

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS: BOTÂNICA**



JORGEANE VALÉRIA CASIQUE TAVARES

**ESTRUTURAS SECRETORAS FLORAIS E EXTRAFLORAIS EM ESPÉCIES DE
STANHOPEINAE (ORCHIDACEAE) OCORRENTES NA REGIÃO AMAZÔNICA
BRASILEIRA: MORFOLOGIA, ANATOMIA E PERFIL FITOQUÍMICO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

JORGEANE VALÉRIA CASIQUE TAVARES

**ESTRUTURAS SECRETORAS FLORAIS E EXTRAFLORAIS EM ESPÉCIES DE
STANHOPEINAE (ORCHIDACEAE) OCORRENTES NA REGIÃO AMAZÔNICA
BRASILEIRA: MORFOLOGIA, ANATOMIA E PERFIL FITOQUÍMICO**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutora em Ciências:
Botânica na Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Alexandra Antunes
Mastroberti

PORTO ALEGRE

2020



À minha
família,
dedico.

Agradecimentos

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) pela formação;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida e apoio a pesquisa;

Ao Museu Paraense Emílio Goeldi pela estrutura concedida e por disponibilizar o Laboratório de Anatomia Vegetal e o Laboratório de Fitoquímica para a realização de análises complementares deste trabalho.

A coordenação da Pós-graduação em Botânica e a sua respectiva secretaria, por serem sempre muito solícitos com as nossas necessidades acadêmicas;

A Prof. Dr.^a Alexandra Mastroberti, pela confiança, paciência, pelo tempo dispensado nas correções dos textos e por todo suporte dado em minha formação;

A Dra. Alba Lins pelo incentivo, conselhos, confiança desde a Iniciação Científica, por todo o apoio ao longo desses 9 anos, apoio este que me ajudou a aperfeiçoar o meu sonho com a Botânica, em especial com a anatomia vegetal.

A MSc. Tatiani Kikuchi, minha mãe da academia, pelo seu amor, companheirismo e amizade. Obrigada por cada direcionamento, incentivo e conselhos;

Ao Dr. Edilson Freitas pelo suporte nas análises em MEV de algumas amostras, pelos momentos de descontração e amizade;

Ao Dr. Fernando Carvalho, do departamento de entomologia do Museu Paraense Emílio Goeldi, por auxiliar na identificação das abelhas e formigas.

Aos colegas da Pós-graduação da Botânica, pelas confraternizações;

Ao orquidófilo e amigo Luiz Otávio Adão Teixeira por fornecer um espaço em sua propriedade para o cultivo de amostras e por fornecer material botânico, provindos de sua coleção particular;

Aos amigos, João Batista, Wanderson Luis, Ana Kelly e André Cardoso que desde o começo me incentivaram a realizar a pesquisa com o grupo Stanhopeinae, forneceram informações de campo a cerca das espécies e por toda ajuda com as fotos;

Aos colegas do Laboratório de Anatomia Vegetal, Carolina Breitsameter, José Richit, Keyla Boch, Vanessa Rubio, Juliana Troleis, Patrícia Gentz, Rhaniel Gonçalves, Henrique Büneker, Fernanda Schmidt, Jordano Tavares, Wagner Martins e Tamara Pastore pela amizade, acolhida, ótima convivência e por todo apoio neste trabalho;

As minhas melhores amigas, Luma Daniele e Mirian Rodrigues por serem tão especiais em minha vida, sendo sempre maravilhosas comigo e por me darem apoio incondicional em todos os momentos;

Aos meus amigos André Correia, Erenson Junior, Edilson Freitas, Jaqueline Helen, Andreza Pereira, Wanderson Luis, Suzane Brigida e Camila Lôbo pelas conversas descontraídas;

Aos meus amigos Perfect Cicero Silva, Daniel Cordova, Rafael Vieira e Douglas Tavares pelos momentos de descontração, companheirismo, troca de conhecimentos e forte amizade;

Aos meus pais, Esther e Joaquim, pelo apoio contínuo, conselhos, incentivos, confiança, exemplo de vida e por todos os sacrifícios que fazem em prol dos filhos, amo muito vocês. E aos meus irmãos, José Luís e Ramon, por serem meus encorajadores e amores da minha vida;

Ao meu companheiro Marcos Vinicius, por todo o seu amor, amizade, paciência, companheirismo, carinho e momentos de paz, te amo.

Um agradecimento especial para todas as espécies analisadas neste estudo, pelas florações não esperadas e curiosidades que só me fizeram amá-las ainda mais.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

Jorgeane Valéria.

Casique Tavares, Jorgeane Valéria

ESTRUTURAS SECRETORAS FLORAIS E EXTRAFLORAIS EM
ESPÉCIES DE STANHOPEINAE (ORCHIDACEAE) OCORRENTES NA
REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA: MORFOLOGIA, ANATOMIA E
PERFIL FITOQUÍMICO / Jorgeane Valéria Casique Tavares.
-- 2020.

142 f.

Orientadora: Alexandra Antunes Mastroberti.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Biociências, Programa de
Pós-Graduação em Botânica, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Anatomia vegetal. 2. Orchidaceae. 3. Estruturas
secretoras. 4. Amazônia. 5. Monocotiledôneas. I.
Mastroberti, Alexandra Antunes, orient. II. Título.

RESUMO

Em Orchidaceae, osmóforos, elaióforos e nectários são comumente encontrados nas flores, cujas formas e cores são amplamente diversas e de irrefutável beleza, as quais atraem potenciais polinizadores e conferem a elas uma relação, muitas vezes, específica com os insetos. Assim, percebe-se que, caracterizar as estruturas secretoras de suas flores e entender a dinâmica de secreção das mesmas é de fundamental importância para melhor compreender o processo de interação inseto-planta, no sucesso reprodutivo dessas plantas, especialmente para espécies de *Gongora* Ruiz & Pav., e *Coryanthes* Hook. que são exclusivamente polinizadas por abelhas macho Euglossini. O objetivo deste trabalho foi investigar as estruturas secretoras florais e extraflorais de espécies de *Gongora* e *Coryanthes*, ocorrentes na Amazônia brasileira, a fim de compreender suas funções ecológicas e as relações com os forrageadores, além de fornecer subsídios para expandir os estudos anatômicos com outras espécies do grupo. Para isso, amostras florais foram coletadas e analisadas sob microscopia óptica de luz, em conjunto com análises histoquímicas e fitoquímicas, microscopia eletrônica de varredura e transmissão. As espécies de Stanhopeinae analisadas (*Gongora jauariensis* Campacci & J.B.F.Silva, *G. pleiochroma* Rchb.f., *G. minax* Rchb.f. e *Coryanthes macrantha* (Hook.) Hook.), oferecem recompensas produzidas pelos osmóforos (em sua maioria terpenos) aos seus polinizadores – as abelhas macho de Euglossini (*Eulaema* sp. e *Euglossa* sp.). Já os nectários florais e extraflorais para os gêneros analisados, são detalhados anatomicamente pela primeira vez aqui. Estes exsudam néctar por estômatos e efetivam assim, a relação simbiótica com formigas (*Azteca* sp. e *Dolichoderus* sp.), e em contrapartida, auxiliam na proteção das flores. Os dados morfoanatomicos e fitoquímicos analisados neste estudo fornecem subsídios para expandir análises anatômicas com outras espécies do grupo, bem como com outras Orchidaceae.

Palavras chaves: osmóforo – elaióforo – nectário – orquídeas – coléter – polinização.

ABSTRACT

In Orchidaceae, osmophores, elaiophores and nectaries are commonly found in flowers, whose shapes and colors are widely diverse and of irrefutable beauty, which attract potential pollinators and give them an often specific relationship with insects. Thus, it is clear that characterizing the secretory structures of its flowers and understanding their secretion dynamics is of fundamental importance to better understand the process of insect-plant interaction, in the reproductive success of these plants, especially for species of *Gongora* Ruiz & Pav. and *Coryanthes* Hook. which are exclusively pollinated by male Euglossini bees. The aim of this work was to investigate the floral and extrafloral secretory structures of *Gongora* and *Coryanthes* species, occurring in the Brazilian Amazon, in order to understand their ecological functions and the relationships with foragers, in addition to providing subsidies to expand anatomical studies with other species. of the group. For this, floral samples were collected and analyzed under light optical microscopy, together with histochemical and phytochemical analysis, scanning and transmission electron microscopy. The species of Stanhopeinae analyzed (*Gongora jauariensis* Campacci & JBFSilva, *G. pleiochroma* Rchb.f., *G. minax* Rchb.f. and *Coryanthes macrantha* (Hook.) Hook.), offer rewards produced by osmophores (mostly terpenes) pollinators - male Euglossini bees (*Eulaema* sp. and *Euglossa* sp.). The floral and extrafloral nectaries for the genera analyzed are anatomically detailed for the first time here. These exudate nectar from stomata and thus affect the symbiotic relationship with ants (*Azteca* sp. and *Dolichoderus* sp.), and in return, help protect the flowers. The morphoanatomical and phytochemical data analyzed in this study provide subsidies to expand anatomical analyzes with other species in the group, as well as with other Orchidaceae.

Keywords: osmophore – elaiophore – nectaries – orchids – colleter – pollination.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
INTRODUÇÃO GERAL	10
REFERÊNCIAS	15
<u>NOVELTIES IN SECRETORY STRUCTURES OF THREE SPECIES OF <i>Gongora</i> (ORCHIDACEAE: STANHOPEINAE)</u>	30
ABSTRACT	31
INTRODUCTION	32
MATERIAL AND METHODS	35
PLANT MATERIAL AND FIELD OBSERVATION	35
LIGHT MICROSCOPY	36
HISTOCHEMICAL TESTS	36
CHEMICAL ANALYSES	37
SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)	38
TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY (TEM)	39
RESULTS	39
MORPHOLOGICAL ASPECTS	39
ECOLOGICAL INTERACTIONS	40
ANATOMICAL DESCRIPTION OF BRACT, LABELLUM AND SEPALS	41
DISCUSSION	45
ACKNOWLEDGMENTS	53
REFERENCES	54
<u>CAPÍTULO II: <i>Coryanthes macrantha</i> (ORCHIDACEAE: STANHOPEINAE) E SUAS ESTRUTURAS SECRETORAS FLORAIS E EXTRAFLORAIS: UMA ABORDAGEM ANATÔMICA E FITOQUÍMICA</u>	83
RESUMO	84
ABSTRACT	85
INTRODUÇÃO	86
MATERIAL E MÉTODOS	88
RESULTADOS	92
DISCUSSÃO	97
AGRADECIMENTOS	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
CONSIDERAÇÕES FINAIS	136
ANEXOS	137

INTRODUÇÃO GERAL

As flores de Orchidaceae são historicamente apreciadas pela espetacular beleza, devido a ampla variedade de formas, cores e sua facilidade de hibridização. Apresentam ainda uma estrutura relativamente uniforme, constituída de dois verticilos trímeros (3 sépalas e 3 pétalas), sendo que a pétala mediana é denominada labelo, geralmente é maior e pode possuir ornamentações (calos) ou glândulas, como nectários, elaióforos e osmóforos, estruturas especializadas para atrair potenciais polinizadores, como os insetos que garantem a polinização cruzada e despertam mais estudos a cerca de sua biologia floral de espécies de orquídeas (Dressler, 1993).

As estruturas secretoras estão presentes em grande parte das plantas vasculares, apresentam grande importância taxonômica, contribuem para o conhecimento das principais vias de síntese dos metabólitos produzidos, como também, para o esclarecimento das suas funções fisiológicas e ecológicas (Fahn, 1988).

A principal recompensa ofertada aos polinizadores nesta família é o néctar, produzido em nectários florais (Dressler, 1993). Em muitas orquídeas há também os chamados nectários extraflorais que estão associados com inflorescências e flores, mas não diretamente envolvidos no processo de polinização (van der Pijl & Dodson, 1966; Davies et al., 2003; De Vries & Stiles, 1990; Flach et al., 2004; Singer & Koehler, 2004). Estas glândulas estão presentes na superfície de brácteas florais como em *Cymbidium* Sw., *Vanda* Jones ex R. Br., *Oncidium* Sw. (Stpiczyńska, 1997) e *Rodriguezia venusta* (Leitão et al., 2014).

Em Orchidaceae, as estruturas secretoras comumente encontradas são os nectários, osmóforos, elaióforos e coléteres (van der Pijl & Dobson, 1966; Dressler, 1993; Pridgeon et al., 1999). Os osmóforos em geral, ou glândulas odoríferas, são elementos

importantes para manter a relação planta-polinizador, caracterizam-se como os principais responsáveis pela produção e liberação da fragrância das flores de algumas plantas (Dudareva, 2006; Wiemer et al., 2008, Melo et al., 2010). A fragrância é comumente produzida por substâncias voláteis, principalmente terpenoides (Williams & Whitten, 1983; Vogel, 1990; Vainstein et al., 2001).

Os osmóforos são constituídos por um tecido compacto ou permeado por espaços intercelulares, geralmente com diversas camadas celulares e a região mais externa é formada por uma epiderme glabra ou com papilas (uni ou multicelulares) (Vogel, 1990; Curry et al., 1991) e tricomas (uni ou multicelulares) (Davies & Turner, 2004; Naczek et al., 2018). A região mais interna é composta por uma ou mais camadas de células do parênquima secretor subepidérmico (Vogel, 1990; Curry et al., 1991; Tölke et al., 2019). Em orquídeas, os osmóforos podem ser localizados na superfície de sépalas e labelos (Adachi et al., 2015; Naczek et al., 2018; Kowalkowska & Krawczyńska, 2019). Em *Cohniella cepula* Hoffmans. e *Cohniella jonesiana* Rchb.f., eles ocorrem próximos dos elaióforos na região do labelo (Kettler et al., 2018).

Em Orchidaceae os elaióforos são comumente descritos para espécies de Oncidiinae, Catasetinae e Maxillariinae (Possobom & Machado, 2017), podem estar localizados em sépalas e labelos (Stpiczyńska et al., 2013; Kettler et al., 2018). Os elaióforos são estruturas secretoras de óleos não voláteis, podendo ser de dois tipos: os tricomatosos e os epidérmicos (Vogel, 1974; Possobom & Machado, 2017; Tölke et al., 2019). Os tricomatosos são compostos de tricomas glandulares ou excrescências unicelulares ou multicelulares da epiderme, onde o óleo pode ser secretado e/ou acumulado, ou ele pode ser armazenado abaixo da cutícula, até ser removido pelas patas dianteiras de abelhas (Blanco et al., 2013; Gomiz et al., 2013; Davies et al., 2014). Os

epidérmicos são formados por uma ou mais camadas de células epidérmicas secretoras, geralmente alongadas (Buchmann, 1987; Endress, 1994; Kettler et al., 2018).

Ao longo dos últimos 25 anos, uma série de estudos investigaram a anatomia das glândulas florais em orquídeas e sua relevância para a polinização. Entre as glândulas descritas até agora estão: **elaióforos e osmóforos** (Stpiczyńska et al., 2007; Stpiczyńska & Davies, 2008; Wiemer et al., 2008; Aliscioni et al., 2009; Davies & Stpiczyńska, 2009; Pansarin & Amaral, 2009; Pansarin, et al., 2009; Melo et al., 2010; Pansarin & Pansarin, 2011; Antón et al., 2012; Davies & Stpiczyńska, 2012; Blanco et al., 2013; Francisco & Ascensão, 2013; Casique et al., 2018; Kettler et al., 2018); **tricomos secretores** (Davies & Stpiczyńska, 2006); **nectários florais e extraflorais** (Figueiredo & Pais, 1992; Galetto et al., 1997; Stpiczyńska & Matusiewicz, 2001; Stpiczyńska et al., 2003; Stpiczyńska et al., 2005; Leitão, 2007; Moreira et al., 2008; Aguiar et al., 2012; Pansarin et al., 2012; Nunes et al., 2013; Casique et al., 2018); e **coléteres** (Davies et al., 2005; Mayer et al., 2011; Cardoso-Gustavson et al., 2014).

Stanhopeinae (Epidendroideae, Cymbidieae) possui cerca de 257 espécies compreendidas em 20 gêneros com distribuição neotropical (Dressler, 1993; Chase et al., 2003; Pridgeon et al., 2009). As espécies da subtribo podem ser caracterizadas como ervas epífitas ou terrestres, com pseudobulbos uninodais; as folhas são terminais, articuladas, geralmente pecioladas; a inflorescência é lateral, com uma ou várias flores em espiral; as flores tem tamanho variado, muitas vezes pendentes e hermafroditas; com coluna (ginostêmio) alada ou não; as polínias são terminais ou ventrais; labelo é complexo e dividido em: hipoquílio, mesoquílio e epiquílio; o estigma é inteiro; possuem duas polínias achatadas, com viscidíolos triangulares e um estipe proeminente (Rasmussen, 1987; Dressler, 1993; Whitten et al., 2000).

As flores das espécies dessa subtribo são as que têm uma grande plasticidade morfológica e pertencem as mais fascinantes e curiosas de todas as orquídeas, devido as estruturas de suas flores e dos seus engenhosos mecanismos de polinização, realizados exclusivamente por abelhas *Euglossini* machos (Dressler, 1968; Dressler, 1993; Gerlach, 2003; Gerlach & Dressler, 2003).

As Stanhopeinae, assim como as Catasetinae, são exclusivamente polinizadas pelos machos de abelhas *Euglossini*, que à procura de compostos aromáticos (aroma), são atraídos por fragrâncias específicas (perfumes e aromas) em abundância que as flores oferecem (Williams & Whitten, 1983; Dressler, 1993; Gerlach, 2003).

As substâncias voláteis presentes nas fragrâncias são coletadas através da raspagem das glândulas produtoras de óleos (osmóforos e elaióforos) geralmente presentes no labelo. A coleta é realizada com os tarsos das pernas anteriores e tíbias posteriores, onde esses compostos presumivelmente são utilizados como precursores na síntese de um feromônio sexual (Dressler, 1967; Dressler, 1982; Stern et al., 1987; Vogel, 1962; van der Cingel, 2001; Bembé, 2004). Porém, a verdadeira utilidade desses compostos, nas atividades reprodutivas ainda são desconhecidas (Dodson et al., 1969; Dressler 1982; Pansarin & Amaral, 2009).

Sabe-se que todas as espécies de Stanhopeinae possuem glândulas que secretam recompensas florais, como os osmóforos (Dressler, 1968; Pansarin et al., 2006; Pansarin & Amaral, 2009; Gerlach, 2009). No entanto, outras estruturas secretoras florais e extraflorais, envolvidas no processo de polinização ou não, podem estar ocorrendo nestas espécies, pois estas apresentam relações específicas com abelhas e formigas.

Em Stanhopeinae, somente os osmóforos ou glândulas odoríferas, haviam sido registrados e detalhados, os quais encontram-se localizados na superfície adaxial de

sépalas, pétalas ou no labelo (Whitten, 1985; Dressler, 1993; Curry et al., 1991; Antón et al., 2012; Pansarin et al., 2014; Adachi et al., 2015; Casique et al., 2018). Essas glândulas foram descritas anatomicamente como células epidérmicas papilosas ou não papilosas, além de tricomas unicelulares (Curry et al., 1991; Stpiczyńska, 1993; Ascensão et al., 2005; Melo et al., 2010).

Os estudos anatômicos realizados até o momento com espécies de Stanhopeinae são com: **órgãos vegetativos** (Solereeder & Meyer, 1930; Williams, 1979; Møller & Rasmussen, 1984; Pridgeon, 1987; Dressler, 1993; Stern & Morris, 1992; Pridgeon et al., 2009), e **órgãos reprodutivos**, envolvendo especialmente osmóforos (Solereeder & Meyer, 1930; Pridgeon & Stern, 1983; Williams, 1983; Stern et al., 1987; Vogel, 1990; Curry et al., 1991; Silva, 1992; Williams & Whitten, 1999; Antón et al., 2012; Pansarin et al., 2009; Pansarin et al., 2014; Adachi et al., 2015).

As Stanhopeinae assim como uma ampla variedade de orquídeas compõem a biodiversidade florífera da Amazônia, com cerca de 37 espécies distribuídas em 20 gêneros (Flora do Brasil, 2020).

Para a Amazônia brasileira, estudos anatômicos com Orchidaceae foram realizados com enfoque em anatomia ecológica foliar de *Epidendrum huebneri* Schltr (Braga & Vilhena, 1981), ecofisiologia e anatomia ecológica foliar de espécies de campina da Amazônia central (Bonates, 1993), e com o complexo estomático de espécies nativas do gênero *Catasetum* (Lira et al., 1997). Atualmente, estudos com estruturas secretoras, foram realizados em flores de *Heterotaxis superflua*, o estudo relatou pela primeira vez a coleta de resina em orquídeas (Krahl et al., 2019). E com espécies de Stanhopeinae ocorrentes Região Amazônica, cita-se o estudo com as estruturas secretoras

de *Stanhopea grandiflora*, neste estudo os autores detalharam pela primeira vez os nectários extraflorais e coléteres, como novidade para a subtribo (Casique et al., 2018).

Assim, com intuito de contribuir para o conhecimento morfoanatômico de Stanhopeinae, este trabalho visa investigar as estruturas secretoras em espécies dos gêneros *Coryanthes* Hook. e *Gongora* Ruiz & Pav., ocorrentes na Amazônica, a fim de, compreender suas funções ecológicas e suas relações com os forrageadores, além de, fornecer subsídios para expandir os estudos anatômicos com outras espécies de Orchidaceae.

REFERÊNCIAS

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

AGUIAR, J. M. R. B. V.; PASARIN, L. M.; ACKERMAN, J. D.; PASARIN, E. R. 2012. Biotic vs. abiotic pollination in *Oeceoclades maculate* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae: Epidendroideae). **Plant Species Biology**. 27: 86-95.

ALISCIONI, S. S.; TORRETTA, J. P.; BELLO, M. E.; GALATI, B. G. 2009. Elaiophores in *Gomesa bifolia* (Sims) M.W. Chase & N.H. Williams (Oncidiinae: Cymbidieae: Orchidaceae): structure and oil secretion. **Annals of Botany**. 104: 1141–1149.

ANTÓN, S.; KAMIŃSKA, M.; STPICZYŃSKA, M. 2012. Comparative structure of the osmophores in the flower of *Stanhopea graveolens* Lindley and *Cycnoches chlorochilon* Klotzsch (ORCHIDACEAE). **Acta agrobotanica**. 65: 11–22.

ASCENSÃO, L.; FRANCISCO, A.; COTRIM, H.; PAIS, M. S. 2005. Comparative structure of the labellum in *Ophrys fusca* and *O. lutea* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**. 92:1059–1067.

BEMBÉ, B. 2004. Functional morphology in male euglossine bees their ability to spray fragrances (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). **Apidologie**. 35: 283-291.

BLANCO, M. A.; DAVIES, K. L.; STIPCZYŃSKA, N.; CARLSWARD, B. S.; IONTA, G. M.; GERLACH, G. 2013. Floral elaiophores in *Lockhartia* Hook. (Orchidaceae: Oncidiinae): Their distribution, diversity and anatomy. **Annals of Botany**. 112: 1775-1791.

BONATES, L. C. M. 1993. Estudos ecofisiológicos de Orchidaceae da Amazônia II. Anatomia ecológica foliar de espécies com metabolismo CAM de uma campina da Amazônia central. **Acta Amazonica**. 23(4): 315-348.

BRAGA, P. I. S.; VILHENA, R. 1981. Estudos sobre a vegetação de campinas amazônicas VII.- Anatomia ecológica de *Epidendrum huebneri* Schltr. e *Phthirusa micrantha* Eichl. In: **Anais do I Encontro de Orquidófilos e Orquidólogos do Brasil**. Rio de Janeiro, Expressão e Cultura. p. 86-106.

BUCHMANN, S. L. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 18: 343–369.

CARDOSO-GUSTAVSON, P.; CAMPBELL, L. M.; MAZZONI-VIVEIROS, S. C.; BARROS, F. 2014. Floral colleters in Pleurothallidinae (Epidendroideae: Orchidaceae). **American Journal of Botany**. 101(4): 000–000.

CASIQUE, J. V.; SILVA, E. F.; ANDRADE, E. H. A.; MASTROBERTI, A. A.; AGUIAR-DIAS A. C. A. 2018. Anatomical analyses of floral and extrafloral secreting structures indicate the presence of nectaries and colleters in *Stanhopea grandiflora* Lindl. **Brazilian Journal of Botany**. 41: 725–738.

CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; BARRETT, R. L.; FREUDENSTEIN, J. V. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. *In*: Dixon, K.W.; KELL, S. P.; BARRETT, R. L.; CRIBB, P. J. (eds.). **Orchid conservation**. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah. pp. 69-89.

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

DAVIES, K. L.; STPICZYN'SKA, M. 2006. Labellar micromorphology of Bifrenariinae Dressler (Orchidaceae). **Annals of Botany**. 98: 1215–1231.

DAVIES, K. L.; STPICZYŃSKA, M. 2009. 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**. 104: 221–234.

DAVIES, K. L., STPICZYŃSKA, M. 2012. Comparative labellar anatomy of resin-secreting and putative resin-mimic species of *Maxillaria* s.l. (Orchidaceae: Maxillariinae). **Botanical Journal of the Linnean Society**. 170:405–435

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

DAVIES, K. L.; TURNER, M. P. 2004. Morphology of floral papillae in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). **Annals of Botany**. 93: 75–86.

DAVIES, K. L.; STPICZYŃSKA, M.; GREGG, A. 2005. Nectar-secreting floral stomata in *Maxillaria anceps* Ames & C. Schweinf. (Orchidaceae). **Annals of Botany**. 96: 217–227.

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

DE VRIES P. J., STILES F. G. 1990. Attractions of pyrrolizidine alkaloid seeking Lepidoptera to *Epidendrum paniculatum* orchids. **Biotropica**. 22: 290-297.

DODSON, C. H.; DRESSLER, R. L.; HILLS, H. G.; ADAMS, R. M.; WILLIAMS, N. H. 1969. Biologically active compounds in orchid fragrances. **Science**. 164: 1243-1249.

DRESSLER, R. L. 1967. Why do euglossine bees visit orchid flowers?. **Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica**. 5: 171-180.

DRESSLER, R. L. 1968. Pollination by Euglossine bees. **Evolution** 22: 202-210.

DRESSLER, R. L. 1982. Biology of the orchid bees (*Euglossini*). **Annual Review of Ecology and Systematics**. 13: 373-94.

DRESSLER, R. L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Dioscorides press. Oregon

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. 2006. Floral Scent Metabolic Pathways: Their Regulation and Evolution. In: Dudareva N, Pichersky E, eds. **Biology of floral scent**. London: CRC Press. 3: 55–71.

ENDRESS, P. K. 1994. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge University Press. Pp. 510.

- FAHN, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. **New Phytol** 108:229–257.
- FIGUEIREDO, A. C.; PAIS, M. S. 1992. Ultrastructural aspect of the nectary spur of *Limodorum abortivum* (L.) Sw. *Orchidaceae*. **Annals of Botany**. 70: 325-331.
- FLACH, A.; DONDON, R. C.; SINGER, R. B.; KOEHLER, S.; AMARAL, M. C. E.; MARSAIOLI, A. J. 2004. The chemistry of pollination in selected Brazilian Maxillariinae orchids: floral rewards and fragrance. **Journal of Chemical Ecology**. 30: 1045–1056.
- FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 12 Nov. 2020.
- FRANCISCO, A.; ASCENSÃO, L. 2013. Structure of the osmophore and labellum micromorphology in the sexually deceptive orchids *Ophrys bombyliflora* and *Ophrys tenthredinifera* (ORCHIDACEAE). **International Journal of Plant Sciences**. 174 (4): 619-636.
- GALETTO, L.; BERNARDELLO, L. M.; RIVERA, G. L. 1997. Nectar, nectaries, flower visitors, and breeding system in five terrestrial Orchidaceae from Central Argentina. **Journal of Plant Research**. 110: 393–403.

GERLACH, G. 2003. La subtribu stanhopeinae: sus notables mecanismos de polinización, la química de sus aromas florales e implicaciones en sistemática y taxonomía. **Lankesteriana**. 7: 104-106.

GERLACH, G.; DRESSLER, R. L. 2003. Stanhopeinae Mesoamericanae I. **Lankesteriana**. 8: 23-30.

GERLACH, G. 2009. *Coryanthes*. In: Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. Genera Orchidacearum. Vol. 5. New York Oxford University Press Pp. 407-411.

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

KETTLER, B. A.; SOLÍS, S. M.; FERRUCCI, M. S. 2019. Comparative survey of secretory structures and floral anatomy of *Cohniella cepula* and *Cohniella jonesiana* (Orchidaceae: Oncidiinae). New evidences of nectaries and osmophores in the genus. **Protoplasma**. 256: 703–720.

KOWALKOWSKAA, A. K.; KRAWCZYŃSKA, A. T. 2019. Anatomical features related with pollination of *Neottia ovata* (L.) Bluff & Fingerh. (Orchidaceae). **Flora**. 255: 24–33.

KRAHL, A. H.; HOLANDA, A. S. S.; KRAHL, D. R. P.; MARTUCCI, M. E. P.; GOBBO-NETO, L.; WEBBER, A. C.; PANSARIN, E. R. 2019. Study of the reproductive biology of an Amazonian *Heterotaxis* (Orchidaceae) demonstrates the collection of resin-like material by stingless bees. **Plant Systematics and Evolution**. 305: 281–291.

LEITÃO, C. A. E. 2007. **Anatomia dos nectários, do coléter e do stigma de *Rodriguezia vennusta* (Lindl.) Rchb. F. (ORCHIDACEAE)**. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. São Paulo. Tese de Doutorado, 111p.

LEITÃO, C. A. E.; DOLDER, M. A. H.; CORTELAZZO, A. L. 2014. Anatomy and histochemistry of the nectaries of *Rodriguezia venusta*(Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae). **Flora** 209: 233–243.

LIRA, M. P. S.; BONATES, L. C. M.; BRAGA, P. I. S. 1997. Variação na densidade e no complexo estomático em epidermes de folhas de espécies nativas da Amazônia do gênero *Catasetum* (Orchidaceae). **Anais da VI Jorn. Inic. Cien. do INPA**. 65–68.

MAYER, J. L. S.; CARDOSO-GUSTAVSON, P.; APPEZZATO-DA-GLORIA, B. 2011. Colleters in monocots: New record for Orchidaceae. **Flora**. 206: 185–190.

MELO, M. C.; BORBA, E. L.; PAIVA, E. A. S. 2010. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). **Plant Systematics and Evolution**. 286: 141-151.

MØLLER, J. D.; RASMUSSEN, H. 1984. Stegmata in Orchidales character state distribution and polarity. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 89: 53-76.

MOREIRA, B. M. T.; TOMBA, E. C.; ZONETTI, P. da C. 2008. Crescimento in vitro de plântulas de orquídea (*Laelia purpurata* Lindl var *venosa* X *Cattleya Warneri* T. Moore Alba) sob diferentes concentrações de sacarose e frutose. **SaBios: Saúde e Biologia**, Campo Mourão. 2(2): 16-21.

NACZK, A. M.; KOWALKOWSKA, A. K.; WIŚNIEWSKA, N.; HALIŃSKI, L. P.; MAŁGORZATA, K.; CZERWICKA, M. 2018. Floral anatomy, ultrastructure and chemical analysis in *Dactylorhiza incarnata/maculata* complex (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**. 20: 1–25.

NUNES, C. E. P.; CASTRO, M. D.; GALETTO, L.; SAZIMA, M. 2013. Anatomy of the floral nectary of Onithophilous *Elleanthus brasiliensis* (Orchidaceae: Sobralieae). **Botanical journal of the Linnean Society**. 171: 764-772.

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

PANSARIN, E. R., & PASARIN, L. M. 2011. Reproductive biology of *Trichocentrum pumilum*: an orchid pollinated by oil-colleting bees. **Plant Biology**. 13: 576-581.

PANSARIN, E. R.; BITTRICH, V., AMARAL, M.C.E. 2006. At daybreak – reproductive biology and isolating mechanisms of *Cirrhaea dependens* (Orchidaceae). **Plant Biology**. 8: 494-502.

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

PANSARIN, E. R.; SALATINO, A.; PANSARIN, L. M.; SAZIMA, M. 2012. Pollination systems in Pogonieae (Orchidaceae: Vanilloideae): A hypothesis of evolution among reward and rewardless flowers. **Flora**. 12: 849-861.

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

POSSOBOM, C. C. F.; MACHADO, S. R. 2017. Elaiophores: their taxonomic distribution, morphology and functions. **Acta Botanica Brasilica**. 31: 503-524.

PRIDGEON, A. M. 1987. The velamen and exodermis of orchid roots. In: Arditti J (ed). **Orchid biology: reviews and perspectives**. Ithaca: Cornell University Press.

PRIDGEON, A. M.; STERN, W. L. 1983. Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**. 70(8): 1233-1243.

PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE M. W.; RASMUSSEN, F. N. 1999. **Genera Orchidacearum**. V. 1. Oxford University Press, Oxford.

PRIDGEON A. M.; CRIBB, P.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. 2009. **Genera Orchidacearum**. v. 5, Oxford University Press: New York.

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

SILVA, A. G. 1992. Osmóforos: restropectiva dos últimos 20 anos de pesquisa. **Rodriguésia**. V.42/44, 7-20.

SINGER, R. B.; KOEHLER S. 2004. Pollinarium morphology and floral rewards in Brazilian Maxillariinae (Orchidaceae). **Annals of Botany**. 93: 39-51.

SOLEREDER, H.; MEYER, F. 1930. Systematische anatomie der Monokotyledonen. Verlag von Gebruder Borntraeger, Berlin.

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

STERN, W. L.; MORRIS, M. W. 1992. Vegetative anatomy of *Stanhopea* (Orchidaceae) with special reference to pseudobulb water-storage cells. **Lindleyana**. 7(1): 34-53.

STPICZYŃSKA, M. 1993. Anatomy and ultrastructure of osmophores of *Cymbidium tracyanum* Rolfe (Orchidaceae). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** 62(1-2): 5-9.

STPICZYŃSKA, M. 1997. Structure of nectary of *Platanthera bifolia* L. (Orchidaceae). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**. 66: 5-11.

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

STPICZYŃSKA, M.; MATUSIEWICZ, J. 2001. Anatomy and ultrastructure of the spur nectary of *Gymnadenia conopsea* L. (Orchidaceae). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**. 70: 267-272.

STPICZYŃSKA, M.; DAVIES, K. L.; GREGG, A. 2003. Nectary structure and nectar secretion in *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae). **Annals of Botany**. 93: 87-95.

STPICZYŃSKA, M.; DAVIES, K. L.; GREGG, A. 2005. Comparative account of nectary structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). **Annals of Botany**. 95: 749-756.

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

STPICZYŃSKA, M.; DAVIES, K. L.; PACEK-BIENIEK, A.; KAMIŃSKA, M. 2013. Comparative anatomy of the floral elaiophore in representatives of the newly recircumscribed *Gomesa* and *Oncidium* clades (Orchidaceae: Oncidiinae). **Annals of Botany**. 112: 839–854.

TÖLKE, E. D.; CAPELLI, N. V.; PASTORI, T.; ALENCAR, A. C.; COLE, T. C. H.; DEMARCO, D. 2019. Diversity of Floral Glands and Their Secretions in Pollinator Attraction. In: Merillon JM., Ramawat K. (eds) **Co-Evolution of Secondary Metabolites**. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham.

VAINSTEIN, A.; LEWINSOHN, E.; PICHERSKY, E.; WEISS, D. 2001. Floral Fragrance. New Inroads into an Old Commodity. **Plant Physiology**. 127: 1383–1389.

VAN DER CINGEL, N. A. 2001. **An atlas of orchid pollination: America, Africa, Asia and Australia**. Rotterdam: A. A. Balkema.

VAN DER PIJL, L.; DODSON, C. H. 1966. **Orchid flowers: their pollination and evolution**. Coral Gables, Florida: University of Miami Press.

VOGEL, S. 1962. Das sexuelle Anlockungsprinzip der Catasetinen und Stanhopeen-Bliiten und die wahre Funktion ihres sogenannten Futtergewebes. **Österreichische Botanische Zeitschrift**. 110: 308-337.

VOGEL, S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. **Tropische subtropische Pflanzenwelt**. 7:283–547.

VOGEL, S. 1990. **The Role of Scent Glands in Pollination**, 1st edn. Smithsonian Institution, Washington, D.C, USA.

WHITTEN, W. M. 1985. **Variation in floral fragrances and pollinators in the *Gongora quinquenervis* complex (Orchidaceae) in central Panama**. A Dissertation Presented to the Graduate School of the University of Florida.

WHITTEN, W. M.; WILLIAMS, N. H.; CHASE, M. W. 2000. Subtribal and generic relationship of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. **American Journal of Botany**. 87: 1842–185.

WIEMER, A. P.; MORÉ, M.; BENITEZ-VIEYRA, S.; COCUCCI A.; RAGUSO R. A.; SÉRSIC, A. N. 2008. A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cyclopogon elatus* (Orchidaceae). **Plant Biology**. 11: 506-514.

WILLIAMS, N. H. 1979. Subsidiary Cells in the Orchidaceae: Their General Distribution with Special Reference to Development in the Oncidieae. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 78: 41-66.

WILLIAMS, N. H. 1983. Floral fragrances as cues in animal behavior. Pp. 50-71, in G. E Jones and R. J. Little (eds.). **Handbook of Experimental Pollination Biology**. Scientific and Academic Editors, N. Y.

WILLIAMS, N. H.; WHITTEN, W. M. 1983. Orchid floral fragrances and male euglossine bees: Methods and advances in the last sesquidecade. **The Biological Bulletin**. 164: 355-395.

WILLIAMS, N. H., WHITTEN, M. 1999. Molecular phylogeny and floral fragrances of male euglossine bee-pollinated orchids: A study of *Stanhopea* (Orchidaceae). **Plant Species Biology**. 14: 129-136.

**Novelties in secretory structures of three species of *Gongora* (Orchidaceae:
Stanhopeinae)**

JORGEANE V. CASIQUE¹, ELOISA H. DE AGUIAR ANDRADE², ANA CRISTINA
ANDRADE DE AGUIAR DIAS³, ALEXANDRA A. MASTROBERTI¹

¹ Programa de Pós-graduação em Botânica, Departamento de Botânica, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade (Bionorte), Departamento de Botânica,
Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA 66077-830, Brazil

³ Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA 66075-110,
Brazil

Short title: SECRETING STRUCTURES IN *GONGORA* SPECIES

Correspondent Author: valerytvares@hotmail.com

* Manuscrito aceito para publicação na Revista Botanical Journal of the Linnean Society

ABSTRACT

Stanhopeinae species bear osmophores, which have been related to pollination, since such structure exudes volatile lipids that attract Euglossini bees. *Gongora* is exclusively pollinated by Euglossini bees. Due to the structural diversity found in the flowers of genus and to the lack of data on other foraging insects that visit these flowers, our aim is to elucidate floral anatomical aspects of secreting structures in the Stanhopeinae group, focusing on structures present in *Gongora jauariensis*, *G. pleiochroma*, and *G. minax*, orchids of the Amazon rainforest. Analyses of secretory structures were performed under light microscopy, in conjunction with histochemical and phytochemical analyses, scanning and transmission electron microscopy. Osmophores, extrafloral nectaries and elaiophores were observed in the species. The three species bear structured nectary on bract and osmophores on both the sepals and labellum hypochile. In *Gongora minax*, the labellum (hypochile) showed chemical and structural characteristics of elaiophore and osmophore. Thus, we suggest that the same plant structure have a dual role of both osmophore and elaiophore. We report the interactions between foraging ants and nectaries of *Gongora* species for the first time for the genus. The interaction with ants, attracted by these nectaries of bracts, is beneficial for orchids, as they help in the protection of their reproductive structures.

ADDITIONAL KEYWORDS: Amazon – anatomy – floral fragrance – floral morphology – histochemistry – lipids – nectary – orchids – pollinator – secretion.

INTRODUCTION

Osmophores, elaiophores and nectaries are easily found in Orchidaceae and are important elements for maintaining the plant-pollinator interaction (Melo, Borba & Paiva, 2010; Aguiar *et al.*, 2012; Pansarin *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2013; Neubig *et al.*, 2015; Franken, Pansarin & Pansarin, 2016; Kettler, Solís & Ferrucci, 2019). However, in flowers of species that belong to the subtribe Stanhopeinae (Epidendroideae, Cymbidieae), only osmophores located in the adaxial surface of sepals, petals, or labellum have been reported (Curry *et al.*, 1991; Pansarin, Castro & Sazima, 2009; Pansarin & Pansarin, 2011; Antoń, Kamińska & Stpiczyńska, 2012; Davies & Stpiczyńska, 2012; Francisco & Ascensão, 2013; Adachi, Machado & Guimarães, 2015; Davies & Stpiczyńska, 2017; Casique *et al.*, 2018). These osmophores were comprised of either one or no papillose epidermal secretory cells, which were characterized as unicellular secretory trichomes (Curry *et al.*, 1991; Stpiczyńska, 1993; Ascensão *et al.*, 2005; Melo *et al.*, 2010).

Stanhopeinae is a Neotropical and monophyletic subtribe, with approximately 304 species and 20 genera (Dressler, 1993; Chase *et al.*, 2003; Pridgeon *et al.*, 2009; Chase *et al.*, 2015). In the Brazilian Amazon, there are approximately 37 species of Stanhopeinae (Barros *et al.*, 2019). The species of this subtribe are epiphytic or terrestrial herbs, with uninodal pseudobulbs, terminal leaves articulate, often petiolate, and lateral inflorescence (Rasmussen, 1985; Dressler, 1993; Whitten, Williams & Chase, 2000).

The flowers have a high morphological plasticity and are among the most fascinating and curious orchids due to their ingenious pollination mechanisms, which are exclusively performed by male Euglossini bees (Dressler, 1993; Gerlach, 2003; Gerlach & Dressler, 2003). The high complexity of Stanhopeinae flowers has encouraged studies in the last decades, primarily focusing on the labellum structure that is divided in three regions:

hypochile (basal), mesochile, and epichile (apical) (Gerlach, 2003; Gerlach, 2011; Antón *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2017; Adachi *et al.*, 2015).

Recent studies on secretory structures of *Stanhopea grandiflora* (Lodd.) Lindl., have also showed nectariferous stomata on the bract and colleters on the ovary surface (Casique *et al.*, 2018). The role of mucilage in this ovary region in Pleurothallidinae species is to protect microorganisms and herbivores, as well as to enable symbiosis with fungi that are necessary for seed germination (Cardoso-Gustavson *et al.*, 2014).

Gongora Ruiz & Pav. is considered one of the most taxonomically complex genera of Stanhopeinae due to the high morphological variability of some species, particularly concerning flowers, colors, and scents (Rudolf, 1993). In *Gongora*, the mesochile (labellum) is inverted, and bees forage hanging upside down sliding posteriorly until the column apex, placed below it, moving the pollinarium (Whitten *et al.*, 2000; Adachi *et al.*, 2015).

In recent studies on pollination ecology, both floral scent and morphology elucidated pollination mechanisms in *Gongora* (Adachi *et al.*, 2015). Osmophores were characterized as being papillose and found in the labellum area, referred to as hypochile (Adachi *et al.*, 2015; Nunes *et al.*, 2017). The fragrance synthesized in the osmophores attracts male Euglossini bees as a reward (Curry *et al.*, 1991). These volatile compounds are actively explored by Euglossini and stored in the posterior tibia, a specialized structure of these bees (Adachi *et al.*, 2015; Nunes *et al.*, 2017; Casique *et al.*, 2018). Although the precise function of these fragrances in bee biology has not been elucidated, some authors believe that fragrances can presumably be used as precursors for the synthesis of a sexual pheromone (Dressler, 1982; Bembé, 2004) and its production is a key element in the evolution of many orchids (Nunes *et al.*, 2017).

A total of 11 species of *Gongora* are described in Brazil, and eight species have been reported in the Brazilian Amazon Region so far (Barros *et al.*, 2019). Despite their broad occurrence in this region, studies involving the ecological relationship of male Euglossini bees (Apidae) and other floral visitors with their flowers are scarce, which hampers a better understanding not only of secretion processes and the floral reward they can offer but also of insect-plant interaction in these species. One example is the study carried out on *Stanhopea grandiflora* (Casique *et al.*, 2018), addressing pollination ecology, floral scent and morphology, and especially on anatomical analyses of its secretory structures and its relationship with floral visitors.

Following the study conducted with *Stanhopea grandiflora*, which addressed pollination ecology, floral aroma, floral morphology, and especially the anatomical analyzes of its secretory structures and their relationships with floral visitors (Casique *et al.*, 2018). *Gongora* species started to be investigated to analyze which other possible secretory structures can be observed in this genus and how they contribute to the adaptive success of these species.

Thus, in this study, we investigated the anatomical, histochemical and phytochemical aspects of the floral and extrafloral glands of *Gongora* species. We also aim to identify and characterize them, to understand their secretion dynamics and their ecological relationships with floral and extrafloral visitors.

MATERIAL AND METHODS

PLANT MATERIAL AND FIELD OBSERVATION

Flowers were collected from the same inflorescence of eight individuals of three *Gongora* species: *Gongora pleiochroma* Rchb.f., *Gongora jauariensis* Campacci & J.B.F.Silva, and *Gongora minax* Rchb.f., (in January and February) in the morning (6 and 7 am), in bud and postanthesis stages. Samplings occurred in Pará state (Brazil), in the following localities: Ananindeua, Belém, vicinities of the Jari River, Santarém, Santo Antônio do Tauá, Santa Izabel, and Oriximiná. All species are epiphytes, and they occur near rivers and streams, which are their natural environment. The first blooms and floral visitors were recorded through photos and videos wherever they were observed. Bees observed on *G. minax* took some time (about 15 min) to approach the flowers; this time dropped to 5 min on the other species (*G. pleiochroma* and *G. jauariensis*).

In this study, the terminology adopted by Remizawa *et al.* (2013), was used to classify the inflorescence of the species analyzed as flower-subtending bracts, here called bracts.

After flowering, flowers were properly identified, and fertile samples were performed for exsiccate confection, which was incorporated at the João Murça Pires Herbarium collections under the corresponding vouchers at Museu Paraense Emílio Goeldi (MG) and the Herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN), under the corresponding vouchers: *Gongora pleiochroma* (MG150592); *Gongora jauariensis* (ICN 199992); *Gongora minax* (MG221264).

Sampled specimens were subsequently cultivated in a private orchidarium under abiotic conditions similar to the natural environment of the species, to observe new flowering events and potential floral visitors. Only bracts were analyzed in the bud phase, the other analyzes were performed in the post-anthesis phase (5 min). Floral buds and

flowers in anthesis stage were isolated with a grid for about 1h. Nectar production was detected in the bracts, but the volumes produced were insufficient to measure. Glucose test strips were used (Glicofita Plus®, Accu-Chek Active, F. Hoffmann-La Roche Ltd.) to check the occurrence of glucose in the secretion produced by glands.

Species were identified by Mr. João Batista Fernandes da Silva, a specialist in Amazon orchids. Foragers observed were collected, conserved in commercial ethyl alcohol, and was identification for Dr. Fernando Carvalho, entomologist of Museu Paraense Emílio Goeldi.

LIGHT MICROSCOPY

For anatomical analyses, flowers (labellum, sepals, bract) were collected and fixed in 1% glutaraldehyde, 4% formaldehyde, and sodium phosphate buffer pH 7.2 0.1M, (McDowell & Trump, 1976), dehydrated in an ascending ethylic series (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, and 100%) and embedded in hydroxyethyl methacrylate (historesin *Leica*®; Gerrits & Smid, 1983). Serial cross-sections and longitudinal sections were performed using a rotary microtome (*Leica* Autocut) with approximately 3 µm thickness and subsequently stained with toluidine blue O (C.I. 52040), pH 4.4 (O'Brien, Feder & McCully, 1964). Permanent slides were mounted in Canada balsam and visualized by light microscopy in the bright field (*Leica* DMR).

HISTOCHEMICAL TESTS

Fresh material of labellum (hypochile), sepals, and bract were used for the following histochemical tests: Lugol reagent was used for starch detection (Johansen, 1940);

Fehling reagent was used for reducing sugars (product released by the action of enzymes like cellulase, for example) (Sass, 1951); Sudan III for lipids (Johansen, 1940); neutral red under fluorescence for lipids (Kirk-Junior, 1970); Nile blue sulfate for neutral lipids and acids (Cain, 1947); copper acetate and rubeanic acid were used for fatty acids (Ganter & Jollès, 1969, 1970); NADI for essential oils and resins (David & Carde, 1964); and Ponceau Xylidine for total proteins (Vidal, 1970). Samples with no treatment (white) were analyzed, and negative control tests were also carried out. Extractive controls were performed in the test for lipids (Sudan III, Sudan IV, NADI reagent, Nile blue sulfate, copper acetate, and rubeanic acid) treating sections with a methanol/chloroform/H₂O/HCl (66: 33: 4: 1) solution during 1h at room temperature before the test. Analyses and photomicrographs were carried under light microscopy in bright field (*Leica* DMR) in all tests except for neutral red, which was observed with epifluorescence (excitation filter 450-490 nm). All images were taken with a digital camera (AxioCam HRc Zeiss) coupled to the microscope and the program ZEN Light 2012 was used for image capture.

Structural nomenclatures were performed based on Metcalfe & Chalk (1950), Withner, Nelson & Wejks-Nora (1974); Fahn (1979); Vogel (1990); and Curry *et al.* (1991).

CHEMICAL ANALYSES

Fresh flowers (post-anthesis) samples were submitted to extraction (3 h) with a simultaneous distillation-extraction microsystem to obtain their volatile concentrates, using a Likens & Nickerson-type apparatus (Likens & Nickerson, 1964) and pentane as the solvent (4 ml). The analysis of the volatile concentrates was carried out by GC-MS, using QP-2010-Plus equipment (Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) and a silica capillary column (Rtx-5ms, 30 m×0.25 mm×0.25 µm film thickness), with the aid of the

MS Solution software and standard libraries (Jennings & Shibamoto, 1980; Adam, 2007; Mondello, 2011). The conditions of analysis were: injector temperature 250°C; oven temperature programming which was 60-250°C (3°C/min); carrier gas, helium (32 cm/s) measured at 100°C; splitless-type injection of 1.0 µl of the sample; ionization by electron impact, 70 eV; temperatures of ion source and transfer line in 220°C and 250°C, respectively. Mass spectra were obtained by automatic scanning (0.3 s, each), with mass fragments varying from 40 to 450 m/z. The retention index was calculated for all volatile components using a homologous series of alkanes (C8-C20, Sigma-Aldrich), according to Van Den Dool & Kratz (Van Den Dool & Kratz, 1963). Constituents were identified by comparing their retention indices and mass spectra libraries (molecular mass and fragmentation pattern), as well as consulting the mass spectra literature. The analysis was undertaken at Adolpho Ducke laboratory of Museu Paraense Emílio Goeldi, Pará State, Brazil.

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)

For Scanning Electron Microscopy (SEM), the fixed material – bract, sepals, and labellum - was dehydrated in a grade acetone series and dried using the critical point method (Gersterberger & Leins, 1978), with a CPD 030 Balzers equipment. Afterward, the material was placed in aluminum stands with double-sided carbon tape, metalized with gold in a SCD 050 Balzers equipment and analyzed using scanning electron microscope (JEOL 6060, Japan) at the Microanalyses and Microscopy Center – CMM – of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY (TEM)

The labellum from the three species were fixed in 2.5% glutaraldehyde, 2.0% formaldehyde in sodium phosphate buffer, pH 7.2, 0.1M and postfixed in 1% osmium tetroxide in sodium phosphate buffer, pH 7.2, 0.1 M. After that, samples were washed in the same buffer (two exchanges of 30 minutes/stage) and distilled water (two exchanges of 30 minutes/stage). The material was dehydrated in an acetone series (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, and 100%) for 30 minutes in each stage and 15 minutes in acetonitrile in the last stage. The material was first embedded in a pure acetonitrile solution (0.5mL) and drop every 10 minutes in an epoxy resin of low viscosity (Spurr, 1969) until a 1:1 ratio was achieved, for 12h. The material was transferred to a solution of resin/acetonitrile at a 3:1 ratio and was subsequently embedded in pure resin, thus remaining for 12h each stage. Embedding and polymerization were carried out in jelly capsules with the material properly placed in an incubator at 70°C for 18h.

These blocks were sectioned approximately with 70 nm thickness using an ultramicrotome (*Leica Ultracut UCT*) and a diamond blade. These ultrathin sections were placed on copper grids of 200 mesh and stained using 2% uranyl acetate aqueous and lead citrate (modified from Hanaichi *et al.*, 1986).

SEM and TEM images were obtained at the Microanalyses and Microscopy Center (CMM) of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (JEOL JEM 1200 Exll).

RESULTS

MORPHOLOGICAL ASPECTS

Gongora Ruiz & Pavon

The inflorescence is a pendant raceme and rises at the base of the pseudobulb, bearing 10-20 flowers with flower-subtending bracts (Fig. 1A). Flowers non-resupinate, often scented, and colors vary, especially between brown and yellow tones, sometimes smooth, sometimes with macules (Fig. 1B, C, D). Sepals are free from each other and feature revolute margin; the dorsal is erect; the lateral is patent on the labellum or reflex; the petals are patent, smaller than sepals. The labellum is often lighter than the sepals ornamented with horns (diagnostic feature for the genus), and it is divided into three segments: hypochile frequently with horns; mesochile always with bristles; and the epichile with a bulge and a triangular extremity (Fig. 1E, F, G, and H). The column is long, narrow and slightly curved (Fig. 1H). The pollinia are two, yellow, and connected to a shield-shaped stipe (Fig. 1H). The viscidium is triangular or rounded. The genus *Gongora* is subdivided into three subgenus, *Acropera*, *Gongora* and *Portentosa*. The above characteristics correspond to the subgenus *Gongora*, to which the species analyzed in this study belong.

The species exhibit some similar morphological characteristics; *Gongora jauariensis* (Fig. 1B) and *Gongora pleiochroma* (Fig. 1D) flowers are approximately 2-3 cm (Fig. 1H) and *Gongora minax* has flowers approximately 4-5 cm (Fig. 1C).

ECOLOGICAL INTERACTIONS

In the present study, the foraging of ants (*Dolichoderus* sp.) was observed in the basal region of flower bract in the bud and postanthesis stages (Fig. 1I, J). Secretion analysis with Glicofita Plus (>25.0 mmol/L) in this region was positive for the three species (Fig. 1I). During anthesis, which occurred in the period between six and seven a.m., the presence of male Euglossini bees (*Eulaema bombiformis* Packard, 1869 and *Euglossa* sp.)

on the species was different regarding scent preferences (Fig. 1K, L, M, N), present in the sepals and labellum (Fig. 2A–C). On *G. pleiochroma* and *G. jauariensis*, both with a remarkable scent that resembles mint, only the bees of the genus *Euglossa* sp. were observed foraging the flowers, while both bees, *E. bombiformis* and *Euglossa* sp., were present on the labellum and sepals of *G. jauariensis* and *G. minax* (Fig. 2C–D). Interestingly, the scent in *G. minax* was similar to the other species, although less pungent and perceptible to human beings. Another interesting factor was the presence of the bee *Eulaema nigrata* Lepeltier, 1841, foraging the labellum (hypochile) of *Gongora minax* together with the male *E. bombiformis* bee (Fig. 1K, L). It was not possible to collect *Eulaema nigrata* bee, and thus its identification was carried out using video recordings.

The pollination mechanism, however, was similar in all species: bees landed specifically on the labellum (mesochile) and foraged both the adaxial and abaxial regions, where osmophores are situated. When bees were placed upside down to explore the ventral region of labellum (hypochile), they showed a slight unbalance and touched the column apex (gynostemium) where the viscidium is located. The viscidium has a glue-like substance that develops at the tip of the stigma, and when the bee touches, the viscidium projects the pollinarium into the scutellum of pollinator (Fig. 2C).

ANATOMICAL DESCRIPTION OF BRACT, LABELLUM AND SEPALS

Bract

The secretory activity of nectary is present only in the base of bract (Fig. 3A), where nectariferous stomata are present in the epidermis of abaxial face (Fig. 3B), comprised of cells with thick cuticle. The secretion observed in the abaxial face of bract in *G.*

jauariensis, *G. minax*, and *G. pleiochroma* has epidermis with cells of outer periclinal walls convex to papillose and inner periclinal walls convex to straight; in the mesophyll, there are 1-3 layers of nectary parenchyma followed by 1-5 layers of fundamental parenchyma with anisodiametric thin-walled cells (Fig. 3A–B); raphide crystal idioblasts (Fig. 3C–D); and collateral vascular bundles limited by a sclerenchymatic sheath (Fig. 3E). Stomata (Fig. 3F–G) and digitiform trichomes were observed on both the adaxial (cross-section and frontal view) and abaxial faces of bract (Fig. 3H–J).

Sepals

The epidermal osmophore is located in the epidermis of the adaxial and abaxial faces of sepals of the three species analyzed, in both the cross-section and frontal views. The epidermal cells (abaxial face) of sepals in *G. jauariensis* (Fig. 4A) and *G. pleiochroma* (Fig. 4B) have outer periclinal walls slightly thick and convex (Fig. 4C–E); the cells of osmophores on the adaxial face are papillose, conical, and have lateral ridges; elongated ridges in *G. pleiochroma* (Fig. 4F) and short ridges in *G. jauariensis* (Fig. 4G); epicuticular wax is frequent in the sepals of *G. jauariensis* (Fig. 4G). In *G. minax* (Fig. 4H–I) the cells of osmophores on the adaxial face are convex and straight, outer periclinal walls are thick; the inner periclinal walls are thin, slightly sinuous to curved in the three species; the anticlinal walls are slightly sinuous; the epidermal cells on the abaxial face of sepals in the three species are elongate, with outer and inner periclinal walls slightly curved the anticlinal walls are straight; and in a frontal view, the cells are polygonal (Fig. 4J–K); the mesophyll is comprised of multiseriate parenchyma cells, large, sinuous, and thin-walled, with sparse collateral vascular bundles (Fig. 4L), starch abundant (Fig. 4D–E) and idioblasts with calcium oxalate crystals (Fig. 4I). Digitiform trichomes were rarely observed, and only on the adaxial face of the three species (Fig. 4M–N), and stomata were

only observed on the abaxial face (Fig.4D, O). It is possible to see a thin layer of epicuticular wax on the abaxial face of sepals in *G. minax*, in a frontal view (Fig. 4O).

Labellum

The osmophores on the labellum in *G. jauariensis* (Fig. 5A–E) and *G. pleiochroma* (Fig. 5F–J), in both the cross-section and the frontal views, have the papillose epidermis of ventral face and the non-papillary epidermis of the dorsal face as main secretory tissues, its cells containing large nucleus, thin cuticle, and dense cytoplasm. The parenchyma below the secretory tissue is adjacent to the epidermis with vacuolated cells (Fig. 5C, I); the dorsal face is also comprised of papillose and secretory cells; the subjacent parenchyma is comprised of anisodiametric cells, thin and with dispersed collateral vascular bundles. In *G. minax* (Fig. 5K–O), the osmophores are also present in the labellum (hypochile). Unlike the other two species of *Gongora* in this study, the labellum area (hypochile) on the ventral and dorsal face of *G. minax* played a double function, of both osmophore and elaiophore. The secretory epidermis (ventral face) of this area is in palisade with cuboid to ovoid cells (cross-section) with large nucleus, thick cuticle, dense cytoplasm, lipid drops (Fig. 5M), stomata, and epicuticular wax (Fig. 5O); followed by six parenchyma layers with vacuolated cells and evident intercellular spaces (Fig. 5I); the epidermis on the dorsal face (Fig. 5L) is also secretory and has cell characteristics similar to that on the ventral face, with stomata absent (Fig. 5L); fundamental parenchyma is made up of anisodiametric cells, thin, vacuolated, with intercellular spaces and collateral vascular bundles (Fig. 5D, I, K).

Histochemistry

The histochemical analysis of bract nectaries from the three species analyzed revealed the following compounds: monosaccharides – reducing sugars (Fig. 6A–D); total proteins (Fig. 6E–G); and starch (Fig. 6H). The following were detected in the osmophores of sepals of the three species: lipids (Fig. 6I–K) and terpenoids (Fig. 6L–M). In the region of the labellum – osmophore (hypochile) of the three species, the tests indicated: total lipids (Fig. 7A–E); starch (Fig. 7F–H); terpenoids – essential oils (Fig. 7I–K) and terpenoids – resin acids (Fig. 7L); acid and neutral lipids (Fig. 7M–N); fatty acids in the elaiophore of *G. minax* (Fig. 7O); and total lipids under UV light in *G. pleiochroma* and *G. jauariensis* (Fig. 7P) and in *G. minax* (Fig. 7Q).

Transmission electron microscopy (TEM)

Osmophore and Elaiophore

Epidermal cells on the ventral and dorsal region of the labellum (hypochile) were analyzed in the three species. Papillose cells of the secretory epidermis of osmophores in *G. jauariensis* and *G. pleiochroma* present similar features (Fig. 8A–E), i.e., dense cytoplasm with lipid drops, vesicles and vacuole with polysaccharide content (Fig. 8A). The cuticle layer shows an electron-dense microchannel net (Fig. 8B). Other papillose cells have a large and voluminous nucleus, dense nucleolus, dense cytoplasm with developing vacuoles and intercellular spaces (Fig. 8A). In the parenchyma cells had well-developed vacuoles (Fig. 8C). Mitochondria and smooth and rough endoplasmic reticulum (Fig. 8D) were found near the periplasmic space (Fig. 8C). Vesicles and abundant amyloplasts associated with plastoglobuli were observed in the cytoplasm (Fig. 8C, E), as well as lipid drops.

In *G. minax* the thick cuticle also exhibited a well-developed net of microchannels and deposits of epicuticular wax (Fig. 8F–H). The outer periclinal wall is polylamellate and has microchannels.

Cells of the secretory region of osmophores/elaiophores of *G. minax* had large and voluminous nucleus (Fig. 8I), dense cytoplasm (Fig. 8I), developing vacuoles, vesicles, protoplasm with abundant amyloplasts and large intercellular spaces with polysaccharides content (Fig. 8I, 8K). Lipid drops occur both in the inner cytoplasm and near the periplasmic space (cytosol) (Fig. 8I–K). Mitochondria and numerous smooth and rough endoplasmic reticulum (Fig. 8J–K) were also observed. Branched plasmodesmata go through the walls between epidermal cells (Fig. 8I–J). After analyzing the results of osmophores in *Gongora* species and elaiophores in *G. minax*, the secretion was observed to be of the granulocrine type in all species.

Phytochemical

The components identified in the floral fragrance of the three species, *Gongora jauariensis* (Pa - 181), *Gongora pleiochroma* (Pa - 182), and *Gongora minax* (Pa - 175) with percentage higher than 5% were: Pa. 181 - (E) - β -Farnesene, β -Bisabolene, MM = 208; Pa. 182 - Eugenol, Benzyl benzoate; Pa. 175-1 hexadecanol acetate, 9,12-octadecadienoic acid (Z, Z), 1-octadecanol, docosane, behenic alcohol 1-docosanol, tetracosane (Table 1).

DISCUSSION

Results showed that *Gongora pleiochroma*, *Gongora jauariensis* and *Gongora minax* had similar anatomical features: especially the nectaries in the area of bract, the digitiform

trichomes along the epidermal surfaces of bract and sepals, and the crystalliferous idioblasts (raphides) of calcium oxalate distributed along the mesophyll of bract. Additionally, the features of osmophores observed in the labellum and sepals were similar to those already described for other Stanhopeinae species (Vogel, 1990; Curry *et al.*, 1991; Antoń *et al.*, 2012; Casique *et al.*, 2018). After the scent was released and nectar was exuded, both Euglossini bees and ants were present in the areas mentioned above, and it was possible to identify these structures.

Osmophores, or odoriferous glands, are important elements to maintain plant-pollinator interaction and are characterized as the major drivers of production and release of flower fragrance in some plants (Dudareva & Pichersky, 2006; Weimer *et al.*, 2009). Floral scent is the most important reward and the main responsible for attracting male Euglossini bees, which are major pollinators of the Stanhopeinae group (Gerlach, 2003; Antoń *et al.*, 2012; Pansarin, Pansarin & Sazima, 2014; Adachi *et al.*, 2015). In some orchid species, the volatilization of these scents is performed via diffusion throughout the cuticle (Stern, Curry & Pridgeon, 1987; Stpiczyńska, 2001).

The floral scents produced by osmophores are often comprised of isoprenoids, ketones, esters, terpenoid aldehyde, benzenoid, and phenylpropanoid, which are derived from fatty acids, and several other nitrogenous and sulfurous compounds that often have low molecular weight, low polarity, and low vapor pressure, which enables scent volatilization; in other words, substances of all possible metabolic origins (Silva, 1990; Tölke *et al.*, 2019). In Orchidaceae, the chemical composition of floral scent in orchids pollinated by Euglossini bees tends to be dominated by volatile monoterpenoids, sesquiterpenoids, and aromatic compounds (Williams & Whitten, 1983). Terpenoids are

comprised of isoprene units (Curry, 1987) and are primarily responsible for attracting male bees of Euglossini.

Pollination behavior and mechanisms carried out by these bees on the flowers of the *Gongora* species analyzed were similar to those already described for the genus, as well as those related to other species in Stanhopeinae (Dressler, 1968; Gerlach, 2011; Pansarin *et al.*, 2014; Adachi *et al.*, 2015; Casique *et al.*, 2018). Male Euglossini bees scratch and collect this scent from osmophores, store it at specialized posterior tibias and, possibly, spread and expose it to conspecific females (Eltz *et al.*, 1999; Zimmermann, Roubik & Eltz, 2006; Adachi *et al.*, 2015; Hetherington-Rauth & Ramírez, 2015; Nunes *et al.*, 2017).

The osmophores in Orchidaceae are found almost exclusively in the labellum (Vogel, 1990). The osmophores in *G. jauariensis*, *G. pleiochroma*, and *G. minax* were also found in the ventral and dorsal area of the labellum (hypochile) and sepals (adaxial face). They are epidermal with papillose cells in *G. jauariensis*, *G. pleiochroma*, and without papilla in *G. minax*. Osmophores can have other morphological features, e.g., be smooth or have multi or unicellular trichomes; their secretory epidermal cells can have different shapes, with or without papilla (uni or multicellular), or simply cubic (Vogel, 1990; Curry, 1991; Antón *et al.*, 2012; Tölke *et al.*, 2019; Casique *et al.*, 2018; Kettler *et al.*, 2019).

The features observed in the osmophores of sepals and labellum of *Gongora* species exhibit similarities with previous descriptions of other Stanhopeinae species, such as *Gongora bufonia* Lindl., *Stanhopea grandiflora*., *Stanhopea oculata* Lindl., *Stanhopea wardii* Lodd. ex Lindl., *Sievekingia* Rchb.f., and *Cirrhaea* Lindl. (Stern *et al.*, 1987; Curry *et al.*, 1991; Davies & Turner, 2004; Ascensão *et al.*, 2005; Pansarin *et al.*, 2014; Adachi

et al., 2015). In other orchids, the osmophores may be located on petal tips and ovary surface (Silveira, 2002; Kowalkowska, Kozieradzka-Kiszkurno & Turzyński, 2015).

The chemical analysis of the scent of the *Gongora* species analyzed revealed typical compounds of aromas usually found in other flowers of these genera, scents that are closely related to pollinator attraction (Hetherington-Rauth & Ramírez, 2015; 2016). Compounds such as eugenol, (E)- β -Farnesene, β -Bisabolene, Docosane, and Tetracosane, present in *Gongora pleiochroma*, *Gongora jauariensis*, and *Gongora minax* were similar to other species in *Stanhopea* (Gerlach, 2010; Casique *et al.*, 2018). Together with alcohol, tetradecyl, and hexadecyl acetate, primary compounds in the three *Gongora* species, there are other substances often involved in the attraction process of potential pollinator bees, including monoterpenes (α -pinene, β -pinene, sabinene, myrcene, limonene, eucalyptol (1,8-cineol) and ocimene) (Whitten & Williams, 1992).

Elaiophores are secretory structures of non-volatile oils that help in the mutual relationship between oil-producing flowers and the bees that collect this oil, which are their potential pollinators (Vogel, 1974; Possobom & Machado, 2017). There are two types of elaiophores: trichomatose and epidermal (Vogel, 1974). Trichomatoses are comprised of glandular trichomes or uni- or multicellular epidermal excrescences, where oil can be secreted and/or accumulated, or it can even be stored below the cuticle until it is removed by the anterior legs of bees. Epidermal elaiophores are secretory epidermal cells covered by cuticle under which the secretion can be stored (Vogel, 1974; Buchmann, 1987; Endress, 1994; Possobom & Machado, 2017; Tölke *et al.*, 2019). This second type was described in this study in the ventral area of the labellum (hypochile) of *Gongora minax*, same area where the osmophores can be found.

It was not possible to observe female bees in this study. Therefore, future investigations of ecological interactions on *G. minax* are required. These shall enable to clarify the importance of this oil for the bee and pollination, and thus, confirm the role played by this elaiophore.

These structures were first described in Malpighiaceae by Vogel (1969). In Orchidaceae, the elaiophores were first described in the Oncidiinae species (Whitten *et al.*, 2000), e.g., *Zygostates* Lindl. and *Oncidium* Sw. (Vogel, 1974). Epidermal elaiophores can be found at the base of the labellum or above the callus and lobes of the labellum in some Oncidiinae species (Pacek & Stpiczyńska, 2007; Stpiczyńska, Davies & Gregg, 2007; Pacek *et al.*, 2012; Gomiz, Torretta & Aliscioni, 2013). They can be comprised of a cuboid cell layer (Singer & Cocucci, 1999; Pacek & Stpiczyńska, 2007; Pacek *et al.*, 2012; Davies, Stpiczyńska & Rawski, 2014), or palisade-type cell (Stpiczyńska & Davies, 2008; Gomiz *et al.*, 2013; Stpiczyńska *et al.*, 2013). Besides, the position and structure of the elaiophore, and the degree of oil secretion, varied according to the morphological group being investigated (Blanco *et al.*, 2013).

The chemical composition of the elaiophores of *Gongora minax* consists mainly of fatty acids and/or glycerids derivatives, such as 1-Hexadecanol, acetate, and Behenic alcohol, 1-Docosanol, which are commonly described in phytochemical studies on elaiophores (Vogel, 1974; Buchmann, 1987; Cocucci, 1991; Reis *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2007; Vogel, 2009). Other minor constituents are also reported, namely: aldehydes, amino acids, carbohydrates, carotenoids, hydrocarbon, isoprenoid compounds, ketones, phenolic compounds, saponins, and terpenes (Vogel, 1974; Simpson & Neff, 1981; Buchmann, 1987; Reis *et al.*, 2000; Reis *et al.*, 2006). Nevertheless, elaiophores do not produce only fatty acids, but also acid mucilage, which along with the oil, makes the

secretion more fluid and, therefore, facilitates its collection by bees (Pansarin *et al.*, 2009). It is worth of note that the occurrence of nectar, lipids, and sugar traces in some floral oils (Vogel, 1990; Davies, Turner & Gregg, 2003), and the inverse, the occurrence of terpenoids in the nectar (Davies, Stpiczyńska & Gregg, 2005) of some species, can indicate that the elaiophores derive from nectaries (Stpiczyńska *et al.*, 2007).

The first ultrastructural analyses of osmophores with granulocrine secretion in Orchidaceae was performed with *Restrepia* Kunth and *Scaphosepalum* Pfitzer (Pridgeon & Stern, 1983; Pridgeon & Stern, 1985). Among Stanhopeinae species, the analysis were initially performed with *Stanhopea oculata*, *S. wardii*, and *Stanhopea graveolens* Lindley and the major organelles observed were mitochondria, amyloplasts, elaioplasts, and smooth and rough endoplasmic reticula (Stern *et al.*, 1987; Antoń *et al.*, 2012). *Gongora bufonia*, however, had some particularities, such as branched plasmodesmata, the apparent absence of rough endoplasmic reticulum, and microchannels formed by the reticulated cuticle (Adachi *et al.*, 2015). These microchannels have already been described in *Bulbophyllum wendlandianum* (Kraenzl.) Dammer and *Bulbophyllum weberi* Ames (Kowalkowska *et al.*, 2015; Kowalkowska, Turzyński, Kozieradzka-Kiszkurno, 2017). In *Gongora jauariensis*, *Gongora pleiochroma* and *Gongora minax*, the results were similar to those found in *Stanhopea* and *Gongora bufonia*. These cellular compounds, smooth and rough endoplasmic reticulum, mitochondria and plastids are closely involved in fragrance synthesis, which is produced and exudated by floral osmophores and are commonly reported in osmophores of most orchids and of other plants (Stern *et al.*, 1987; Curry *et al.*, 1991; Stpiczyńska, 1993; Effemert *et al.*, 2006; Kowalkowska *et al.*, 2015; Stpiczyńska *et al.*, 2018; Paiva *et al.*, 2019; Tölke *et al.*, 2019).

The labellum surface (hypochile) of *Gongora minax* is covered by grains of epicuticular wax, as in *Gongora bufonia* which according to Adachi et al. (2015), may help pollination by causing instability in the pollinator (slip-and-fall) when positioning on and fixating in the labellum, which makes it fall over the column, thus removing the pollinarium. The flower morphology provides this pollination mechanism characteristic of *Gongora* subg. *Gongora* and the subg. *Portentosa* (Gerlach, 2009).

The starch grains present in the osmophores cells of the species studied are a common feature of odoriferous glands (Stern *et al.*, 1987; Curry *et al.*, 1991; Pansarin *et al.*, 2009) since starch is used as an energy source for the production of nectar or scent (Vogel, 1990; Effemert *et al.*, 2006). Moreover, these starch agglomerations decrease as volatile evaporation occurs, along with increased vacuole volume and reduced cytoplasm; however, a thin peripheral cytoplasm layer remains, as do some large lipid drops, few amyloplasts, mitochondria, and SER/RER (Pridgeon & Stern, 1983; Effemert *et al.*, 2006).

As seen by in situ histochemical analysis, the main classes of metabolites are the terpenoids in the three species of *Gongora* and free fatty acids, especially in *Gongora minax*, data confirmed by the list of compounds obtained after phytochemical analysis of the labellum (Table. 1). The labellar secretion of *Gongora minax* is a heterogeneous mixture, containing mainly lipophilic substances, like a high content of free fatty acids and terpenoids. The free fatty acids are the most common components found in floral oils of the elaiophores (Vogel, 1974; Reis et al., 2006; Possobom & Machado, 2017). And the distinct coloration of the floral tissue in histochemical analyses with reagents such as neutral red help in osmophore identification (Vogel, 1990; Pansarin & Pansarin, 2011; Francisco & Ascensão, 2013). The use of dyes Sudan black, Sudan III, and Sudan IV are

useful for the detection of triacylglycerides and total lipids (Effemert et al., 2006). Nile blue sulfate indicates the presence of differentiated lipids such as acid and neutral lipids, and NADI reagent helps to identify terpenoids (Effemert et al., 2006; Demarco, 2017). All these tests react positively indicating that this secretion would be compatible with that secreted by osmophores. Aside from coloration, identifying volatile compounds using a mass spectrometer (GC-MS) is essential for osmophore identification (Effemert et al., 2006).

Nectariferous stomata were also observed at the base of bract, both in bud and postanthesis stages in *Gongora*, as well as in *Stanhopea grandiflora*. Ants were observed on the bract, even with flower in anthesis stage and with the presence of bees. This foraging of ants was similar to that reported on *Epidendrum denticulatum* Barb.Rodr. ants did not interfere with pollinator behaviour (Almeida & Figueiredo, 2003; Gerlach, 2011; Leitão *et al.*, 2014). This association with ants has been reported in *Coryanthes* Hook., and recently, in *Stanhopea grandiflora*, where ants feed on nectar from extrafloral nectaries and can use the plant to build their nests while defending plants from herbivores and fertilizing them with vertebrate feces (Gerlach, 2011; Casique *et al.*, 2018). This nutrient offered by ants allows plants to grow more rapidly (Gerlach, 2011; Gegenbauer *et al.*, 2012).

In conclusion, after anatomical, histochemical, and phytochemical analyses, we observed the osmophores, structures commonly described for Stanhopeinae, these structures are involved in the attraction and reward of pollinators, i.e., the male Euglossini bees. In *Gongora minax*, the labellum (hypochile) showed chemical and structural characteristics of elaiophore and osmophore. It can thus be assumed that there is a possibility that the same plant structure is both osmophore and elaiophore. The elaiophore

described in this study was mainly characterized by chemical analysis and TEM analysis. Elaiophores are commonly described in Malpighiaceae, Iridaceae and other Orchidaceae and the main ecological function of secreted oils is used for coating nest wall of Euglossini bees nests by female bees. More studies on the floral biology of this species will be necessary to identify the female bee or the real function of this exuded oil, for the pollination process. Regarding the interactions between foraging ants and nectaries of bracts of *Gongora* species, it is here reported for the first time for the genus. However, we emphasize the need for future studies of these nectaries using transmission electron microscopy to elucidate the secretion processes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Biodiversity Authorization and Information System (Sisbio) for providing the authorization for sampling; we thank the collaboration of Luiz Otávio Adão and João Batista in the fieldwork. JVCT thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) for granting a scholarship and supporting our research and Museu Paraense Emílio Goeldi and Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especially Laboratory of Plant Anatomy (LAVeg) and Center of Microscopy and Microanalysis (Centro de Microscopia e Microanálise - CMM), for the support provided to carry out this study.

REFERENCES

- Adachi S, Machado S, Guimarães E. 2015.** Structural and ultrastructural characterization of the floral lip in *Gongora bufonia* Lindl. (Orchidaceae): understanding the slip-and-fall pollination mechanism. *Botany* **93**: 759–768.
- Adams P. 2007.** *Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry*. 4th Ed. Allured Publishing, Carol Stream.
- Aguiar JMRBV, Pasarin LM, Ackerman JD, Pasarin ER. 2012.** Biotic vs. abiotic pollination in *Oeceoclades maculate* (Lindl.) Lindl. (Orchidaceae: Epidendroideae). *Plant Species Biology* **27**: 86–95.
- Almeida AM, Figueiredo RA. 2003.** Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a Brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. *Brazilian Journal of Biology* **63**: 551–558.
- Antoń S, Kamińska M, Stpiczyńska M. 2012.** Comparative structure of the osmophores in the flower of *Stanhopea graveolens* Lindley and *Cycnoches chlorochilon* Klotzsch (Orchidaceae). *Acta Agrobotanica* **65**: 11–22.
- Ascensão L, Francisco A, Cotrim H, Pais MS. 2005.** Comparative structure of the lip in *Ophrys fusca* and *O. lutea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **92**: 1059–1067.
- Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN, Pessoa EM, Forster W, Menini Neto L, Furtado SG, Nardy C, Azevedo CO, Guimarães LRS. 2019.** *Orchidaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB179>.
- Bembé B. 2004.** Functional morphology in male euglossine bees and their ability to spray fragrances (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Apidologie* **35**: 283–291.

- Blanco MA, Davies KL, Stpiczyńska M, Carlswald BS, Ionta GM, Gerlach G. 2013.** Floral elaiophores in *Lockhartia* Hook. (Orchidaceae: Oncidiinae): their distribution, diversity and anatomy. *Annals of Botany* **112**: 1775–1791.
- Buchmann SL. 1987.** The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **18**: 343–369.
- Cain AJ. 1947.** The use of Nile blue in the examination of lipids. *Quarterly journal of microscopical science* **88**: 383–392.
- Cardoso-Gustavson P, Campbell LM, Mazzoni-Viveiros SC, DE Barros F. 2014.** Floral colleters in Pleurothallidinae (Epidendroideae: Orchidaceae). *American Journal of Botany* **101**: 587–597.
- Casique JV, Silva EF, Andrade EHA, Mastroberti AA, Aguiar-Dias ACA. 2018.** Anatomical analyses of floral and extrafloral secreting structures indicate the presence of nectaries and colleters in *Stanhopea grandiflora* Lindl. *Brazilian Journal of Botany* **41**: 725–738.
- Chase MW, Cameron KM, Barrett RL, Freudenstein JV. 2003.** DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KW, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ, eds. *Orchid conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, 69–89.
- Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar G, van den Berg C, Schuiteman A. 2015.** An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **177**: 151–174.
- Cocucci AA. 1991.** Pollination Biology of *Nierembergia* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* **174**: 17–35.

- Curry KJ. 1987.** Initiation of terpenoid synthesis in osmophores of *Stanhopea anfracta* (Orchidaceae): a cytochemical study. *American Journal of Botany* **74**: 1332–1338.
- Curry KJ, McDowell LM, Judd WS, Stern WL. 1991.** Osmophores, floral features, and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **78**: 610–623.
- David R, Carde JP. 1964.** Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdo Séances de l'Académie des Sciences Paris* **258**: 1338–1340.
- Davies KL, Stpiczyńska M. 2012.** Comparative labellar anatomy of resin-secreting and putative resin-mimic species of *Maxillaria* s.l. (Orchidaceae: Maxillariinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **170**: 405–435.
- Davies KL, Stpiczyńska M. 2017.** Comparative floral micromorphology and the ultrastructural basis of fragrance production in pseudocopulatory *Mormolyca* s.s. and non-pseudocopulatory *Maxillaria* section *Rufescens* s.s. (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **185**: 81–112.
- Davies KL, Stpiczyńska M, Gregg A. 2005.** Nectar-secreting floral stomata in *Maxillaria anceps* Ames & C.Schweinf. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **96**: 217–227.
- Davies KL, Stpiczyńska M, Rawski M. 2014.** Comparative anatomy of floral elaiophores in *Vitekorchis* Romowicz & Szlach., *Cyrtochilum* Kunth and aflowerly dimorphic species of *Oncidium* Sw. (Orchidaceae: Oncidiinae). *Annals of Botany* **113**: 1155–1173.
- Davies KL, Turner MP, Gregg A. 2003.** Lipoidal labellar secretions in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **91**: 439–446.

- Davies KL, Turner MP. 2004.** Morphology of floral papillae in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). *Annals of Botany* **93**: 75–86.
- Demarco D. 2017.** Histochemical Analysis of Plant Secretory Structures. In: Pellicciari C, Biggiogera M, eds. *Histochemistry of single molecules – Methods and Protocols*. Pavia: Human press, 313–330.
- Dressler RL. 1968.** Pollination by Euglossini bees. *Evolution* **22**: 202–210.
- Dressler RL. 1982.** Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics* **13**: 373–394.
- Dressler RL. 1993.** *Phylogeny and classification of the orchid family*. Dioscorides Press, Portland.
- Dudareva N, Pichersky E. 2006.** Biology of Floral Scent. Taylor and Francis Group press, Boca Raton, FL.
- Effmert U, Buss D, Rohrbeck D, Piechulla B. 2006.** Localization of the synthesis and emission of scent compounds within the flower. In: Dudareva N, Pichersky E, eds. *Biology of floral scent*. London: CRC Press, 105–124.
- Eltz T, Whitten WM, Roubik DW, Linsenmair KE. 1999.** Fragrance collection, storage, and accumulation by individual male orchid bees. *Journal of Chemical Ecology* **25**: 157–176.
- Endress PK. 1994.** *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge University Press.
- Fahn A. 1979.** Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. *American Journal of Botany* **57**: 977–985.

- Francisco A, Ascensão L. 2013.** Structure of the osmophore and lip micromorphology in the sexually deceptive orchids *Ophrys bombyliflora* and *Ophrys tenthredinifera* (Orchidaceae). *International Journal of Plant Science* **174**: 619–636.
- Franken EP, Pansarin LM, Pansarin ER. 2016.** Osmophore diversity in the *Catasetum cristatum* alliance (Orchidaceae: Catasetinae). *Lankesteriana* **16**: 317–327.
- Ganter P, G Jollès. 1969.** *Histologie normale et pathologique*. Vol. 1, Gauthier-Villars, Paris.
- Ganter P, G Jollès. 1970.** *Histologie normale et pathologique*. Vol. 2, Gauthier-Villars, Paris.
- Gegenbauer C, Mayer VE, Zotz G, Richter A. 2012.** Uptake of ant-derived nitrogen in the myrmecophytic orchid *Caularthron bilamellatum*. *Annals of Botany* **110**: 757–765.
- Gerrits PO, Smid L. 1983.** A new less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* **132**: 81–85.
- Gerlach G. 2003.** La subtribu Stanhopeinae: sus notables mecanismos de polinización, la química de sus aromas florales e implicaciones en sistemática y taxonomía. *Lankesteriana* **7**: 104–106.
- Gerlach G, Dressler RL. 2003.** Stanhopeinae Mesoamericanas. *Lankesteriana* **8**: 23–30.
- Gerlach G, Whitten WM. 2009.** Stanhopeinae. In: Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. *Genera Orchidacearum*. Vol. 5. Oxford University Press, New York. Pp. 394–399.
- Gerlach G. 2010.** Stanhopeinae Mesoamericanas, V. El aroma floral de las Stanhopeas de México. *Lankesteriana* **9**: 431–442.

- Gerlach G. 2011.** The genus *Coryanthes*: a paradigm in ecology. *Lankesteriana* **11**: 253–264.
- Gersterberger P, Leins P. 1978.** Rasterelektronmikroskopische untersuchungen an blütenknospen von *Physalis philadelphica* (Solanaceae). Anwendung einer neuen präparationsmethode. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **91**: 381-387.
- Gomiz NE, Torretta JP, Aliscioni SS. 2013.** Comparative anatomy of elaiophores and oil secretion in the genus *Gomesa* (Orchidaceae). *Turkish Journal of Botany* **37**: 859–871.
- Hanaichi T, Sato T, Iwamoto T, Malavasi-Yamashiro J, Hoshino M, Mizuno N. 1986.** A stable lead by modification of Sato's method. *Journal of Electron Microscopy* **35**: 304–306.
- Hetherington-Rauth MC, Ramírez SR. 2015.** Evolutionary trends and specialization in the Euglossine bee – pollinated orchid genus *Gongora*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **100**: 271–299.
- Hetherington-Rauth MC, Ramírez SR. 2016.** Evolution and diversity of floral scent chemistry in the euglossine bee-pollinated orchid genus *Gongora*. *Annals of Botany* **118**: 135–148.
- Jennings W, Shibamoto T. 1980.** Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. Academic Press, London.
- Johansen DA. 1940.** *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York Johnson.
- Kettler BA, Solís SM, Ferrucci MS. 2019.** Comparative survey of secretory structures and floral anatomy of *Cohniella cepula* and *Cohniella jonesiana* (Orchidaceae: Oncidiinae). New evidences of nectaries and osmophores in the genus. *Protoplasma* **256**: 703–720.

- Kirk-Junior PW. 1970.** Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technology* **45**: 1–4.
- Kowalkowska AK, Koziaradzka-Kiszkurno M, Turzyński S. 2015.** Morphological, histological and ultrastructural features of osmophores and nectary of *Bulbophyllum wendlandianum* (Kraenzl.) Dammer (*B.* section *Cirrhopetalum* Lindl., Bulbophyllinae Schltr., Orchidaceae). *Plant Systematic and Evolution* **59**: 80–308.
- Kowalkowska AK, Turzyński S, Koziaradzka-Kiszkurno M. 2017.** Floral structure of two species of *Bulbophyllum* section *Cirrhopetalum* Lindl.: *B. weberi* Ames and *B. cumingii* (Lindl.) Rchb.f. (Bulbophyllinae Schltr., Orchidaceae). *Protoplasma* **254**: 1431–1449.
- Leitão CAE, Mary Dolder MAH, Cortelazzo AL. 2014.** Anatomy and histochemistry of the nectaries of *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Flora* **209**: 233–243.
- Likens ST, Nickerson GB. 1964.** Detection of certain hop oil constituents in brewing products. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **22**: 5–13.
- Mcdowell EM, Trump B. 1976.** Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **100**: 405–414.
- Melo MC, Borba EL, Paiva EAS. 2010.** Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* **286**: 141–151.
- Metcalf C, Chalk L. 1950.** *Anatomy of the dicotyledons*. Oxford: Clarendon Press.
- Mondello L. 2011.** *Flavors and fragrances of natural and synthetic compounds*. 2nd Ed. Wiley, New Jersey

- Neubig KM, Carlsward BS, Whitten WM, Williams NH. 2015.** Nectar y structure and nectar in *Sobralia* and *Elleanthus* (Sobralieae: Orchidaceae). *Lankesteriana* **15**: 113–127.
- Nunes CEP, Castro MD, Galetto L, Sazima M. 2013.** Anatomy of the floral nectary of ornithophilous *Elleanthus brasiliensis* (Orchidaceae: Sobralieae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **171**: 764–772.
- Nunes CEP, Gerlach G, Bandeira KDO, Gobbo-Neto L, Pansarin ER, Sazima M. 2017.** Intriguing chemical similarity: Floral scents of *Catasetum cernuum* and *Gongora bufonia* suggest convergent evolution to a unique pollination niche. *Flora* **232**: 207–216.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964.** Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* **59**: 368–373.
- Pacek A, Stpiczyńska M. 2007.** The structure of elaiophores in *Oncidium cheirophorum* Rchb.f. and *Ornithocephalus kruegeri* Rchb.F. (Orchidaceae). *Acta Agrobotanica* **60**: 9–14.
- Pacek A, Stpiczyńska M, Davies KL, Szymczak G. 2012.** Floral elaiophore structure in four representatives of the *Ornithocephalus* clade (Orchidaceae: Oncidiinae). *Annals of Botany* **110**: 809–820.
- Paiva EAS, Dötterl S, De-Paula OC, Schlindwein C, Souto LS, Vitarelli NC, Silva CI, Mateus S, Alves-dos-Santos I, Oliveira DMT. 2019.** Osmophores of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): a particular structure of the androecium that releases an unusual scent. *Protoplasma* **256**: 971–981.
- Pansarin ER, Pansarin LM. 2011.** Reproductive biology of *Trichocentrum pumilum*: an orchid pollinated by oil-collecting bees. *Plant Biology* **13**: 576–581.

- Pansarin LM, Castro M, Sazima M. 2009.** Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. *Botanical Journal of the Linnean Society* **159**: 408–415.
- Pansarin ER, Salatino A, Pansarin LM, Sazima M. 2012.** Pollination systems in Pogonieae (Orchidaceae: Vanilloideae): A hypothesis of evolution among reward and rewardless flowers. *Flora* **207**: 849–861.
- Pansarin LM, Pansarin ER, Sazima M. 2014.** Osmophore structure and phylogeny of *Cirrhaea* (Orchidaceae, Stanhopeinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **176**: 369–383.
- Pearse AGE. 1980.** *Histochemistry: theoretical and applied, Vol. 2.* 4th ed., Edinburgh: C. Livingstone.
- Possobom CCF, Machado SR. 2017.** Elaiophores: their taxonomic distribution, morphology and functions. *Acta Botanica Brasilica* **31**: 503-524.
- Pridgeon AM, Stern WL. 1983.** Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* Kunth (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **70**: 1233–1243.
- Pridgeon AM, Stern WL. 1985.** Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* **146**: 115–123.
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. 2009.** *Genera orchidacearum Volume 5; Epidendroideae (Part 2)*. Oxford: Oxford University Press.
- Rasmussen FN. 1985.** Orchids. In: Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF. *The Families of the monocotyledons: structure, evolution and taxonomy*. Springer, Berlin, 247–274.
- Reis MG, Faria AD, Bittrich V, Amaral MCE, Marsaioli AJ. 2000.** The chemistry of flower-rewards: *Oncidium* (Orchidaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **11**: 600–608.

- Reis MG, Singer RB, Gonçalves R, Marsaioli AJ. 2006.** The chemical composition of *Phymatidium delicatulum* and *P. tillandsioides* (Orchidaceae) floral oils. *Natural Products Communications* **1**: 757–761.
- Reis MG, Faria AD, Alves-dos-Santos I, Amaral MCE, Marsaioli AJ. 2007.** Byrsonic acid – the clue to floral mimicry involving oil-producing flowers and oil-collecting bees. *Journal of Chemical Ecology* **33**: 1421–1429.
- Remizowa MV, Rudall PJ, Choob VV, Sokoloff DD. 2013.** Racemose inflorescences of monocots: structural and morphogenetic interaction at the flower/inflorescence level. *Annals of Botany* **112**: 1553–1566.
- Rudolf J. 1993.** *Monograph of the genus Gongora Ruiz & Pavón (transl. M. Sommer & C. d'Heureuse)*. Koeltz Scientific Books, Champaign, IL, U.S.A./Königstein, Germany.
- Sass JE. 1951.** *Botanical microtechnique*, 2nd edn. Iowa State College Press, Ames.
- Silva AG. 1990.** Osmóforos: Retrospectiva dos últimos 20 anos de Pesquisa. *Rodriguésia* **42-44**: 7–20.
- Silveira K. 2002.** *Adaptive radiation of oil-reward compounds among neotropical orchid species (Oncidiinae)*. Master's Dissertation, University of Florida, USA.
- Simpson BB, Neff JL. 1981.** Floral rewards: Alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **68**: 301–322.
- Singer RB, Cocucci AA. 1999.** Pollination Mechanisms in four Sympatric Southern Brazilian Epidendroideae orchids. *Lindleyana* **14**: 47–56.
- Spurr AR. 1969.** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* **26**: 31–43.

- Stern WL, Curry KJ, Pridgeon AM. 1987.** Osmophores of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **74**: 1323–1331.
- Stpiczyńska M. 1993.** Anatomy and ultrastructure of osmophores of *Cymbidium tracyanum* Rolfe (Orchidaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **62**: 5–9.
- Stpiczyńska M. 2001.** Osmophores of the fragrant orchid *Gymnadenia conopsea* L. (Orchidaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **70**: 91–96.
- Stpiczyńska M, Davies KL, Gregg A. 2007.** Elaiophore diversity in three contrasting members of Oncidiinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **155**: 135–148.
- Stpiczyńska M, Davies KL. 2008.** Elaiophore structure and oil secretion in flowers of *Oncidium trulliferum* Lindl. and *Ornithophora radicans* (Rchb.f.) Garay & Pabst (Oncidiinae: Orchidaceae). *Annals of Botany* **101**: 375–384.
- Stpiczyńska M, Davies KL, Pacek-Bieniek A, Kamińska M. 2013.** Comparative anatomy of the floral elaiophore in representatives of the newly recircumscribed *Gomesa* and *Oncidium* clades (Orchidaceae: Oncidiinae). *Annals of Botany* **112**: 839–854.
- Stpiczyńska M, Davies KL, Zych M, Plachno BJ. 2018.** Labellar secretory structures and pollinator food-rewards in representatives of Old World *Bulbophyllum* Thouars. *Flora* **240**: 98–115.
- Tölke ED, Capelli NV, Pastori T, Alencar AC, Cole TCH, Demarco D. 2019.** Diversity of Floral Glands and Their Secretions in Pollinator Attraction. In: Merillon JM., Ramawat K. (eds) *Co-Evolution of Secondary Metabolites*. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham.

- Van Den Dool H, Kratz PDA. 1963.** Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography* **11**: 463–471.
- Vidal BC. 1970.** Dichroism in collagen bundles stained with xylydine ponceau 2R. *Annales d'histochimie* **15**: 289–296.
- Vogel S. 1969.** Flowers offering fatty oil instead of nectar. Abstracts, Proceedings of the XI International Botanical Congress, Seattle, p. 229
- Vogel S. 1974.** Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Tropische und subtropische Pflanzenwelt* **7**: 285–547
- Vogel S. 1990.** *The Role of Scent Glands in Pollination*, 1st edn. Smithsonian Institution, Washington, D.C, USA.
- Vogel S. 2009.** The non-African oil flowers and their bees: A brief survey. SAAB Annual Meeting Abstracts. *South African Journal of Botany* **75**: 389–390.
- Weimer AP, Moré M, Benitez-Vieyra, Cocucci AA, Raguso RA, Sérsic AN. 2009.** A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cyclopogon elatus* (Orchidaceae). *Plant Biology* **11**: 508–514.
- Whitten WM, Williams NH. 1992.** Floral fragrances of *Stanhopea* (Orchidaceae). *Lindleyana* **7**: 130–153.
- Whitten WM, Williams NH, Chase MW. 2000.** Subtribal and generic relationship of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. *American Journal of Botany* **87**: 1842–1856.
- Williams NH, Whitten WM. 1983.** Orchid floral fragrances and male Euglossini bees: Methods and advances in the last sesquidecade. *Biological Bulletin* **164**: 355–395.

Withner CL, Nelson PK, Wejks-Nora PJ. 1974. The anatomy of orchids. In: *The orchids: scientific studies*, Withner CL ed. New York: John Wiley & Sons, 267–347.

Zimmermann Y, Roubik DW, Eltz T. 2006. Species-specific attraction to pheromonal analogues in orchid bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **60**: 833–843.

TABLES

Table 1. Analysis of the floral fragrance of *Gongora* species. *Gongora jauariensis* (Pa - 181), *Gongora pleiochroma* (Pa - 182), and *Gongora minax* (Pa - 175) (%).

FIGURES

Figure 1. Habit and morphology of *Gongora*. (A) Habit and pendant inflorescence. (B) Postanthesis flower of *G. jauariensis*. (C) Flower of *G. minax*. (D–E) Flower of *G. pleiochroma*. (F–G) Morphology of *G. minax*, frontal and lateral view, note the absence of horns in the labellum. (H) Frontal view of flower of *G. pleiochroma*, detail of horns (arrow). (I–J) Bract tested with Glicofita Plus and foraging ants (*Dolichoderus* sp.). (K) *Eulaema nigrita* (arrow) in the labellum of *G. minax*. (L) Detail of *Eulaema bombiformis* in the sepals of *G. jauariensis*. (M) *Euglossa* sp. in the sepals of *G. pleiochroma*. (N) *Eulaema bombiformis* in the labellum of *G. minax*. Scales bars: M = 5 cm; A, C, I = 2 cm; H, B, D, N = 1 cm; L, K, F, G = 5 mm; J, E = 1 mm. Key to all figures: sl, lateral sepals; sd, dorsal sepals; pt, petals; co, column; hp, hypochile; me, mesochile; ep, epichile; cu, cuticle; cw, cell wall; is, intercellular space; mi, mitochondria; nu, nucleus; se, lipid secretion; sg, starch grains; pl, plasmalemma; va, vacuole; ve, vesicles.

Figure 2. Foragers, pollinators, and pollination mechanism in *Gongora*. (A) Floral bud of *G. pleiochroma* with *Dolichoderus* sp. ant on bract (red arrow). (B) Flower of *G. minax* in anthesis. (C) Scheme of flowers of *G. jauariensis* (left) with *Eulaema bombiformis* (red circle) foraging the labellum and *G. pleiochroma* (right) with *Euglossa* sp. (red circle) foraging the sepal; note the pollinarium (highlighted in yellow) in the bee's scutellum and

the detail (red circle) shows the ant foraging the bract of postanthesis flowers. (D) Bee (*Eulaema nigrita*) entering the excavated hypochile in search for oleiferous compounds collected from the base of the hypochile; detail of column apex with pollinarium (red circle); after the bee forages the labellum, it falls on the column, and the pollinarium clings to the scutellum. Scales bars: A, C = 1 cm; B, D = 2 cm.

Figure 3. Structural analysis of bract (A-F) and SEM (G-J) in *Gongora* species. (A, B, I) *G. jauariensis*. (C, D, G, H) *G. pleiochroma*. (E, F, J) *G. minax*. (A) Cross-section of the bract adnate to pedicel, collateral vascular bundles ordered in mesophyll (arrow head), digitiform trichomes in the adaxial face (arrow). (B) Crystalliferous idioblasts in bract mesophyll and vascular bundle (arrow head), stomata on the abaxial face (arrows). (C–D) Detail of bract idioblasts with raphides. (E) Collateral vascular bundles of the bract. (F) Nectariferous stomata on the abaxial face of bract, with content visible in intercellular spaces (*). (G) In SEM, stomata observed on the abaxial face of bract of *G. pleiochroma*. (H) Digitiform trichomes along the adaxial face of bract (arrowhead). (I–J) Detail of this digitiform trichomes observed on the abaxial face of bract. Scales bars: A = 200 μm ; B = 100 μm ; C–E = 20 μm ; F = 10 μm ; G, H, J = 20 μm ; I = 10 μm .

Figure 4. Osmophore in the sepal of *Gongora* species. (A) *G. jauariensis*, papillose cells of secretory epidermis (arrow). (B) Papillose cells of secretory epidermis in the sepal of *G. pleiochroma*. (C) Collateral vascular bundle in the mesophyll close to abaxial face. (D) Adaxial face of sepal, with starch grains in the detail (*) of papillose cells, stomata on the abaxial face (arrow). (E) Adaxial face of sepal showing starch grains in the parenchyma cells (*). (F) Elongated ridges in *G. pleiochroma* sepals. (G) Short ridges in

G. jauariensis, in the detail epicuticular wax (arrow). (H) Smooth osmophore in the sepal of *G. minax*. (I) crystalliferous idioblasts along the mesophyll, evident lipid drops (arrow). (J) Abaxial face of sepals of *G. pleiochroma*. (K) Abaxial face of *G. minax* sepal. (L) detail of collateral vascular bundle in the sepal of *G. minax*. (M–N) Digitiform trichomes observed on the adaxial face of sepals of *G. jauariensis*. (O) Stomata present on the abaxial face of *G. minax* sepals. Scale bars: A–C = 500 μm ; H, J = 200 μm ; D, E, I, L = 100 μm ; F, K, M, N, O = 20 μm ; G = 10 μm ;

Figure 5. Osmophores and Elaiophore in the labellum of *Gongora* species. (A–E) *G. jauariensis*. (F–J) *G. pleiochroma*. (K–Q) *G. minax*. (A) Hypochile of *G. jauariensis* (cross-section). (B) Detail of horns. (C) Dorsal face showing papillose cells of the epidermis. (D) Ventral face without papillose cells and papillose dorsal face. (E) Osmophore of labellum in *G. jauariensis* (SEM). (F) Hypochile of *G. pleiochroma* (cross-section). (G) Part of the labellum showing the ventral and dorsal faces. (H) Detail of ventral face, cells with numerous starch grains (arrow head). (I) Detail of dorsal face with some papillose cells (arrow). (J) Osmophore of labellum in *G. pleiochroma* (SEM). (K) Hypochile of *G. minax* (cross-section). (L) Ventral face (hypochile), with content visible in intercellular spaces. (M) Detail of epidermal cells in the ventral face, evident lipid drops (*). (N) Dorsal face (hypochile) and evident lipid drops in this area. (O) Ventral face of labellum with osmophores/elaiophores in *G. minax*, sparse stomata (arrowhead), and epicuticular wax (arrowhead). Scales bars: A, K = 500 μm ; D, F = 350 μm ; C = 200 μm ; B, H, L, P, Q = 100 μm ; N–O = 50 μm ; I, E, J = 20 μm ; G, M = 10 μm .

Figure 6. Histochemical analysis of *Gongora* species of the median regions (cross-section) of bract (A–H) and sepals (I–M). (A–D) Fehling reagent. (A–B) Mesophyll and stomata of *G. minax*. (C–D) Mesophyll of *G. jauariensis*. (E–G) Ponceau Xylidine. (E–F) Staining with Xylidine revealed the presence of protein bodies in the mesophyll and trichome of *G. pleiochroma*. (G) Protein bodies in the stomata of *G. minax*. (H) Staining with Lugol reagent in the mesophyll and stomata of *G. jauariensis*. (I–K) Sudan III. (I) Staining with Sudan III revealed the presence of lipid bodies in the sepals of *G. jauariensis*. (J) Mesophyll of *G. pleiochroma*. (K) Mesophyll of *G. minax*. (L–M) Staining with NADI reagent. (L) Mesophyll of *G. jauariensis*. (M) Mesophyll of *G. minax*. Scales bars: A = 50 μm ; B–M = 10 μm .

Figure 7. Labellum (hypochile) histochemical analysis of *Gongora* species. (A) Staining with Sudan III in the secretory parenchyma of *G. jauariensis*. (B) Papillose cells with Sudan III of *G. pleiochroma*. (C–E) Staining with Sudan III of *G. minax*. (D–E) Ventral face and dorsal face, respectively, of labellum of *G. minax* with Sudan III. (F–G) Starch grains (Lugol reagent) of *G. pleiochroma*. (H) Starch grains (Lugol reagent) of *G. minax*. (I–J) Essential oils (NADI reagent) *G. jauariensis* and *G. pleiochroma*, respectively. (K) Essential oils (NADI reagent) in *G. minax*. (L) Oil resin in *G. minax*. (M) Bodies of acid lipids (Nile blue sulfate) in *G. jauariensis*. (N) Bodies of neutral lipids (Nile blue sulfate) in *G. minax*. (O) Staining bodies with fatty acids (copper acetate/rubanic acid) in the labellum of *G. minax*. (P) Labellum with Neutral red in UV light of *G. jauariensis*. (Q) Labellum with Neutral red in UV light of *G. minax*. Scales bars: O–Q = 20 μm ; A–N = 10 μm .

Figure 8. Analysis using Transmission Electron Microscopy (TEM) of ventral and dorsal faces of labellum (hypochile) osmophores of the three *Gongora* species. (A–E) *Gongora jauariensis* and *Gongora pleiochroma*. (F–K) *Gongora minax*. (A) Secretory epidermal cell, papillose with a thin periclinal wall on the dorsal face of *G. jauariensis* and *G. pleiochroma* with abundant cytoplasm, evident vacuole, numerous amyloplasts, lipid drops in vesicles (arrowhead), mitochondria, and smooth and rough endoplasmic reticula. (B) Cuticle presenting a well-developed net of microchannels (arrows). (C) Amyloplasts containing visible starch grains, well-developed vacuoles, and lipid drops near (arrowhead). (D) Smooth and rough endoplasmic reticula, mitochondria, and large intercellular spaces. (E) Detail of amyloplast containing starch grains and smooth endoplasmic reticulum (arrowhead). (F) Ventral face of labellum with a thick cuticle. (G) Outer periclinal wall polylamellate with microchannels (arrows). (H) Deposit of epicuticular wax (arrows) on the ventral face. (I) Secretory cells of epidermis on the ventral face. (J) Branched plasmodesmata (arrows) going through intercellular walls and detail. (K) Abundant lipid drops, amyloplasts containing starch grains, mitochondria, and smooth (blackhead arrow) and rough (white head arrow) endoplasmic reticula. Scales bars: I = 20 μm ; A = 10 μm ; C, J = 5 μm ; B, G, H, K = 2 μm ; E = 1 μm ; D, F = 0,5 μm . For key, see Figure 1.

Table 1.

RI	Constituents	Characterization	Pa-175	Pa-181	Pa-182
2086	[2-(2-Hydroxyphenyl)cyclopropyl] (phenyl)methanone	Acetone	-	-	1.73
2170	Octadeca-(3Z,13Z)-dien-1-yl acetate	Acetone	-	0.46	-
1596	2,2,4-Trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate	Alcohols	-	0.36	0.39
1634	α -Acorenol	Alcohols	-	0.33	-
62.499	1-Tricosanol	Alcohols	1.19	-	-
811	Hexanal	Aldehydes	-	0.27	3.60
1045	Phenylacetaldehyde	Aldehydes	-	0.96	1.49
1106	n-Nonanal	Aldehydes	-	1.97	2.09
1161	1,3,5,7-Cyclooctatetraene-1-carboxaldehyde	Aldehydes	-	0.16	-
1208	n-Decanal	Aldehydes	-	0.14	-
1273	(E)-Cinnamaldehyde	Aldehydes	-	-	0.44
820	Butyl-Acetate	Carboxylic Acids	-	0.77	-
1409	Methyl-Eugenol	Carboxylic Acids	-	1.83	-
1774	Benzyl benzoate	Carboxylic Acids	-	-	60.63
34.904	Dodecyl acetate	Carboxylic Acids	0.46	-	-
1877	Phthalic acid, isobutyl propyl ester	Ester	-	0.13	-
1968	Hexadecanoic acid	Fatty acid	-	0.62	-
2000	Ethyl hexadecanoate	Fatty acid	-	0.09	-
44.627	n-Hexadecanoic acid	Fatty acid	3.63	-	-
49.403	9-Octadecenoic acid (Z)-	Fatty acid	3.09	-	-
49.969	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	Fatty acid	7.09	-	-
42.018	Hexadecanol<n->	Fatty Alcohols	0.97	-	-
54.055	1-Octadecanol	Fatty Alcohols	5.19	-	-
59.496	1-Docosanol	Fatty Alcohols	20.46	-	-
64.961	1-Tetracosanol	Fatty Alcohols	1.32	-	-
46.178	1-Hexadecanol, acetate	Fatty Esters	14.74	-	-
52.234	Octadecyl acetate	Fatty Esters	1.03	-	-
1389	(E)- β -Damascenone	Hydrocarbon	-	0.06	-
1420	chis- α -Bergamotene	Hydrocarbon	-	0.42	-
1440	<i>trans</i> - α -Bergamotene	Hydrocarbon	-	0.86	-
39.581	1-Octadecene	Hydrocarbon	3.16	-	-
54.843	Docosane	Hydrocarbon	5.98	-	-

60.185	Tetracosane	Hydrocarbon	12.04	-	-
62.770	Pentacosane	Hydrocarbon	1.86	-	-
65.305	Hexacosane	Hydrocarbon	1.25	-	-
2305	Tricosane	Hydrocarbon	-	1.12	0.26
2405	Tetracosane	Hydrocarbon	-	0.34	-
1187	Naphthalene	Hydrocarbon	-	0.92	-
1292	Safrole	Hydrocarbon	-	0.11	2.27
1362	Eugenol	Monoterpene	-	0.29	18.45
7.432	Cineole<dehydro-1,8->	Monoterpene	0.22	-	-
8.293	α -Terpinene	Monoterpene	1.32	-	-
9.770	γ -Terpinene	Monoterpene	1.32	-	-
10.779	Terpinolene	Monoterpene	0.54	-	-
8.712	Sylvestrene	Monoterpene	0.56	-	-
11.346	Linalol	Monoterpene	0.49	-	-
13.389	Limonene oxide<cis->	Monoterpene	0.31	-	-
14.817	Thujone<trans->	Monoterpene	0.7	-	-
15.309	α -Terpineol	Monoterpene	0.94	-	-
16.490	Verbenyl acetate<trans->	Monoterpene	0.58	-	-
19.321	Cymen-8-ol <para->	Monoterpene	0.21	-	-
1380	α -Copaene	Sesquiterpene	-	-	0.31
1425	(E)-Caryophyllene	Sesquiterpene	-	-	0.37
1440	(Z)- β -Farnesene	Sesquiterpene	-	-	0.07
1461	(E)-β-Farnesene	Sesquiterpene	-	5.15	0.31
1444	β -Dihydroionone	Sesquiterpene	-	0.08	-
1448	Sesquisabinene	Sesquiterpene	-	0.2	-
1484	γ -Curcumene	Sesquiterpene	-	0.49	-
1487	α -Curcumene	Sesquiterpene	-	0.24	-
1517	β -Curcumene	Sesquiterpene	-	0.61	-
1528	β -Sesquiphellandrene	Sesquiterpene	-	4.72	-
1565	(E)-Nerolidol	Sesquiterpene	-	0.89	-
1630	Hinesol	Sesquiterpene	-	0.15	-
1515	β-Bisabolene	Sesquiterpene	-	39.0	0.5
1615	α -Bisabolol	Sesquiterpene	-	0.4	-
1676	epi- β -Bisabolol	Sesquiterpene	-	0.22	-
1693	epi- α -Bisabolol	Sesquiterpene	-	0.16	-
8.564	Cymene<ortho->	Terpene	0.27	-	-
14.669	Terpinen-4-ol	Terpene	0.92	-	-
1457	Geranylacetone	Terpene	-	0.16	-
1492	(E)- β -Ionone	Terpene	-	0.89	0.33
1500	α -Zingiberene	Terpene	-	0.61	-
1319	N.I.		-	3.84	4.81
1588	*MM=208		-	24.76	-

31.457	RT:31.457	0.13	-	-
39.876	RT:39.876	0.19	-	-
41.181	RT:41.181	0.15	-	-
41.304	RT:41.304	0.25	-	-
44.529	RT:44.529	0.41	-	-
48.861	RT:48.861	0.20	-	-
49.034	RT:49.034	0.25	-	-
50.732	RT:50.732	0.93	-	-
50.905	RT:50.905	0.54	-	-
51.618	RT:51.618	0.23	-	-
54.252	RT:54.252	0.24	-	-
56.837	RT:56.837	0.42	-	-
57.576	RT:57.576	0.32	-	-
59.348	RT:59.348	0.06	-	-
59.693	RT:59.693	0.61	-	-
60.628	RT:60.628	0.13	-	-
61.490	RT:61.490	0.35	-	-
61.711	RT:61.711	0.72	-	-
63.951	RT:63.951	0.14	-	-
64.591	RT:64.591	0.30	-	-
64.690	RT:64.690	0.08	-	-
65.084	RT:65.084	0.18	-	-

Fig. 1

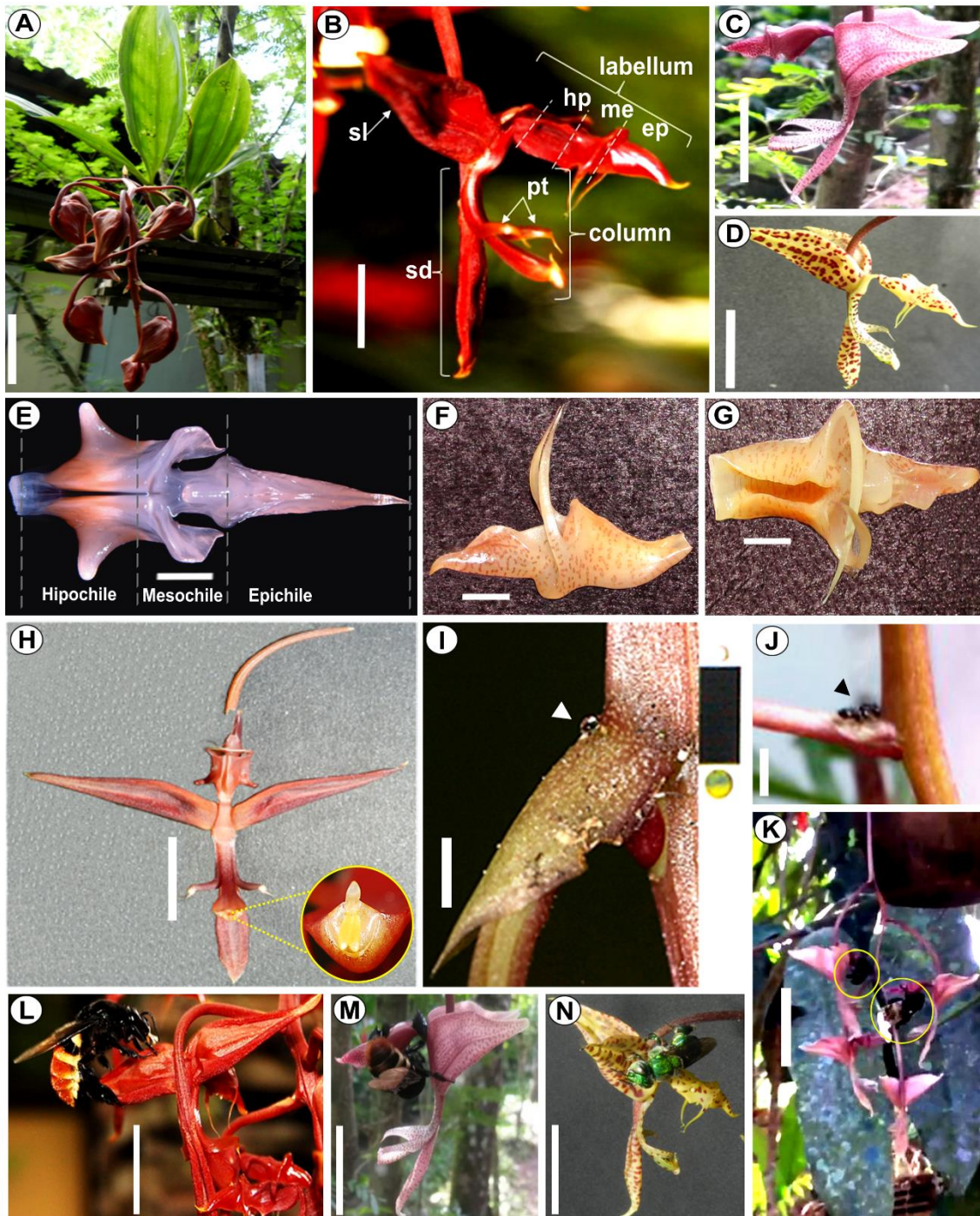


Fig. 2

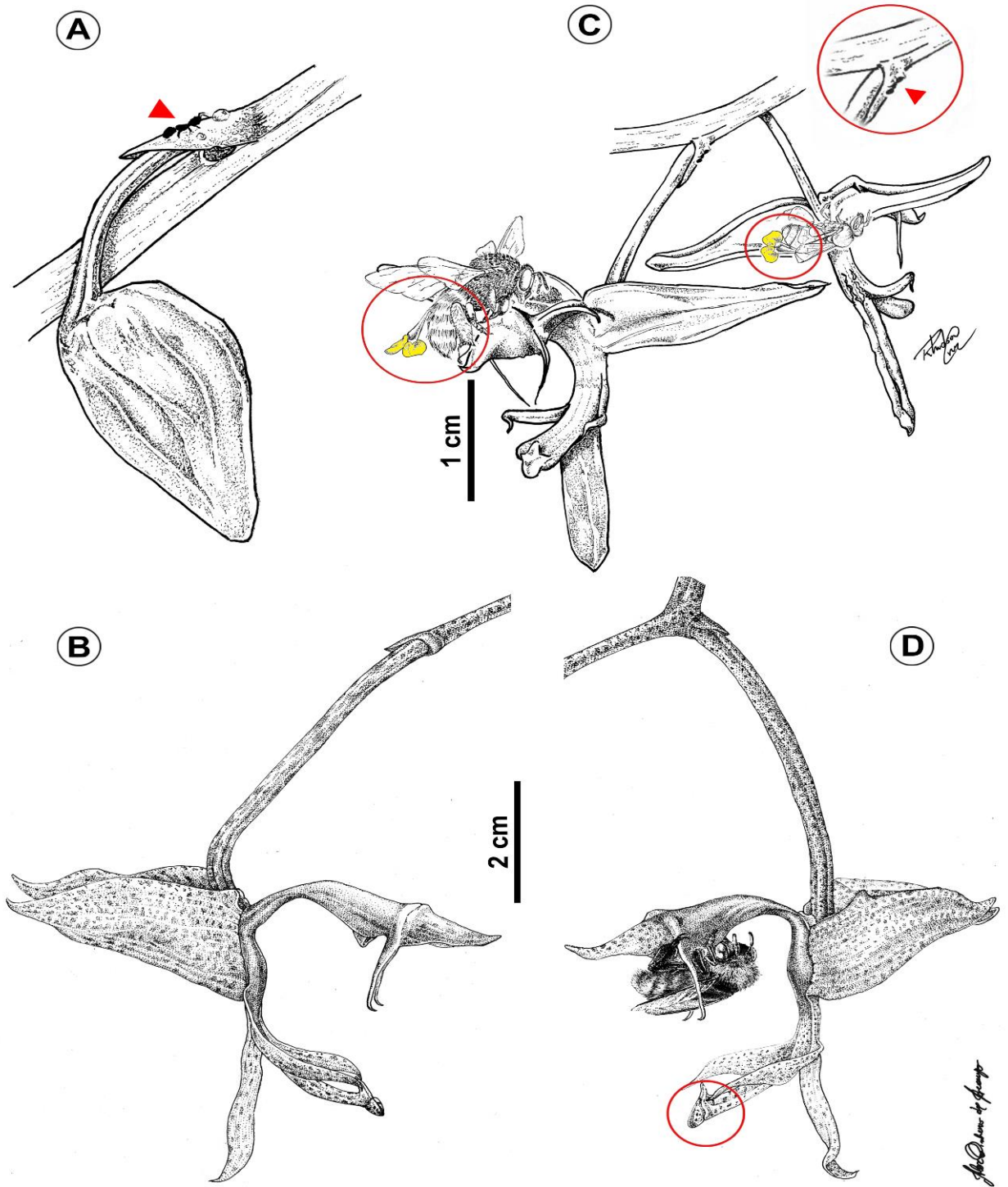


Fig. 3

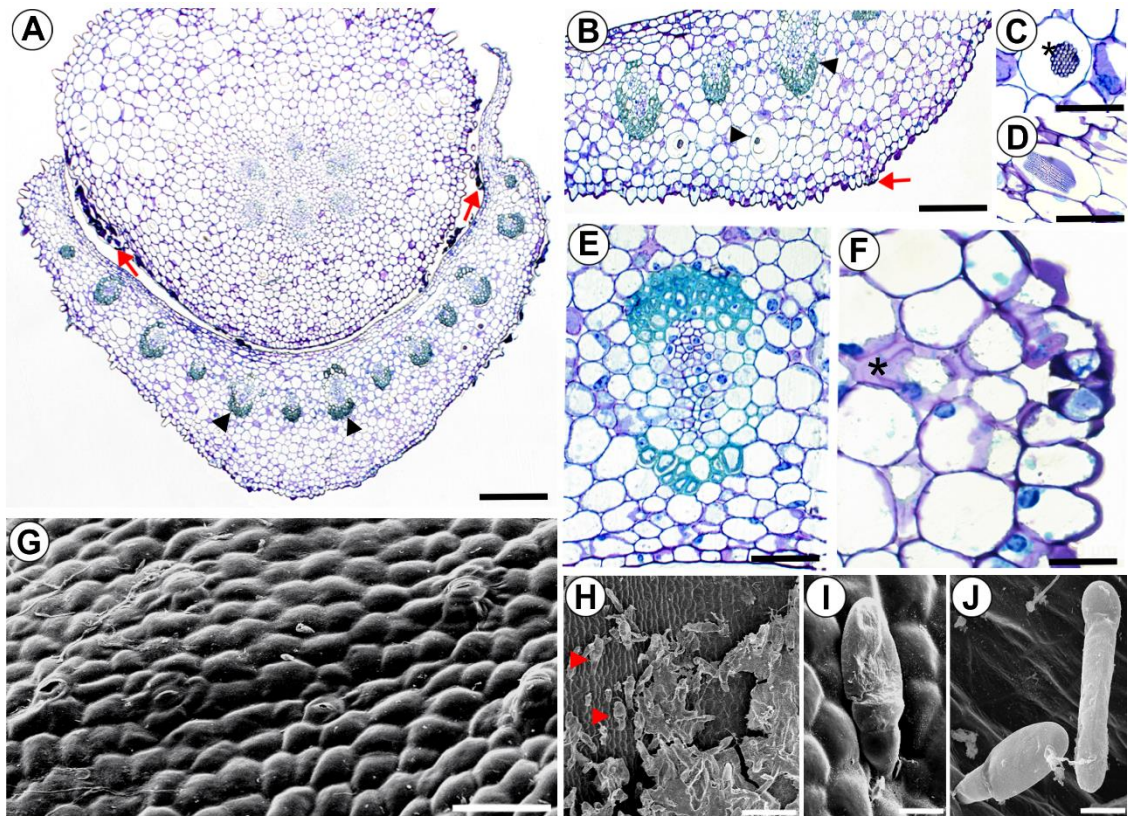


Fig. 4

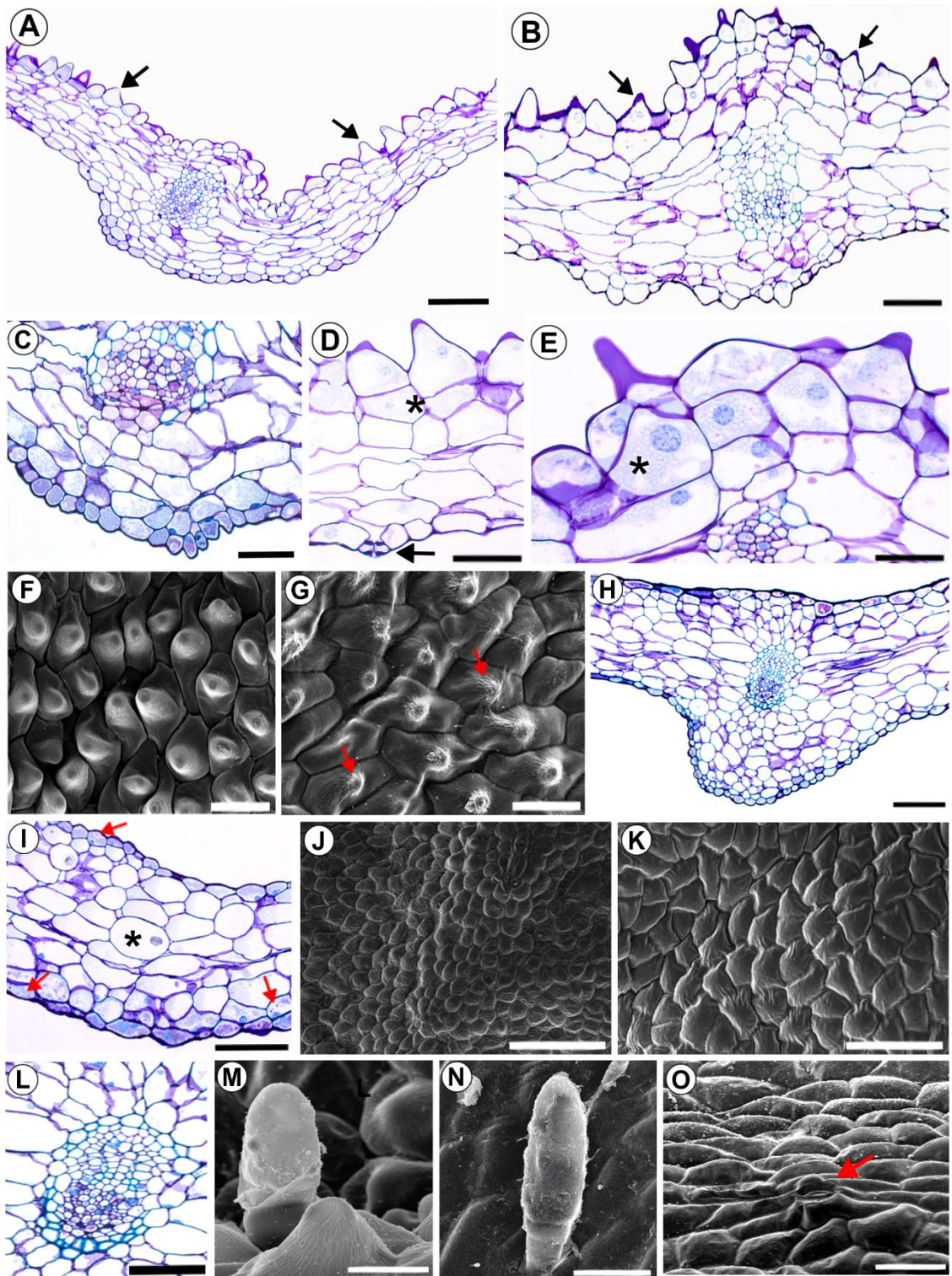


Fig. 5

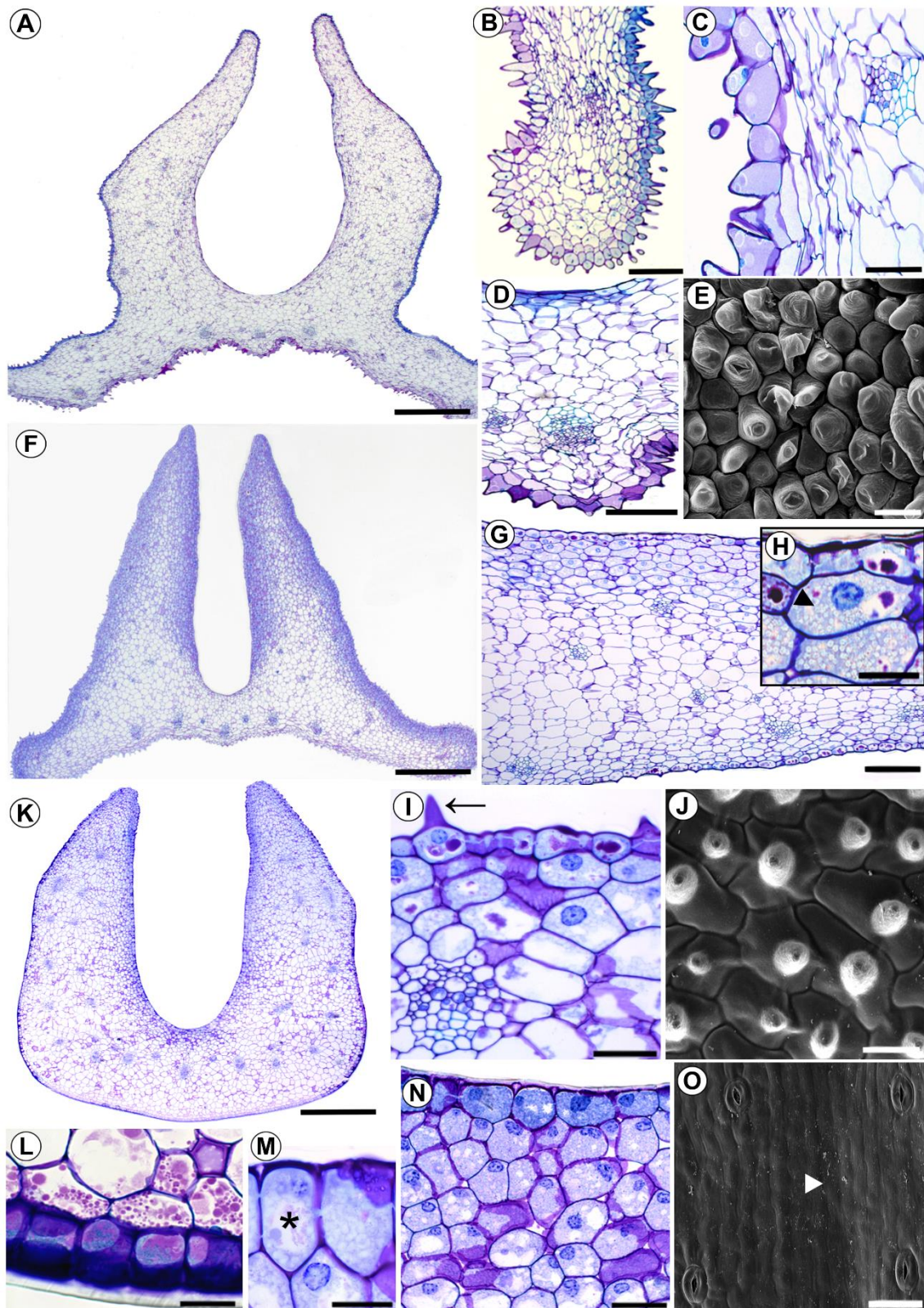


Fig. 6

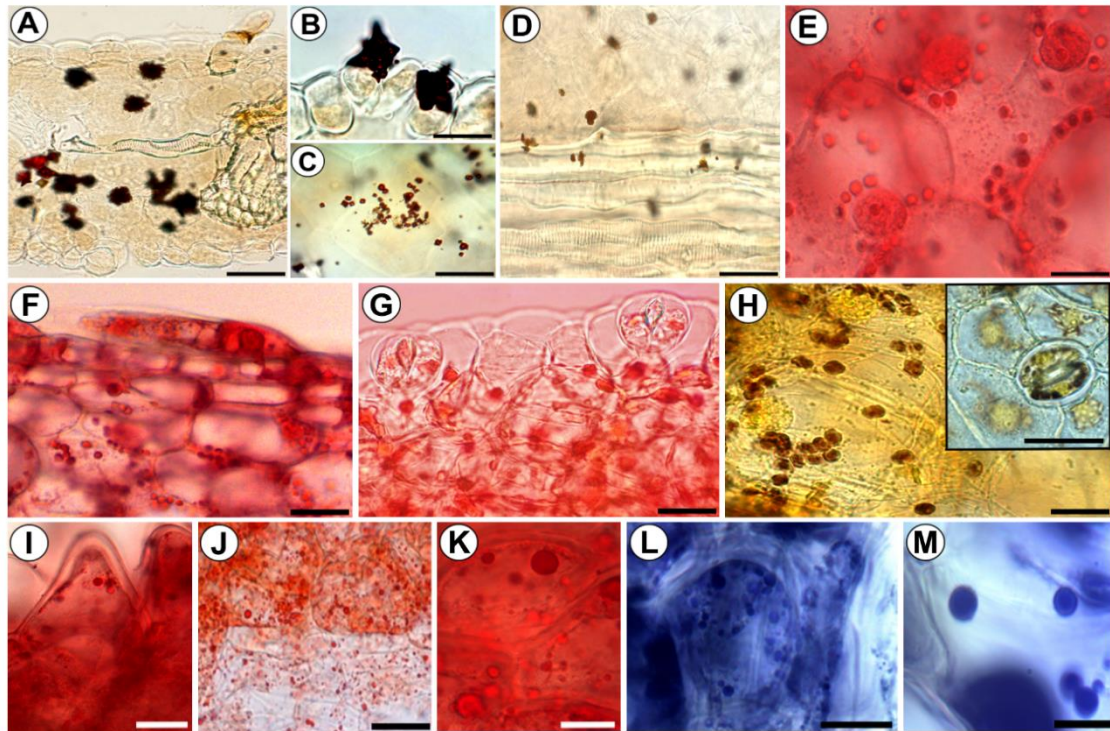


Fig. 7

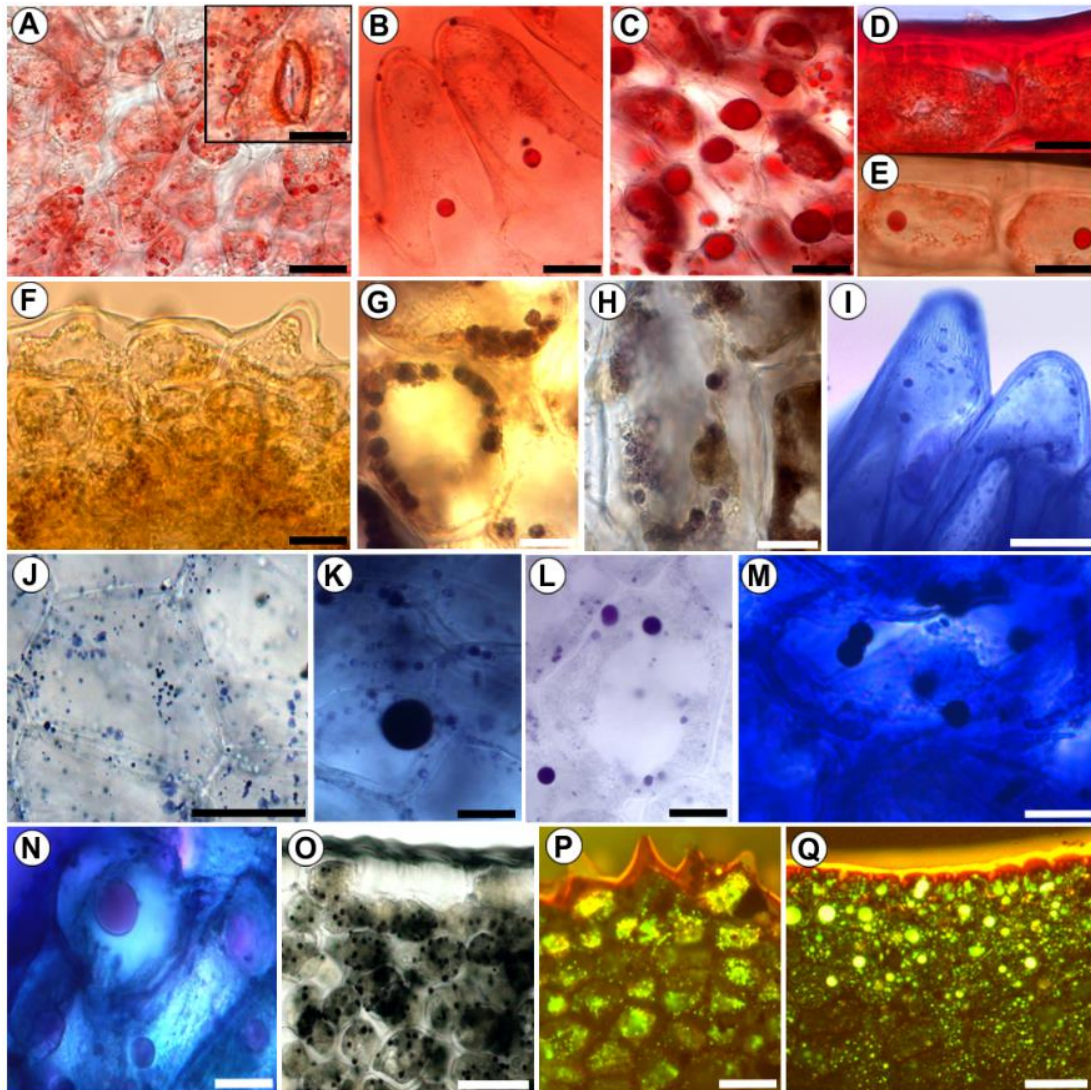
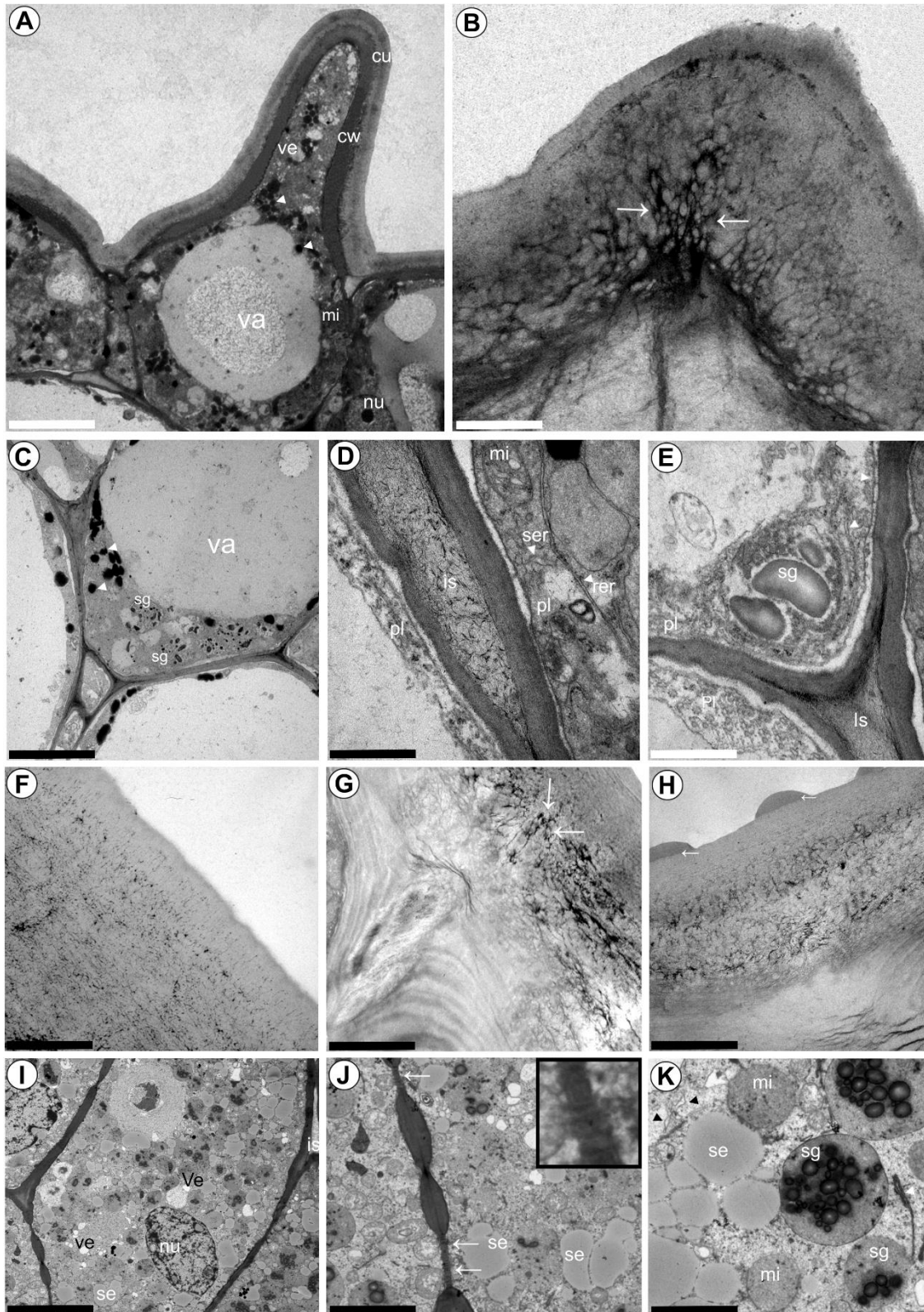


Fig. 8



CAPÍTULO II: *Coryanthes macrantha* (Orchidaceae: Stanhopeinae) e suas estruturas secretoras florais e extraflorais: uma abordagem anatômica e fitoquímica

Jorgeane Valéria Casique Tavares ^{* 1}, Alexandra Antunes Mastroberti ^{* 1}.

¹ Programa de Pós-graduação em Botânica, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil

* Manuscrito a ser submetido para publicação na Revista Acta Botânica Brasílica.

(*) Autores para correspondência: valerytvares@hotmail.com

RESUMO

Coryanthes é um dos gêneros mais fascinantes de Stanhopeinae (Orchidaceae), pois apresenta um complexo mecanismo de polinização devido as peculiares estruturas de suas flores. Apesar de *Coryanthes macrantha* (Hook.) Hook. ser amplamente estudada, estudos anatômicos de estruturas secretoras citadas nas descrições de morfologia externa associadas à biologia floral são importantes para entender os mecanismos de polinização e seus aspectos ecológicos, os quais merecem atenção, porém de difícil realização devido às dificuldades em encontrar e coletar material fértil na natureza. O objetivo desse estudo foi realizar análises morfoanatômicas detalhadas das estruturas secretoras florais e extraflorais de *Coryanthes macrantha* com o intuito de compreender melhor as estruturas secretoras ocorrentes e contribuir para o conhecimento da sua biologia floral e/ou processos de polinização e principalmente entender a função ecológica dessas estruturas. As análises revelaram que *C. macrantha* apresenta os osmóforos epidérmicos com papilas unicelulares que foram forrageados pelas abelhas macho *Eulaema*, nectários florais nas sépalas e os extraflorais nas brácteas, em ambos o néctar é exsudado pelos estômatos. As formigas *Azteca* forragearam os nectários das brácteas e sépalas na pré-antese e pós-antese conferindo proteção a flor. Nosso estudo mostrou o modo de secreção dos osmóforos e dos nectários demonstrando que estes atraem específicos forrageadores. As estruturas secretoras de *Coryanthes macrantha* foram aqui detalhadas anatomicamente pela primeira vez.

Palavras chaves: osmóforos – elaióforos – nectários – Orquídeas – glândulas secretoras.

ABSTRACT

Coryanthes is one of the most fascinating genera of Stanhopeinae (Orchidaceae), as it has a complex pollination mechanism due to the peculiar structures of its flowers. Although *Coryanthes macrantha* has been widely studied, anatomical studies of secretory structures mentioned in the descriptions of external morphology, regarding to floral biology are important to understand polination processes and its ecological aspects, which deserve attention. However, performing these studies are hard due the difficulties in collecting fertile material in the natural environment. Have not yet been carried out and one of the reasons would be the difficulty in nature. This study aimed to carry out detailed morphoanatomical analyzes of the floral and extrafloral secretory structures of *Coryanthes macrantha* (Hook.) Hook. in order to analyse the secretory structures approaching their floral biology and/or pollination processes and mainly to understand the ecological function of these structures. The analyzes revealed that *C. macranta* presents the epidermal osmophores with unicellular papillae that were foraged by male *Eulaema* bees, floral nectaries in sepals and extrafloral in bracts, in both the nectar is exuded by the stomata. *Azteca* ants foraged nectaries of bracts and sepals in the pre-anthesis and post-anthesis giving protection to the flower. Our study provided how osmophore na nectaries secretion presenting that these structures attract specific foragers. The secretory structures of *Coryanthes macrantha* anatomically are detailed here for the first time.

Keywords: osmophores – elaiophores – nectaries – Orchids – secreting glands.

INTRODUÇÃO

As flores das *Coryanthes* Hook. estão entre as mais fascinantes e interessantes dentre as Orchidaceae. Tal fato se deve principalmente, pelo seu complexo mecanismo de polinização (Gerlach 2003). O gênero pertence à Stanhopeinae e assim como os outros gêneros do grupo, suas flores apresentam o labelo subdividido em: hipoquílio, mesoquílio e epiquílio (Gerlach 2009).

Além do labelo subdividido, as *Coryanthes* podem ser caracterizadas como ervas epífitas, com inflorescências geralmente pendentes, flores carnudas, pesadas e de cores vivas, mas uma característica marcante de *Coryanthes* é a coluna achatada ventralmente com duas glândulas proeminentes (pleuridia), subquadradas a longo falcadas, secretoras de uma substância aquosa (Schnepf *et al.* 1983; Gerlach 2009).

Os osmóforos comumente descritos para as espécies de Stanhopeinae, geralmente estão situados na região do hipoquílio e são os responsáveis por emitir substâncias voláteis como recompensa aos seus polinizadores: as abelhas macho de *Euglossini* (Vogel 1990; Whitten *et al.* 2000; Gerlach 2003). Essas substâncias são coletadas unicamente pelas abelhas através da raspagem dos osmóforos com os tarsos das pernas anteriores e tíbias posteriores, esses compostos não servem para nutrição ou proteção, presumivelmente são utilizados como precursores na síntese de um feromônio sexual (Vogel 1962; van der Cingel 2001; Gerlach 2003; Bembé 2004). Porém o uso desses compostos nas atividades reprodutivas ainda não foi confirmado (Dodson *et al.* 1969; Dressler 1982; Pansarin & Amaral 2009).

Coryanthes apresenta distribuição neotropical e possui cerca de 60 espécies, para o Brasil são citadas 22 espécies e dessas, 18 são registradas para a Amazônia brasileira (Flora do Brasil 2020). E apesar da ampla ocorrência na Amazônica brasileira, estudos

com o gênero ainda são escassos, isso se deve pela dificuldade em coletar os espécimes férteis na natureza, bem como, pela dificuldade em cultivá-las, devido a sua intrínseca relação mutualística com formigas (Engels *et al.* 2017; Gerlach 2011). Nas espécies de *Coryanthes* as parcerias mutualísticas entre formigas e suas plantas são conhecidas, as formigas *Azteca*, *Campanotus* e *Crematogaster*, alimentam-se do néctar oferecido pelos nectários extraflorais e em troca oferecem proteção às plantas contra possíveis invasores/herbívoros (Gerlach 2009; Gerlach 2011).

E apesar de existirem estudos anatômicos envolvendo espécies de *Coryanthes*, esses foram realizados principalmente em órgãos vegetativos, como anatomia foliar de *Coryanthes macrantha* (Hook.) Hook. (Stern & Whitten 1999) e análises em raízes de *Coryanthes speciosa* (Hook.) Hook. e *Coryanthes maculata* Hook. (Pridgeon *et al.* 1983; Porembski & Barthlott 1988). Até o momento, o único estudo realizado em órgãos reprodutivos foi focado nas glândulas e na composição química do exsudato das pleurídias de *Coryanthes speciosa*. Neste estudo, os autores caracterizaram esta estrutura como um hidatódio, sem dizer o tipo a qual pertence, ativo ou passivo (Schnepf *et al.* 1983).

Um estudo recente com enfoque em estruturas secretoras florais e extraflorais em *Stanhopea grandiflora* (Lodd.) Lindl. analisou os osmóforos presentes no labelo (hipoquílio), bem como descreveu novidades para Stanhopeinae, como os nectários das brácteas e sépalas e os coléteres presentes na região do ovário. Além disso foi registrado também, a relação de formigas dos gêneros *Dolichoderus* sp. e *Azteca* sp. na região das brácteas e sépalas desta espécie (Casique *et al.* 2018).

Diante do exposto, este trabalho visou investigar sob os aspectos anatômicos, histoquímicos e fitoquímicos das estruturas secretoras florais e extraflorais de *Coryanthes*

macrantha, com o objetivo de caracterizar suas estruturas, entender a dinâmica e a composição da secreção. Desse modo, pretende-se compreender o papel dessas estruturas nesta espécie, principalmente, fornecer dados sobre suas relações ecológicas com os forrageadores.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

Foram coletadas três flores de um único indivíduo de *Coryanthes macrantha* nos meses de Janeiro a Abril, procedente de Barcarena, localidade do Estado do Pará (Brasil). Após antese (cerca de 7 h da manhã), as flores de *Coryanthes macrantha* foram devidamente identificadas e amostras férteis da mesma foi destinada à confecção de exsicata, a qual encontram-se incorporada ao acervo do Herbário João Murça Pires do Museu Paraense Emílio Goeldi (MG), sob o respectivo voucher MG151349.

Posteriormente alguns indivíduos dos espécimes foram coletados e cultivados em um orquidário privado sob condições abióticas semelhantes ao ambiente natural da espécie e quando possível com parte do formigueiro, com o objetivo de observar novos eventos de floração e potenciais visitantes florais. As flores em pré-antese e em antese foram isolados por uma tela, por cerca de uma hora, detectamos a produção de néctar e confirmamos a ocorrência de glicose na secreção através da glicofita (Glicofita Plus®, Accu-Chek Active_, F. Hoffmann-La Roche Ltd.).

Os órgãos analisados neste estudo foram os em antese: os florais, sépala, labelo e pleurídias (coluna); e extraflorais: apenas as brácteas.

Os insetos forrageiros observados neste estudo, foram coletadas, conservadas em álcool etílico comercial e encaminhadas para identificação pelo especialista Fernando Carvalho, entomólogo do Museu Paraense Emílio Goeldi.

Microscopia de luz

Para as análises anatômicas, o material coletado das brácteas (pré-antese), sépalas (pós-antese), labelo e coluna (pleuridia) foi fixado em glutaraldeído 1%, formaldeído 4% e tampão fosfato de sódio pH 7,2 - 0,1M (McDowell & Trump 1976), sem vácuo, em seguida foram desidratadas em série etílica ascendente (10%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e incluídas em hidroxietilmetacrilato (historresina Leica®; Gerrits & Smid 1983). Cortes seriados transversais e longitudinais foram realizados em micrótomo de rotação, 3 µm de espessura; posteriormente corados em azul de toluidina (C.I. 52040) em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,7 (O'Brien *et al.* 1964). As lâminas permanentes foram montadas em bálsamo do Canadá e observadas em microscópio óptico em campo claro.

Histoquímica

Foram feitos cortes à mão livre do material fresco do labelo (hipoquílio), sépalas e brácteas para os seguintes testes histoquímicos: O reagente Lugol foi usado para a detecção de amido (Johansen 1940); O reagente Fehling foi utilizado para açúcares redutores (produto liberado pela ação de enzimas como a celulase, por exemplo) (Sass 1951); Sudan III para lipídios (Johansen 1940); vermelho neutro sob fluorescência para lipídios totais (Kirk-Junior 1970); Cloreto férrico 10% para compostos fenólicos (Johansen 1940); Vermelho de Rutênio para mucilagens ácidas e pectinas (Gregory & Baas 1989); Azul de Alcão para mucilagens ácidas e pectinas (Pearse 1985); Sulfato de azul do Nilo para lipídios ácidos e neutros (Caim 1947); NADI para óleos essenciais e

resinas (David & Carde 1964); e Xylidine Ponceau para proteínas totais (Vidal 1970). Amostras sem tratamento (branco) foram analisadas e testes de controle negativo também foram realizados. Os controles negativos foram realizados nos testes para detecção de lipídios (Sudan III, Sudan IV, NADI reagente, sulfato de azul do Nilo), tratando as seções em uma solução de metanol / clorofórmio / H₂O / HCl (66: 33: 4: 1) durante 72h à temperatura ambiente antes de realizar o teste. As análises e fotomicrografias foram realizadas em microscópio de campo claro (Leica DMR) em todos os testes, exceto no vermelho neutro, observado com epifluorescência (filtro de excitação 450-490 nm). Todas as imagens foram tiradas com uma câmera digital (AxioCam HRc Zeiss) acoplada à microscopia e o programa ZEN Light 2012 foi utilizado para captura de imagens.

Fitoquímica

Amostras do labelo (hipoquílio) foram submetidas a microhidrodestilação-extração simultânea (SDE) por 3 horas usando um sistema Chrompack, e pentano (2 mL) como solvente. A análise do concentrado de flores foi realizada em um sistema CG/EM Finnigan (cromatógrafo de gás Varian 3400; espectrômetro de massas Finnigan INCOS-XL), equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30m x 0,25mm d. i; 0,25 µm de espessura do filme), nas seguintes condições operacionais: programa de temperatura, 60°C – 270°C (3°C/min); temperatura do injetor, 220°C; gás de arraste, hélio numa velocidade linear de 32 cm/s (medido a 100°C); tipo de injeção: splitless (2mL); espectrômetro de massas: impacto eletrônico, 70 eV; temperatura da fonte de íons, 180°C.

Os constituintes voláteis foram identificados através da comparação dos seus espectros de massas e índices de retenção com os de substâncias padrão existentes nas bibliotecas de referências e, com dados da literatura (Jennings & Shibamoto 1980; Adams

2007). Os íons-cromatogramas foram escaneados a partir dos originais obtidos do sistema CG/EM. A análise foi realizada no laboratório de fitoquímica do Museu Paraense Emílio Goeldi.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) o material fixado foi desidratado em série crescente de acetona e secagem através do método do ponto crítico (Gersterberger & Leins 1978), com o uso do equipamento Balzers, CPD 030, Posteriormente, o material foi colocado em suportes de alumínio com fita carbono dupla face, metalização com ouro no aparelho Balzers SCD 050 e análise em microscópio eletrônico de varredura JEOL 6060, no Centro de Microscopia e Microanálises – CMM – da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Amostras dos nectários presentes nas brácteas e sépalas foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,0% em tampão fosfato de sódio pH 7,2 0,1M. Pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato de sódio pH 7,2, 0,1 M. Posteriormente, as amostras foram lavadas no mesmo tampão (duas trocas de 30 min/etapa) e água destilada (duas trocas de 30 min/etapa). O material foi desidratado em soluções de acetona ascendente (10%, 30%, 50%, 70%, 90%, 100%) por 30 min cada etapa e uma última etapa em acetonitrila por 15 min. Para inclusão em resina epóxi o material primeiramente foi submetido a uma solução de acetonitrila pura (0,5mL) colocando a cada 10min gota a gota a uma resina epóxi de baixa viscosidade (Spurr, 1969) até chegar em uma proporção 1:1 permanecendo por 12 h. O material foi transferido para uma solução de resina/acetonitrila numa proporção de 3:1 e posteriormente em resina

pura permanecendo por 12h cada etapa. A inclusão e polimerização foi realizada em cápsulas de gelatina com o material devidamente orientado submetido em estufa à 70oC durante 18h. Estes blocos foram seccionados em ultramicrotomo (Leica ULTRACUT UCT) em navalha de diamante em aproximadamente 70 nm de espessura. Essas seções ultrafinas foram colocadas em “grids” de cobre de 200 mesh e contrastadas em acetato de uranila 2% aquosa e citrato de chumbo (modificado de Hanaichi *et al.* 1986). As imagens foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1200 ExII, no Centro de Microscopia e Microanálise (CMM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RESULTADOS

Aspectos morfológicos e ecológicos

Coryanthes macrantha Hook.

A inflorescência é pendente e lateral (Fig. 1A), nascendo na base do pseudobulbo, carrega de 1-5 flores. Brácteas ovadas. As flores com ovário juntamente com o pedicelo, possuem até 17 cm comprimento, são levemente amareladas, muito perfumadas com máculas avermelhadas. As sépalas são livres entre si, a dorsal é posicionada paralelamente à coluna com ápice totalmente reflexo, as laterais são patentes à coluna com margens fortemente revolutas (Fig. 1B). As pétalas são mais estreitas que as sépalas, têm margens onduladas, quase sempre pendentes em relação ao ovário. O labelo é a estrutura mais proeminente da flor, este é dividido em três segmentos (Fig. 1B): o epiquílio subquadrado, com cavidade profunda em vista lateral, armazena uma solução

aquosa secretada pelos cornos (pleuridia); o mesoquílio que é semitubular, externo e internamente vináceo, carnosos, externamente pubescente na região central; e o hipoquílio que é vermelho-alaranjado, levemente piloso. A coluna é subtubular com ápice alargado com duas pleuridias que secretam um exsudato fluido que é acumulado no epiquílio, uma estrutura semelhante a um “balde” (Fig. 1B). As polínias são duas, amarelas e com o viscidio arredondado.

O forrageamento de formigas (*Azteca* sp.), ocorreu na região das brácteas (Fig. 1C) e sépalas (Fig. 1D–F), tanto em pré-antese quanto pós-antese. A análise da secreção com glicofita *Plus* ($> 25,0$ mmol / L) foi positiva nos nectários das brácteas e sépalas em ambos os estádios (Fig. 1C, F).

A antese ocorreu por volta das 7:00 da manhã, com a simultânea emissão das fragrâncias. Notou-se que cinco minutos depois, a abelha macho Euglossini (*Eulaema* sp.), pousou na região adaxial do hipoquílio, e, em seguida, forrageou na região abaxial onde encontram-se os osmóforos (Fig. 1G–H). Observou-se que a abelha, durante o forrageamento cai no epiquílio (balde) (Fig. 1I), o qual acumula uma substância aquosa secretada pelos cornos (pleuridia). Impedida de voar devido a parede escorregadia do epiquílio, a abelha após alguns segundos encontra a saída localizada na região inferior do epiquílio com o final da coluna (Fig. 1J), onde o viscidio está localizado. E este projeta o polinário no escutelo da abelha (Fig. 1K).

Um esquema simplificado demonstra como ocorre as interações entre as flores de *Coryanthes macrantha* com as formigas e abelhas. As formigas forrageiam a região das sépalas do botão floral e as brácteas das flores (Fig. 2A–C). Cinco minutos da antese há a aproximação das abelhas que realizaram o processo de polinização já descrito acima, mesmo com a presença da formiga (Fig. 2C – passos I, II, III, IV).

Aspectos anatômicos

Brácteas

Identificou-se dois tipos de estruturas secretoras nas brácteas: Nectários e coléteres (Fig. 3A e Fig. 3E).

Os nectários se caracterizam por apresentarem nectestômatos para secreção do néctar localizados na região abaxial (Fig. 3A). Estes estômatos são levemente elevados acima das demais células epidérmicas nesta região (Fig. 3C). Adjacente a esta região da epiderme, localiza-se o parênquima nectarífero. O mesofilo é composto por uma camada de parênquima nectarífero subepidérmico (Fig. 3A, B) e abaixo deste, o parênquima fundamental associado aos feixes vasculares colaterais (Fig. 3A).

Os coléteres apresentam tricomas digitiformes caducos localizados na face abaxial (Fig. 3E–H). Tricomas digitiformes na face adaxial também são observados, porém não são coléteres.

Sépalas

As sépalas em vista transversal, têm a epiderme da face abaxial e adaxial uniestratificada, anisodiamétrica e com cutícula delgada (Fig. 4A). As células da face adaxial têm paredes anticliniais externas sinuosas e as internas retas a suavemente curvas; as células da face abaxial têm paredes pericliniais externas e internas retas a suavemente curvas. O mesofilo apresenta de 1-2 camadas de parênquima nectarífero subepidérmico e aproximadamente 4 camadas de parênquima subnectarífero com células anisodiamétricas e feixes vasculares colaterais. Os estômatos nectaríferos analisados foram os da face adaxial da sépala pós-antese (Fig. 4B–D). Idioblastos com ráfides estão presentes e estão

distribuídos de forma aleatória no parênquima fundamental (Fig. 4E). As sépalas são epiestomáticas e apresentam tricomas digitiformes caducos somente na face adaxial (Fig. 4F–G). Os estômatos, assim como nas brácteas, são levemente elevados acima da epiderme.

Labelo

Na face abaxial do labelo (hipoquílio), encontram-se os osmóforos do tipo epidérmico. Em seção transversal o hipoquílio apresenta células epidérmicas diferentes (Fig. 5A). A epiderme da face adaxial apresenta células de parede periclinal externa alongada com formato escamiforme e com conteúdo celular (Fig. 5B–C). A epiderme da face abaxial, o osmóforo, apresenta células papilosas, unicelulares, levemente enrugadas e de diferentes tamanhos (Fig. 5D–F). No parênquima subjacente, os feixes vasculares são colaterais (Fig. 5G). O epiquílio em seção transversal apresenta células epidérmicas da face adaxial e abaxial semelhantes, levemente arredondadas a achatadas (Fig. 5H). As células da epiderme de ambas as faces apresentam conteúdo mucilaginoso ácido (Fig. 5I–J). O feixe vascular é colateral (Fig. 5I).

Pleurídia

No ápice da coluna estão localizados os dois cornos denominados pleurídias (Fig. 6A). As pleurídias são grandes, retangulares, levemente falcadas e que secretam um líquido viscoso semelhante a mucilagem. A epiderme em vista longitudinal (Fig. 6B) e transversal (Fig. 6C) tem uma superfície uniestratificada, anisodiamétrica, cutícula espessa e um volumoso espaço subcuticular entre as células epidérmicas (Fig. 6D). As células epidérmicas são papilosas, sem a presença de estômatos, com a região cortical com feixes vasculares colaterais distribuídos aleatoriamente.

Histoquímica

A análise histoquímica do nectário da bractéola de *Coryanthes macrantha* revelou os seguintes compostos: monossacarídeos - açúcares redutores (Fig. 7A) e proteínas totais (Fig. 7B). No nectário da sépala: monossacarídeos - açúcares redutores (Fig. 7C) e proteínas totais (Fig. 7D). Na região do labelo (face adaxial e abaxial) - osmóforo (hipoquílio), os testes indicaram: lipídios totais (Fig. 8A–B); amido (Fig. 8C–D); terpenóides - óleos essenciais (Fig. 8E–F); lipídios totais em luz UV (Fig. 9A–B); ácidos graxos (Fig. 9C–D); e lipídios ácidos e neutros (Fig. 9E–F).

Fitoquímica

Os componentes identificados na fragrância floral de *Coryanthes macrantha* (Pa - 175), com percentual superior a 5%, foram: *para*-Anisyl acetato, n-Hexanal, Deca-(2E,4E)-dienal, 2-pentil-Furan, (Z)- β -Farnesene (Table 1).

Microscopia Eletrônica de Transmissão: nectário da bráctea

O nectário da bractéola de *Coryanthes macrantha* analisado em MET foi o coletado um dia antes da antese floral. As células guarda dos estômatos dos nectários caracterizam-se por parede espessadas, núcleo grande e volumoso, nucléolo denso e vacúolos grandes (Fig. 10A), as mesmas características citológicas observadas na microscopia de luz. Entretanto, em MET, foram observados microrganismos eucariontes presentes na secreção do nectar e no espaço da câmara subestomática (Fig. 10B).

As células do parênquima nectarífero apresentam numerosas vesículas, provavelmente provenientes dos dictiossomas e/ou RE (Fig. 10D), mitocôndrias, vacúolo bem desenvolvido e raros cloroplastos (Fig. 10C), além de ribossomos, retículo

endoplasmático rugoso e dictiossomos ativos (Fig. 10D). Não foram observados amiloplastos. Nas proximidades do espaço periplasmático mitocôndrias, retículos endoplasmático rugoso e dictiossomos foram observados (Fig. 10D).

As células do parênquima subnectarífero, o citoplasma apresenta vacúolos bem desenvolvidos, mitocôndrias, dictiossomos, vesículas, abundante retículo endoplasmático rugoso e plastídios contendo pequenos grãos de amido (Fig. 10E–F). Os microrganismos eucariontes foram observados nos grandes espaços intercelulares desta camada de células (Fig. 10E). Plasmodios também foram observados atravessando as paredes entre as células (Fig. 10F).

DISCUSSÃO

Interações ecológicas

As espécies de *Coryanthes* são ervas epífitas que sempre despertaram a curiosidade de grandes naturalistas, como Darwin, principalmente pela peculiar morfologia de suas flores, gotejamento das pleurídias e pelo seu engenhoso mecanismo de polinização (Darwin 1882; Gerlach 2011). *Coryanthes macrantha* cresce nos chamados jardins de formigas. Assim, como outras *Coryanthes*, essa interação simbiótica é comum em formigas dos gêneros *Azteca*, *Campanotus* e *Crematogaster* (Schnepf *et al.* 1983; Gerlach 2009; Gerlach 2011).

A interação simbiótica se estabelece a partir do momento em que as formigas são atraídas pelos nectários extraflorais e florais, acabam por construir os seus ninhos nas matrizes formadas pelo sistema de raízes das *Coryanthes*, fornecem nutrientes e passam a proteger ferozmente a planta contra ataques de herbívoros, principalmente os órgãos jovens vegetativos e reprodutivos, tais como os botões florais (Gerlach 2009; Gerlach 2011). Essa oferta abundante de nutrientes, oriundos de fezes de vertebrados que as

formigas disponibilizam para as plantas, faz com que elas cresçam muito rapidamente. Desse modo, o cultivo dessas plantas em orquidários torna-se difícil ou até mesmo sem sucesso, uma vez que, a interação com esses insetos se torna fundamental para o desenvolvimento e floração do gênero (Dressler 1982; Gerlach 2009; Gerlach 2011).

A interação das formigas *Azteca* com os nectários de *Coryanthes macrantha* também foi observada neste estudo. Essa interação com formigas ocorre em outras espécies de Orchidaceae de forma semelhante, como em *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr., *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb.f. e em espécies de *Cohniella* Pfitzer. As formigas forrageiam os nectários extraflorais sem interferir no comportamento dos polinizadores, protegem as estruturas reprodutivas, auxiliando assim no aumento da probabilidade de sucesso de polinização, bem como, no desenvolvimento da planta (Almeida & Figueiredo 2003; Leitão *et al.* 2014; Kettler *et al.* 2018).

Além dos nectários extraflorais e florais, os osmóforos também estão presentes no hipoquílio da face abaxial do labelo de *Coryanthes macrantha*. Os osmóforos ou glândulas odoríferas são as principais estruturas secretoras de Stanhopeinae (Vogel 1962; Vogel 1990; Curry *et al.* 1991; Antón *et al.* 2012; Casique *et al.* 2018). Estas estruturas são as responsáveis por oferecer os compostos voláteis como recompensa para os seus polinizadores exclusivos, ou seja, as abelhas machos Euglossini (Gerlach 2003; Antón *et al.* 2012; Pansarin *et al.* 2014; Adachi *et al.* 2015).

As flores de *Coryanthes macrantha* são tão complexas quanto as flores de *Gongora* Ruiz & Pav. e *Stanhopea* Frost ex Hook. (Dodson *et al.* 1969; Gerlach & Schill 1989). Essa complexidade está relacionada a morfologia do labelo desses gêneros de Stanhopeinae, que apresentam processos de polinização considerados como os mais engenhosos do reino Plantae (Dodson *et al.* 1969; Dressler 1993). As abelhas macho de

Euglossini de tamanhos ideais são atraídas por odores específicos, caem no epiquílio, no qual se encontra cheio de um líquido secretado pelas pleurídias. A abelha sai apenas por um pequeno túnel lateral formado pela base da coluna e o labelo, retirando, assim, o polinário (Nazarov & Gerlach 1997; Gerlach 2011).

Osmóforos e Nectários

Odor e néctar são elementos importantes para manter a relação planta-polinizador (Vogel 1969; Melo *et al.* 2010). O odor floral é o principal responsável por atrair polinizadores à longa distância, enquanto o néctar é uma das principais recompensas florais das plantas (Proctor *et al.* 1996). O perfume floral é produzido pelos osmóforos (glândulas odoríferas) que ocorrem em um grande grupo de plantas, como por exemplo em Araceae, Orchidaceae, Apocynaceae (Asclepiadoideae) e Burmanniaceae (Vogel 1990; Dressler 1993). Nas Orchidaceae os osmóforos são encontrados quase que exclusivamente no labelo (Vogel 1990). Em algumas outras espécies de orquídeas, a fonte do aroma floral pode estar situada nas pontas das pétalas e nos ovários (Esaú 1965; Swanson 1980; Silveira 2002; Kowalkowska *et al.* 2014).

Os osmóforos, nas flores, têm uma estrutura histológica particular (Vogel 1990). Assim, a superfície epidérmica dos osmóforos pode ter características morfológicas diferentes, isto é, glabras com células secretoras epidérmicas simplesmente cúbicas (Vogel 1990; Curry *et al.* 1991; Kettler *et al.* 2018; Tölke *et al.* 2019) ou podem apresentar papilas e/ou tricomas multi ou unicelulares (Curry *et al.* 1991; Davies & Turner 2004; Naczki *et al.* 2018). Além disso, os osmóforos podem apresentar epiderme com cutícula estriada a lisa e ainda apresentar células de parênquima secretor subepidérmico (Vogel 1990; Tölke *et al.* 2019).

As características celulares descritas neste estudo para o osmóforo epidérmico de *Coryanthes macrantha* foram semelhantes as já descritas para outras espécies de Stanhopeinae, como *Gongora bufonia* Lindl., *Stanhopea grandiflora* Lindl., *Stanhopea graveolens* Lindley, *Stanhopea oculata* (G. Lodd.) Lindl., *Stanhopea wardii* G. Lodd. ex Lindl., *Sievekingia* Rchb.f. e *Cirrhaea* Lindl. (Stern *et al.* 1987; Curry *et al.* 1991; Antoñ *et al.* 2012; Pansarin *et al.* 2014; Adachi *et al.* 2015; Casique *et al.* 2018), os quais se caracterizam por apresentar osmóforos epidérmicos glabros.

Os nectários são glândulas especializadas do tecido vegetal que secretam néctar, sendo os principais componentes, os monossacarídeos, dissacarídeos, proteínas, aminoácidos, água e outros compostos (Fahn 1979; Elias 1983; Endress 1994). Podem ocorrer em diversas famílias de Angiospermas, de Gimnospermas e em certas espécies de samambaias (Endress 1994; Pacini *et al.* 2003). A principal função relacionada aos nectários é a de atração de visitantes, tanto de polinizadores (nectários nupciais), como de defensores (nectários extranupciais), como as formigas (Nicolson & Pacini 2007; Heil 2011). Estudos recentes demonstraram também que o nectário possui a função de defesa contra invasão microbiana, devido a presença de proteínas no néctar (Park & Thornburg 2009; Harper *et al.* 2010; Zhou *et al.* 2016).

Os nectários extraflorais de *Coryanthes macrantha* foram observados nas brácteas e esses são comumente associados a defesa da planta, pois atraem predadores invertebrados, geralmente formigas, cuja presença e atividade podem reduzir a herbivoria (Heil & McKey 2003; Bronstein *et al.* 2006; Gerlach 2011).

Os nectários podem variar quanto a localização e morfologia, mas apresentam características anatômicas semelhantes (Tölke *et al.* 2019). Consistem em uma epiderme nectarífera, com ou sem tricomas e estômatos envolvidos na secreção, composta de um parênquima nectarífero e um parênquima subnectarífero (Fahn 1988; Nepi 2007;

Escalante-Pérez & Heil 2012). Os nectários podem ainda estar conectados ao floema, ao xilema, aos dois ou não ter conexão vascular direta (Fahn 1988). O néctar da bráctea e da sépala de *Coryanthes macrantha* é exsudado através de estômatos. Os estômatos envolvidos na secreção de néctar algumas vezes são citados na literatura como “nectarostômatos” (Smets & Cresens 1988) e quando o néctar é exsudado por nectarestômatos, estes podem permanecer permanentemente abertos (Heil 2011).

Em Orchidaceae a exsudação de néctar por nectarestômatos é comum em *Maxillaria anceps* Ames & C. Schweinf. (Davies *et al.* 2005), em *Disa* P.J. Bergius. (Johnson *et al.* 1998, 2013; Hobbhahn *et al.* 2013) e em espécies de *Cohniella* (Kettler *et al.* 2019). Quanto a análise ultraestrutural do parênquima nectarífero das brácteas de *Coryanthes macrantha*, estas apresentaram características teciduais semelhantes às de outras espécies de orquídeas, como por exemplo, um citoplasma denso, numerosas mitocôndrias, dictiossomos, numerosas vesículas e retículo endoplasmático rugoso, cujas organelas foram relacionadas ao processo de síntese do néctar em orquídeas (Figueiredo & Pais 1992; Stpiczyńska & Matusiewicz 2001; Davies *et al.* 2005; Melo *et al.* 2010; Swiczowska & Kowalkowska 2015), bem como, em outras plantas (Gaffal *et al.* 1998; Vassilyev 2010; Nepi 2007; Tölke *et al.* 2019).

O nectário da bráctea de *Coryanthes macrantha* foi coletado no momento de sua atividade secretora. Dessa forma, em MET foi possível observar que as células do parênquima nectarífero apresentaram um vacúolo altamente desenvolvido. Enquanto a secreção do néctar está ocorrendo, o volume do vacúolo das células do parênquima nectarífero tende a aumentar (Nepi 2007), o citoplasma é denso e rico em ribossomos e mitocôndrias, o retículo endoplasmático rugoso é altamente desenvolvido, os dictiossomos são ativos em função de numerosas vesículas de origem desta organela. Os

plastídios, às vezes contém grãos de amido (Escalante-Pérez & Heil 2012; Tölke *et al.* 2019). Na maioria dos nectários já descritos, durante a fase secretora há um elevado consumo da reserva energética fornecida pelos grãos de amido ao nectário (Nepi 2007; Pacini & Nepi 2007; Stpiczynska *et al.* 2005; Paiva & Machado 2008; Heil 2011). E com o decorrer do processo secretor essa reserva tende a diminuir (Escalante-Pérez & Heil 2012). Possivelmente, por este motivo não foram observados grãos de amido, nestas células do parênquima nectarífero da bráctea de *Coryanthes macrantha*.

Os espaços intercelulares maiores que estão próximos das câmaras subestomáticas, talvez seja uma adaptação anatômica que facilita o transporte do néctar pelo apoplasto de maneira mais eficiente (Nepi 2007; Leitão *et al.* 2014). Quanto ao modo de secreção do nectário das brácteas de *Coryanthes macrantha* podemos caracterizá-la como granulócrina, onde o pre-néctar é transportado em vesículas que se movem possivelmente através de via simplástica, secretados via exocitose, e via apoplástica (Vassilyev 2010; Heil 2011; Abedini *et al.* 2013; Tölke *et al.* 2019).

Os nectários florais e extraflorais presentes nas brácteas e sépalas mencionados para *Coryanthes macrantha* (Gerlach 2011), são aqui confirmados e detalhados anatomicamente pela primeira vez para este gênero.

Foram observados também, idioblastos contendo ráfides observadas nas brácteas e sépalas de *Coryanthes macrantha*, característica esta, comum em folhas de espécies de Stanhopeinae (Stern 2014). Os idioblastos são comuns também em tépalas de outras espécies de orquídeas (Stpiczyńska *et al.* 2003; Kowalkowska & Margońska 2009; Kowalkowska *et al.* 2014), frequentemente acompanhados por células secretoras como nectários, glândulas de resina e elaióforos (Stpiczyńska *et al.* 2011; Davies & Stpiczyńska 2012; Casique *et al.* 2018; Davies & Stpiczyńska 2019), cuja função é associada a defesa

contra herbívoros (Prychid & Rudall 1999). Adicionalmente, estes cristais de cálcio podem estar apenas sendo armazenados, pois estão em excesso no citosol (Paiva & Machado 2008).

Composição química da secreção dos osmóforos do Labelo (Hipoquílio)

O perfume das flores das Orchidaceae é produzido e exsudado pelos osmóforos ou glândulas odoríferas (Vogel 1990; Silva 1992; Adachi *et al.* 2015). Os aromas florais estão intimamente envolvidos na atração de seus polinizadores, as abelhas Euglossini (Dressler 1993; Hetherington-Rauth & Ramírez 2015). Com base nas análises histoquímicas e químicas realizadas neste estudo, o exsudato do labelo (hipoquílio) de *Coryanthes macrantha* pode ser caracterizado como um óleo misto, marcado principalmente pela presença de terpenóides, os quais são característicos de osmóforos e de compostos derivados de ácidos graxos de alto peso molecular. Pode-se inferir que estes óleos auxiliam no "escorregar" da abelha para dentro do epiquílho, mas tal informação deve ser melhor investigada para a confirmação desta hipótese.

Uma variedade de compostos de aromas florais é amplamente conhecida (Endress 1994). E podem ter duas classificações: componentes de cheiros agradáveis, tais como os ésteres metílicos de ácidos graxos, mono e sesquiterpenos (alifáticos e cíclicos), diterpenos, compostos com anéis de benzeno e fenilpropanos; e, por outro lado, componentes de cheiros desagradáveis como os hidrocarbonetos, ácidos graxos e voláteis nitrogenados (amônia, indol, cadaverina, putrescina) (Vogel 1983).

Os aromas das flores em espécies de Stanhopeinae são compostos por monoterpenos, sesquiterpenos e seus derivados, como ésteres, éteres, indol, lactonas, epóxidos e aldeídos, frequentemente na forma de aromáticos (Gerlach 2009).

Em espécies de *Stanhopea*, os compostos monoterpênicos (α -pineno, β -pineno, sabineno, mirceno, limoneno, eucaliptol (1,8-cineol) e ocimenes (Whitten & Williams 1992; Gerlach 2010) são comumente encontrados. Em um estudo recente para *Stanhopea grandiflora* foram identificados também os compostos como hexanal, limoneno, nonanal, eugenol e octadeca - (3Z, 13Z) - acetato de di-1-ilo, estes podem ser os responsáveis pela atração de polinizadores (Casique *et al.* 2018). Comparada com outros gêneros de Stanhopeinae, as fragrâncias florais de *Stanhopea* são menos especializadas quanto os compostos químicos (Gerlach 2009).

As espécies de *Coryanthes* apresentam aromas diferentes e as análises fitoquímicas vem ajudando os taxonomistas a delimitar as espécies, que na natureza são polinizadas pela mesma abelha Euglossini, apesar das variações de cores ou morfologia de suas flores (Gerlach 2011).

Em estudos fitoquímicos anteriores, os componentes voláteis presentes nas flores de *Coryanthes macrantha* foram identificados, além dos alcalóides, sete quimiotipos, um éster, ipsdienol/miristeno B, 2-N-metilaminobenzaldeído, undecatrieno, 1,8-cineol, acimeno, e sesquiterpeno (Gerlach & Schill's 1993). Dentre estes, o composto 2-N-metilaminobenzaldeído é considerado raro no reino vegetal (Gerlach 2009). Na análise fitoquímica deste estudo, este composto raro não foi observado, possivelmente por conta do ambiente ao qual foi coletado e observado.

Em conclusão, as flores de *Coryanthes macrantha* apresentam estruturas secretoras de lipídios e néctar, ou seja, os osmóforos e os nectários florais e extraflorais, sendo os nectários aqui detalhados anatomicamente pela primeira vez. Dada a diversidade dessas estruturas existentes, acredita-se que é importante analisarmos outras espécies de

Coryanthes, bem como, outras Stanhopeinae e Orchidaceae, a fim de acrescentar com outros dados anatômicos que nos permitam entender a evolução floral da família.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade (Sisbio) por fornecer a autorização para coletar; agradecemos a colaboração de Luiz Otávio Adão e João Batista nas coletas de campo e cultivo das Orchidaceae. A JVCT agradece à da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa e pelo apoio a pesquisa; ao Museu Paraense Emílio Goeldi e a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente aos Laboratórios de Anatomia Vegetal (LAVeg) de ambos; e ao Centro de Microscopia e Microanálise (CMM), pelo apoio prestado para a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDINI M, MOVAFEGHI A, ALIASGHARPOUR M, DADPOUR MR. 2013. Anatomy and ultrastructure of the floral nectary in *Peganum harmala* L. (Nitrariaceae). *Plant Species Biology* 28: 185–192.
- ADACHI S, MACHADO S, GUIMARÃES E. 2015. Structural and ultrastructural characterization of the floral lip in *Gongora bufonia* Lindl. (Orchidaceae): understanding the slip-and-fall pollination mechanism. *Botany* 93: 759–768.

ADAMS P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry, 4th Ed. Illinois, Allured Publishing Corporation Allured Publishing.

ALMEIDA AM, FIGUEIREDO RA. 2003. Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. *Brazilian Journal of Biology* 63: 551-558.

ANTÓN S, KAMIŃSKA M, STPICZYŃSKA M. 2012. Comparative structure of the osmophores in the flower of *Stanhopea graveolens* Lindley and *Cycnoches chlorochilon* Klotzsch (ORCHIDACEAE). *Acta agrobotanica* 65: 11–22.

BEMBÉ B. 2004. Functional morphology in male euglossine bees their ability to spray fragrances (Hymenoptera, Apidae, Euglossini). *Apidologie* 35: 283-291.

BRONSTEIN JL, ALARCÓN R, GEBER M. 2006. The evolution of plantinsect mutualism. *New Phytologist* 172: 412-428.

CAIN AJ. 1947. The use of Nile blue in the examination of lipids. *Quarternary Journal of Microscopy Science* 88: 383-392.

CASIQUE JV, SILVA EF, ANDRADE EHA, MASTROBERTI AA, AGUIAR-DIAS ACA. 2018. Anatomical analyses of floral and extrafloral secreting structures indicate the presence of nectaries and colleters in *Stanhopea grandiflora* Lindl. *Brazilian Journal of Botany* 41: 725–738.

CURRY KJ, MCDOWELL LM, JUDD WS, STERN WL. 1991. Osmophores, floral features, and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 78: 610–623.

DARWIN CR. 1882. *The various contrivances by which orchids are fertilised by insects*. 2nd ed. Revised 3d thousand. London: John Murray.

DAVID R., CARDE J. P. 1964. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris. Série D* 258: 1338–1340.

DAVIES KL, TURNER MP. 2004. Morphology of Floral Papillae in *Maxillaria Ruiz & Pav.* (Orchidaceae). *Annals of Botany* 93: 75-86.

DAVIES KL, STPICZYŃSKA M. 2012. Comparative labellar anatomy of resin-secreting and putative resin-mimic species of *Maxillaria* s.l. (Orchidaceae: Maxillariinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 170: 405–435.

DAVIES KL, STPICZYŃSKA M. 2019. Comparative anatomy of putative secretory floral structures in the *Camaridium cucullatum* complex and *Nitidobulbon* (Orchidaceae: Maxillariinae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 20: 1–27.

- DAVIES KL, STPICZYNSKA M, GREGG A. 2005. Nectar-secreting floral stomata in *Maxillaria anceps* Ames & C. Schweinf. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 96: 217–227.
- DODSON CH, DRESSLER RL, HILLS HG, ADAMS RM, WILLIAMS NH. 1969. Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science* 164: 1243-1249.
- DRESSLER RL. 1982. Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 373-94.
- DRESSLER R. L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Oregon, Dioscorides press.
- ELIAS T. 1983. The extrafloral nectaries. In : *The biology of nectaries*. Bentley and Elias. New York, Ed. Columbia University Press.
- ENDRESS PK. 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. Cambridge University Press. Pp. 510.
- ENGELS ME, ROCHA LCF, PESSOA EM. 2017. O gênero *Coryanthes* (Orchidaceae-Stanhopeinae) no estado do Mato Grosso, Brasil. *Rodriguésia* 68(2): 489-501.
- ESAU K. 1965. *Plant Anatomy* (2nd ed). New York., John Wiley and Sons, Inc.

ESCALANTE-PÉREZ M, HEIL M. 2012. Nectar Secretion: Its Ecological Context and Physiological Regulation. In: Vivanco JM, Balusˇka F. (eds.) Secretions and Exudates in Biological Systems. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.

FAHN A. 1979. Ultraestrutura of nectaries in relation to néctar secretion. *American Journal of Botany* 57: 977-985.

FAHN A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* 108: 229–258.

FIGUEIREDO AC, PAIS MS. 1992. Ultrastructural aspect f the nectary spur of *Limodorum abortivum* (L.) Sw. Orchidaceae. *Annals of Botany* 70: 325-331.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 12 Nov. 2020.

GAFFAL KP, HEIMLER W, EL-GAMMAL S. 1998. The floral nectary of *Digitalis purpúrea* L., structure and nectar secretion. *Annals of Botany* 81: 251–262.

GERLACH G., SCHILL R. 1989. Fragrance analyses, an aid to taxonomic relationships of the genus *Coryanthes* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 168: 159-165.

GERLACH G, SCHILL R. 1993. Composition of orchid scents attracting euglossine bees. *Botanica Acta* 104: 379-391.

GERLACH G. 2003. La subtribu stanhopeinae: sus notables mecanismos de polinización, la química de sus aromas florales e implicaciones en sistemática y taxonomía. *Lankesteriana* 7: 104-106.

GERLACH G. 2009. *Coryanthes*. In: Pridgeon, A.M.; Cribb, P.J.; Chase, M.W. & Rasmussen, F.N. *Genera Orchidacearum*. Vol. 5. New York Oxford University Press Pp. 407-411.

GERLACH G. 2010. *Coryanthes mystax* und *Coryanthes wenzeliana*: zwei neue *Coryanthes*-Arten aus dem amazonischen Brasilien. *Orchideen Journal* 17: 28-36.

GERLACH G. 2011. The genus *Coryanthes*: a paradigm in ecology. *Lankesteriana* 11(3): 253-264.

GERSTERBERGER P, LEINS P. 1978. Rasterelektronmikroskopische untersuchungen an blütenknospen von *Physalis philadelphica* (Solanaceae). Anwendung einer neuen präparationsmethode. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 91: 381-387.

GREGORY M, BAAS P. 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. *Israel Journal of Botany* 38:125–174.

HANAICHI T, SATO T, IWAMOTO T, MALAVASI-YAMASHIRO J, HOSHINO M, MIZUNO N. 1986. A stable lead by modification of Sato's method. *Journal of Electron Microscopy* 35: 304–306.

HARPER AD, STALNAKER SH, WELLS L, DARVILL A, THORNBURG R, ANDYORK WS. 2010. Interaction of Nectarin 4 with a fungal protein triggers antimicrobial surveillance and defense mechanism in nectar. *Phytochemistry* 71, 1963–1969.

HEIL M, MCKEY D. 2003. Protective ant-plant interactions as model systems in ecological and evolutionary research. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34:425–453.

HEIL M. 2011. Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science* 16: 191–200.

HETHERINGTON-RAUTH M, RAMÍREZ SR. 2015. Evolutionary trends and specialization in the euglossine bee-pollinated orchid genus *Gongora*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 100: 271–299.

HOBBAHN N., JOHNSON S. D., BYTEBIER B., YEUNG E. C., HARDER L. D. 2013. The evolution of floral nectaries in *Disa* (Orchidaceae: Disinae): recapitulation or diversifying innovation?. *Annals of Botany*, 112: 1303-1319.

JENNINGS W, SHIBAMOTO T. 1980. Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. Academic Press, London.

JOHANSEN D. A. 1940. *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill.

JOHNSON SD, LINDER HP, STEINER KE. 1998. Phylogeny and radiation of pollination systems in *Disa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85: 402–411.

Johnson SD, Hobbhahn N, Bytebier B. 2013. Ancestral deceit and labile evolution of nectar production in the African orchid genus *Disa*. *Biology Letters* 9: 20130500.

Kettler BA, Solís SM, Ferrucci MS. 2019. Comparative survey of secretory structures and floral anatomy of *Cohniella cepula* and *Cohniella jonesiana* (Orchidaceae: Oncidiinae). New evidences of nectaries and osmophores in the genus. *Protoplasma* 256: 703–720.

KIRK JR PW. 1970. Neutral red as a lipid fluorochrome. *Stain Technology* 45: 1-4.

KOWALKOWSKA AK, MARGOŃSKA HB. 2009. Diversity of labellar micromorphological structures in selected species of Malaxidinae (Orchidales). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 78:141–150

KOWALKOWSKA A. K., KOZIERADZKA-KISZKURNO M., TURZYN´SKI S. 2014. Morphological, histological and ultrastructural features of osmophores and nectary of *Bulbophyllum wendlandianum* (Kraenzl.) Dammer (B. section *Cirrhopetalum* Lindl., *Bulbophyllinae* Schltr., Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 59: 80-308.

LEITÃO CAE, DOLDER MAH, CORTELAZZO AL. 2014. Anatomy and histochemistry of the nectaries of *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae). *Flora* 209: 233–243.

MCDOWELL EM, TRUMP B. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 100: 405–414.

MELO M. C., BORBA E. L., PAIVA E. A. S. 2010. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution*, 286: 141-151.

NACZK AM, KOWALKOWSKA AK, WIŚNIEWSKA N, HALIŃSKI LP, MAŁGORZATA K, CZERWICKA M. 2018. Floral anatomy, ultrastructure and chemical analysis in *Dactylorhiza incarnata/maculata* complex (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 20: 1–25.

NAZAROV VV, GERLACH G. 1997. The potential seed productivity of orchid flowers and peculiarities of their pollination systems. *Lindleyana* 12(4): 188–204.

NEPI M. 2007. Nectary structure and ultrastructure. In: S.W. Nicolson, M. Nepi, & E. Pacini (Eds.), *Nectaries and nectar* (pp. 129–166). Dordrecht: Springer.

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

PACINI E, NEPI M, VESPRINI JL. 2003. Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution* 238:7-22.

PACINI E, NEPI M. 2007. Nectar production and presentation. In: Nicolson S, Nepi M, Pacini E, editors. Nectaries and nectar. Dordrecht: Springer. pp. 167–214.

PAIVA EAS, MACHADO SR. 2008. The floral nectary of *Hymenaea stigonocarpa* (Fabaceae, Caesalpinioideae): structural aspects during floral development. *Annals of Botany* 101:125–133.

PANSARIN ER, AMARAL MCE. 2009. Reproductive biology and pollination of southeastern Brazilian *Stanhopea Frost ex Hook.* (Orchidaceae). *Flora* 204: 238–249.

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

PARK S, THORNBURG RW. 2009. Biochemistry of nectar proteins. *Journal of Plant Biology* 52, 27–34.

PEARSE AGE. 1985. *Histochemistry: theoretical and applied*, vol 2, 4th ed., Edinburgh, C. Livingstone.

POREMBSKI S, BARTHLOTT W. 1988. Velamen radicum micromorphology and classification of Orchidaceae. *Nordic Journal of Botany* 8(2):117–137.

PRIDGEON AM, STERN WL, BENZING DH. 1983. Tilosomes in roots of Orchidaceae: morphology and systematic occurrence. *American Journal of Botany* 70: 1365-1377.

PROCTOR M, YEO P, LACK A. 1996. *The natural history of pollination*. London, Harper- Collins.

PRYCHID CJ, RUDALL PJ. 1999. Calcium Oxalate Crystals in Monocotyledons: A Review of their Structure and Systematics. *Annals of Botany* 84: 725-739.

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

SCHNEPF E, DEICHGRABER G, BARTHLOTT W. 1983. On the fine structure of the liquid producing floral gland of - the orchid, *Coryanthes speciosa*. *Nordic Journal of Botany* 3: 479-491.

SILVA AG. 1992. Osmóforos: restropectiva dos últimos 20 anos de pesquisa. *Rodriguésia* 42/44: 7-20.

SILVEIRA K. 2002. Adaptive radiation of oil-reward compounds among neotropical orchid species (Oncidiinae). A thesis presented to the graduate school of the university of florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science University of Florida.

SMETS EF, CRESENS EM. 1988. Types of floral nectaries and the concepts 'character' and 'character state' a reconsideration. *Acta Botanica Neerlandica* 37: 121–128.

SPURR AR. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26: 31–43.

STERN WL, WHITTEN WM. 1999. Comparative vegetative anatomy of Stanhopeinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 129(2):87-103.

STERN WL. 2014. *Anatomy of the Monocotyledons. Volume X: Orchidaceae.* Oxford Univ. Press. Oxford. pp: 24-49.

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

STPICZYŃSKA M, MATUSIEWICZ J. 2001. Anatomy and ultrastructure of the spur nectary of *Gymnadenia conopsea* L. (Orchidaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 70: 267-272.

STPICZYŃSKA M, DAVIES KL, GREGG A. 2005. Comparative account of nectary structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 95: 749–756.

STPICZYŃSKA M, DAVIES KL, KAMIŃSKA M. 2011. Comparative anatomy of the nectary spur in selected species of Aeridinae (Orchidaceae). *Annals of Botany* 107: 327–345.

SWANSON E. S.; CUNNINGHAM W. P.; HOLMAN R. T. 1980. Ultrastructure of glandular ovarian trichomes of *Cypripedium calceolus* and *C. reginae* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 67: 784-789.

SWICZKOWSKA E, KOWALKOWSKA AK. 2015. Floral Nectary Anatomy and Ultrastructure in Mycoheterotrophic Plant, *Epipogium aphyllum* Sw. (Orchidaceae). *The Scientific World Journal* 15: 11

TÖLKE ED, CAPELLI NV, PASTORI T, ALENCAR AC, COLE TCH, DEMARCO D. 2019. Diversity of Floral Glands and Their Secretions in Pollinator Attraction. In: Merillon JM., Ramawat K. (eds) *Co-Evolution of Secondary Metabolites. Reference Series in Phytochemistry*. Springer, Cham.

VAN DER CINGEL N. A. 2001. *An atlas of orchid pollination: America, Africa, Asia and Australia*. Rotterdam: A. A. Balkema.

VASSILYEV AE. 2010. On the mechanism of nectar secretion: revisited. *Annals of Botany* 105:349–354.

VIDAL BC. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with xyloidine ponceau 2R. *Annales d'histochimie* 15: 289–296.

VOGEL S. 1962. Das sexuelle Anlockungsprinzip der *Catasetin* und *Stanhopeen*-Blüten und die wahre Funktion ihres sogenannten Futtergewebes. *Österreichische Botanische Zeitschrift* 110: 308-337.

VOGEL S. 1969. Flowers offering fatty oil instead of nectar. Abstracts, Proceedings of the XI International Botanical Congress, Seattle, p. 229.

VOGEL S. 1983. Ecophysiology of zoophilic pollination. In Lange OL, Nobel OS, Osmond CB, Zieger H. (eds.). *Encyclopedia of Plant Physiology*, N. S., 12C, *Physiological Plant Ecology III*, 559-624. Berlin, Springer.

VOGEL S. 1990. History of the *Malpighiaceae* in the Light of Pollination Ecology. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 130-142.

WHITTEN WM. 1985. Variation in floral fragrances and pollinators in the *Gonqora quinguenervis* complex (*Orchidaceae*) in central Panama. A Dissertation Presented to the Graduate School of the University of Florida.

WHITTEN WM, WILLIAMS NH. 1992. Floral fragrances of *Stanhopea* (*Orchidaceae*). *Lindleyana* 7: 130–153.

WHITTEN WM, WILLIAMS NH, CHASE MW. 2000. Subtribal and generic relationship of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. *American Journal of Botany* 87: 1842–1856.

ZHOU Y, LI M, ZHAO F, ZHA H, YANG L, LU Y, WANG G, SHI J, CHEN J. 2016. Floral Nectary Morphology and Proteomic Analysis of Nectar of *Liriodendron tulipifera* Linn. *Frontiers in Plant Science* 7: 826.

List of Tables

Table 1. Analysis of the floral fragrance of *Coryanthes macrantha* (Pa - 175) (%).

Figures

Figure 1. Habit and morphology of *Coryanthes* species. **A.** Habit and pendant inflorescence of *Coryanthes macrantha*. **B.** Morphology of *Coryanthes macrantha*. **C.** Bracteole of *Coryanthes macrantha*, nectaries (arrow). **D–E.** Floral bud of *Coryanthes macrantha*. **D.** Ant foraging next of nectaries (arrow). **E.** Nectaries in veins of floral bud (arrow). **F.** Sepal of *Coryanthes macrantha*, in detail the exudate of the nectaries (arrow). **G.** Presence of bees *Euglossini* in the hipochile of the labellum. **H.** Stunned bees next to the hipochile. **I.** Bee inside of the epichile. **J.** Bee finding the exit of the lower region of the epichile. **K.** Bee coming out of the epichile and removing the pollinator from the base of the column. Scale bars: 2 cm (A, B, D, G–J); 1 cm (C, K); 5 mm (E, F).

Figure 2. Foraging of visitors in *Coryanthes macrantha* (Hook.) Hook. (A–C) Ant *Azteca* sp., in sepals and bracts before and after anthesis (B) Flower in anthesis (C - steps 1-5): 1 and 2 - Landing of the bee *Euglossini* *Eulaema* sp., On the lip (hypochile). The detail shows the bee entering the excavated hypochile and collecting the oil; 3 and 4 - The bee inside the epichile and its exit from the side; 5 - Pollinarian being taken over the scutellum of the bee. Scale bars: 2 cm.

Figure 3. Bracteole of *Coryanthes macrantha*. **A.** Cross-section of bracteole, nectariferous stomata (arrow). **B.** Cristaliferous idioblasts in the mesophyll (*). **C.**

Nectariferous stomata. **D.** Nectariferous stomata on the bracteole surface (SEM). **E–H.** Trichomes digitiform (colleter) on the adaxial surface (**F–G**) Trichomes digitiform (colleter) (SEM). fab: abaxial surface. fad: adaxial surface. Scale bars: 130 μm (D); 100 μm (A); 50 μm (B); 20 μm (E–G); 10 μm (C, H).

Figure 4. Sepal of *Coryanthes macrantha*. **A.** Cross-section of sepal, nectariferous stomata (arrow). **B.** Evident secretion of nectar (arrow), nectar in the sub-stomatal air space. **C.** Mesophyll, nectariferous parenchyma, and subnectary parenchyma. **D.** Fungal colonization which has grown on the nectar (stomata). **E.** Collateral vascular bundle. **F–G.** Digitiform trichome in the adaxial surface. Scale bars: 100 μm (A); 50 μm (E); 40 μm (F); 20 μm (C–G); 10 μm (B, D).

Figure 5. The labellum of *Coryanthes macrantha*. **A.** Cross-section of the labellum (hypochile). **B.** Detail of the epidermal cell with the format of the squama. **C.** The epidermis and your cells with the format of the squama (SEM). **D.** Papillary cells of epidermis on the abaxial surface (SEM). **E–F.** Papillary cells of different sizes. **G.** Collateral vascular bundle. **H.** Cross-section of the labellum (epichile). **I.** The adaxial face of epichile and collateral vascular bundle in the parenchyma. **J.** The abaxial face of epichile. fab: abaxial face. fad: adaxial face. Scale bars: 500 μm (A); 200 μm (H); 100 μm (G); 60 μm (D); 50 μm (B, I–J); 20 μm (C, E–F).

Figure 6. Morphology of pleuridias in *Coryanthes macrantha*. **A.** Secretion drip in the epichile. **B.** Longitudinal section of pleuridia. **C.** Cross-section of pleuridia. **D.** Papillary

cells and parenchyma of pleuridia (SEM). Scale bars: 2 cm (A); 200 μm (D); 100 μm (B–C).

Figure 7. Histochemical analysis of *Coryanthes macrantha* of the median regions of bracts and sepals (cross-section). **A–B.** Bracteole. **C–D.** Sepal. **A–C.** Fehling reagent. **B–D.** Staining with Xylidine revealed the presence of protein bodies in the nectaries. Scale bars: 10 μm (A–D).

Figure 8. Histochemical analysis of the abaxial and adaxial surface of the (hypochile) labellum of *Coryanthes macrantha* (cross-section). **A–B.** Staining with Sudan III in the papillose cells notes the presence of lipid bodies. **C–D.** The distribution of starch grains (Lugol reagent) in the secretory papillos cells and subsecretory parenchyma. **E–F.** Essential oils presence by (NADI reagent). Scale bars: 50 μm (A); 20 μm (B); 10 μm (C–F).

Figure 9. Histochemical analysis of cross-section of the abaxial and adaxial surfaces of the labellum (hypochile) of the *Coryanthes macrantha*. **A–B.** Fresh material of labellum with Neutral red in UV light. **C–D.** Staining bodies with fatty acids (copper acetate/rubeanic acid) in the papillose cells. **E–F.** Bodies of neutral lipids (Nile blue sulfate). Scale bars: 50 μm (A–B, E); 20 μm (C); 10 μm (D, F).

Figure 10. Analysis using Transmission Electron Microscopy (TEM) of nectaries in the bracts of *Coryanthes macrantha*. **A.** Nectarostomata in the abaxial face of the bracts, note the presence of eukaryotic microorganisms in the sub-stomatal chamber. **B.** Microorganism in the secretion of nectar. **C.** Cells of nectary parenchyma with, evident

vacuole, numerous vesicles, mitochondria, and large intercellular spaces. **D.** Rough endoplasmic reticula and dictyosomes have also been observed in these cells of the nectary parenchyma. **E–F.** Cells of subnectary parenchyma containing huge vacuolated, numerous vesicles, mitochondria, rough endoplasmic reticula, plastids, and dictyosomes. **F.** Detail of eukaryotic microorganisms in the intercellular spaces. **F.** Plasmodesmata (arrow) have also been observed in these cells of the subnectary parenchyma. Scale bars: 5 μm (A, C); 2 μm (B, F); 1 μm (D); 0,5 μm (E).

Tabela 1

RI	Composto	Classe química	%
1360	Eugenol	Ácido carboxílico	0.13
1407	methyl-eugenol	Ácido carboxílico	0.88
1422	<i>para</i>-Anisyl acetate	Ácido carboxílico	10.6
2097	Methyl linoleate	Ácido Graxo	0.34
1376	n-Undecanol	Álcool graxo	0.53
798	n-Hexanal	Aldeído	29.45
1104	Nonanal	Aldeído	2.07
1295	Deca-(2E,4Z)-dienal	Aldeído	1.23
1317	Deca-(2E,4E)-dienal	Aldeído	6.33
1256	<i>para</i> -Anisaldehyde	Benzaldeído	3.07
1345	Dihydroisojasmone	Cetona	0.16
1600	1-[2-(Isobutyryloxy)-1-methylethyl]-2,2-dimethylpropyl 2-methylpropanoate	Éster	0.66
1437	Methyl undecanoate	Éster de ácido graxo	0.4
1002	2-pentyl-Furan	Furano	5.66
1471	β -Acoradiene	Hidrocarboneto	0.19
1640	α -Acorenol	Hidrocarboneto	0.56
2099	n-Heneicosane	Hidrocarboneto acíclico	0.17
2311	n-Tricosane	Hidrocarboneto acíclico	0.52
2401	n-Tetracosane	Hidrocarboneto acíclico	0.09
1291	Safrole	Hidrocarboneto aromático	0.31
1418	<i>cis</i> - α -Bergamotene	Hidrocarboneto cíclico	0.23
1439	<i>trans</i> - α -Bergamotene	Hidrocarboneto cíclico	2.65
1392	7-epi- Sesquithujene	Terpeno	2.5
1446	(Z)-β-Farnesene	Terpeno	10.83
1455	Geranyl acetone	Terpeno	0.12
1459	(E)- β -Farnesene	Terpeno	1.01
1482	γ -Curcumene	Terpeno	1.63
1485	α -Curcumene	Terpeno	0.75
1490	(E)- β -Ionone	Terpeno	1.16
1508	(E,E)- α -Farnesene	Terpeno	0.31
1511	β -Bisabolene	Terpeno	0.64
1515	β -Curcumene	Terpeno	3.13

1520	(Z)- γ -Bisabolene	Terpeno	0.15
1527	β -Sesquiphellandrene	Terpeno	0.4
1547	<i>cis</i> -Sesquisabinene hydrate	Terpeno	1.2
1584	<i>trans</i> -Sesquisabinene hydrate	Terpeno	2.2
1612	β -Atlantol	Terpeno	0.32
1676	<i>epi</i> - β -Bisabolol	Terpeno	2.32
1689	α -Bisabolol	Terpeno	0.17

Figura 1

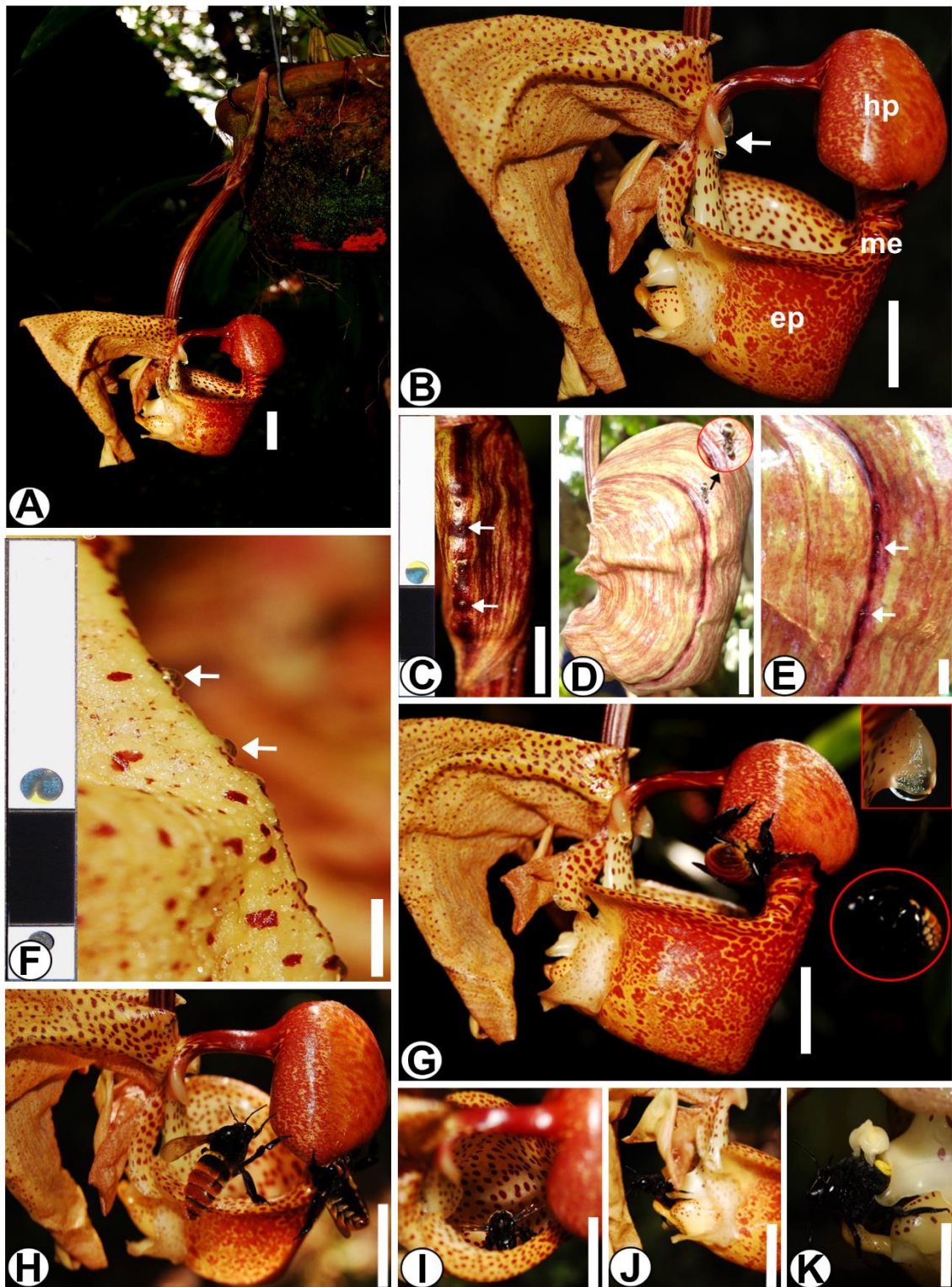


Figura 2

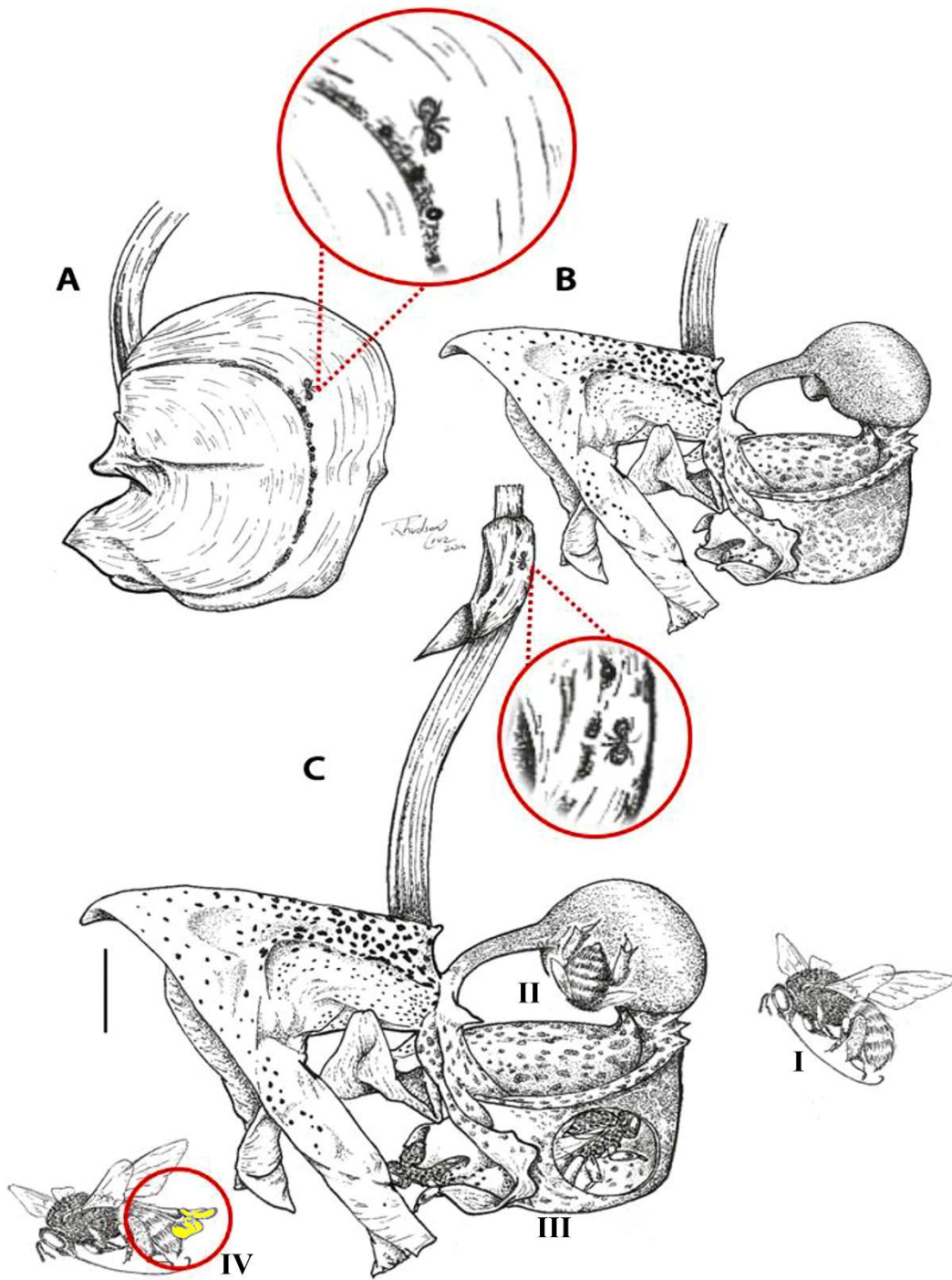


Figura 3

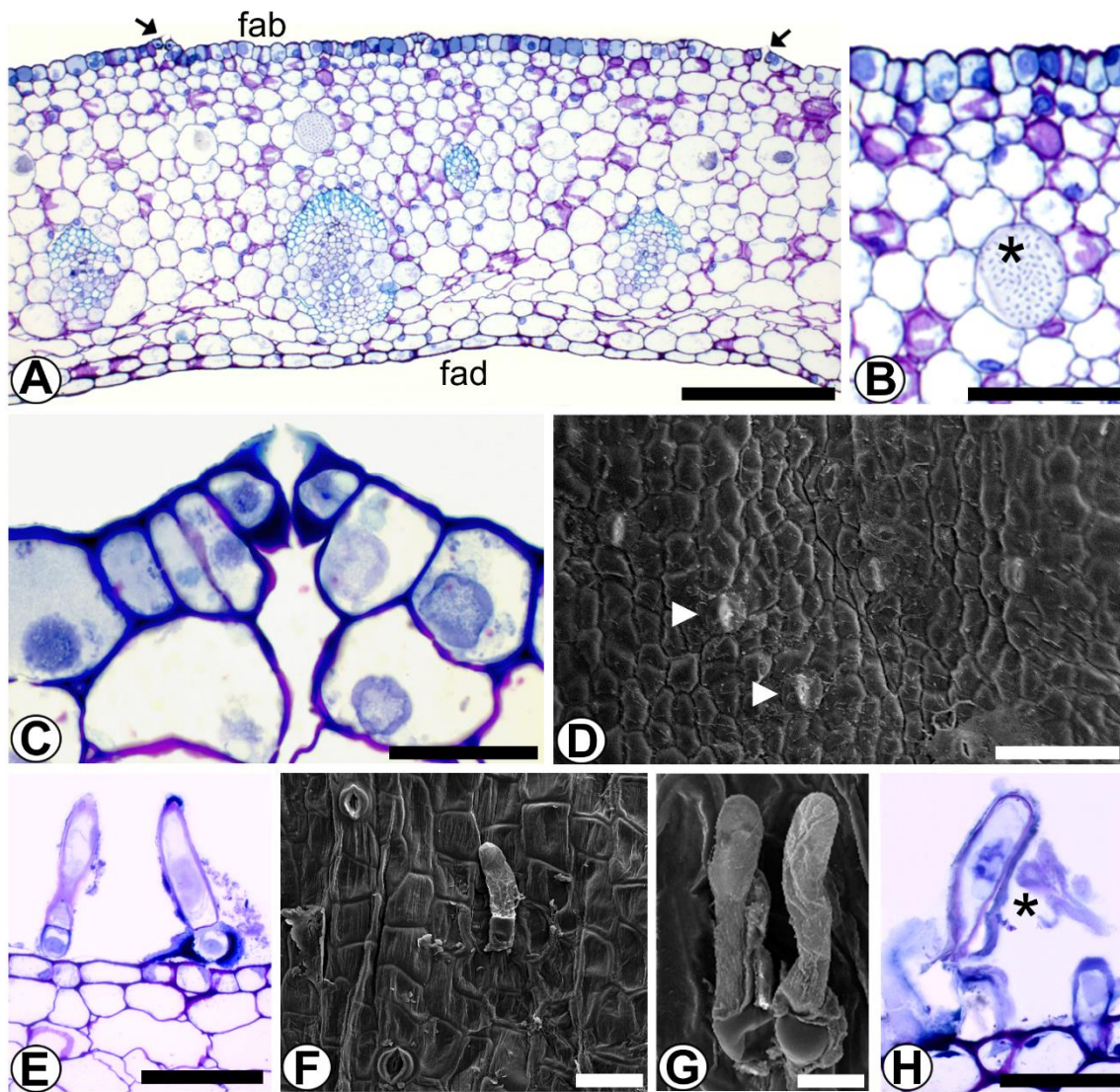


Figura 4

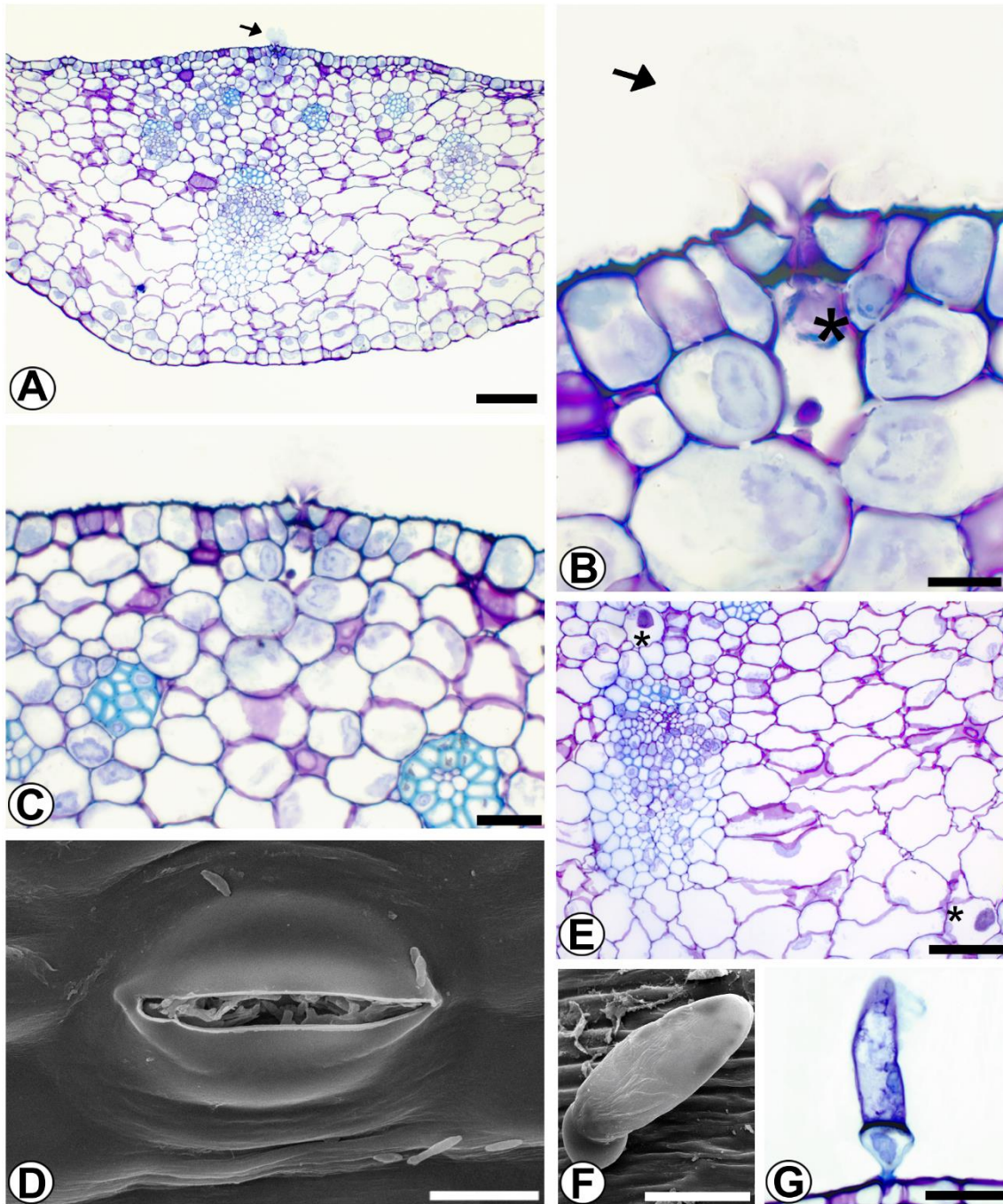


Figura 5

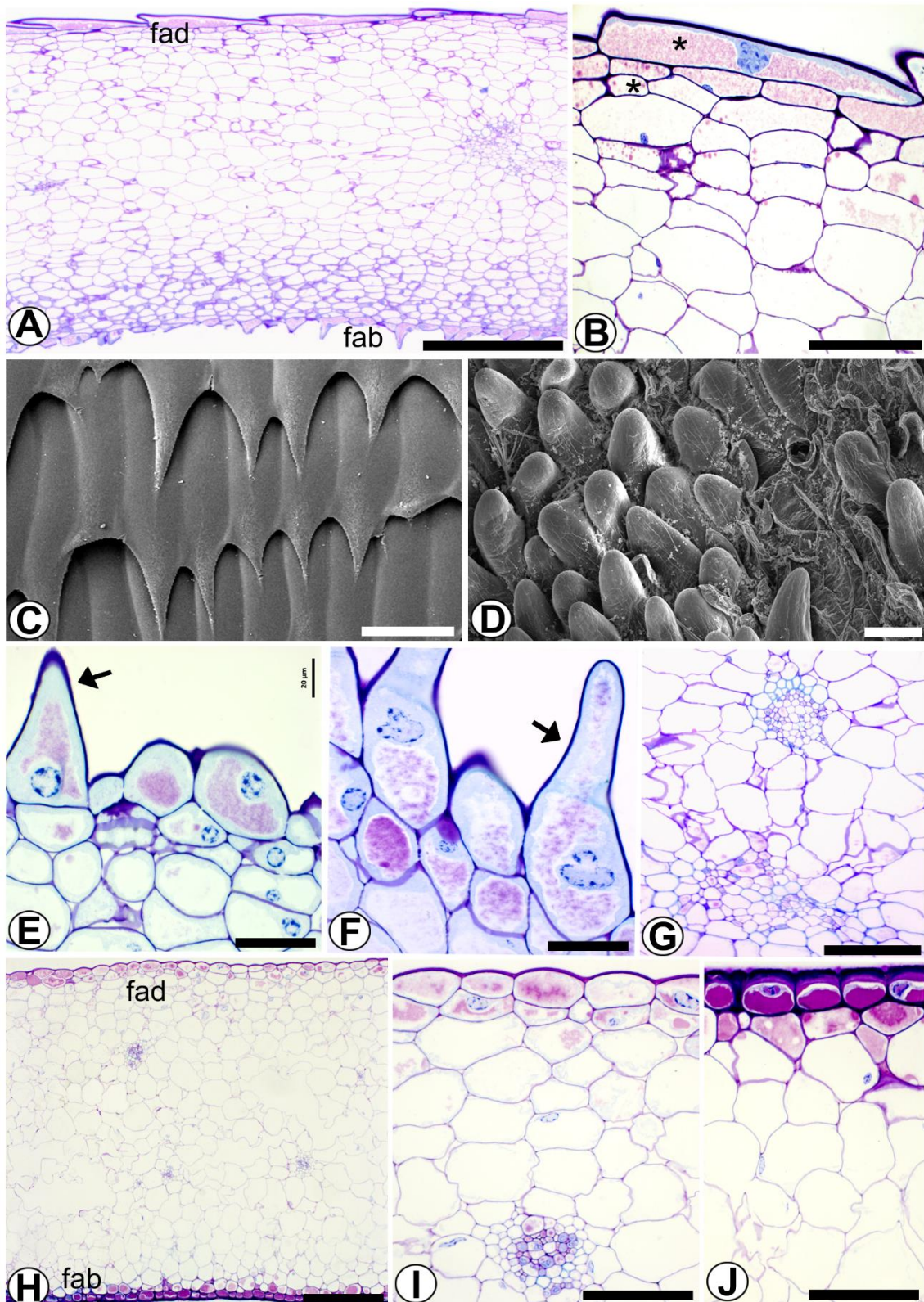


Figura 6

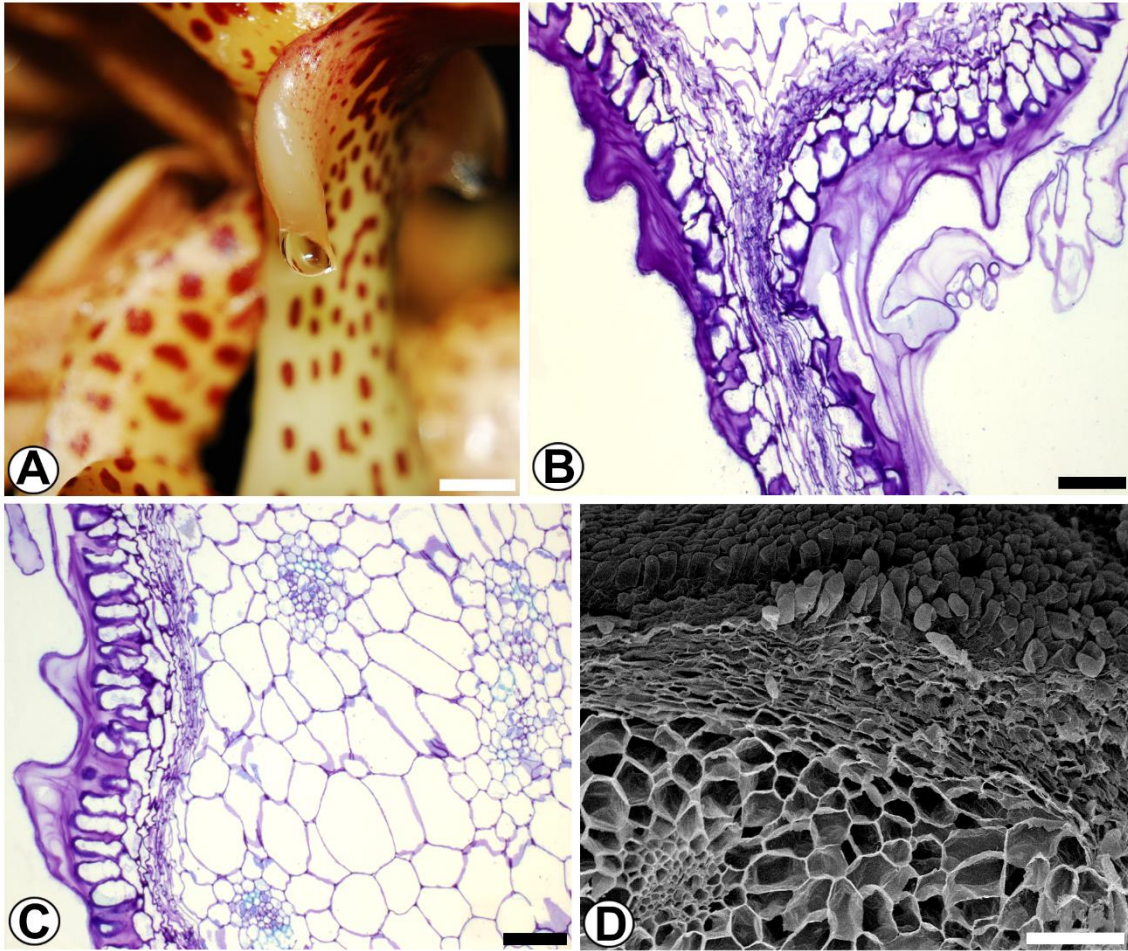


Figura 7

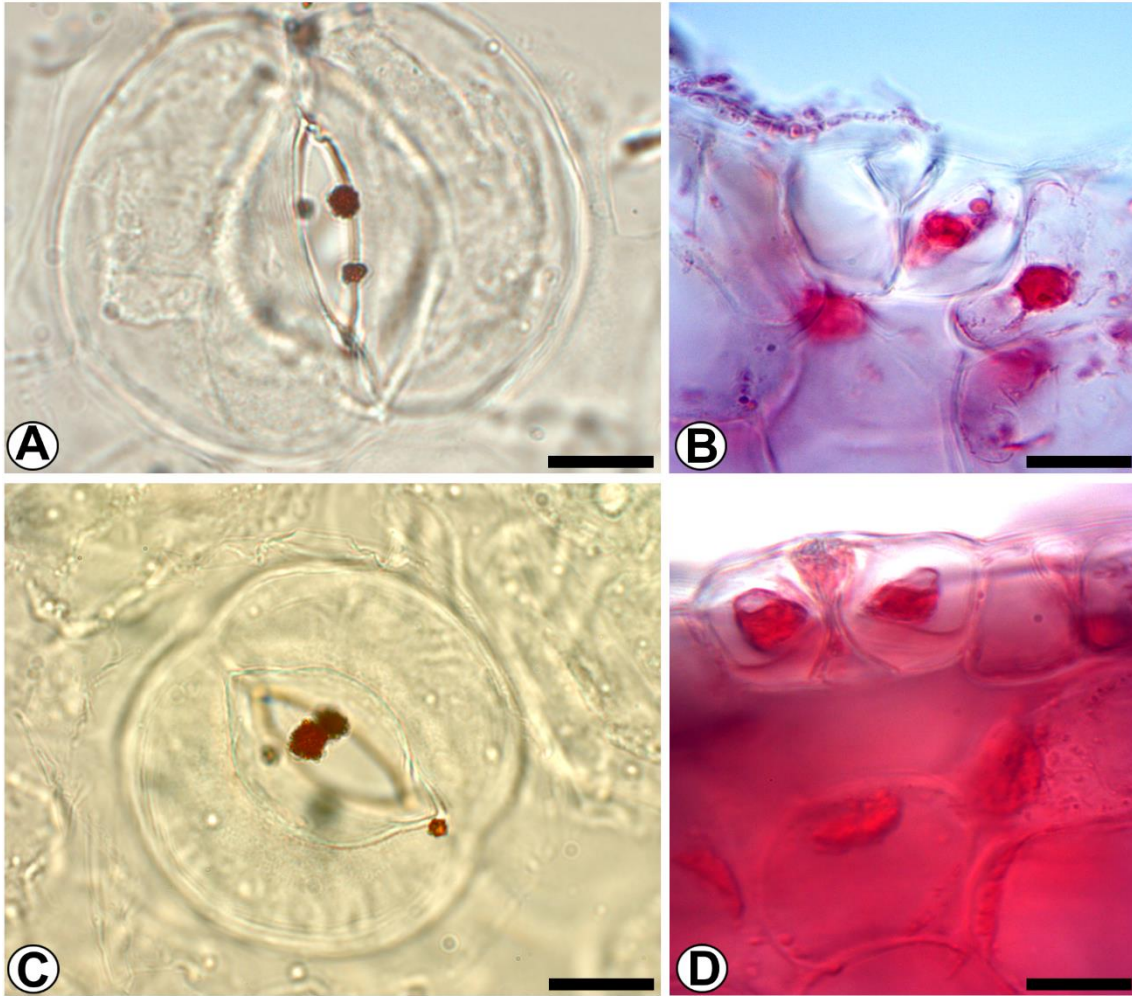


Figura 8

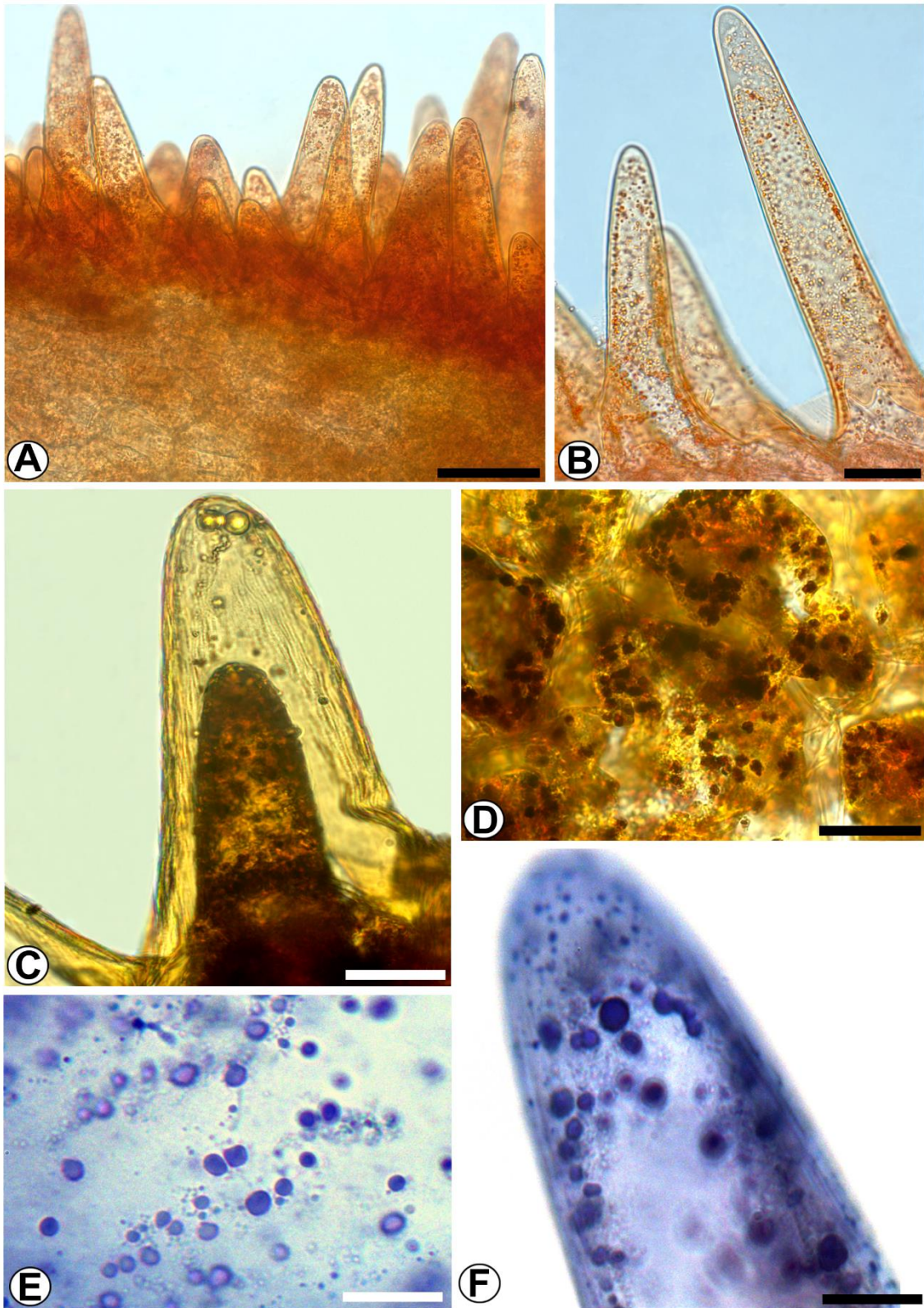


Figura 9

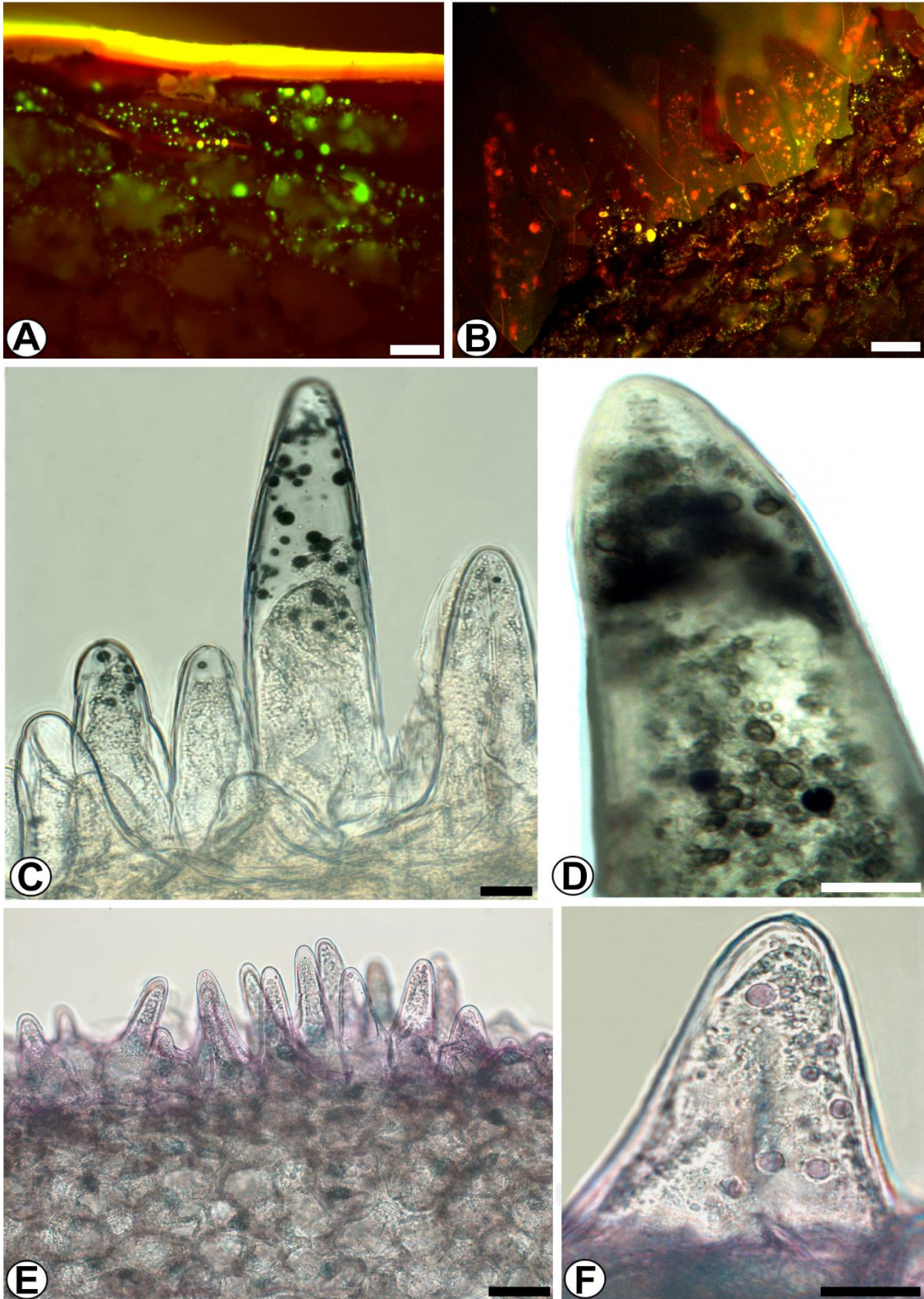
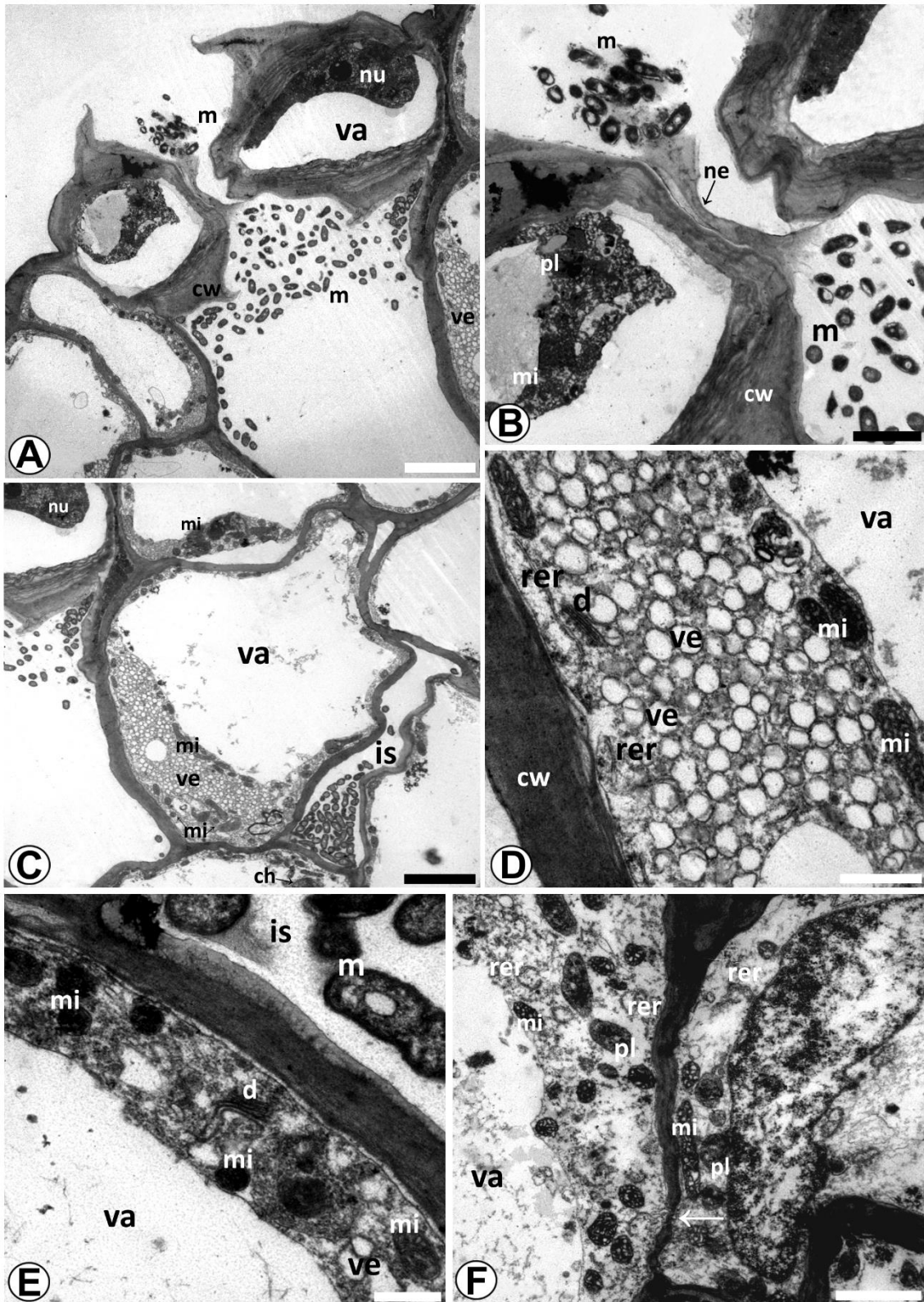


Figura 10



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados alcançados através das análises anatômicas e histoquímicas notou-se que:

- As flores de espécies de Stanhopeinae podem apresentar osmóforos, nectários florais e extraflorais e possivelmente, elaióforos. Sendo que os osmóforos ainda são os que estão diretamente envolvidos na atração e produção dos óleos voláteis como formas de recompensa aos seus polinizadores, as abelhas macho de Euglossini.

- A composição química diferenciada em *Gongora minax* e *Coryanthes macrantha* nos possibilita inferir que estas espécies pode estar sintetizando um óleo mais fixo na tentativa de alcançar outro possível polinizador ou simplesmente facilitar a queda da abelha na coluna de *G. minax* e no epiquilho da *C. macrantha*, regiões onde estão localizados os polinários.

Comprovou-se também que outras espécies de Stanhopeinae oferecem o néctar para formigas como recompensa, concretizando com o referido inseto uma relação simbiótica de proteção, principalmente dos seus órgãos reprodutivos, contra possíveis herbívoros.

Salientamos que, os dados anatômicos apresentados neste estudo mostram como é relevante pesquisar as Stanhopeinae, dadas as dificuldades em coletá-las na Amazônia Brasileira e de cultivá-las sem a presença das formigas. E como outros estudos futuros, de cunho anatômico, histoquímico e fitoquímico, com outras espécies da subtribo, trará uma melhor compreensão dessas e de outras possíveis estruturas secretoras.

Neste estudo também apresentamos como perspectivas futuras:

- O tratamento dos dados preliminares sobre a presença de coléteres (tricomas) na região das bractéolas e ovários que também foram observados nos gêneros *Gongora*, *Coryanthes*, *Braemia* Jenny e *Paphinia* Lindl.

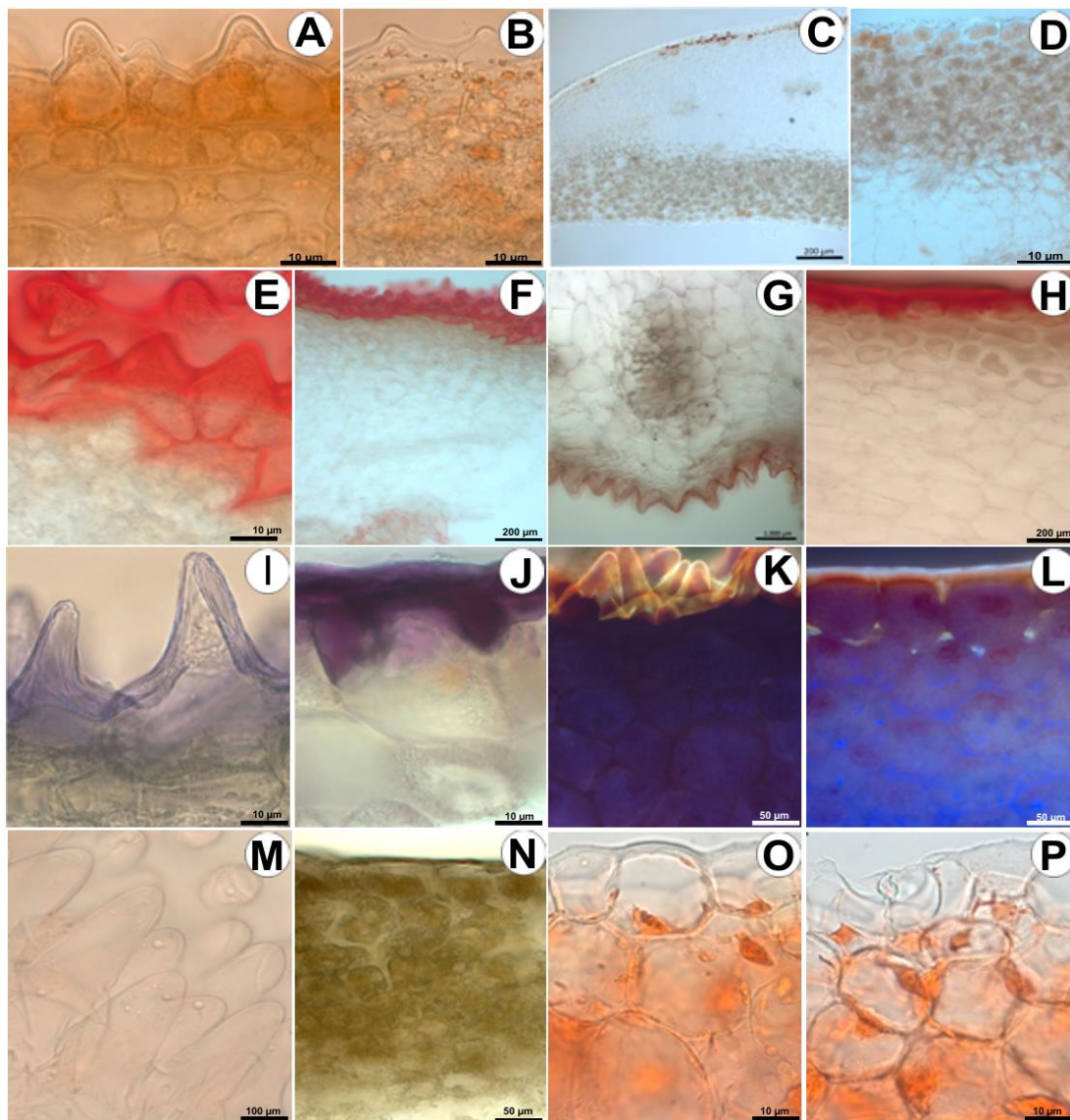
- Análises anatômicas dos nectários florais e extraflorais em espécies de *Paphinia* e *Braemia*.

- E análises detalhadas a respeito da estrutura anatômica e composição química do exsudato das Pleurídias de *Coryanthes macrantha* também estão em andamento.

ANEXOS

Anexo I

Seções sem tratamento (Branco) e Controles negativos das espécies de *Gongora*.



A – Branco do Labelo (hipoquílio) da *Gongora pleiochroma*; B – Branco do labelo de *G. jauariensis*; C-D – Branco do labelo de *G. minax*; E-G – Teste negativo do Sudan III nos labelos e sépalas de *G. pleiochroma* após tratamento na solução extratora de lipídios; H – Teste do Sudan III no labelo de *G. minax* após tratamento na solução extratora de lipídios; I – Teste negativo do reagente de Nadi no labelo e sépalas de *G. jauariensis* após tratamento na solução extratora de lipídios; J – Teste negativo do reagente de Nadi no labelo de *G. minax* após tratamento na solução extratora de lipídios; K – Teste negativo do vermelho neutro sob fluorescência no labelo e sépalas de *G. pleiochroma* após tratamento na solução extratora de lipídios; L – Teste negativo do vermelho neutro sob fluorescência no labelo de *G. minax*; M – Teste negativo do acetato de cobre/ácido

rubeânico no labelo de *G. jauariensis*; N – Teste negativo do acetato de cobre/ ácido rubeânico no labelo de *G. minax*; O-P – Imagem representante do teste negativo do Xylidine Ponceau nas bractéas de *G. minax* após tratamento com solução de anidrido acético 10% em piridina por 6 horas.

Anexo II

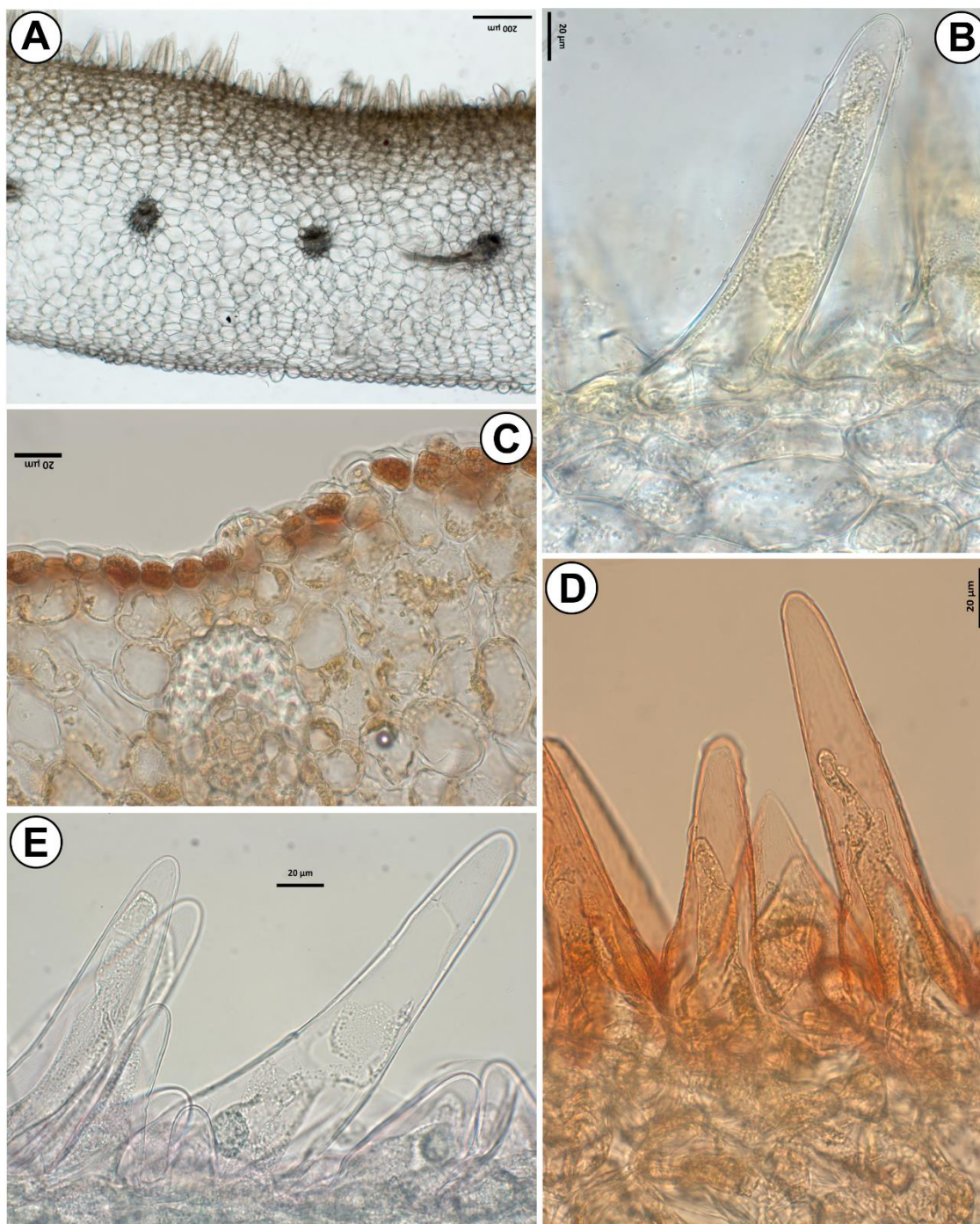
Tabela dos testes histoquímicos realizados em *Coryanthes macrantha*.

Tratamentos	Compostos Marcados	Referências	Resultado		
			Bráctea	Sépala	Labelo
<u>Observado sob luz visível</u>					
Reagente de Fehling	Açúcares Redutores	Sass 1951	+	+	*
Lugol	Grãos de Amido	Johansen 1940	+	+	+
Sudan III	Lipídeos	Johansen 1940	-	-	+
Acetato de Cobre / Ácido Rubeânico	Ácidos Graxos	Ganter & Jollès, 1969, 1970	*	*	+
Sulfato Azul do Nilo	Ácidos Graxos	Caim 1947	*	*	+
NADI reagente	Óleos essenciais e resinas	David & Carde 1964	*	*	+
Xylidine Ponceau	Proteínas	Vidal 1970	+	+	+
Cloreto Férrico 10%	Compostos Fenólicos	Johansen 1940	-	-	-
Azul de Alcião	Mucilagens Ácidas e Pectinas	Pearse 1985	-	-	-
Vermelho de Rutênio	Ácidas e Pectinas	Gregory & Baas 1989	-	-	-
<u>Observado sob luz UV</u>					
Vermelho Neutro	Lipídeos	Kirk-Junior 1970	*	*	+

(+) reação positiva; (-) reação negativa; (*) não aplicado

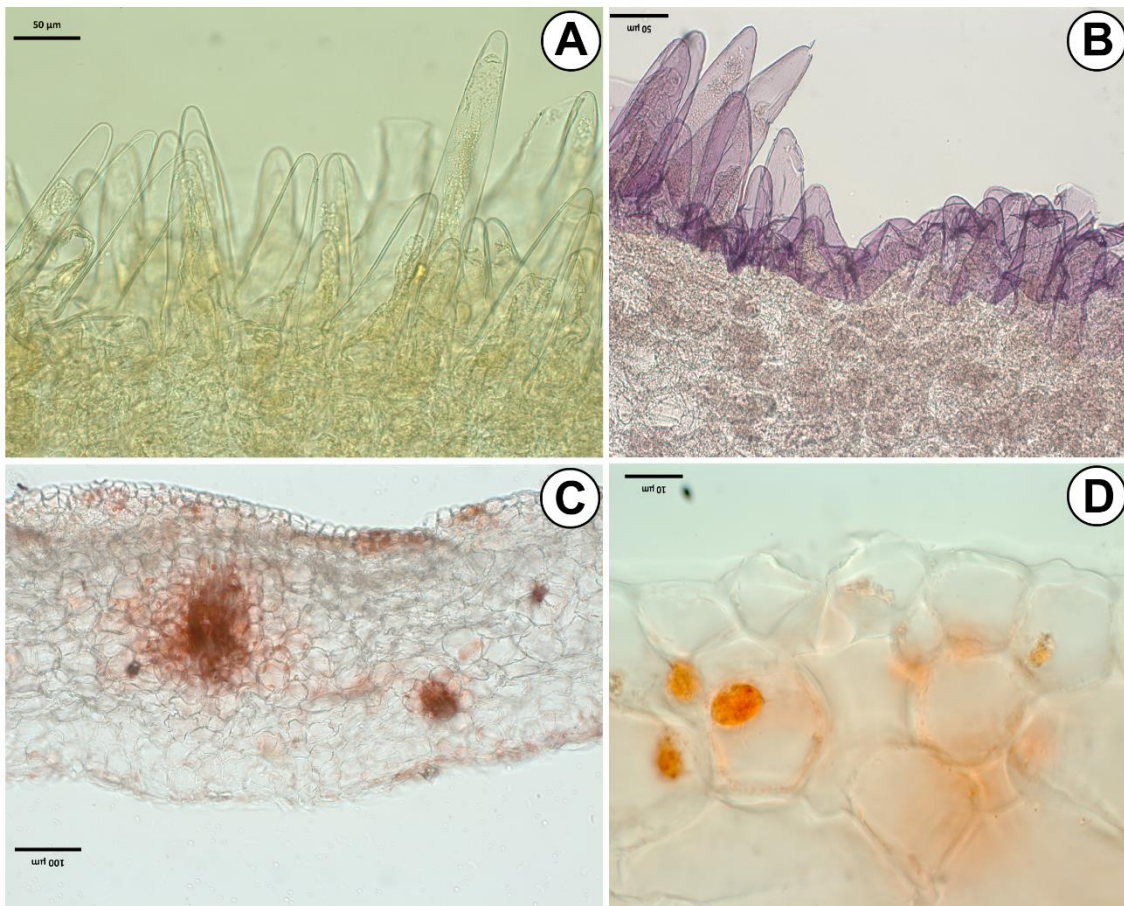
Anexo III

Seções sem tratamento e controles negativos dos testes realizados no labelo (hipoquílio) e brácteas de *Coryanthes macrantha*.



A-B – Branco do labelo (hipoquílio); C – Branco da bráctea; D – Teste negativo do Sudan III no labelo após tratamento na solução extratora de lipídios; E – Teste negativo do Sulfato Azul do Nilo no labelo após tratamento na solução extratora de lipídios.

Continuação dos testes controles realizados em *Coryanthes macrantha*.



A – Teste negativo do acetato de cobre/ácido rubeânico no labelo após tratamento na silução extratora; B – Teste negativo do reagente de NADI no labelo após tratamento na silução extratora; C – Teste negativo do Xylydine Ponceae da bráctea após tratamento com solução de anidrido acético 10% em piridina por 8 horas.

Anexo IV

Imagem complementar da realização do teste Sudan black no labelo (hipoquílio) de *Gongora minax* e no labelo (hipoquílio) de *Coryanthes macrantha*, o material foi fixado em Tetróxido de Ósmio. (A) *G. minax* e (B) *C. macrantha*.

