comparando-se as medidas aferidas pelo aparelho Thal 300 com as medidas da estação climatológica de Juiz de Fora, foi observado que os valores referentes à radiação nas baixa e alta altitudes foram superiores aos registrados em Juiz de Fora (Figura 2).

Comparando-se os dados climáticos obtidos através do aparelho Thal 300 com os dados fornecidos pelo PEIB e pela Universidade Federal de Juiz de Fora, quanto à temperatura, umidade relativa do ar e velocidade do vento, observaram-se que os valores médios aferidos pelo Thal 300 para temperatura, aproximaram-se das médias máximas do PEIB e de Juiz de Fora; e para umidade aproximaram-se das médias mínimas do PEIB. Já a velocidade do vento registrada pelo Thal 300, na alta altitude, foi próxima à média do PEIB, e na baixa altitude, foi próxima ou inferior à de Juiz de Fora (Figuras 3, 4 e 5).

Dentre as quatro estações, as maiores médias para velocidade do vento e para umidade relativa do ar foram observadas na alta altitude, no outono (Tabela 1).

4.4.2 Descrição da morfologia externa e anatomia da lâmina foliar

4.4.2.1 *Zygopetalum maculatum* (Kunth) Garay

Folha linear, plicada, glabra, com nervuras proeminentes, notófila (38,19-46,42 cm²), com ápice agudo e margem inteira (Figura 6C).

Em secção transversal, a folha apresenta cutícula moderadamente espessa em ambas as faces da epiderme, sendo mais espessa na face adaxial. A epiderme é uniestratificada em ambas as faces, com as células da face adaxial mais altas que as células da face abaxial (Tabela 2; Figura 7A-B, D). Estômatos situam-se em um mesmo nível das demais células epidérmicas. As células-guarda apresentam espessamento de cutina nas paredes voltadas para a câmara subestomática. Cristas estomáticas ocorrem sobre o poro estomático, formando uma câmara supraestomática (Figura 7C). O mesofilo é homogêneo, constituído por aproximadamente dez camadas de células de formato arredondado, com alguns espaços intercelulares (Figura 7D).

Todos os feixes vasculares são colaterais e são margeados por células esclerificadas, sendo que as localizadas nos pólos dos feixes tendem a apresentar parede mais espessa. O feixe vascular central é consideravelmente maior que os demais, ocupando toda a espessura da folha. Os feixes vasculares colaterais de menor calibre são alinhados na região central do mesofilo, pouco mais deslocados para a face abaxial da lâmina (Figura 7D).

A folha é hipostomática e através de corte paradérmico, observam-se estômatos tetracíticos, células epidérmicas com formato poligonal, alongadas no sentido do comprimento foliar, e parede anticlinal reta em ambas as faces (Figura 7E-G).

4.4.2.2 *Epidendrum secundum* Jacq.

Folha elíptica-oblonga, carnosa, mais ou menos coriácea, glabra, micrófila (2,25-20,25 cm²), com ápice arredondado e margem inteira (Figura 6E).

Em secção transversal, a folha apresenta cutícula espessa na face adaxial e moderadamente espessa na face abaxial. A epiderme é uniestratificada em ambas as faces, com as células da face adaxial mais altas que as células da face abaxial. Estômatos situam-se em um mesmo nível das demais células epidérmicas. Interna à epiderme há, em ambas as faces, uma hipoderme aquífera, constituída por células arredondadas a periclinamente alongadas. Fibras esclerenquimáticas interrompem a hipoderme em ambas as faces e adentram o mesofilo na face abaxial (Tabela 3; Figura 7H, J). O mesofilo é homogêneo,

constituído por aproximadamente quinze camadas de células alongadas anticlinalmente; suas células apresentam-se entremeadas por idioblastos traqueoidais com espessamento lignificado de parede secundária em espiral, próximos à face abaxial da lâmina foliar (Figura 7I). Todos os feixes vasculares são colaterais e estão margeados por células esclerificadas e alinhados na região central do mesofilo, um pouco mais deslocados para a face adaxial da lâmina. Idioblastos traqueoidais próximos aos feixes vasculares apresentam espessamento lignificado de parede secundária reticulado (Figura 7H-I).

A folha é hipoestomática e, através de corte paradérmico, observam-se estômatos tetracíticos ou, raramente, anomocíticos. As células epidérmicas apresentam parede anticlinal reta em ambas as faces (Figura 7K-L).

4.4.3 Testes histoquímicos

Os testes histoquímicos foram positivos para substâncias lipofílicas, destacando as cutículas em ambas as faces das folhas de *Z. maculatum* (Figura 7A-B) e *E. secundum*, e para ligninas, observadas nas duas espécies, nos grupos de fibras margeando os feixes vasculares e, em *E. secundum*, nos grupos de fibras entremeados à hipoderme de ambas as faces e nos espessamentos de parede secundária helicoidal dos idioblastos traqueoidais.

4.4.4 Produção de metabólitos especiais

Dentre as diferentes substâncias detectadas a partir das análises no sistema cromatográfico empregado, destacou-se o grupo químico dos flavonoides em *Z. maculatum*. A figura 9 apresenta os espectros em UV dos quatro flavonoides detectados majoritariamente. *Epidendrum secundum* não apresentou perfil cromatográfico relevante em relação a substâncias detectadas nas três repetições dentre as fitofisionomias comparadas.

Comparando-se BA e AA, desconsiderando-se as épocas de coleta, foi encontrada maior quantidade relativa de flavonoides detectados (não significativa) na BA para *Z. maculatum* (Tabela 4).

Comparando-se a quantidade relativa de flavonoides, entre BA e AA, para *Z. maculatum*, nas quatro estações analisadas, diferenças significativas foram observadas no verão e primavera, com maiores valores na BA, e no inverno, com maior valor na AA (Tabela 4).

4.4.5 Respostas biótico-quantitativas

Comparando-se as respostas obtidas para *Z. maculatum* e *E. secundum* nas BA e AA, no verão e inverno, constatou-se que cada uma dessas espécies apresentaram estratégias diferenciadas quanto às variáveis morfológicas externas e anatômicas, fisiológicas e químicas. Não sendo possível definir um padrão de resposta comum às duas espécies (Tabelas 2 e 3).

Comparando-se BA e AA em uma análise geral, ou seja, aumentando-se o n amostral, considerando-se os valores obtidos a partir das coletas de verão e inverno, conjuntamente, *Z. maculatum* e *E. secundum* apresentaram respostas similares para as variáveis: MF, TMS, CA e GS; todas, com exceção de TMS, com valores maiores e estatisticamente significativos na AA.

Entre *Z. maculatum* e *E. secundum*, respectivamente, a MF foi significativamente maior (16,49% e 46,56%) na AA; o CA foi significativamente maior (30,7% e 48,52%) na AA; o GS foi significativamente maior (22,23% e 17,65%) na AA e o TMS foi significativamente maior (27,67% e 20,39%) na BA.

Zygopetalum maculatum apresentou diferenças estatisticamente significativas, entre BA e AA, além das anteriormente citadas, também para AFE, MFE, EAD, Cl *a*, Cl *b* e Cl *t*, sendo AFE e MFE também significativamente diferentes nas duas estações. As variáveis MH e EAB apresentaram diferenças significativas somente no verão. As variáveis MS e LT apresentaram diferenças significativas somente no inverno. Houve diferenças significativas apenas nas estações verão e inverno para MS (Tabela 2).

Epidendrum secundum apresentou diferenças significativas entre BA e AA, além das anteriormente citadas, também para MS, AF, HAD, HAB, EAB, CAB e DE, sendo AF também significativamente diferente nas duas estações. A variável MFE apresentou diferenças significativas somente no verão. A variável Cl *t*/carot apresentou diferenças significativas somente no inverno. Houve diferenças significativas apenas no verão e inverno para AFE, MH e LT (Tabela 3).

4.4.6 Índice de plasticidade fenotípica

Os resultados referentes ao cálculo do índice de plasticidade fenotípica (IPF) para *Z. maculatum* e *E. secundum* indicaram que as duas espécies apresentaram plasticidade fenotípica semelhante para a média do IP dos três grupos de variáveis analisadas

(morfológicas, anatômicas e fisiológicas), com $IP = 0,20$ para *Z. maculatum* e $IP = 0,28$ para *E. secundum*.

Comparando-se as duas espécies, quanto ao IP calculado para cada grupo de variável, *E. secundum* apresentou maiores valores para os três grupos. Nas duas espécies, o grupo das variáveis anatômicas foi o menos plástico quando comparadas aos outros grupos de variáveis: $IP_a < IP_m < IP_f$. Para *Z. maculatum*, o IP_a foi considerado não plástico ($IP_a < 0,1$).

As duas espécies apresentaram semelhanças quanto ao número de variáveis não plásticas (com $IP < 0,1$), sendo elas: MH, LT e Cl *t/carot* para *Z. maculatum*; AFE e ADE para *E. secundum*, e CAD, EAB e DE em comum para as duas espécies (Tabela 5).

4.5 DISCUSSÃO

As condições climáticas constatadas nesta pesquisa foram semelhantes à encontradas em um amplo estudo sobre o clima da área da Serra do Ibitipoca, realizado por Rodela e Tarifa (2002), no qual observou-se que em regiões acima de 1.500 m de altitude, onde se localizam as chamadas escarpas de anticlinais, neste trabalho representadas pela fitofisionomia campina nebulosa (AA), ocorrem ventos intensos e descendentes, que contribuem com menores temperaturas e diminuição da nebulosidade, esta última contrária ao observado no presente trabalho. A presença de fortes rajadas de vento na alta altitude, especialmente registradas no outono (Tabela 1 e Figura 3), estão associadas à maior umidade relativa do ar também observada nesta estação (Tabela 1), condição também relatada em um estudo com Orchidaceae no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro que, assim como o PEIB, faz parte do complexo serrano da Mantiqueira (BENITES et al., 2003; SILVA et al., 2006).

A condição edáfica também é um importante fator a se considerar nas respostas apresentadas por *Z. maculatum* e *E. secundum*, uma vez que ambas apresentam hábito terrícola. Na BA, as orquídeas se desenvolveram diretamente sobre rochas quartzíticas maciças ou em processo de intemperismo físico. Na AA, elas encontravam-se em solo do tipo Cambissolo álico Tb A moderado relevo forte ondulado sob campo rupestre substrato quartzito, caracterizado como um solo pouco desenvolvido, com horizonte B câmbico, quimicamente pobre e pouco floclulado, com presença de quartzo e caulinita (ROCHA, 2013). Mesmo que esse solo apresente elementos que contribuam para escoamento superficial da água (SARTORI et al., 2005), as plantas da AA têm acesso à maior umidade proveniente

desse substrato, por causa da disponibilidade de água das chuvas da época do verão (SILVA et al., 2006).

Dessa forma, em BA, as condições climáticas, representadas, principalmente, pela menor umidade relativa do ar, e edáficas, representadas pelo crescimento dessas orquídeas diretamente nos afloramentos rochosos, permitem considerar essa fitofisionomia mais xérica em relação à AA. Os altos valores para velocidade do vento na AA poderiam supor maior déficit hídrico, porém o aumento da velocidade do vento foi proporcional ao aumento da umidade relativa do ar, permitindo inferir que o vento contribuiu mais para difundir a nebulosidade do que como uma massa seca, que poderia retirar umidade das plantas.

Epidendrum secundum apresentou-se mais xeromorfa que *Z. maculatum*, sendo os caracteres que permitiram tal observação presentes, independente da fitofisionomia em que habitava. Esses caracteres se expressaram morfológicamente pelo tamanho reduzido das folhas (micrófilas) e à espessura da lâmina foliar (Tabelas 3 e); e, anatomicamente pela espessura da cutícula da face adaxial da epiderme, hipoderme em ambas as faces entremeada por grupos de fibras e mesofilo homogêneo espesso portador de idioblastos traqueoidais. As folhas das plantas que se desenvolvem em solos arenosos e bem drenados tendem a apresentar menor área foliar, aumento da espessura da lâmina e hipoderme (TANNER; KAPOV, 1982; TURNER et al., 1995) como respostas aos processos de lixiviação, que acarretam, além de pouca disponibilidade de água, menor conteúdo de nutrientes (TURNER et al., 1995; BOEGER; WISNIEWSKI, 2002).

Estudos em diferentes localidades com *E. secundum* consideraram sua cutícula sempre espessa (SILVA et al., 2006; MOREIRA et al., 2013), como observado no presente trabalho, o que parece ser um caráter taxonômico para a espécie. Em *E. secundum*, os grupos de fibras próximos às faces da folha também foram observados nessa mesma região em folhas das orquídeas *Miltonia regnellii* (Lindl.) Rchb. f. (DETTKE et al., 2008), *Cattleya walkeriana* Gardn. (SILVA; MILANEZE-GUTIERRE, 2004) e em *E. secundum* estudada por Moreira et al. (2003) e Silva et al. (2006). Esses grupos de fibras auxiliam no suporte mecânico da folha, e sua presença é comum nos membros de Orchidaceae (SILVA et al., 2006), havendo, porém exceções, como em *Z. maculatum*.

Mesofilo espesso e portador de idioblastos com paredes secundárias espessadas, observado em *E. secundum*, geralmente está relacionado à suculência foliar, que, por sua vez, associa-se ao metabolismo ácido das crassuláceas (CAM). Nesse sentido, no presente estudo é suposta a ocorrência desse tipo de fotossíntese com base apenas em aspectos anatômicos o

que corrobora o estudo de Moreira et al. (2013), que indicam que essa espécie apresenta todo o aparato estrutural que propicia esse tipo alternativo de metabolismo fotossintético.

Idioblastos traqueoidais, observados no parênquima das folhas de *E. secundum*, são células comumente encontradas no mesofilo e que apresentam parede secundária espessada de forma anelar, espiral, pontuada ou reticulada (FOSTER, 1956; WITHNER et al., 1974), com formato que varia de globoso, ovoide, elipsoide a cilíndrico ou alongado. Essas células não apresentam nenhuma relação com as células do sistema vascular, sendo essa denominação devida apenas a sua semelhança com os traqueídes (OLATUNJI; NENGIM, 1980). Sua ocorrência para algumas espécies de *Epidendrum* sp. foi inicialmente registrada por Pirwitz (1931) e, assim, como neste trabalho, encontradas por Moreira et al. (2013) para *E. secundum*. Contudo, de acordo com esta última citação, *E. secundum* possuiu hábito epifítico e idioblastos traqueoidais com espessamento reticulado, em contrapartida, no presente trabalho, o hábito dessa mesma espécie foi terrícola e o espessamento de seus idioblastos foi espiralado e reticulado apenas quando estes estavam associados dos feixes vasculares.

Em um trabalho sobre ocorrência e distribuição de elementos traqueoidais em 88 espécies de orquídeas do Oeste da África, constatou-se para todas as espécies que eram epífitas a presença dessas estruturas, relacionando-se sua ocorrência a *habitats* secos, nos quais a conservação e retenção de água podem ser cruciais. Esses elementos provem suporte mecânico ao tecido parenquimático ao redor deles e a parede secundária espessada auxilia na prevenção contra o colapso das células nos períodos de seca intensa, quando a probabilidade de dessecação é maior (OLATUNJI; NENGIM, 1980). Apesar de os indivíduos de *E. secundum* investigados neste trabalho serem todos terrícolas, em contrapartida às orquídeas epífitas daquele trabalho em que se detectou idioblastos traqueoidais, eles estavam igualmente sujeitos à escassez de água nos substratos em que habitavam no PEIB.

Em contrapartida aos caracteres xeromorfos citados para *E. secundum*, que parecem apresentar uma menor amplitude fenotípica, nas duas espécies estudadas no presente trabalho ocorreram respostas quanto ao maior déficit hídrico constatado na BA, à nível morfológico, anatômico e fisiológico. Esta consideração auxiliou na compreensão de que *Z. maculatum* e *E. secundum* apresentaram adaptações foliares semelhantes, e uma relação de proporcionalidade, quanto à variáveis: MF, CA e GS, e de *E. secundum* apresentar HAD, MH e HAB, todas significativamente menores na BA.

A entrada de água nas plantas ocorre por absorção através da superfície do vegetal, embora em maior parte seja proveniente do solo (PAIVA; OLIVEIRA, 2006). Aparentemente, na AA, as maiores ofertas de água no ar atmosférico e no solo, capacitaram

as folhas desse ambiente a armazenarem mais água, pela expansão celular e pelo aumento de camadas de células armazenadoras de água, resultando em maior quantidade de biomassa verde (MF), uma vez que cerca de 80 a 90% da massa fresca de uma planta herbácea, como é o caso das espécies estudadas no presente trabalho, são representados pela água (SILVA; FREITAS, 1998). Assim, os maiores valores para MF na AA, associados às maiores espessuras da EAD em *Z. maculatum* e das HAD, HAB e MH em *E. secundum*, indicaram, também, maior GS, como um fator adicional de prevenção aos ventos mais intensos na AA e sua possível influência no aumento das taxas de evaporação nas superfícies foliares (KÖRNER, 2007).

Dessa forma, a maior disponibilidade hídrica na AA favoreceu o desenvolvimento celular da EAD em *Z. maculatum* (Tabela 2), resultando em células mais volumosas (FEI et al., 1999) e mais altas, devido ao maior acúmulo de água (KURZWEIL et al., 1994). Outra possibilidade para esse aumento na espessura da epiderme é a relação que se estabelece como um fator de prevenção à perda de água (MELO JÚNIOR et al., 2012), possivelmente por causa dos ventos mais intensos na AA. Em contrapartida, um menor volume celular parece ser a principal resposta à condição de maior déficit hídrico (CUTLER et al., 1977), característica da baixa altitude, pois células menores apresentam maior resistência à pressão negativa de turgor (FAHN; CUTLER, 1992) devido à maior elasticidade (CASTRO-JIMENEZ et al., 1989). Em um estudo de anatomia foliar em resposta a adaptação à seca de várias eudicotiledôneas nas regiões do Tibet e da Mongólia, observou-se que o volume das células do mesofilo foi a variável que estatisticamente mais se modificou entre os ambientes estudados, apresentando-se duas vezes menor nas regiões áridas que compreendem o Planalto Interior da Mongólia em relação às frias regiões Tibetanas (MA et al., 2012). A densidade estomática maior e estatisticamente significativa para *E. secundum* na BA, provavelmente ocorreu em resposta às condições mais xéricas enfrentadas nesse ambiente em comparação com a alta altitude. Essa resposta adaptativa é uma estratégia adotada para reduzir a transpiração sob condições de menor disponibilidade de água (SANTIAGO et al., 2001; SOUZA et al., 2007; CASTRO et al., 2009), pois aumentando-se o número de estômatos de menores dimensão, o tempo de abertura dos mesmos pode ser reduzido, minimizando a perda de água na forma de vapor, sem comprometimento da eficiência fotossintética foliar (EVANS; POORTER, 2001).

Além das variáveis anteriormente comentadas, que foram comuns a ambas espécies, os maiores valores apresentados por *Z. maculatum* para AFE, ADE, Cl *a*, Cl *b* e Cl *t*, na AA e

para MFE na BA, também relacionam-se às diferentes disponibilidades hídricas nesses ambientes.

AFE é uma relação inversa ao Índice de esclerofilia (MFE). Assim, o maior valor para MFE na BA corresponde a um maior investimento de tecido esclerenquimático, que confere maior resistência mecânica à folha em casos de desidratação (BONATES, 1993; PRIDGEON, 1994; OLIVEIRA; SAJO, 1999; STERN; CARLSWARD, 2004), sendo essa característica produção vantajosa contra a perda de água (YENTÜR, 2003).

Os menores conteúdos de Cl *a*, Cl *b* e Cl *t* são uma resposta fisiológica relacionada também ao menor conteúdo de água presente nas folhas das plantas crescidas na BA, dados corroborados por um estudo realizado na Turquia em que, para se verificar o efeito do déficit hídrico numa espécie de soja, as plantas foram cultivadas em regiões áridas, verificando-se que quando a irrigação foi suspensa por dez dias, o conteúdo de clorofila total diminuiu significativamente, em resposta ao menor potencial hídrico presente nas folhas (MAKBUL et al., 2011). Tal condição permite inferir que há correlação entre a produção de biomassa foliar, teor de clorofilas e taxa fotossintética (TAIZ; ZEIGER, 2009), que aparentemente foram maiores no presente estudo na AA, devido à maior disponibilidade hídrica (WACHOWICZ et al., 2002).

O aumento em MS na AA pode relacionar-se também a uma maior AF, uma consequência da maior produção de MF, proporcionada pela maior disponibilidade de água nessa fitofisionomia. Sabe-se que as plantas, para melhor se estabelecerem num ambiente, podem adotar diferentes estratégias de alocação de biomassa, ou taxa líquida de carbono, seja expandindo a lâmina foliar ou investindo em tecido de suporte (LI et al., 2008), sendo que, no caso de *E. secundum*, os dois fatores aconteceram, ou seja, a folha se tornou mais ampla e teve maior investimento em esclerênquima para sustentá-la. Exemplo parecido ocorreu em um estudo relacionado a respostas adaptativas da vegetação ao longo de um gradiente de altitude, variando ente 350 m a 1506 m, conduzido na reserva Mt. Tianmu Nature, na China, no qual observou-se uma relação positiva entre a massa e a área foliar, com valores significativamente maiores na altitude mais elevada, sujeita a ventos mais fortes, uma vez que as folhas maiores direcionaram maior fração de alocação de biomassa para a construção de tecidos de suporte da lâmina, proporcionando estabilidade mecânica (PAN et al., 2013).

Maiores EAB e CAB, na BA para *E. secundum*, indicam, respectivamente, possibilidade de maior acúmulo de água e prevenção contra perda de água pela face abaxial da folha, conferindo proteção adicional também aos estômatos, uma vez que se trata de folha hipostomática.

Além dos investimentos estruturais decorrentes do metabolismo primário, comentados anteriormente, as plantas podem produzir flavonoides, dentre outras substâncias do metabolismo especial ou secundário, em resposta à proteção contra o estresse oxidativo e contra a formação de radicais livres de oxigênio (GOTLIEB et al., 1996) ou ainda, dentre outros, como resposta específica a condições estressantes edáficas e climáticas (YAMASAKI et al., 1997; GOBBO NETO; LOPES, 2007;).

A correlação positiva que geralmente se estabelece entre altitude e produção de substâncias fenólicas é devido a maior susceptibilidade das plantas à radiação UV em altitudes maiores, o que desencadeia, normalmente, a produção de flavonoides (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Entretanto, não houve diferença significativa na quantidade de radiação solar aferida no presente estudo entre as duas altitudes, o que pode explicar a ausência de diferenças nos teores relativos de flavonoides produzidos pelas folhas de *Z. maculatum* nas fitofisionomias estudadas na análise geral. Fato também confirmado em um estudo com *Fagus sylvatica* L. (Fagaceae), situada em diferentes altitudes da Montanha Hrubý Jeseník, na República Tcheca (RAJSNEROVÁ et al., 2015). Conforme estes autores, maiores taxas fotossintéticas tendem a acarretar maiores teores de flavonoides, entretanto, no presente estudo os maiores teores de clorofilas a, b e total, que poderiam acarretar aumento da taxa fotossintética em *Z. maculatum* em AA, ou seja, aumento do metabolismo primário, não foi significativo e conseqüentemente não geraram diferenças nos teores relativos de flavonoides, comparando as duas fitofisionomias.

Diferente de *Z. maculatum*, para *E. secundum* não foram detectados derivados flavonoídicos no sistema cromatográfico empregado no presente trabalho, resultado também encontrado em avaliação histoquímica de *E. secundum*, espécie epifítica em ambientes de florestas nebulares de campos rupestres da Serra da Piedade, Brasil, demonstrando que essa espécie não apresentou plasticidade fenotípica com base na produção desse grupo químico (MOREIRA et al., 2013).

Os resultados encontrados mostraram que *E. secundum* e *Z. maculatum* investiram em estratégias de sobrevivência específicas para enfrentar as diferenças abióticas entre as duas fitofisionomias. *Zygopetalum maculatum*, com plasticidade morfológica e anatômica menor que *E. secundum*, investiu, adicionalmente, em respostas químicas, uma vez que o carbono pode ser redirecionado da rota de síntese de metabólitos primários para a síntese de metabólitos secundários, por exemplo flavonoides, como uma defesa ao déficit hídrico (KIRAKOSYAN et al., 2004; ABREU; MAZZAFERA, 2005).

Na interpretação do metabolismo especial como mecanismo de defesa, há autores que citam que a planta priorizará o metabolismo primário (crescimento vegetativo em condições ambientais propícias) ou priorizará a defesa química (condições ambientais desfavoráveis ao crescimento) (BROWN JR., 1988; GOBBO-NETO, 2007). Na análise geral, a maior quantidade relativa de flavonoides (não significativa) foi observada em BA. Nessa mesma análise geral, os fatores climáticos que apresentaram diferenças significativas foram umidade e velocidade do vento, maiores em AA (o vento associado à nebulosidade). Portanto, a produção de flavonoides esteve coerentemente relacionada com condições ambientais desfavoráveis ao crescimento, corroborado com os autores acima citados. Alguns trabalhos mostraram influência significativa da disponibilidade hídrica na produção de flavonoides, sendo que, na literatura não há consenso se essa condição aumenta ou reduz a sua síntese pela planta. Em *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) em condições de déficit hídrico antes da colheita, constatou-se que a escassez de água contribuiu para um decréscimo na síntese destes constituintes (ALVARENGA et al., 2011). Por outro lado, a deficiência hídrica causou, nas folhas de *Crataegus laevigata* (Poir.) DC. (Rosaceae), aumento nas concentrações dos flavonoides vitexina, hiperosídeo e rutina (KIRAKOSYAN et al., 2004).

4.6 CONSIDERAÇÕES

A relativa abundância com que essas espécies foram encontradas nas fitofisionomias estudadas no PEIB indica que elas estão bem adaptadas ao clima e ao solo locais. *Epidendrum secundum* apresentou valor mais elevado de plasticidade fenotípica para um maior número de variáveis em relação à *Z. maculatum*, e esse resultado é corroborado pela maior amplitude de distribuição geográfica registrada para *E. secundum*.

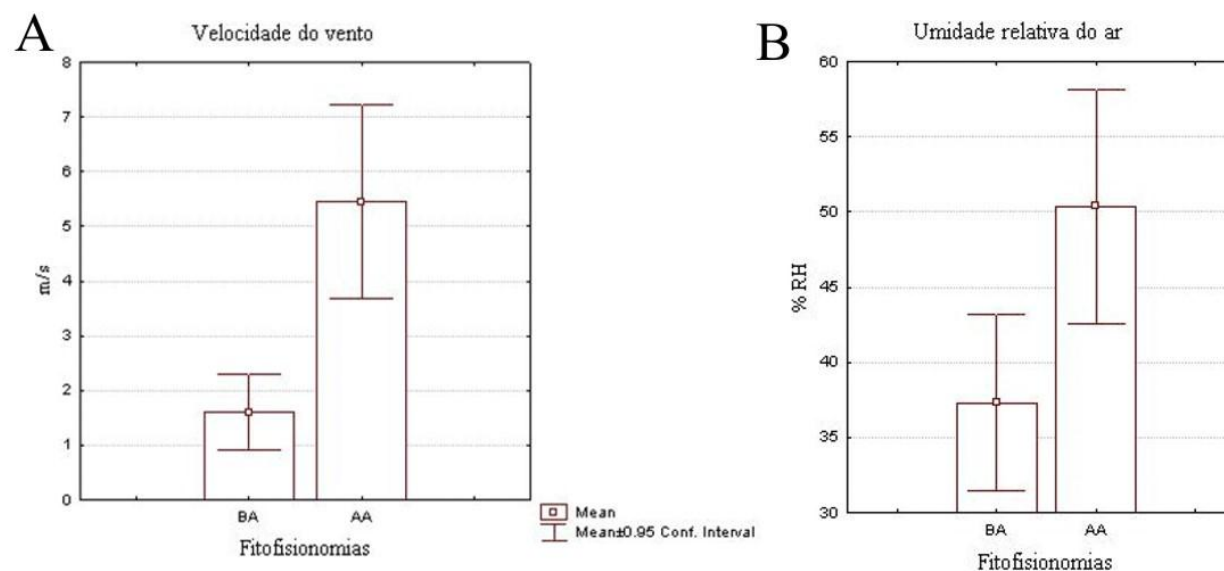


Figura 1. A-B. Condições climáticas do Parque Estadual do Ibitipoca, relativas à velocidade do vento e à umidade, respectivamente, aferidas em quatro estações do ano, durante o período de julho de 2013 a maio de 2014. BA= baixa altitude e AA = alta altitude

Tabela 1- Valores médios, respectivos desvios-padrão (entre parênteses) e coeficientes de variação das variáveis ambientais, luminosidade (LUM - $\mu\text{mol. m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), temperatura (TEMP - $^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar (UMID - % RH) e velocidade do vento (VEL V – m/s) (n=3), nas fitofisionomias, baixa altitude (BA) e alta altitude (AA), nas estações verão, outono, inverno e primavera. Letras diferentes para cada estação e para a mesma variável por linha significam que os valores são estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

	BA verão	CV%	AA verão	CV%	BA outono	CV%	AA outono	CV%	BA inverno	CV%	AA inverno	CV%	BA primavera	CV%	AA primavera	CV%
LUM	1785.66 (± 371.23) a	0.21	1985 (± 15) a	0.01	1991.5 (± 7.85) a	0.04	1950 (± 50) a	0.03	1723.66 (± 478.62) a	0.28	1562.25 (± 437.75) a	0.28	1733.66 (± 414.58) a	0.24	1664.75 (± 185.25) a	0.11
TEMP	37.86 (± 11.15) a	0.29	34.6 (± 5.1) a	0.15	27.9 (± 4.88) a	0.17	19.2 (± 7.3) a	0.38	25.8 (± 3.81) a	0.15	21 (± 5.6) a	0.27	33.13 (± 3.97) a	0.12	23.8 (± 0.8) a	0.03
UMID	33.66 (± 15.87) a	0.47	39.7 (± 6.7) a	0.17	37.73 (± 7.27) a	0.19	55.1 (± 17.7) a	0.32	37.73 (± 8.29) a	0.22	51.9 (± 17.5) a	0.34	40.06 (± 7.74) a	0.19	54.75 (± 1.25) b	0.02
VEL V	0.89 (± 0.32) a	0.36	2.76 (0.04) b	0.01	2.76 (± 1.7) a	0.62	9.4 (± 1.7) b	0.18	1.33 (± 0.77) a	0.1	5.05 (± 1.75) b	0.28	1.43 (± 0.15) a	0.58	4.6 (± 1.3) b	0.35

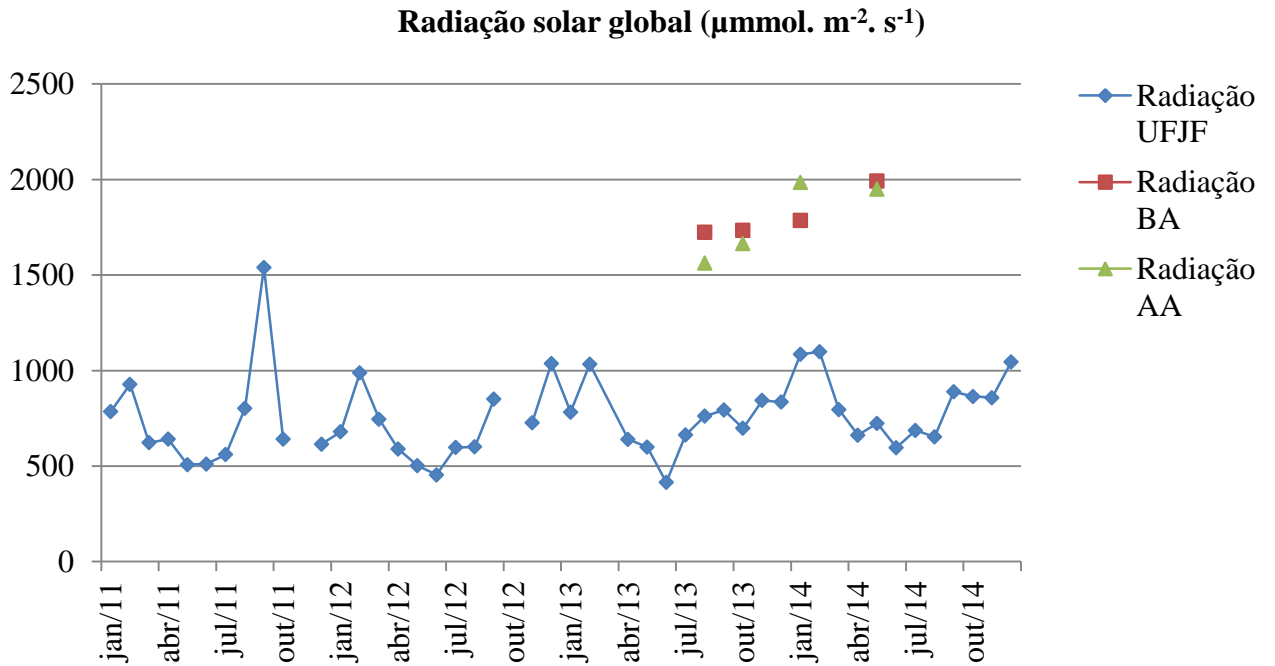


Figura 2. Comparação da radiação solar global entre Juiz de Fora e os locais de estudo no Parque Estadual do Ibitipoca, baixa altitude (BA) e alta altitude (AA) entre julho de 2013 a maio de 2014

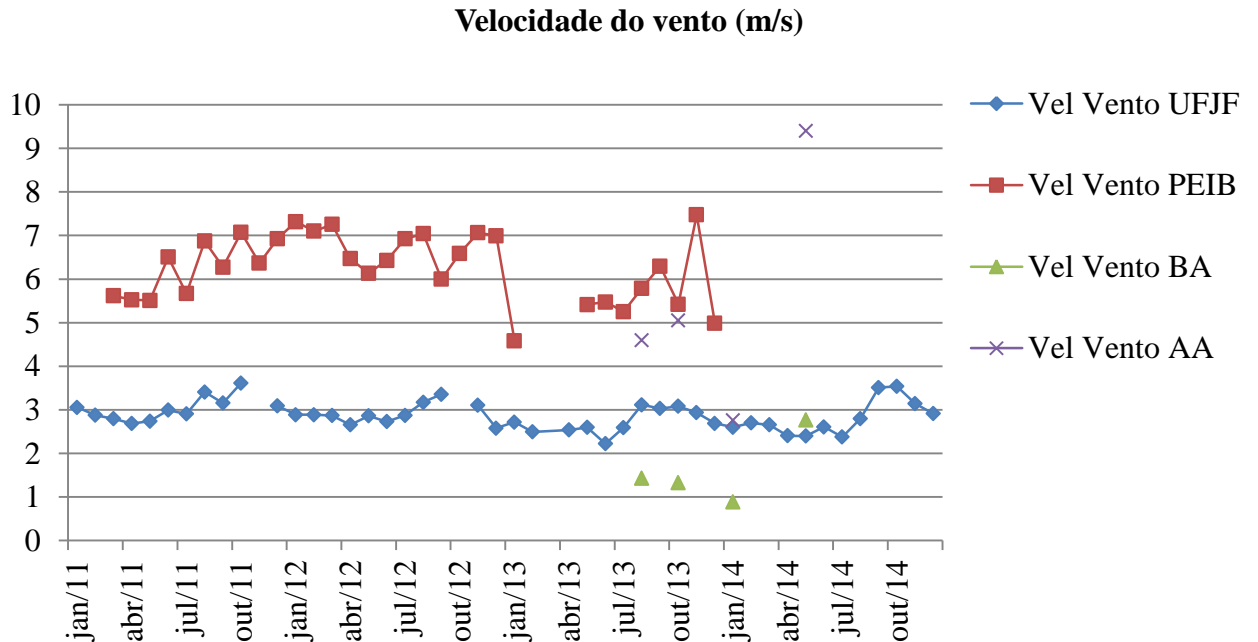


Figura 3. Comparação da temperatura entre Juiz de Fora e os locais de estudo no Parque Estadual do Ibitipoca, baixa altitude (BA) e alta altitude (AA) entre julho de 2013 a maio de 2014

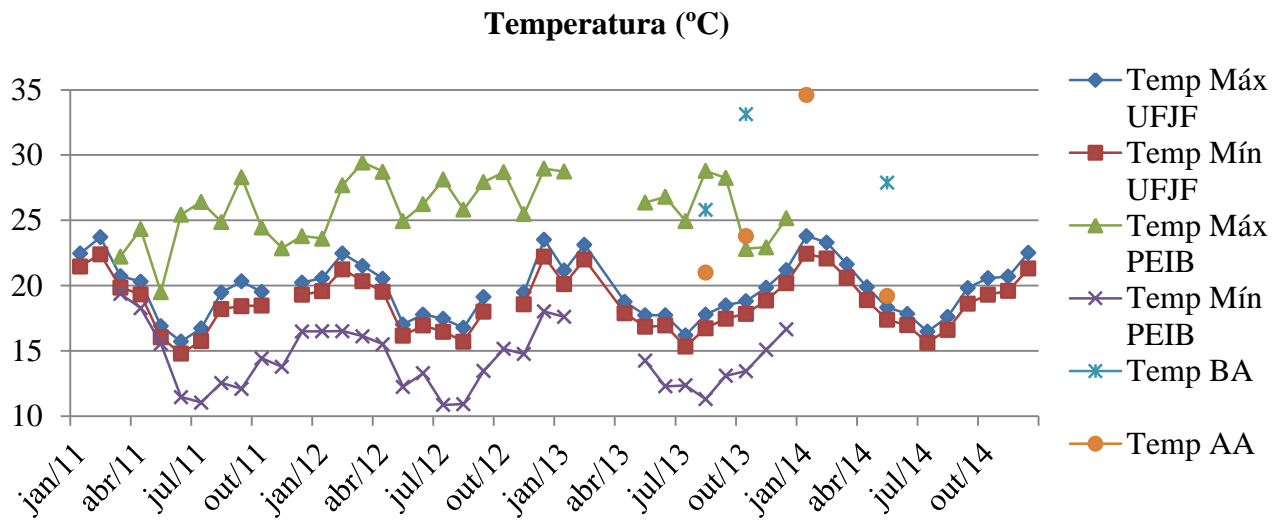


Figura 4. Comparação da umidade relativa do ar entre Juiz de Fora e os locais de estudo no Parque Estadual do Ibitipoca, baixa altitude (BA) e alta altitude (AA) entre julho de 2013 a maio de 2014

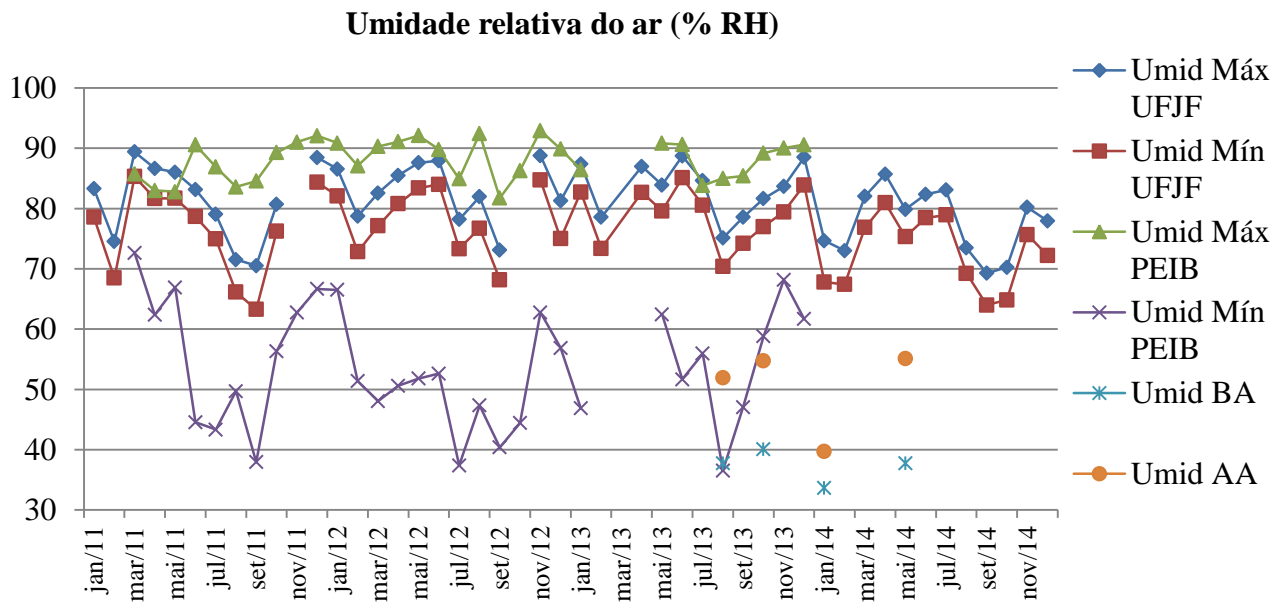


Figura 5. Comparação da velocidade do vento entre Juiz de Fora, o Parque Estadual do Ibitipoca e as fitofisionomias da baixa altitude (BA) e alta altitude (AA) no período de março de 2011 a dezembro de 2013

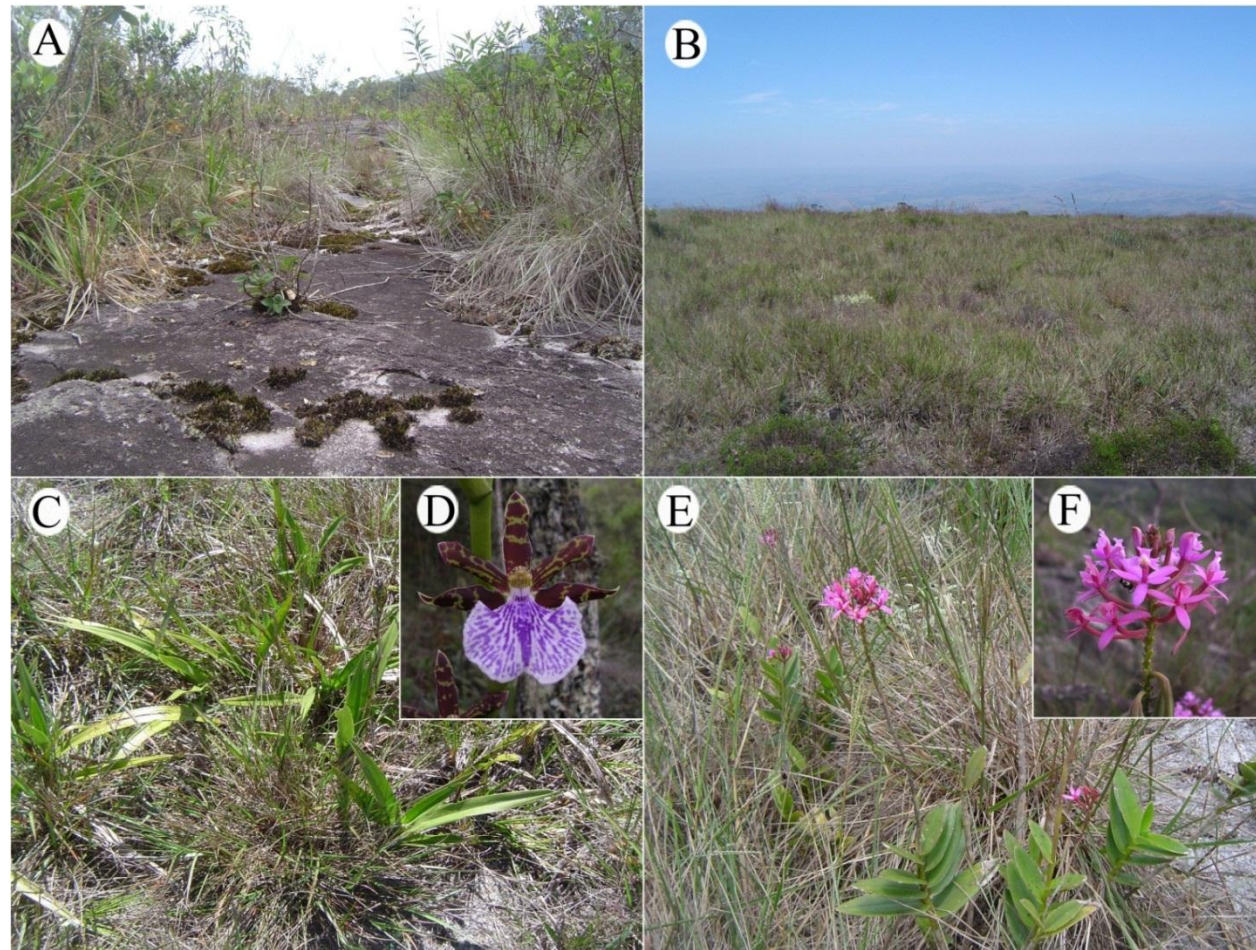


Figura 6. A. Aspecto geral Baixa Altitude (BA) e B. Aspecto geral Alta Altitude (AA) do PEIB. C e D. Hábito e detalhe da flor de *Zygopetalum maculatum*, respectivamente; E e F. Hábito e detalhe da flor de *Epidendrum secundum*, respectivamente

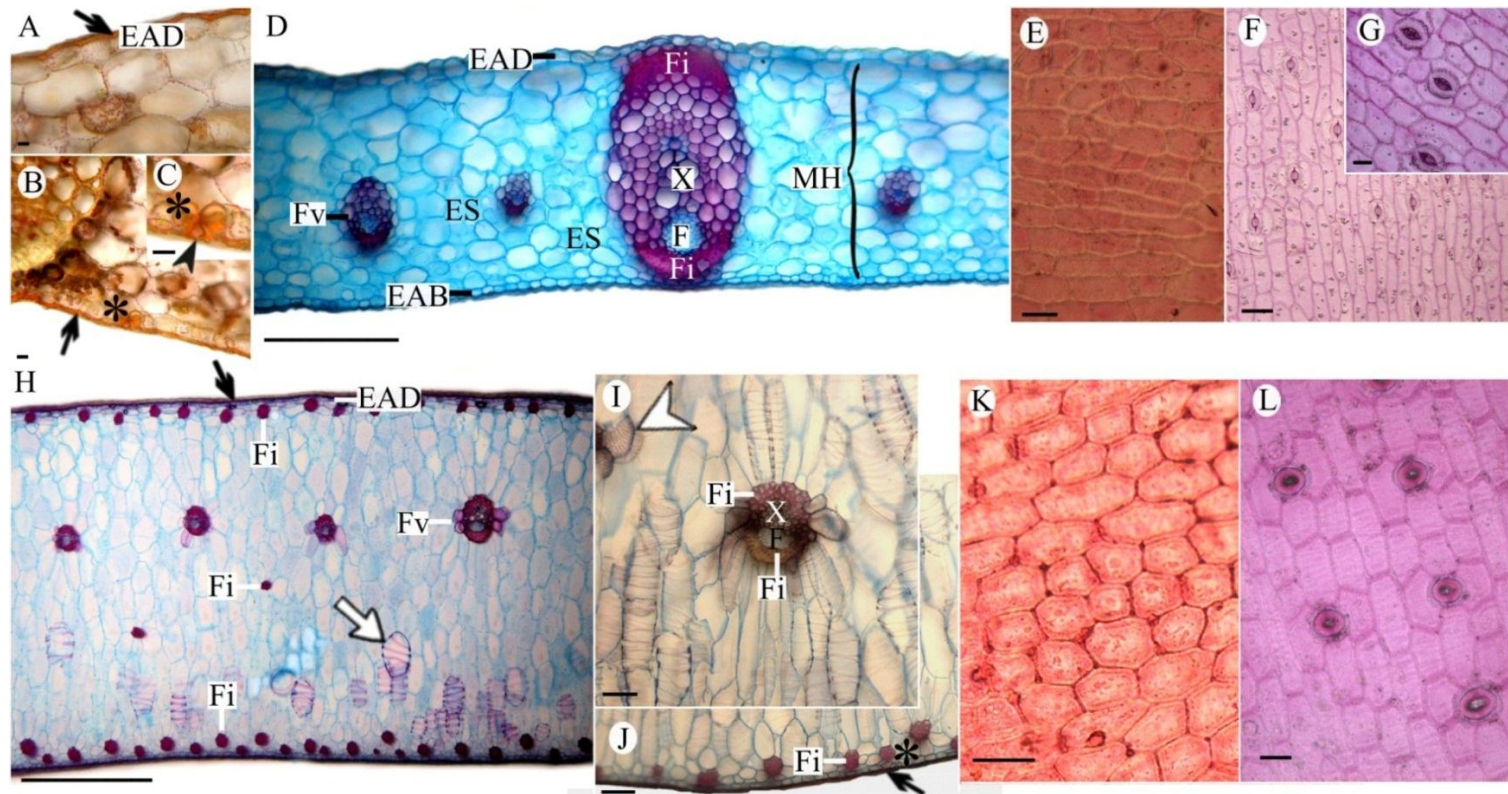


Figura 7. A-G. *Zygopetalum maculatum* (Kunth) Garay. A-C. Cortes transversais da lâmina foliar mostrando cutícula destacada por Sudan III. C. Detalhe do estômato. D. Corte transversal da lâmina foliar corado com azul de astra e fucsina básica. E-G. Face adaxial (E) e abaxial (F-G) da lâmina foliar em vista paradérmica, corados com fucsina básica. H-L. *Epidendrum secundum* Jacq. H-J. Cortes transversais da lâmina foliar corados com azul de astra e fucsina básica. K e L. Face adaxial (K) e abaxial (L) da lâmina foliar em vista paradérmica, coradas com fucsina básica. EAD= face adaxial da epiderme; HAD= hipoderme da face adaxial; MH= mesofilo homogêneo; EAB= face abaxial da epiderme; Fv= Feixe vascular; X= xilema; F= floema; Fi = fibras; ES= espaço intercelular; seta preta= cutícula; cabeça de seta preta= espessamento parietal na região de contato entre as células guarda; seta branca= idioblasto com spessamento lignificado de parede secundária em espiral; cabeça de seta branca= espessamento reticulado secundário de idioblasto traqueodal; *= espessamento de cutina. Barras de escalas: A, B, D e H= 150 μ m; C, G, I e J= 100 μ m; E, F, K e L= 75 μ m

Tabela 2 - Valores médios, respectivos desvios-padrão (entre parênteses) e coeficientes de variação das características morfológicas (n=30), anatômicas (n=90) e clorofilas (n=3) das folhas de *Zygotetulum maculatum* nas diferentes fitofisionomias do Parque Estadual do Ibitipoca na baixa altitude (BA) e alta altitude (AA), nas estações do ano: verão (V) e inverno (I). MF: massa fresca; MS: massa seca; TMS= teor de matéria seca; CA= conteúdo de água; AF: área foliar; AFE: área foliar específica; MEF: massa específica foliar; GS: grau de suculência; espessuras (μm) das CAD: cutícula da face adaxial da epiderme; EAD: face adaxial da epiderme; HAD: hipoderme da face adaxial; MH: mesofilo homogêneo; EAB: face abaxial da epiderme; CAB: cutícula da face abaxial; LT: lâmina total; DE: densidade estomática; concentrações de clorofila a: cl a; clorofila b: cl b; clorofila total: cl t; clorofila a/b: cl a/b; carotenoides: *Carot* e clorofila total/carotenoides: cl t/*carot*. Letras diferentes para a mesma variável/ linha significam que os valores são estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

	BA V	CV (%)	AA V	CV (%)	BA I	CV (%)	AA I	CV (%)	BA	CV (%)	AA	CV (%)	IP
MF	4,75 (\pm 2,84) a	0,60	4,75 (\pm 2,19) a	0,46	4,59 (\pm 1,18) a	0,26	6,43 (\pm 2,01) b	0,31	4,67 (\pm 0,11) a	0,02	5,59 (\pm 1,19) b	0,21	0,37
MS	2,23 (\pm 1,6) a	0,71	1,02 (\pm 0,84) b	0,82	1,67 (\pm 0,85) a	0,51	2,33 (\pm 1,06) b	0,46	1,95 (\pm 1,4) a	0,20	1,68 (\pm 0,93) a	0,55	0,43
TMS	44,20 (\pm 10,49) a	0,24	20,18 (\pm 8,34) b	0,41	35,91 (\pm 14,44) a	0,4	37,78 (\pm 15,85) a	0,42	40,06 (\pm 5,86) a	0,15	28,98 (\pm 12,45) b	0,43	0,42
CA	39,44 (\pm 1,32) a	0,54	3,73 (\pm 1,64) b	0,44	2,92 (\pm 0,97) a	0,33	4,1 (\pm 1,86) b	0,45	21,18 (\pm 25,82) a	1,22	3,92 (\pm 0,26) b	0,07	0,38
AF	39,44 (\pm 16,25) a	0,41	46,42 (\pm 19,55) a	0,42	36,95 (\pm 14,52) a	0,39	40,88 (\pm 11,85) a	0,29	38,20 (\pm 1,76) a	0,05	43,65 (\pm 3,92) a	0,09	0,37
AFE	0,06 (\pm 23,45) a	0,89	56,09 (\pm 17,44) b	0,31	25,41 (\pm 9,93) a	0,39	19,59 (\pm 6,55) b	0,33	12,74 (\pm 17,93) a	1,41	37,84 (\pm 25,81) b	0,68	0,46
MFE	2,52 (\pm 0,04) a	0,66	0,02 (\pm 0,01) b	0,48	0,05 (\pm 0,02) a	0,5	0,06 (\pm 0,02) a	0,33	1,29 (\pm 1,75) a	1,36	0,04 (\pm 0,03) b	0,71	0,42
GS	2,74 (\pm 2,52) a	1,09	0,08 (\pm 0,03) b	0,35	0,07 (\pm 0,02) a	0,05	10,51 (\pm 4,2) a	3,8	1,41 (\pm 1,89) a	1,34	5,3 (\pm 7,38) b	1,39	0,08
Pl m													0,13
CAD	5,00 (\pm 0,66) a	0,13	5,33 (\pm 2,34) a	0,44	5,50 (\pm 1,02) a	0,18	5,17 (\pm 0,91) a	0,18	5,25 (\pm 0,35) a	0,07	5,25 (\pm 0,11) b	0,02	0,37
EAD	24,67 (\pm 7,65) a	0,31	26,00 (\pm 4,98) a	0,19	27 (\pm 6,8) a	0,25	31,50 (\pm 6,78) b	0,22	25,84 (\pm 1,65) a	0,06	28,75 (\pm 3,89) b	0,14	0,11
MH	530,33 (\pm 138,72) a	0,26	463,50 (\pm 66,7) b	0,14	501,58 (\pm 82,28) a	0,16	518,17 (\pm 59,5) a	0,11	515,96 (\pm 20,33) a	0,04	490,84 (\pm 38,66) a	0,08	0,07
EAB	15,67 (\pm 3,65) a	0,23	18,17 (\pm 2,78) b	0,15	19,75 (\pm 3,24) a	0,16	20,33 (\pm 3,7) a	0,18	17,71 (\pm 2,88) a	0,16	19,25 (\pm 1,53) a	0,08	0,10
CAB	3,83 (\pm 1,27) a	0,33	3,92 (\pm 1,26) a	0,32	4,50 (\pm 4) a	0,9	3,17 (\pm 1,12) a	0,36	4,17 (\pm 0,47) a	0,11	3,55 (\pm 0,53) a	0,15	0,26
LT	579,50 (\pm 141,22) a	0,24	516,92 (\pm 68) a	0,13	558,33 (\pm 83,45) a	0,15	578,33 (\pm 61,54) b	0,11	568,92 (\pm 14,97) a	0,03	547,63 (\pm 43,42) a	0,08	0,02
DE	7,33 (\pm 1,45) a	0,20	7,4 (\pm 1,38) a	0,19	7,79 (\pm 1,11) a	0,14	7,03 (\pm 1,33) a	0,19	7,56 (\pm 0,33) a	0,04	7,22 (\pm 0,26) a	0,04	0,24
Pl a													0,12
Cl a	0,42 (\pm 0,24) a	0,58	0,74 (\pm 0,06) a	0,08	0,54 (\pm 0,03) a	0,06	0,82 (\pm 0,12) a	0,15	0,48 (\pm 0,08) a	0,18	0,78 (\pm 0,06) b	0,07	0,09
Cl b	0,34 (\pm 0,2) a	0,60	0,65 (\pm 0,21) a	0,33	0,25 (\pm 0) a	0,01	0,48 (\pm 0,19) a	0,40	0,30 (\pm 0,06) a	0,22	0,57 (\pm 0,12) b	0,21	0,32
Cl t	0,76 (\pm 0,42) a	0,56	1,39 (\pm 0,23) a	0,17	0,79 (\pm 0,04) a	0,05	1,30 (\pm 0,31) a	0,24	0,78 (\pm 0,02) a	0,03	1,35 (\pm 0,06) b	0,05	0,06
Cl a/b	1,41 (\pm 0,74) a	0,53	1,24 (\pm 0,48) a	0,39	2,20 (\pm 0,11) a	0,05	1,83 (\pm 0,42) a	0,23	1,81 (\pm 0,56) a	0,31	1,54 (\pm 0,42) a	0,27	0,36
Carot	0,25 (\pm 0,74) a	0,40	0,41 (\pm 0,08) a	0,21	0,15 (\pm 0,1) a	0,06	0,26 (\pm 0,01) a	0,04	0,20 (\pm 0,07) a	0,35	0,34 (\pm 0,11) a	0,32	0,13
Cl t/Carot	3,18 (\pm 1,38) a	0,43	3,54 (\pm 1,08) a	0,30	5,11 (\pm 0,7) a	0,01	5,09 (\pm 1,44) a	0,28	4,15 (\pm 1,36) a	0,33	4,32 (\pm 0,1) a	0,25	0,11
Pl f													0,18

Tabela 4 - Quantidade relativa de flavonoides detectada a 335 nm por estação do ano nas fitofisionomias baixa altitude (BA) e alta altitude (AA). Quantidade relativa destacada (*) corresponde ao maior valor estatisticamente significativo

	<i>Zygopetalum maculatum</i>	
Estações do ano	Baixa altitude	Alta altitude
Verão	4.523.599 *	839.419
Outono	6.449.415	10.466.869
Inverno	2.631.848	6.362.372*
Primavera	21126692*	11.679.836

Tabela 5 - Valores médios dos Índices de plasticidades (IP) das variáveis morfológicas (m), anatômicas (a) e fisiológicas (f); Índice de plasticidade fenotípica (IPF) total das espécies *Zygopetalum maculatum* e *Epidendrum secundum* e Índice de plasticidade fenotípica (IPF) total para cada grupo de variáveis

	<i>Zygopetalum maculatum</i>	<i>Epidendrum secundum</i>	IPF Total
IP m	0,24	0,37	0,30
IP a	0,06	0,11	0,08
IP f	0,31	0,38	0,34
IPF Total	0,20	0,28	0,24

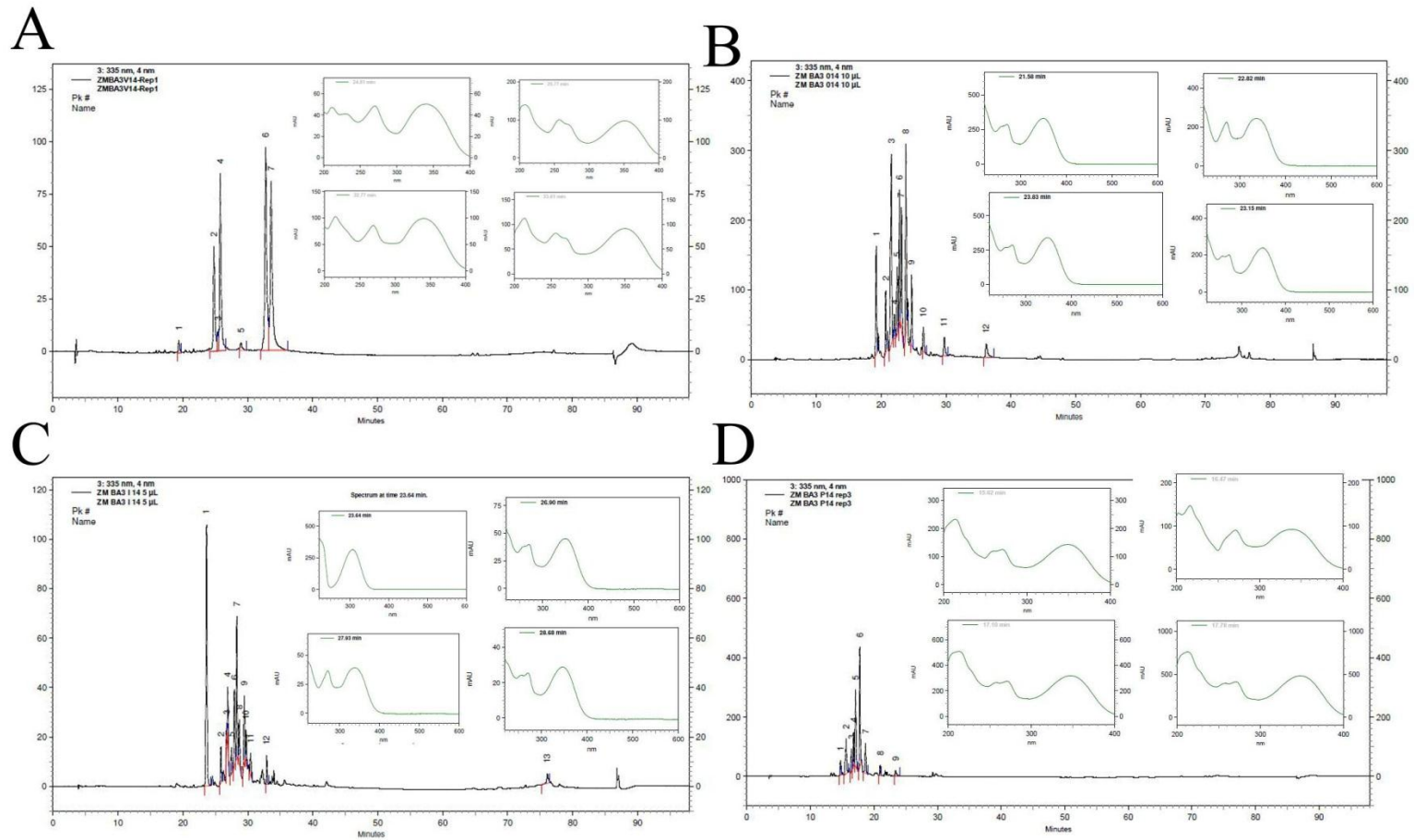


Figura 8. A-D. Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos brutos de folhas de *Zygopetalum maculatum* utilizando-se $\lambda=335$ nm e seus respectivos espectros UV no verão (A), outono (B), inverno (I) e primavera (P)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho gerou contribuições para a compreensão da anatomia ecológica e da plasticidade das orquídeas estudadas no PEIB, com apresentação de novas propostas de trabalho, que permitiram a associação de conhecimentos ecológicos, morfoanatômicos e químicos.

Este trabalho apresenta de forma pioneira o uso do reagente BODIPY 505/ 515 na detecção de gotículas lipídicas em plantas, juntamente com procedimentos usuais de microscopia confocal de varredura à laser, que permitiram confirmar que a recompensa floral produzida por *O. donianum* e *O. warmingii* é constituída por lipídios, sendo seus elaióforos classificados como epidermal. Esta técnica é promissora, pois além de confirmar presença de lipídios neutros em vegetais à nível celular, pode auxiliar na compreensão dos processos bioquímicos de síntese lipídica em vegetais.

Os resultados encontrados no presente trabalho são subsídios aos estudos das interações planta-polinizador e planta-variação ambiental, que devem ser avaliados para conservação dessas espécies, considerando o *status* de vulnerabilidade do PEIB, uma das UC mais visitadas do Brasil, e as condições de *O. warmingii*, como vulnerável, e de *H. coccinea*, como em perigo de extinção, na lista vermelha das Espécies Ameaçadas da Flora de Minas Gerais.

Hadrolaelia coccinea foi a espécie de maior IPF, seguida por *E. secundum*, o que significa que elas apresentam maiores chances de sobrevivência às oscilações ambientais que as demais, com possibilidades de distribuição geográfica mais abrangente. Este resultado é especialmente importante pela situação descrita acima para *H. coccinea*.

Para todas as orquídeas, o IPF das variáveis fisiológicas foram maiores do que o IPF das variáveis morfológicas e anatômicas, mostrando que os processos fisiológicos são mais facilmente moldáveis às diferentes condições ambientais e condicionam características morfoanatômicas para o sucesso e sobrevivência da planta em seu habitat.

O estudo químico das folhas das orquídeas oriundas do PEIB também foi promissor, principalmente, por contribuir com possibilidades de se isolar flavonoides ainda não identificados para *P. pachysepala*.

Em se tratando de Orchidaceae, família de plantas de grande importância ecológica e ornamental, com potencial químico relevante pela presença de flavonoides, este trabalho possibilita, a partir do entendimento da dinâmica das adaptações das espécies estudadas nas

diversas fitofisionomias do PEIB, adotar medidas preventivas à sua conservação e ao ecossistema no qual elas estão inseridas.

REFERÊNCIAS

ABRAHAN, A.; VATSALA, P. **Introduction to orchids with illustrations and descriptions of 150 south Indian orchids**. Trivandrum: The Saint Joseph's Press, 1981.

ABRANS, M. C.; KLOEPPPEL, B. D.; KUBISKE, M. E. Ecophysiological and morphological responses to shade and drought in two contrasting ecotypes of *Prunus setorina*. **Tree Physiology**, v. 10, p. 343-355, 1992.

ABREU, I. N.; MAZZAFERA, P. Effects of water and temperature stress of activity constituent *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 241-248, 2005.

ABREU, N. L. DE; MENINI NETO, L.; KONNO, T. U. P. Orchidaceae das Serras Negra e do Funil, Rio Preto, Minas Gerais, e similaridade florística entre formações campestres e florestais do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, p. 58-70, 2011.

ALERIC, K. M.; KIRKMAN, L. K. Growth and photosynthetic responses of the federally endangered shrub, *Lindera melissifolia* (Lauraceae), to varied light environments. **American Journal of Botany**, v. 92, p. 682-689, 2005.

ALISCIONI, S. S. et al. Elaiophores in *Gomesa bifolia* (Sims) MW Chase & NH Williams (Oncidiinae: Cymbidieae: Orchidaceae): structure and oil secretion. **Annals of Botany**, v. 104, p. 1141-1149, 2009.

ALLARD, G.; NELSON, C. J.; PALLARDY, S. G. Shade effects on growth of tall fescue: I. leaf anatomy and dry matter partitioning. **Crop Science**, v. 31, p. 163-167, 1991.

ALVARENGA, A. A. et al. Effects of different light levels on the initial growth and photosynthesis of *Croton urucurana* Baill. in Southeastern Brazil. **Revista Árvore**, v. 27, n. 1, p. 53-57, 2003.

ALVARENGA, I. C. A. et al. Water stress before harvest of pepper-rosemary. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n.7, p.706-711, 2011.

ALVES-DOS-SANTOS, I.; MACHADO, I. C.; GAGLIANONE, M. C. História natural das abelhas coletoras de óleo. **Oecologia Brasiliensis**, v. 3, p. 242-255, 2007.

ALVES-DOS-SANTOS, I.; MELO, G. A. R.; ROZEN, J. G. Biology and immature stages of the bee tribe Tetrapediini (Hymenoptera: Apidae). **American Museum Novitates**, v. 3377, p. 1-45, 2002.

ALVES, R. J. V.; KOLBEK, J. Summit vascular flora of Serra de São José, Minas Gerais, Brazil. **Check List**, v. 5, p. 35-73, 2009.

AMARAL, J. S. et al. Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. **Food Chemistry**, v. 88, p. 373- 379, 2004.

ANDRADE, P. M.; SOUSA, H. C. Contribuição ao conhecimento da vegetação do Parque Estadual do Ibitipoca, Lima Duarte, Minas Gerais. **Revista Árvore**, v. 19, p. 249-261, 1995.

ANDROUTSOPOULOS, V.P. et al. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: substrate and inhibitors of cytochrome p450CYP1 enzymes. **Pharmacology & Therapeutics**, v.126, 9-20, 2010.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2003. 438 p.

APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; HAYASHI, A. H. Raiz. In: B. APEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELO-GUERREIRO, S. M. (Eds.). **Anatomia Vegetal**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2006. p. 267-281.

ARANDA, I. et al. Efecto de la luz y la sequía sobre la anatomía foliar de plantas de alcornoque (*Quercus suber* L.). **Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales**, v. 20, p. 117-121, 2004.

ARAMBARRI, A. M. et al. Ecoanatomía foliar de árboles y arbustos de los distritos chaqueños occidental y serrano (Argentina). **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 46, p. 251-270, 2011.

ARDITTI, J. **Fundamentals of Orchid Biology**. New York: Wiley, 1992. 691 p.

ASCENSÃO, L. et al. Comparative structure of the labellum in *Ophrys fusca* and *O. lutea* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 92, p.1059-1067, 2005.

AZEVEDO, C. O. DE; BERG, C. A Família Orchidaceae no Parque Municipal de Mucugê, Bahia, Brasil. **Hoehnea**, v. 34, p. 1-47, 2007.

BALAGUER, L. et al. Population divergence in the plasticity of the response of *Quercus coccifera* to the light environment. **Functional Ecology**, v. 15, p. 124-135, 2001.

BAPTISTA, D. H.; DOCHA NETO, A. *Coppensia Dumortier*: revisão taxonômica do gênero de Orchidaceae e proposta de novas alianças. *Orchidstudium - International Journal of Orchid Study*, v. 1, p. 1-8, 2006.

BARROS, F. et al. **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: 01 fev. 2015.

BARROS, F. A. 2006. **Efeito de borda em fragmentos de floresta Montana, Nova Friburgo - RJ**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Fluminense, 100 p.

BARROS, F. Notas taxonômicas para as espécies brasileiras dos gêneros *Epidendrum*, *Platystele*, *Pleurothallis* e *Scaphyglottis* (Orchidaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 10, p. 139-151, 1996.

- BARROS, F. et al. Orchidaceae. In: FORZZA, R.C. et al (org.). **Catálogo de plantas e Fungos do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v. 2, p. 1344- 1426.
- BASTOS, C. A.; VAN DEN BERG, C. A família Orchidaceae no município de Morro do Chapéu, Bahia, Brasil. **Rodriguésia**, v. 63, p. 883-927, 2012.
- BELL, G.; LECHOWICZ, M. J. 1994. Spatial heterogeneity at small scales and how plants respond to it. In: CALDWELL, M. M.; PEARCY, R. W. (eds.). **Exploitation of environmental heterogeneity by plants: ecophysiological processes above and below ground**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 391- 414.
- BENITES, V. M. et al. Solos e vegetação nos complexos rupestres de altitude da Mantiqueira e do Espinhaço. **Floresta e Ambiente**, v. 10, p. 76-85, 2003.
- BENZING, D. H.; PRIDGEON, A. M. Foliar trichomes of Pleurothallidinae (Orchidaceae): functional significance. **American Journal of Botany**, v. 70, p. 173-180, 1983.
- BENZING, D. H. The physical mosaic and plant variety in forest canopies. **Selbyana**, v. 16, p. 159- 168, 1995.
- BENZING, G. P. Vascular epiphytism: taxonomic participation and adaptive diversity. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 74, p. 183-204, 1987.
- BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical Microtechnique and Cytochemistry**. Ames: The Iowa State College Press, 1976. 326 p.
- BERNARDI, S.; BUDKE, J. C. Estrutura da sinúsia epifítica e efeito de borda em uma área de transição entre floresta estacional semidecídua e floresta Ombrófila Mista. **Floresta**, v. 40, p. 81-92, 2010.
- BHARTI, A. K.; KHURANA, J. P. Mutants of *Arabidopsis* as tools to understand the regulation of phenylpropanoid pathway and UVB protection mechanisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, p. 765-776, 1997.
- BHATTACHARYYA, J. et al. Constituents of *Encyclia longifolia* Schltr. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 22-23, 2006.
- BIERAS, A. C.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de *Erythroxylum* P. Browne (Erythroxylaceae) do Cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 60-612, 2004.
- BIEZA, K.; LOIS, R. An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1105-1115, 2001.
- BLANCO, M. A. et al. Floral elaiophores in *Lockhartia* Hook. (Orchidaceae: Oncidiinae): their distribution, diversity and anatomy. **Annals of Botany**, v. 112, p. 1775-1791, 2013.
- BOEGER, M. R.; WISNIEWSKI, C. Estrutura e teores de nutrientes foliares de seis espécies arbóreas ao longo de um gradiente sucessional da planície litorânea do estado do Paraná, Brasil. **Iheringia**, v. 57, p. 243-262, 2002.

- BOHM, B.A. Intraspecific flavonoid variation. *Botanical Review*, v. 53, p. 197-279, 1987.
- BONATES, L. C. M.; BRAGA, P. I. S. Estudos ecofisiológicos de Orchidaceae da Amazônia I. Identificação da via C3 e CAM em quatorze espécies que vegetam no estrato terrestre de uma campina da Amazônia central. **Boletim do Museu Paraense “Emilio Goeldi”**. Nova serie, **Botanica**, v. 8, p. 163-189, 1992.
- BONATES, L. C. M. Estudos ecofisiológicos de Orchidaceae da Amazônia II. Anatomia ecológica foliar de espécies com metabolismo CAM de uma campina da Amazônia central. **Acta Amazonica**, v. 23, p. 315-348, 1993.
- BOTELHO, E. S. Considerações sobre turismo, comunidade e educação ambiental: o caso de Ibitipoca. **Caderno Virtual de Turismo**, v. 6, p. 10-19, 2006.
- BOUDET, A. M. A new view of lignification. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 67-71, 1998.
- BOZZOLA, J. J.; RUSSELL, L. D. **Electron microscopy**. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1992. 542 p.
- BRADSHAW, A. D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity. **Advances in Genetics**, v. 13, p. 115-153, 1965.
- BRADSHAW, A. D. Unravelling phenotypic plasticity – why should we bother? **New Phytologist**, v. 170, p. 644-648, 2006.
- BRAGA, P. I. S. Aspectos biológicos das Orchidaceae de uma campina da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, v. 7, p. 1-89, 1977.
- BROWN, JR., KEITH, S. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Acta Amazonica** [online], v. 18, p. 291-303, 1988.
- BUCHMANN, S. L. The ecology of oil flowers and their bees. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 343-369, 1987.
- BUZATTO, C. et al. O gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae: Laeliinae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, p. 388-398, 2010.
- CAIN, A. J. Use of Nile Blue in the examination of lipoids. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 88, p. 383-392, 1947.
- CALIXTO, J. B. **Medicamentos Fitoterápicos**. Santa Catarina: Editora Universitária UNOESC, Argos; 2001. 523 p.
- CALVO-ALVARADO, J. C.; MCDOWELL, N. G.; WARING, R. H. Allometric relationships predicting foliar biomass and leaf area: sapwood area ratio from tree height in five Costa Rican rain forest species. **Tree physiology**, v. 28, p. 1601-1608, 2008.

- CAO, K. F. Leaf anatomy and chlorophyll content of 12 woody species in contrasting light conditions in a Bornean heath forest. **Canadian Journal of Botany**, v. 78, p. 1245-1253, 2000.
- CARRERA, G. C. et al. Testes fitoquímicos em extratos foliares de *Oeceoclades maculata* Lindl. (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, p. 938-944, 2014.
- CARVALHO, M. M.; FREITAS, V. P.; ANDRADE, A. C. Crescimento inicial de cinco gramíneas tropicais em um sub-bosque de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* Benth.). **Pasturas Tropicais**, v. 17, p. 24-30, 1995.
- CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA/CNPAP, 1994. 640 p.
- CASTRO, E. M. et al. Aspectos da anatomia foliar de mudas de *Guarea guidonea* (L.) Slumer, sob diferentes níveis de sombreamento. **Daphne**, v. 8, p. 31-35, 1998.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia Vegetal: estrutura e função dos órgãos vegetativos**. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.
- CASTRO-JIMENEZ, Y. et al. Drought stress responses of microseris species differing in nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. **American Journal of Botany**, v. 76, p. 789-795, 1989.
- CATONI, R. et al. *Corylus avellana* responsiveness to light variations: morphological, anatomical, and physiological leaf trait plasticity. **Photosynthetica**, v. 53, p. 35-46, 2015.
- CATONI, R.; GRATANI, L.; VARONE L. Physiological, morphological and anatomical trait variations between winter and summer leaves of *Cistus* species. **Flora**, v. 207, p. 442-449, 2012.
- CESTARO, L. A. Estudo microclimático do interior de uma mata de araucária na Estação Ecológica de Aracuri, Esmeralda, R. S. **Revista Árvore**, v. 12, n. 1, p. 41-57, 1988.
- CETEC. **Diagnóstico Ambiental do Estado de Minas Gerais**. Belo horizonte: Série de Publicações Técnicas, 1983.
- CHAPMAN, K. D.; JOHN, J. M.; MULLEN, R. T. Biogenesis and functions of lipid droplets in plants. **Journal of Lipid Research**, v. 53, p. 215-226, 2012.
- CHASE, M. W. Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. **Curtis's Botanical Magazine**, v. 22, p. 2-7, 2005.
- CHASE, M. W. et al. Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae: Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. **Annals of Botany**, v. 104, p. 387-402, 2009.
- CHIRON, G. R. Aspects of the pollination syndrome in *Baptistonia* (Orchidaceae, Oncidiinae) with link to genus evolution. **Revista Guatemalensis**, v. 13, (28 pages) (unnumbered), 2010.

CLARK, D. B.; PALMER, M. W.; CLARK, D. A. Edaphic factors and the landscape-scale distributions of Tropical Rain Forest trees. **Ecology**, v. 80, p. 2662-2675, 1999.

CLARK, G. **Staining procedures Baltimore**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1981. 512 p.

COCUCCI, A. A.; SÉRCIC, A.; ROIG-ALSINA, A. H. Oil-collecting structures in Tapinotaspidini: their diversity, function, and probable origin. **Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft**, v. 90, p. 51-74, 2000.

COLLETA, R. C. L. D.; SILVA, I. V. Morfoanatomia foliar de microorquídeas de *Ornithocephalus* Hook. e *Psycmorchis* Dodson & Dressler. **Acta Botanica Brasílica**, v. 22, p. 1068-1076, 2008.

COLEY, P. D. Herbivory and defensive characteristic of tree species in a Lowland tropical forest. **Ecological Monographs**, v. 53, p. 209-233, 1983.

CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL, Fundação SOS Mata Atlântica, Fundação Biodiversitas, Instituto de Pesquisas Ecológicas, Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, SEMAD/Instituto Estadual de Florestas–MG. 2000. **Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Floresta Atlântica e Campos Sulinos**. Brasília: MMA/SBF, 2000.

CORNELISSEN, J. H. C. et. al. A handbook of protocols for standardized and easy measurement of plant functional traits worldwide. **Australian Journal of Botany**, v. 51, p. 335-380, 2003.

CORREA, M. N. Orchidaceae. In: ZULOAGA, F.; MORRONE, O. (Eds.). **Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina**. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, v. 60, p. 242-295, 1996.

CORRÊA NETO, A. V.; ANÍSIO, L. C. C.; BRANDÃO, C. P. Um endocarste quartzítico na Serra do Ibitipoca, sudeste de Minas Gerais. In: Simpósio de Geologia de Minas Gerais, 7, **Anais...**, SBG Núcleo MG, Boletim 12, p. 83-86, 1993.

COSTA, C. M. R. et al. **Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1998. 92 p.

COUTINHO, L. M. Algumas informações sobre a capacidade rítmica diária da fixação e acumulação de CO₂ no escuro em epífitas e herbáceas da mata pluvial. **Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo. Botânica**, v. 289, p. 397- 408, 1964.

CRAVEN, D.; GULAMHUSSEIN, S.; E BERLYN, G. P. Physiological and anatomical response of *Acacia koa* (Gray) seedlings to varying light and drought conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 69, p. 205-213, 2010.

CUSHMAN, J. C. Crassulacean Acid Metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. **Plant Physiology**, v. 127, p. 1439-1448, 2001.

CUTLER, J. M.; RAINS, D. W.; LOOMIS, R. S. On the importance of cell size in the relations of plants. **Physiologia Plantarum**, v. 40, p. 256-259, 1977.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal: órgãos**. São Paulo: Roca, 1987. 336 p.

DAVIES, H. M. et al. Developmental induction, purification, and further characterization of 12:0-ACP thioesterase from immature cotyledons of *Umbellularia californica*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 290, p. 37-45, 1991.

DAVIES, K. L.; STPICZYŃSKA, M. Comparative histology of floral elaiophores in the orchids *Rudolfiella picta* (Schltr.) Hoehne (Maxillariinae *sensu lato*) and *Oncidium ornithorhynchum* H.B.K. (Oncidiinae *sensu lato*). **Annals of Botany**, v. 104, p. 221-234, 2009.

DAVIES, K. L.; STPICZYŃSKA, M. The anatomical basis of floral, food-reward production in Orchidaceae. In: TEIXEIRA DA SILVA, J. A. (Ed), **Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues**. London: Global Science Books, v. V, p. 392-407, 2008.

_____. The anatomical basis of floral, food-reward production in Orchidaceae. In: TEIXEIRA DA SILVA, J. A. (Ed), **Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues**. London: Global Science Books, 2008. v. 5, p. 392-407.

_____. Comparative labellar anatomy of resinsecreting and putative resin-mimic species of *Maxillaria* s.l. (Orchidaceae: Maxillariinae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, p. 405-435, 2012.

DAVIES, K. L.; STPICZYŃSKA, M.; RAWSKI, M. Comparative anatomy of floral elaiophores in *Vitekorchis* Romowicz & Szlach., *Cyrtorchilum* Kunth and a florally dimorphic species of *Oncidium* Sw. (Orchidaceae: Oncidiinae). **Annals of Botany**, v. 113, p. 1155-1173, 2014.

DAVIES, K. L.; TURNER, M. P.; GREGG, A. Lipoidal labellar secretions in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 91, p. 439-446, 2003.

DENGLER, N. G. Comparative histological basis of sun and shade leaf dimorphism in *Helianthus annuus*. **Canadian Journal of Botany**, v. 58, p. 717-730, 1980.

DETTKE, G. A. et al. Morfoanatomia dos órgãos vegetativos de *Miltonia regnellii* (Lindl.) Rchb. f. (Oncidiinae, Orchidaceae) Rchb. f. (Oncidiinae, Orchidaceae) chb. f. (Oncidiinae, Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 30, p. 9-16, 2008.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2. Ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2002. 515 p.

DE WIT, P. J. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 64, p. 2726-32, 2007.

DIAS, H. C. T. et al. Geoambientes do Parque Estadual do Ibitipoca, município de Lima Duarte-MG. **Revista Árvore**, v. 26, p. 777-786, 2002.

DICKISON, W. C. **Integrative Plant Anatomy**. San Diego: Harcourt Academic Press, 2000. 533 p.

DOCHA NETO, A.; BAPTISTA, D. H.; CAMPACCI, M. A. Novos gêneros baseados nos *Oncidium* brasileiros. In: CAMPACCI, M. A. (Eds.). **Coletânea de orquídeas brasileiras**, Brasil Orquídeas, São Paulo, 2006, p. 70-96.

DRESSLER, R. L. How many orchid species? **Selbyana**, v. 26, p. 155-158, 2005.

DRESSLER, R. L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland, Dioscorides Press, 1993. 314 p.

DRESSLER, R. L. **The Orchids, Natural History and Classification**. Cambridge: Harvard University Press, 1981. 332p.

DRUMMOND, G. M. et al. **Biodiversidade em Minas Gerais: Um Atlas para sua Conservação**. 2. ed. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2005. 222p.

DUNBAR-CO, S.; SPORCK, M. J.; SACK, L. Leaf traits diversification and design in seven rare taxa of the Hawaiian *Plantago* radiation. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 170, p. 61-75, 2009.

DURMUŞKAHYA, C.; AKYOL, Y.; ÖZDEMİR, C. Ecology, anatomy and morphology of *Orchis spitzelii* in Turkey. **Journal of Environmental Biology**, v. 36, p. 177-184, 2015.

DUZ, S. R. et al. Crescimento inicial de três espécies arbóreas da Floresta Atlântica em resposta à variação de luz. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 3, p. 587-596, 2004.

ENDRESS, P. K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. London: Cambridge University Press, 1994. 420 p.

EPSTEIN, E. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. London, New York: John Wiley & Sons, 1972. 412 p.

ERIKSEN, F. I., WHITNEY, A. S. Effects of light intensity on growth of some tropical forage species. In: Interaction of light intensity and nitrogen fertilization on six forage grasses. **Agronomy Journal**, v. 73, p. 427-433, 1981.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. Sao Paulo: Edgard Blucher, 1974. 293 p.

ESSEEN, P. A. Tree mortality patterns after experimental fragmentation of an old-growth conifer forest. **Biological Conservation**, v. 68, p. 19-28, 1994.

EVANS, J. R.; POORTER, H. Photosynthetic acclimation of plants to growth irradiance: the relative importance of specific leaf area and nitrogen partitioning in maximizing carbon gain. **Plant, Cell and Environment**, v.24, p.755-767, 2001.

EVANS, W. C. **Farmacognosia**. México: Nueva Editorial Interamericana, 1991. 453p.

EVANS, W. C. Trease and Evans' Pharmacognosy. 14th ed., WB Saunders Company: London, 1996. 612p.

FAHMY, G. M. Leaf anatomy and its relation to the ecophysiology of some nonsucculent desert plants from Egypt. **Journal of Arid Environments**, v. 36, p. 499-525. 1997.

FAHN, A.; CUTLER, D. F. **Xerophytes**. Berlin: GebrüderBorntraeger Stuttgart, 1992. 176 p.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press, 1979. 302 p.

FAHN, A. Structural and functional properties of trichomes of xeromorphic leaves. **Annals of Botany**, v. 57, p. 631-637, 1986.

FAINI, F.; LABBE, C.; COLL, J. Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 673-679, 1999.

FARIA, A. D. 2004. **Sistemática filogenética e delimitação dos gêneros da subtribo Oncidiinae (Orchidaceae) endêmicos do Brasil: *Baptistonia*, *Gomesa*, *Ornithophora*, *Rodrigueziella*, *Rodrigueziopsis* e *Oncidium pro parte***. Tese (Doutorado em Biologia vegetal)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 126 f.

FEI, S. L. et al. Anatomical characteristics of leaves and woods of *Fagus lucida* and their relationship to ecological factors in Mountain Fanjingshan, Guizhou, China. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 41, p. 1002-1009, 1999.

FENG, Y. L.; CAO, K. F.; ZHANG, J. L. Photosynthetic characteristics, dark respiration, and leaf mass per unit area in seedlings of four tropical tree species grown under three irradiances. **Photosynthetica**, v. 42, p. 431-437, 2004.

FERMINO-JR., P. C. et al. Espécies pioneiras e climácicas da floresta ombrófila densa: anatomia foliar comparada. **Insula**, v. 33, p. 21-37, 2004.

FERREIRA, J. L. B. 1992. **Anatomia foliar de espécies da subtribo Pleurothallidinae**. Dissertação (Mestrado em Botânica)-. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 106 f.

FERREIRA, J. L. B.; OLIVEIRA, P. L.; MARIATH, J. E. A. Anatomia foliar de espécies do gênero *Octomeria* (Orchidaceae). **Napaea**, v. 10, p. 7-14, 1994.

FINI, A. et al. Growth, leaf gas exchange, and leaf anatomy of three ornamental shrubs grown under different light intensities. **European Journal of Horticultural Science**, v. 75, p. 111-117, 2010.

FLOR, I. C.; SILVA, G. T; HARTE-MARQUES, B. Ambientes de borda são mais susceptíveis a ataques de insetos herbívoros em áreas de floresta ombrófila densa? **Natureza on line**, v. 13, p. 98-100, 2015.

FORZZA, R. C. et al. Bromeliaceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. Andrea Jakobsson & Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p. 315-397, 2013.

FORZZA, R. C. et al. **Flora do Parque Estadual do Ibitipoca e seu entorno**. Juiz de Fora: UFJF Press, 2013. 384 p.

FOSTER, A. S. Plant idioblasts: remarkable example of cell specialization. **Protoplasma**, v. 46, p. 184-193, 1956.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. D. Princetown: van Nostrand Company, 1949. 155 p.

FRANKLIN, G. L. A rapid method of softening wood for microtome sectioning. **Australian Journal of Botany**, v. 33, p. 393- 408, 1946.

FURTADO, S. G.; MENINI NETO, L. Diversity of vascular epiphytes in two high altitude biotopes of Brazilian Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, p. 1-1, 2015.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de histologia em cores**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 234 p.

GENTRY, A. H. Tropical forest biodiversity: distributional patterns and their conservational significance. **Oikos**, v. 63, p. 19-28, 1992.

GIULIETTI, A. M. et al. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista das espécies. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 9, p. 1-151, 1987.

GIULIETTI, A. M. et al. Caracterização e endemismos nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. In: CAVALCANTI, T. B.; WALTER, B. M. T. (eds.). **Tópicos Atuais de Botânica**. Brasília: EMBRAPA Recompensas Genéticos, 2000. p. 311-318.

GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: **Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns** (VANZOLINI, P. E.; HEYER, W. R., eds.). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988 p. 39-69.

GASPI, F. O. G. et al. Effects of the Topical Application of Hydroalcoholic Leaf Extract of *Oncidium flexuosum* Sims. (Orchidaceae) and Microcurrent on the Healing of Wounds Surgically Induced in Wistar Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 20, p. 1-9, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOMES, S. M. et al. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 223-238, 2009.

GOMIZ, N. E.; TORRETTA, J. P.; ALISCIONI, S. S. Comparative anatomy of elaiophores and oil secretion in the genus *Gomesa* (Orchidaceae). **Turkish Journal of Botany**, v. 37, p. 859-871, 2013.

GONÇALVES, J. F. C.; MARENCO, R. A.; VIEIRA, G. Concentration of photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence of mahogany and tonka bean under two light environments. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.13, p.49-157, 2001.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. DE M. B. Morphological and metabolic differentiation of Rubiaceae by ecogeographical transitions in South America. **Opera Botanica Belgica**, v. 7, p. 213-230, 1996.

GOUINGUENÉ, S. P.; TURLINGS, T. C. J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**, v. 129, p.1296-1307, 2002.

GOVAERTS, R. World Checklist of Areaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <<http://apps.kew.org/wcsp/>>. Acesso em: 06 mar. 2015.

GRATANI, L.; COVONE, F.; LARCHER, W. Leaf plasticity in response to light of three evergreen species of the Mediterranean maquis. **Trees**, v. 20, p. 549-558, 2006.

GRATANI, L. et al. Physiological and morphological leaf trait variations in two Apennine plant species in response to different altitudes. **Photosynthetica**, v. 50, p. 15-23, 2012.

GRATANI, L. et al. Structural and functional plasticity of *Quercus ilex* seedlings of different provenances in Italy. **Trees - Structure and Function**, v. 17, p. 515-521, 2003.

GRATANI, L. Leaf and shoot growth dynamics of *Quercus ilex* L. **Acta oecologica**, v. 17, p. 17-27, 1996.

GRATANI, L. Plant Phenotypic Plasticity in Response to Environmental Factors. **Advances in Botany**, v. 2014, p. 1-17, 2014.

GRATANI, L.; VARONE, L. Adaptive photosynthetic strategies of the Mediterranean maquis species according to their origin. **Photosynthetica**, v. 42, p. 551-558, 2004.

GRAVENDEEL, B. et al. Epiphytism and pollinator specialization: drivers for orchid diversity? **Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences**, v. 359, p. 1523-1535, 2004.

GRAVENDEEL, B. et al. *Bulbophyllum*. In: PRIDGEON, A.M. et al. (eds.) **Genera Orchidacearum**, 6, Epidendroideae (Part Three). Oxford University, Oxford, 2014, p. 4-51.

GUAN, Z. J. et al. Leaf anatomical structures of *Paphiopedilum* and *Cypripedium* and their adaptive significance. **Journal of Plant Research**, v. 124, p. 289-98, 2011.

HANBA, Y. T.; KOGAMI, H.; TERASHIMA, L. The effects of growth irradiance on leaf anatomy and photosynthesis in *Acer* species differing in light demand. **Plant Cell and Environment**, v. 25, p. 1021-1030, 2002.

HANDRO, W. Escleromorfismo foliar e nutrição mineral de *Gomphrena prostrata* (Mart.). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38, p. 225-242, 1966.

HANLEY, M. E.; LAMONT, B. B. Relationships between physical and chemical attributes of congeneric seedlings: how important is seedling defence? **Functional Ecology**, v. 16, p. 216-222, 2002.

HAO, G.-Y. et al. Differentiation of leaf water flux and drought tolerance traits in hemiepiphytic and non-hemiepiphytic *Ficus* tree species. **Functional Ecology**, v. 24, p. 731-740, 2010.

HARBORNE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1993. 318 p.

HARIDASAN, M. Nutrição mineral das plantas nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 54-64, 2000.

HARLEY, R. M.; SIMMONS, N. A. **Florula of Mucugê**: Chapada Diamantina - Bahia, Brazil. London: Royal Botanic Gardens, 1986. 228 p.

HAUGLAND, R. **Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals**. Molecular Probes Inc., Eugene, OR, 1996. 966 p.

HERNANDES, J. L.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; BARDIN, L. Variação estacional da radiação solar em ambiente externo e no interior de floresta semidecídua. **Árvore**, v.28, p. 167-172, 2004.

HERR-TUROFF, A.; J. B., ZEDLER. Does morphological plasticity of the *Phalaris arundinacea* canopy increase invasiveness? **Plant Ecology**, v. 193, p. 265-277, 2007.

HIGGINS, W. E. A reconsideration of the genus *Prosthechea* (Orchidaceae). **Phytologia**, v. 82, p. 370-383, 1997.

HIGGINS, W. E. *Prosthechea*: A Chemical Discontinuity in Laeliinae. **Lankesteriana**, v. 7, p. 39- 41, 2003.

HILLER, B.; WITTMANN, D. Seasonality, nesting biology and mating behavior of the oil-collecting bee *Epicharis dejeanii* (Anthophoridae, Centridini). **Biociências**, v. 2, p. 107-124, 1994.

HIKOSAKA, K. Nitrogen partitioning in the photosynthetic apparatus of *Plantago asiatica* leaves grown under different temperature and light conditions: similarities and differences between temperature and light acclimation. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, p. 1283-1290, 2005.

HIROSE, T.; WERGER, M. J. A. Maximizing daily canopy photosynthesis with respect to the leaf nitrogen allocation pattern in the canopy. **Oecologia**, v. 72, p. 520-526, 1987.

HLWATIKA, C. N. M.; BHAT, R. B. An ecological interpretation of the difference in leaf anatomy and its plasticity in contrasting tree species in Orange Kloof, Table Mountain, South Africa. **Annals of Botany**, v. 89, p. 109-114, 2002.

HOEHNE, F. C. **Iconografia das Orchidáceas do Brasil**. São Paulo, Instituto de Botânica, 1949, 301 p.

HOEHNE, F. C. 1953. Orchidaceas. Pp. 1-397. In: F.C. Hoehne (ed.). **Flora Brasílica**, v. 12, p.7. São Paulo, Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio de São Paulo.

HOLANDA, A. C. et al. Estruturas de espécies arbóreas sob efeito de borda em um fragmento de floresta estacional semidecidual em Pernambuco. **Revista Árvore**, v. 34, p. 103-114, 2010.

HOLTZMEIER, M. A.; STERN, W. L.; JUDD, W. S. Comparative anatomy and systematics of Senghas's cushion species of *Maxillaria* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 127, p. 43-82, 1998.

HUNT, P. F. Orquidáceas. In: V.H. Heywood (ed.). **Las plantas con flores**. Editorial Reverté, Barcelona, 1985.

HUNT, R.; CORNELISSEN, J. H. C. Components of relative growth rate and their interrelations in 59 temperate plant species. **New Phytologist**, v. 135, p. 395-417, 1997.

HUTCHINGS, M. J. The structure of plant populations. In: CRAWLEY, M. J. **Plant Ecology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 97-136, 1989.

JANSEN, M. A. K.; GABA, V.; GREENBERG, B. M. Higher plants and UB-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 131-135, 1998.

JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry (principles and practice)**. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1962. 408 p.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940. 523 p.

JOSE, S. et al. Vegetation responses along edge-to-interior gradients in a high altitude tropical forest in peninsular India. **Forest Ecology and Management**, v. 87, p. 51-52, 1996.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 612 p.

KAISER, E. Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. **Botanisch Zentralb**, v. 180, p. 25-26, 1880.

KANAZAWA, K. et al. Short photoirradiation induces flavonoid synthesis and increases its production in postharvest vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4359-4368, 2012.

KAPOS, V. Effects of isolation on the water status of forest patches in the Brazilian Amazon. **Journal Tropical Ecology**, v. 5, p. 173-185, 1989.

KARBAN R.; BALDWIN, I. T. **Induced responses to herbivory**. University of Chicago Press, Chicago, 1997. 83 p.

KELLY, J. et al. Growth and physiological response of six Australian rainforest tree species to a light gradient. **Forest Ecology and Management**, v. 257, p. 287-293, 2009.

KIRAKOSYAN, A. et al. Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. **Physiologia Plantarum**, v. 121, p. 182-186, 2004.

KNUTZEN, F.; MEIER, I. C.; LEUSCHNER, C. Does reduced precipitation trigger physiological and morphological drought adaptations in European beech (*Fagus sylvatica* L.)? Comparing provenances across a precipitation gradient. **Tree Physiology**, v. 0, 1-15, 2015.

KOCSIS, M.; DARÓK, J.; BORHIDI, A. Comparative leaf anatomy and morphology of some neotropical *Rondeletia* (Rubiaceae) species. **Plant Systematic and Evolution**, v. 248, p. 205-218. 2004.

KOES, R. E.; QUATTROCCHIO, F.; MOL, J. N. M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. **BioEssays**, v. 16, p. 123-132, 1994.

KOFIDIS, G.; BOSABALIDIS, A. M.; MOUSTAKAS, M. Contemporary seasonal and altitudinal variations of leaf structural features in oregano (*Origanum vulgare* L.). **Annals of Botany**, v. 92, p. 635-645, 2003.

KÖPPEN, W. **Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra**. México: Fondo de Cultura Económica, 1948. 479 p.

KÖRNER, C. The use of 'altitude' in ecological research. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 22, p. 569-574, 2007.

KRAMER, T.; KOZLOWSKI, T. T. **Physiology of woody plants**. Academic Press, New York, 1979. 811 p.

KURZWEIL, H. et al. Comparative vegetative anatomy and classification of *Diseae* (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 117, p. 171-220, 1994.

LABRID, C. Pharmacologic properties of Daflon 500 mg. **Angiology**, v. 45, p. 524-530, 1994.

LANGERON, M. **Précis de microscopie**. Paris: Masson & Cie, 1949. 916 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.

LASSUEUR, T.; JOOST, S.; RANDIN, C. F. Very high resolution digital elevation models: do they improve models of plant species distribution? **Ecological Modelling**, v. 198, p. 139-153, 2006.

LAUGHLIN, D. C. et al. A predictive model of community assembly that incorporates intraspecific trait variation. **Ecology letters**, v. 15, p. 1291-1299, 2012.

LEON, J.; BUKOVAC, M. Cuticle development and surface morphology of olive leaves with reference to penetration of foliar applied chemicals. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 103, p. 465-472, 1978.

LEWIS, M. C. The physiological significance of variation in leaf structure. **Science Progress**, v. 60, p. 25-51, 1972.

LIAKOURA, V. et al. Effects of UV-B radiation on *Olea europaea*: comparisons between a greenhouse and a field experiment. **Tree Physiology**, v. 19, p. 905-908, 1999.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: **Current protocols in food analytical chemistry**, Wiley, New York, p. F4.3.1-F4.3.8.

LICHTENTHALER, H. K. et al. Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. **Plant physiology and biochemistry**, v. 45, p. 577-588, 2007.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

LICHTENTHALER, H. K. et al. Chlorophyll-protein levels and degree of thylakoid stacking in radish chloroplasts from high-light, low-light and bentazon-treated plants. **Physiologia Plantarum**, v. 56, p. 183-188, 1982.

LICHTENTHALER, H. K. et al. Photosynthetic activity chloroplasts ultrastructure and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. **Photosynthesis Research**, v. 2, p. 115-141, 1981.

LI, G.; YANG, D.; SUN, S. Allometric relationships between lamina area, lamina mass and petiole mass of 93 temperate woody species vary with leaf habit, leaf form and altitude. **Functional Ecology**, v. 22, p. 557-564, 2008.

LIMA JR., E. C. et al. Aspectos fisiológicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, v. 30, p. 33-41, 2006.

LIMA, M. A. O. et al. Crescimento e plasticidade fenotípica de três espécies arbóreas com uso potencial em sistemas agroflorestais. **Scientia Forestalis**, v. 38, p. 527-534, 2010.

LIMA-RIBEIRO, M. S. Efeitos de borda sobre a vegetação e estruturação populacional em fragmentos de Cerradão, no Sudoeste Goiano, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, p. 55-545, 2008.

LISA, M. S. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoids from *Strobilanthes crispus* (pecah Kaca). **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 319-326, 2010.

LLERAS, E. Differences in stomatal number per unit area within the same species under different microenvironmental conditions: a working hypothesis. **Acta Amazonica**, v. 7, p. 473-476, 1977.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998. 2 v., 373 p.

LÜTTGE, U. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism (CAM). **Annals of Botany**, v. 93, p. 629-652, 2004.

LÜTTGE, U. **Physiological ecology of tropical plants**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 314 p.

MA, J. J. et al. Comparative analyses of leaf anatomy of dicotyledonous species in Tibetan and Inner Mongolian grasslands. **Science China Life Sciences**, v. 55, p. 68-79, 2012.

MACEK, P.; MACKOVÁ, J.; DE BELLO, F. Morphological and ecophysiological traits shaping altitudinal distribution of three *Polylepis* treeline species in the dry tropical Andes. **Acta Oecologica**, v. 35, p. 778-785, 2009.

MACHADO, I. C. Oil-Collecting bees and related plants: a review of the studies in the last twenty years and case histories of plants occurring in NE Brazil. In: FREITAS, B. M.; PEREIRA, J. O. P. eds. Solitary Bees. **Conservation, rearing and management for pollination**. Universidade do Ceará, Fortaleza, Brazil, p. 255-280, 2004.

MAKBUL, S. et al. Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. **Turkish Journal of Botany**, v. 35, p. 369-377, 2011.

MANTOVANI, A. et al. Anatomia comparada da folha e espata de espécies de *Anthurium* (Araceae) ocorrentes na Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 33, p. 185-200, 2010.

MANTOVANI, M. et al. Fenologia reprodutiva de espécies arbóreas em uma formação secundária da floresta atlântica. **Revista Árvore**, v. 27, p. 451-458, 2003.

MARGARIS, N. S. Adaptive strategies in plants dominating Mediterranean-type ecosystems. In: **Mediterranean-type shrublands. Ecosystem of the World**. Eds. F. Di Castri, D.W. Goodall and R.L. Specht. Elsevier, Amsterdam, p. 309-315, 1981.

MARQUES, A. R.; GARCIA, Q. S.; FERNANDES, G. W. Effects of sun and shade on leaf structure and sclerophylly of *Sebastiania myrtilloides* (Euphorbiaceae) from Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil. **Boletim Botânico da Universidade de São Paulo**, v. 18, p. 21-27, 1999.

MARTINAZZO, E. G. et al. Efeito do sombreamento sobre o crescimento inicial e teor de clorofila foliar de *Eugenia uniflora* Linn (pitanga) - família Myrtaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 162-164, 2007.

MAUSETH, J. D. **Plant Anatomy**. California: Menlo Park, 1988. 560 p.

MAYEKISO, B.; MAGWA, M. L.; COOPOOSAMY, R. The morphology and ultrastructure of glandular and non-glandular trichomes of *Pteronia incana* (Asteraceae). **African Journal of Plant Science**, v. 2, p. 52-60, 2008.

MEDINA, E.; SOBRADO, M.; HERRERA, R. Significance of leaf orientation for leaf temperature in an Amazonian sclerophyll vegetation. **Radiation and Environmental Biophysics**, v. 15, p.131-40, 1978.

MEDINA, E. CAM and C4 plants in the humid tropics. In: MULKEY, S. S.; CHAZDON, R. L.; SMITH, A. P. (eds.). **Tropical forest plant eco-physiology**. Chapman & Hall, New York, 1996.

MEDINA, E.; GARCIA, V.; CUEVAS, E. Sclerophylly and oligotrophic environments: relationships between leaf, structure, mineral nutrient content, and drought resistance in tropical rain forest of the upper Rio Negro region. **Biotropica**, v. 22, p. 51-64, 1990.

MELO JÚNIOR, J. C. F. DE; BONA, C.; CECCANTIN, G. Anatomia foliar de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae): interpretações ecológicas em diferentes condições edáficas de Cerrado. **Biotemas**, v. 25, p. 29-36, 2012.

MELO, N. C. et al. Leaf anatomy and chlorophyll content in *Psychotria vellosiana* Benth influenced by the edge and two matrices. **Revista de Ciência Agrária - Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 56, p. 80-88, 2013.

MENEZES, N. L.; GIULIETTI, A. M. Campos rupestres. In: MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. (eds.). **Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas de Extinção da Flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, 2000, p. 65-73.

MENGARDA, G. H. L. et al. Morphological and physiological adjustments of Brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam.) to direct solar radiation. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 24, p. 161-172, 2012.

MENINI NETO, L.; ALVES, R. J. V.; FORZZA, R. C. A subtribo Pleurothallidinae (Orchidaceae) no Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais. **Boletim Botânico da Universidade de São Paulo**, v. 25, p. 253-278, 2007.

MENINI NETO, L. et al. Orchidaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, p. 687-696, 2007.

MENINI NETO, L.; FORZZA, R. C.; ZAPPI, D. Angiosperm epiphytes as conservation indicators in forest fragments: A case study from Southeastern Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 18, p. 3785-3807, 2009.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1979. 341 p.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. Baltimore & London: Johns Hopkins University Press, 2000. 913 p.

MICKELIUNAS, L.; PANSARIN, E. R.; SAZIMA, M. Biologia floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucesso reprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 251-258, 2006.

MICKELIUNAS, L. 2007. **Biologia floral e reprodutiva e anatomia do labelo de *Cyrtopodium polyphyllum* Vell. (Orchidaceae, Cyrtopodiinae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, 75 p.

MCKEY, D. 1979. The distribution of secondary compounds within plants. p.55-134. In: Rosenthal G.A. & Jansen D.H. (eds.). *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*. London, Academic Press.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, v. 19, p. 16240-16265, 2014.

MILLER, D. et al. **Serra dos Órgãos, Sua História e Suas Orquídeas**. 2006. 574 p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. and Secretaria Nacional de Biodiversidade e Florestas - SBF, 2002. **Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília, DF: MMA/SBF, 2002. 404 p.

MOHANA RAO, P. R.; KHASIM, S. M. Anatomy of three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) with comments on their ecological adaptability 86 and taxonomy. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences**, v. 97, p. 391-397, 1987.

MOLINA-MONTENEGRO, M. A. et al. Higher plasticity in ecophysiological traits enhances the performance and invasion success of *Taraxacum officinale* (dandelion) in alpine environments. **Biological Invasions**, v. 14, p. 21-33, 2012.

MOREIRA, A. S. F. P. et al. Anatomy and photosynthetic parameters of roots and leaves of two shade-adapted orchids, *Dichaea cogniauxiana* Shltr. and *Epidendrum secundum* Jacq. **Flora**, v. 204, p. 604-611, 2009.

MOREIRA, A. S. F. P.; ISAIAS, R. M. S. Comparative anatomy of the absorption roots of terrestrial and epiphytic orchids. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 83-93, 2008.

MOREIRA, A. S. F. P.; LEMOS FILHO, J. P.; ISAIAS, R.M.S. Structural adaptations of two sympatric epiphytic orchids (Orchidaceae) to a cloudy forest environment in rocky outcrops of Southeast Brazil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 61, p. 1053-1065, 2013.

MORRIS, M. W.; STERN, W. L.; JUDD, W. S. Vegetative anatomy and systematic of subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 120, p. 89-114, 1996.

MOURA, J. C. M. S.; BONINE, C. A. V.; VIANA J. O. F.; DORNELAS M. C.; MAZZAFERA, P. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, p. 360-376, 2010.

MULLER, A.; BATAGHIN, F. A.; SANTOS, S. C. Efeito de borda sobre a comunidade arbórea em um fragmento de Floresta Ombrófila Mista, Rio Grande do Sul, Brasil. **Perspectiva Erechim**, v. 34, p. 29-39, 2010.

MURCIA, C. Edges effects in fragmented forest: implications for conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 10, p. 58-62, 1995.

MURPHY, D. J. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. **Progress in Lipid Research**, v. 32, p. 247-280, 1993.

NAVAS, M-L.; GARNIER, E. Plasticity of whole plant and leaf traits in *Rubia peregrina* in response to light, nutrient and water availability. **Acta Oecologica**, v. 23, p. 375-383, 2002.

NEUBIG, K. M. et al. Generic recircumscriptions of Oncidiinae (Orchidaceae: Cymbidieae) based on maximum likelihood analysis of combined DNA datasets. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 168, p. 117-146, 2012.

NIINEMETS, Ü.; VALLADARES, F. Photosynthetic acclimation to simultaneous and interacting environmental stresses along natural light gradients: optimality and constraints. **Plant biology**, v. 6, p. 254-268, 2004.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

O'BRIEN, T. P.; MCCULLY, M. E. The study of plants structure: principles and selected methods. **Taxon**, v. 31, p. 789-791, 1981.

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

OLIVEIRA, D. C. et al. Reações de defesas químicas e estruturais de *Lonchocarpus muehlbergianus* Hassl. (Fabaceae) à ação do galhador *Euphalerus ostreoides* Crawf. (Hemiptera: Psyllidae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, p. 657-667, 2006.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. Classificação das fitofisionomias da América do Sul cisandina tropical e subtropical: proposta de um novo sistema – prático e flexível – ou uma injeção a mais de caos? **Rodriguésia**, v. 60, p. 237-258, 2009.

OLIVEIRA-FILHO, A. T. et al. Delving into the variations in tree species composition and richness across South American subtropical Atlantic and Pampean forests. **Journal of Plant Ecology**, v. 2, p. 3-23, 2013.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forest in Southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v. 32, p. 793-809, 2000.

OLIVEIRA-PIRES, M. F. et al. Taxonomic separation of the genera *Prosthechea* and *Encyclia* (Laeliinae: Orchidaceae) using leaf and root anatomical features. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 143, p. 293-303, 2003.

OLIVEIRA, V. C.; SAJO, A. G. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, p. 365-374, 1999.

OLIVEIRA, V. C.; SAJO, A. G. Root anatomy of nine Orchidaceae species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 4, 1999.

OLIVEIRA, V. C.; SAJO, A. G. Morfo-anatomia caulinar de nove espécies de Orchidaceae. **Acta Botânica Brasilica**, v. 15, p. 177-188, 2001.

ORIAN, G. H.; JANZEN, D. H. Why are embryos so tasty? **American Naturalist**, v. 108, p. 581-592, 1974.

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses**. Band I Brücke-Verlag Kurt Schmiersow, Hildesheim, 1975. 150 p.

PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses**. Hildesheim: Kurt Schmiersow. v. 2, 1977.

PABST, G. G. J.; MOUTINHO, J. L.; PINTO, A. V.. An attempt to establish the correct statement for genus *Anachelium* Hoffmgg and revision of the genus *Hormidium* Lindl. Ex Heynh. **Bradea**, v. 3, p. 173-186, 1981.

PACEK, A. et al. Floral elaiophore structure in four representatives of the *Ornithocephalus* clade (Orchidaceae: Oncidiinae). **Annals of Botany**, v. 110, p. 809-820, 2012.

PACEK, A.; STPICZYŃSKA, M. The structure of elaiophores in *Oncidium cheiroporum* Rchb.f. and *Ornithocephalus kruegeri* Rchb.f. (Orchidaceae). **Acta Agrobotanica**, v. 60, n. 9-14, 2007.

PAIVA, J. G. A. et al. Verniz vitral incolor 500: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 257-264, 2006.

PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M. **Fisiologia e Produção Vegetal**. Lavras: UFLA, 2006. 104 p.

- PAN, S. et al. The Scaling Relationships between Leaf Mass and Leaf Area of Vascular Plant Species Change with Altitude. **PLOS ONE**, v. 8, p. 1-4, 2013.
- PANDEY, S. K.; SINGH, H.; SINGH, J. S. Species and site effects on leaf traits of woody vegetation in a dry tropical environment. **Current Science**, v. 96, p. 1109-1114, 2009.
- PANSARIN, E. R.; PANSARIN, L. M. A família Orchidaceae na Serra do Japi, São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, p. 99-111, 2008.
- PANSARIN, L. M.; CASTRO, M. D.; SAZIMA, M. Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 159, p. 408-415, 2009.
- PEARCY, R. W.; WAY, D. A. Two decades of sunfleck research: looking back to move forward. **Tree Physiology**, v. 32, p. 1059-1061, 2012.
- PEREIRA, D. C.; BARROS, C. F.; SCARANO, F. R. *In situ* variation in leaf anatomy and morphology of *Andira legalis* (Leguminosae) in two neighbouring but contrasting light environments in a Brazilian sandy coastal plain. **Acta botanica brasílica**, v. 23, n. 1, p. 267-273, 2009.
- PERON, M. V. Listagem preliminar da flora fanerogâmica dos campos rupestres do Parque Estadual do Itacolomi – Ouro Preto/Mariana, MG. **Rodriguésia**, v. 67, p. 63-69, 1989.
- PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Análise da pluviosidade e do efeito de borda sobre os teores de flavonóides em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 740-745, 2009.
- PHILLIPS, O. L. et al. Habitat association among Amazonian tree species: a landscape-scale approach. **Journal of Ecology**, v. 91, p. 757-775, 2003.
- PIAZZA, L. D.; SMIDT, E. C.; BONA, C. Anatomia dos órgãos vegetativos de espécies de *Bulbophyllum* seção *Didactyle* (Lind.) Cogn. e *Bulbophyllum* seção *Xiphizusa* Rchb. F. (Orchidaceae). **Hoehnea**, v. 42, p. 171-183, 2015.
- PINHEIRO, F.; BARROS, F. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. **Nordic Journal of Botany**, v. 25, p. 126-136, 2007.
- PINTADO, A.; VALLADARES, F.; SANCHO, L. G. Exploring phenotypic plasticity in the lichen *Ramalina capitata*: morphology, water relations and chlorophyll content in North- and South-facing populations. **Annals of Botany**, v. 80, p. 345-353, 1997.
- PIRANI, J. R. et al. Checklist and patterns of geographic distribution of the vegetation of Serra do Ambrósio, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 17, p. 133-147, 1994.
- PIRANI, J. R.; MELLO-SILVA, R.; GIULIETTI, A. M. Flora de Grão Mogol, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 21, p. 1-24, 2003.

PIRWITZ, K. Physiologische und anatomische Untersuchungen an Speichertracheiden und Velamen. **Planta**, v.14, p. 19-76, 1931.

PORSCH, O. Beiträge zur 'histologischen' Blütenbiologie. In: **Mitt Inst Allg Bot Hamb**, v. 55, p. 165-173, 227-235, 253-260, 1905.

PRICE, T. D.; QVARNSTROM, A.; IRWIN, D. E. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, p. 1433-1440, 2003.

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

PRIDGEON, A. M. Anatomical adaptations in Orchidaceae. **Lindleyana**, v. 1, p. 90-101, 1986.

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

PRIDGEON, A. M. et al. Epidendroideae (Part One). **Genera Orchidacearum**. New York: Oxford University Press, 2006, v. 4. 672p.

PRIDGEON, A. M. et al. **Genera Orchidacearum**. New York: Oxford University Press, 2001, v. 2. 464 p.

PRIDGEON, A. M. et al. **Genera Orchidacearum**. v. 3. Orchidoideae (Part Two) – Vanilloideae. New York: Oxford University Press, 2003.

PRIDGEON, A. M. et al. **Genera Orchidacearum**. New York: Oxford University Press, 2009. v. 5.

PRIDGEON, A. M. et al. **Genera Orchidacearum**. New York: Oxford University Press, 1999, v. 1. 298p.

PRIDGEON, A. M. et al. Subtribe Pleurothallidinae. In: PRIDGEON, A. M. et. al (eds.). **Genera Orchidacearum**. New York: Oxford University Press, 2005, v. 4.

PRIDGEON, A. M. et al. **Genera Orchidacearum**. General introduction, Apostasioideae, Cypripedioideae. Oxford: University Press, 1999, v.1. 352p.

PRIDGEON, A.M. et al. **Genera Orchidacearum**. Epidendroideae. Oxford: University Press, 2005, v. 4. 672p.

PRIDGEON, A. M. Systematic leaf of Caladeniinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 144, p. 31-48, 1994.

PRIMACK, B; RICHARD. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina. Midiograf, 2001. 328 p.

PROCTOR, M.; YEO, P.; LARK, A. **The natural history of pollination**. London: Harper Collins, 1996. 479 p.

PROCTOR, M.; YEO, P. **The pollination of flowers**. London: Collins, 1975. 418 p.

RAJSNEROVÁ, P. et al. Morphological, biochemical and physiological traits of upper and lower canopy leaves of European beech tend to converge with increasing altitude. **Tree Physiology**, v. 35, p. 47-60, 2015.

RAMOS, C. et al. Variabilidad ambiental y respuestas fisiológicas de *Polylepis cuadrijuga* (Rosaceae) en un ambiente fragmentado en el Páramo de la Rusia (Colombia). **Revista de Biología Tropical**, v. 61, p. 351-361, 2013.

RASMUSSEN, H. Orchid stomata - structure, differentiation, function and phylogeny. In: ARDITTI, J. (Ed.). **Orchid biology: reviews and perspectives IV**. New York: Cornell University Press, 1987. p. 105-138.

READ, Q. D. et al. Convergent effects of elevation on functional leaf traits within and among species. **Functional Ecology**, v. 28, p. 37-45, 2014.

REGO, G. M., POSSAMAI, E. Efeito do sombreamento sobre o teor de clorofila e crescimento inicial do Jequitibá-rosa. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 53, p. 179-194, 2006.

REIS, M. G. et al. Oncidinol – a novel diacylglycerol from *Ornithophora radicans* Barb. Rodr. (Orchidaceae) floral oil. **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 8519-8523, 2003.

REIS, M. G. et al. The chemical composition of *Phymatidium delicatulum* and *P. tillandsioides* (Orchidaceae) floral oils. **Natural Product Communications**, v.1, p. 757-761, 2006.

REIS M. G. et al. The chemistry of flower rewards – *Oncidium* (Orchidaceae). **Journal of the Brazilian chemical society**, v. 11, p. 600-608, 2000.

REHR, S. S.; JANZEN, D. H.; FEENY, P. P. L-Dopa in legumes seeds: a chemical barrier to insect attack. **Science**, v. 181, p. 81-82, 1973.

REICH, P. B.; WALTERS, M. B.; ELLSWORTH, D. S. From tropics to tundra: Global convergence in plant functioning. **Proceedings National Academic Science**, v. 94, p.13730-13734, 1997.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto Madeiras de Santa Catarina**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1978. 320 p.

RICHARDSON, A.; BERLYN, G. Changes in foliar spectral reflectance and chlorophyll fluorescence of four temperate species following branch cutting. **Tree Physiology**, v. 22, p. 499-506, 2002.

RICHARDSON, A. D. et al. Foliar plasticity of hybrid spruce in relation to crown position and stand age. **Canadian Journal of Botany**, v. 78, p. 305-317, 2000.

RIGUEIRA, D. M. G. et al. Influência da distância da borda e do adensamento foliar sobre a abundância de plantas pioneiras em um fragmento de Floresta Tropical Submontana na Estação Ecológica de Wenceslau Guimarães (Bahia, Brasil). **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 1, p. 197-202, 2012.

RHOADES, D. F.; CATES, R. G. Toward a general theory of plant antiherbivore chemistry. **Recent Advances in Phytochemistry**, v. 10, p. 168-213, 1976.

RIZZINI, C.T. **Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. Âmbito Cultural Edições Ltda., Rio de Janeiro. 1997. 747p.

RIZZINI, C. T. **Tratado de Fitogeografia do Brasil**. São Paulo: Edusp. 1976. 317 p.

ROCHA, G. C. O meio físico da região de Ibitipoca: características e fragilidade. In: FORZZA, R. C.; MENINI NETO, L.; SALIMENA, F. R. G.; ZAPPI, D. **Flora do Parque Estadual do Ibitipoca e seu entorno**. Juiz de Fora: Ed. UFJF, 2013. cap. 2, p. 27-52.

RODELA, L. G. Cerrados de altitude e campos rupestres do Parque Estadual de Ibitipoca, sudeste de Minas Gerais: distribuição e florística por subfisionomias da vegetação. **Revista do Departamento de Geografia da Universidade de São Paulo**, v. 12, p. 1-248, 1998.

RODELA, L. G.; TARIFA, J. R. Unidades ambientais do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais. **GEOUSP – Espaço e Tempo**, v. 10, p. 97-116, 2001.

_____. O clima da Serra do Ibitipoca, Sudeste de Minas Gerais. **GEOUSP – Espaço e Tempo**, v. 11, p. 101-113, 2002.

RODRIGUES, P. J. F. P.; NASCIMENTO, M. T. Fragmentação florestal: breves considerações teóricas sobre efeito de borda. **Rodriguésia**, v. 57, p. 63-74, 2006.

RÔÇAS, G.; SCARANO, F. R.; BARROS, C. F. Leaf anatomical variation in *Alchornea triplinervia* (Spreng) Mull. Arg. (Euphorbiaceae) under distinct light and soil water regimes. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 136, p. 231-238, 2001.

ROMANINI, R. P.; BARROS, F. Orchidaceae. In: M. M. R. F. MELO et al. (eds.). **Flora Fanerogâmica da Ilha do Cardoso**, v. 12, p. 29-275, 2008.

ROSSATTO, D. R.; KOLB, R. M. *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera (Asteraceae) changes in leaf structure due to differences in light and edaphic conditions. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 605-612, 2010.

SACK, L. et al. How strong is intracanalopy leaf plasticity in temperate deciduous trees? **American Journal of Botany**, v. 93, p. 829-839, 2006.

SALIMENA, F. R. G.; VIANA, P. L.; MOREIRA, F. Caracterização e diagnóstico da vegetação campestre do Parque Estadual do Ibitipoca e entorno. In: **Plano de Manejo do Parque Estadual do Ibitipoca**. Instituto Estadual de Florestas, Belo Horizonte, 2006.

SALIMENA-PIRES, F. R. Aspectos fisionômicos e vegetacionais do Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. In: ROCHA, G. C. (coord.) Anais do 1º Seminário de Pesquisa sobre o Parque Estadual do Ibitipoca, Juiz de Fora, v. 1, p. 51-60, 1997.

SALIS, S. M.; SHEPHERD, G. J.; JOLY, C. A. Floristic comparison between mesophytic forests of the interior of the state of São Paulo, S.E. Brazil. **Journal of Vegetation Science**, v. 119, p. 55-164, 1995.

SALISBURY, F. B. **Units, Symbols, and Terminology for Plant Physiology**. Oxford University Press, Oxford, 1996. 234 p.

SAMARAKOON, S. P.; SHELTON, H. M.; WILSON, J. R. Voluntary feed intake by sheep and digestibility of shaded *Stenotaphrum secundatum* and *Pennisetum clandestinum* herbage. **Journal of Agricultural Science**, v. 114, p. 143-150, 1990.

SANCHES, M. C. et al. Morfologia foliar de indivíduos jovens e adultos de *Caesalpinia echinata* Lam. numa floresta semidecídua do Sul da Bahia. **Revista Árvore**, v. 33, p. 885-893, 2009.

SANO, P. T. et al. Monocotiledôneas Ameaçadas de Extinção no Estado de Minas Gerais. In: DRUMMOND, G. M. et al. (Eds), **Lista Vermelha das Espécies da Fauna e da Flora Ameaçada de Extinção em Minas Gerais**. 2. ed. Belo Horizonte: Biodiversitas, 2008. 1 CD-Rom.

SANTIAGO, E. J. A. et al. Aspectos da anatomia foliar da pimenta-longa (*Piper hispidinervium* C. DC.) sob diferentes condições de luminosidade. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 05, p. 1035-1042, 2001.

SARTORI, A.; LOMBARDI NETO, F.; GENOVEZ, A. M. Classificação Hidrológica de Solos Brasileiros para a Estimativa da Chuva Excedente com o Método do Serviço de Conservação do Solo dos Estados Unidos Parte 1: Classificação. RBRH. **Revista Brasileira de Recompensas Hídricas**, v. 10, p. 5-18, 2005.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. The Iowa State College Press, Ames, 1951.

SCALON, S. P. Q. et al. Crescimento inicial de mudas de espécies florestais nativas sob diferentes níveis de sombreamento. **Revista Árvore**, v. 26, p. 1-5, 2002.

SCARIOT, A. et al. Vegetação e Flora. 104-123 p. In: Ministério do Meio Ambiente – MMA. **Fragmentação de Ecossistemas: Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas** / Denise Marçal Rambaldi, Daniela América Suárez de Oliveira (orgs.). 2. ed. Brasília: MMA/SBF, 2005. 510 p.

SCARIOT, A. et al. Espécies raras e endêmicas. 28-29 p. In: Ministério do Meio Ambiente – MMA. **Fragmentação de Ecossistemas: Causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas** / Denise Marçal Rambaldi, Daniela América Suárez de Oliveira (orgs.). 2. ed. Brasília: MMA/SBF, 2005. 510 p.

SCATENA, V. L.; NUNES, A. C. Anatomia de *Pleurothallis rupestris* Lindl. (Orchidaceae) dos campos rupestres do Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 15, p. 35-43, 1996.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S. 2005. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 635-649.

SCHLICHTING, C. D. Phenotypic plasticity in plants. **Plant Species Biology**, v. 17, p. 85-88, 2002.

_____. The evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 17, p. 667-693, 1986.

SCHLÜTER, U.; MUSCHAK, M.; BERGER D.; ALTMANN, T. Photosynthetic performance of an *Arabidopsis* mutant with elevated stomatal density (*sdd1-1*) under different light regimes. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 867-874, 2003.

SCHUMACHER, M. V. Aspectos da ciclagem de nutrientes e do microclima em talhões de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, *E. grandis* Hill ex Maiden e *E. torelliana* F. Muell. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)- Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992. 87 p.

SCUDELLER, V. V.; MARTINS, F. R.; SHEPHERD, G. J. Distribution and abundance of arboreal species in the Atlantic Ombrophilous Dense Forest in Southeastern Brazil. **Plant Ecology**, v. 152, p. 185-199, 2001.

SEGATTO, F. B. et al. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Revista Ciência Rural**, v. 34, p. 1597-1601, 2004.

SEIXAS, F de C. et al. Leaf Anatomy of *Prosthechea moojenii* (Pabst) W. E. Higgins and *P. silvana* Cath. & V. P. Castro (Orchidaceae) as an Approach to Taxonomy of Species Occurring in Biomes Cerrado and Atlantic Forest of the Bahia. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 1752-1758, 2012.

SEVGI, E. E. et al. Morphological and Ecological studies on some Orchis (Orchidaceae) taxa of Mediterranean region in Turkey. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, p. 343-353, 2012.

SCHEEPENS, J. F.; FREI, E. S.; STÖCKLIN, J. Genotypic and environmental variation in specific leaf area in a widespread Alpine plant after transplantation to different altitudes. **Oecologia**, v. 164, p. 141-150, 2010.

SCHLICHTING, C. D. The evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annual Review of Ecological and Systematics**, v. 17, p. 667-693, 1986.

SCHULTZ, A. R. Introdução ao estudo da botânica sistemática. Porto Alegre: Globo. 1968. 647 p.

SCHYMANSKI, S. J.; OR, D. Effects of wind speed on leaf energy and gas exchange. In: **EGU General Assembly Conference Abstracts**. 2013. 8628 p.

SHAFER, C. L. **Nature reserves: island theory and conservation practice**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1990. 185p.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. **Advances In Botanical Research Incorporating Advances In Plant Pathology**, v. 26, p. 135-192, 1997.

SHIRWAIKAR, A. et al. Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 171-5, 2004.

SILVA, C. I.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Caracterização morfo-anatômica dos órgãos vegetativos de *Cattleya walkeriana* Gardner (Orchidaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, p. 91-100, 2004.

SILVA, I. V. et al. Estratégias anatômicas foliares de treze espécies de Orchidaceae ocorrentes em um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB) – MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 741-750, 2006.

SILVA, I. V.; MEIRA, R. M. S. A.; AZEVEDO, A. A. Anatomia de raízes de espécies de Orchidaceae do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais. **Hoehnea**, v. 37, p. 147-161, 2010.

SILVA, L. B ; FREITAS, H. M. B. Texto Academico - **Os Vegetais e a Água**. UFBA / Projeto Qualibio, Salvador, 1998. Disponível em: <<http://www.qualibio.ufba.br/012.html>>. Acesso em: 04 ago. 2008.

SILVERA, K. **Adaptive radiation of oil-reward compounds among neotropical orchid species (Oncidiinae)**. PhD thesis, University of Florida, USA, 2002.

SINGER, R. B.; COCUCCHI, A. A. Pollination mechanisms in four sympatric southern Brazilian Epidendroideae orchids. **Lindleyana**, v. 14, p. 47-56, 1999.

SINGER, R. B. et al. The Ecology and chemistry of pollination in Brazilian orchids: recent advances. In J. Teixeira da Silva, ed. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, Vol. IV. Global Science Books, Middlesex. p. 569-582, 2006.

SINGH, V.; SINGH, H. Organization of stomatal complex in some Orchidaceae. **Current Science**, v. 43, p. 490-91, 1974.

SMIDT, E. C.; GALLO, L. W.; SCATENA, V. L. Leaf anatomical and molecular studies of *Bulbophyllum* section *Micranthae* (Orchidaceae) and their implications for systematic. **Brazilian Journal of Botany**, v. 36, p. 75-82, 2013.

SMITH, N. et al. **Flowering plants of the Neotropics** - Introduction. Princeton: Princeton University Press, 2004.

SMITH, M. A., WHITEMAN, P. C. Evaluation of tropical grasses in increasing shade under coconut canopies. **Experimental Agriculture**, v. 19, p. 153-161, 1983.

SMITH, W. K.; BERRY, Z. C. Sunflecks? **Tree physiology**, v. 33, p. 233-237, 2013.

SOARES, G. L. G. et al. Alterações químicas induzidas por coccídeos galhadores (Coccoidea: Brachyscelidae) em folhas de *Rollinia laurifolia* Schdtl. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 2, p. 103-116, 2000.

SOBRADO, M. A.; MEDINA, E. General morphology, anatomical structure, and nutrient content of sclerophyllous leaves of the “bana” vegetation of Amazonas. **Oecologia**, v. 45, p. 341-345, 1980.

SOMAVILLA, N. S.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Análise comparativa da anatomia foliar de Melastomataceae em ambiente de vereda e cerrado *sensu stricto*. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, p. 764-775, 2011.

SOOLANAYAKANAHALLY, R. Y. et al. Enhanced assimilation rate and water use efficiency with latitude through increased photosynthetic capacity and internal conductance in balsam poplar (*Populus balsamifera* L.). **Plant Cell Environmental**, v. 32, p.1821-1832, 2009.

SOUZA, G. S. et al. Estrutura foliar e de cloroplastídeos em *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker em diferentes condições de qualidade de luz. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 78-80, 2007.

SOUZA, C. V.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Plantarum, 2005.

SOUZA, R. P.; VÁLIO, I. F. M. Seedling growth of fifteen tropical tree species differing in successional status. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, p.35-47, 2003.

SOUZA, W. **Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: SBME, 1988. 179 p.

SPRUNGER, S. (ed.); CRIBB, P.; TOSCANO-DE-BRITO, A. L. V. (colabs.). **João Barbosa Rodrigues - Iconographie des orchidées du Brésil**. v. 1, The illustrations. Basle: Friedrich Reinhardt Verlag, 1996.

STAHL, W. et al. Lycopene-rich products and dietary photoprotection. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 5, p. 238-242, 2006.

STANNARD, B. L. (ed.). **Flora of the Pico das Almas – Chapada Diamantina, Bahia, Brazil**. Kew, Royal Botanic Gardens, 1995.

STERCK, F. J.; POORTER, L.; SCHIEVING, F. Leaf traits determine the growth–survival trade-off across rain forest tree species. **The American Naturalist**, v. 167, p. 758-765, 2006.

STERN, W. L. **Anatomy of the Monocotyledons: X. Orchidaceae**. University Press, Oxford, 2014.

STERN, W. L.; JUDD, W. S.; CARLSWARD, B. S. Systematic and comparative anatomy of Maxillarieae (Orchidaceae), *sans* Oncidiinae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 144, p. 251-274, 2004.

STERN, W. L.; CARLSWARD, B. S. Comparative vegetative anatomy and systematics of Laeliinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.160, p. 21-41, 2009.

STERN, W. L.; WHITTEN, W. M. Comparative vegetative anatomy of Stanhopeinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 129, p. 87-103, 1999.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1995. 378p.

STPICZYŃSKA, M.; DAVIES, K. L. Elaiophore structure and oil secretion in flowers of *Oncidium trulliferum* Lindl. and *Ornithophora radicans* (Rchb.f.) Garay & Pabst (Oncidiinae: Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 101, p. 375-384, 2008.

STPICZYŃSKA, M.; DAVIES, K. L.; GREGG, A. Elaiophore diversity in three contrasting members of Oncidiinae Benth. (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 155, p. 135-148, 2007.

STPICZYŃSKA, M. et al. Comparative anatomy of the floral elaiophore in representatives of the newly re-circumscribed *Gomesa* and *Oncidium* clades (Orchidaceae: Oncidiinae). **Annals of Botany**, v. 112, p. 839-854, 2013.

STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v. 35, p. 748- 755, 2005.

STUMPF, P. K. Biosynthesis of saturated and unsaturated fatty acids. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E. (Eds), **The Biochemistry of Plants**, New York: Academic Press, p. 177-204, 1980.

SULTAN, S. E. Phenotypic plasticity and plant adaptation. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 44, p. 363-383, 1995.

_____. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 537-542, 2000.

_____. Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. **Evolution & Development**, v. 5, n.1, p. 25-33, 2003.

_____. Promising directions in plant phenotypic plasticity. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 6, p. 227-233, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TALORA, D. C.; MORELLATO, P. C. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planície litorânea do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo , v. 23, p. 13-26, 2000.

TANNER, E. V. J.; KAPOV, V. Leaf structure of Jamaican montane rain-forest trees. **Biotropica**, v. 14, p. 16-24, 1982.

TERASHIMA, I. et al. Irradiance and phenotype: comparative ecocodevelopment of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 343-54, 2006.

THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E.; CRAIG, I. E. Photosynthetic Response to light and nutrients in sun-tolerant and shade-tolerant rainforest trees. I. growth, leaf anatomy and nutrient content. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 1-18, 1992.

TOBARES, L.; GUZMÁN, C.; MAESTRI, D. Effect of the extraction and bleaching processes on jojoba (*Simmondsia chinensis*) wax quality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 749-753, 2003.

TORRETTA, J. P. et al. Biología reproductiva de *Gomesa bifolia* (Orchidaceae, Cymbidieae, Oncidiinae). **Darwiniana**, v. 49, p. 16-24, 2011.

TOSCANO-DE-BRITO, A. L. V.; CRIBB, P. **Orquídeas da Chapada Diamantina**, Editora Nova Fronteira, São Paulo, 2005.

TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 4, p. 147-157, 2006.

TURNER, I. M. Sclerophylly: primarily protective? **Functional Ecology**, v. 8, p. 669-675, 1994.

TURNER, I. M.; ONG, B. L.; TAN, H. T. W. Vegetation analysis, leaf structure and nutrient status of a Malaysian heath community. **Biotropica**, v. 27, p. 2-12, 1995.

TURNER, N. C.; KRAMER, P. J. **Adaptation of plants to water and high temperature stress**. New York: John Wiley & Sons, 1980. 428p.

TIWARI, S. P. et al. Comparative morphological, epidermal, and anatomical studies of *Pinus roxburghii* needles at different altitudes in the North-West Indian Himalayas. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, p. 65-73, 2013.

VALENTE, A. S. M. et al. Composição, estrutura e similaridade florística da Floresta Atlântica, na Serra Negra, Rio Preto – MG. **Rodriguésia**, v. 62, p. 321-340, 2011.

VALLADARES, F. et al. Plastic phenotypic response to light of 16 congeneric shrubs from a Panamanian rainforest. **Ecology**, v. 81, p. 1925-1936, 2000.

VALLADARES, F. et al. The greater seedling high-light tolerance of *Quercus robur* over *Fagus sylvatica* is linked to a greater physiological plasticity. **Trees**, v. 16, p. 395-403, 2002.

VALLADARES, F. et al. Shade tolerance, photoinhibition sensitivity and phenotypic plasticity of *Ilex aquifolium* in continental Mediterranean sites. **Tree Physiology**, v. 25, p. 1041-1052, 2005.

VALLADARES, F.; SANCHEZ-GOMES, D.; ZAVALA, M. A. Quantitative estimation of phenotypic plasticity. **Journal of Ecology**, v. 94, p. 1103-1116, 2006.

VAN DER CINGEL, N. A. **An atlas of orchid pollination: America, Africa, Asia and Australia**. Netherlands: A. A. Balkema, 2001. 296 p.

VAN DER PIJL, L.; DODSON, C. H. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. Coral Gables, FL: University of Miami Press, 1969. 214 p.

VAN DER SCHOOT, C. et al. Plant lipid bodies and cell-cell signaling: A new role for an old organelle? **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, p.1732-1738, 2011.

VENDRAMINI, F. et al. Leaf traits as indicators of resource-use strategy in floras with succulent species. **New Phytologist**, v. 154, p. 147-157, 2002.

VENEKLAAS, E. J.; OUDEN, F. Dynamics of non-structural carbohydrates in two *Ficus* species after transfer to deep shade. **Environmental and Experimental Botany**, v. 54, p. 148-154, 2005.

VENTRELLA, M. C.; MARINHO, C. R. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, p. 457-467, 2008.

VIANA, V. M. Biologia e manejo de fragmentos de florestas naturais. In: Congresso Florestal Brasileiro, Campos do Jordão. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura e Sociedade Brasileira de Engenheiros Florestais, 1990. Resumos, p. 155.

VIOLLE, C. et al. Let the concept of trait be functional! **Oikos**, v. 116, p. 882-892, 2007.

VITTA, F. Diversidade e conservação da flora nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais. In: ARAÚJO, E. L. et al. (eds.). **Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil**, UFRPE/SBB, Pernambuco, p. 90-94, 2002.

VITTI, A. M.; BRITO, J. O. Produção de óleo essencial de eucalipto. **IPEF Notícias**, v. 23, p. 11, 1999.

VOGEL, S. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. **Akademie der Wissenschaften und der Literatur Tropische und subtropische. Pflanzenwelt**, v. 7, p. 285-547, 1974.

WACHOWICZ, M. C. et al. **Fisiologia Vegetal: Produção de pós-colheita**. Curitiba: Champagnat, 2002. 422 p.

WALTERS, M. B.; REICH, P. B. Low light carbon balance and shade tolerance in the seedlings of woody plants: do winter deciduous and broad-leaved evergreen species differ? **New Phytologist**, v. 143, p. 143-154, 1999.

WANG, H. H. et al. Species distribution modelling for conservation of an endangered endemic orchid. **AoB PLANTS**, v. 7, p. 39, 2015.

WAR, A. R. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, p. 1306-1320, 2012.

WATKINS, J. E.; CARDELÚS, C. Ferns in an angiosperm world: cretaceous radiation into the epiphytic niche and diversification on the forest floor. **International Journal of Plant Sciences**, v. 173, p. 695-710, 2012.

WAY, D. A.; PEARCY, R. W. Sunflecks in trees and forests: from photosynthetic physiology to global change biology. **Tree Physiology**, v. 32, p. 1066-1081, 2012.

WEBB, L. J. A physiognomic classification of Australian rain forests. **Journal Ecology**, v. 47, p. 551-570, 1959.

WIDHOLZER, C. F. N.; OLIVEIRA P. L. Tipo fotossintético e anatomia foliar de *Sophranitis coccinea* (Orchidaceae). **Napaea**, v. 10, p. 23-29, 1994.

WITHNER, C. L. et al. The anatomy of orchids. In: WITHNER, C. L. (ed). **The orchids: a scientific studies**. New York: Wiley-Interscience, 1974. p. 267-347.

WILLIAMS, C. A. The leaf flavonoides of Orchidaceae. **Phytochemistry**, v. 18, p. 803-813, 1979.

WILLIAMS, N. H. The biology of orchids and *Euglossine* bees. In: ARDITTI, J. (Eds), **Orchid Biology: Reviews and Perspectives**, II. Ithaca. New York: Cornell University Press, 1982. p. 119-171.

WITKOWSKI, E. T. F.; LAMONT, B. B. Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. **Oecologica**, Berlin, v. 88, p. 486-493. 1991.

WYKA, T.; ROBAKOWSKI, P.; ZYTKOWIAK, R. Acclimation of leaves to contrasting irradiance in juvenile trees differing in shade tolerance. **Tree Physiology**, v. 27, p. 1293-1306, 2007.

XIE, C. et al. Açai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice 93 through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Atherosclerosis**, v. 216, p. 327-333, 2011.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y.; IKEHARA, N. Flavonoidperoxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. **Plant Physiology**, v.115, p. 1405-1412, 1997.

YAO, L. et al. Seasonal variations of phenolic compounds in Australia-grown tea (*Camellia sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6477-6483, 2005.

YOSHIMURA, K. Irradiance heterogeneity within crown affects photosynthetic capacity and nitrogen distribution of leaves in *Cedrelela sinensis*. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 750-758, 2010.

YENTÜR, S. Bitki Anatomisi. İstanbul Üniversitesi, **Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul** (in Turkish), 2003.

ZANENGA-GODOY, R.; COSTA, C. G. Anatomia foliar de quatro espécies do gênero *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae) do planalto central brasileiro. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, p. 101-118, 2003.

ZAPPI, D. C. et al. Lista das plantas vasculares de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 21, p. 345-389, 2003.

ZAPPI, D. C. et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1984. 218p.

ZHANG, H. X.; LIU, G. H.; CUI, X. P. Affection of aridity to anatomical structure of leave of *Ulmus pumila* L. var. *sabulosa*. **Bulletin of Botanical Research**, v. 25, p. 39-44, 2005.

ZUANAZZI, J. S. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS ; Florianópolis: EdUFSCar, 2004. 742 p.

ZUNZUNEGUI, M. et al. Seasonal physiological plasticity and recovery capacity after summer stress in Mediterranean scrub communities. **Plant Ecology**, v. 212, p. 127-142, 2011.