

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



**“Sistemática filogenética e biologia floral de Pogoniinae sul-americanas, e revisão taxonômica e análise das ceras epicuticulares do gênero *Cleistes* Rich. ex Lindl. (Orchidaceae)”**

**Emerson Ricardo Pansarin**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) EMERSON RICARDO PANSARIN e aprovada pela Comissão Julgadora. Marlies Sazima

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal

**Orientadora: Profa. Dra. Marlies Sazima**

**Campinas**

**2005**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

*Pansarin, Emerson Ricardo*

**P195s**

Sistemática filogenética e biologia floral de Pogoniinae sul-americanas, e revisão taxonômica e análise das ceras epicuticulares do gênero *Cleisthes* Rich. ex Lindl. (Orchidaceae) / Emerson Ricardo Pansarin. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

*Orientadora: Marlies Sazima.*

*Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.*

1. Orquídea. 2. Taxonomia vegetal. 3. Plantas - Filogenia. 4. Polinização. I. Sazima, Marlies. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Phylogeny and floral biology of South American Pogoniinae, and taxonomic revision and analysis of the epicuticular waxes of the genus *Cleisthes* Rich. ex Lindl. (Orchidaceae).

**Palavras-chave em inglês:** Orchid, Vegetal taxonomy, Plants - Phylogeny, Pollination.

**Área de concentração:** Biologia Vegetal.

**Titulação:** Doutor em Biologia Vegetal.

**Banca examinadora:** Marlies Sazima, Antonio Salatino, Julie Henriette Antoinette Dutilh, Rodrigo Bustos Singer, Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi.

**Data da defesa:** 28/06/2005.

**DATA DA DEFESA: 28/06/2005**

**BANCA EXAMINADORA:**

Profa. Dra. Marlies Sazima

Marlies Sazima

Prof. Dr. Antonio Salatino

Antonio Salatino

Dra. Julie H. A. Dutilh

Julie H. A. Dutilh

Dr. Rodrigo B. Singer

Rodrigo B. Singer

Prof. Dr. Vidal F. Mansano

\_\_\_\_\_

Profa. Dra. Ana Maria G. de Azevedo Tozzi

Ana Maria G. de Azevedo Tozzi

Dr. Washington M. Ferreira Neto

\_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Maria do Carmo Estanislau do Amaral pela orientação inicial e a Marlies Sazima pela orientação e oportunidade dada para a conclusão do doutorado;

Aos professores Maria Luiza Salatino e Antonio Salatino pelo apoio e co-orientação no desenvolvimento das análises filogenéticas;

Ao Fábio de Barros pela co-orientação na revisão taxonômica do gênero *Cleistes*;

Aos professores Dr. Fábio de Barros, Dra. Ana Maria G. de Azevedo Tozzi, Dra. Julie H. A. Dutilh e Deborah Y. A. Cursino dos Santos pela leitura crítica e pelas sugestões dadas na pré-banca;

Aos docentes do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia da Unicamp pela contribuição para minha formação;

A Ludmila Mickeliunas pela companhia e apoio durante todas as etapas do trabalho, e pela grande ajuda na elaboração da chave interativa e alinhamento das seqüências;

Aos meus pais pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis;

Ao Erik Rothaker e Dough Goldman pelo envio de material de espécies norte-americanas de Pogoniinae;

A Samantha Koehler pela grande ajuda com a disponibilidade de vários dos protocolos usados e pelas fundamentais dicas para elaboração das análises filogenéticas;

Aos colegas do laboratório de fitoquímica da USP e do Departamento de Botânica da Unicamp pelo companheirismo e apoio;

Ao João A. N. Batista, Aparecida D. Faria, Eduardo L. Ribeiro, Rubens Custódio, David e Isabel Miller, Ludmila Mickeliunas, Antônio Toscano de Brito, Dirlane Silva e André O. Simões pela ajuda nos trabalhos de campo;

Ao Fábio de Barros, Fábio Pinheiro, Samantha Koehler, João A. N. Batista, Antônio Toscano de Brito, Dirlane Silva e Erik Rothacker pelas bibliografias e valiosas discussões que muito contribuíram para a conclusão deste trabalho;

Ao Pe. Lauro Palú pela ajuda com as diagnoses em latim;

Ao Rogério Lupo e Ricardo Lourenço pelo delineamento das pranchas a nanquim;

Ao Alberto dos Santos Pereira pela elaboração das análises químicas das ceras epicuticulares das espécies de *Cleistes*;

A Sílvia Blanco pela grande ajuda no processo de seqüenciamento dos fragmentos de restrição de DNA;

A Lúcia G. Lohmann pelas sugestões no alinhamento das seqüências e realização nos testes de ILD;

A Cristiane Del Nero Rodrigues pela ajuda com os alinhamentos e análises filogenéticas;

A Mouriza M. S. Ferreira e Lucimar B. Mota pela ajuda nas muitas tarefas desenvolvidas no laboratório de sistemática filogenética da USP;

Aos curadores dos herbários pelo envio dos espécimes de *Cleistes*;

Agradeço também a oportunidade dada para utilização do Laboratório Biologia Molecular da USP para realização do processo de seqüenciamento de DNA;

Agradeço especialmente a Fapesp (processo nº 00/11015-9) pelo financiamento, tornando viável o desenvolvimento desse projeto e ao assessor anônimo que muito contribuiu para melhoria do presente trabalho.

<b>SUMÁRIO</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>RESUMO</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	5
A família Orchidaceae	5
As orquídeas vanilóides	6
A subtribo Pogoniinae	8
Relações filogenéticas	10
<b>OBJETIVOS</b>	11
<b>CAPÍTULO 1.</b> Phylogeny of South American Pogoniinae (Orchidaceae) based on morphology and DNA sequence data from nuclear ribosomal (ITS) and chloroplast ( <i>trnL-F</i> and <i>rps16</i> ) regions.	13
<b>CAPÍTULO 2.</b> Biologia floral de <i>Cleistes libonii</i> (Rchb. f.) Schltr. (Orchidaceae, Vanilloideae, Pogoniinae).	46
<b>CAPÍTULO 3.</b> Pollination in the genus <i>Cleistes</i> and a comparison on floral biology within Pogoniinae (Orchidaceae: Vanilloideae): an evidence of evolution from deceptive to reward pollination systems.	61
<b>CAPÍTULO 4.</b> Revisão taxonômica do gênero <i>Cleistes</i> Rich. ex Lindl. (Orchidaceae).	80
<b>CAPÍTULO 5.</b> <i>Cleistes pusilla</i> (Orchidaceae: Pogoniinae) a new species from central Brazil.	165
<b>CAPÍTULO 6.</b> Epicuticular waxes in <i>Cleistes</i> Rich. ex Lindl. (Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae): micromorphology and chemical compounds.	172
<b>CONCLUSÕES</b>	192
<b>BIBLIOGRAFIA GERAL</b>	193

## RESUMO

Neste trabalho foi realizada a revisão taxonômica, o estudo químico e micromorfológico das ceras epicuticulares, bem como estudados os processos de polinização e os polinizadores de representantes sul-americanos do gênero *Cleistes*. Foi, também, elaborada uma hipótese filogenética da subtribo Pogoniinae com base em caracteres morfológicos e moleculares, através do seqüenciamento das regiões ITS (nrDNA), e *rps16* e *trnL-F* (cpDNA). O gênero *Cleistes* apresenta 17 espécies distribuídas entre as Américas Central e do Sul, ocorrendo principalmente em regiões de cerrado do Brasil central. Três dessas espécies foram descritas durante a elaboração do presente trabalho e estão aqui apresentadas. Através do estudo da hipótese filogenética de Pogoniinae foi verificado que essa subtribo apresenta dois clados bem sustentados. Um clado é norte-americano-asiático, e inclui os gêneros *Pogonia*, *Isotria* e as espécies norte-americanas de *Cleistes*. O outro é centro-sul-americano e inclui as espécies de *Cleistes* distribuídas entre as Américas Central e do Sul. Com o desenvolvimento do presente estudo, incluindo a maioria das espécies de *Cleistes* nas análises, pode ser demonstrado que esse gênero é parafilético, concordando com os dados publicados por Cameron & Chase (1999). As espécies norte-americanas de *Cleistes* estão mais relacionadas com os gêneros norte-americano-asiáticos *Isotria* e *Pogonia* do que com as espécies centro-sul-americanas de *Cleistes*. A subtribo Pogoniinae também é parafilética. O saprofítico gênero *Pogoniopsis* está mais relacionado com representantes dos gêneros *Galeola* e *Cyrtosia* (Galeolinae) do que com os demais gêneros pertencentes à subtribo Pogoniinae. *Duckeella*, um gênero endêmico da Amazônia e irmão das Pogoniinae, não apresenta os caracteres sinapomórficos que define essa subtribo, devendo ser transferido para a subtribo Duckeellinae. Espécies de *Cleistes* apresentam micromorfologia das ceras epicuticulares existentes nas folhas variando desde lisas, com grânulos, ou até formando placas. As ceras epicuticulares de *Cleistes* são constituídas principalmente por álcoois, ácidos e ésteres. A composição química das ceras epicuticulares das folhas de espécies de *Cleistes* é muito variável entre espécies, podendo ser usada na delimitação específica dentro do gênero. Espécies de *Cleistes*, assim como as demais Pogoniinae, são polinizadas principalmente por abelhas,

embora *C. libonii* apresente beija-flores do gênero *Phaethornis* como co-polinizadores. Espécies sul-americanas de *Cleistes* apresentam picos de floração, em que todos os botões maduros de cada planta abrem simultaneamente no mesmo dia. As flores das espécies estudadas são pouco duráveis (geralmente um dia), e oferecem néctar aos polinizadores. O néctar é produzido em nectários glandulares da base do labelo das flores. Para os gêneros norte-americano-asiáticos esses nectários estão ausentes e as abelhas são atraídas às flores por engano. Esse estudo sustenta a hipótese de evolução de flores de engano para flores de néctar.

**Palavras-chave:** ceras epicuticulares, *Cleistes*, filogenia, Orchidaceae, Pogoniinae, polinização, taxonomia.



## ABSTRACT

The taxonomic revision, the micromorphological and chemical study of the epicuticular waxes, as well as the pollination processes and pollinators of the genus *Cleistes* were reported. A phylogenetic inference within *Cleistes* and among genera of subtribe Pogoniinae was also established, based on morphology and nrDNA (ITS) and cpDNA (*trnL-F* and *rps16*) sequence data, and using maximum parsimony. The genus *Cleistes* includes 17 species distributed among Central and South America, occurring mainly in “cerrado” areas of Central Brazil. Three of these species are new and were described in the present study. The phylogenetic study of Pogoniinae showed that this subtribe presents two well-supported clades. One clade is North-American-Asiatic and includes the genera *Isotria*, *Pogonia* and the North-American species of *Cleistes*. The other clade is Central-South-American and includes the species of *Cleistes* occurring in Central and South America. The genus *Cleistes*, in agreement to Cameron & Chase (1999), is paraphyletic. The North American species of *Cleistes* are more related to the North American-Asiatic genera *Isotria* and *Pogonia* than to the remaining species of *Cleistes*. The subtribe Pogoniinae is also paraphyletic. The saprophytic genus *Pogoniopsis* is more related with *Galeola* and *Cyrtosia* (Galeolinae) than to the remaining genera currently recognized within subtribe Pogoniinae. The Amazonian genus *Duckeella*, sister of all remainder of Pogoniinae, lacks the synapomorphic characters that define this subtribe, and should be transferred to the subtribe Duckeellinae. Species of the genus *Cleistes* present micromorphology of the epicuticular waxes of the leaves varying from a singular film to forming granules or platelets. The epicuticular waxes in *Cleistes* are constituted mainly by alcohols, acids and esters. The chemical compounds of epicuticular waxes of *Cleistes* were very variable among species, and may be used for specific delimitation within the genus. Species of *Cleistes*, as for remaining Pogoniinae, are pollinated mainly by bees, although *C. libonii* is co-pollinated by hermit hummingbirds. The South American species of *Cleistes* presents flowering peaks, in which all mature buds of each plant flowering simultaneously on the same day. The studied species produced short-lived flowers (generally one day), which offer nectar as reward produced by two nectariferous glands on the basis of the lip.

For the North American-Asiatic genera these nectariferous glands are absent and the floral visitors are attracted by deceit. This study supports the evolution of deceptive flowers to nectar flowers.

**Key words:** *Cleistis*, epicuticular waxes, Orchidaceae, phylogeny, Pogoniinae, pollination, taxonomy.

## INTRODUÇÃO GERAL

### *A família Orchidaceae*

A família Orchidaceae abrange cerca de 7% das angiospermas, sendo considerada uma das maiores famílias desse grupo (Atwood 1986). Orchidaceae apresenta cerca de 850 gêneros e 20.000 espécies distribuídas por todo o mundo, mas apresenta sua maior diversidade nas regiões tropicais (Dressler 1993). No Brasil, ocorrem cerca de 2.300 espécies distribuídas em 191 gêneros (Pabst & Dungs 1975).

A maioria das orquídeas é epífita, porém, existem espécies rupícolas, terrícolas, palustres e saprofíticas (Dressler 1993). Essa diversidade de formas de vida possibilita a ocupação de diferentes tipos de ambientes, uma vez que orquídeas podem ser encontradas em formações vegetais diversas (Hoehne 1949). A grande capacidade adaptativa das orquídeas pode ser explicada, em parte, pelas várias formas vegetativas presentes na família, as quais podem representar diferentes estratégias relacionadas, basicamente, com a obtenção e reserva de água e nutrientes. Caule intumescido formando pseudobulbo, folhas carnosas e raízes velamenosas são algumas dessas estratégias. Apesar das estruturas vegetativas serem bastante diversas na família, a construção floral das orquídeas é mais ou menos uniforme quanto ao número e arranjo de suas partes. Entretanto, há variação em detalhes estruturais, na forma e tamanho dos componentes básicos o que leva ao surgimento de estruturas muito complexas (van der Pijl & Dodson 1966). As flores de Orchidaceae são geralmente zigomorfas, possuindo três sépalas e três pétalas, sendo uma destas diferenciada em labelo. Os órgãos reprodutivos são fundidos em uma estrutura, a coluna, com uma ou mais raramente duas ou três anteras e uma região estigmática formada pela fusão dos três estigmas (Dressler 1981). Na maioria das orquídeas os grãos de pólen são reunidos em duas ou mais polínias, e estas, em conjunto com o viscidio (e estipe, em alguns gêneros), que é a extremidade adesiva responsável pela fixação ao polinizador, formam o polinário. Na coluna, o polinário é separado do estigma por uma região denominada rostelo (Dressler 1993). Em orquídeas vanilóides (Cameron & Chase 1999), e em algumas Epidendroideae basais (Cameron *et al.* 1999), os grãos de pólen são liberados como mônades ou tétrades livres e estruturas como viscidio e estipe estão ausentes.

A família Orchidaceae está dividida em 70 subtribos, 22 tribos e cinco subfamílias, baseadas principalmente no número e na posição da antera (Dressler 1993). Essas subfamílias, de acordo com a classificação de Dressler (1993), são: Apostasioideae, Cyripedioideae, Epidendroideae, Spiranthoideae e Orchidoideae. Em tratamentos mais recentes, baseados na análise de fragmentos de restrição de DNA (Cameron *et al.* 1999, Cameron 2004, Freudenstein *et al.* 2004) e caracteres morfológicos (Freudenstein & Rasmussen 1999), o número de subfamílias é mantido, porém Spiranthoideae e Orchidoideae foram consideradas como uma única subfamília (Orchidoideae), e Epidendroideae tem sido sub-dividida, com a criação da subfamília Vanilloideae (Cameron *et al.* 1999, Cameron 2004, Freudenstein *et al.* 2004). Epidendroideae forma um grupo parafilético que, ultimamente, está dividido em dois grandes clados. Um deles compreende as Epidendroideae derivadas, que apresentam polínias revestidas por viscina, antera incumbente, caule geralmente modificado em pseudobulbos e hábito predominantemente epifítico ou rupícola. Existem, no entanto, gêneros (e.g. *Psilochilus*, *Triphora*, *Epipactis* e *Neottia*) que parecem pertencer às Epidendroideae, mas que não possuem os caracteres sinapomórficos que definem esse grupo (Cameron *et al.* 1999, Freudenstein *et al.* 2004). Esses gêneros compreendem o clado das Epidendroideae basais, um grupo cujas polínias possuem pólen livre e anteras eretas ou suberetas (Cameron *et al.* 1999).

#### *As orquídeas vanilóides*

A posição das orquídeas vanilóides na família Orchidaceae, ao longo da história da classificação, tem sido muito controversa. Em 1835, Lindley propôs uma família separada para as orquídeas vanilóides (Vanillaceae), mas esse mesmo autor retornou-as, posteriormente, para a tribo Vanilleae, em Orchidaceae (Lindley 1836). Schlechter (1926) inicialmente considerou a tribo Vanilleae com apenas uma subtribo, mas, posteriormente, reconheceu duas subtribos distintas, Vanillinae e Pogoniinae (Schlechter 1970). Rasmussen (1982) incluiu os táxons de orquídeas vanilóides na subfamília Neottioideae, mas, transferiu-as posteriormente, para as Epidendroideae (Rasmussen 1985). Garay (1986) reconheceu a tribo Vanilleae como pertencendo à subfamília Neottioideae e distinta das Epidendroideae devido à sua morfologia considerada primitiva (Cameron & Chase 1999). Burns-Balogh & Funk (1986), em uma análise cladística da família Orchidaceae, seguiram

a recomendação de Dressler (1981) e reconheceram a tribo Vanilleae, incluindo as subtribos Vanillinae, Pogoniinae, Lechanorchidinae e Palmorchidinae na subfamília Epidendroideae. Estudos posteriores (Dressler 1993 e Cameron *et al.* 1999), entretanto, sustentaram a dissociação de Palmorchidinae das orquídeas vanilóides. Em seu mais recente tratamento sistemático da família Orchidaceae, Dressler (1993) reconheceu os gêneros das orquídeas vanilóides como membros da tribo Vanilleae. Esta tribo foi dividida nas subtribos Vanillinae, Galeolinae e Lecanorchidinae, sendo interpretada como um grupo de orquídeas primitivas que formam uma “aliança” com as Epidendroideae (Dressler 1993). A subtribo Pogoniinae foi considerada por esse autor como uma tribo de “status” incerto, com base na asserção de Rasmussen (1985), de que o grupo não teria sinapomorfias óbvias que o ligasse à tribo Vanilleae. Atualmente é conhecido que a subtribo Pogoniinae pertence ao grupo das orquídeas vanilóides devido à presença de algumas sinapomorfias, como presença de zona de abscisão entre perianto e ovário, antera versátil e pólen livre, em mônades (Cameron *et al.* 1999, Cameron & Chase 1999). Em espécies de *Cleistes* (Pansarin 2003), assim como nos demais gêneros em Pogoniinae os grãos de pólen são depositados no escudo das abelhas. As orquídeas vanilóides, nos sistemas mais recentes de classificação da família, têm sido incluídas na subfamília Vanilloideae (Cameron *et al.* 1999, Cameron & Chase 1999, Cameron 2004, Freudenstein *et al.* 2004).

As orquídeas vanilóides são importantes na classificação da família Orchidaceae, pois apresentam um conjunto de características que não estão presentes em nenhum outro grupo na família (Cameron & Chase 1999). Esse grupo é também de interesse econômico, pois frutos de *Vanilla planifolia* Andrews são usados como fonte natural de vanilina (Correll 1953). As orquídeas vanilóides são mais diversas nos trópicos, mas podem ser encontradas em todo o mundo. Essas orquídeas compreendem aproximadamente 15 gêneros, contendo cerca de 175 espécies (Cameron 1999, Cameron *et al.* 1999). *Vanilla* é o gênero mais numeroso, com cerca de 90 espécies (Cameron & Chase 1999), seguido de *Cleistes* com cerca de 20 espécies. Os demais gêneros são muito pequenos ou monotípicos (Cameron & Chase 1999).

### *A subtribo Pogoniinae*

Cameron & Chase (1999) em um estudo da filogenia para Pogoniinae, com base em caracteres morfológicos e moleculares, revelaram que essa subtribo é monofilética. Esse estudo revelou, ainda, que o gênero *Duckeella*, que ocorre na Amazônia, é o grupo irmão do restante das Pogoniinae. No entanto, o saprofítico gênero *Pogoniopsis*, endêmico do Brasil, não foi incluído nessas análises. As demais espécies incluídas em Pogoniinae estão reunidas em dois grupos monofiléticos. Um deles é o clado norte-americano-asiático que contém os gêneros *Pogonia*, *Isotria* e as espécies norte-americanas de *Cleistis*. Os gêneros do clado norte-americano apresentam número igual de cromossomos,  $2n=18$ . As espécies sul-americanas do gênero *Cleistis*, por outro lado, formam outro grupo monofilético. Os resultados obtidos por Cameron & Chase (1999) revelaram que o gênero *Cleistis* é parafilético e que *Cleistis divaricata* é mais proximamente relacionada aos gêneros *Pogonia* e *Isotria* do que com as demais espécies de *Cleistis*. As espécies sul-americanas do gênero *Cleistis* constituem o grupo irmão do clado norte-americano-asiático. Cameron & Chase (1999) defendem a necessidade de alterações taxonômicas na subtribo Pogoniinae e propõem a criação de um novo gênero para *Cleistis divaricata*, uma vez que o gênero *Cleistis* foi criado baseado na espécie sul-americana *Cleistis lutea* Lindl. Outra alternativa proposta por esses autores seria a de combinar *Pogonia*, *Isotria* e *Cleistis divaricata* em um único gênero, *Pogonia* Juss., mas essas alterações só podem ser realizadas quando os estudos com as demais espécies de *Cleistis* forem completados.

De acordo com Cameron & Chase (1999) a subtribo Pogoniinae é distribuída em três continentes, América do Norte, do Sul e oeste da Ásia. Essa distribuição não é contínua e apresenta duas disjunções fitogeográficas significantes. O gênero *Duckeella* é endêmico da Amazônia. O gênero *Cleistis* apresenta seu centro de diversidade na América do Sul, com a espécie *Cleistis rosea* ocorrendo até a América Central e *C. costaricensis*, endêmica da Costa Rica. *Cleistis divaricata* e os gêneros *Isotria* e *Pogonia* distribuem-se na América do Norte e oeste da Ásia. Cameron & Chase (1999) interpretaram que a subtribo Pogoniinae teria surgido na América do Sul, durante o Cretáceo. Provavelmente, o ancestral de *Cleistis divaricata* teria migrado para o sudeste dos Estados Unidos durante o Paleoceno, via dispersão à longa distância das sementes. Com o ancestral das Pogoniinae norte-americanas estabelecidas no sudeste dos Estados Unidos, teria ocorrido a migração e especiação do

grupo nesse continente, onde se estabeleceram os gêneros *Isotria*, *Pogonia* e a espécie *Cleisthes divaricata*. Durante o mioceno, o gênero *Pogonia* pode ter se distribuído entre o norte da América do Norte e nordeste da Ásia. Com a glaciação, ocorreu uma disjunção das populações do gênero *Pogonia*.

Dados hoje disponíveis sobre polinização em Pogoniinae restringem-se ao clado norte-americano-asiático. *Pogonia ophioglossoides* (L.) Jussieu é polinizada por abelhas operárias do gênero *Megachile* e rainhas e operárias do gênero *Bombus*. O polinário dessa espécie, que é farináceo como nos demais gêneros em Pogoniinae (Cameron *et al.* 1999), fica aderido à face frontal da cabeça das abelhas (Thien & Marcks 1972). *Isotria medeoloides* (Pursh) Raf. reproduz-se através de autopolinização espontânea e *I. verticillata* (Muhl. ex Willd.) Raf. é polinizada por pequenas abelhas pertencentes às famílias Halictidae, Anthophoridae e Adrenidae, nas quais os grãos de pólen são depositados na face dorsal do tórax (Mehrhoff 1983). *Cleisthes divaricata* (L.) Ames, que ocorre no oeste da Virginia, é polinizada por abelhas operárias dos gêneros *Megachile* e *Bombus*, nas quais o pólen é depositado na face dorsal do tórax (Gregg 1989). Nessa espécie, os polinizadores são atraídos por engano, pois as flores não oferecem recursos (Gregg 1989). Assim como em *Cleisthes divaricata*, Dressler (1993) relata que em *Pogonia* e *Isotria* os polinizadores são atraídos por engano devido à presença, no labelo, de tricomas que imitam pólen. Thien & Marcks (1972), no entanto, observaram o acúmulo de pequena quantidade de néctar na base do labelo de *P. ophioglossoides*.

A identificação de caracteres micromorfológicos, com auxílio de microscópio eletrônico de varredura (MEV), tem sido muito utilizada em estudos taxonômicos, podendo contribuir com informações detalhadas das estruturas e fornecendo informações que podem ser utilizadas em estudos de sistemática e filogenia. Tais estudos são relativamente simples e rápidos de serem realizados, e os caracteres são geralmente fáceis de serem interpretados. O arranjo e a forma das células epidérmicas e da parede celular são alguns dos caracteres micromorfológicos que podem ser observados (Barthlott 1981). Em Orchidaceae, caracteres, como a superfície de sementes, são os mais utilizados em microscopia eletrônica de varredura (Dressler 1993). Cameron & Chase (1998) indicam que a morfologia das sementes é um caractere muito importante na delimitação dos gêneros em Pogoniinae e relatam que as sementes de espécies do gênero *Cleisthes* sul-americanas diferem muito das

sementes de espécies de *Isotria*, *Pogonia* e da espécie *Cleistis divaricata*, que formam o clado norte-americano. Características de sementes também podem ser muito importantes na delimitação de espécies dentro de cada gênero em Pogoniinae (Cameron & Chase 1998). Em *Cleistis* foram observadas diferenças da morfologia das sementes nas espécies analisadas por Cameron & Chase (1998).

### *Relações filogenéticas*

As primeiras hipóteses filogenéticas elaboradas para Orchidaceae foram baseadas em caracteres morfológicos (Burns-Balogh & Funk 1986, Dressler 1993, Szlachetko 1995). As hipóteses propostas por esses autores foram refletidas nos sistemas de classificação da família, que atualmente vêm sendo revisadas e modificadas, quando necessário. Desde a última década, o uso de seqüências de nucleotídeos para estimar relações filogenéticas entre táxons tem atraído à atenção de botânicos que estudam uma variedade de grupos de plantas (Clegg & Zurawski 1992), inclusive Orchidaceae (para revisão veja Cameron 2004 e Freudenstein *et al.* 2004). Desde o primeiro trabalho envolvendo técnicas moleculares na família (Chase *et al.* 1994), vem sendo crescente o número de estudos realizados, que abrangem tanto Orchidaceae como um todo (mas incluindo apenas alguns representantes de cada gênero ou subtribos), como níveis hierárquicos inferiores dentro do grupo (para revisão veja Cameron 2004 e Freudenstein *et al.* 2004). Atualmente, numerosos estudos (revisão em Cameron 2004) têm demonstrado que flores de orquídeas podem ser muito susceptíveis a convergência morfológica causada por pressão de seleção por parte de seus polinizadores, ainda que caracteres florais tenham sido tradicionalmente usados na classificação da família (Dodson 1962, Dressler & Dodson 1960). Nesses casos, seqüências de nucleotídeos têm a vantagem de, além de poderem ser rapidamente produzidas, serem pouco homoplásicas (Palmer *et al.* 1988). Dressler (1993) aponta que dados moleculares podem ser muito importantes em estudos de filogenia, sendo úteis nos casos em que os dados obtidos em análise de estruturas morfo-anatômicas são inadequados ou conflitantes. Os dados moleculares podem ser de grande utilidade na tomada de decisões entre idéias conflitantes, podendo ser usados em conjunto com dados obtidos através da análise de outros caracteres. Geralmente a quantidade de caracteres que pode ser obtida através da análise do DNA é muito maior que a que pode ser obtida somente com caracteres morfo-



anatômicos. Esses atributos são atrativos para orquidologistas, dada à complexidade das estruturas florais e vegetativas das orquídeas e pela importância da existência de caracteres que sejam pouco homoplásicos para gerar hipóteses sobre a estrutura filogenética do grupo. Sequências gênicas podem ser obtidas a partir do DNA presente no núcleo (nDNA), cloroplastos (cpDNA) e mitocôndrias (mDNA). As variações que ocorrem no DNA são os estados de caráter procurados, e estas incluem mutações pontuais e rearranjos, incluindo inversões, deleções e inserções de material genético. As mutações podem ser comparadas entre diferentes táxons e são analisadas através de métodos cladísticos, geralmente com utilização do princípio de parcimônia. Fragmentos de restrição, como a região nuclear de DNA ribossômico ITS, têm sido usados na delimitação de gêneros e subtribos dentro do grupo. O uso da região ITS tem sido muito importante para estimar a posição de orquídeas saprofitas, quando fragmentos de regiões de cloroplasto não são possíveis de serem amplificados (Cameron 2004). Muitos dos estudos com níveis hierárquicos inferiores tem sido complementados com as regiões de DNA de cloroplasto *trnL-F* e *matK*. O gene de cloroplasto *rbcL* (Cameron *et al.* 1999, Cameron 2004), assim como *psaB* (Cameron 2004), tem sido usado na delimitação de subfamílias, tribos e subtribos em Orchidaceae.

## OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

1. Formular uma hipótese filogenética para gênero *Cleistes* e demais Pogoniinae com base em caracteres morfológicos e macromoleculares;
2. Estudar as inter-relações filogenéticas entre o gênero *Cleistes* e os demais gêneros da subtribo Pogoniinae sul-americanos e verificar a posição do gênero *Pogoniopsis* no grupo;
3. Estudar os mecanismos envolvidos no processo de polinização e os polinizadores de espécies sul-americanas de *Cleistes*, relacionando esses aspectos entre os clados sul-americano e norte-americano-asiático em Pogoniinae.
4. Realizar a revisão taxonômica do gênero *Cleistes* com elaboração de chave de identificação, documentação fotográfica, desenhos e descrições das espécies;

5. Realizar o estudo micromorfológico e químico das ceras epicuticulares de espécies sul-americanas de *Cleistes*;

## Capítulo 1

### Formatado de acordo com as normas da American Journal of Botany

PHYLOGENY OF SOUTH AMERICAN POGONIINAE (ORCHIDACEAE) BASED ON MORPHOLOGY AND DNA SEQUENCE DATA FROM NUCLEAR RIBOSOMAL (ITS) AND CHLOROPLAST (*TRNL-F* AND *RPS16*) REGIONS

EMERSON R. PANSARIN, ANTONIO SALATINO, AND MARIA L. F. SALATINO

#### ABSTRACT

The subtribe Pogoniinae (Orchidaceae), as currently known, comprises five genera distributed in South and Central America, and Eastern Asia. A phylogenetic inference within *Cleisthes* and among genera of subtribe Pogoniinae was established, based on morphology and nrDNA (ITS) and cpDNA (*trnL-F* and *rps16*) sequence data, and using maximum parsimony. Seventeen species of *Cleisthes* and members of all other genera of Pogoniinae and outgroups were sampled. Analyses based separately on morphology and molecular data provided very similar topologies. Pogoniinae is supported as a paraphyletic subtribe. The saprophytic genus *Pogoniopsis* is closer to the vanilloid subtribe Galeoliinae than to the remainder Pogoniinae. The genus *Cleisthes* is paraphyletic. The North American *Cleisthes divaricata* and *C. bifaria* have affinities closer to the temperate genera *Isotria* and *Pogonia* than to the Central and South American species of *Cleisthes*, the latter constituting a monophyletic group characterized by the presence of glandular nectaria, tuberous roots and Central and South American distribution. The Amazonian *Duckeella* is sister of all the remainder Pogoniinae. Basally whorled leaves, lateral and multiflored inflorescences with yellow flowers, lip poorly differentiated from petals and presence of appendages on both column sides characterize this rare genus.

**Key words:** molecular systematics; Orchidaceae; Pogoniinae; phylogeny; Vanilleae; Vanilloideae.

## INTRODUCTION

The subtribe Pogoniinae includes five genera distributed in South and North America, and Eastern Asia (Dressler, 1993; Cameron and Chase, 1999). *Cleistes* is the largest genus, with about 20 species (Pansarin and Barros, in prep.). The remaining genera (*Duckeella*, *Isotria*, *Pogonia* and *Pogoniopsis*) are much smaller or monotypic (Cameron, 1999). The subtribe Pogoniinae, as well as other vanilloid orchids, are important for orchid systematics because the suite of morphological characters that defines them is present in no other members of Orchidaceae and may provide clues to the evolution of this large and diverse family (Cameron and Chase, 1999). In fact, they have a considerable number of plesiomorphic features that have lead orchidologists to classify them at various levels and to disagree about their circumscription and phylogenetic position within Orchidaceae (Cameron and Chase, 1999).

The position of vanilloid orchids in the Orchidaceae has been controversial and this group has been assigned distinct taxonomic ranks within the family (see Cameron and Chase, 1999 for a review). Dressler (1993), in his most recent treatment of the Orchidaceae, placed the members of vanilloid orchids in the tribe Vanilleae, within the subfamily Epidendroideae. This tribe was divided into subtribes Vanillinae, Galeolinae and Lecanorchidinae. Pogoniinae, in Dressler's (1993) treatment, was assumed as a subtribe of uncertain status on the basis of assertion of Rassmussen (1985).

In his classification for the Orchidaceae, Slathetko (1995) promoted the vanilloid orchids to the subfamily level. Within Vanilloideae he recognized the tribes Triphoreae, Arethuseae, Nervileae, Gastroideae, Epipogieae and Vanilleae. *Cleistes*, *Isotria*, *Pogonia* and *Pogoniopsis* were kept in subtribe Pogoniinae, while *Duckeella* was placed in subtribe Duckeellinae. These two subtribes were positioned close to Sobraliinae and Arethusinae, in tribe Arethusae.

In recent treatments based on morphological and DNA sequence data (Cameron et al., 1999; Cameron and Chase, 1999; Chase et al., 2003; Cameron, 2004; Freudenstein et al.,

2004), and in accordance with Slathetko (1995), the vanilloids orchids were ranked at the subfamily hierarchy. Basically, the group corresponds to tribe Vanilleae sensu Dressler (1993), but including Pogoniinae. Within Vanilloideae was recognized the subtribes Vanillinae, Galeolinae and Pogoniinae (Cameron et al., 1999). In his most recent treatment for the vanilloid orchids, Cameron (2003) elevated the subtribe Pogoniinae to the rank of tribe (Pogoniieae) and combined Galeolinae and Vanillinae in a singular group (i.e., tribe Vanilleae). According to Cameron et al. (1999) and Cameron and Chase (1999), based on morphology and DNA sequence data of the nuclear ribosomal ITS and plastid *rbcL*, the subtribe Pogoniinae (tribe Pogoniieae; sensu Cameron, 2003) is monophyletic. The South American genus *Duckeella* is sister of all remaining genera of Pogoniinae. The genus *Cleistis* is paraphyletic (Cameron and Chase, 1999). The North American *C. divaricata* and *C. bifaria* are closer to the North American genus *Isotria* and the North American-Asiatic *Pogonia* than to their South American congeneric species (Cameron and Chase, 1999). The South American *Cleistis* constitute a monophyletic group (Cameron and Chase, 1999). The rare saprophytic *Pogoniopsis* has not been included in these analyses, and thus its position within the subtribe remains inconclusive (Cameron and Chase, 1999).

DNA sequence data have often been used for inference of the phylogeny of many different groups of plants, including Orchidaceae (e.g., Cameron et al., 1999; Cameron, 2004; Freudenstein et al., 2004). The nuclear nrDNA internal transcribed spacers ITS and the plastid regions *rps16* and *trnL-F* have been useful for the establishment of phylogenetic relationships at low hierarchic levels in Orchidaceae (e.g., Cameron and Chase, 1999; Clements et al., 2002; Koehler et al., 2002; Bateman et al., 2003; Smith et al., 2004).

The paper aims to (1) infer phylogenetic relationship among the species of *Cleistis*, (2) test the monophyly of Pogoniinae with the inclusion of the South American genus *Pogoniopsis* in the analyses, (3) establish phylogenetic relationships among South American Pogoniinae and (4) reevaluate the synapomorphic characters and its consistency delimiting the taxa within subtribe.

## MATERIAL AND METHODS

**Taxon sampling** – A total of twenty-seven species were sampled on this study, corresponding all five genera (*Cleistes*, *Duckeella*, *Isotria*, *Pogonia* and *Pogoniopsis*) currently recognized as Pogoniinae (Dressler, 1993; Cameron et al., 1999; Cameron and Chase, 1999) and here assumed as ingroup. Seventeen species of Central and South American *Cleistes* were sampled. Two species of *Vanilla* were used as outgroup, based on previous molecular and morphological phylogenetic studies of Orchidaceae (Cameron et al., 1999; Cameron, 2004; Freudenstein et al., 2004), particularly of the subtribe Pogoniinae (Cameron and Chase, 1999). The Pogoniinae species and outgroup used in this study, voucher information and GenBank accession numbers are given in Table 1.

**DNA extraction, amplification and sequencing** – Total DNA was extracted from fresh and silica gel-dried plant issues (Chase and Hills, 1991), following a modified CTAB method of Doyle and Doyle (1987). The DNA was precipitated overnight at -20 °C with 510 µL of 100% isopropanol and centrifuged. The pellet was washed twice or three times with 70% ethanol, and dried. The DNA was re-suspended in 75 µL of TE buffer (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 8.0) and stored at -20 °C. Amplifications were carried out in a thermocycler, using 50 µL PCR reaction volumes and *Taq* DNA polymerase of Invitrogen. For ITS amplifications betaine (Sigma) at 1.0 mL/L was added to the PCR mixture. Primers of nuclear ribosomal internal transcribed spacers (ITS1, ITS2) and intervening 5.8 S (Sun et al., 1994), and plastid *trnL-F* intergenic spacers (Taberlet et al., 1991) and *rps16* intron (Oxelman et al., 1997) were used in the amplifications and sequencing. For ITS, the thermocycler program was 99 °C, 10 min; 80 °C, 5-10 sec. for *Taq* polymerase addition; 35 cycles: 94 °C, 1 min; 65 °C, 45 sec; 72 °C, 1 min; the last cycle ended with an extension period of 5 min at 72 °C. For *trnL-F* the program was 94 °C, 2 min; 33 cycles: 94 °C, 1 min; 56 °C, 45 sec; 72 °C, 1 min 20 sec; the last cycle ended with an extension period of 5 min at 72 °C. For *rps16*, the thermocycler program was similar to the one for *trnL-F*, with annealing temperature of 50 °C. Successfully amplified PCR products were purified using a GFX PCR cleaning column (Amersham Biosciences). The sequences were obtained with Applied Biosystems automated sequencer models 3100 or 3700 with dye terminators (Big Dye 3.0-3.1, ABI) according to manufacturer's protocols. Sequence editing and assembly of

complementary and overlapping sequences were accomplished using the ABI softwares Sequence Navigator and Autoassembler (Applied Biosystems), respectively. DNA sequences were aligned using Clustal X version 1.83 (Thompson et al., 1997). Subsequent manual corrections were carried out with BioEdit version 5.0.9. Indels were entered into the matrices as missing values added as binary characters in end of matrix for phylogenetic analysis. Matrix ends were trimmed to exclude sequence artifacts. Taxa used in the analyses and GenBank accessions are listed in Table 1. Matrices are available upon request from the corresponding author.

***Non-molecular characters*** – Herbarium specimens from CEN, ESA, HB, HRCB, HUEFS, INPA, MBML SP, SPF, R, RB, UEC, VEN and VIC, as well as collected in field with voucher deposited at herbaria UEC and INPA, were used as sources of morphological characters. Characters were also obtained from papers of Thien and Marcks (1972), Mehrhoff (1983), Dressler (1993), Gregg (1989), Cameron and Chase (1998, 1999) and Cameron (2003). A total of 37 non-molecular characters and character state coding are given in Table 2. Polarization of morphologic characters was done following the outgroup comparisons method (Nixon and Carpenter, 1993) using species of *Vanilla*. The Pogoniinae species and outgroup used in this study and non-molecular data matrix are in Table 3.

The SEM study of the seeds of *Pogoniopsis nidus-avis* was carried out using mature fruits collected in the field. The seeds were mounted on aluminum SEM stubs and direct sputter-coated with a gold-palladium alloy, and observed and photographed under accelerating voltage of 10kv. Seed characteristics of other taxa included in this study were obtained from the study of Cameron and Chase (1998) and from Dressler (1993).

***Data matrix composition and cladistic analysis*** – All cladistic analyses were run with PAUP\* version 4.0b (Swofford, 2001), using the criteria of Fitch parsimony (Fitch, 1971), including autapomorphies, and ACCTRAN optimization with zero-length branches collapsed. Heuristic searches were conducted with for 31 taxa for ITS, 33 taxa for *trnL-F*, 28 taxa for *rps16*, 18 taxa for the combination of data from the three DNA regions. The search strategy for the molecular and combined data sets used 1000 replications of random taxon entry additions, option MULTREES in effect, and tree bisection reconnection

swapping, holding 10 trees/replicate and saving all shortest trees. Strength of clade support was assessed using 1000 bootstrap replicates (Felsenstein, 1985).

The non-molecular phylogenetic analysis used a matrix with 37 characters, and the 25 taxa (Table 3) were analyzed with a branch-and-bound search. No bootstrap replicates were performed for the morphological data set because of the low internal support of branches. In order to reduce the effect of homoplastic characters on the tree topologies, successive weighting (Farris, 1969) was applied to the morphological and combined data sets. The partition Homogeneity Test of PAUP\* 4.0b (Swofford, 2001) was used to assess congruence among molecular and morphological data sets. This test is equivalent to the ILD test of Farris et al. (1994), which has been employed as a method for determining whether separated data sets should be combined in a single parsimony analysis. In the present study, this test was used as a way of validate or invalidate the combined analyses. We performed the test under parsimony, using the following parameters: heuristic search, TBR branch-swapping, with 100 random addition sequences, and 500 replicates to generate the null hypothesis. Changes of morphological characters states were traced on the combined molecular trees with MacClade version 4.0 (Madison and Madison, 2000).

## RESULTS

Information of tree statistics for both individual and combined data set including tree length, number of characters in data matrices, number of variable characters, number of potentially phylogenetic informative characters, number of Fitch trees, Consistency Index (CI) and Retention Index (RI) is given in Table 4. The ILD test results suggest that partitions of data into cpDNA + nrDNA were not incongruent, although partition of data into molecular and non-molecular characters was incongruent. Most analyses with individual and combined data set produced well-supported trees with highly congruent topologies (Figs. 1-5). The sole exception refers to the South and Central American *Cleistes* clade in the analysis of non-molecular characters and *trnL-F* cpDNA data matrix (Figs. 3, 4).

The cpDNA regions of saprophytic *Pogoniopsis* could not be amplified and consequently no phylogenetic analyses involving *rps16* and *trnL-F* were conducted for this



taxon. Tests of *rbcL* amplification were successful for representatives of all genera currently recognized as Pogoniinae (results not presented), except *Pogoniopsis*. It seems that many chloroplast DNA regions can be absent from the plastid genome of *Pogoniopsis*, which are saprophytic, non-photosynthesizing plants. On the other hand, it was not possible to amplify the ITS1, ITS2 and 5.8 S region of *C. castanoides* and *C. pluriflora*, and thus the phylogenetic analyses involving these species were restricted to *rps16*, *trnL-F* sequence data and non-molecular characters.

**Phylogenetic analysis of isolated ITS, *rps16* and *trnL-F* regions** – Individual analysis of the ITS nrDNA, and *rps16* and *trnL-F* of cpDNA resulted in well-supported strict consensus trees (except for *trnL-F* cpDNA) with highly congruent topologies (Figs. 1-3). The Vanillinae genus *Epistephium*, included only in *trnL-F* data matrix, is supported as sister of *Duckeella* (Fig. 3). The genus *Pogoniopsis*, in ITS nrDNA bootstrap consensus tree (Fig. 1), is sister of all genera currently recognized as Pogoniinae, with 96% of bootstrap support (BS). The Amazonian *Duckeella*, in all isolated molecular analyses, is supported as sister of all remainder of Pogoniinae. The North American *Isotria*, *Cleistes divaricata* and *C. bifaria*, and the North American-Asiatic genus *Pogonia* form a monophyletic temperate group (Figs. 1-3). According to isolated ITS analysis, the North American *Pogonia ophioglossoides* is sister of the Eastern Asia clade, that includes *P. japonica* and *P. minor*, with BS = 90% (Fig. 1). The clade that includes *Cleistes divaricata* and *C. bifaria* is sister of *Isotria* and *Pogonia* (Figs. 1, 2). The temperate clade ((*Cleistes divaricata* + *C. bifaria*) (*Isotria* (*Pogonia ophioglossoides* (*P. japonica* + *P. minor*)))) is sister of all South and Central American *Cleistes*. The genus *Cleistes*, as currently known, is paraphyletic. The North American *C. bifaria* and *C. divaricata* are more related to *Isotria* and *Pogonia* than the remainder of South and Central American species of *Cleistes*. The South-Central American *Cleistes* form a monophyletic group (Figs. 1-3). Within Central and South American *Cleistes*, we identified some well-supported clades (*C. aphylla* + *C. pusilla*, Figs. 1-3), (*C. libonii* + *C. metallina*, Figs. 1-3), (*C. gracilis* (*C. ramboi* + *C. uliginosa*, Figs. 1, 2), (*C. exilis* + *C. cipoana*, Figs. 1, 2), although in isolated *trnL-F* cpDNA analysis the tropical clade is poorly resolved. *Cleistes tenuis*, in ITS nrDNA tree, is supported as sister of all remainder of taxa although, in *rps16* and *trnL-F* analyses, this

specie is sister of *C. castanoides*. The clade (*Cleistes metallina* + *C. libonii*) is sister of *C. paranaensis*. *Cleistes pararaensis* is supported as sister of all remaining *Cleistes* species (Figs. 1-3). *Cleistes pluriflora* and *C. itatiaie*, as presented in *rps16* matrix, are sisters of *C. gracilis* and *C. exilis*, respectively (Fig. 2).

**Non-molecular analysis** – The analysis of morphological data resulted in a poorly resolved strict consensus tree (Fig. 4). We did not perform bootstrap analyses for the morphological matrix because of the low resolution within South and Central American species of *Cleistes* and within temperate clade of Pogoniinae. According to non-molecular data matrix, Pogoniinae is supported as a paraphyletic subtribe. The inclusion of *Pogoniopsis* on the analysis reveal that this saprophytic genus is more related with the genera included in Galeolinae (*Galeola* and *Cyrtosia*), than remainder of genera currently recognized within Pogoniinae. *Duckeella*, as in all isolated, combined molecular, and total evidence data set, is supported as sister of all remainder of Pogoniinae. The temperate clade (*Isotria* + *Pogonia* + *Cleistes divaricata* + *C. bifaria*), although poorly resolved in morphological analyses, form a monophyletic group sister of the tropical clade, that includes the South and Central American *Cleistes*. The group formed by South and Central American *Cleistes*, as in all isolated and combined analyses (Figs. 1-3, 5), are supported as monophyletic, although the relationships within this clade are unresolved (Fig. 4).

**Combined molecular data set** – Analyses of combined molecular matrix from ITS, *rps16*, *trnL-F* data set resulted in a single bootstrap consensus tree (Fig. 5). The combined molecular data set resulted in a tree with topology highly congruent with individual molecular analyses (Fig. 5). The Amazonian *Duckeella*, as in isolated molecular data (Fig. 1-3), is sister of all remainder of Pogoniinae (BS = 100%). *Isotria*, *Pogonia* and *Cleistes bifaria* forms a North American-Asiatic group with BS = 100%. This temperate clade is sister of remaining Central and South American *Cleistes*. The genus *Cleistes* is paraphyletic. The North American *C. bifaria* is more related with the North American *Pogonia ophioglossoides* and *Isotria verticillata* than remainder of Central and South American *Cleistes*. The tropical species of *Cleistes* form a monophyletic group (BS = 100%). *Cleistes tenuis*, as reported in isolated molecular analyses, is sister of remaining

tropical species. The clade (*Cleisthes metallina* + *C. libonii*, BS = 100%) is the sister group of *C. paranaensis*, and this species is supported as sister *C. bella* (BS = 100%). Following *Cleisthes bella*, other well-supported clades are presented (*Cleisthes pusilla* + *C. aphylla*), (*C. itatiaie* (*C. cipoana* + *C. exilis*), and (*C. gracilis* (*C. ramboi* + *C. uliginosa*), showing strong bootstrap support (BS = 100%).

## DISCUSSION

**Phylogeny within subtribe Pogoniinae** – The molecular ITS nrDNA and morphological data do not support the monophyly of the subtribe Pogoniinae. Although Cameron and Chase (1999) and Cameron et al. (1999) reports Pogoniinae as a monophyletic group, the Amazonian genus *Pogoniopsis* was not included on their analyses. In according to our molecular (ITS nrDNA) and morphological data matrix, the inclusion of the saprophytic *Pogoniopsis* of the analyses makes the subtribe paraphyletic. *Pogoniopsis*, in the nuclear ribosomal ITS data matrix, is supported as sister of *Duckeella*. The morphological data set, although show a low resolution within South and Central American *Cleisthes* clade, reveal strong congruence with all isolated and combined molecular, and total evidence data set. According to morphological data matrix, the genus *Pogoniopsis* is closely related to the Galeolinae (tribe Vanilleae; sensu Cameron, 2003) *Galeola* and *Cyrtosia* than the remainder of genera currently recognized within Pogoniinae. *Pogoniopsis* presents two saprophytic species with simpodial habit, rudimentary leaves, terminal inflorescences, absence of abscission layer between flower and ovary, fleshy and yellow colored indehiscent fruits and sclerified and not tunicate seeds (Fig. 6), all characteristics in common with species currently recognized within Galeolinae (Dressler, 1993). The sclerified, not tunicate and ovoid seeds of *Pogoniopsis* (Fig. 4D), therefore, are similar to reported for *Vanilla* species (Cameron and Chase, 1998). According to Cameron et al. (1999) the subtribe Pogoniinae is sister of Galeolinae. These two subtribes, associated with Vanillinae, form the subfamily Vanilloideae (Cameron et al., 1999; Chase et al., 2003; Cameron, 2004; Freudenstein et al., 2004) (i.e., tribe Vanilleae, sensu Dressler, 1993). These conclusions are corroborated with the ITS nrDNA and morphological data matrix (Fig. 1). Actually, Vanillinae and Galeolinae are combined in a singular group (tribe

Vanilleae) and Pogoniinae is ranked to the level of tribe (Pogoniieae) (Cameron, 2003). Although *Vanilla* present sclerified and not tunicate ovoid seeds, as we observed in *Pogoniopsis*, this Panropical genus is composed by photosynthetic and monopodial plants with climber habit, aerial roots, lateral inflorescences, presence of abscission layer between flower and ovary, and green and dehiscent fruits (Dressler, 1993). Although abscission layer between flower and ovary has been used as a sinapomorphic character in defining the vanilloid orchid group (Cameron and Chase, 1999; Cameron et al., 1999), as well as we demonstrated for *Pogoniopsis*, another genera currently recognized within Galeolinae may present persistent perianth parts (Dressler, 1993).

The results of individual molecular and morphological, and combined data set support *Duckeella* as sister of all remainder of Pogoniinae. This genus, although included in Pogoniinae in recent morphological and molecular studies (Dressler, 1993; Cameron et al., 1999; Cameron and Chase, 1999), lack the synapomorphic characters that define the subtribe. *Duckeella* is characterized by densely fasciculate and numerous fibrous roots, solid stems with basally whorled and linear leaves, lateral, ramified and multiflored inflorescences, yellow flowers, lip poorly differenced from petals and column with appendages on either side of the versatile anthers. Our molecular and morphological data, and in accordance with the assertion of Slatchetko (1995), support *Duckeella* as distinct of remaining genera currently recognized as Pogoniinae.

The genera of Pogoniinae (i.e., *Isotria*, *Pogonia* and *Cleistis*) form a monophyletic unit characterized by the presence of few fibrous roots, hollow stems, generally elliptic, lanceolate or ovate leaves, terminal and not ramified inflorescence with one to few white, pink or violet colored flowers, generally with a tube-like lip and with a long and parallel disposed column. Although Cameron and Chase (1999) and Cameron et al. (1999) reports the North American-Asiatic species of Pogoniinae as the most derived within subtribe, all individual and combined data set support the temperate clade as most basal and sister of the tropical clade. The molecular and morphological data support *Cleistis* as a paraphyletic genus. The North American *Cleistis bifaria* and *C. divaricata*, and in according to Cameron and Chase (1999), and Cameron et al. (1999) molecular and morphological data, are more related to the North American genus *Isotria* and the North-American-Asiatic genus *Pogonia* than South and Central American *Cleistis*. The remainder of South and

Central American *Cleistes* form a monophyletic unit supported by both morphological and molecular sequence data. The genus *Cleistes* is characterized by tuberous roots (Cameron and Chase, 1999), presence of nectariferous glands on the basis of the lip and South and/or Central American distribution. *Isotria verticillata* is sister of the clade formed by North American *Cleistes* and the North American-Asiatic monophyletic genus *Pogonia*. It shares chromosome number of  $2n = 18$ , sinuous epidermal cells, hypostomatous leaves and North American - Western Asia distribution as synapomorphies (Cameron and Chase, 1999).

***Phylogeny within South and Central American Cleistes clade*** – The morphological data had little effect on the resolution within genus *Cleistes* probably because of the restricted number of morphological characters used in the analysis. Even though, the molecular individual and combined data set resulted in well-resolved trees (except for *trnL-F* cpDNA) with congruent topologies. The data presented here is low congruent with the species "alliances" proposed by Hoehne (1940) and Pabst and Dungs (1975) in its treatments for the Brazilian Orchids. Traditionally, the species of *Cleistes* were artificially defined, and the classification of the Brazilian *Cleistes* has been based mainly in differences on the form and size of lip (Hoehne, 1940; Pabst and Dungs 1975). Recent studies performed by Pansarin and Barros (in prep.), and in accordance with the data presented here, reveal that these characters are not much consistent in species delimitation within *Cleistes*.

The analyses revealed a most basal position for the marshy and largely distributed *C. tenuis* (Figs. 1-3, 5) and *C. castanoides* (Figs. 2, 3, 5). *Cleistes tenuis* is characterized by small plants, delicate and white flowers with 3-lobed lip, while *C. castanoides* presents large plants, large and generally pink coloured flowers with 1-lobed lip. The clade A, represented by *Cleistes metallina* and *C. libonii* (Fig. 5), presents as principal synapomorphies the presence of large plants with evident leaves and large and pink flowers. *Cleistes libonii* is distinguishable of *C. metallina* by presence of dark veins on the lip and by its occurrence in Atlantic Forests regions, mainly on road margins (Pansarin, 2003), while *C. metallina* occurs in wet camps adjacent to “cerrado” vegetation in interior Brazil. *Cleistes paranaensis*, that occurs mainly in dry soils, in “cerrado” vegetation, and presents large pink flowers with long hairs on central crest, and discrete veins on the lip, is

supported as sister of the foliose and vinaceous large flowered *C. bella* in both molecular combined, and total evidence data set. *Cleistes bella* occurs in "campo sujo" vegetation (grasslands with shrubs) in "cerrado" areas of central (Goiás, Distrito Federal and Minas Gerais states) Brazil. *Cleistes bella* is sister of the clade B formed by *C. aphylla* and *C. pusilla*, both small plants with scale like leaves and 1-2 delicate flowers. *Cleistes pusilla* is a rare species distributed in central Brazil, frequently misnamed as *C. aphylla* by several authors (Pansarin, 2004). *Cleistes pusilla* is easily distinguishable from *C. aphylla* by its largest and pink colored flowers, by presence purple veins on the lip and by its large central crest made by white papillae and with yellow apices (Pansarin, 2004). The clade C includes *Cleistes itatiaie*, which occurs in altitudinal camps of South and Southern Brazil, presents a large lip without dark veins and small apical lobe, and the closely related *C. cipoana* and *C. exilis*, which presents reduced leaves, evident dark veins on the lip, and occurs in wet camps in central (Minas Gerais, Goiás, and Bahia states) Brazil. The clade D includes *Cleistes gracilis*, a largely distributed specie that occurs mainly in quartzite islands, in montane regions of Brazil, and the closely related *C. ramboi* and *C. uliginosa*, both species occurring in wet camps adjacent to gallery forests that present falcate lateral lobes, a long prolongation between the lateral and apical lobe and lip with dark and evident veins. *Cleistes ramboi* and *C. uliginosa* are distinguishable by the presence of hairs vs. papillae, composing the apical portion of its central crest, respectively.

***Taxonomic implications*** – Both molecular and morphological data support *C. divaricata* and *C. bifaria* as more related to *Isotria* and *Pogonia* than Central and South American *Cleistes* and, in according the present data, is necessary taxonomic changes on the group, since the name *Cleistes* is based in *C. grandiflora* (Aubl.) Schltr., a specie distributed over South and Central America. These modifications were previously suggested by Cameron and Chase (1999), who proposed two alternatives: (1) the creation of a new genus for North American *Cleistes*, or (2) the combination of *Cleistes divaricata*, *C. bifaria*, *Isotria* and *Pogonia* in a singular genus, *Pogonia* Juss. Cameron and Chase (1999), therefore, report that these changes can't be made until studies of additional *Cleistes* species were completed. Now, after the inclusion of the majority of South and Central American *Cleistes* in the analyses, is possible to conclude that the South and Central

American *Cleistes* form a monophyletic tropical group, as previously suggested by Cameron and Chase (1999) and Cameron et al. (1999). We propose the creation of a new genus for *Cleistes divaricata* and *C. bifaria*, because *Isotria* with its whorled disposed leaves and *Pogonia* with its long hairs on the lip are well supported as distinct genera on both individual morphological and molecular, and combined molecular and total evidence data set. The molecular and morphological data also support the dissociation of the Amazonian *Duckeella* from the Pogoniinae, and in accordance with the assertion of Szlachetko (1995) this genus can be placed in a distinct subtribe (i.e., Duckeellinae). Although *Pogoniopsis* has been currently included in Pogoniinae (Cameron and Chase, 1999; Cameron et al., 1999), according our data, this genus is more related to the genera including in the vanilloid Galeolinae (tribe Vanilleae; sensu Cameron 2003) than remaining Pogoniinae, and can be transferred for this subtribe. Within South and Central American *Cleistes*, as presented in all individual and combined molecular data matrices, *C. cipoana* is closely to *C. exilis*. Morphologically, this species are similar and probably are treated as synonyms in taxonomic revision for the genus *Cleistes* (Pansarin and Barros, in prep). Similarly, *C. ramboi* is closely related with *C. uliginosa*. However, these species differ in relation to their central crest. In *C. ramboi* the central crest is made by hairs, while *C. uliginosa* is made by papillae.

***Phylogenetic utility of the molecular and morphological characters in Pogoniinae –***

Our molecular data provided a largest number of phylogenetically informative characters, being very important for establishing the relationships within South and Central American *Cleistes*. Among genera, these characters are also important and highly congruent with morphological data matrix, as well as reported in others groups in Orchidaceae (e.g., Koehler et al., 2002), including Pogoniinae (Cameron and Chase, 1999), being important in determining synapomorphies that allow the recognition of clades and phylogenetic position within vanilloid orchids. In saprophytic orchids, as occurs with several genera of basal Epidendroideae and vanilloid orchids (Dressler, 1993), and as well as we reported for the South American *Pogoniopsis*, all cpDNA regions actually used in systematic studies appear to be absent in its plastid genome, but see Cameron, (2004) for the saprophytic genus *Cyrtosia* (Galeolinae). Thus, the use of nuclear markers (e.g., ITS nrDNA) and

accurate morphological and anatomical studies can be important in the establishment of the phylogenetic and taxonomic position of achlorophyllous orchids in the family. Although the use of ITS nr DNA has been questionable because of paralogy in some plant groups (Bailey et al., 2003) and the use of morphology has been conflicting in several orchid studies (e.g., van den Berg et al., 2000; Kores et al., 2001; Pridgeon et al., 2001), in Pogoniinae, and in according to Cameron and Chase (1999), the use of these non-plastid markers appears to be adequate, producing trees with topology strongly congruent with both plastid and combined (molecular and morphological) data set, and offering information by the comprehension of this primitive orchid group, and providing clues to the evolution of the large and diverse family Orchidaceae.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank João A. N. Batista, David Miller and Ludmila Mickeliunas, Antonio Toscano de Brito and André O. Simões for help in the field work; Erik Rothacker and Dough Goldman for provision of North American plant material; Marlies Sazima, Kenneth M. Cameron, Antonio T. de Brito, Samantha Koehler, and Fábio de Barros for valuable suggestions; Ludmila Mickeliunas, Lúcia G. Lohmann, Samantha Koehler, Cristiane N. Rodrigues, Mouriza M. S. Ferreira, Lucimar B. Motta and Sílvia Blanco for technical assistance in lab work and data analyses; Marie-Anne Van Sluys to open the Laboratory of Molecular Biology of the Department of Botany of the Universidade de São Paulo for our use. This study is part of a PhD thesis by the first author for the `pós-graduação` course in Plant Biology at the 'Universidade Estadual de Campinas' (São Paulo, Brazil). Provision of funds by FAPESP (grant 00/11015-9) and CNPq is acknowledged.

<sup>4</sup>E-mail: epansarin@uol.com.br

#### **LITERATURE CITED**

BATEMAN, R. M., P. M. HOLLINGSWORTH, J. PRESTON, L. YI-BO, A. M. PRIDGEON, AND M. W. CHASE. 2003. Molecular phylogenetics and evolution of



- Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 142: 1-40.
- BAILEY, C. D., T. G. CARR, S. A. HARRIS, AND C. E. HUGHES. 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 435-455.
- CAMERON, K. M. 1999. Phylogeny and biogeography of Pogoniinae (Vanilloideae: Orchidaceae). *North American Native Orchid Journal* 5: 152-163.
- CAMERON, K. M. 2003. Vanilloideae. In A. M. Pridgeon, P. J. Cribb, M. W. Chase, and F. N. Rasmussen [eds.], *Genera Orchidacearum*. vol 3, Oxford University Press, Oxford.
- CAMERON, K. M. 2004. Utility of plastid *psaB* gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 1157-1180.
- CAMERON, K. M., AND W. C. DICKISON. 1998. Foliar architecture of vanilloid orchids: insights into the evolution of reticulate leaf venation in monocotyledons. *Botanical Journal of the Linnean Society* 128: 45-70.
- CAMERON, K. M., AND M. W. CHASE. 1998. Seed morphology of vanilloid orchids (Vanilloideae: Orchidaceae). *Lindleyana* 13: 148-169.
- CAMERON, K. M., AND M. W. CHASE. 1999. Phylogenetic relationships of Pogoniinae (Vanilloideae, Orchidaceae): an herbaceous example of the eastern North America – eastern Asia phytogeographic disjunction. *Journal of Plant Research* 112: 317-329.
- CAMERON, K. M., M. W. CHASE, W. M. WHITTEN, P. J. KORES, D. C. JARRELL, V. A. ALBERT, T. YUKAWA, H. G. HILLS, AND D. H. GOLDMAN. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 86: 208-224.
- CHASE, M. W., AND H. M. HILLS. 1991. Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40: 215-220.
- CHASE, M. W., K. M. CAMERON, R. L. BARRETT, AND J. V. FREUDENSTEIN. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In K. W. Dixon, S. P. Kell, R. L. Barrett, and P. J. Cribb [eds.], *Orchid conservation*, 69-89. Natural History Classification, Kota Kinabalu, Sabah.

- CLEMENTS, M. A., D. L. JONES, I. K. SHARMA, M. E. NIGHTINGALE, M. J. GARRATT, K. J. FITZGERALD, A. M. MACKENZIE, AND B. P. J. MOLLOY. 2002. Phylogenetics of Diurideae (Orchidaceae) based on the internal transcribed spacers (ITS) regions of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* 17: 135-171.
- DOYLE, J. J., AND J. S. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- FARRIS, J. S. 1969. A successive approximations approach to character weighting. *Systematic Zoology* 18: 274-385.
- FARRIS, J. S., M. KALLERSJO, A. G. KLUGE, AND C. BULT. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-320.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- FREUDENSTEIN, J. V., C. VAN DEN BERG, D. H. GOLDMAN, P. J. KORES, M. MOLVRAY, AND M. W. CHASE. 2004. An expanded plastid DNA phylogeny of Orchidaceae and analyses of Jackknife branch support strategy. *American Journal of Botany* 91: 149-157.
- GREGG, K. B. 1989. Reproductive biology of the orchid *Cleistes divaricata* (L.) Ames var. *bifaria* Fernald growing in West Virginia meadow. *Castanea* 54: 57-78.
- HOEHNE, F. C. 1940. Orchidaceae. In F. C. Hoehne [ed.], *Flora Brasílica*. vol. 12. Fasc. 1, 1-254, tab. 1-153. Instituto de Botânica, São Paulo.
- KOEHLER, S., N. H. WILLIAMS, W. M. WHITTEN, AND M. C. E. AMARAL. 2002. Phylogeny of the *Bifrenaria* (Orchidaceae) complex based on morphology and sequence data from nuclear rDNA internal transcribed spacers (ITS) and chloroplast *trnL-trnF* region. *International Journal of Plant Sciences* 163: 1055-1066.
- KORES, P. J., M. MOLVRAY, P. H. WESTON, S. D. HOPPER, A. P. BROWN, K. M. CAMERON, AND M. W. CHASE. 2001. A phylogenetic analysis of Diurideae (Orchidaceae) based on plastid DNA sequence data. *American Journal of Botany* 88: 1903-1914.
- MADDISON, W. P., AND D. R. MADDISON. 2000. *MacClade analysis of phylogeny and character evolution*, version 4. Sunderland, Mass, Sinauer Associates.

- MEHRHOFF, L. A. 1983. Pollination in the genus *Isotria* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 70: 1444-1453.
- NIXON, K. C., AND J. M. CARPENTER. 1993. On outgroups. *Cladistics* 9: 413-426.
- OXELMAN, B., M. LIDÉN, AND D. BERGLUND. 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* 206: 393-410.
- PABST, G. F., AND F. DUNGS. 1977. Orchidaceae Brasiliensis. vol. 2. Kurt Schmiersow: Hildeshein.
- PANSARIN, E. R. 2003. Biologia floral de *Cleistes macrantha* (Barb. Rodr.) Schltr. (Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae). *Revista Brasileira de Botânica* 26: 73-80.
- PANSARIN, E. R. 2004. *Cleistes pusilla*: a new species from Central Brazil. *Kew Bulletin* 59: 555-558.
- PRIDGEON, A. M., R. SOLANO, AND M. W. CHASE. 2001. Phylogenetic relationships in Pleurothallidinae (Orchidaceae): combined evidence from nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany* 88: 2286-2308.
- RASMUSSEN, F. N. 1985. Orchids. In R. M. Dahlgren, H. T. Clifford, and P. F. Yeo [eds.], *The families of the monocotyledons*, 249-274. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- SMITH, S. D., R. S. COWAN, K. B. GREGG, M. W. CHASE, N. MAXTED, AND M. F. FAY. 2004. Genetic discontinuities among populations of *Cleistes* (Orchidaceae, Vanilloideae) in North America. *Botanical Journal of the Linnean Society* 145: 87-95.
- SOLTIS, D. E., AND P. S. SOLTIS. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic systematics. In D. E. Soltis, P. S. Soltis, and J. J. Doyle [eds.], *Molecular systematics of plants II: DNA sequencing*, 1-42. Kluwer Academic, Boston, Massachusetts, USA.
- SUN, Y, D. Z. SKINNER, G. H. LIANG, AND S. H. HULBERT. 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 26-32.
- SWOFFORD, D. L. 2001. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony version 4.b.8. Computer program distributed by Sinauer Associates, Inc.

- SZLACHETKO, D. L. 1995. Systema Orchidarium. *Fragmenta Floristica et Geobotanica Supplementum* 3: 1-152.
- TABERLET, P., L. GIELLY, G. PAUTOU, AND J. BOUVET. 1991. Universal primer for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- THIEN, L. B., AND B. G. MARCKS. 1972. The floral biology of *Arethusa bulbosa*, *Calopogon tuberosus*, and *Pogonia ophioglossoides* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* 50: 2319-2325.
- THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN, AND D. G. HIGGINS. 1997. The ClustalX-Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- VAN DEN BERG, C., W. E. HIGGINS, R. L. DRESSLER, W. M. WHITTEN, M. A. SOTO-ARENAS, A. CULHAM, AND M. W. CHASE. 2000. A phylogenetic analyses of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from nuclear transcribed spacers (ITS) of ribosomal DNA. *Lindleyana* 15: 96-114.

TABLE 1. Taxa analyzed in the molecular study, data collected and GenBank accessions numbers.

Taxon	Voucher	Data collected	GenBank accessions
<i>Cleistes aphylla</i> (Barb. Rodr.) Hoehne	<i>Pansarin and Mickeliunas 899</i> (UEC)	ITS, <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes aphylla</i> (Barb. Rodr.) Hoehne	<i>Pansarin and Mickeliunas 933</i> (UEC)	<i>rps16</i>	
<i>Cleistes aphylla</i> (Barb. Rodr.) Hoehne	<i>Mickeliunas and Pansarin 14</i> (UEC)	ITS, <i>rps16</i>	
<i>Cleistes bella</i> Rchb. f & Warm.	<i>Pansarin and Mickeliunas 921</i> (UEC)	<i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes bella</i> Rchb. f & Warm.	<i>Mickeliunas and Pansarin s.n.</i> (UEC)	ITS, <i>rps16</i>	
<i>Cleistes bifaria</i> (Fernald) Catling & Gregg	<i>Rothacker 60</i> (UEC)	ITS, <i>rps16</i> , <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes castanoides</i> Hoehne	<i>Pansarin and Mickeliunas 873</i> (UEC)	<i>rps16</i>	
<i>Cleistes castanoides</i> Hoehne	<i>Pansarin and Mickeliunas 932</i> (UEC)	<i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes castanoides</i> Hoehne	<i>Pansarin et. al. s.n.</i> (UEC)	<i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes cipoana</i> Hoehne	<i>Pansarin and Mickeliunas 915</i> (UEC)	ITS, <i>rps16</i> , <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes exilis</i> Hoehne	<i>Pansarin and Mickeliunas 898</i> (UEC)	ITS, <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes exilis</i> Hoehne	<i>Pansarin and Mickeliunas 923</i> (UEC)	<i>rps16</i> , <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes exilis</i> Hoehne	<i>Mickeliunas and Pansarin 40</i> (UEC)	ITS, <i>rps16</i>	
<i>Cleistes exilis</i> Hoehne	<i>Pansarin and Simões 783</i> (UEC)	ITS, <i>rps16</i>	

TABLE 1. Continued.

Taxon	Voucher	Data collected	GenBank accessions
<i>Cleistes divaricata</i> (L.) Ames	Goldman and Brzuszek 2287 (UEC)	ITS, <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes gracilis</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	Pansarin and Mickeliunas 908 (UEC)	<i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes gracilis</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	Pansarin and Mickeliunas 1123 (UEC)	ITS, <i>rps16</i>	
<i>Cleistes gracilis</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	Mickeliunas and Pansarin 46 (UEC)	ITS, <i>rps16</i> , <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes itatiaie</i> Pabst	Pansarin and Mickeliunas 1019 (UEC)	ITS, <i>rps16</i> , <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes itatiaie</i> Pabst	Pansarin and Mickeliunas 1007 (UEC)	<i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes itatiaie</i> Pabst	Pansarin and Mickeliunas 1129 (UEC)	ITS, <i>rps16</i>	
<i>Cleistes libonii</i> (Rchb. f.) Schltr.	Pansarin 857 (UEC)	ITS, <i>rps16</i> , <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes libonii</i> (Rchb. f.) Schltr.	Pansarin and Mickeliunas 972 (UEC)	ITS, <i>rps16</i> , <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes metallina</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	Pansarin et al. 776 (UEC)	<i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes metallina</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	Pansarin and Mickeliunas 1145 (UEC)	<i>rps16</i> , <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes metallina</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	Pansarin and Mickeliunas 909 (UEC)	ITS	
<i>Cleistes paranaensis</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	Mickeliunas and Pansarin 31 (UEC)	ITS	
<i>Cleistes paranaensis</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	Pansarin and Mickeliunas 920 (UEC)	<i>rps16</i> , <i>trnL-F</i>	

TABLE 1. Continued.

Taxon	Voucher	Data collected	GenBank accessions
<i>Cleistes paranaensis</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	<i>Pansarin and Batista 759</i> (UEC)	<i>rps16</i>	
<i>Cleistes paranaensis</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	<i>Simões et al. s.n.</i> (UEC)	<i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes pluriflora</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	<i>Pansarin et al. 782</i> (UEC)	<i>rps16, trnL-F</i>	
<i>Cleistes pusilla</i> Pansarin	<i>Pansarin and Mickeliunas 901</i> (UEC)	<i>rps16</i>	
<i>Cleistes pusilla</i> Pansarin	<i>Pansarin and Mickeliunas 922</i> (UEC)	ITS, <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes ramboi</i> Pabst	<i>Pansarin and Mickeliunas s.n.</i> (UEC)	ITS, <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes ramboi</i> Pabst	<i>Pansarin et al. s.n.</i> (UEC)	<i>rps16, trnL-F</i>	
<i>Cleistes tenuis</i> Rchb. f.	<i>Mickeliunas and Pansarin 13</i> (UEC)	ITS, <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes tenuis</i> Rchb. f.	<i>Pansarin and Mickeliunas 940</i> (UEC)	ITS, <i>rps16, trnL-F</i>	
<i>Cleistes uliginosa</i> Pabst	<i>Pansarin and Mickeliunas 872</i> (UEC)	ITS, <i>trnL-F</i>	
<i>Cleistes uliginosa</i> Pabst	<i>Pansarin and Mickeliunas 937</i> (UEC)	<i>rps16</i>	
<i>Cleistes uliginosa</i> Pabst	<i>Pansarin and Mickeliunas 984</i> (UEC)	ITS, <i>rps16</i>	
<i>Duckeella adolphii</i> Porto & Brade	<i>Pansarin 1165</i> (INPA)	ITS, <i>rps16, trnL-F</i>	
<i>Epistephium sclerophyllum</i> Lindl.	<i>Mickeliunas and Pansarin 4</i> (UEC)	<i>trnL-F</i>	

TABLE 1. Continued.

Taxon	Voucher	Data collected	GenBank accessions
<i>Epistephium sclerophyllum</i> Lindl.	<i>Mickeliunas and Pansarin 953</i> (UEC)	<i>trnL-F</i>	
<i>Isotria verticillata</i> (Muhl. Ex Willd.) Raf.	<i>Rothacker 69</i> (UEC)	ITS, <i>rps16</i> , <i>trnL-F</i>	
<i>Pogonia japonica</i> Rchb. f.	<i>Cameron 1034</i> (NY)	ITS	AF151011
<i>Pogonia minor</i> (Makino) Makino	<i>Cameron 1033</i> (NY)	ITS	AF151010
<i>Pogonia ophioglossoides</i> (L.) Jussieu	<i>Rothacker 70</i> (UEC)	ITS, <i>rps16</i> , <i>trnL-F</i>	
<i>Pogoniopsis nidus-avis</i> Rchb. f.	<i>Mickeliunas and Pansarin 45</i> (UEC)	ITS	
<i>Vanilla bahiana</i> Hoehne	<i>Pansarin 727</i> (UEC)	ITS, <i>trnL-F</i>	
<i>Vanilla edwallii</i> Hoehne	<i>Pansarin 840</i> (UEC)	<i>rps16</i>	
<i>Vanilla pompona</i> Schiede	<i>Pansarin 1167</i> (UEC)	ITS, <i>trnL-F</i>	



TABLE 2. Non-molecular characters and character polarization.

Character	Character polarization
1. Distribution	(0) Pantropical, (1) South America, (2) North America/Asia
2. Habit	(0) photosynthesizing herbs, (1) saprophytic herbs
3. Grow habit	(0) monopodial, (1) simpodial
4. Aerial roots	(0) absent, (1) present
5. Tuberous roots	(0) absent, (1) present
6. Tuberous roots center	(0) solid, (1) hollow
7. Stem	(0) solid, (1) hollow
8. Leaves	(0) evident, (1) reduced to scales
9. Leaf disposition	(0) whorled, (1) alternate
10. Petiole	(0) absent, (1) present
11. Leaf shape	(0) linear or oblong, (1) ovate elliptic or acute
12. Apical leave	(0) less developed than median (1) most developed than median
13. Leaf margin ornamentation	(0) absent, (1) present
14. Epicuticular wax ornamentation	(0) absent (flat), (1) present (as platelets)
15. Raphides in leaves	(0) absent, (1) present
16. Stomata distribution	(0) amphistomatous, (1) hypostomatous
17. Inflorescence	(0) lateral, (1) terminal
18. Inflorescence type	(0) raceme, (1) solitary escape
19. Abscission layer between flower and ovary	(0) absent, (1) present
20. Calyculus	(0) absent or not prominent, (1) present
21. Lip	(0) 1-lobate, (1) 3-lobate
22. Lip-column adnation	(0) free, (1) fused margins
23. Central crest made by	(0) hairs, (1) papillae

TABLE 2. Continued.

Character	Character polarization
24. Glandular nectaries	(0) absent, (1) present
25. Veins on the lip	(0) absent, (1) present
26. Prolongation in the apical lobe	(0) absent or not prominent, (1) present
27. Form of column	(0) straight, (1) arched
28. Stigma shape	(0) concave, (1) flat
29. Versatile anther	(0) absent, (1) present
30. Form of the anther apices	(0) not emarginated, (1) emarginated
31. Pollen shed as	(0) monads, (1) tetrads
32. Pollen coloration	(0) white, (1) yellow
33. Fruit type	(0) indehiscent, (1) dehiscent
34. Fruit coloration	(0) green, (1) yellow or red colored
35. Seed type	(0) not tunicate, (1) tunicate
36. Seed form	(0) fusiform, (1) ovoid, (2) polyhedral
37. Seed coat sclerification	(0) absent, (1) present

TABLE 3. Taxa used in the study and non-molecular data matrix.

Taxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
<i>Cleistes aphylla</i>	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleistes batistana</i>	1	0	1	0	1	?	1	0	1	0	1	0	0	0	1	?	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleistes bella</i>	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleistes bifaria</i>	2	0	1	0	0	na	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	?	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0
<i>Cleistes castanoides</i>	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleistes caloptera</i>	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleistes cipoana</i>	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleistes divaricata</i>	2	0	1	0	0	na	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	?	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0
<i>Cleistes exilis</i>	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleistes gracilis</i>	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleistes itatiaie</i>	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleistes libonii</i>	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleistes paranaensis</i>	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleistes pluriflora</i>	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0

TABLE 3. Continued.

Taxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
<i>Cleisthes pusilla</i>	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleisthes ramboi</i>	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleisthes tenuis</i>	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cleisthes uliginosa</i>	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
<i>Cyrtosia septentrionalis</i>	2	1	1	0	0	na	0	1	1	0	1	0	?	0	?	?	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1
<i>Duckeella adolphii</i>	1	0	1	0	0	na	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	
<i>Epistephium sclerophyllum</i>	1	0	1	0	0	na	1	0	1	0	1	0	0	0	?	?	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	2	0
<i>Galeola hydra</i>	2	1	1	0	0	na	0	1	1	0	1	0	?	0	?	?	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	1
<i>Isotria verticillata</i>	2	0	1	0	0	na	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	
<i>Pogonia</i>	2	0	1	0	0	na	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	
<i>ophioglossoides</i>																																					
<i>Pogoniopsis nidus-avis</i>	1	1	1	0	0	na	0	1	1	0	1	0	?	0	?	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1
<i>Vanilla bahiana</i>	0	0	0	1	0	na	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	
<i>Vanilla edwallii</i>	0	0	0	1	0	na	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	

? = missing data, na = not applicable

TABLE 4. Summary of tree statistics, including tree length, number of characters in data matrices, number of variable characters, number of potentially phylogenetic informative characters, number of Fitch trees, number of excluded characters, Consistency Index (CI) and Retention Index (RI) for individual and combined data set.

Parameter	ITS	<i>rps16</i>	<i>trnL-F</i>	Molecular combined	Morphology
Characters in matrix	768	936	478	2180	37
Variable characters	514 (66.9%)	585 (62.5%)	201 (42%)	1147 (52.6%)	36 (97.2%)
Phylogenetically informative characters	399 (51.9%)	244 (26%)	145 (30.3%)	528 (24.2%)	34 (91.8%)
Fitch trees	6	30	30	1	78
Steps	1285	982	345	2025	59
CI	0.71	0.79	0.80	0.79	0.64
RI	0.79	0.71	0.86	0.67	0.85

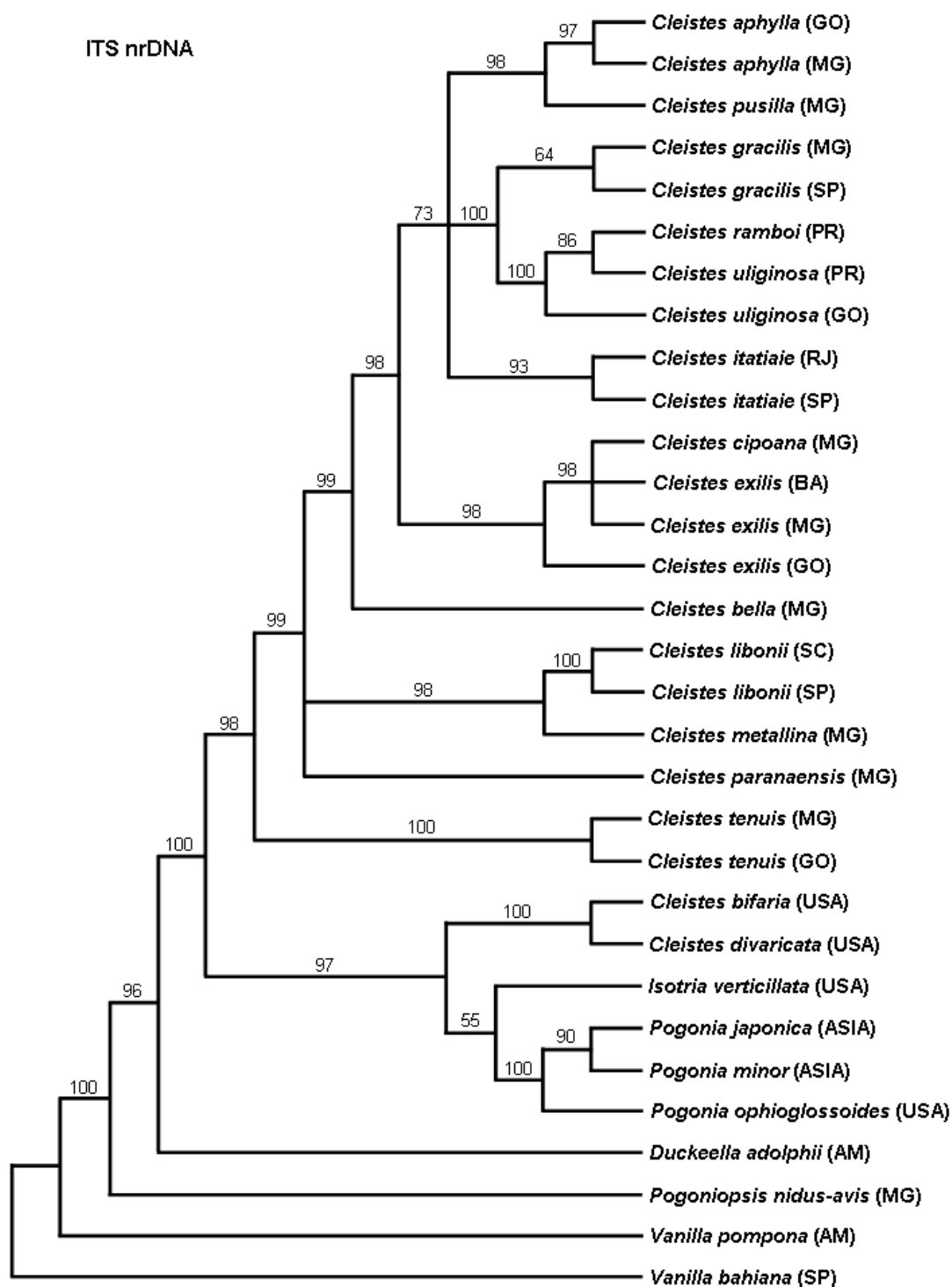


Fig. 1

Fig. 1. Bootstrap consensus tree from individual ITS nrDNA. Characters between parenthesis = abbreviation of Brazilian states; AM: Amazonas, BA: Bahia, GO: Goiás, MG: Minas Gerais, PR: Paraná, RJ: Rio de Janeiro, SC: Santa Catarina, and SP: São Paulo; country: USA; or continent: ASIA. Bootstrap values >50% are reported above the branches.

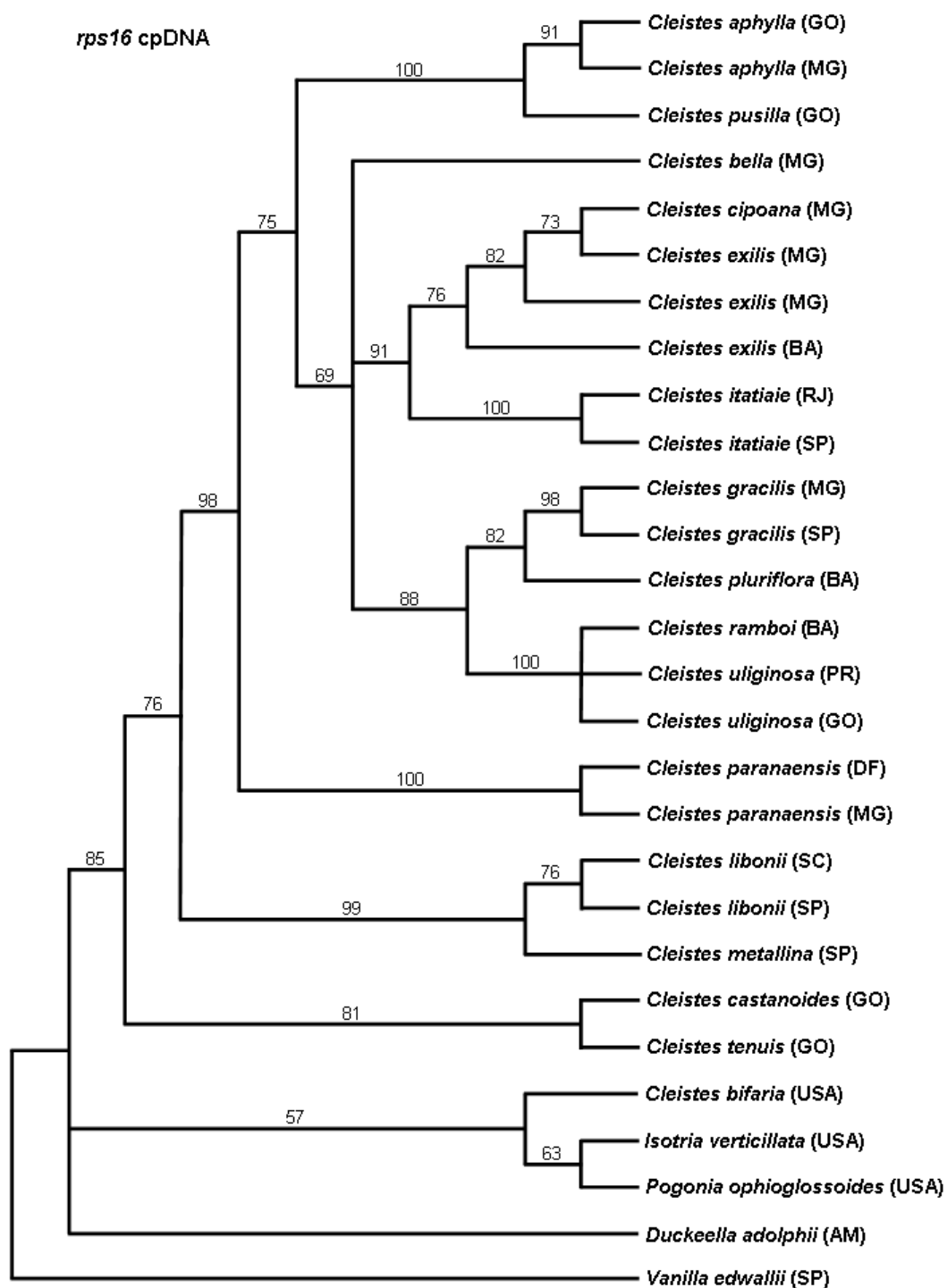


Fig. 2

Fig. 2. Bootstrap consensus tree from individual *rps16* cpDNA. Characters between parenthesis = abbreviation of Brazilian states; AM: Amazonas, BA: Bahia, DF: Distrito Federal, GO: Goiás, MG: Minas Gerais, PR: Paraná, RJ: Rio de Janeiro, SC: Santa Catarina, and SP: São Paulo; and country: USA. Bootstrap values >50% are reported above the branches.

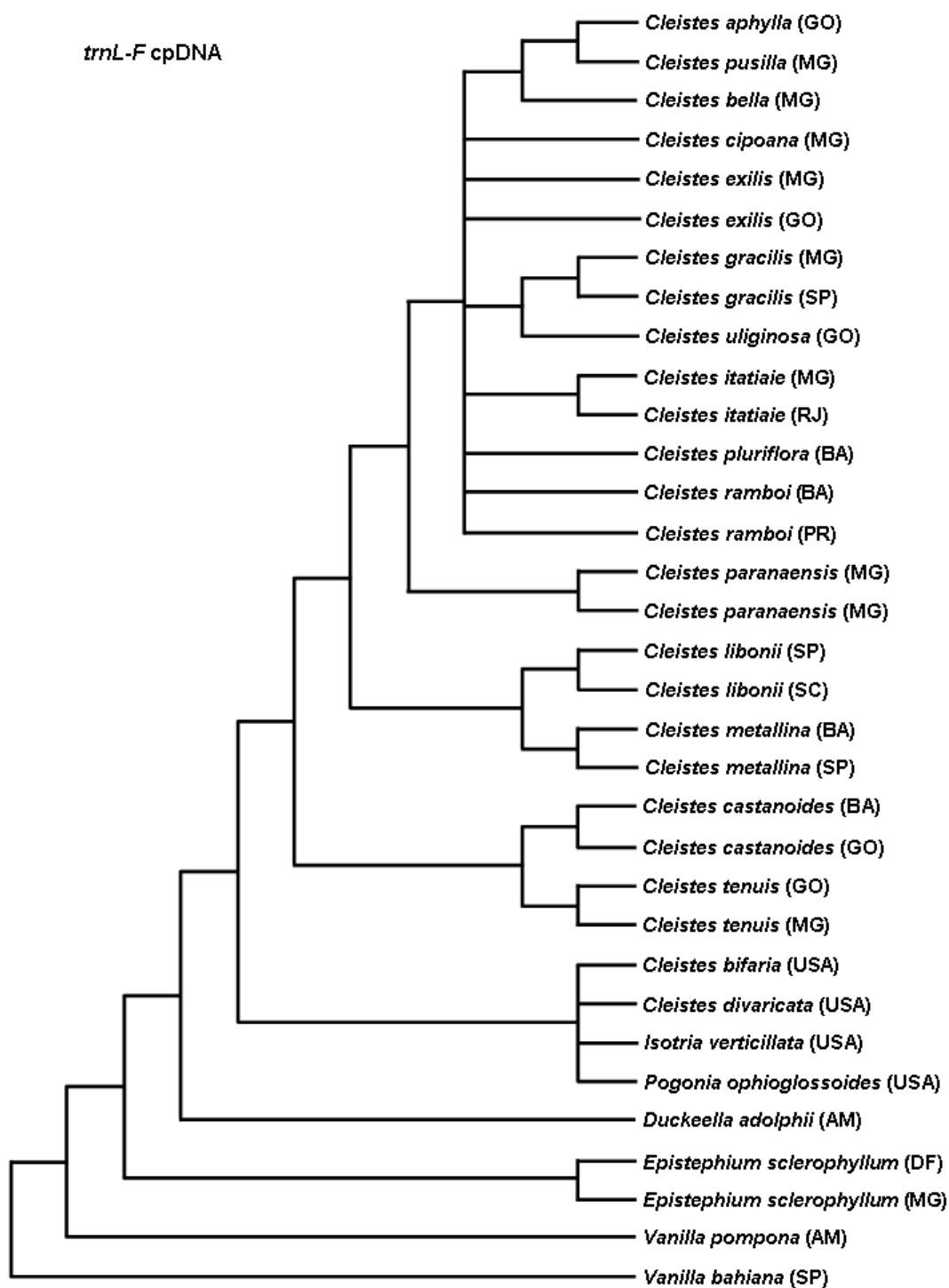


Fig. 3

Fig. 3. Strict consensus tree from individual *trnL-F* cpDNA. Characters between parenthesis = abbreviation of Brazilian states; AM: Amazonas, BA: Bahia, DF: Distrito Federal, GO: Goiás, MG: Minas Gerais, PR: Paraná, RJ: Rio de Janeiro, SC: Santa Catarina, and SP: São Paulo; and country: USA. Bootstrap values >50% are reported above the branches.



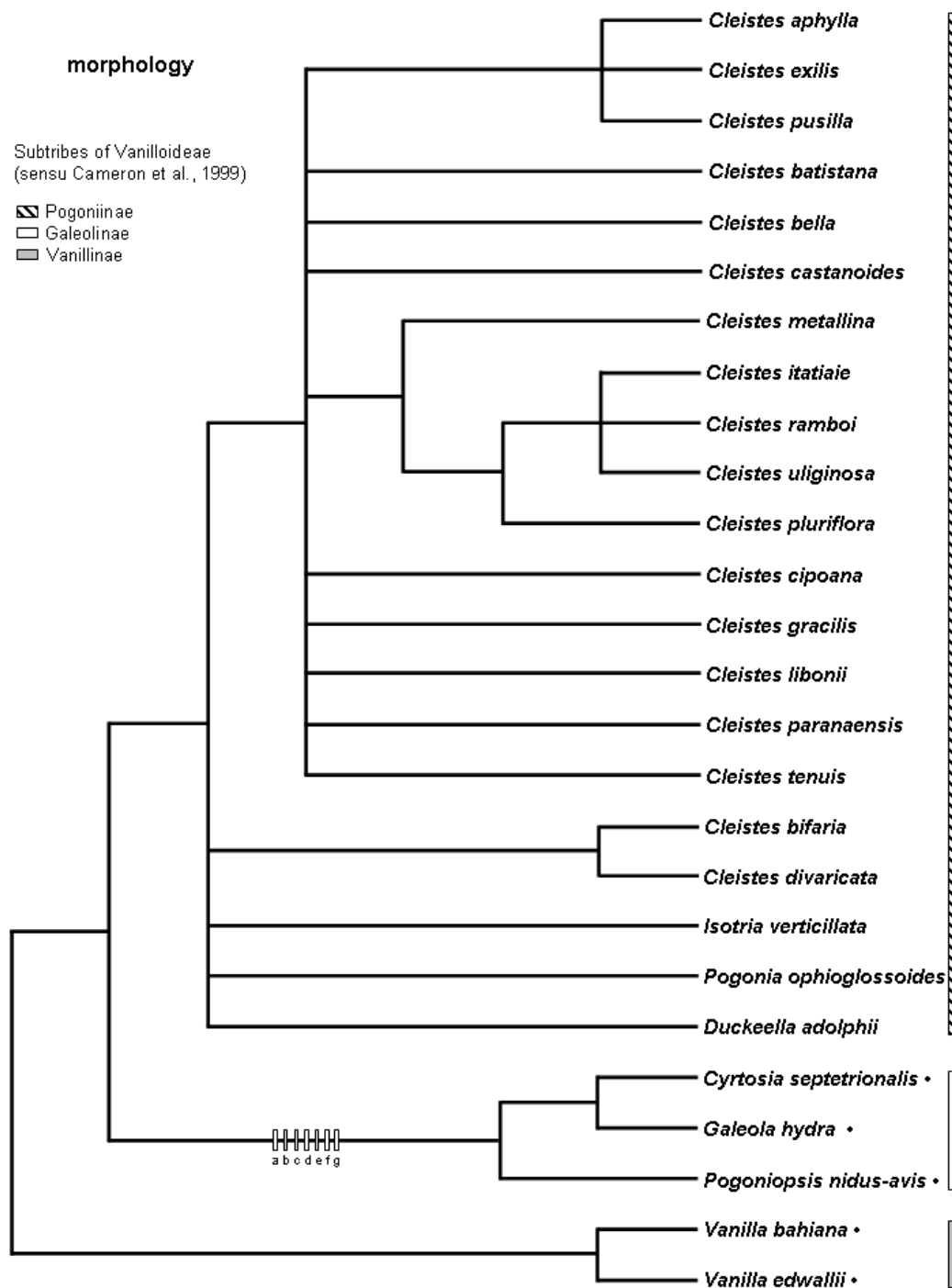


Fig. 4

Fig. 4. Strict consensus of most parsimonious trees generated by the morphological data matrix. The letters a-g denotes key morphological synapomorphies diagnostic for Galeolinae and are taken in Table 2; a: habit simpodial; b: leaves reduced to scales; c: inflorescence terminal; d: perianth parts persistent; e: fruits yellow-colored; f: fruits fleshy and indehiscent; g: seeds sclerified and not tunicate. Dots indicate species recognized within Vanilleae (Cameron, 2003).

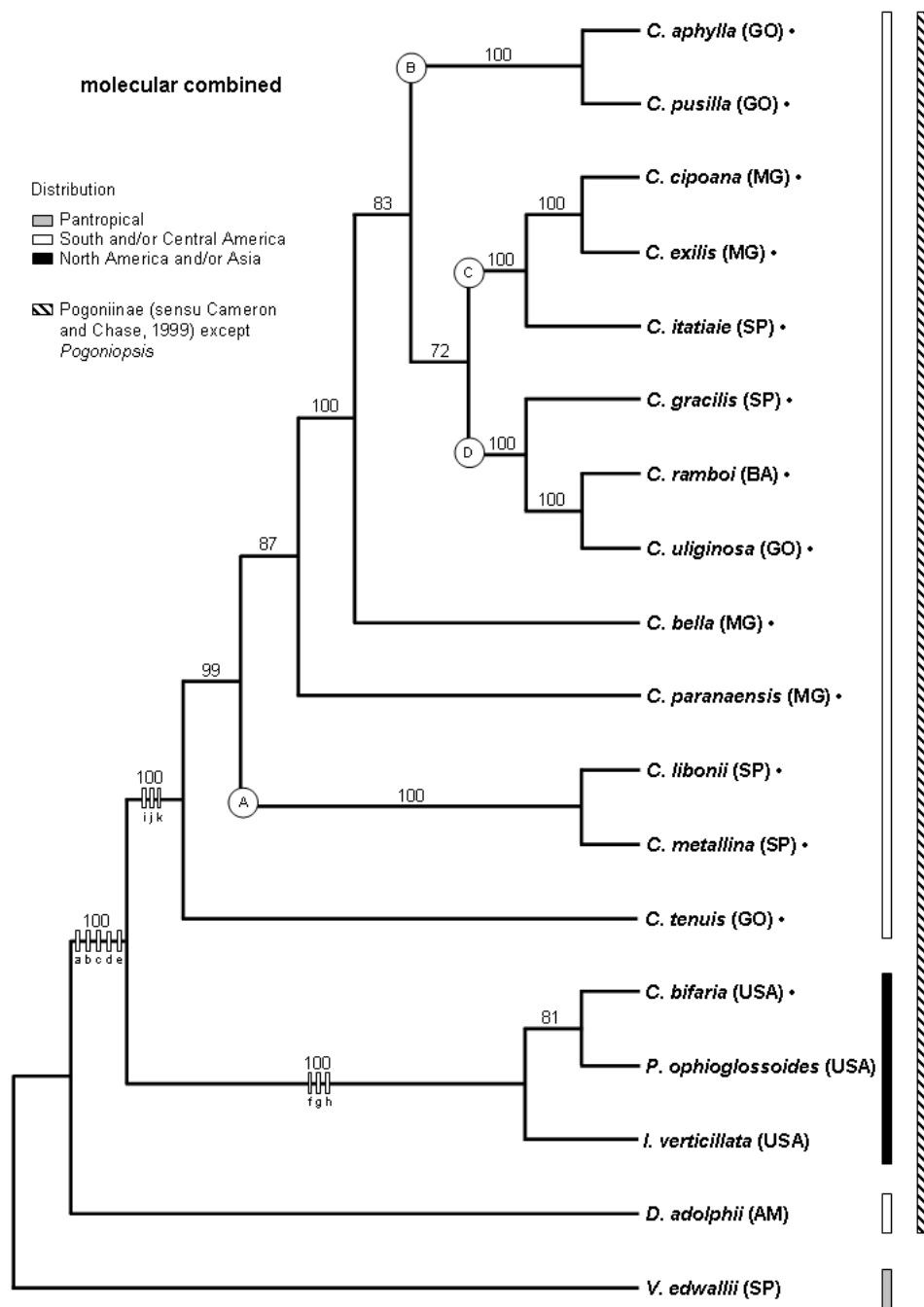


Fig. 5

Fig. 5. Bootstrap consensus tree from combined molecular data set. Only bootstrap values >50% are reported. Numbers above branches = bootstrap values from combined molecular data set. The letters a-k denotes key morphological synapomorphies diagnostic for Pogoniinae and defining both temperate and tropical clades within subtribe and are taken in Table 2; a: few roots; b: stem center hollow; d: inflorescence terminal; e: few flowers with white, pink or violet colored perianth parts; f: chromosome number of  $2n = 18$ ; g: epidermal cells sinuous; h: North American-Eastern Asia distribution; i: roots tuberous; j: basis of the lip with nectariferous glands; k: Central and/or South America distribution. A-D corresponds to clades cited in the discussion. Characters between parenthesis = abbreviation of Brazilian states; AM: Amazonas, BA: Bahia, GO: Goiás, MG: Minas Gerais, and SP: São Paulo; and country: USA. Dots indicate species currently recognized as *Cleistes*. Full generic names are given in Table 1.



Fig. 6

Fig. 6. *Pogoniopsis nidus-avis*. (A) Habit; (B) Flower; (C) Infructescence. Note the persistent perianth parts. (D) Sclerified seed. Scale bars A-C = 1 cm; D = 100  $\mu$ m.

## Capítulo 2

**Publicado na Revista Brasileira de Botânica (2003) 26: 73-80 como: Biologia floral de *Cleistes macrantha* (Barb. Rodr.) Schltr. (Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae)**

**Biologia floral de *Cleistes libonii* (Rchb. f.) Schltr. (Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae)**

**Emerson R. Pansarin**

**Resumo** – (Biologia floral de *Cleistes libonii* (Rchb. f.) Schltr. (Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae)). *Cleistes libonii* (Rchb. f.) Schltr. se encontra amplamente distribuída em regiões de Mata Atlântica do sul e sudeste brasileiros, onde ocorre em áreas perturbadas e em restinga. Aspectos da biologia floral de *C. libonii* foram investigados na região de Intervales, no interior do Estado de São Paulo. Esta espécie oferece néctar como recompensa e é polinizada principalmente por espécies de abelhas do gênero *Bombus*. O néctar é secretado antes da antese, não havendo secreção após a abertura das flores. Beija-flores do gênero *Phaethornis* também podem atuar como polinizadores. No entanto, é necessária uma prévia visita de *Bombus* spp. para que possa ocorrer a deposição de pólen no bico dos beija-flores. Abelhas *Bombus* são responsáveis pela realização da maioria das polinizações cruzadas. Os beija-flores realizam, principalmente, autopolinização. Tratamentos preliminares revelam que *C. libonii* é auto-compatível, mas dependente de um agente polinizador. Apesar da auto-compatibilidade, fatores ecológicos favorecem a polinização cruzada para a espécie. Este estudo faz, ainda, uma comparação da biologia floral de *C. libonii* com o que é conhecido sobre os gêneros pertencentes ao clado norte-americano-asiático em Pogoniinae.

Palavras-chave - Biologia Floral, *Cleistes*, Orchidaceae, Pogoniinae, polinização

## Introdução

A subtribo Pogoniinae (Orchidaceae: Vanilloideae), um grupo monofilético segundo Cameron *et al.* (1999), compreende cinco gêneros distribuídos entre as Américas do Norte e do Sul, e oeste da Ásia (Cameron & Chase 1999). Dentre esses gêneros, inclui-se *Cleistes* Rich. ex Lindl., o maior dentro da subtribo, com 70 espécies descritas. O gênero *Cleistes* apresenta seu centro de diversidade na América do Sul, com apenas uma espécie, *C. rosea* Lindl., ocorrendo até a América Central (Cameron & Chase 1999). As espécies sul e centro-americanas de *Cleistes* formam um grupo monofilético. A inclusão de *C. divaricata*, que ocorre na América do Norte, na análise torna o gênero parafilético (Cameron & Chase 1999). *C. divaricata* é mais proximamente relacionada com os gêneros norte-americanos *Isotria* e *Pogonia* do que com os demais representantes sul-americanos do gênero *Cleistes* (Cameron & Chase 1999).

Dados sobre polinização em Pogoniinae restringem-se ao clado norte-americano-asiático. *Pogonia ophioglossoides* (L.) Juss. é polinizada por abelhas operárias do gênero *Megachile* e rainhas e operárias do gênero *Bombus*. Nessa espécie, o polinário, que é farináceo como nos demais gêneros em Pogoniinae (Cameron *et al.* 1999), fica aderido à face frontal da cabeça das abelhas (Thien & Marcks 1972). *Isotria medeoloides* (Pursh) Raf. reproduz-se através de autopolinização espontânea e *I. verticillata* (Muhl. ex Willd.) Raf. é polinizada por pequenas abelhas pertencentes às famílias Halictidae, Anthophoridae e Adrenidae, nas quais os grãos de pólen ficam depositados na face dorsal do tórax (Mehrhoff 1983). *Cleistes divaricata* (L.) Ames, que ocorre no oeste da Virginia, é polinizada por abelhas operárias dos gêneros *Megachile* e *Bombus*, nas quais o pólen é depositado na face dorsal do tórax (Gregg 1989). Nessa espécie, os polinizadores são atraídos por engano, pois as flores não oferecem recompensa alguma (Gregg 1989). Assim como em *Cleistes divaricata*, Dressler (1993) relata que em *Pogonia* e *Isotria* os polinizadores são atraídos por engano devido à presença, no labelo, de tricomas que imitam pólen. Thien & Marcks (1972), no entanto, observaram o acúmulo de uma pequena quantidade de néctar na base do labelo de *P. ophioglossoides*.

Dentre os representantes sul-americanos do gênero *Cleistes* encontra-se *C. libonii*, incluída na seção (como “centro de espécie”) *Cleistes speciosa*, por Hoehne (1940). *C. libonii* é uma espécie amplamente distribuída entre os Estados de Santa Catarina e Rio de

Janeiro, ocorrendo principalmente em regiões de Mata Atlântica. A espécie é comumente encontrada em regiões de restinga e áreas perturbadas, principalmente ao longo de estradas e rodovias, em barrancos úmidos na Serra do Mar. Em locais perturbados, ocorre principalmente em associação com *Gleichenia* sp. No Estado de São Paulo, *C. libonii* pode ser encontrada também no interior, mas sempre está associada com regiões perturbadas, ocorrendo em barrancos úmidos.

A importância dos polinizadores na evolução da família Orchidaceae é refletida na complexidade das características dos mecanismos de polinização (Garay 1960, Van der Pijl & Dodson 1966). Muitas espécies em Orchidaceae são auto-compatíveis, no entanto, a polinização cruzada parece ser a regra (Van der Pijl & Dodson 1966). Algumas características podem favorecer a polinização cruzada em Orchidaceae. Essas características podem ser ecológicas como, por exemplo, a sincronia de floração com a emergência dos polinizadores (Ackerman 1981, Boyden 1982), ou o sincronismo de floração entre populações, no caso de plantas que produzem poucas flores por inflorescência (Medley 1979, Pansarin 2000). A produção de flores em seqüência na inflorescência e alguns tipos de mecanismos florais são muito difundidos em orquídeas e também podem favorecer a polinização cruzada de muitas espécies (revisão em Catling & Catling 1991).

Pouco é conhecido sobre a biologia reprodutiva em Pogoniinae (Luer 1975). Dados sobre polinização e biologia floral para esta subtribo estão restritos às espécies norte-americanas, não existindo, até o momento, estudos com espécies que ocorrem nas Américas do Sul e Central. O presente trabalho é o primeiro sendo realizado com um representante sul-americano em Pogoniinae. No presente trabalho foram investigados aspectos da biologia floral de *Cleistes libonii*, identificados os fatores que previnem a autopolinização na espécie e realizados tratamentos preliminares para verificação do sistema reprodutivo. Os resultados obtidos neste estudo foram discutidos a partir das informações existentes para as espécies norte-americano-asiáticas.

## Material e métodos

O estudo foi realizado em uma área de mata primária, localizada no Parque Estadual Intervales (24°16'09" S e 48°24'56" W), sul do Estado de São Paulo. O parque possui 49.000 ha de Mata Atlântica e está localizado entre os municípios de Guapiara, Ribeirão Grande, Sete Barras, Eldorado e Iporanga. O presente trabalho foi desenvolvido na área localizada no município de Ribeirão Grande.

O Parque Estadual Intervales localiza-se na Serra de Paranapiacaba. Nessa região as escarpas serranas estão recuadas até cerca de 100 km da orla litorânea, abrindo em um amplo fronte erosivo de aspecto montanhoso (Almeida 1974). A planície entre a Serra de Paranapiacaba e o litoral é formada pelo Vale do Rio Ribeira. A altitude do Parque varia de 60 a 1.100 m, sendo que o presente estudo foi realizado em uma altitude de 900 m. A precipitação anual é de cerca de 1.800 mm, apresentando baixa sazonalidade. A temperatura média anual oscila entre 17 e 19 °C. A região sofre influência do clima mesotérmico brando, com estação subseca. As chuvas ocorrem durante o ano todo, mas é possível determinar uma estação mais chuvosa, de outubro a março e outra, subseca, de abril a setembro (Nimer 1989).

Em Intervales foram realizadas observações e o registro fotográfico do processo de polinização de *Cleistes libonii*. As observações foram realizadas entre os dias 03 e 06 de março de 2001, período em que ocorreu o pico de florada mais significativo dentro da população. As observações estenderam-se das 06:30 h às 17:30 h, totalizando 33 horas. No decorrer das observações, visitantes florais foram capturados para posterior identificação. Não foram realizadas observações noturnas. A eventual ocorrência de visitas noturnas foi investigada através da conferência, pela manhã, de flores marcadas na tarde anterior. Observações adicionais foram realizadas nos anos de 1999 e 2000, nos municípios de Caraguatatuba e Ubatuba. Durante as visitas ao campo, flores frescas foram fixadas em álcool 70% para investigação da morfologia floral. As peças florais foram desenhadas com auxílio de um estereomicroscópio acoplado a câmera clara. O material testemunho está depositado no herbário da Universidade Estadual de Campinas (UEC) - *E.R. Pansarin 857*. Os beija-flores observados e fotografados, e o material entomológico coletado foram identificados através da comparação com espécimes depositados no Museu de História Natural da Universidade Estadual de Campinas (ZUEC).

Os tratamentos para verificação do sistema reprodutivo foram realizados em casa de vegetação, na Universidade Estadual de Campinas. Devido à escassez de flores produzidas pelos indivíduos foram utilizadas apenas quatro flores por tratamento no dia em que ocorreu a antese, e outras quatro flores por tratamento no segundo dia após a antese. Os tratamentos realizados foram: polinização cruzada, autopolinização manual, emasculação e autopolinização espontânea.

## Resultados e Discussão

Na reserva de Intervales, *Cleistes libonii* ocorre em barrancos ao longo das estradas, em locais perturbados com predominância de *Gleichenia* sp. As plantas são eretas, com 40-80 cm de altura e produzem até cinco flores ressupinadas por inflorescência (Fig. 1A). A inflorescência é folhosa e representa um contínuo do caule aéreo (Fig. 1A). As flores medem cerca de 6-8 cm de comprimento (Fig. 1A-B) e apresentam diversos tons de rosa (Fig. 2A). As sépalas são linear-lanceoladas e de consistência carnosas. As pétalas são espatuladas e membranáceas (Fig. 1C). O labelo é trilobado, róseo-esbranquiçado com estrias e ápice vináceo (Fig.s 1C, 2B). O lobo apical do labelo varia desde arredondado até agudo. A forma dos lobos laterais também é muito variável, podendo ser desde arredondados até truncados. A crista do labelo é formada por estrias brancas com ápice amarelo. Na base do labelo existem duas glândulas esféricas, que secretam néctar. O néctar fica acumulado na câmara nectarífera, um espaço delimitado por uma elevação da base da crista do labelo (Fig. 1F). A coluna mede cerca de 5 cm de comprimento (Fig. 1D-E), é branca e paralela ao labelo. No ápice da coluna localiza-se a antera, que é versátil (Fig. 1D-E), com duas polínias amarelas, de consistência farinácea. A superfície estigmática apresenta papilas hialinas e uma fenda em forma de “U” na porção basal (Fig. 1E).

As flores de *Cleistes libonii* apresentam antese diurna, desabrochando ao amanhecer. Três dias após a antese, ocorre o processo de fenecimento das flores. Antes da antese, o néctar já está totalmente secretado, não havendo secreção posterior. A antese das flores é sincrônica dentro da mesma população, com a maioria dos indivíduos florescendo em um mesmo dia. Existe um pico principal de floração, quando ocorre a antese da maioria das flores na população. Outros picos menos intensos podem ocorrer. Poucos botões,



entretanto, ainda permanecem fechados após o primeiro pico de floração. Não foi possível correlacionar a ocorrência do pico de floração com nenhum fator ambiental, tal como chuva, já que podem ser observados picos de floração tanto em dias ensolarados como chuvosos. A ocorrência do próximo pico de florada também é imprevisível e pode ocorrer em um intervalo de uma semana até cerca de 20 dias. Outras orquídeas podem apresentar um padrão semelhante de ocorrência de picos de floração. Em *Psilochilus modestus* Barb. Rodr., foi observado que toda a população floresce e as flores duram apenas um dia. Como em *C. libonii*, o sincronismo de floração em *P. modestus* não pode ser relacionado com nenhum fator ambiental (Pansarin 2000). Medley (1979) observou sincronismo de floração em *Triphora trianthophora* (Sw.) Rydb., na qual centenas de plantas florescem no mesmo dia e as flores fenescem no dia posterior à antese. Em *T. trianthophora* o sincronismo de floração parece ser mediado pela chuva (Medley 1979).

Flores de *Cleisthes libonii* são visitadas por espécies de abelhas operárias do gênero *Bombus*, por borboletas da família Hesperíidae e por duas espécies de beija-flores do gênero *Phaethornis* (Trochilidae: Phaethorniinae). Através da conferência das flores marcadas, não foram detectados visitantes noturnos para *C. libonii*.

Os principais agentes polinizadores de *Cleisthes libonii* são abelhas do gênero *Bombus*. Foram observadas duas espécies de *Bombus* como polinizadores: *Bombus (Fervidobombus) atratus* Franklin 1913, a espécie mais freqüente como polinizador de *C. libonii* na área estudada (Fig. 2B-C) e *Bombus (Fervidobombus) brasiliensis* Lepeletier 1835. Ambas visitam a maioria dos indivíduos com flores disponíveis ao longo das margens das estradas. A atividade das abelhas inicia-se por volta das 7:30 h e se estende até cerca de 13:00 h. Cada abelha visita de uma a duas flores por inflorescência, e cada uma delas com duração de cerca de 10 segundos. A visita inicia-se com o animal pousando no ápice do labelo da flor. Em seguida, a abelha dirige-se para a base do labelo, para acessar o néctar (Fig. 2B). Como a antera é versátil, a abelha não toca o pólen ao entrar no estreito tubo formado pelo labelo. Apenas quando ela se afasta, para abandonar a flor, esbarra com a região dorsal do tórax na antera, desarticulando-a. Nesse momento o pólen é depositado no escudo do animal (Fig. 2C). Após a abelha abandonar a flor a antera permanece desarticulada, pois o espaço que a separa da crista do labelo é muito pequeno e ela fica apoiada sobre a crista. A figura 1D mostra, ordenadamente, a seqüência de desarticulação da antera. No momento em que

ocorre outra visita por *Bombus* spp., a antera volta à posição inicial, de modo que a abelha apenas consegue depositar pólen nas papilas do estigma. A abelha somente receberá o pólen quando abandonar a flor, ao desarticular novamente a antera. Esse procedimento evita que, durante uma única visita, a abelha leve ao estigma, pólen da mesma flor, favorecendo, portanto, a polinização cruzada. Algumas vezes, as abelhas que saem das flores com o escudo impregnado com pólen iniciam um processo de limpeza, coletando o pólen residual aderido aos seus corpos e transferindo-o para as corbículas. Processo semelhante de coleta indireta de pólen como consequência da limpeza do pólen que fica aderido ao corpo dos polinizadores, foi observado em *C. divaricata* (Gregg 1991b).

As visitas por *Bombus* spp. ocorrem apenas nos dois primeiros dias após a antese, enquanto as flores ainda possuem néctar. Nem todas as flores têm seu néctar esgotado logo no primeiro dia. Em algumas flores, no segundo dia após a antese, um pouco de néctar ainda permanece, sendo aproveitado pelas abelhas. Mesmo que apenas algumas flores apresentem néctar, a maioria delas é visitada. As abelhas permanecem apenas cerca de 2 segundos nas flores que não apresentam néctar. Apesar de *Bombus* spp. visitarem as flores de *C. libonii* no segundo dia após a antese, transferindo pólen entre os indivíduos, não acarreta na formação de frutos, pois o estigma permanece receptivo apenas no primeiro dia.

Dois espécies de beija-flores do gênero *Phaethornis*, *Phaethornis eurynome* Lesson 1832 (Fig. 2D) e *Phaethornis squalidus* Temminck 1822, foram observadas como visitantes florais de *Cleistes libonii*. Ambas as espécies geralmente visitam apenas uma ou duas flores disponíveis na população e nunca foram observadas visitando os indivíduos com flores disponíveis ao longo da estrada, como ocorre com as espécies de *Bombus*. Na ocasião, foi observado que ambas as espécies de *Phaethornis* apresentaram comportamento “trapliner” na reserva Intervalles. *P. eurynome* foi observado retornando aos mesmos indivíduos de *Vriesea* sp. (Bromeliaceae) e *Justicia* sp. (Acanthaceae) em intervalos de aproximadamente 1 h e 10 min. e *P. squalidus* retornando apenas em *Vriesea* sp., em intervalos de 30-40 min. As flores de *C. libonii* são visitadas somente quando um beija-flor já visitou flores de *Vriesea* sp. ou *Justicia* sp. que estão próximas à população. Espécies do gênero *Phaethornis* são conhecidas por serem polinizadores eficientes e “trapliners”, geralmente visitando flores em intervalos regulares (Feinsinger & Colwell 1978, Stiles 1985, Sazima *et al.* 1995, 1996). Claramente a morfologia de *C. libonii*, principalmente o diâmetro e comprimento

formado pelo tubo do labelo, está adaptada para a polinização por *Bombus* spp. (Fig. 2B). Ambas as espécies de *Phaethornis*, entretanto, podem atuar como polinizadores de *C. libonii*, em condições especiais. Os beija-flores, por possuírem bicos muito estreitos em relação ao espaço formado pela antera e a crista do labelo, não conseguem desarticular a antera das flores de *C. libonii*, como as espécies de *Bombus* observadas. Entretanto, se a flor foi previamente visitada por um indivíduo de *Bombus*, a antera permanece desarticulada. Quando um beija-flor visita a flor, após a prévia visita de uma abelha *Bombus*, ele pode empurrar, com o bico, o pólen da própria flor até o estigma e promover a autopolinização. No momento em que remove o bico da flor, também pode receber pólen, que, posteriormente, será levado a outra flor, em uma próxima visita. Se o beija-flor, portando pólen em seu bico, visitar uma flor com antera intacta, ele poderá realizar polinização cruzada.

Várias espécies de borboletas da família HesperIIDae visitam flores de *Cleisthes libonii*. As visitas ocorrem principalmente nas horas mais quentes do dia, quando os raios de sol atingem as flores. Lepidópteros com probóscides mais longas conseguem acessar o néctar apenas pousando no ápice do labelo, sem entrar na flor (Fig. 2E). Entretanto, espécies com probóscides mais curtas que o comprimento do labelo, precisam entrar parcialmente na flor para obter o néctar (Fig. 2F). Em nenhum dos casos foram observados lepidópteros tocando os órgãos reprodutivos das flores. Em *C. libonii*, aparentemente, os lepidópteros atuam apenas como pilhadores de néctar.

Os tratamentos, embora preliminares, realizados em casa de vegetação, revelam que *Cleisthes libonii* é auto-compatível, mas dependente de um agente polinizador. Todas as quatro flores utilizadas nas autopolinizações manuais e polinizações cruzadas promoveram a formação de frutos. Nenhuma das quatro flores intactas ou emasculadas chegou a promover frutificação. Somente as flores que recebem pólen no primeiro dia da antese chegam a formar frutos. Assim como *C. libonii*, os demais representantes norte-americanos de Pogoniinae são auto-compatíveis. Do mesmo modo, como observado em *C. libonii*, todas as espécies norte-americanas, com exceção da autógama *Isotria medeoloides*, são dependentes de um agente polinizador (Thien & Marcks 1972, Mehrhoff 1983, Gregg 1989).

Apesar de *Cleistes libonii* ser auto-compatível, alguns fatores podem favorecer a ocorrência de polinização cruzada nessa espécie. Cada indivíduo de *C. libonii* produz poucas flores por inflorescência, existe um preciso sincronismo de floração dentro da população e o estigma permanece receptivo por um único dia. A combinação desses fatores pode favorecer enormemente a polinização cruzada na população. Assim como observado para *C. libonii*, em *Triphora trianthophora* (Medley 1979) e *Psilochilus modestus* (Pansarin 2000), a polinização cruzada é favorecida pela escassez de flores produzidas por inflorescência e pelo sincronismo de floração.

Em *Cleistes libonii*, como o polinário tem consistência farinácea e não é removido em pacotes, como acontece na maioria das Orchidaceae (Dressler 1981, 1993), apenas uma pequena quantidade de pólen é depositada sobre o polinizador em cada visita. Em *Cleistes divaricata*, a antera, que é versátil como em *C. libonii*, pode depositar pólen por diversas vezes ao corpo dos polinizadores. A quantidade de pólen depositada, entretanto, decresce com as visitas subseqüentes (Gregg 1991a). A deposição de pólen em pequenas quantidades nos polinizadores permite que mais de um animal possa receber pólen de uma única flor, o que pode reduzir a perda de pólen se a flor for visitada por um polinizador ineficiente. Na maioria das Orchidaceae, nas quais as polínias são removidas em uma única visita, a remoção do polinário por um polinizador ineficiente pode resultar em uma grande perda de pólen (Tremblay 1992).

Dressler (1993) relata que as espécies pertencentes aos gêneros *Cleistes*, *Isotria* e *Pogonia* atraem polinizadores por engano, para os quais os tricomas existentes no labelo simulam pólen. Curiosamente, em *Cleistes divaricata*, *Isotria verticillata* e *Pogonia ophioglossoides*, assim como em todos os representantes sul-americanos do gênero *Cleistes*, esses tricomas estão concentrados na porção mais apical do labelo, enquanto na altura da antera, essas estruturas estão ausentes. Dessa forma, se as abelhas coletassem os tricomas como se fossem grãos de pólen, elas não precisariam se dirigir à base do labelo para obterem alimento e, conseqüentemente, não contactariam os órgãos reprodutivos da flor. Thien & Marcks (1972) observaram que os tricomas branco-amarelados existentes no labelo de *P. ophioglossoides* são as estruturas que mais absorvem luz ultravioleta na flor, sendo a região mais visível para as abelhas. Esses mesmos autores indicam que *P. ophioglossoides*, além dos tricomas no labelo, também oferece pequenas quantidades de

néctar aos insetos. Do mesmo modo, Guignard (1879 *apud* Thien & Marcks 1972) relata que após rasparem a crista do labelo, as abelhas se dirigem à base dessa estrutura, na qual uma pequena quantidade de néctar fica acumulada. Em *P. ophioglossoides*, como em *C. libonii*, e outras espécies sul-americanas como *C. aphylla* (Barb. Rodr.) Schltr., *C. castanoides* Hoehne, *C. exilis* Hoehne e *C. gracilis* (Barb. Rodr.) Schltr., os tricomas do labelo podem, simplesmente, estar atuando como guias de néctar e não como fontes de alimento como proposto por Dressler (1993). Assim, a natureza das recompensas florais das espécies norte-americanas de Pogoniinae deve ser melhor investigada, pois é provável que os tricomas do labelo dessas espécies são apenas guias de néctar, como observado em espécies sul-americanas de *Cleistis*. O fato de que, em *Cleistis*, o néctar já estar totalmente secretado antes da antese, pode trazer interpretações errôneas se a biologia floral de uma determinada espécie não for minuciosamente investigada. Fagnani (2001) relata que *C. libonii* não oferece néctar, sendo polinizada por engano, por abelhas que procuram alimento. Muito provavelmente, pelo menos no que se refere às espécies sul-americanas de *Cleistis*, a estratégia de engano dos polinizadores não se aplica e as considerações errôneas, até agora realizadas, podem ser consequência de observações em flores abertas há mais de um dia, cujo néctar, provavelmente, já havia sido esgotado pelos visitantes florais.

Todas as espécies de *Cleistis* que ocorrem nas Américas do Sul e Central apresentam nectários glandulares na base do labelo e a presença dessas estruturas, provavelmente, representa uma sinapomorfia para o clado sul-centro-americano do gênero (Pansarin, dados não publicados). Nas espécies norte-americanas de *Isotria* (Mehrhoff 1983), em *Cleistis divaricata* (Gregg 1989) e em *Pogonia ophioglossoides*, entretanto, esses nectários glandulares estão ausentes. A presença de nectários nos gêneros norte-americanos precisa ser melhor investigada através de estudos anatômicos, uma vez que foi observada a presença de néctar em *P. ophioglossoides* (Thien & Marcks 1972), mas nectários glandulares estão ausentes nesta espécie.

Assim como observado para *Cleistis libonii*, *C. divaricata* (Gregg 1989), *Isotria verticillata* (Mehrhoff 1983) e *Pogonia ophioglossoides* (Thien & Marcks 1972), outras espécies sul-americanas de *Cleistis*, como *C. aphylla*, *C. castanoides*, *C. exilis* e *C. gracilis* também são polinizadas por abelhas (Pansarin, dados não publicados). Assim, com exceção da autógama *I. medeoloides* (Mehrhoff 1983), abelhas parecem ser os principais vetores de

pólen em Pogoniinae, estando presentes em todos os gêneros até agora investigados. *Duckeella*, no entanto, um gênero endêmico da região amazônica e irmão do restante da subtribo Pogoniinae (Cameron & Chase 1999), é completamente desconhecido com relação aos aspectos de sua biologia reprodutiva e polinização. O avanço das pesquisas com *Duckeella* e representantes das demais seções do gênero *Cleistis* poderão propiciar um maior entendimento sobre aspectos da hipótese filogenética de Pogoniinae e, conseqüentemente, sobre a evolução da polinização da subtribo.

Agradecimentos – O autor agradece ao Dr. Volker Bittrich pela revisão crítica, a Profa. Maria do Carmo E. Amaral pelas sugestões dadas, à diretoria do Parque Estadual Intervales pela autorização concedida para realização das observações de campo e à Fapesp pelo financiamento do projeto (Processo n. 00/11015-9).

### **Referências bibliográficas**

- Ackerman, J.D. 1981. Pollination biology of *Calypso bulbosa* var. *occidentalis* (Orchidaceae): a food deception system. *Madroño* 28: 101-110.
- Almeida, F.F.M. 1974. Fundamentos Geológicos do relevo paulista. Série teses e monografias. Instituto de Geografia da Universidade de São Paulo, São Paulo, v.14.
- Boyden, T.C. 1982. The pollination biology of *Calypso bulbosa* var. *americana* (Orchidaceae): initial deception of bumblebee visitors. *Oecologia* 55: 178-184.
- Cameron, K.M. & Chase, M.W. 1999. Phylogenetic relationships of Pogoniinae (Vanilloideae, Orchidaceae): an herbaceous example of the eastern North America – eastern Asia phytogeographic disjunction. *Journal of Plant Research* 112: 317-329.
- Cameron, K.M.; Chase, M.W.; Whitten, W.M.; Kores, P.J.; Jarrell, C.; Albert, V.A.; Yukawa, T.; Hills, H.G. & Goldman, D.H. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from rbcL nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 86: 208-224.
- Catling, P.M. & Catling, V.R. 1991. A synopsis of breeding systems and pollination in north American orchids. *Lindleyana* 6: 187-210.

- Dressler, R.L. 1981. The orchids: natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, R.L. 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Cambridge University Press, Cambridge.
- Fagnani, M.P.K. 2001. Orquídeas da cidade do Rio de Janeiro. Orquidário 14: 2-4.
- Feinsinger, P. & Colwell, R.K. 1978. Community organization among neotropical nectar-feeding birds. American Zoologist 18: 779-795.
- Garay, L.A. 1960. On the origin of the Orchidaceae. Botanical Museum Leaflets of Harvard University 19: 57-96.
- Gregg, K.B. 1989. Reproductive biology of the orchid *Cleistes divaricata* (L.) Ames var. *bifaria* Fernald growing in West Virginia meadow. Castanea 54: 57-78.
- Gregg, K.B. 1991a. Reproductive strategy of *Cleistes divaricata* (Orchidaceae). American Journal of Botany 78: 350-360.
- Gregg, K.B. 1991b. Defrauding the deceitful orchid: pollen collection by pollinators of *Cleistes divaricata*. Lindleyana 6: 214-220.
- Hoehne, F.C. 1940. Orchidaceae. In Flora brasílica (F.C. Hoehne, ed.). Instituto de Botânica, São Paulo, v.12, fasc.1.
- Luer, C.A. 1975. The native orchids of United States and Canada. New York Botanical Garden, New York.
- Medley, M.E. 1979. Some aspects of the life story of *Triphora trianthophora* (Sw.) Rydb. (Three birds orchid) with reference to its pollination. MD Thesis, St Andrews University, St Andrews.
- Mehrhoff, L.A. 1983. Pollination in the genus *Isotria* (Orchidaceae). American Journal of Botany 70: 1444-1453.
- Nimer, E. 1989. Climatologia do Brasil. 2 ed. IBGE, Rio de Janeiro.
- Pansarin, E.R. 2000. Biologia Reprodutiva e morfologia floral de espécies de Orchidaceae em diferentes ambientes no Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Sazima, I., Buzato, S. & Sazima, M. 1995. The saw billed hermit *Ramphodon naevius* and its flowers in southeastern Brazil. Journal of Ornithology 136: 195-206.

- Sazima, I., Buzato, S. & Sazima, M. 1996. An assemblage of hummingbird-pollinated flowers in a Montane Forest in Southeastern Brazil. *Botanica Acta* 109: 149-160.
- Stiles, F.G. 1975. Ecology, flowering phenology, and hummingbird pollination of some Costa Rican *Heliconia* species. *Ecology* 56: 323-351.
- Thien, L.B. & Marcks, B.G. 1972. The floral biology of *Arethusa bulbosa*, *Calopogon tuberosus*, and *Pogonia ophioglossoides* (Orchidaceae). *Canadian Journal of Botany* 50: 2319-2325.
- Tremblay, R.L. 1992. Trends in pollination ecology of the Orchidaceae: evolution and systematics. *Canadian Journal of Botany* 70: 642-650.
- Van der Pijl, L. & Dodson, C.H. 1966. *Orchid flowers: Their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables.



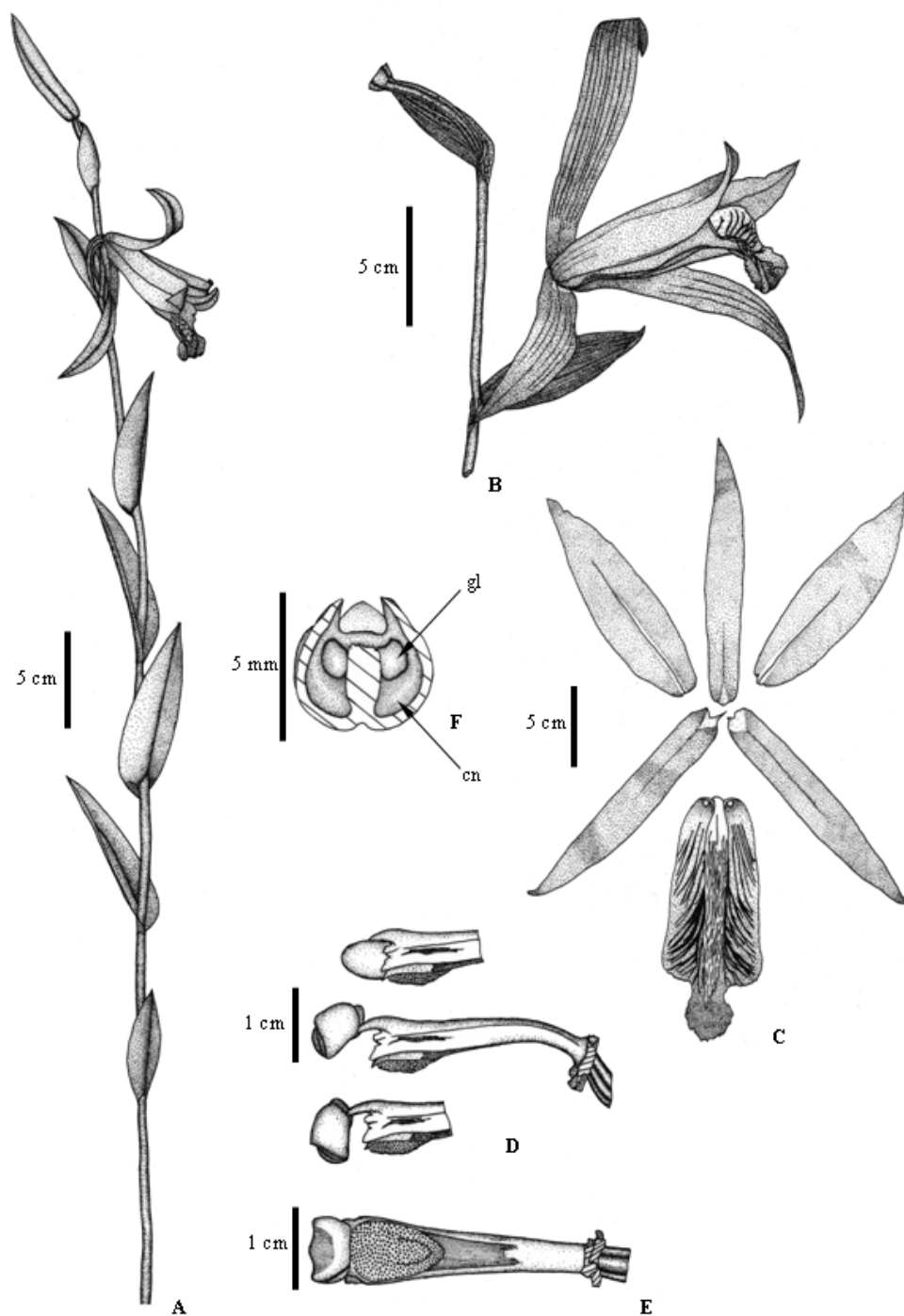


Figura 1. *Cleistes libonii*. A. Hábito. B. Flor. C. Perianto. D. Coluna em vista lateral, mostrando a seqüência de desarticulação da antera. E. Coluna em vista ventral. F. Base do labelo em corte transversal, mostrando as duas glândulas (gl) e as câmaras nectaríferas (cn).



Figura 2. *Cleistes libonii*. A. Flor. B. *Bombus atratus* contactando a antera da flor com o escudo enquanto obtém néctar na base do labelo. C. *B. atratus* saindo da flor com o escudo coberto por pólen. D. *Phaethornis eurynome* obtendo néctar na base do labelo. E. Hesperíidae obtendo néctar apenas com a probóscide dentro da flor. F. Hesperíidae obtendo néctar com o corpo parcialmente dentro da flor. Barras de escala = 2 cm.

### Capítulo 3

#### Formatado de acordo com as normas da Plant Biology

#### **Pollination in the genus *Cleistes* and a comparison on floral biology within Pogoniinae (Orchidaceae: Vanilloideae): an evidence of evolution from deceptive to reward pollination systems**

E. R. Pansarin and M. Sazima

**Abstract:** Pollination of seven species of *Cleistes* occurring in Central-Western and Southeastern Brazil were studied and comparisons about the floral biology of South-Central American and North American-Asiatic clade of Pogoniinae were realized. The *Cleistes* species are terrestrial and occur mainly in “cerrado” vegetation, growing on dry, sandy and marshy soils, or on rocks and among mosses. Each plant produces one terminal raceme not much differentiated from the aerial stem, with one to five resupinate flowers. The disposition of the petals and the labellum results in tubular flowers. The lip presents a central crest with clusters of hairs or papillae, yellow or white coloured in the upper third, which acts as a nectar guide. The flowering period occurs in summer. The species presents a precise flowering synchronism, in which all mature buds open simultaneously in the early morning of a same day. The flowering synchronism added to production of short-lived flowers favors cross-pollination within populations. The flowers offer nectar as reward, produced by two nectariferous glands at the basis of the lip. The studied species, as is known for North American Pogoniinae genera, are pollinated by several groups of solitary or social bees. The pollinaria of the Pogoniinae are composed of soft pollinia, and the free monads are released on the scutum of the bees by the hinged terminal anther. The size of the bees is proportional to flower dimensions, being a crucial factor to perform pollination in Pogoniinae species. The presence of nectariferous glands in Central and South American species of *Cleistes* is the most derived condition in the subtribe. The absence of nectariferous glands, which promotes deceptive pollination, is the basal condition in Pogoniinae, being related with the North American-Asiatic clade. This study does not

support the classical view point of evolution from reward to deceptive pollination mechanisms as occurs in most derived subfamilies in Orchidaceae.

**Key words:** *Cleistes*, floral biology, melittophily, mimicry, Orchidaceae, Pogoniinae, pollination.

## Introduction

The subtribe Pogoniinae (tribe Pogoniieae sensu Cameron, 2003), according to Dressler (1993) and Cameron et al. (1999), presents five genera (*Cleistes*, *Duckeella*, *Isotria*, *Pogonia* and *Pogoniopsis*) distributed among North and South America, and Eastern Asia (Cameron and Chase, 1999). According to Cameron and Chase (1999) Pogoniinae is monophyletic, although the rare saprophytic genus *Pogoniopsis* and the majority of South American species of *Cleistes*, have been unavailable in their analyses. The Amazonian *Duckeella* is sister of all remainder of Pogoniinae (Cameron et al., 1999). The genus *Cleistes*, as currently known, is paraphyletic. The North American *C. divaricata* (L.) Ames and *C. bifaria* (Fernald) Gregg are closer to *Isotria* and *Pogonia* than the Central and South American species (Cameron and Chase, 1999; Pansarin et al., in prep.). According to Cameron and Chase (1999) Pogoniinae originated in South America during the late Cretaceous, its ancestral dispersed to North American southeast during the early Tertiary, diversified and migrated northward during the Oligocene and subsequently moved westward across northern North America and into Asia via Bering land bridges during the Miocene.

*Isotria* and *Pogonia* are small genera, with two and three species, respectively (Cameron, 1999). *Cleistes* is the largest genus within Pogoniinae, comprising about 20 species distributed within Central and South America (Pansarin and Barros, in prep.). The pollination biology of Pogoniinae is poorly known (van der Pijl and Dodson, 1966; Luer, 1975), but the North American-Eastern Asia clade has been studied and conclusive data on pollination are available for *Pogonia* (Thien and Marcks, 1972), *Isotria* (Mehrhoff, 1983), and *Cleistes divaricata* and *C. bifaria* (Gregg, 1989, 1991a, 1991b). Pollination data on South American species are restricted to *Cleistes libonii* (Rchb. f.) Schltr. (as *C. macrantha*

(Barb. Rodr.) Schltr.), that occurs in disturbed areas in the Atlantic rain forests of Southeastern Brazil (Pansarin, 2003). The subtribe Pogoniinae, as in about 60% of the species of Orchidaceae (van der Pijl and Dodson, 1966; Dressler, 1981), is adapted to pollination by Hymenoptera (Thien and Marcks, 1972; Mehrhoff, 1983; Gregg, 1989, 1991a; Pansarin, 2003). *Cleisthes bifaria* (Gregg, 1989) and *C. divaricata* (Gregg, 1991a) are pollinated by workers of *Bombus* and *Megachile*. *Isotria verticillata* (Muhl. ex Willd.) Raf. is pollinated by small Halictidae, Anthophoridae and Andrenidae bees, while *I. medeoloides* (Pursh) Raf. is self-pollinated (Mehrhoff, 1983). According to Thien and Marcks (1972), *Pogonia ophioglossoides* (L.) Ker Gawl. is pollinated by queens and workers of bumblebees. *Cleisthes libonii* (as *C. macrantha*) is pollinated by queens or more rarely by workers of *Bombus*, and co-pollinated by hermit hummingbirds (Pansarin, 2003). According to Dressler (1993) *Pogonia*, *Isotria* and *Cleisthes*, as in about one third or more of the Orchidaceae (van der Pijl and Dodson, 1966; Dafni, 1984; Ackerman, 1986), attract their pollinators by deceit. Non-rewarding orchids attract their pollinators by a variety of manners, including food-frauds (Dafni, 1984; Ackerman, 1986; Nilsson, 1992). The majority of the food deceptive orchids are pollinated by nectar-seeking insects (Dafni, 1984; Ackerman, 1986). Shifts between rewarding and deceptive pollination systems have occurred many times in the evolution of the Orchidaceae (Dressler, 1981), and these deceptive systems seem to be derived from rewarding species in the family (Ackerman, 1986). Mimicry is unlikely to explain the evolution of rewardlessness in orchids, and has occurred comparatively rarely in the evolution of the Orchidaceae (Dafni, 1984, 1987; Johnson, 2000). Among the orchids that produce some type of reward, the principal and more common is floral nectar (van der Pijl and Dodson, 1966; Arditti, 1992; Dressler, 1993). Nectar in orchids is produced by several types of structures (see Dressler, 1993 for a review). In *Cleisthes libonii* (as *C. macrantha*), nectar is produced by two glands at the base of the lip (Pansarin, 2003). *Pogonia ophioglossoides* produces small quantities of nectar (Thien and Marcks, 1972; *apud* Guignard, 1879) but nectariferous glands are lacking (Thien and Marcks, 1972). The report on nectar production in *Pogonia* is controversial and, according to Dressler (1993) and Ackerman (1986), the hair cluster on the lip of *Pogonia* simulates pollen clusters and the species attract pollinators by deceit, in a similar way as reported for the North American *Cleisthes bifaria* (Gregg, 1989). The North American

*Cleistes* and the genus *Isotria* are pollinated by deceit, although nectar guides are present (Mehrhoff, 1983; Gregg, 1991a).

This paper reports on pollination biology of seven species of *Cleistes*, namely: *C. aphylla* (Barb. Rodr.) Hoehne, *C. bella* Rchb. f. & Warm., *C. castanoides* Hoehne, *C. exilis* Hoehne, *C. gracilis* (Barb. Rodr.) Schltr., *C. paranaensis* (Barb. Rodr.) Schltr. and *C. pusilla* Pansarin, occurring in Central-Western and Southeastern Brazil, and compares with the North American-Asiatic clade of Pogoniinae. Besides it is discussed, in a phylogenetic context, the pollination biology between the reward-producing South-Central American and the deceptive North American-Asiatic clade of Pogoniinae.

## Material and methods

### *Study sites*

Fieldwork was carried out in “vereda” vegetation (wet camps) in the Chapada dos Veadeiros, Central-Western, in “campos de altitude” (high mountain grasslands), Southeastern, in “campo limpo” (open grasslands) and “campo sujo” (grasslands with shrubs) adjacent to “cerrado” vegetation (wooded savannas), Southeastern Brazil. The sites and observation periods of the studied species are summarized in table 1.

The phenological data were recorded on several populations of *Cleistes*, during the flowering periods of the years 2000-2004. Morphological features of fresh or in FAA 70% conserved plants of all studied species were recorded. Flower details of *Cleistes castanoides* were drawn under a binocular stereomicroscope equipped with camera lucida.

Flowers of *Cleistes castanoides* conserved in FAA 70% were also used for anatomical studies. The basal portion of the lip was dehydrated in ethanol series and embedded in glycol methacrylate. Cross sections (9-12  $\mu\text{m}$ ) were stained with toluidin blue (Sakai, 1973).

Observations on pollination were carried out in the first day of anthesis, between 0630 and 1800 h (from dawn to nightfall), and in the second day of flower opening, from 0630 to about 1400 h. To check the occurrence of nocturnal pollination, intact flowers were marked in the afternoon and examined at dawn on the next day. The insects collected during the observations were identified and are deposited at the Museu de História Natural of the

Universidade Estadual de Campinas (ZUEC). Plant vouchers (numbers given in table 1) are deposited at the herbarium of the Universidade Estadual de Campinas (UEC).

Data about floral biology of North American Pogoniinae genera were obtained from literature for *Pogonia* (Thien and Marcks, 1972), *Isotria* (Mehrhoff, 1983), and *Cleistes divaricata* (Gregg, 1991a) and *C. bifaria* (Gregg, 1989).

## Results and discussion

### *Phenology and flowering strategies*

Phenological and flowering strategies were similar for all studied *Cleistes* species. After the first rainy period, each tuberous root produces one not ramified aerial stem, with an erect and terminal inflorescence. Flowering occurs one or two months later, during the major wet season. The studied taxa, as other species of the genus (Pansarin et al., in prep.), present an accurate flowering synchronism, in which every mature buds of the majority of individuals within a population open simultaneously in the early morning (0700 to 0730 h) of a same day. Similar flowering synchronism in Pogoniinae has been reported for *Cleistes libonii* (Pansarin, 2003) as well as for the basal Epidendroids *Triphora trianthophora* (Sw.) Rydb. (Medley, 1979) and *Psilochilus modestus* Barb. Rodr. (Pansarin, 2000). During a flowering period occurred three or four flowering peaks, which seem to be related with the rainy period in the studied *Cleistes* species, as well as reported for *T. trianthophora* from North America (Medley, 1979), however, such relation was not recorded for *P. modestus* and in *C. libonii*, from the mesophytic semidecidual and the Atlantic rain forests (Pansarin, 2000, 2003), respectively.

### *General plant features*

The species of *Cleistes* are terrestrial herbs growing on sandy, dry or marshy soils, or on rocks and among mosses. The aerial stem presents leaves which may be evident or reduced to scale-like. The inflorescence is a raceme not much differentiated from the aerial stem. Each plant produces one–two or up to five resupinate, axillary flowers, but one per knot. The floral bracts are mostly undistinguishable from leaves but, sometimes, are more

attenuated on the basis. The flowers of these *Cleisthes* species are morphologically very similar. The sepals are linear to elliptic-lanceolate and fleshy (Fig. 1B). The elliptic to spatulate petals are membranaceous and parallel disposed with the lateral parts of the lip, resulting in a tubular-shaped flower (Figs. 1 A, 3 B, F, G). The lip is 1-3 lobed, tubular, presents two nectariferous glands at the basis (Fig. 1B, D), and a longitudinal central crest with clusters of yellow or white coloured hairs or papillae (Fig. 1C) on the upper third (Fig. 3 B, E, G) which may act as a nectar guide (Pansarin 2003). The column is parallel disposed with the lip and presents a versatile anther (Fig. 1C, E), which has two yellow and bipartite pollinia made up by free monads. The stigmatic surface (Fig. 1E) is plane or more rarely concave, and generally presents small hyaline trichomes. Many of the general floral characteristics of the studied *Cleisthes* are common for other genera in Pogoniinae (Thien and Marcks, 1972; Mehrhoff, 1983; Gregg, 1989, 1991a, 1991b).

Every *Cleisthes* species offer nectar as reward produced by globular-ovate glands, whose secretory surface is composed of several cell layers (Fig. 2), and the total nectar amount is secreted before flower opening, as reported for *C. libonii* (Pansarin, 2003). The specific plant features are summarized in table 2.

#### *Floral visitors and pollination mechanisms*

The studied *Cleisthes* species were pollinated exclusively by bees, as has been reported for the North American Pogoniinae (Thien and Marcks, 1972; Mehrhoff, 1983; Gregg, 1989, 1991a) and for the South American *C. libonii* (Pansarin, 2003). The pollinator species and visit frequencies are summarized in table 2. Visits occurred only in the first day of anthesis, even in the species whose flowers lasts more than one day, which probably is related with the production of the total nectar amount before flower opening. Still, *C. libonii* flowers were visited by queens of *Bombus atratus* in the second day of anthesis (Pansarin, 2003). Visits to the *Cleisthes* species occurred only during daytime, mainly from 08:00 h up to 14:00 h, being visitation frequency significantly higher in days with sunshine than in rainy days. The visitation frequencies in *C. exilis* and *C. aphylla* were higher than in the other species (Table 2), probably because the flowering peaks occurred in sunny days. According to Mehrhoff (1983) the frequency to flowers of the Pogoniinae *Isotria verticillata* was most dependent upon the availability of flowers and its stage, as most of the



visits were to fully open fresh flowers. Besides, time of the day, air temperature, solar radiation, and relative humidity may also have affected pollinator activity (Mehrhoff, 1983).

The pollination mechanism was similar in all the studied species. The bee lands on the apex of the lip (Fig. 3 A, C, D) and probes for nectar at its base (details in Figs. 3 A, C, D). When the insect leaves the flower it disarticulates the anther with the scutellum and the free pollen monads are placed on their scutum (Fig. 3 C). After this, the anther turns to the original position. Each bee may stay about 5-12 s visiting a flower. This mechanism is common for Pogoniinae species, and was reported in details for *Pogonia* (Thien and Marcks, 1972), *Isotria* (Mehrhoff, 1983), *Cleisthes divaricata* (Gregg, 1991a), *C. bifaria* (Gregg, 1989) and *C. libonii* (Pansarin, 2003). In *Cleisthes aphylla* and *C. exilis*, after leaving the flower with pollen loads, sometimes the bee cleans itself placing the free monads in the curbiculae. Such behavior was reported for the visitors of the South American *C. libonii* (Pansarin, 2003) and the North American *C. divaricata* (Gregg, 1991b). The deposition of pollen on the stigma occurs when a bee with their scutum impregnated with pollen visits another flower. The small papillae recovering the stigmatic surface are responsible for the retention of the free monads.

The size of the bees is proportional to the flower dimensions of each studied *Cleisthes* species, a condition that may prevent pollen transfer between synchronopatric species such as *Cleisthes aphylla* and *C. exilis*, occurring in wet camps at Chapada dos Veadeiros, in Central-Western Brazil. Differences in size of flowers can avoid pollen transference between sympatric species, being an important isolating mechanism in several orchid groups (van der Pijl and Dodson, 1966; Dressler, 1968; Catling and Catling, 1991; Pansarin, 2000). According to Thien and Marcks (1972) flowers of the Pogoniinae *Pogonia ophioglossoides* attracts a wide variety of bees as visitors, but only those whose size and weight appropriate are effective pollinators. Differences in flower size are an important factor avoiding hybridization between *Pogonia ophioglossoides* and its sympatric species (*Aretusa bulbosa* L. and *Calopogon tuberosus* (L.) Britton, Sterns & Poggenb.), occurring in North America.

In all studied *Cleisthes* species, the precise flowering synchronism in addition to the production of short-lived flowers, may favor cross-pollinations within a population, as

recorded for *C. libonii* (Pansarin, 2003) and some basal Epidendroids, like *Triphora trianthophora* (Medley, 1979) and *Psilochilus modestus* (Pansarin, 2000). According to Catling and Catling (1991) this kind of synchrony is an important strategy favoring cross-pollination in plants with one- to few-flowered inflorescences. In fact, when all flowers in a population open together the floral display to attract pollinator attention is maximized. Of course synchronous flowering is most valuable when pollinators can learn a rewarding flower (Catling and Catling, 1991).

According to Dressler (1993), flowers of *Cleistes*, *Isotria* and *Pogonia* attract pollinators by deceit since the trichomes in the central crest simulate pollen clusters, as is known for other orchid groups (Heinrich, 1975; Boyden, 1982). In Pogoniinae, as reported for *C. libonii* (Pansarin, 2003), these trichomes occur only on the upper third of the lip, being absent from that part on. If the bees try to collect these trichomes, it is very likely that they do not touch the anther, and in turn do not pollinate. Thus, the central crest, in the studied *Cleistes* species, more likely acts as a nectar guide, as reported for *C. libonii* (Pansarin, 2003) and *Pogonia ophioglossoides* (Thien and Marcks, 1972).

#### *Evolutionary considerations*

The subtribe Pogoniinae is predominantly pollinated by nectar-seeking bees, while *C. libonii* is co-pollinated by hermit hummingbirds (Pansarin, 2003) and *Isotria medeoloides* is automatic self-pollinated (Mehrhoff, 1983). Despite several authors (see Dressler, 1993; Szlachetko, 1995; Cameron and Chase, 1999; Cameron et al., 1999) include *Pogoniopsis* in Pogoniinae (tribe Pogoniieae sensu Cameron, 2003), recent morphological and molecular studies reveal that its inclusion in the analyses makes the subtribe paraphyletic (Pansarin et al., in prep.). The saprophytic *Pogoniopsis* is an automatic self-pollinating orchid that presents characteristics of life form, roots, stem, leaves, flowers, fruits and seeds closely related to *Galeola* and *Cyrtosia*, being its placement in the subtribe Galeolinae (tribe Vanilleae sensu Cameron, 2003) more adequate (Pansarin et al., in prep.). The Amazonian *Duckeella*, has also been placed in Pogoniinae by several authors (see Dressler, 1993; Cameron and Chase, 1999; and Cameron et al., 1999). However, the synapomorphic characters that define Pogoniinae are absent in *Duckeella*, and this rare genus with basally whorled linear leaves, lateral and multiflored inflorescences with yellow flowers and lip

poorly differentiated from petals, in accordance to the classification proposed by Szlachetko (1995), belongs to the subtribe Duckeellinae (Pansarin et al., in prep.). The presence of glandular nectaria at the lip basis represents a sinapomorphy for the tropical clade of Pogoniinae, which includes the South and Central American species of *Cleistes* (Pansarin et al., in prep.). In the North American-Asiatic clade, which includes *Isotria*, *Pogonia* and *Cleistes divaricata* and *C. bifaria*, these glandular nectaria are absent (Thien and Marcks, 1972; Mehrhoff, 1983; Gregg, 1989, 1991b). Although Thien and Marcks (1972) *apud* Guignard (1879) recorded small quantities of nectar at the lip basis of flowers of *Pogonia ophioglossoides*, this species attracts pollinators by deceit (Thien and Marcks, 1972; Ackerman, 1986; Catling and Catling, 1991). Furthermore, nectariferous glands are absent in *Pogonia ophioglossoides* (Pansarin et al., in prep.). Species of *Isotria*, and North American *Cleistes* also attract pollinators by deceit, operating as general bee-food mimics (Mehrhoff, 1983; Gregg, 1989). The presence of glandular nectaria in the South-Central American *Cleistes* is the most derived condition in Pogoniinae, confirmed by studies based on both morphological and molecular (ITS nrDNA, and *rps16* and *trnL-F* cpDNA) sequence data (Pansarin et al., in prep.). Although Cameron and Chase (1999) reported a South American species as ancestral of the Pogoniinae and a most derived condition for the temperate clade, recent analyses (Pansarin et al., in prep.) support the tropical clade as more derived within Pogoniinae.

In Orchidaceae, although several authors have suggested that deceptive mechanisms probably evolved from reward pollination systems (Dafni, 1984; Ackerman, 1986; Nilsson, 1992), which appears to be correct in many isolated cases (e.g., Ackerman, 1986; Johnson and Nilsson, 1999; Johnson, 2000), only a few of these studies have been based on phylogenetic analyses. According to Dressler (1981) shifts between rewarding to deceptive pollination systems may have occurred many times in the evolution of Orchidaceae. Based on phylogenetic analyses, Johnson et al. (1998) recorded three evolutionary transitions between nectar-producing and non-rewarding flowers in the South African genus *Disa*. Nectar production can be energetically expensive and resources used to produce this reward could be better expended in other functions which may ultimately increase the fitness of those individuals lacking pollinator rewards (Boyden, 1982; Ackerman, 1986). The main problem with this hypothesis is that the lifetime fitness of many orchids is pollination

limited, rather than resource limited (Calvo and Horvitz, 1990; Calvo, 1983). Furthermore, there are few reliable estimates of the cost of nectar (Pyke, 1991). The cost of nectar production in short-lived flowers tends to be lower than in long-lived flowers (Johnson and Nilsson, 1999). In fact, flowers of nectar-producing tropical *Cleistes* are less durable than those of deceptive *Isotria*, *Pogonia*, *Cleistes divaricata* and *C. bifaria* (Thien and Marcks, 1972; Mehrhoff, 1983; Gregg, 1989, 1991b).

Some rewardless species can cause reduced visitation and consequently a low reproductive success in relation to nectar-producing orchids (e.g., Ackerman, 1981; Dafni, 1984; Ackerman, 1986; Johnson and Nilsson, 1999; Salguero-Faria and Ackerman, 1999; Johnson, 2000; Smithson, 2002), but also reduced fruit set by geitonogamy (Ackerman, 1986; Johnson and Nilsson, 1999; Johnson, 2000; Smithson, 2002), since there is no extensive pollen carryover in plants with loose pollen (Johnson and Nilsson, 1999), and floral mechanisms preventing immediate self-pollination (Dressler, 1981; Johnson and Nilsson, 1999). These facts can be supported by comparing both reward-producing and deceptive clade of Pogoniinae. The North-American Pogoniinae presents a low reproductive success (Thien and Marcks, 1972; Mehrhoff, 1983; Gregg, 1989, 1991b) when compared with Brazilian species of *Cleistes* (Pansarin, pers. obs.). In certain years the fruit set of some *Cleistes* species (e.g., *C. castanoides*, *C. libonii* and *C. ramboi*) was about 100% (Pansarin, pers. obs.). Furthermore, as reported for the Central and South American *Cleistes*, the production of a few short-lived flowers by each inflorescence in addition to the precise flowering synchronism tends to prevent the occurrence of self-pollination and geitonogamy. Orchids with soft pollinaria, as reported for Pogoniinae, do not appear to be especially prone to geitonogamy (Johnson and Nilsson, 1999). Structural differences between pollinaria may have important implications for evolution of deception as consequence of pollen carryover and bending mechanisms (Johnson and Nilsson, 1999). Self-pollination resulting from geitonogamy can reduce fitness by causing inbreeding depression and pollen loss. Thus, although several authors argue that selection might favor less or no nectar, if this encourages pollinators to leave the plant rather than to visit a long sequence of flowers (Ackerman, 1986; Johnson and Nilsson, 1999), this hypothesis may be plausible, since do not exist any floral or ecological barriers avoiding self-pollination, as proposed by Dressler (1981) and Johnson and Nilsson (1999). Despite its plausibility, and

although Peakall and Beattie (1996) present data showing extensive outcrossing and long distance pollen flow in a sexually deceptive orchid species (Johnson and Nilsson, 1999), we are not aware of any test of the hypothesis that food deception in orchids enhances outcrossing.

### **Acknowledgements**

We thank L. Mickeliunas for help and pleasant company during the fieldwork. This study is part of the Doctoral Thesis by the first author at the Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal of the Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Essential financial support was provided by FAPESP (grant 00/11015-9) and CNPq.

### **References**

- Ackerman, J. D. (1981) Pollination biology of *Calypso bulbosa* var. *occidentalis* (Orchidaceae): a food-deception system. *Madroño* 28, 101-110.
- Ackerman, J. D. (1986) Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana* 1, 108-113.
- Arditti, J. (1992) *Fundamentals of orchid biology*. New York: John Wiley & Sons.
- Boyden, T. C. (1982) The pollination biology of *Calypso bulbosa* var. *americana* (Orchidaceae): initial deception of bumblebee visitors. *Oecologia* 55, 178-184.
- Calvo, R. N. (1993) Evolutionary demography of orchids: intensity and frequency of pollination and the cost of fruiting. *Ecology* 74, 1033-1042.
- Calvo, R. N. and Horvitz, C. C. (1990) Pollinator limitation, cost of reproduction, and fitness in plants, a transition matrix demographic approach. *American Naturalist* 136, 499-516.
- Cameron, K. M. (1999) Phylogeny and biogeography of Pogoniinae (Vanilloideae: Orchidaceae). *North American Native Orchid Journal* 5, 151-163.
- Cameron, K. M. (2003) Vanilloideae. In A. M. Pridgeon, P. J. Cribb, M. W. Chase, and F. N. Rasmussen (eds.), *Genera Orchidacearum*. vol 3. Oxford: Oxford University Press.

- Cameron, K. M. and Chase, M. W. (1999) Phylogenetic relationships of Pogoniinae (Vanilloideae, Orchidaceae): an herbaceous example of the eastern North America – eastern Asia phytogeographic disjunction. *Journal of Plant Research* 112, 317-329.
- Cameron, K. M., Chase, M. W., Whitten, W. M., Kores, P. J., Jarrell, D. C., Albert, V. A., Yukawa, T., Hills, H. G. and Goldman, D. H. (1999) A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* 86, 208-224.
- Catling, P. M. and Catling, V. R. (1991) A synopsis of breeding systems and pollination in North American orchids. *Lindleyana* 6, 187-210.
- Dafni, A. (1984) Mimicry and deception in pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15, 259-278.
- Dafni, A. (1987) Pollination in *Orchis* and related genera: evolution from reward to deception. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives* 4, 79-104.
- Dressler, R. L. (1981) *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Dressler, R. L. (1993) *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Gregg, K. B. (1989) Reproductive biology of the orchid *Cleisthes divaricata* (L.) Ames var. *bifaria* Fernald growing in a West Virginia meadow. *Castañea* 54, 57-78.
- Gregg, K. B. (1991a) Reproductive strategy of *Cleisthes divaricata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 78, 350-360.
- Gregg, K. B. (1991b) Defrauding the deceitful orchid: pollen collection by pollinators of *Cleisthes divaricata* and *C. bifaria*. *Lindleyana* 6, 214-220.
- Guignard, J. A. (1879) Insects and orchids. *Annu. Rep. Entomol. Soc. Ont.* 16, 39-55.
- Heinrich, B. (1975) Bee flowers: a hypothesis on flower variety and blooming times. *Evolution* 29, 325-334.
- Johnson, S. D. (2000) Batesian mimicry in the non-rewarding orchid *Disa pulchra*, and its consequences for pollinator behavior. *Biological Journal of the Linnean Society* 71, 119-132.

- Johnson, S. D., Linder, H. P. and Steiner, K. E. (1998) Phylogeny and adaptative radiation of pollination systems in *Disa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85, 402-411.
- Johnson, S. D. and Nilsson, L. A. (1999) Pollen carryover, geitonogamy, and the evolution of deceptive pollination systems in orchids. *Ecology* 80, 2607-2619.
- Luer, C. A. (1975) *The native orchids of the United States and Canada*. New York: New York Botanical Garden.
- Medley, M. E. (1979) Some aspects of the life story of *Triphora trianthophora* (Sw.) Rydb. (Three birds orchid) with reference to its pollination. Andrews University - St Andrews: MD Thesis.
- Mehrhoff, L. A. (1983) Pollination in the genus *Isotria* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 70, 1444-1453.
- Nilsson, L. A. (1992) Orchid pollination biology. *TREE* 7, 255-259.
- Pansarin E. R. (2000) *Biologia Reprodutiva e morfologia floral de espécies de Orchidaceae em diferentes ambientes no Estado de São Paulo*. Universidade Estadual de Campinas – Campinas: MD Thesis.
- Pansarin, E. R. (2003) *Biologia floral de Cleistes macrantha* (Barb. Rodr.) Schltr. (Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae). *Revista Brasileira de Botânica* 26, 73-80.
- Peakall, R. and Beattie, A. J. (1996) Ecological and genetic consequences of pollination by sexual deception in the orchid *Caladenia tentaculata*. *Evolution* 50, 2207-2220.
- van der Pijl, L. and Dodson, C. H. (1966) *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Florida: University of Miami.
- Pyke, G. H. (1991) What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature* 350, 58-59.
- Sakai, W. S. (1973) Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue. *Stain Technology* 43, 247-249.
- Salguero-Farías, J. A. and Ackerman, J. D. (1999) A nectar reward: is more better? *Biotropica* 31, 303-311.
- Smithson, A. (2002) The consequences of rewardlessness in orchids: reward-supplementation experiments with *Anacamptis morio* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 89, 1579-1587.

- Szlachetko, D. L. (1995) Systema Orchidaliium. Fragmenta floristica et geobotanica suplementum 3, 1-152.
- Thien, L. B. and Marcks, B. G. (1972) The floral biology of *Arethusa bulbosa*, *Calopogon tuberosus*, and *Pogonia ophioglossoides* (Orchidaceae). Canadian Journal of Botany 50, 2319-2325.



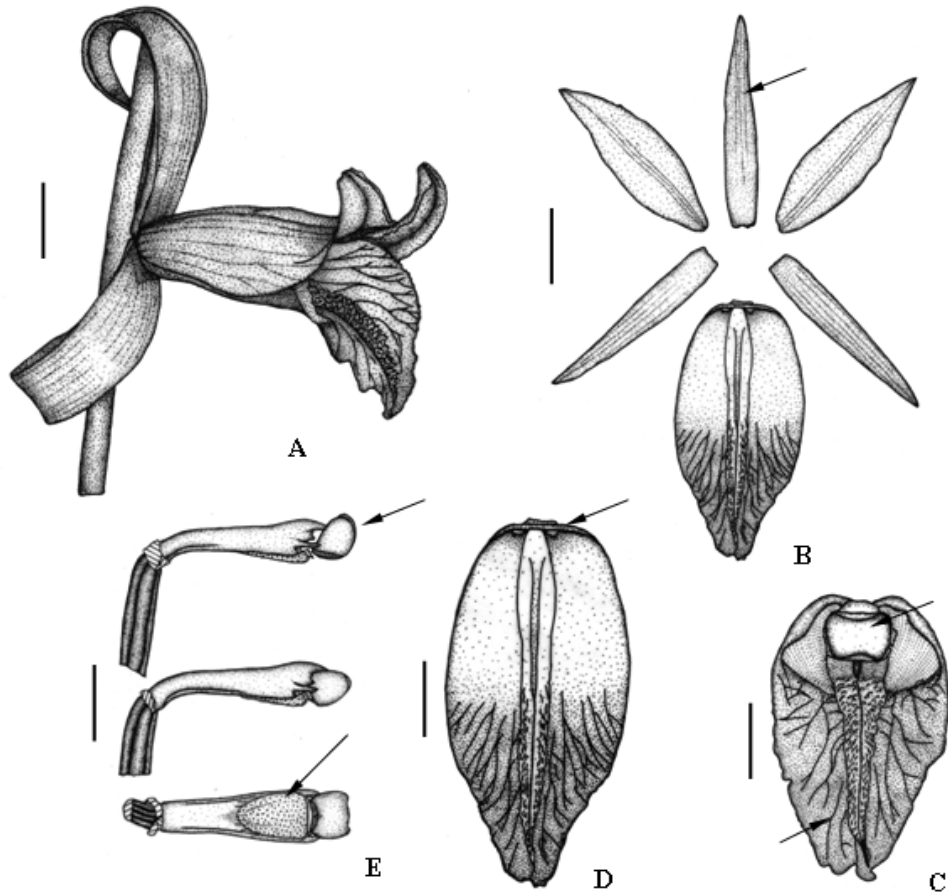
**Table 1** Study sites, coordinates, observation periods and voucher numbers of the studied *Cleistes* species.

Species	Location	Coordinate	Observation period	Voucher
<i>Cleistes aphylla</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	Teresina de Goiás - GO	13°36'S 47°13'W	5-6 Jan. 2002	<i>E.R. Pansarin &amp; L. Mickeliunas</i> 899
<i>Cleistes bella</i> Rchb. f. & Warm.	Serra do Cipó - MG	19°17'S, 43°35'W	13-14 Feb. 2002	<i>E.R. Pansarin &amp; L. Mickeliunas</i> 921
<i>Cleistes castanoides</i> Hoehne	Teresina de Goiás - GO	13°36'S 47°13'W	3-4 Jan. 2002	<i>E.R. Pansarin &amp; L. Mickeliunas</i> 889
<i>Cleistes exilis</i> Hoehne	Teresina de Goiás - GO	13°36'S 47°13'W	5-6 Jan. 2002	<i>E.R. Pansarin &amp; L. Mickeliunas</i> 898
<i>Cleistes gracilis</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	Atibaia - SP	23°13'S, 46°35'W	14-15 Jan. 2003	<i>E.R. Pansarin &amp; L. Mickeliunas</i> 963
<i>Cleistes paranaensis</i> (Barb. Rodr.) Schltr.	Diamantina - MG	18°14'S, 43°38'W	16-17 Jan. 2004	<i>L. Mickeliunas &amp; E.R. Pansarin</i> 31
<i>Cleistes pusilla</i> Pansarin	Diamantina - MG	18°14'S, 43°38'W	16-17 Jan. 2004	<i>L. Mickeliunas &amp; E.R. Pansarin</i> 12

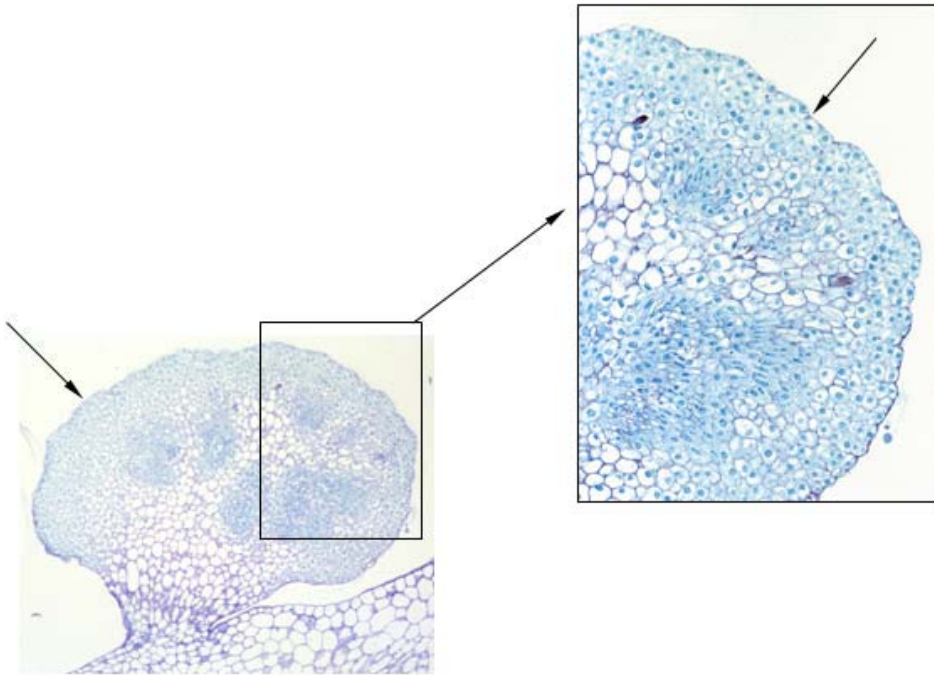
Vouchers are deposited at the herbarium of the Universidade Estadual de Campinas (UEC)

**Table 2** Specific floral features of the studied *Cleisthes* species, their pollinators and respective visit frequencies. Number between parenthesis = number of visits. “q” = queen; “w” = worker. Full plant species names are given in **table 1**.

Species	Perianth coloration	Lip dimension (cm)	Column length (cm)	Stigma length (mm)	Pollinia length (mm)	Pollinators/ number of visits	Pollinator dimension (cm)
<i>C. aphylla</i>	cream-whitish	1.2-1.8x0.5-0.7	0.8-1.1	2-2.5	1.5	<i>Dialictus</i> sp. (21)	0.65-0.67x0.2
<i>C. bella</i>	vinaceous	6.5-8.5x1,8-2,7	3.8-4.2	11-13	5-5.5	<i>Bombus atratus</i> (Franklin 1913) “q” (3)	1.8-2x0.8-0.9
<i>C. castanoides</i>	white, rose or vinaceous	4.2-6.4x2,8-3,5	2.5-5	4-5	3.5-4	<i>Bombus atratus</i> (Franklin 1913) “q” (5) <i>Eulaema nigrita</i> (Lepeletier, 1841) (1) <i>Xylocopa</i> (1)	1.8-2x0.8-0.9 2x0.8-0.9 2-2.2x1-1.1
<i>C. exilis</i>	rose to lilac	2-4.5x0,6-1	1,4-3	2.8-3.5	1.5-2	<i>Augochlora</i> sp. (23)	1-1.1x0.3
<i>C. gracilis</i>	vinaceous, pink or rose	2.3-3x0,8-1,4	2.6-4	2.6-4	2-2.4	<i>Augochlora</i> sp. (6) <i>Bombus morio</i> (Swederus, 1787) “w” (3)	1-1.1x0.3 1-1.2x0.6-0.7
<i>C. paranaensis</i>	lilac or white	4.5-6x2,3-3	3.3-3.8	3.5-4.5	3-3.5	<i>Bombus atratus</i> (Franklin 1913) “q” (2)	1.8-2x0.8-0.9
<i>C. pusilla</i>	rose to pink	1.5-2x0,5-1	1-1.5	2.3-2.6	1.5	<i>Dialictus</i> sp. (3)	0.65-0.7x0.25



**Fig. 1** *Cleistes castanoides*. Flower (A), perianth parts (B), frontal view of the lip and column (C), lip (D), column in lateral view with articulated anther, disarticulated anther, and in ventral view (E). Scale bars = 1 cm.



**Fig. 2** Longitudinal section of the nectariferous gland of *Cleistes castanoides*. Note the several layers of secretory cells with very large and stained nucleus. Arrows show the secretory surface x5. Detail x10.



**Fig. 3** Bee pollinated *Cleistes* species. *Dialictus* sp. leaving the flower of *Cleistes aphylla*. Note some pollen on its scutum (A), Flower of *C. bella* in diagonal view showing the white hairs on the central crest (B), *Xylocopa* sp. with its scutum covered with a pollen load, leaving the flower of *C. castanoides* (C), *Augochlora* sp. leaving a flower of *C. exilis*. Note the pollen deposited on its scutum (D), Flower of *C. gracilis* in frontal view showing the very conspicuous yellow papillae on the central crest (E), flower of *C. paranaensis* (F), Flower of *C. pusilla* (G). Details in Figs A, C and D are the respective pollinators probing for nectar at the lip basis. Scale bars = 1 cm.

## Capítulo 4

### Revisão taxonômica do gênero *Cleistes* Rich. ex Lindl.

Emerson R. Pansarin & Fábio de Barros

*Cleistes* Rich. ex Lindl.

Etimologia: O nome *Cleistes* é derivado do grego “*cleistos*” que significa fechado e faz referência ao labelo que, na maioria das espécies, se apresenta sob a forma de um tubo.

#### Histórico

A criação do gênero *Cleistes* foi sugerida por Richard (1818), mas o nome foi validamente publicado por Lindley (1840). Até então, *Cleistes* foi considerado por muitos autores como uma seção dentro do gênero *Pogonia* Juss. João Barbosa Rodrigues foi um dos primeiros estudiosos das espécies sul-americanas, apresentando, em sua iconografia, que foi posteriormente reproduzida por Sprunger *et al.* (1996), onze novas espécies para o Brasil. João Barbosa Rodrigues tratou as espécies brasileiras como pertencendo ao gênero *Pogonia* (Sprunger *et al.* 1996). Os dois únicos tratamentos envolvendo o gênero como um todo foram os realizados por Cogniaux (1893) e Hoehne (1940). No tratamento realizado por Cogniaux (1893), o gênero *Cleistes* foi tratado como uma seção dentro de *Pogonia*. Em seu trabalho, Cogniaux (1893) apresentou a descrição de 30 espécies para a seção *Cleistes*. Schlechter (1926) transferiu as espécies brasileiras, até então consideradas como uma seção dentro de *Pogonia*, para o gênero *Cleistes*. Hoehne (1940) apresentou a descrição de 42 espécies de *Cleistes* para o Brasil. Algumas delas, segundo o próprio autor, com limites muito mal definidos. Baseando-se neste fato, Hoehne (1940), em seu tratamento para o gênero, sugeriu a existência de nove seções (como centros de espécies) e relatou que as espécies incluídas em cada uma dessas seções poderiam ser simples variedades ou formas de uma única espécie. Pabst & Dungs (1975) apresentaram, para o Brasil, uma listagem de 47 espécies com ilustrações. Pabst & Dungs (1975) seguiram, basicamente, o tratamento realizado por Hoehne (1940) e também aceitaram essencialmente as mesmas seções,

porém, com algumas modificações. A partir de então, o gênero *Cleistes* tem sido tratado em floras locais e descrições de novas espécies. O estudo mais específico neste sentido foi a dissertação recentemente apresentada por Silva (2002), que fez o levantamento das espécies de *Cleistes* na Chapada Diamantina (Bahia), sendo identificadas nove espécies para a região.

### **Material e métodos**

O estudo morfológico das espécies de *Cleistes* foi baseado em espécimes de diversos herbários: CEN, ESA, HB, HRCB, HUEFS, INPA, MBML SP, SPF, R, RB, UEC, VEN e VIC, e a partir de material fresco, coletado no campo ou fixado em FAA 50%. Para elaboração das micrografias obtidas em MEV, superfícies de folhas, estruturas florais e sementes foram montadas em “stubs” de alumínio e cobertos com ouro-paládio. Os espécimes foram observados e fotografados sob uma tensão de 10 kv e a uma distância de trabalho de 10 a 15 mm. As descrições e as medidas das micro-estruturas foram baseadas nas micrografias realizadas, utilizando para isso as barras de escalas correspondentes para cada espécime analisado.

Para realização dos estudos anatômicos foi utilizada a porção basal do labelo de *Cleistes libonii* (Rchb. f.) Schltr. e raízes tuberosas de *C. gracilis* (Barb. Rodr.) Schltr. e *C. rosea* Lindl. As raízes tuberosas de *C. rosea* e *C. gracilis*, e as flores e de *Cleistes libonii* foram coletadas no campo, fixadas em FAA 50% e transferidas para álcool 70%. Posteriormente foi realizada a série de desidratação alcoólica em álcool etílico 70%, 80%, 96% e 100% e porções das raízes tuberosas e da região basal dos labelos foram emblocados em historresina, em moldes de polietileno. Para isso, foram realizadas as etapas de pré-infiltração, infiltração e polimerização. Após a polimerização, os moldes foram levados à estufa. Posteriormente, os blocos foram colados em retângulos de madeira e cortados em micrótomo rotativo.

Os cortes foram montados em lâminas com água destilada e secos em estufa. Posteriormente foram corados com Azul de Toluidina 1% (solução alcoólica) em cubetas de vidro e novamente secos em estufa. Após secos os cortes, as lamínulas foram montadas com “Permount”.

***Cleistes* Rich. ex Lindl.**

*Cleistes* Rich., Orch. Eur. 9. Mem. Mus. Paris, 4: 31. 1818; Lindl., Gen. Sp. Orchid. Pl. 409. 1840. Tipo: Trinidad, Purdie, 1940, *Hooker s.n.* (holótipo K!).

= *Pogonia* Juss. *pro parte.*, Gen. Pl. 65. 1789. ≡ *Pogonia grandiflora* (Aubl.) Lindl. ≡ *Limodorum grandiflorum* Aubl., Pl. Guian. 2: 818. 1775. Tipo: Trinidad, Purdie, 1940, *Hooker s.n.* (holótipo K!).

Ervas terrícolas, palustres ou rupícolas. Raízes geralmente em número de 3 a poucas por indivíduo, esparsa ou densamente revestidas por tricomas; raiz tuberosa maciça ou oca, densa ou esparsamente revestida por tricomas. Rizoma subterrâneo, cilíndrico, revestido por tricomas. Caule aéreo ereto, glauco, piloso na base, glabro em direção ao ápice, produzido apenas na época reprodutiva, desaparecendo após a deiscência dos frutos. Folhas sésseis, evidentes ou não, linear-lanceoladas a ovais, glaucas, ápice agudo a acuminado, base aguda a atenuada, as superiores maiores ou menores que as medianas, as inferiores reduzidas, geralmente amplexivas na base. Inflorescência racemosa, terminal, com 1-6 flores. Flores axilares, ressupinadas; sépalas linear-lanceoladas a elíptico-lanceoladas, carnosas; pétalas lanceoladas a espatuladas, algumas vezes falcadas, membranáceas; labelo 1-3-lobado, com crista central disposta longitudinalmente na porção central; crista central geralmente de coloração diferenciada das demais partes da flor; base do labelo com duas glândulas nectaríferas esféricas, ovais ou piriformes; lobos laterais arredondados a falcados; lobo apical em geral unguiculado; istmo retangular ou trapezoidal. Coluna claviforme, delgada na base, dilatada para o ápice; antera terminal, versátil, com duas polínias; polínias de consistência farinácea, bipartidas, amarelas; grãos de pólen em mônades; superfície estigmática plana ou côncava, em geral com diminutas papilas hialinas; zona de abscisão entre perianto e ovário presente; ovário geralmente indistinto do pedicelo. Fruto cápsula, oblongo a oval, em geral glauco, mesmo quando deiscente. Sementes numerosas, tunicadas, sem endosperma. (Figuras 1-3).



Gênero com 18 espécies distribuídas entre as Américas Central e do Sul. Estudos cladísticos realizados por Cameron & Chase (1999) e Pansarin *et al.* (em preparação) revelaram que as espécies *C. divaricata* (L) Ames e *C. bifaria* (Fernald) Catling & Gregg, que ocorrem nos Estados Unidos, estão mais relacionadas com o clado norte-americano-asiático, que inclui os gêneros *Isotria* e *Pogonia*, devendo ser excluídas do gênero *Cleistes*. O Brasil Central constitui o centro de diversidade para o gênero (Hoehne 1940).

### Chave para as espécies de *Cleistes*

1. Plantas com folhas reduzidas
  2. Flores esbranquiçadas; vênulas do labelo ausentes
    3. Inflorescência com 1-3(-4) flores; labelo 3-lobado ..... **1.** *C. aphylla*
    3. Inflorescência com mais de 4 flores; labelo inteiro ..... **17.** *C. stricta*
  2. Flores róseas ou vináceas; vênulas do labelo presentes
    4. Crista central do labelo esbranquiçada ..... **14.** *C. pusilla*
    4. Crista central do labelo amarelada
      5. Flores róseo-escuras; crista central larga, amarelo-intensa .. **4.** *C. elongata*
      5. Flores róseas, róseo-esbranquiçadas, róseo-amareladas ou lilás-azuladas; crista central do labelo estreita, amarelo-pálida ..... **5.** *C. exilis*
1. Plantas com folhas evidentes
  6. Folha apical maior que as medianas ..... **16.** *C. rosea*
  6. Folha apical menor ou igual as medianas
    7. Flores brancas ou branco-esverdeadas
      8. Labelo com lobo apical unguiculado; istmo ca. 5 mm .....  
..... **2.** *C. batistana*
      8. Labelo com lobo apical não unguiculado; istmo ausente ou pouco evidente ..... **18.** *C. tenuis*
    7. Flores em tons de rosa ou vináceas
      9. Porção apical da crista central do labelo formada por fímbrias

- 10.** Plantas robustas, folhosas; caule com entrenós muito curtos; folhas freqüentemente ovais ou elípticas; flores róseo-vináceas .....  
..... **3.** *C. bella*
- 10.** Plantas esguias, com folhas escassas, caule com entrenós alongados, folhas freqüentemente agudas ou lanceoladas; flores róseas
- 11.** Istmo entre os lobos laterais e o apical muito evidente; lobos laterais falcados; porção apical pouco diferenciada do istmo ..... **15.** *C. ramboi*
- 11.** Istmo entre os lobos laterais e o apical pouco evidente ou ausente; lobos laterais arredondados; lobo apical evidente .....  
..... **13.** *C. paranaensis*
- 9.** Porção apical da crista central do labelo formada por papilas
- 12.** Vênulas do labelo evidentes
- 13.** Plantas desenvolvendo-se em locais de Mata Atlântica, em barrancos úmidos ou em restinga; ovário + pedicelo 4,6-5,8 cm compr.; labelo 6,5-7,6x3,3-4,3 cm ..... **8.** *C. libonii*
- 13.** Plantas desenvolvendo-se em campos de altitude; ovário + pedicelo 1,2-2,6 cm compr.; labelo 2,3-3,6x0,8-1,4 cm .....  
..... **6.** *C. gracilis*
- 12.** Vênulas do labelo ausentes ou pouco evidentes
- 14.** Labelo com lobo apical unguiculado
- 15.** Estigma com uma depressão longitudinal na porção mediana ..... **9.** *C. mantiqueirae*
- 15.** Estigma plano ..... **11.** *C. montana*
- 14.** Labelo com lobo apical não unguiculado
- 16.** Flores róseo-alaranjadas; ovário + pedicelo 1,8-2,8 cm compr. .... **12.** *C. moritzii*
- 16.** Flores róseas; ovário + pedicelo maior que 3 cm compr.
- 17.** Labelo inteiro ..... **7.** *C. grandiflora*

17. Labelo 3-lobado ..... 10. *C. metallina*

1. *Cleisthes aphylla* (Barb. Rodr.) Hoehne, Arch. Bot. São Paulo 1: 180. 1926.  $\equiv$  *Pogonia aphylla* Barb. Rodr., Gen. sp. Orchid. 2: 269. 1882. Tipo: Brasil, Paraná, Campos de São Bento e Rincão das Pedras, I.1880, *Schwacke* 72 (holótipo R!; isótipo RB!).

Figuras: 4, 20B, 20D, 22F, 24.

= *Cleisthes toledoii* Schltr. ex Hoehne, Bol. Mus. Nac. Rio de Janeiro 12(2): 30. 1936, *pro syn.*

Plantas 13-42(-50) cm alt., terrícolas. Raízes 0,5-1 mm diâm; raiz tuberosa 1-1,5x0,4-0,6 cm, oval, maciça, branca ou creme, revestida por tricomas acastanhados. Caule 0,5-2 mm diâm., reto, às vezes tortuoso na porção mediana. Folhas 2-9x1-2,8 mm, lanceoladas a elíptico-lanceoladas, às vezes ovais, eretas, adpressas ao caule, ápice agudo, as apicais menores que as medianas, as basais reduzidas a pequenas escamas. Inflorescência geralmente com 1-3(-4) flores. Flores predominantemente esbranquiçadas; ovário + pedicelo 1-2 cm compr.; sépalas 14-20x2,5-3,8 mm, lanceoladas a linear-lanceoladas, externamente de coloração creme, ápice agudo, a apical simétrica, as laterais assimétricas; pétalas 12-18x3,5-5,5 mm, elípticas a elíptico-lanceoladas, às vezes oblanceoladas ou falcadas, branco-hialinas, às vezes com porção apical levemente rósea, ápice agudo a acuminado; labelo 12-18x4,5-6,5 mm, 3-lobado, de âmbito oblanceolado, às vezes oblongo ou apresentando uma constrição na porção mediana, branco-hialino, às vezes com lobos laterais e apical levemente róseos; glândulas nectaríferas ca. 0,5 mm diâm., esféricas; crista central amarelada, com diminutas papilas amareladas na porção apical; lobos laterais falcados ou sub-falcados, ápice agudo ou arredondado; lobo apical unguiculado, istmo 1-2 mm compr., retangular ou trapezoidal, porção apical arredondada, oval ou romboidal, margem ondulada, serreada. Coluna 8-11 mm compr., reta, branca; estigma 2-2,5 mm compr., oval, plano; antera branca, ápice formado por três protuberâncias arredondadas; polínias ca. 1,5 mm compr. Frutos 2,5-3,8x0,4-0,6 cm, oblongos a ovais, verdes. Sementes ca. 0,46x0,2 mm, curtamente oblongas a ovais, de coloração creme.

A espécie distribui-se pelos Estados de Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais. Na região sul está representada apenas pelo exemplar tipo, coletado no Estado do Paraná. Atualmente, os campos nos quais o tipo de *Cleistes aphylla* foi coletado deram lugar a lavoura e pastagens. Espécie encontrada em campos úmidos, principalmente em vereda. Floresce entre os meses de dezembro e fevereiro. Os frutos tornam-se deiscentes entre fevereiro e início de abril. Cada flor dura um dia.

É facilmente identificável pelo caule delgado com folhas reduzidas, pelas flores esbranquiçadas com sépalas de coloração creme, pelo labelo branco-hialino e sem vênulas, e pela crista central amarela, formada por diminutas papilas.

Rodrigues (1882) designou como holótipo de *Pogonia aphylla* o material *Schwacke 72*, depositado no herbário do Museu Nacional do Rio de Janeiro (R). No herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB) há uma duplicata, cuja etiqueta foi refeita posteriormente à ocasião da coleta, indicando como coletor *Schwacke 2510 (II 72)*. Outra etiqueta, localizada abaixo daquela, indica 2510 como número do herbário Schwacke e o número de coletor (72) está entre parênteses, abaixo do número do herbário.

Material examinado: **BRASIL, DISTRITO FEDERAL: Brasília**, II.1992, *J.A.N. Batista 277* (CEN); I.1997, *J.A.N. Batista 665* (CEN). **GOIÁS: Alto Paraíso de Goiás**, II.1966, *H.S. Irwin et al. 12530* (UB); I.1993, *J.A.N. Batista & L.B. Bianchetti 392* (CEN); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista 739* (UEC); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista 744* (UEC); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista 754* (UEC); III.2001, *J.A.N. Batista 1232* (CEN); XII.2001, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 862* (UEC); I.2003, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 947* (UEC); I.2003, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 951* (UEC). **Cavalcante**, I.1999, *J.A.N. Batista 828* (CEN, UEC); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista 754* (UEC). **Pirenópolis**, I.1991, *J.A.N. Batista 161* (CEN). **Teresina de Goiás**, XII.2001, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 865* (UEC); XII.2001, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 870* (UEC); I.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 885* (UEC); I.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 899* (UEC). **MINAS GERAIS: Diamantina**, I.2000, *J.A.N. Batista & K. Proite 1026* (CEN, UEC); I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 14* (UEC).

2. *Cleistes batistana* Pansarin, *sp. nov.* Tipo: Brasil, Distrito Federal, Brasília, Campo próximo ao Ribeirão do Gama, ao lado oposto ao conjunto 3 da quadra 24, das Mansões setor Park Way, II.1996, *J.A.N. Batista et al.* 599 (holótipo CEN!).

Figuras: 5, 21F, 25.

Plantas 15-50 cm alt., terrícolas. Raízes 0,5-0,7 mm diâm., escuras. Caule 0,5-3 mm diâm., reto ou às vezes sinuoso, verde-amarelado do meio para a base, verde em direção ao ápice. Folhas 6-25x3-6 mm, lanceoladas ou elíptico-lanceoladas, eretas ou ereto-patentes, côncavas a levemente conduplicadas, amplexivas na base, ápice agudo, as apicais em geral menos desenvolvidas que as medianas, as basais reduzidas a pequenas bainhas ovais. Inflorescência com 1-2 flores. Flores predominantemente esbranquiçadas; ovário + pedicelo 1-3 cm compr.; sépalas 18-24x3-4,5 mm, lanceoladas, esverdeadas, ápice agudo, vinoso ou acastanhado; pétalas 18-20x5-7,5 mm, elípticas, branco-hialinas, ápice acuminado; labelo 18-20x6-9 mm, 3-lobado, de âmbito oblanceolado ou oblongo, às vezes com uma constrição na porção mediana, branco-hialino ou levemente esverdeado, com discretas vênulas vináceas; glândulas nectaríferas ca. 0,6 mm diâm., esféricas ou sub-ovais; crista central amarelada, com diminutas papilas amareladas na porção apical; lobos laterais truncados a sub-falcados, ápice arredondado; lobo apical unguiculado, istmo 1,5-2 mm compr., retangular, porção apical oval ou deltóide, margem ondulada, crenulada. Coluna 9-12 mm compr., reta, branca; estigma 2-2,2 mm compr., oval, plano; antera arredondada, branca, ápice truncado ou sub-emarginado; polínias 1,4-1,6 mm compr. Frutos 2,5-3,5x0,3-0,4 cm, lineares a oblongos, verdes.

Espécie coletada apenas no Distrito Federal. Encontrada em campos úmidos, em vereda. Floresce entre o final do mês de janeiro e início de março. Cada flor dura um dia.

Identificável pelas flores predominantemente esbranquiçadas, pelo labelo esbranquiçado ou esverdeado com vênulas vináceas, pelos lobos laterais geralmente truncados e lobo apical geralmente unguiculado com porção apical oval ou deltóide.

Material examinado: **BRASIL, DISTRITO FEDERAL: Brasília**, I.1996, *J.A.N. Batista & R. Oliveira* 583 (CEN); III.1996, *J.A.N. Batista & L.B. Bianchetti* 607 (CEN); II.1998, *J.A.N. Batista et al.* 768 (CEN).

3. *Cleisthes bella* (Rchb. f. & Warm.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 179. 1926.  $\equiv$  *Pogonia bella* Rchb. f. & Warm., Otia bot. Hamburg. 2: 82. 1881. Tipo: Brasil, Minas Gerais, Lagoa Santa, in campsis, *E. Warming s.n.* (holótipo W!).

Figuras: 6, 21A, 26.

Plantas 15-75 cm alt., terrícolas. Raízes 1,5-2,5 mm diâm., densamente pilosas; raiz tuberosa 7-13x1-1,8 cm, cônica ou oblonga, oca, acastanhada. Caule 1,5-7 mm diâm., sinuoso, principalmente do meio para o ápice, entrenós muito curtos. Folhas 3,8-9-x1,5-4,5 cm, elípticas, elíptico-lanceoladas ou ovais, patentes ou ereto-patentes, levemente conduplicadas, às vezes com manchas vináceas, ápice agudo a acuminado, as apicais menores e com base mais atenuada que as medianas, as basais reduzidas, ovais, eretas ou ereto-patentes. Inflorescência geralmente com 1-3 flores. Flores predominantemente róseo-vináceas; ovário + pedicelo 3,5-5,5 cm compr.; sépalas 5,5-9x0,9-1,4 cm, linear-lanceoladas, internamente róseo-vináceas, externamente róseo-esverdeadas, ápice agudo; pétalas 5-8,5x1,2-2 cm, elípticas a elíptico-lanceoladas, esbranquiçadas em direção à base, róseo-vináceas do meio para o ápice, ápice agudo, às vezes com margem recortada; labelo 5-8,5x1,8-2,7 cm, 3-lobado, de âmbito oblongo, com uma constrição na porção mediana, róseo-claro em direção à base, róseo-vináceo com vênulas roxo-escuras do meio para o ápice; glândulas nectaríferas ca. 1,5 mm compr., ovais; crista central amarelada, amarelo-esverdeada ou esbranquiçada, com numerosas fímbrias esbranquiçadas ou papilas amareladas ou amarelo-esverdeadas na porção apical; lobos laterais falcados, ápice arredondado; lobo apical unguiculado, istmo 4-8 mm compr., retangular ou trapezoidal, porção apical oval ou deltóide, margem ondulada, denteada. Coluna 3,6-4,2 cm compr., reta, branca, às vezes com linhas longitudinais vináceas; estigma 1,1-1,3 cm compr., oval, plano; antera branca ou branco-vinácea, ápice sub-emarginado; polínias 5-5,5 mm compr. Frutos 5-8,3x1-1,5 cm, oblongos ou cônicos, afilados em direção a base, verdes.

Espécie distribuída pelo Distrito Federal, Goiás e Minas Gerais. Geralmente é encontrada em campo cerrado seco, no entanto, também pode ocorrer em locais úmidos, às margens de riachos, em barrancos ou entre rochas adjacentes a vegetação de cerrado. Floresce entre o final do mês de janeiro e início de março. Os frutos se tornam deiscentes entre maio e junho. Cada flor dura até três dias. As flores são muito fragrantas, principalmente nas horas mais quentes do dia.

Espécie facilmente identificável pelas grandes flores róseo-vináceas, na maioria das vezes contrastando com o reduzido caule aéreo, pelas folhas bem evidentes, patentes ou ereto-patentes, levemente conduplicadas e geralmente verde-vináceas, pelo labelo com uma constrição muito evidente na porção mediana, lobos laterais falcados e lobo apical oval a deltóide, e com crista central geralmente apresentando fímbrias esbranquiçadas na porção apical. O caule, as folhas e as flores se tornam enegrecidos após serem desidratados. Os espécimes coletados no Distrito Federal e em Goiás geralmente são mais robustos e mais altos que os encontrados em Minas Gerais.

Quando Reichenbach & Warming (1881) descreveram *Pogonia bella*, assim como *P. caloptera* e *P. mantiqueirae*, eles indicaram, para cada uma delas, o nome *Cleisthes* Rich. entre parênteses. No entanto, eles claramente consideraram essas espécies como pertencendo ao gênero *Pogonia* Juss., uma opinião que Reichenbach (1865) adotou previamente e que está representado no seu tratamento para as espécies de *Pogonia* em *Xenia* Orchidacea. Quando Schlechter e Hoehne transferiram várias espécies brasileiras de *Pogonia* para o gênero *Cleisthes*, eles não reconheceram que *C. bella*, *C. caloptera* e *C. mantiqueirae* não haviam sido validamente publicadas como membros do gênero *Cleisthes* por Reichenbach (1881). De acordo com Medley (1991), *C. bella*, assim como *C. caloptera* e *C. mantiqueirae*, foi validamente publicada por Schlechter & Hoehne (1926).

Material examinado: **BRASIL, DISTRITO FEDERAL: Brasília**, II.1960, *C. Porto* 3424 (RB); II.1961, *E.P. Heringer* 7951 (UB); XI.1962, *E.P. Heringer* 9690 (UB); I.1992, *J.A.N. Batista* 266 (CEN); II. 1995, *J.A.N. Batista* 524 (CEN); II.1995, *R.S. Oliveira* 101 (UB); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista* 758 (UEC); III.2001, *J.A.N. Batista & O.B. Oliveira Neto* 1204 (CEN, UEC). **GOIÁS: Alto Paraíso de Goiás**, II.1979, *P.Gates &*

*Estabrook 119* (NY, RB, SP, UB); II.1991, *B.M.T. Walter et al. 673* (IBGE); I.1993, *J.A.N. Batista & L.B. Bianchetti 383* (CEN). **Goiás**, I.1966, *Andrade-Lima 66-4406* (IPA, UEC). **Luziânia**, I.1979, *E.P. Heringer 17311* (IBGE). **MINAS GERAIS: Datas**, IV.1980, *F. Barros 139* (SP). **Diamantina**, II.2002, *M. Mansanares et al. 230* (UEC); I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 26* (UEC). **Jaboticatubas**, II.1972, *M. Sazima 13406* (UEC). **Paraopeba**, IV.1954, *E.P. Heringer 3475* (UB). **Santana do Riacho**, III.1982, *J. Semir & A.B. Martins 13470* (UEC); II.1985, *M.A. Lopes & P.M. Andrade s.n.* (BHCB 9107); II.1986, *N.L. Menezes et al. CFSC 9628* (SPF, UEC). **Serra da Moeda**, VIII.1987, *C.C. Reis et al.25* (BHCB). **Serra do Cipó**, III.1958, *E.P. Heringer & Castellanos 6086* (UB); III.1958, *E.P. Heringer & Castellanos 22245* (R); III.1999, *J.A.N. Batista & L.B. Bianchetti 887* (CEN); II.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 921* (UEC).

4. *Cleistes elongata* Pansarin, *sp. nov.* Tipo: Brasil, Distrito Federal, Brasília Setor de Mansões Park Way, vareda do lado oposto ao Rio Taquara, na quadra 24 do conjunto 3, II.2005, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 1175* (holótipo UEC!).

Figuras: 7, 21E, 27.

Plantas 53-80 cm alt, terrícolas. Raízes 0,7-1 mm diâm. Caule 0,7-2,5 mm diâm., geralmente reto, entrenós muito alongados. Folhas 4-11x1-3 mm, elípticas a elíptico-lanceoladas, eretas, adpressas ao caule, as apicais menores que as medianas e às vezes ereto-patentes, as basais reduzidas a escamas. Inflorescência com 2-4 flores. Flores predominantemente róseo-escuras; ovário + pedicelo 1,5-1,8 cm compr.; sépalas 21-24x4-4,5 mm, lanceoladas a linear-lanceoladas, externamente róseo-pálidas, internamente róseo-escuras, ápice agudo, a apical simétrica, as laterais assimétricas; pétalas 19-23x4,5-5,5 mm, elípticas, róseas, ápice agudo a acuminado; labelo 19-23x6-7 mm, 3-lobado, de âmbito oblongo a sub-oblancheolado, róseo, com discretas vênulas vináceas; glândulas nectaríferas ca. 0,5 mm diâm., esféricas ou sub-ovais; crista central larga amarela, com papilas completamente amarelo-intensas na porção apical; lobos laterais sub-falcados a falcados, ápice agudo a arredondado; lobo apical unguiculado, istmo ca. 1 mm compr., trapezoidal, porção apical oval, margem ondulada. Coluna 9-11 mm compr., reta, branca; estigma 2,5-3



mm compr., oval, plano; antera branca, ápice truncado a emarginado. Frutos 2,7-3,5x0,5-0,7 cm, oblongos, verdes.

Espécie coletada apenas no Distrito Federal. Encontrada em campos úmidos, em vereda. Floresce desde o final do mês de novembro até março. Os frutos tornam-se deiscentes entre março e maio. Cada flor dura apenas um dia.

Identificável pelo caule esguio e muito longo, pelas flores predominantemente róseo-escuras, pelo labelo róseo com vênulas pouco evidentes e pela crista central larga, composta de papilas amarelo-intensas.

Material examinado: **BRASIL, DISTRITO FEDERAL: Brasília**, II.1996, *J.A.N. Batista et al. 600* (CEN); I.1997, *J.A.N. Batista 671* (CEN); XI.1999, *J.A.N. Batista & K. Proite 958* (CEN).

5. *Cleistes exilis* Hoehne, *Comm. Lin. Telegr., Bot.*, 9: 26. 1916. Tipo: Brasil, Minas Gerais, perto de Sabará, *F.C. Hoehne 6829* (holótipo R!).

Figuras: 8, 21B, 23A, 28.

= *Cleistes cipoana* Hoehne, *Arq. Bot. Est. São Paulo* 1: 43. 1939. Tipo: Brasil, Minas Gerais, Serra do Cipó, km 140, estrada do Pilar, I. 1934, *M. Barreto 4886* (holótipo SP!).

= *Cleistes medicii* Ruschi, *Brasil Florestal* 3(11): 3. 1972. Tipo: Brasil, Bahia, Andaraí, Serra do Capa Bode, IV.1972, *A. Ruschi 1111* (holótipo MBML!).

Plantas 20-75 cm alt., terrícolas ou palustres. Raízes 0,8-1,2 mm diâm; raiz tuberosa 3,5-4,8x0,7-1,1 cm, oblonga ou cônica, maciça, ferrugínea, revestida por tricomas acastanhados. Caule 0,5-2,8 mm diâm., reto, entrenós alongados. Folhas 3-40x2-6 mm, geralmente reduzidas, lanceoladas, elíptico-lanceoladas, ou mais raramente oval-lanceoladas, eretas, côncavas, adpressas, amplexivas na base, as superiores menores que as medianas, as basais reduzidas a pequenas bainhas elípticas e amplexivas, ápice agudo a

acuminado. Inflorescência com 1-4(-5) flores. Flores em geral predominantemente róseas, podendo ser róseo-esbranquiçadas, róseo-amareladas ou lilás-azuladas; ovário + pedicelo 1,6-3,5 cm compr.; sépalas 2-4,5x0,3-0,55 cm, lanceoladas a linear-lanceoladas, em geral internamente róseas ou róseo-vináceas, externamente róseo-pálidas ou róseo-amareladas, ápice agudo ou acuminado; pétalas 1,8-4,3x0,5-0,8 cm, elípticas a oblanceoladas, freqüentemente falcadas, róseas, róseo-pálidas ou lilás-pálidas, ápice agudo; labelo 2-4,5x0,6-1 cm, 3-lobado, de âmbito oblongo, oblanceolado a sub-pandurado, com uma constrição próximo aos lobos laterais, róseo ou lilás-pálidos em direção à base, em geral róseo-escuro, róseo ou lilás com estrias vináceas para o ápice; glândulas nectaríferas 0,8-1 mm diâm., globosas ou sub-ovais; crista central estreita, amarelo-pálida, com papilas arredondadas e amareladas na porção apical; lobos laterais falcados, ápice arredondado; lobo apical unguiculado, istmo pouco evidente, porção apical aguda, triangular ou deltóide, margem ondulada. Coluna 1,4-3 mm compr., reta, branca; estigma 5-7 mm compr., oval, côncavo na porção mediana; antera branca ou vinácea, ápice truncado ou sub-emarginado; polínias 1,5-2 mm compr. Frutos 2-3,5x0,7-1,3 cm, lineares a oblongos, verdes. Sementes ca. 0,77x0,22 mm, em forma de projétil, acastanhadas, ápice agudo.

Espécie distribuída pelos Estados de Minas Gerais, Goiás e Bahia. Encontrada principalmente em campos abertos úmidos. Em Goiás ocorre no mesmo ambiente que *Cleisthes aphylla*. No Estado da Bahia, é comumente encontrada na Chapada Diamantina, onde ocorre principalmente em solo úmido, entre rochas. Floresce entre os meses de janeiro e fevereiro. Os frutos tornam-se deiscentes entre março e abril. Na chapada Diamantina, no Estado da Bahia, algumas vezes é possível encontrar plantas com flores até o mês de julho. Cada flor dura apenas um dia.

Identificável pelo caule delgado e delicado com folhas reduzidas, pelo labelo com estrias vináceas muito evidentes, com lobos laterais falcados, lobo apical unguiculado com istmo pouco evidente e porção apical aguda, triangular ou deltóide, e pela crista central estreita formada por papilas amareladas na porção apical. A coloração das flores é muito variável. Comumente são róseas, como observado em populações dos Estados de Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal. No entanto, na Chapada Diamantina, na Bahia, alguns indivíduos podem apresentar flores lilás a levemente azuladas.

Material examinado: **BRASIL, BAHIA: Abaíra**, III. 1992, *T. Laessoe & T.R.S. Silva* 53307 (SPF); III.1992, *B. Stannard et al.* 51693 (HUEFS, SPF). **Andaraí**, II.1977, *R.M. Harley et al.* 18765 (IPA, SPF, UEC); III.1992, *B. Stannard et al.* 52752 (HUEFS); III.1992, *P.T. Sano & T. Laessoe* 50980 (HUEFS); II.1994, *W. Ganev s.n.* (HUEFS 19178). **Ibicoara**, III.2000, *S. Koehler* 20/00 (UEC). **Lencóis**, VII.1994, *S. Mayo et al.* 37 (HUEFS, SPF); IX.1996, *J.A.N. Batista & R. Oliveira* 626 (CEN). **Mucugê**, VII.1996, *H.P. Bautista et al.* 3638 (ALCB). **Rio de Contas**, II.1987, *R.M. Harley et al.* 24645 (SPF); III.1994, *S. Atkins et al.* 14799 (ESA, SPF, UEC); I.1998, *L.P. Queiroz & C.C. dos Santos* 4957 (HUEFS); II.2001, *E.R. Pansarin et al.* 783 (UEC); II.2002, *A.O. Simões et al.* 47 (UEC). **GOIÁS: Alto Paraíso de Goiás**, II.1991, *B.M.T. Walter et al.* 648 (CEN, IBGE); II.1991, *B.M.T. Walter et al.* 673 (CEN, IBGE); IV.1991, *O.A. da Silva s.n.* (CEN 14880); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista* 741 (UEC); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista* 746 (UEC); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista* 752 (UEC); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista s.n.* (UEC 117380); I.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 901 (UEC). **Chapada dos Veadeiros**, XII.1968, *G.M.J. Ana* 508 (UB). **Pirenópolis**, I.1972, *H.S. Irwin et al.* 34535 (UB); I.1991, *J.A.N. Batista* 158 (CEN); II.1995, *J.A.N. Batista & L.B. Bianchetti* 541 (CEN). **Santo Antônio do Descoberto**, I.1976, *E.P. Heringer* 15358 (UB). **Teresina de Goiás**, XII.2001, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 871 (UEC); I.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 886 (UEC); I.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 895 (UEC); I.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 898 (UEC). **MINAS GERAIS: Catas Altas (Serra do Caraça)**, I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin* 40 (UEC). **Datas**, I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin* 9 (UEC); I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin* 33 (UEC). **Diamantina**, I.1969, *H.S. Irwin et al.* 22350 (UB); I.2000, *J.A.N. Batista & K. Proite* 1019 (CEN); I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin* 19 (UEC); I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin* 20 (UEC); I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin* 24 (UEC). **Itabirito**, I.1994, *W.A. Teixeira s.n.* (BHCB 26080); II.1995, *W.A. Teixeira s.n.* (BHCB 26347). **Jaboticatubas**, II.1972, *M. Sazima* 13407 (UEC). **Mendanha**, I.1969, *H. S. Irwin et al.* 22703 (UB). **Presidente Kubitschek**, II.2000, *R. Mello-Silva & R.C. Forzza* 1778 (SPF). **Santana do Riacho**, II.1999, *J.A. Lombardi & L.G. Temponi* 2460 (BHCB). **Serra do Cipó**, II.1934, *A.J. Sampaio* 6805 (HB); II.1968, *H.S. Irwin et al.* 20339 (UB); II.1968, *H.S. Irwin et al.*

20457 (UB); II.1968. *H.S. Irwin et al.* 20641 (UB); II.1995, *N.M. Castro* 402 (HUFU); I.2000, *J.A.N. Batista & K. Proite* 991 (CEN); I. 2000, *J.A.N. Batista & K. Proite* 997 (CEN); II.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 923 (UEC). **Serro**, I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin* 5 (UEC).

6. *Cleisthes gracilis* (Barb. Rodr.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia rodriguesii* Cogn. in Mart., Fl. Bras. 3(4): 121. 1893. ≡ *Pogonia gracilis* Barb. Rodr., Rev. de Eng. 3(5): 74. 1881, non Blume. 1858. Tipo: Brasil, Minas Gerais, São João del Rei, Serra do Lenheiro, s.dat., *J.B. Rodrigues s.n.* (perdido). Lectótipo aqui designado: ilustração original preparada por João Barbosa Rodrigues, em II.1881, depositada na biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e reproduzida por Sprunger *et al.* (1996) em Iconographie des orchideés du Brésil vol.1, t. 36.

Figuras: 9, 19A, 22A, 29.

= *Cleisthes paulensis* Schltr., Arch. Bot. Est. São Paulo 1: 180. 1926. ≡ *Pogonia paulensis* (Schltr.) Schltr., Anexos Mem. Inst. Butantan, Bot. 1(4): 17. 1922. Tipo: Brasil, São Paulo, São Paulo, próximo ao Jaraguá, III.1913, *A.C. Brade* 6230 (holótipo HB!).

= *Cleisthes ionoglossa* Hoehne & Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 181. 1926. Tipo: São Paulo, Alto da Serra, Estação Biológica, *A. Gehrt s.n.* (holótipo SP5356!).

= *Cleisthes carautae* Toscano & Leoni, Pabstia 3(5): 1. 1997. Tipo: Brasil, Minas Gerais, Alto Caparaó, área de transição entre floresta e campo de altitude, junto a manancial hídrico, sobre barranco em meio a briófitas e pteridófitas, IV.1996, *L.S. Leoni* 3281 (holótipo GFJP!; isótipo RB).

Plantas 18-70 cm alt., terrícolas. Raízes ca. 1 mm diâm.; raiz tuberosa 1,5-4x0,5-0,8 cm, oblonga, maciça, branca ou creme, revestida por tricomas acastanhados. Caule 1,5-4 mm diâm., reto. Folhas 1,5-11x0,6-2,2 cm, lanceoladas a elíptico-lanceoladas, patentes ou ereto-patentes, as superiores menores e mais atenuadas que as medianas e elípticas ou oval-lanceoladas, as inferiores em geral reduzidas a pequenas bainhas. Inflorescência com 1-4 flores. Flores predominantemente vináceas, róseas ou róseo-pálidas; ovário + pedicelo 1,2-

2,6 cm compr.; sépalas 2,3-4x0,4-0,9 cm, lanceoladas a linear-lanceoladas, róseas, vináceas ou róseo-pálidas com ápice arroxeadado, ápice agudo; pétalas 2-3,8x0,7-1,2 cm, elípticas a oblanceoladas, em geral sub-falcadas, róseo-esbranquiçadas, ápice agudo a acuminado; labelo 2,3-3,6x0,8-1,4 cm, 3-lobado, de âmbito oblongo, oblanceolado ou triangular, às vezes com uma constrição próximo aos lobos laterais, branco ou róseo-pálido com vênulas vináceas geralmente bem evidentes; glândulas nectaríferas 0,5-0,8 mm diâm., esféricas ou sub-ovais; crista central amarela, com numerosas papilas amarelas ou amarelo-esverdeadas na porção apical; lobos laterais truncados, triangulares ou falcados, ápice agudo ou arredondado; lobo apical unguiculado, istmo 3-6 mm compr., retangular ou trapezoidal, porção apical arredondada ou transversalmente oblonga, vinácea, margem ondulada, crenulada a denteada. Coluna 1-1,8 cm compr., reta ou ondulada na base, branca; estigma 2,6-4 mm compr., oval, plano; antera em geral rósea, ápice truncado a sub-emarginado; polínias 2-2,4 mm compr. Frutos 2,6-3,7x0,8-1 cm, oblongos, ovais ou cônicos, dilatados em direção ao ápice, verdes. Sementes ca. 1,8x0,2 mm, fusiformes, castanho-claras.

Espécie encontrada em locais úmidos entre briófitas e pteridófitas, ocorrendo principalmente em regiões de altitude dos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. Espécie terrícola, sendo encontrada em barrancos, em ilhas quartizíticas, em margens de riachos ou em bordas de matas. Floresce entre os meses de janeiro e abril e apresenta frutos deiscentes entre março e junho. Cada flor dura apenas um dia.

Esta espécie é facilmente reconhecível pelo labelo com vênulas escuras muito evidentes, pelo istmo evidente e pela crista central larga e geralmente amarelo-esverdeada.

Material examinado: **BRASIL, MINAS GERAIS: Araponga**, III.2001, *A.N. Caiafa & M.L. Batista 155* (VIC). **Conceição do Ibitipoca**, I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 46* (UEC). **Belo Horizonte**, II.1934, *A.J. Sampaio 7205* (R). **Catas Altas (Serra do Caraça)**, I.1971, *H.S. Irwin et al. 29182* (UB). **Diamantina**, III.1999, *F. Feres et al. 99/63* (UEC). **Gouveia**, IV.1997, *N.L. Menezes et al. CFCR 10456* (SPF). **Igarapé**, 1947, *Luetzelburg 21396* (R). **Itabira do Campo**, IV.1892, *E. Ule s.n.* (R 3492). **Itabirito**, II.1995, *W.A. Teixeira s.n.* (BHCB 26348). **Itacambira**, XI.1984, *J.D. Oliveira et al. CFCR 6557* (SPF). **Itamonte**, III.1991, *G. Hashimoto s.n.* (GHSP 13295). **Jaboticatubas**,

II.1972, *M. Sazima* 13407 (UEC). **Joaquim Felício**, V.1977, *P.E. Gibbs et al.* 5047 (UEC); III.1999, *V.C. Souza & J.P. Souza* 22036 (ESA). **Mariana**, IV.1957, *E. Pereira & G. Pabst.* 3086 (RB). **Milho Verde**, II.2001, *E.R. Pansarin & A.O. Simões* 832 (UEC). **Ouro Branco**: VI.1988, *C.A.A. Ferreira et al.* 12729 (BHCB). **Ouro Preto**, IV.1892, *E. Ule s.n.* (R 32208); 1904, *Schwacke* 178 (BHCB); 1912, *A. Bueno & S. Araujo* 124 (R). s. dat., *F.C.. Hoehne* (SP 29005). **Santa Bárbara (Serra do Caraça)**, IV.1933, *Mello Barreto* 4898 (SP). **São Gonçalo do Rio Preto**, IV.2000, *J.A. Lombardi et al.* 3901 (BHCB). **Tiradentes**, VI.1987, *R.J.V. Alves* 401 (RB). **RIO DE JANEIRO: Cabo Frio**, IV.1952, *L.B. Smith et al.* 6584 (R); 1953, *F. Segadas-Vianna et al.* 1298 (R). **Itatiaia**, III.1894, *E. Ule* 287 (R); IV.1921, *Biechini s.n.* (RB 41393); I.1925, *A. Lutz & B. Lutz* 59 (R); IV.1929, *P.C. Porto* 1903 (R, RB); IV.1971, *I. Gottsberger & G. Gottsberger* 133-16471 (R); s.dat. *P.C. Porto* 1032 (R). **Nova Friburgo**, III.1936, *C.. Gomes* 2 (RB). **Teresópolis**, IV.1986, *R. Ribeiro et al.* 791 (GUA); III.2003, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 1025 (UEC). **SÃO PAULO: Atibaia**, II.2000, *E.R. Pansarin* 698 (UEC); I.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 908 (UEC); I.2003, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 963 (UEC); II.2004, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 1123 (UEC). **Biritiba-Mirim**, III.1985, *M. Kirizawa & A.V.G. de Souza* 1391 (SP). **Campos do Jordão**, I.1982, *M. Sakane s.n.* (SP 232427). **Cananéia**, IV.1991, *F. Barros* 2268 (SP). **Cunha**, III.2000, *R. Mello-Silva et al.* 1790 (SPF). **Miracatú**, III.1985, *P. Martuscelli* 99 (SP).

7. *Cleistes grandiflora* (Aubl.) Schltr., Arch. Bot. Sao Paulo 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia grandiflora* (Aubl.) Rchb. f., Xenia orchid. 2: 91. 1865. ≡ *Limodorum grandiflorum* Aubl., Pl. Guian. 2: 818. 1775. Tipo: Trinidad, Purdie, 1940, *Hooker s.n.* (holótipo K!).

Figura: 30.

= *Cleistes lutea* Lindl., Gen. sp. Orchid. Pl. 409. 1840., *pro syn.*

Plantas 65-140 cm alt., terrícolas ou palustres. Raízes 2-2,5 mm diâm.; raiz tuberosa 5-7,5x1-1,3 cm, cônica, oca, de coloração creme, revestida por tricomas acastanhados. Caule 3,5-7,5 mm diâm., reto. Folhas 7-14x1,5-4 cm, lanceoladas a elíptico-lanceoladas, patentes ou ereto-patentes, planas ou levemente conduplicadas, as superiores menores e mais

atenuadas que as medianas, as basais reduzidas a pequenas bainhas elípticas ou elíptico-lanceoladas, eretas, adpressas, amplexivas na base. Inflorescência com 2-3 flores. Flores predominantemente róseo-vináceas; ovário + pedicelo 3-3,5 cm compr.; sépalas 6,5-7,5x0,9-1,1 cm, linear-lanceoladas, róseas, ápice agudo; pétalas 6,2-7,2x1,3-1,6 cm, oblanceoladas a elíptico-lanceoladas, roxo-pálidas em direção a base, roxo-escuras para o ápice, ápice agudo a acuminado, geralmente denteado; labelo 6,5-7x2,4-2,7 cm, em geral inteiro ou discretamente 3-lobado, de âmbito oblongo, esbranquiçado em direção a base, roxo com vênulas vináceas para o ápice; glândulas nectaríferas 1,5-2 mm compr., ovais; crista central amarela, com pequenas papilas amarelas ou esbranquiçadas na porção apical; lobos laterais arredondados quando presentes; lobo apical agudo a arredondado, margem ondulada, algumas vezes levemente recortada. Coluna 3,4-3,6 cm compr., reta, branca; estigma 0,9-1,1 cm compr., oval, plano; antera branca, ápice sub-emarginado; polínias 3,8-4,1 mm compr. Frutos 5,5-6,5x1-1,2 cm, oblongos ou lineares.

Espécie encontrada nos Estados de Goiás, Tocantins, Amazonas e Maranhão. Espécie ocorrente, também, em países da América Central. Associada principalmente com áreas palustres adjacentes a regiões de cerrado. Geralmente encontrada entre gramíneas e ciperáceas de 0,5-1m de altura. Floresce entre os meses de fevereiro e abril. Os frutos tornam-se deiscentes entre maio e junho. Cada flor dura cerca de três dias.

É facilmente identificável pelo caule aéreo robusto com numerosas folhas lanceoladas e patentes, sendo as superiores menores que as medianas, e pela presença de grandes flores róseas, geralmente em número igual ou superior a 3 por inflorescência, com labelo geralmente inteiro ou levemente 3-lobado.

Material examinado: **BRASIL, GOIÁS: Caldas Novas**, II.1993, *T.A.B. Dias et al.* 410 (CEN). **Cavalcante**, II.2001, *G. Pereira-Silva et al.* 4791 (CEN). **MATO GROSSO: Xavantina**, 1.1966, *H.S. Irwin et al.* 16356 (UB). **TOCANTINS: Natividade**, II.1997, *J.A.N. Batista et al.* 699 (CEN).

8. *Cleisthes libonii* (Rchb. f.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia libonii* Rchb. f., Xenia Orchid. 2: 91. 1865.

Figuras: 10, 19E, 22B, 31.

= *Cleisthes macrantha* (Barb. Rodr.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia macrantha* Barb. Rodr., Rev. Eng. 3: 144. 1881. Tipo: Brasil, Rio de Janeiro, Serra da Tijuca, s. dat., *J.B. Rodrigues s.n.* (perdido). Lectótipo aqui designado: ilustração original preparada por João Barbosa Rodrigues, em IV.1881, depositada na biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e reproduzida por Sprunger *et al.* (1996) em *Iconographie des orchideés du Brésil*, vol. 1, t. 35.

= *Cleisthes vinosa* (Barb. Rodr.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia vinosa* Barb. Rodr., Gen. sp. Orchid. 2: 263. 1881. Tipo: Brasil, Rio de Janeiro, Serra de Jacarepaguá, s. dat., *J.B. Rodrigues s.n.* (perdido). Lectótipo aqui designado: ilustração original preparada por João Barbosa Rodrigues, em II-III.1881, depositada na biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e reproduzida por Sprunger *et al.* (1996) em *Iconographie des orchideés du Brésil*, vol. 1, t. 37.

= *Cleisthes latipetala* (Barb. Rodr.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia latipetala* Barb. Rodr., Gen. sp. Orchid. 2: 265. 1881. Tipo: Brasil, Rio de Janeiro, Serra da Estrela, s.dat., *J.B. Rodrigues s.n.* (perdido). Lectótipo aqui designado: ilustração original preparada por João Barbosa Rodrigues, em V.1877, depositada na biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e reproduzida por Sprunger *et al.* (1996) em *Iconographie des orchideés du Brésil*, vol. 1, t. 38.

= *Cleisthes revoluta* (Barb. Rodr.) Schltr., Fedde Rep. Spec. Nov. 35: 26. 1925. ≡ *Pogonia revoluta* Barb. Rodr., Gen. sp. Orchid. 2: 266. 1882. Tipo: Brasil, Rio de Janeiro, Serra da Tijuca, Solidão, s.dat. *J. Barbosa Rodrigues s.n.* (perdido). Lectótipo aqui designado: ilustração original preparada por João Barbosa Rodrigues, em IV.1881, depositada na biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e reproduzida por Sprunger *et al.* (1996) em *Iconographie des orchideés du Brésil*, vol. 1, t. 44.

= *Cleisthes catharinensis* (Cogn.) Hoehne, Fl. Brasílica 12(1): 236. 1940. ≡ *Pogonia catharinensis* Cogn. in Mart., Fl. Bras. 3(4): 529. 1906.



- = *Cleisthes magnifica* (Schltr.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 180. 1926. ≡ *Pogonia magnifica* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 16: 316. 1920.
- = *Cleisthes calantha* (Schltr.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 180. 1926. ≡ *Pogonia calantha* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 16: 317. 1920. Tipo: Brasil, Rio de Janeiro, Corcovado, II.1903, *P. Dusén 1897* (fotografia do holótipo RB!).
- = *Cleisthes humidicola* (Schltr.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 180. 1926. ≡ *Pogonia humidicola* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. 16: 317. 1920. Tipo: Brasil, Paraná, *P. Dusén 7895* (fotografia do holótipo RB!).
- = *Cleisthes australis* Schltr., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 35: 26. 1925.
- = *Cleisthes silveirana* Hoehne & Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 183. 1926. Tipo: Brasil, São Paulo, Butantan, III.1920. *A. Gehrt s.n.* (holótipo SP3686!).
- = *Cleisthes fragrans* (Schltr.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 180. 1926. ≡ *Pogonia fragrans* Schltr., Anexos Mem. Inst. Butantan, Bot. 1(4): 18. 1922. Tipo: Brasil, São Paulo, III.1912, *A.C. Brade 6227* (holótipo HB!).
- = *Cleisthes hoehneana* Schltr. ex Mansf., Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. 7: 40. 1930., *pro syn.*

Plantas 40-120 cm alt., terrícolas. Raízes 1,3-1,5 mm diâm.; raiz tuberosa 5,5-7,5x1,2-1,5 cm, oblonga, oca, acastanhada, revestida por tricomas acastanhados. Caule 4-6 mm diâm., reto, com entrenós, em geral, curtos. Folhas 5-9x1,5-4 cm, lanceoladas a oval-lanceoladas, as apicais menores que as medianas, patentes, levemente conduplicadas, as basais geralmente ovais ou oval-lanceoladas, adpressas, amplexivas na base. Inflorescência geralmente com 3-5 flores. Flores predominantemente róseas; ovário + pedicelo 4,6-5,8 cm compr.; sépalas 7-8x0,8-1 cm, lineares a linear-lanceoladas, róseas ou róseo-vináceas, ápice agudo; pétalas 6,5-7,5x1,3-1,6 cm, oblanceoladas, róseas ou róseo-vináceas, ápice agudo a acuminado; labelo 6,5-7,6x3,3-4,3 cm, 3-lobado, de âmbito oblongo, esbranquiçado em direção a base, róseo com vênulas vináceas muito evidentes para o ápice; glândulas nectaríferas 1,8-2 mm compr., piriformes; crista central branca, com estrias longitudinais ou papilas de base branca e ápice amarelo na porção apical; lobos laterais arredondados a truncados; lobo apical unguiculado, istmo geralmente reduzido, retangular ou trapezoidal, porção apical arredondada a aguda, margem ondulada, denteada. Coluna 4,2-5,3 cm

compr., levemente recurvada na base, branca, às vezes com faixas laterais vináceas; estigma 5-7 mm compr., oval, plano; antera branca, ápice em geral emarginado; polínias 4,8-5,2 mm compr. Frutos 5,5-6,5x1,6-1,8 cm, lineares a oblongos, verdes. Sementes ca. 1,7x0,2 mm, fusiformes, de coloração castanha.

Espécie encontrada nos Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio de Janeiro, principalmente em regiões com domínio de Mata Atlântica *sensu stricto*, sendo mais freqüente na Serra do Mar. Espécie muito freqüente em regiões perturbadas por ação antrópica ou em restinga. Coletada com flores nos meses de março a abril e com frutos deiscentes de junho a julho. Cada flor dura cerca de três dias.

*Cleistes libonii* é muito variável quanto à forma do labelo, um dos principais caracteres que vem sendo utilizado para distinguir as espécies do gênero até o presente (Hoehne 1940, Pabst & Dungs 1977). Em populações observadas nos municípios de Caraguatatuba e Ribeirão Grande, ambos no Estado de São Paulo, foi verificada grande variação na forma das folhas e flores. Entretanto, a crista central do labelo exibe morfologia e coloração constantes nos espécimes observados em ambas as localidades.

De acordo com Pansarin (2003) *Cleistes libonii* (tratada como *C. macrantha*) é polinizada principalmente por espécies de abelhas do gênero *Bombus* que obtêm néctar das flores. O pólen fica depositado no escudo das abelhas.

Material examinado: **BRASIL, PARANÁ: Palmeira**, II.1988, S. Ginzburg *et al.* 681 (SP). **RIO DE JANEIRO: Macaé**, II.1928, C. Spannagel 128 (SP); II.1933, A. Justen & C. Spannagel 362 (SP); III.1936, M. Ribeiro *s.n.* (SP 35246). **Nova Friburgo**, II.1995, C.E. Pereira 84 (GUA). **Rio de Janeiro**, II.1917, F.C. Hoehne 228 (SP); III.1925, M. Rosa *s.n.* (R 15042); II.1929, A.C. Brade *s.n.* (R 24884); III.1929, A.C. Brade 11100 (R); II.1932, A.C. Brade 11343 (R); II.1944, L. Vaz & J. Vidal *s.n.* (R 41043); I.1960, H.F. Martins 103 (GUA); IV.1962, E. Fromm *et al.* 1128 (R); III.1963, H.E. Strang 499 (GUA); III.1963, M.C. Vianna 54 (GUA); V.1964, Z.A. Trinta & E. Fromm 475 (R); III.1965, M.C. Vianna 378 (GUA); V.1968, J.P. Carauta 599 (GUA); II.1968, D. Santos & J.P. Carauta 570 (GUA); IV.1971, H.E. Strang 692 (GUA); II.1972, J.P. Carauta 1500 (GUA); II.1983, F.E. Miranda & M.C. Carvalho 153 (GUA); s.dat. E. Ule *s.n.* (R 32232). **Petrópolis**, II.1952,

A.C. Brade 21211 (R); IV.1972, R. Henriques 45 (R); II.1952, A.C. Brade 21211 (RB); II.1944, L. Vaz & J. Vidal s.n. (R 41043); s.dat., Spannagel 128 (SP); s.dat., S.C. Diogo s.n. (R 36236). **Santo Antonio do Imbé**, IV.1932, A.C. Brade & S. Lima 11756 (R). **Tijuca**, III.1916, F.C. Hoehne 228 (SP). **SANTA CATARINA: Benedito Novo**, IV.198?, J.A.F. da Costa s.n. (R 193377). **Brilhante**, III.1946, R. Reitz 1486 (RB). **Gaspar**, IV.1981, J.M. Campos & P.F. Leite 37 (HUEFS). **Pomerode**, IV.1988, J.A.F. da Costa s.n. (R 193376). **SÃO PAULO: Apiaí**, IV.1977, H.F. Leitão Filho 4743 (R, UEC); IV.1987, M. Kirizawa 1846 (SP). **Ararapira**, IV.1918, F.C. Hoehne s.n. (SP 1886). **Biritiba Mirim**, III.1983, A. Custodio Filho & T.M. Cerati 1261 (SP, UEC); III.1984, A. Custodio Filho 2282 (SP, UEC); III.1985, M. Kirizawa et al. 1391 (UEC); IV.1985, C.B. Toledo & M. Sugiyama 91 (SP). **Cananéia**, IV.1975, M. Sakane 235 (SP); III.1979, D.A. de Grande & E.A. Lopez 273 (SP); IV.1982, M.M. Takeda et al. 3 (SP); IV.1982, S. Romaniuc Neto et al. 17 (SP); IV.1983, S.A.C. Chiea 273 (SP); IV.1983, S.A.C. Chiea 279 (SP); IV.1985, M. Kirizawa & T.M. Ceratti 1429 (SP); IV.1985, M. Kirizawa & T.M. Ceratti 1457 (SP); IV.1987, S.C. Chiea s.n. (SP 247763); IV.1991, F. Barros 2268 (SP); V.1991, F. Barros 2236 (SP); IV.2000, E.R. Pansarin s.n. (UEC 115190). **Caraguatatuba**, V.1938, A. Gehrt & M. Kuhlmann s.n. (SP 39461); V.1983, L.P. de Queiroz 484 (HUEFS); IV.2000, W. Forster et al. 416 (ESA). **Eldorado**, V.1996, J.A. Pastore & G.A. Franco 682 (SP). **Iguape**, IV.1918, F.C. Hoehne s.n. (SP 1856); III.1991, E.L.M. Catharino et al. 1574 (SP); III.1992, L. Rossi et al. 1038 (SP); IV.1992, L. Rossi et al. 1039 (SP); III.1993, S. Aragaki et al. 29 (SP); s. dat., R. Krone s.n. (SP 29010). **Iporanga**, IV.1983, J.R. Pirani & O. Yano 567 (SP); IV.1994, V.C. Souza et al. 12322 (ESA, SPF, UEC); V.1996, M.A. Corrêa et al. 84 (SP). **Juquitiba**, s. dat. F. Barros 800 (SP). **Paranapiacaba (Alto da Serra)**, III.1921, A. Gehrt s.n. (SP 5358); VI.1923, D. Lemos s.n. (SP 8383); V.1924, D. Lemos s.n. (SP 14602); III.1929, F.C. Hoehne & A. Gehrt s.n. (SP 23915); IV.1931, F.C. Hoehne s.n. (SP 27428); IV.1939, D. Lemos s.n. (SP 40229, SPF 113905); III.1968, O. Handro 2031 (SPF). **Pariquera-Açu**, V.1994, L.C. Bernacci et al. 267 (SP); II.1995, H.F. Leitão Filho 32848 (UEC); III.1995, N.M. Ivanauskas 93 (ESA, UEC); IV.1995, N.M. Ivanauskas 138 (ESA). **Praia Grande**, III.1932, F.C. Hoehne s.n. (SP 29360). **Ribeirão Grande**, V.1997, M.G.L. Wanderley 2201 (UEC). **São Miguel Arcanjo**, IV.1967, W. Hoehne 6192 (SP). **São Paulo**, V.1923, A. Gehrt s.n. (SP 8373); IV.1939, D. Lemos 40229 (SP); III.2000, R.J.F. Garcia et

*al.* 1928 (SP). **São Sebastião**, III.1951, A.A. *Barbiellini s.n.* (SP 69675). **Sete Barras**, IV.1983, W.M. *Ferreira et al.* 14583 (UEC). **Ubatuba**, II.1976, N. *Taroda* 2180 (UEC); III.1983, M. *Sazima* 14671 (UEC); III.1989, A. *Furlan et al.* 670 (HRCB); III.1995, E.L.M. *Catharino* 2068 (SP, UEC); IV.1999, E.R. *Pansarin* 462 (UEC); IV.1999, E.R. *Pansarin* 466 (UEC); II.2000, Y. *Nagatani s.n.* (GHSP 24647).

9. *Cleistes mantiqueirae* (Rchb. f. & Warm.) Schltr., Arch Bot. São Paulo 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia mantiqueirae* Rchb. f. & Warm., Otia bot. Hamburg. 2: 81. 1881. Tipo: Brasil, Minas Gerais, Serra da Mantiqueira, in decliviis juxta viam per silvis ducentum, E. *Warming s.n.* (holótipo W!).

Figuras: 11, 32.

= *Cleistes itatiaie* Pabst, Rev. Bras. Biol. 15: 192. 1955. *et simile* in Mem. Inst. Oswaldo Cruz 3: 360. 1955. Tipo: Brasil, Rio de Janeiro Itatiaia, Último Adeus, I.1936, P. *Campos Porto* 2811 (holótipo RB!).

Plantas 35-80 cm alt., terrícolas. Raízes 0,8-1 mm diâm.; raiz tuberosa 3-4,5x0,8-1,1 cm, oblonga, de coloração creme, revestida por tricomas acastanhados. Caule 1-4,2 mm diâm. Folhas 1,3-8,8x0,4-1,6 cm, lanceoladas, elíptico-lanceoladas ou agudas, eretas ou ereto-patentes, côncavas ou conduplicadas, as apicais menores que as medianas, as basais reduzidas a pequenas bainhas elípticas, adpressas, amplexivas na base. Inflorescência com 2-4 flores. Flores predominantemente róseas, róseo-pálidas ou amareladas; ovário + pedicelo 1,8-3,2 cm compr.; sépalas 3,5-5,5x0,5-1 cm, lanceoladas a linear-lanceoladas, róseas a amareladas, ápice agudo; pétalas 3-5x0,8-1,6 cm, elípticas, linear-lanceoladas ou oblanceoladas, róseas a róseo-amareladas, ápice acuminado; labelo 3-5x1,2-2 cm, 3-lobado, de âmbito oblongo ou às vezes oblanceolado, em geral com uma constrição próximo aos lobos laterais, esbranquiçado em direção à base, róseo-pálido para o ápice, com vênulas pouco evidentes ou ausentes; glândulas nectaríferas 1-1,2 mm compr., ovais ou esféricas; crista central amarelo-esverdeada, com papilas muito curtas e amareladas na porção apical; lobos laterais falcados, ápice agudo a arredondado; lobo apical unguiculado, istmo 3-4,5

mm compr., retangular, porção apical arredondada, oval ou deltóide. Coluna 1,8-2,5 cm compr., recurvada, branca; estigma 5-7 mm compr., oval, com uma depressão longitudinal na porção mediana; antera branca, ápice profundamente emarginado; polínias 3-3,5 mm compr. Frutos 4,5-5x0,8-0,9 cm, lineares ou cônicos, afilados em direção à base.

Espécie distribuída pelos Estados de São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro, Goiás e Minas Gerais. Comumente encontrada em campos úmidos de altitude, em locais rochosos, em ilhas de vegetação. Floresce entre os meses de dezembro e março. Os frutos tornam-se deiscentes entre o final de março e início de abril. As flores fenecem ao final do primeiro dia da antese.

Espécie identificável pelas folhas apicais muito reduzidas em relação às medianas, pelas flores róseas ou róseo-amareladas, pelo labelo com vênulas ausentes ou pouco evidentes, pelos lobos laterais falcados com ápice geralmente agudo, pelo lobo apical unguiculado com porção apical arredondada ou deltóide e pela crista central estreita com papilas muito pequenas. É próxima de *Cleistes ramboi*, no entanto, *C. itatiaie* difere por várias características do labelo, como a ausência de vênulas, os lobos laterais com ápice agudo, o lobo apical arredondado, a crista central com papilas ao invés de fímbrias e o istmo reduzido entre os lobos. Plantas de *Cleistes itatiaie*, quando prensadas, não ficam nigrescentes como ocorre com *C. ramboi*.

Material examinado: **BRASIL, GOIÁS: Alto Paraíso de Goiás**, B.M.T. Walter et al. 648 (IBGE, CEN); I.2001 **Pirenópolis**, II.1995, J.A.N. Batista & L.B. Bianchetti 541 (CEN). **MINAS GERAIS: Alagoa**, III.2003, E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 1007 (UEC); s.dat., E.L. Ribeiro 2449 (UEC). **PARANÁ: Campina Grande do Sul**, I.2003, E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 985 (UEC). **SÃO PAULO: Atibaia**, II.2004, E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 1129 (UEC). **Mogi Guaçu**, I.1981, M. Sugiyama & W. Mantovani 2 (UEC). **Pirassununga**, I.1976, M. Kirizawa 69 (SP). **Serra da Bocaina**, XII.1953, A. Lutz & B. Lutz 1736 (R).

**10.** *Cleisthes metallina* (Barb. Rodr.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia metallina* Barb. Rodr., Rev. Engenh. 3(5): 74. 1881. Tipo: Brasil, Minas Gerais, São João D'el Rei, Serra do Lenheiro, *J.B. Rodrigues s.n.* (Perdido). Lectótipo aqui designado: ilustração original preparada por João Barbosa Rodrigues, em II.1881, depositada na biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e reproduzida por Sprunger *et al.* (1996) em *Iconographie des orchideés du Brésil*, vol. 1, t. 39.

Figuras: 12, 19F, 23B, 33.

= *Cleisthes caloptera* (Rchb. f. & Warm.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia caloptera* Rchb. f. & Warm., Otia bot. Hamburg. 2(1): 82. 1881. Tipo: Brasil, Minas Gerais, Lagoa Santa, in marginibus silvarum locis humidiusculus, et in campsis fertilibus, *E. Warming s.n.* (holótipo W!).

= *Cleisthes lenheirensis* (Barb. Rodr.) Hoehne, Fl. Brasilica 12(2): 232. 1940. ≡ *Pogonia lenheirensis* Barb. Rodr., Contr. Jard. Bot. Rio de Janeiro 1(2): 47. 1901. Tipo: Brasil, Minas Gerais, Serra do Lenheiro, *J.B. Rodrigues s.n.* (RB) (perdido). Lectótipo aqui designado: ilustração original preparada por João Barbosa Rodrigues, em II.1881, depositada na biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e reproduzida por Sprunger *et al.* (1996) em *Iconographie des orchideés du Brésil*, vol. 1, t. 39.

Plantas 55-80 cm alt., terrícolas. Raízes 2-3,7 mm diâm.; raiz tuberosa 3,5-4,5x1,5-1,8 cm, oblonga ou cônica, oca, de coloração creme. Caule 3-7 mm diâm., reto, às vezes sinuoso próximo ao ápice. Folhas 3,5-14x1-4,5 cm, lanceoladas a elíptico-lanceoladas, ereto-patentes, planas ou levemente conduplicadas, às vezes as apicais com discretas linhas vináceas, mais atenuadas e menores que as medianas, as basais reduzidas a pequenas bainhas elípticas a elíptico-lanceoladas, adpressas, amplexivas na base. Inflorescência com 1-4 flores. Flores predominantemente róseo-vináceas; ovário + pedicelo 1,6-3 cm compr.; sépalas 6-7,5x1-1,4 cm, linear-lanceoladas, internamente róseo-vináceas, externamente róseo-pálidas, ápice agudo; pétalas 5,5-7x1,5-2 cm, lanceoladas a elíptico-lanceoladas, róseo-pálidas em direção à base, róseo-vináceas para o ápice, freqüentemente com uma fenda próximo ao ápice, ápice agudo, arredondado ou mais raramente acuminado; labelo 5,5-7x2,5-3 cm, discretamente 3-lobado, de âmbito oblongo ou lanceolado, às vezes com

uma constrição próximo aos lobos laterais, esbranquiçado em direção à base, vináceo e com vênulas roxas pouco evidentes para o ápice; glândulas nectaríferas 2,5-3 mm diâm., discóides; crista central esbranquiçada ou amarelada, com estrias longitudinais ou diminutas papilas esbranquiçadas, amarelas ou branco-arroxeadas na porção apical; istmo pouco evidente ou ausente, porção apical arredondada a retangular, margem em geral recortada, ondulada. Coluna 2,8-3,3 cm compr., levemente recurvada, branca, às vezes com duas faixas longitudinais na face ventral; estigma 8-9 mm compr., oval, plano; antera branca, às vezes vinácea na porção central, ápice sub-emarginado ou emarginado; polínias 5-5,5 mm compr. Frutos 3-4x1-1,5 cm, ovais, verdes. Sementes ca. 1,1x0,3 mm, em forma de projétil, levemente afilada de ambos os lados, marrons.

Espécie distribuída pelos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Distrito Federal e Bahia. É comumente encontrada em campos úmidos, na maioria das vezes ocorrendo em locais adjacentes à vegetação de cerrado. Floresce entre os meses de fevereiro e março. Os frutos se tornam deiscentes entre abril e maio. Cada flor pode durar até três dias.

Espécie muito próxima de *Cleistes libonii*. No entanto, pode ser distinguida dessa espécie pelo labelo geralmente sem istmo, com vênulas pouco evidentes ou ausentes e pela com crista central composta por pequenas papilas ao invés de estrias.

Material examinado: **BRASIL, BAHIA: Andaraí**, VII.1997, *P.E. Labiak* 465 (SPF). **Palmeiras**, V.1980, *R.M. Harley* 22654 (SPF). **Rio de Contas**, III.1994, *S. Atkins et al.* 14793 (ESA, SPF, UEC); II.2001, *E.R. Pansarin & A.O. Simões* 776 (UEC). **DISTRITO FEDERAL: Brasília**, III.1982, *E.P. Heringer & A. Negratte* 18292 (IBGE); II.1995, *R.S. Oliveira* 76 (UB). **GOIÁS: Chapada dos Veadeiros**, III.1969, *H.S. Irwin et al.* 24496 (UB); II.1997, *J.A.N. Batista et al.* 721 (CEN). **Corumbaíba**, III.1997, *T.B. Cavalcanti et al.* 2165 (UEC). **Minaçu**, III.1992, *T.B. Cavalcanti et al.* 1130 (CEN). **Santo Antônio do Descoberto**, I.1976, *E.P. Heringer* 15358 (UB). **MINAS GERAIS: Alto Caparaó**, II.2000, *V.C. Souza et al.* 23620 (ESA) **Amarantina**, III.1989, *C.C. Reis et al. s.n.* (BHCB 15359). **Belo Horizonte**, III.1919, *A. Gehrt s.n.* (SP 3318). **Congonhas do Campo**, II.2000, *T.B. Cavalcanti et al.* 2569 (CEN). **Itabirito**, III.1994, *W.A. Teixeira s.n.* (BHCB 26079). **Miguel Burnier**, IV.1957, *E. Pereira & G. Pabst* 3014 (RB). **Ouro Branco**,

II.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 909 (UEC). **Ouro Preto**, I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin* 44 (UEC). **Santo Antônio do Itambé**, IV. 1982, *A. Furlan et al.* 3059 (SP, SPF). **São João del Rei**, III.1942, *A.C. Teixeira* 2 (SP). **São Sebastião do Paraíso**, VI.1945, *J. Vidal* I-946 (R). **Serra do Cipó**, III.1999, *J.A.N. Batista & L.B. Bianchetti* 905 (CEN). **Tiradentes**, II.1976, *G. Davidse & G. D'arcy* 10716 (SP). **SÃO PAULO: Botucatu**, X.1972, *A. Amaral* 1170 (UEC). **Itirapina**, II.1985, *E.L.M. Catharino* 234 (ESA, UEC); II.2004, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 1119 (UEC). **Pedregulho**, IV.1997, *M.C.E. Amaral* 130 (UEC); III.2004, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 1145 (UEC).

**11.** *Cleisthes montana* Gardn., Icon. Pl. Omeiesium 1: 473. 1842. ≡ *Pogonia montana* Rchb. f., Xenia Orchid. 2: 91. 1865. Tipo: Brasil, Rio de Janeiro, Serra dos Órgãos, III.1841, *Gardner* 5879 (holótipo K!).

Figura: 34.

= *Cleisthes lepida* (Rchb. f.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia lepida* Rchb. f., Xenia Orchid. 2: 90. 1865.

= *Cleisthes brasiliensis* (Barb. Rodr.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia brasiliensis* Barb. Rodr., Gen. sp. Orchid. 1: 167. 1877. Tipo: Brasil, Sur le sommet de la Serra do Picú, province de Minas Geraes, s.dat., *J.B. Rodrigues s.n.* (perdido). Lectótipo aqui designado: ilustração original preparada por João Barbosa Rodrigues, em IV.1881, depositada na biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e reproduzida por Sprunger *et al.* (1996) em Iconographie des orchideés du Brésil vol. 1, t. 41.

= *Cleisthes quadricalosa* (Barb. Rodr.) Schltr. Arch. Bot. São Paulo 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia quadricalosa* Barb. Rodr., Gen. sp. Orchid. 2: 263. 1881. Tipo: Brasil, Paraná, dans la Province du Paraná, s.dat., *J.B. Rodrigues s.n.* (perdido). Lectótipo aqui designado: ilustração original preparada por João Barbosa Rodrigues, em IV.1881, depositada na biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e reproduzida por Sprunger *et al.* (1996) em Iconographie des orchideés du Brésil vol. 1, t. 42.



= *Cleisthes rodeiensis* (Barb. Rodr.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia rodeiensis* Barb. Rodr., Gen. sp. Orchid. 2: 269. 1881. Tipo: Brasil, Minas Gerais, croissant dans l'humus à l'ombre des forêts, vierges des montagnes de Rodeio, s.dat., J.B. Rodrigues s.n. (perdido). Lectótipo aqui designado: ilustração original preparada por João Barbosa Rodrigues, em IV.1881, depositada na biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e reproduzida por Sprunger *et al.* (1996) em Iconographie des orchideés du Brésil vol. 1, t. 41.

Plantas 25-75 cm alt., terrícolas. Raízes ca. 1,5-2 mm diâm.; raiz tuberosa 2-4,5x0,8-1 cm, oblonga, maciça, ferrugínea, revestida por tricomas acastanhados. Caule 2-4,5 mm diâm., reto. Folhas 3-11x0,7-2,5 cm, lanceoladas a ovais, patentes ou ereto-patentes, as apicais menores e mais atenuadas que as medianas, as basais em geral reduzidas a pequenas bainhas. Inflorescência com 2-4 flores. Flores predominantemente esbranquiçadas ou róseo-pálidas; ovário + pedicelo 1,5-3 cm compr.; sépalas 2,5-4x0,7-1 cm, linear-lanceoladas, róseo-pálidas, ápice agudo; pétalas 2-3,5x0,6-0,9 cm, elípticas a oblanceoladas, róseo-esbranquiçadas, ápice acuminado, arroxeadado, margem crenulada ou denteada; labelo 2,5-3,8x1-1,5 cm, 3-lobado, de âmbito oblongo, às vezes com uma constrição próximo aos lobos laterais, branco ou róseo-pálido com vênulas escuras pouco evidentes ou ausentes; glândulas nectaríferas 0,6-0,8 mm diâm., esféricas ou ovais; crista central amarelada, com numerosas papilas amareladas na porção apical; lobos laterais falcados, ápice agudo; lobo apical unguiculado, istmo 4-5 mm compr., retangular, porção apical arredondada ou oval, vinácea, margem ondulada, crenulada. Coluna 1,5-1,8 cm compr., reta, branca; estigma 3-4 mm compr., oval, plano; antera em branca, ápice truncado; polínias 2,2-2,5 mm compr. Frutos 3-3,5x1-1,2 cm, oblongos ou ovais, verdes.

Espécie encontrada em regiões de altitude dos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro e Paraná. Espécie terrícola, sendo encontrada em barrancos úmidos, em bordas de matas, e áreas brejosas. Floresce entre os meses de março e maio e apresenta frutos deiscentes entre junho e agosto. Cada flor dura cerca de um a dois dias.

Esta espécie é facilmente reconhecível pelas flores esbranquiçadas, pelas pétalas com porção apical vinácea e com margem crenulada ou denteada, pelo labelo geralmente esbranquiçado com ápice vináceo e com discretas vênulas escuras.

Material examinado: **BRASIL, MINAS GERAIS: Alagoa**, III.2003, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 1001* (UEC). **PARANÁ: Campina Grande do Sul**, I.2003, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 987* (UEC). **RIO DE JANEIRO: Petrópolis**, 1929, *Spannagel 137* (SP); IV.1982, *R. Ribeiro 275* (GUA). **Paranapiacaba (Alto da Serra)**, III.1923, *F.C. Hoehne s.n.* (SP 5996); III.1968, *O. Handro 2032* (SPF). **Parelheiros**, II.1995, *S.A.P. Godoy et al. 340* (SP). **Salesópolis**, II.1950, *E. Kuehn & M. Kuhlmann 2359* (SP); III.1958, *M. Kuhlmann 4364* (SP); III.1962, *O. Travassos 338* (RB). **São Paulo**, III.1921, *A. Gehrt s.n.* (R 13832); III.1921, *A. Gehrt s.n.* (R 13833); II.1929, *F.C. Hoehne 29009* (SP); II.2002, *A.P.S. Gonçalves et al. 379* (UEC); II.2002, *A.P.S. Gonçalves et al. 391* (UEC).

**12. *Cleistes moritzii*** (Rchb. f.) Garay & Dunsterv., in Dunsterv. & Garay, *Venez. Orchid.* III. 4: 54. 1966. ≡ *Pogonia moritzii* Rchb. f., *Xenia orchid.* 2: 89. 1865. Tipo: Venezuela, s.d., *Moritz s.n.* (holótipo K!).

Figuras: 13, 20E, 22E, 35.

= *Cleistes pluriflora* (Barb. Rodr.) Schltr., *Arch. Bot. São Paulo* 1: 179. 1926. ≡ *Pogonia pluriflora* Barb. Rodr., *Gen. sp. Orchid.* 2: 264. 1882. Tipo: Brasil, Rio de Janeiro, entre Macaé e Barra de São João, campos do Iriiri. s. dat., *J. Barbosa Rodrigues s.n.* (perdido). Lectótipo aqui designado: ilustração original preparada por João Barbosa Rodrigues, em V.1879, depositada na biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e reproduzida por Sprunger *et al.* (1996) em *Iconographie des orchideés du Brésil*, vol. 1, t. 42.

= *Pogonia triflora* C. Schweinf., *Fieldiana, Bot.* 28: 169. 1951. Tipo: Venezuela, state of Bolívar, Mount Roraima, alt. 1220-1980 m, southwest-facing slopes between base of mountain at Quebrada Ka-hua-parú and Glycon swamp, X.1944, *J.A. Steyermark 59014* (holótipo F).

- = *Cleistes costaricensis* Christenson, Lindleyana 7(4): 206. 1992. Tipo: Costa Rica, Alajuela, La Palma de San Ramon, 1175 m, X.1924, A.M. Brenes 1119 (holótipo NY!).
- = *Cleistes tamboana* Dodson & Carnevali, Orquideologia 20(3): 473. 1997. Tipo: Equador, Esmeraldas, km 18, Lita to San Lourenzo, 700 m, III.1994, C.H. Dodson & G. Carnevali 19231 (holótipo RPSC).

Plantas 40-100 cm alt., terrícolas. Raízes 0,8-1,2 mm diâm.; raiz tuberosa 2,5-3x0,6-0,9 cm, oblonga, maciça, de coloração creme, revestida por tricomas acastanhados. Caule 1-4 mm diâm., reto. Folhas 2,5-7x7-1,4 cm, lanceoladas a oval-lanceoladas, eretas a eretopatentes, as apicais menores que as medianas, os basais reduzidas a pequenas bainhas ovais a oval-lanceoladas, adpressas, amplexivas na base. Inflorescência geralmente com 2-4(-6) flores. Flores predominantemente róseo-alaranjadas; ovário + pedicelo 1,8-2,8 cm compr.; sépalas 2,5-3x0,6-0,8 cm, linear-lanceoladas, ápice agudo; pétalas 2-2,6x1,1-1,3 cm, oblanceoladas a espatuladas, ápice acuminado; labelo 3-3,5x2,3-2,8 cm, 3-lobado, de âmbito oblongo, laranja-esbranquiçado em direção a base, alaranjado para o ápice, vênulas escuras em geral ausentes; lobos laterais arredondados ou truncados; lobo apical arredondado, reduzido, margem ondulada, denteada ou crenulada; glândulas nectaríferas 0,6-0,8 mm diâm., esféricas; crista central branca com papilas amarelo-pálidas ou amarelo-esverdeadas na porção apical. Coluna 1,6-2,4 cm compr., recurvada, branco-hialina; antera branca, ápice emarginado; polínias 2,4-2,6 mm compr. Frutos 2-2,5x0,8 cm, lineares a oblongos, verdes. Sementes ca. 1x0,2 mm, em forma de projétil, de coloração acastanhada.

Espécie encontrada principalmente no Estado da Bahia, mas podendo ser encontrada em Minas Gerais e Rio de Janeiro, no Brasil, chegando até a América Central. É encontrada em campos alagados, em vales adjacentes à vegetação de cerrado. Floresce principalmente entre os meses de fevereiro e abril, podendo ser coletada com flores até o mês de julho. Os frutos tornam-se deiscentes desde abril até agosto. Cada flor dura um dia.

Espécie facilmente identificável pela tonalidade alaranjada das flores, pelo labelo com lobo apical reduzido e pela crista central com papilas amareladas pouco evidentes na porção apical.

Material examinado: **BRASIL, BAHIA: Abaíra**, IV.1992, *W. Ganev 64* (HUEFS); III.1992, *T. Laessoe & T. Silva 52577* (UEC, HUEFS); V.1999, *V.C Souza et al. 22912* (ESA). **Barra da Estiva**, III.1980, *R.M. Harley et al. 20803* (IPA, SPF, UEC). **Jacobina**, VI.1996, *H.P. Bautista et al. 3436* (ALCB). **Lençóis**, III.1980, *L.R. Noblic 1768* (ALCB, HUEFS); VII.1983, *L. Coradin et al. 6536* (CEN, SP); II.1994, *H.M. Harley et al. 14100* (SPF). **Palmeiras**, III. 1997, *A.A. Conceição & A. Grillo 471* (SPF). **Piatã**, II.1987, *R.M. Harley et al. 24181* (SPF). **Rio de Contas**, II.1977, *R.M. Harley 19513* (SPF, UEC); I.1998, *L.P. Queiroz & C.C. Santos 4959* (ESA, HUEFS); III.2000, *L.Y.S. Aona & M.D. Moraes 642* (UEC); II.2001, *E.R. Pansarin et al. 782* (UEC).

**13.** *Cleisthes paranaensis* (Barb. Rodr.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 180. 1926. ≡ *Pogonia paranaensis* Barb. Rodr., Gen. sp. Orchid. 2: 268. 1881. Tipo: Brasil, Paraná, campos de São Bento e Rincão das Pedras, I.1880, *Schwacke 94* (holótipo R!).

Figuras: 14, 19C, 22D, 36.

= *Cleisthes paranaensis* var. *bradeana* (Kränzl.) Hoehne, Fl. Brasilica 12(1): 218. 1940. ≡ *Pogonia bradeana* Kränzl., Ark. Bot. 14(10): 4. 1915. Tipo: Brasil, São Paulo, São Paulo, Ipiranga, I.1913, *A.C. Brade 6226* (holótipo SP!; isótipo HB).

= *Cleisthes paranaensis* var. *minor* Hoehne, Fl. Brasilica 12(1): 218. 1940. Brasil, São Paulo, São Paulo, Vila Ema, 1922, *A.C. Brade 6226b* (holótipo SP!).

= *Cleisthes paranaensis* var. *major* Schltr., Fedde Repert. Sp. Nov. 17: 318. 1920. Tipo: Brasil, São Paulo, Jabaquara, em campos altos e secos, II.1935, *A. Gerth 32309a* (holótipo SP!).

= *Cleisthes strangii* Pabst, Bradea 2(6): 21. 1975. Tipo: Brasil, Minas gerais, Serra do Caraça, II.1974, *H.E. Strang 1461* (holótipo HB!).

Plantas 40-100 cm alt., terrícolas. Raízes 1,2-1,4 mm diâm., revestidas por tricomas acastanhados; raiz tuberosa 6-7,8x1,2-1,5 cm, cônica ou oblonga, oca, castanho clara, revestidas por tricomas acastanhados. Caule 1-6,5 mm diâm., sinuoso, entrenós muito

alongados, base revestida por tricomas marrons. Folhas 1,5-11x0,5-2,3 cm, agudas a lanceoladas, conduplicadas, as apicais menores que as medianas, as basais reduzidas a pequenas bainhas elípticas, adpressas, amplexivas na base. Inflorescência com (1-)2-4(-5) flores. Flores predominantemente lilases ou lilás-esbranquiçadas, raramente brancas; ovário + pedicelo 2,7-4,1 cm compr.; sépalas 4,7-9x0,8-1,1 cm, linear-lanceoladas a lanceoladas, geralmente róseas, ápice agudo a acuminado; pétalas 4,1-8,5x1,2-1,7 cm, lanceoladas a oblanceoladas, geralmente róseo-pálidas, ápice agudo a acuminado, geralmente com margem recortada; labelo 4,3-8,5x2,3-3 cm, 1-3-lobado, de âmbito oblongo ou oblanceolado, róseo-pálido ou esbranquiçado em direção a base, geralmente róseo para o ápice, em geral sem vênulas escuras; lobos laterais arredondados quando presentes, margem ondulada; lobo apical oval, arredondado ou deltóide, istmo pouco evidente ou ausente, geralmente com margem denteada; glândulas nectaríferas 1,5-1,7 mm compr., ovais; crista central esbranquiçada ou lilás, com fímbrias longas, esbranquiçadas ou arroxeadas na porção apical. Coluna 2,3-3,2 cm compr., levemente recurvada, branca ou branco-arroxeadada; estigma 4,5-6,1 mm compr., oval, plano; antera rósea ou branca, ápice sub-emarginado; polínias 3,2-3,8 mm compr. Frutos 3,5-5,2x0,8-1 cm, oblongos ou ovais. Sementes ca. 1,7x0,5 mm, oblongas, levemente recurvadas, castanho-escuras.

Espécie amplamente distribuída no Brasil, coletada desde o Estado do Paraná até a Bahia, sendo muito abundante em Minas Gerais. Frequentemente encontrada em campos secos localizados em regiões de cerrado ou em barrancos úmidos e entre rochas. Floresce entre os meses de janeiro e março. Os frutos tornam-se deiscentes entre maio e julho. Cada flor dura cerca de dois dias.

Espécie facilmente identificável pelo caule sinuoso, pelas folhas agudas ou lanceoladas e conduplicadas, e pela crista central do labelo com grandes fímbrias brancas ou lilás na porção apical. As flores de *C. paranaensis* são muito variáveis, especialmente em relação à forma do labelo, que pode ser desde inteiro até 3-lobado. Baseado em variações do labelo, Hoehne (1940), descreveu três variedades para a espécie. Tais variedades, segundo o próprio autor, podem ocorrer em plantas de uma mesma população e foram consideradas como sinônimos de *C. paranaensis* no presente tratamento.

Material examinado: **BRASIL, BAHIA: Abaíra**, I.1992, *J.R. Pirani et al. 51343-A* (HUEFS). **Água de Rega**, II.1971, *H.S. Irwin et al. 30898* (UB). **DISTRITO FEDERAL: Brasília**, XII.1963, *E.P. Heringer 9294* (UB); I.1966, *H. S. Irwin et al. 11533* (UB); II.1972, *E.P. Heringer 12025* (UB); II.1978, *E.P. Heringer et al. 332* (IBGE, UEC); III.1978, *E.P. Heringer et al. 392* (IBGE); II.1978, *E.P. Heringer et al. 16808* (IBGE); III.1982, *E.P. Heringer et al. 7377* (IBGE); II.1983, *E.P. Heringer et al. 7536* (R); I.1990, *D. Alvarenga & F.C. Oliveira 588* (IBGE); II.1995, *R.S. Oliveira 102* (UB); II.2000, *Z. Jesus s.n.* (UB 79); I.2001, *J.A.N. Batista & L.B. Bianchetti 1174* (UEC); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista 759* (UEC). **Cabeça de Veado**, II.1975, *E.P. Heringer 14427* (UB, IBGE). **Gama**, I.2001, *J.A.N. Batista et al. 1174* (UEC). **Guará**, s.dat. *Z.J. Miranda 13* (UB); III.1961, *E.P. Heringer 8125* (UB). **Saia Velha**, II.1975, *E.P. Heringer 14747* (UB). **GOIÁS: Alto Paraíso**, III.1971, *H.S. Irwin et al. 32124* (UB); I.1979, *P. Gates & Stabrook 49* (UB); III.2001, *J.A.N. Batista et al. 1233* (UEC). **Catalão**, I.1970, *H.S. Irwin et al. 25244* (UB). **Luziânia**, I.1979, *E.P. Heringer 17311* (IBGE). **MINAS GERAIS: Barão de Cocais**, II.1971, *H.S. Irwin et al. 28808* (UB, UEC). **Brumadinho**, III.1990, *L.A. Martens 309* (SPF). **Catas Altas (Serra do Caraça)**, I.2000, *J.A.N. Batista & K. Proite 981* (CEN). **Conceição do Mato Dentro**, III.1999, *J.A.N. Batista & L.B. Bianchetti 888* (CEN). **Diamantina**, II.1947, *D. Romariz 101* (RB); II.1972, *W.R. Anderson et al. 35484* (UB); II.1972, *W.R. Anderson et al. 35503* (UB); I.1986, *D.C. Zappi et al. 9344* (SPF); II.1991, *M.M. Arbo et al. 5204* (SPF); IV.1995, *N.L. Menezes & M. Meguro 9802* (SPF); II.1996, *I. Koch 435* (UEC); II.1998, *F.N. Costa et al. 31* (SPF); III.1999, *F. Feres et al. 23* (UEC); I.2000, *J.A.N. Batista & K. Proite 1028* (CEN); I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 28* (UEC); I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 31* (UEC). **Francisco Sá**, II.1969, *H.S. Irwin et al. 23184* (UB). **Gouveia**, II.1994, *R.M. Harley et al. 14012* (SPF). **Itabirito**, II.1968, *H.S. Irwin et al. 19658* (UB); II.1995, *W.A. Teixeira s.n.* (BHCB 26349). **Jaboticatubas**, II.1972, *J. Semir 13424* (UEC); II.1972, *M. Sazima 13392* (UEC). **Lapinha**, II.1968, *H.S. Irwin et al. 20834* (UB). **Ouro Branco**, III.2003, *A.N. Caiafa & L.D. Meireles 101* (VIC). **Ouro Preto**, I.1942, *M. Magalhães 1393* (SP). **Piumbi**, II.1968, *R. Romero et al. s.n.* (UEC 97504). **São Gonçalo do Rio Abaixo**, II.1994, *E.L. Borba 116* (BHCB). **Santana do Riacho**, II.1999, *J.A. Lombardi & L.G. Temponi 2459* (BHCB). **Serra do Cipó**, II.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 920* (UEC). **Serro**, II.1987, *S.J.*

*Mayo et al. 10441* (SPF). **RIO DE JANEIRO: Santa Maria Madalena**, II.1935, *A. Lima & A.C. Brade 14325* (R). **SÃO PAULO: Botucatu**, I.1973, *A. Amaral Jr. 1394* (BOTU). **Moji das Cruzes**, II.1996, *G. Hashimoto s.n.* (GHSP 13226). **Pirassununga**, I.1976, *M. Kirizawa 69* (SP). **São Paulo**, II.1913, *A.C. Brade 6226* (SP, holótipo de *Cleistes bradeana* Kransl.); I.1924, *F.C. Hoehne & A. Gehrt s.n.* (SP 28999); II.1933, *R. Muus s.n.* (SP 30188); II.1934, *F.C. Hoehne s.n.* (SP 31551); II.1935, *A. Gehrt s.n.* (SP 32309); III.1940, *Brade 16251* (RB); I.1941, *B. Pickel 5195* (IPA); II.1945, *W. Hoehne 11073* (SPF); II.1949, *O. Handro 90* (SP). **São Roque**, III.1992, *G. Hashimoto s.n.* (GHSP 13461).

**14.** *Cleistes pusilla* Pansarin, Kew Bull. 59(4): 555. 2004. Tipo: Brasil, Minas Gerais, Diamantina, estrada de terra que liga Diamantina a Conselheiro Mata, sentido Conselheiro Mata, ao lado direito da estrada, próximo ao Km 174, em campo alagado, I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 12* (holótipo UEC!; isótipos SP!, SPF!, CEN!).

Figuras: 15, 20A, 20C, 37.

Plantas 9-30(-35) cm alt., terrícolas. Raízes 0,5-0,7 mm diâm.; raiz tuberosa 1,5-2,5x0,3-0,5 cm, oblonga, maciça, de coloração creme ou castanha, revestida por tricomas acastanhados. Caule 0,5-1,3 mm diâm., reto, às vezes com duas folhas apicais. Folhas desenvolvidas em plântulas, reduzidas em plantas em floração; folhas de plântulas 30-50x8-12 mm, elípticas a lanceoladas, planas, eretas; folhas de plantas em floração 3-9x1-2,5 mm, lanceoladas a oval-lanceoladas, eretas, adpressas, algumas vezes as apicais mais desenvolvidas que as medianas e lanceoladas a linear-lanceoladas, as basais reduzidas a pequenas escamas. Inflorescência com 1-2 flores. Flores predominantemente róseas; ovário + pedicelo 1,3-2 cm compr., verde-escuros; sépalas 15-20(-25)x3-4(-5) mm, oblanceoladas a linear-lanceoladas, róseas, ápice agudo; pétalas 15-20(-25)x3,5-5(-6) mm, oblanceoladas a sub-espátuladas, róseas, ápice agudo a acuminado; labelo 1,5-2x0,5-1 cm, 3-lobado, de âmbito oblongo ou oval, às vezes com uma constrição próximo aos lobos laterais, outras vezes oblanceolado, rosa pálido em direção a base, róseo-escuro com vênulas vináceas para o ápice; glândulas nectaríferas ca. 0,5 mm diâm., esféricas; crista central predominantemente esbranquiçada, com papilas esbranquiçadas de ápice amarelado ou

verde-amarelado na porção apical; lobos laterais sub-falcados, ápice agudo ou arredondado; lobo apical unguiculado, istmo 1,5-3 mm compr., retangular; porção apical arredondada ou transversalmente oval, margem ondulada, serreada. Coluna 1-1,3(-1,5) cm compr., reta, branca; estigma 2,3-2,6 mm compr., oval, plano; antera geralmente rósea, ápice truncado; polínias ca. 1,5 mm compr. Frutos 1,5-2,6(-3)x0,5-0,7 cm, lineares a oblongos, verde-escuros ou verde-purpúreos. Sementes 0,5-0,7 mm compr., fusiformes.

A espécie encontra-se amplamente distribuída na Cadeia do Espinhaço, no Estado de Minas Gerais, sendo também encontrada na Chapada dos Veadeiros. Ocorre entre gramíneas ou, mais raramente, entre rochas, em campos úmidos de altitude. Planta raramente coletada. Floresce entre os meses de janeiro e fevereiro. Os frutos se tornam deiscentes entre fevereiro e março. Cada flor dura apenas um dia.

Espécie facilmente identificável pelo porte baixo, pelo caule esguio e com folhas reduzidas, geralmente portando uma única flor rósea. É também característica pelo labelo róseo com vênulas vináceas e com uma larga crista central esbranquiçada composta de papilas brancas com ápice amarelado. Os lobos laterais do labelo são falcados e o apical é unguiculado, com porção apical arredondada e margem ondulada ou serreada.

*Cleistes pusilla* difere de *C. aphylla* em diversos caracteres florais, mas vegetativamente as espécies assemelham-se principalmente pelo caule delgado e folhas reduzidas. Em *C. aphylla* as sépalas são creme e as pétalas e labelo são branco-hialinos, enquanto em *C. pusilla* as flores são completamente róseas. A forma do labelo, bem como sua crista também difere muito entre as duas espécies. Em *C. aphylla* o labelo é completamente branco, sem vênulas e a crista central é fina e amarela, composta de papilas delicadas.

Material examinado: **BRASIL, GOIÁS: Alto Paraíso de Goiás**, I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista* (UEC); II.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* (UEC); II.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* (UEC). **MINAS GERAIS: Catas Altas (Serra do Caraça)**, II.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 922 (UEC); I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin* 41 (UEC). **Datas**, I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin s.n.* (UEC). **Diamantina**, I.1947, *W. Engler s.n.* (RB 59975); I. 1986, *N.L. Menezes et al.* CFCR 9481



(SPF); I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 22* (UEC); I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 27* (UEC). **Joaquim Felício**, XI.1984, *B. Stannard et al. CFCR 6299* (SPF). **Ouro Preto (Itacolomi)**, II.1892, *E. Ule s.n.* (R 3493). **Santana do Riacho**, II.1999, *J.A. Lombardi & L.G. Temponi 2460* (BHCB). **Santo Antônio do Itambé**, II.1972, *W.R. Anderson et al. 35840* (UB); II.2001, *E.R. Pansarin & A.O. Simões 815* (UEC).

**15. *Cleistes ramboi*** Pabst, Arch. Jard. Bot. Rio de Janeiro 12: 130.1952. Tipo: Brasil, Rio Grande do Sul, Cambará, próximo a São Francisco de Paula, 900 m, II.1947, *B. Rambo s.n.* (holótipo PACA!; ilustração original preparada por Pabst, HB!).

Figuras: 16, 21D, 23D, 38.

= *Cleistes uliginosa* Pabst, Orquidea (Niterói) 29: 7. 1967. Tipo: Brasil, Distrito Federal, Brasília, Parque Zoobotânico, XII.1963, *E.P. Heringer 9291* (holótipo HB!).

Plantas 34-85 cm alt., terrícolas ou palustres. Raízes 0,8-1 mm diâm.; raiz tuberosa 4,8-6x0,8-1 cm, oblonga, maciça, de coloração castanha, revestida por tricomas acastanhados. Caule 1-4 mm diâm., reto. Folhas 1,5-7,5x0,6-1,5 cm, lanceoladas, eretopatentes, côncavas ou conduplicadas, as apicais menores que as medianas, as basais reduzidas a bainhas elípticas ou elíptico-lanceoladas, eretas, adpressas, amplexivas na base. Inflorescência geralmente com 1-3(-4) flores. Flores predominantemente róseas, róseo-pálidas ou carmim; ovário + pedicelo 2,5-3,5 cm compr.; sépalas 3-4,2x0,5-0,7 cm, lanceoladas a linear-lanceoladas, róseas ou carmim, ápice agudo; pétalas 3-3,5x0,65-1 cm, elípticas a elíptico-lanceoladas, róseas ou róseo-pálidas, ápice acuminado, margem crenulada, às vezes com uma fenda transversal; labelo 3-3,5x1-1,4 cm, 3-lobado, de âmbito oblongo, com uma constrição na porção mediana, róseo-pálido em direção a base, róseo com vênulas róseo-escuras para o ápice; glândulas nectaríferas ca. 0,8 mm compr., ovais; crista central esbranquiçada ou branco-arroxeadada, com fímbrias esbranquiçadas ou branco-arroxeadada na porção apical; lobos laterais falcados, ápice arredondado; lobo apical unguiculado, istmo 5-8 mm compr., retangular ou trapezoidal, muito evidente, porção apical oval ou deltóide, pouco diferenciada do istmo, margem ondulada. Coluna 1,5-2,3 cm,

ondulada, branca; estigma 3,5-4 mm, oval, com uma depressão longitudinal na porção central; antera branca, ápice profundamente emarginado; polínias 1,8-2 mm compr. Frutos 5-6,5x0,6-0,8 cm, lineares ou cônicos, afilados em direção a base. Sementes ca. 0,75x0,22 mm, largamente fusiformes, creme-acastanhadas.

Espécie distribuída pelos Estados do Distrito Federal, Goiás e Paraná. É muito característica por ocorrer em ilhas com gramíneas, em regiões inundadas, geralmente com presença de buriti (*Mauritia flexuosa* Linn. f.). Floresce entre os meses de dezembro e fevereiro. Os frutos tornam-se deiscentes entre março e abril. As flores fenecem no segundo dia após a antese.

Espécie caracterizada pelo caule com entrenós muito alongados, pelas folhas evidentes e conduplicadas e pelas flores róseo-pálidas com lobo apical do labelo pouco diferenciado. A planta fica nigrescente após ser prensada.

Material examinado: **BRASIL, GOIÁS: Alto Paraíso de Goiás**, III.1971, *H.S. Irwin et al.* 32124 (UB); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista* 745 (UEC); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista s.n.* (UEC 117396). **Formosa**, II.2000, *J.A.N. Batista* 1049 (CEN). **Pirenópolis**, II.1995, *J.A.N. Batista & L.B. Bianchetti* 541 (CEN). **Teresina de Goiás**, XII.2001, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 872 (UEC). **PARANÁ: Campina Grande do Sul**, I.2003, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas* 984 (UEC).

**16.** *Cleisthes rosea* Lindl., Gen. sp. Orchid. Pl. 410. 1840. ≡ *Pogonia rosea* (Lindl.) Rchb. f., Xenia Orchid. 2: 89. 1865. Tipo: Guiana, Savannah near Lake Capooey, coast of Essequibo, *Schomburgk s.n.* (holótipo K!).

Figuras: 17, 19B, 19D, 39.

= *Cleisthes castanoides* Hoehne, Arq. Bot. São Paulo 1: 42. 1939. Tipo: Brasil, São Paulo, São Paulo, Indianópolis, I.1932, *F.C. Hoehne s.n.* (lectótipo SP28697!). Ipiranga, I.1908, *H. Luederwaldt s.n.* (síntipo SP28995!).

- = *Cleistes latiglossa* Hoehne, Arq. Bot. São Paulo 1: 42. 1939. Tipo: Brasil, Mato Grosso, Salto Augusto Rio Juruena, II.1912, *F.C. Hoehne 5328* (holótipo SP!).
- = *Cleistes villabellae* Barb. Rodr. ex Hoehne, Fl. Brasílica 12(1): 231. 1940, *pro syn.*
- = *Cleistes rosea* f. *pallida* Carnevali & I. Ramírez, Ann. Missouri Bot. Gard. 77(3): 551. 1990. Tipo: Venezuela, Territorio Federal Amazonas, Depto. Átures, morichal 1-2 km E de Piedra Tortuga, unos 8 km S de Puerto Ayacucho, 80-90 m, ca. 5°32'N, 67°32'W, VI.1988, *G. Carnevali et al. 2661* (holótipo VEN!).

Plantas 20-50 cm alt., palustres. Raízes 1,3-1,5 mm diâm.; raiz tuberosa 3,5-4,5x1,3-1,6 cm, oblonga ou cônica, oca, de coloração acastanhada, revestida por tricomas castanho-avermelhados. Caule 2,5-3,5 mm diâm., reto. Folhas lanceoladas a elípticas, eretas, a apical maior que as medianas, folhas apicais 5-11x0,8-2,5 cm, côncavas, envolvendo ovário e pedicelo da flor, as basais 1,2-2,5x0,5-1 cm, elípticas ou ovais, adpressas ao caule. Inflorescência geralmente com 1-2(-3) flores. Flores predominantemente em tons de rosa ou às vezes esbranquiçadas; ovário + pedicelo 3,5-5 cm compr.; sépalas 4,5-7x0,8-1,3 cm, linear-lanceoladas, esverdeadas, ápice agudo; pétalas 3,6-6,3x1-1,5 cm, elípticas a oblanceoladas, em tons de rosa ou esbranquiçadas, ápice acuminado; labelo 4,2-6,4x2,8-3,5 cm, inteiro, de âmbito oblanceolado, róseo com vênulas rosa-escuras ou mais raramente branco com ápice róseo, ápice agudo, margem ondulada, crenulada ou denteada; glândulas nectaríferas 1,8-2,1 mm compr., piriformes; crista central branca com papilas arredondadas e esbranquiçadas na porção apical. Coluna 2,9-5,6 cm compr., reta, branca; estigma 4-5 mm compr., oval, plano; antera branca, ápice truncado, às vezes com três protuberâncias arredondadas; polínias 3,5-4 mm compr. Frutos 4,5-6,5x1,3-1,5 cm, cônicos, estreitos na base, dilatados para o ápice. Sementes ca. 1x0,2 mm, fusiformes, castanho-escuras.

Espécie distribuída pelos Estados de Minas Gerais, Goiás, Amazonas, Mato Grosso e Bahia, sendo também muito freqüente no Distrito Federal. É uma espécie de ampla distribuição, sendo encontrada até a América Central. Espécie comumente encontrada em solos encharcados adjacentes à áreas de cerrado. Floresce entre os meses de dezembro e fevereiro. Os frutos tornam-se deiscentes entre março e abril. Cada flor dura cerca de 2-3 dias.

Facilmente reconhecível pela folha apical côncava e visivelmente maior que as demais. Apresenta, também, como característica, grandes frutos cônicos, estreitos na base e dilatados para o ápice, geralmente recobertos pelas folhas apicais.

*Cleistes latiglossa* Hoehne, apresentada aqui como sinônimo de *C. rosea*, foi também publicada como *Cleistes latiplume* Hoehne Orquidea (Rio de Janeiro) 2: 113. 1940.

Material examinado: **BRASIL, BAHIA: Lençóis**, XII.1981, *A.M. Carvalho 1071* (SP). **DISTRITO FEDERAL: Brasília**, XII.1964, *E.P. Heringer 9979* (UB); XII.1965, *E.P. Heringer 10555* (UB); I.1994, *M.A. da Silva et al. 1874* (IBGE); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista 762* (UEC). **Reserva Biológica do IBGE**, II.1983, *G.I. Rocha et al. 7536* (R). **Samambaia**, I.1967, *E.P. Heringer 11308* (UB). **Saia Velha**, XII.1991, *R.C. Mendonça et al. 2054* (IBGE). **Santuário Ecológico do Riacho Fundo**, XII.1994, *R.S. Oliveira 41* (UB); XII.1994, *R.S. Oliveira 49* (UB). **Sobradinho**, XII.1974, *E.P. Heringer 14254* (IBGE). **GOIÁS: Alto Paraíso de Goiás**, I.1979, *P. Gates & Stabrook 49* (SP); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista 740* (UEC); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista 743* (UEC); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista 750* (UEC); I.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 861* (UEC); II.2002, *R.S. Rodrigues et al. 1438* (UEC). **Cavalcante**, XII.1998, *J.A.N. Batista 820* (CEN); I.1999, *J.A.N. Batista 829* (UEC); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista 753* (UEC). **Mináçu**, XI.1991, *B.M.T. Walter et al. 711* (CEN); XII.1991, *B.M.T. Walter et al. 884* (CEN). **Pirenópolis**, I.1972, *H.S. Irwin et al. 32545* (UEC); I.1972, *H.S. Irwin 34538* (UB); I.1972, *H.S. Irwin et al. 34545* (UB); I.1991, *J.A.N. Batista 175* (CEN); I.1992, *J.A.N. Batista 238* (CEN). **Pires do Rio**, XII.1988, *M.G.L. Wanderley & R. Kral 1896* (SP). **Serra Dourada**, I.1966, *E.P. Heringer 10938* (HB, UB). **Teresina de Goiás**, XII.2001, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 868* (UEC); XII.2001, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 873* (UEC); I.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 889* (UEC); I.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 897* (UEC). **MARANHÃO: Carolina**, I.1998, *R.S. Oliveira & E. Gonçalves 264* (CEN). **MINAS GERAIS: Datas**, I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 8* (UEC). **Diamantina**, I.2000, *J.A.N. Batista & K. Proite 1025* (CEN). **Ouro Preto**, I.1942, *Mendes Magalhães 1393* (SP). **Serro**, I.1998, *M.F. Vasconcelos s.n.* (BHC 40157). **PARÁ: Marapanim**, III.1960, *W.A. Egler 1930* (MG). **PARANÁ: Capão**

**Grande**, XII.1903, *P. Dusén* 2876 (R). **SÃO PAULO: São Paulo**, s.dat., *A. Usteri s.n.* (SP29004).

**17.** *Cleisthes stricta* (C. Schweinf.) Garay & Dunsterv., *Venez. Orchid.* III. 5: 54. 1972. ≡ *Pogonia stricta* C. Schweinf., *Fieldiana, Bot.* 28: 167. 1951. Tipo: Venezuela, Bolívar, Ptari-tepui, XI.1944, *J.A. Steyermark* 59786 (holótipo F).

Figura: 40.

= *Cleisthes huberi* Carnevali & Ramírez, *Ann. Missouri Bot. Gard.* 77: 549-558. 1990. Tipo: Venezuela, Bolívar, Aparamán-tepui, westernmost of four tepuis in the Aparamán Range, 2150 m, 5°54'N, 62°07'W, summit of highly eroded sandstone mesa, III.1987, *B. Holst* 3480 (holótipo VEN!).

Plantas 24-50 cm alt., terrícolas ou palustres. Raízes 0,5 mm diâm. Caule 1-3 mm diâm., reto. Folhas 3-6x1,5-3 mm, lanceoladas, elíptico-lanceoladas ou oval-lanceoladas, eretas, adpressas ao caule, de tamanho mais ou menos uniforme ao longo do caule. Inflorescência com até 10 flores; brácteas florais 3,5-7x2-3 mm, lanceoladas a elíptico-lanceoladas. Flores predominantemente esbranquiçadas; ovário + pedicelo 8-16 mm compr.; sépalas 14-20x3-3,5 mm, linear-lanceoladas a sub-falcadas, amareladas, ápice agudo; pétalas 13,5-16x4-5 mm, elípticas a espatuladas, sub-falcadas, brancas, ápice agudo; labelo 12-13,5x5-6 mm, inteiro, oblongo, branco com ápice purpúreo, ápice agudo, margem crenulada; glândulas nectaríferas 0,3 mm compr., ovais; crista central amarelada, com diminutas papilas na porção apical. Coluna 8,5-9 mm compr., esbranquiçada; estigma 2,4-2,6 mm compr., côncavo; antera sub-emarginada, branca; polínias 1,5 mm compr. Frutos 1,8-2,2x0,5-0,7 cm, oblongos.

Espécie endêmica da Amazônia Venezuelana. É comumente encontrada em campos úmidos adjacentes a áreas de matas, em regiões de tepui. Floresce entre os meses de outubro e fevereiro. Os frutos se tornam deiscentes entre dezembro e abril.

Espécie identificável pela inflorescência com até 10 flores, pelas flores predominantemente esbranquiçadas, pelas sépalas amareladas e pelo labelo inteiro.

Material examinado: **VENEZUELA, AMAZONAS: Cerro Aracamoni**, X.1987, *G. Carnevali & G. Santana* 2379 (VEN); X.1987, *R. Liesner & G. Carnevali* 22421 (MO, VEN). **ESTADO BOLÍVAR: Cerro Jaua**, II.1974, *J.A. Steyermark et al.* 109593 (VEN).

**18.** *Cleistes tenuis* (Rchb. f. ex Griseb.) Schltr., Arch. Bot. São Paulo 1: 180. 1926. ≡ *Pogonia tenuis* Rchb. f. ex Griseb., Fl. Brit. W. Ind. Isl. 1: 637. 1864.

Figuras: 18, 21C, 23C, 41.

= *Cleistes paludosa* Benth. ex Griseb., Pl. Sprucean. 1: 637. 1864, non Rchb. f. 1849.

= *Cleistes gert-hatschbachiana* Hoehne, Arch. Bot. São Paulo 2: 122. 1952. Tipo: Brasil, Paraná, São José dos Pinhais, Rincão, I.1950, *G. Hatschbach* 1788 (holótipo SP!).

Plantas (-7)13-28(-35) cm alt., terrícolas ou palustres. Raízes 0,5-1(-1,3) mm diâm.; raiz tuberosa 1,3-4x0,6-0,9 cm, oblonga, maciça, esbranquiçada ou de coloração creme, revestida por tricomas acastanhados. Caule 0,5-1,8 mm diâm., reto. Folhas 5-50x3-8 mm, lanceoladas a elíptico-lanceoladas, eretas, planas ou côncavas, as apicais geralmente maiores ou de tamanho igual às medianas, as basais reduzidas a pequenas bainhas, em geral elípticas, adpressas ao caule. Inflorescência com 1-3 flores. Flores predominantemente brancas; ovário + pedicelo 1,3-2,7 cm compr.; sépalas 1,5-2,5x0,3-0,5 cm, lanceoladas a elíptico-lanceoladas, esverdeadas, ápice agudo; as laterais em geral sub-falcadas; pétalas 1,2-2,3x0,4-0,7 cm, elípticas a oblanceoladas, sub-falcadas, branco-hialinas, às vezes levemente róseas para o ápice, ápice agudo; labelo 1,2-2,3x0,6-1 cm, 3-lobado, de âmbito oblanceolado, oblongo ou oval, branco com vênulas roxas; glândulas nectaríferas 0,5-0,7 mm diâm., esféricas; crista central amarelada, com diminutas papilas amareladas na porção apical; lobos com margem ondulada ou crenulada, os laterais arredondados ou falcados, ápice arredondado, o apical em geral não unguiculado, istmo ausente ou pouco evidente, retangular quando presente, porção apical arredondada, margem em geral recortada. Coluna 9-13 mm compr., reta, branca; estigma 0,8-1,1 mm compr., semicircular, côncavo; antera branca; polínias 1,3-1,7 mm compr. Frutos 3,5-4,5x0,5-0,7 cm, lineares ou oblongos, verdes ou arroxeados. Sementes ca. 0,73x0,23 mm, oblanceoladas, castanho-claras.

Espécie distribuída pelos Estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Amazonas e Distrito Federal. Uma única coleta foi registrada para o Paraná cujo espécime é o holótipo de *Cleistes gert-hatschbachiana*. Comumente encontrada em campos úmidos, entre gramíneas. Na maioria das vezes, embora não seja regra, estes campos estão cobertos por um filme d'água. Floresce entre os meses de dezembro e início de fevereiro. Os frutos tornam-se deiscentes em março. As flores são pouco duráveis. Abrem ao nascer do sol e fenecem entre 12:00 e 14:00 hs. As flores têm cheiro desagradável, que lembra ao de baratas.

Espécie reconhecível pelas flores predominantemente brancas com sépalas esverdeadas, pelo labelo branco-hialino com vênulas roxas, pelos lobos com margem ondulada ou crenulada, pelo lobo apical arredondado, em geral sem istmo. Na região norte do Brasil e na amazônia venezuelana geralmente as plantas são mais alongadas e as folhas apicais são mais reduzidas quando comparadas com espécimes que ocorrem na porção mais ao sul ao longo de sua distribuição.

Material examinado: **BRASIL, DISTRITO FEDERAL: Brasília**, XI.1989, *J.A.N. Batista s.n.* (CEN 14876); XI.1992, *Z.J.G. Miranda 23* (CEN); I.1996, *J.A.N. Batista & R. Oliveira 588* (CEN). **GOIÁS: Águas Lindas de Goiás**, I.2001, *R.J.G. Miranda 66* (CEN). **Alto Paraíso de Goiás**, II.1979, *P. Gates & Stabrook 128* (UB); I.1993, *J.A.N. Batista & L.B. Bianchetti 403* (CEN); I.1997, *M.C. Assis et al. 354* (CEN); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista 741* (UEC); I.2003, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 931* (UEC); I.2003, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 949* (UEC). **Cavalcante**, XII.1998, *J.A.N. Batista 818* (CEN); XII.1998, *J.A.N. Batista 819* (CEN); I.1999, *J.A.N. Batista 882* (UEC); I.2001, *E.R. Pansarin & J.A.N. Batista 738* (UEC); I.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 900* (UEC). **Cristalina**, XII.1996, *R.S. Oliveira & C. Proença 217* (CEN). **Pirenópolis**, I.1991, *J.A.N. Batista 162* (CEN); I.1991, *J.A.N. Batista 163* (CEN); I.1992, *J.A.N. Batista 239* (CEN); III.1998, *J.A.N. Batista & A.R. Lemos 498* (CEN). **Teresina de Goiás**, XII.2001, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 875* (UEC); I.2002, *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 890* (UEC). **MATO GROSSO: Juruema**, s.d., *C.M.C. Rondon & F.C. Hoehne 5591* (R). **MINAS GERAIS: Catas Altas (Serra do Caraça)**, I.2000, *J.A.N. Batista & K. Proite 982*

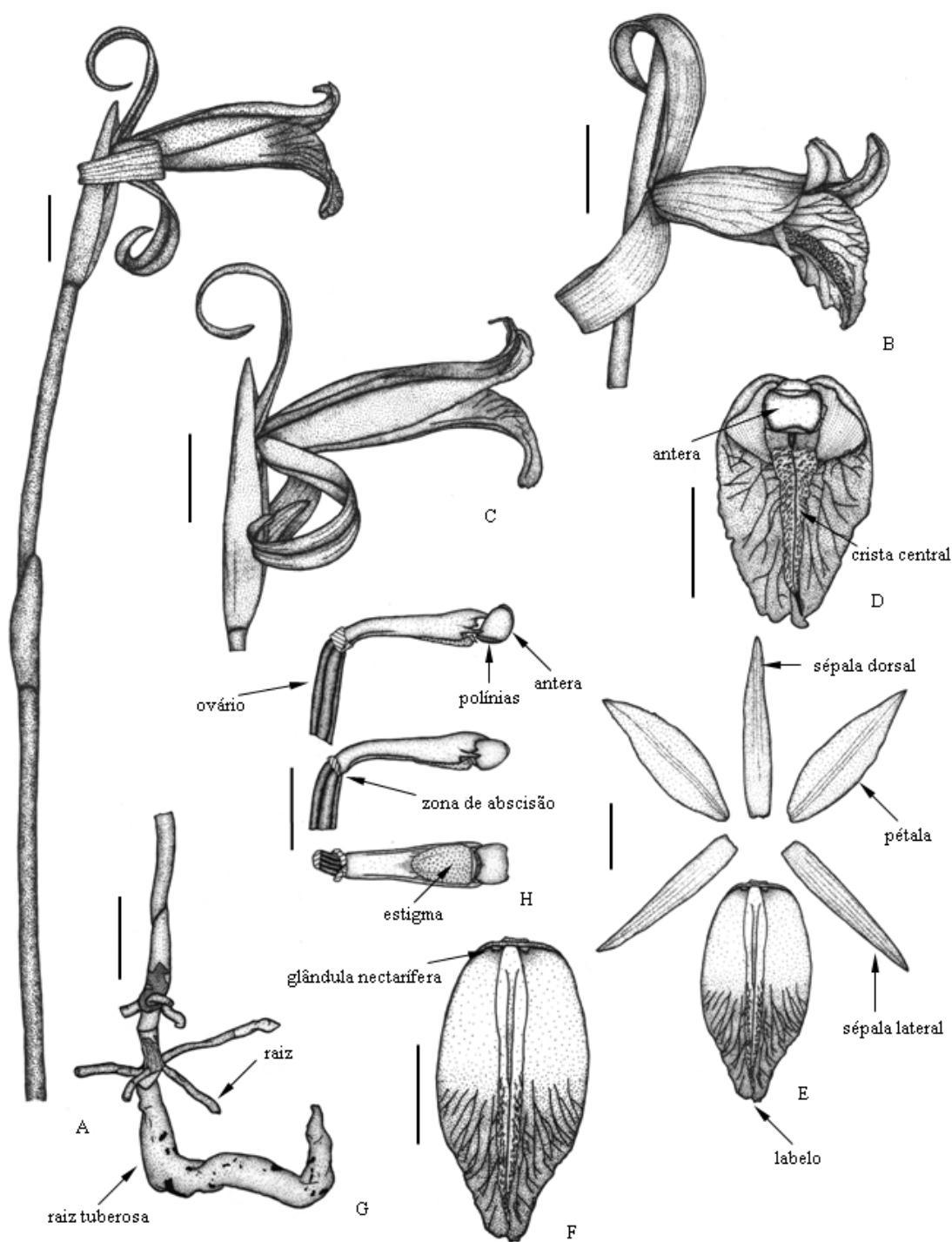
(CEN). **Diamantina**, I.2004, *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 13* (UEC). **Ouro Branco**, I.2003, *C.C. de Paula et al. 596* (VIC). **Serra do Cipó**, I.2000, *J.A.N. Batista & K. Proite 990* (CEN). **VENEZUELA, AMAZONAS: Atures**, VII.1984, *F. Guanchez 2926* (VEN). **Cerro Autana**, IX.1971, *G.C.K. Dunsterville & J. Steyemark s.n.* (VEN 208108).

### Referências bibliográficas

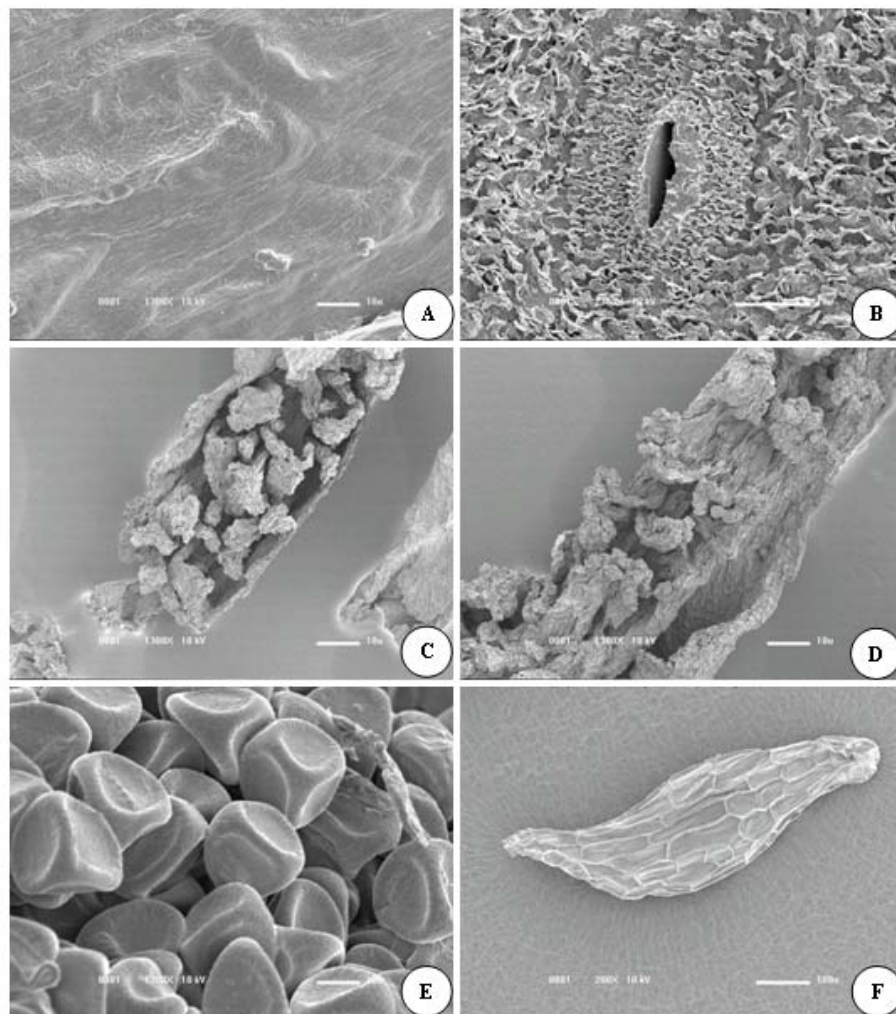
- Cameron, K.M. & Chase, M.W. 1999. Phylogenetic relationships of Pogoniinae (Vanilloideae, Orchidaceae): an herbaceous example of the eastern North America – eastern Asia phytogeographic disjunction. *J. Plant. Res.* 112: 317-329.
- Cogniaux, A. 1893. Orchidaceae. In Martius, C.F.P. von; Endlicher, S. & Urban, I. *Flora Brasiliensis*. 3(4): 111-134.
- Hoehne, F.C. 1940. Orchidaceae vol. XII, nº II *Flora Brasílica*. São Paulo: Instituto de Botânica.
- Lindley, J. 1830-1840. *The genera and Species of Orchidaceous Plants*. Ridgways: London.
- Medley, M.E. 1991. Notes on *Cleistes* and *Triphora* (Orchidaceae). *Selbyana* 12: 102-103.
- Pabst, G.F. & Dungs, F. 1975. *Orchidaceae Brasiliensis*. Vol. 1. Kurt Schmiersow: Hildeshein.
- Pansarin, E.R. 2003. Biologia floral de *Cleistes macrantha* (Barb. Rodr.) Schltr. (Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae). *Revista Brasil. Bot.* 26: 73-80.
- Reichenbach, H.G. 1865. *Xenia Orchidacea*. Band 2. F.A. Brockhaus. Leipzig.
- Reichenbach, H.G. 1881. *Otia botanica Hamburguensia*. Fascicle 2. *Novitiae Orchidaceae Warmingianae*. Hamburg.
- Richard, L.M.C. 1818. *The Orchidieis europais annotations*. Paris 14: 23-61.
- Schlechter, R. 1926. Contribuição ao conhecimento das orchidaceas do Brasil. *Arch. Bot. Est. São Paulo* 1(3): 161-349.
- Silva, D.G. 2002. O gênero *Cleistes* Rich. ex Lindl. (Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae) na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana.



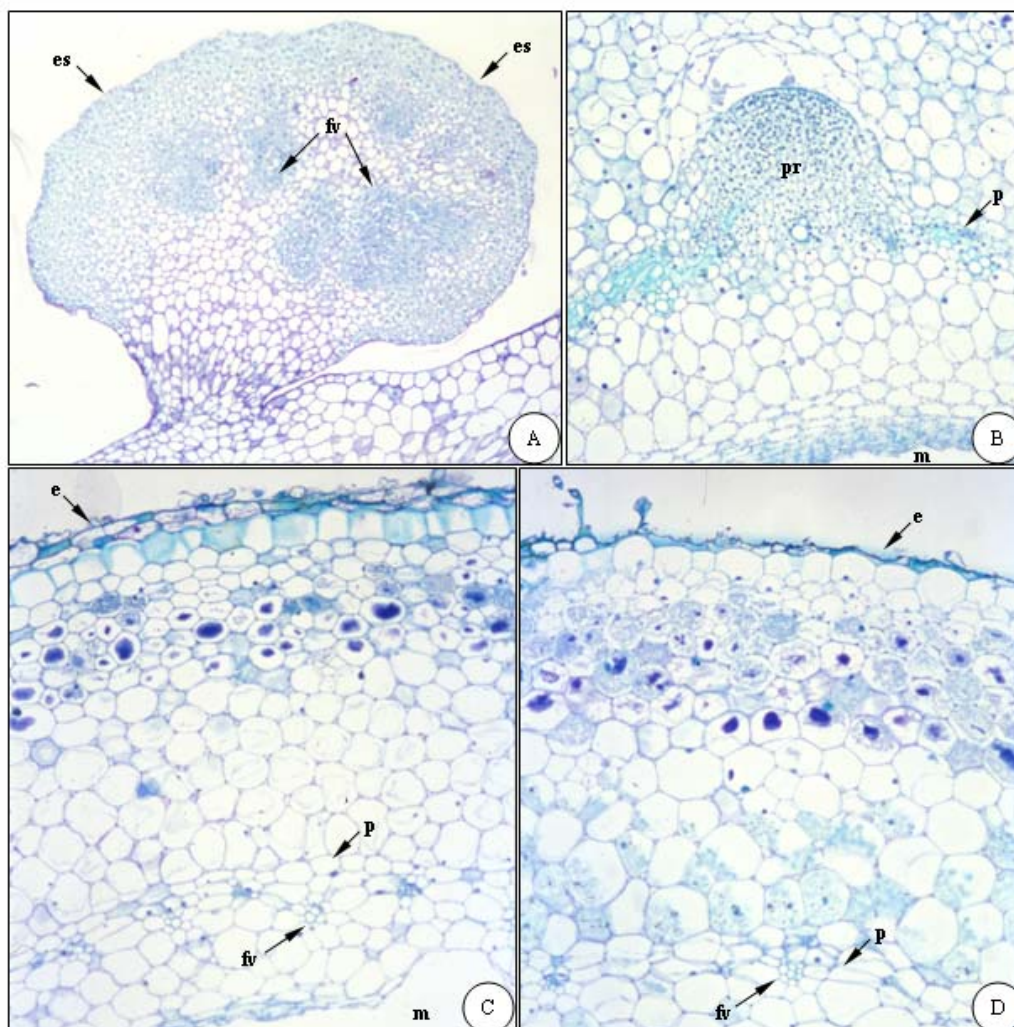
Sprunger, S.; Cribb, P. & Toscano de Brito, A. (eds.). 1996. João Barbosa Rodrigues. Iconographie des orchidées du Brésil, Volume 1: the illustrations. Volume 2: the texts. Friedrich Reinhardt Verlag: Basle.



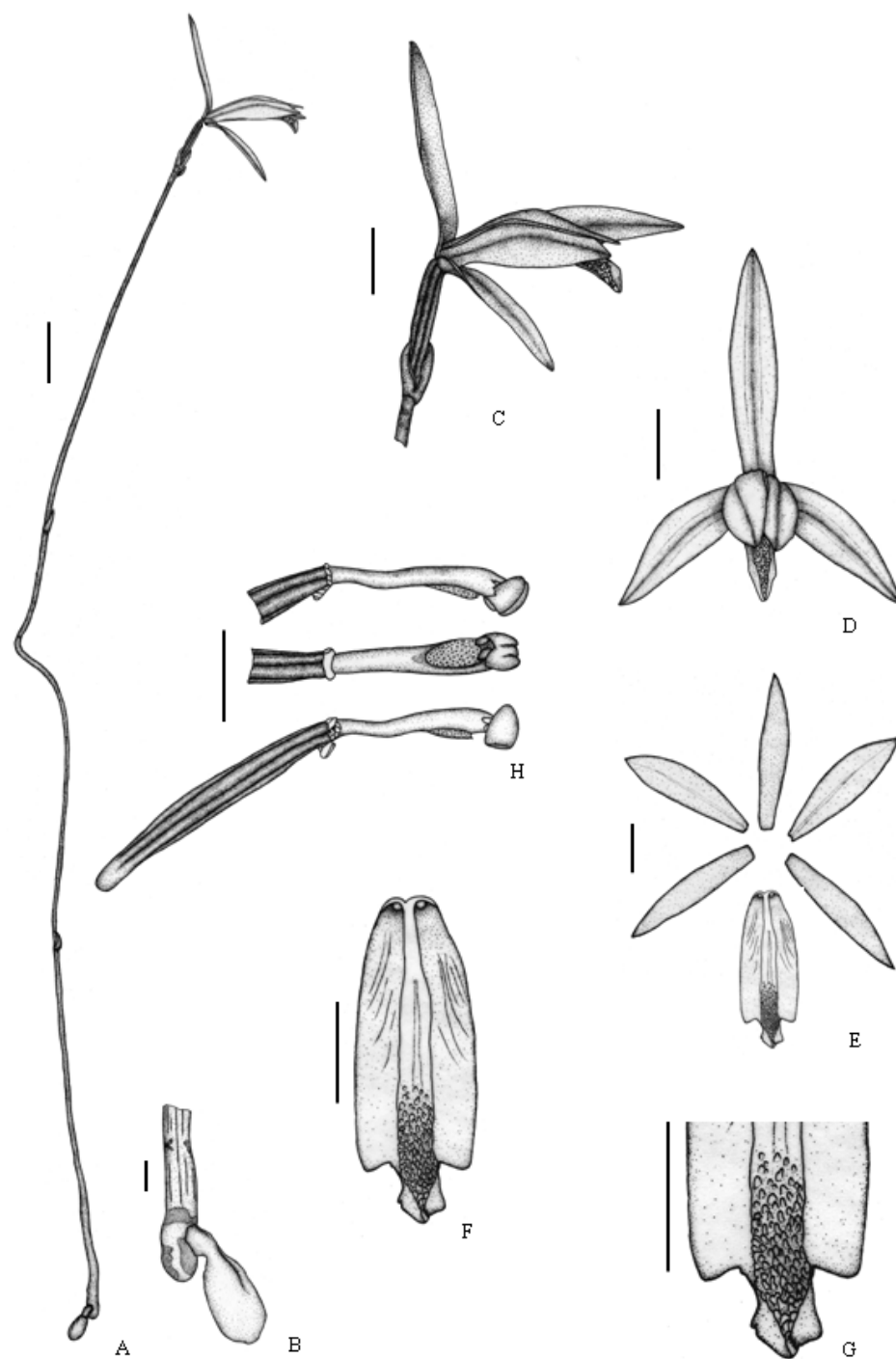
**Figura 1:** *Cleistes rosea* Lindl. A. Hábito; B. Flor; C. Flor e m vista lateral; D. Labelo e coluna em vista frontal; E. Perianto; F. Labelo; G. Raiz tuberosa; H. Coluna em vistas lateral com antera desarticulada, lateral com antera articulada e ventral. Barras de escala: A-H = 2 cm. E.R. Fansarin & L. Mickeliunas 873 (UEC).



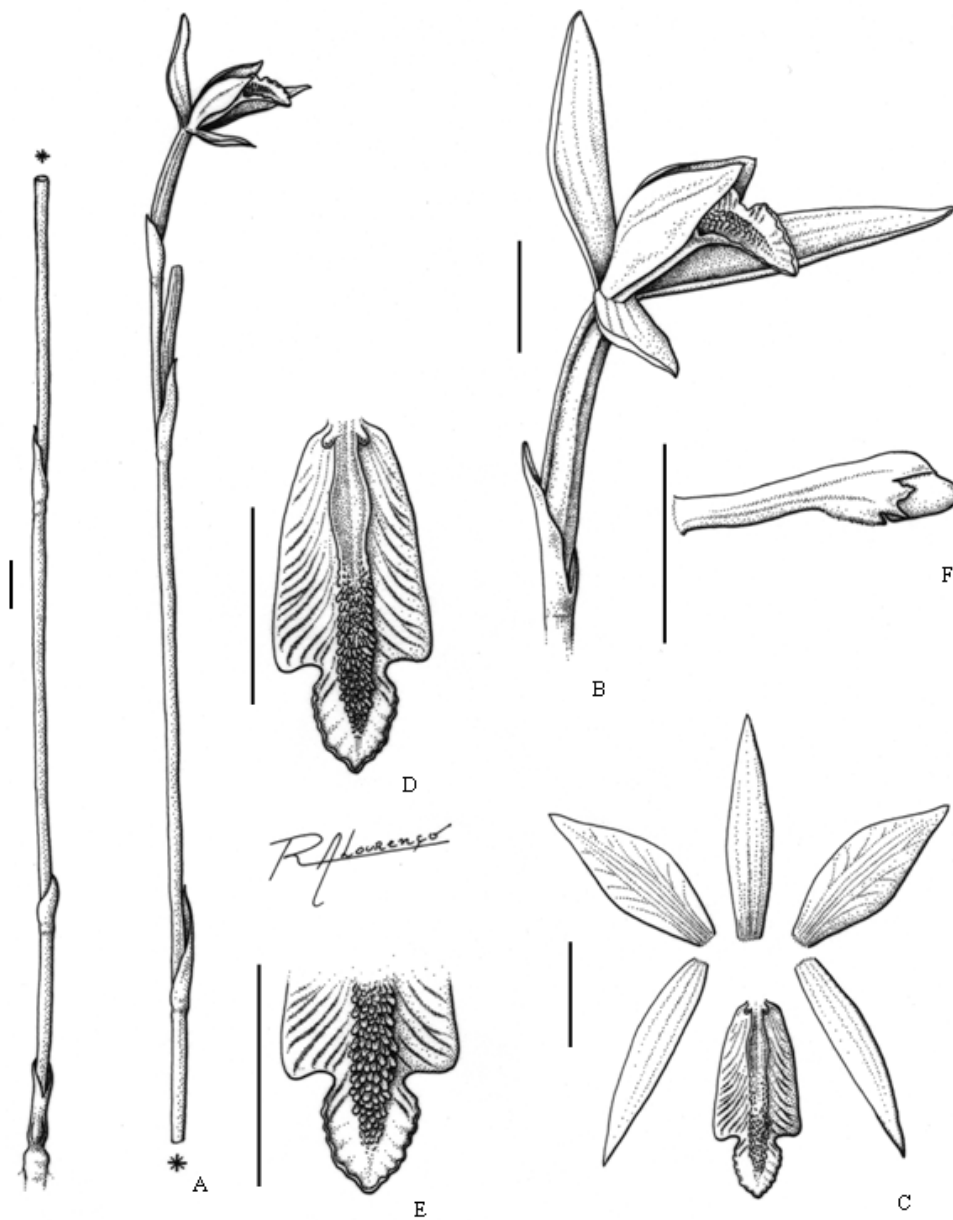
**Figura 2:** Micrografias obtidas em MEV de estruturas vegetativas e florais de espécies de *Cleistes*: **A.** Superfície adaxial de uma folha de *C. pusilla* Pansarin; **B.** Superfície adaxial de uma folha de *C. metallina* (Barb. Rodr.) Schltr.; **C.** Detalhe do labelo de *C. aphylla* (Barb. Rodr.) Schltr.; **D.** Detalhe do labelo de *C. exilis* Hoehne; **E.** Pólen de *C. aphylla* (Barb. Rodr.) Schltr.; **F.** Semente de *C. ramboi* Pabst. Barras de escala A-B, E = 100  $\mu\text{m}$ ; C-D, F = 10  $\mu\text{m}$ .



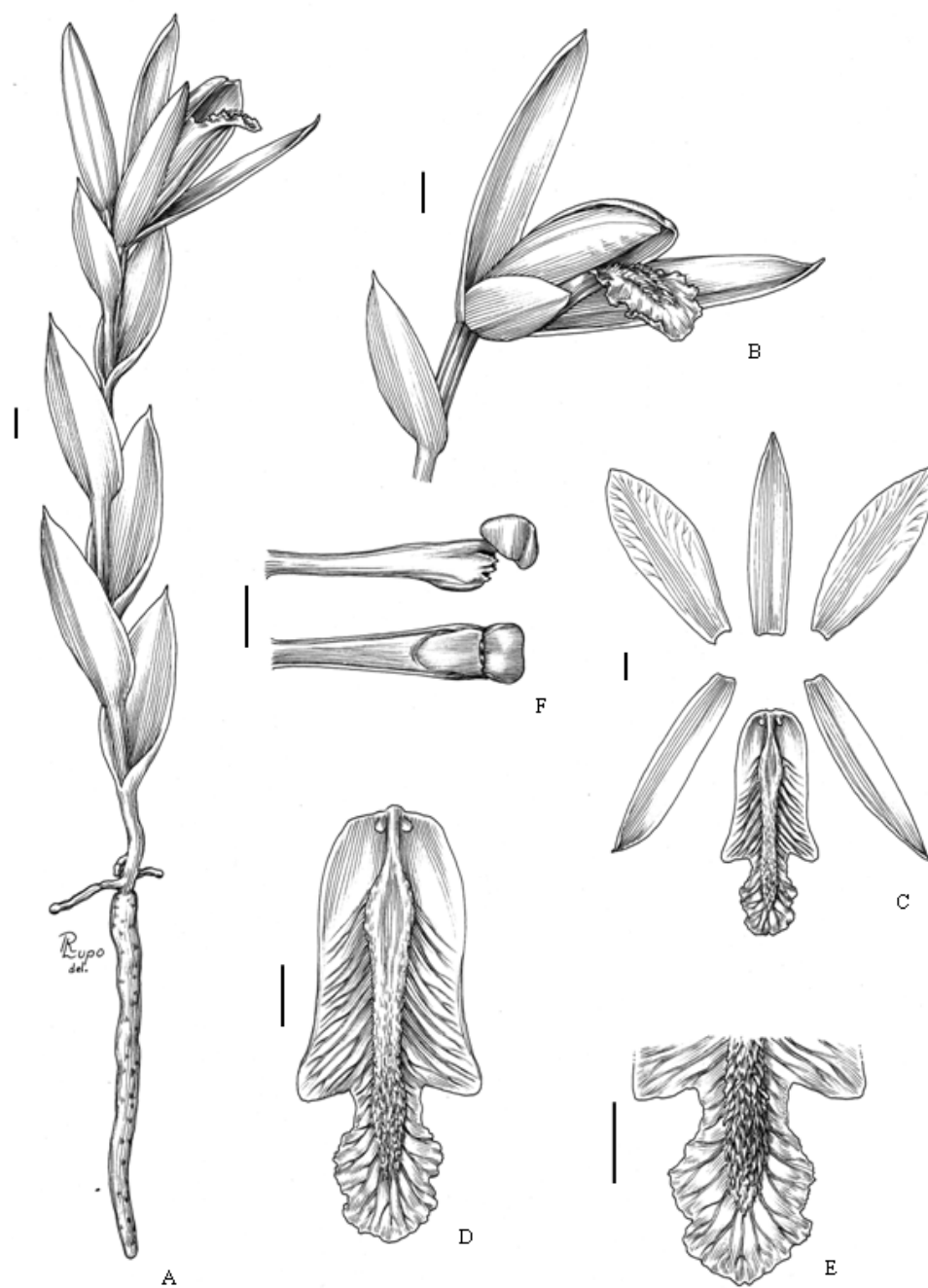
**Figura 3:** A. Corte longitudinal do nectário de *Cleistes libonii* (Rchb. f.) Schltr. B. Corte transversal da raiz tuberosa de *C. rosea* Lindl. mostrando o primórdio radicular. C. Corte transversal da raiz tuberosa de *C. rosea*. Note a presença da medula (m). D. Corte transversal da raiz tuberosa de *C. gracilis* (Barb. Rodr.) Schltr. Note que nessa espécie a medula está ausente. e = epiderme, es = epiderme secretora, fv = feixes vasculares, p = periciclo, pr = primórdio de raiz. A = x20; B-D = x40.



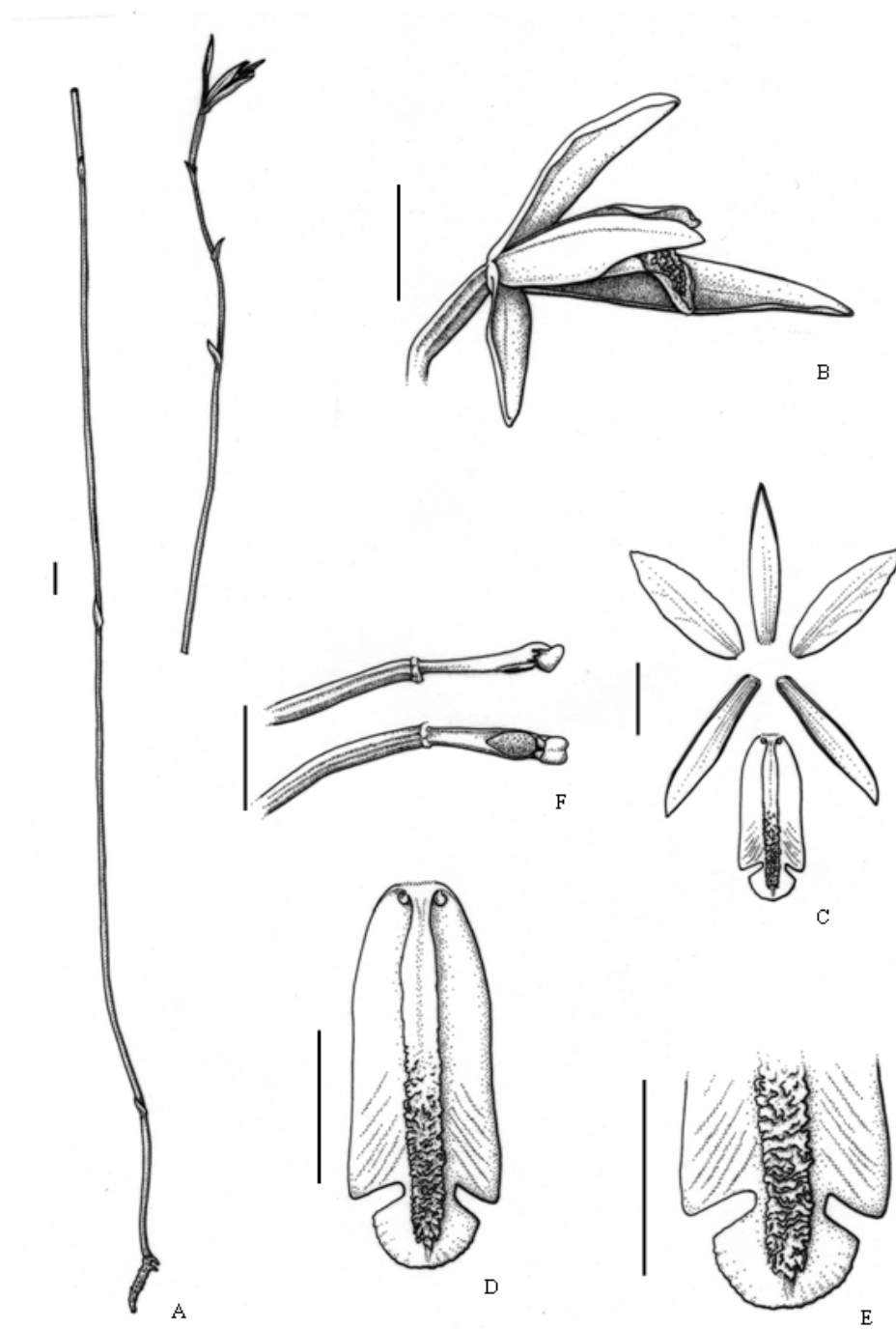
**Figura 4:** *Cleistes aphylla* (Barb. Rodr.) Hoehne. A. Hábito; B. Raiz tuberosa; C. Flor; D. Flor em vista frontal; E. Perianto; F. Labelo; G. Detalhe do ápice do labelo; H. Coluna em vistas lateral com antera articulada, ventral e lateral com antera desarticulada. Barras de escala: A = 1 cm, B = 1 mm, C-H = 5 mm. *E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 870*(UEC).



**Figura 5:** *Cleistes batistana* Pansarin. **A.** Hábito; **B.** Flor; **C.** Perianto; **D.** Labelo; **E.** Detalhe do ápice do labelo; **F.** Coluna em vista lateral com antera articulada. Barras de escala: A-F = 1 cm. *J.A.N. Batista et al. 599 (CEN).*

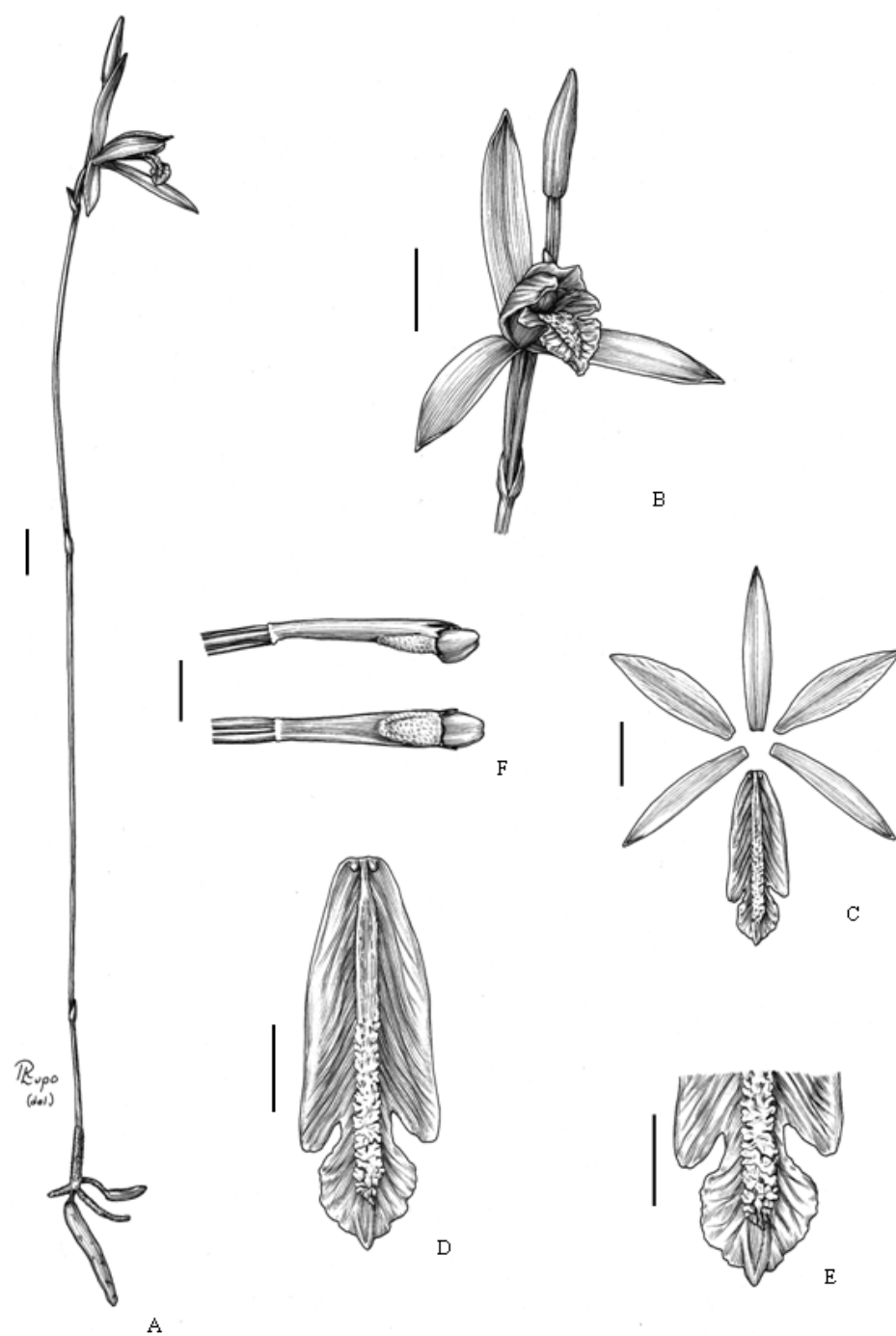


**Figura 6:** *Cleistes bella* Rchb. f. & Warm. **A.** Hábito; **B.** Flor; **C.** Perianto; **D.** Labelo; **E.** Detalhe do ápice do labelo; **F.** Coluna em vistas lateral com antera desarticulada e ventral. Barras de escala: A-F = 1 cm. *E.R. Pansarin & L. Mickelionas 921* (UEC).

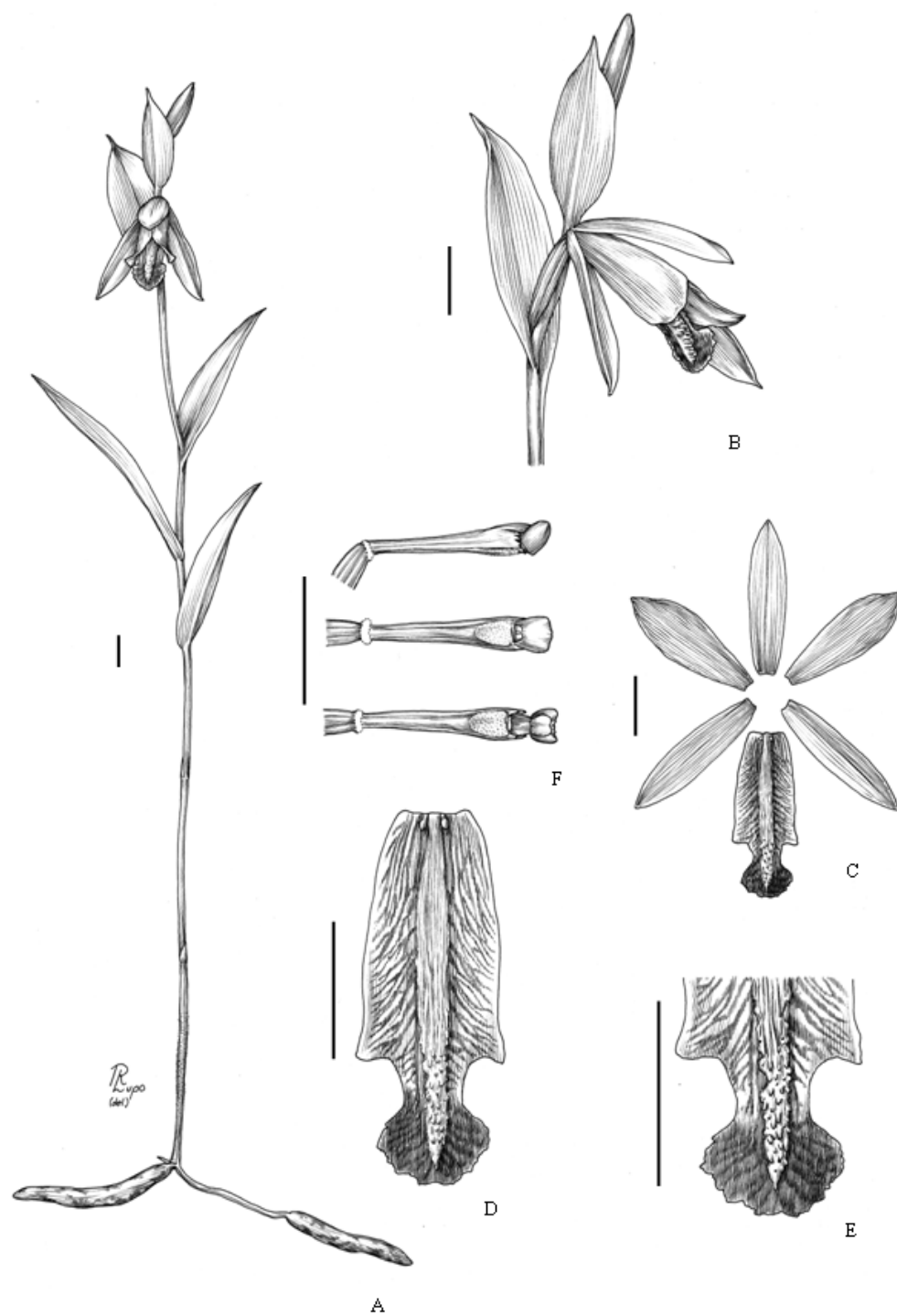


**Figura 7:** *Cleistes elongata* Pansarin. A. Hábito; B. Flor; C. Perianto; D. Labelo; E. Detalhe do ápice do labelo; F. Coluna em vistas lateral com antera articulada e ventral. Barras de escala: A-F = 1 cm. *ER Pansarin & L. Mickeliunas 1175* (UEC).

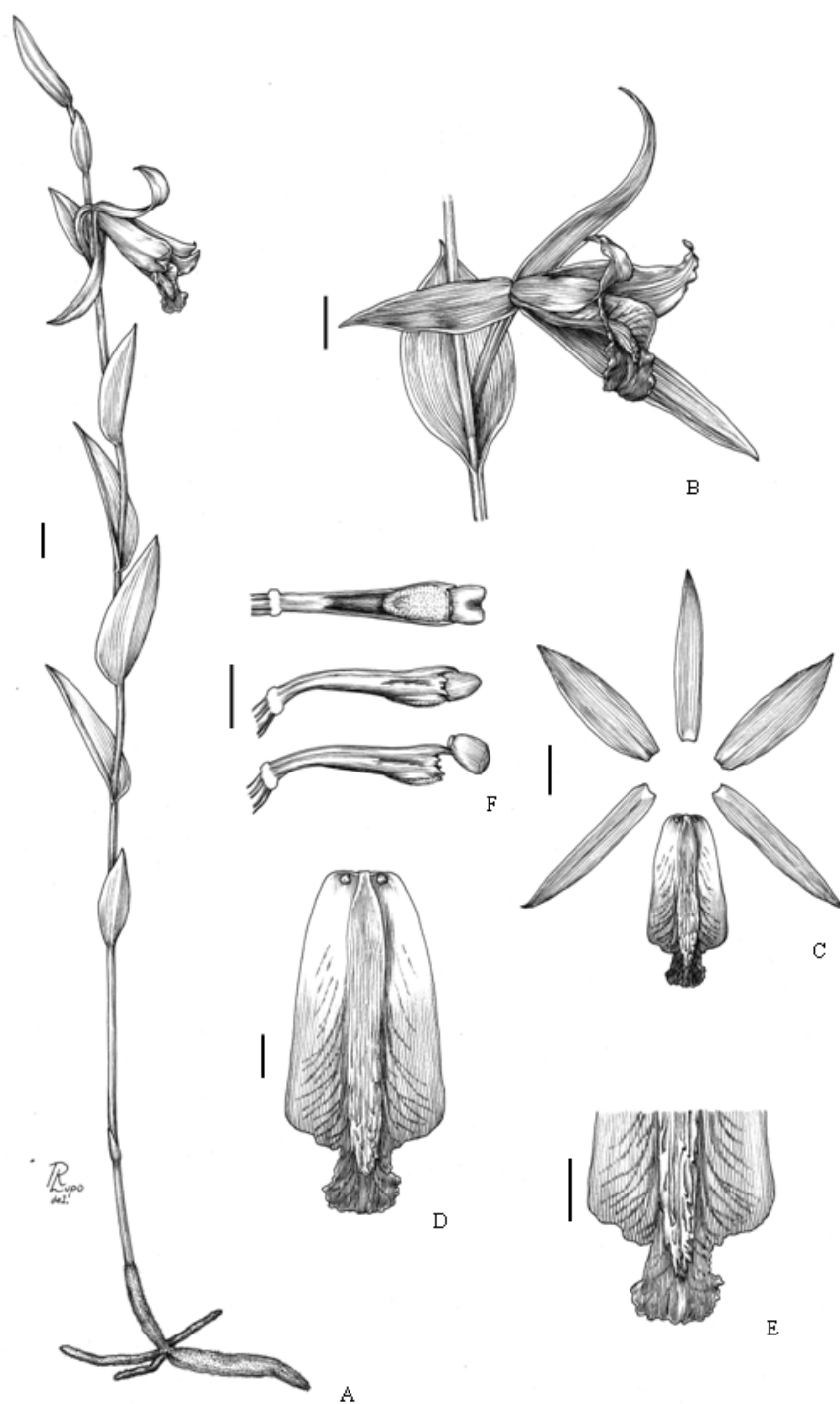




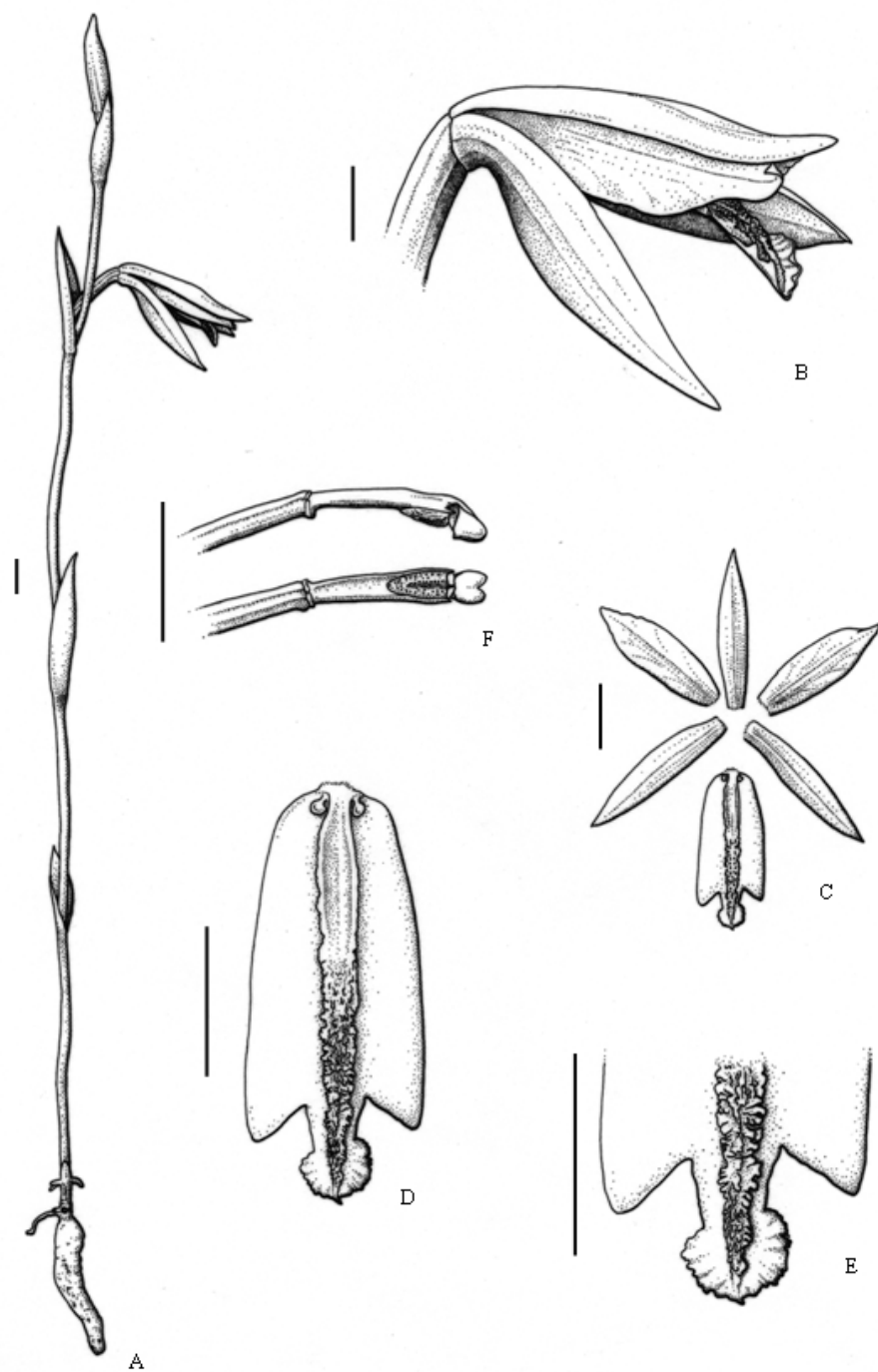
**Figura 8:** *Cleistes exilis* Hoehne. A. Hábito; B. Flor; C. Perianto; D. Labelo; E. Detalhe do ápice do labelo; F. Coluna em vistas lateral com antera articulada e ventral. Barras de escala: A-C = 1 cm; D-F = 5 mm. E.R. Fansarin & L. Mickelinas 886 (UEC).



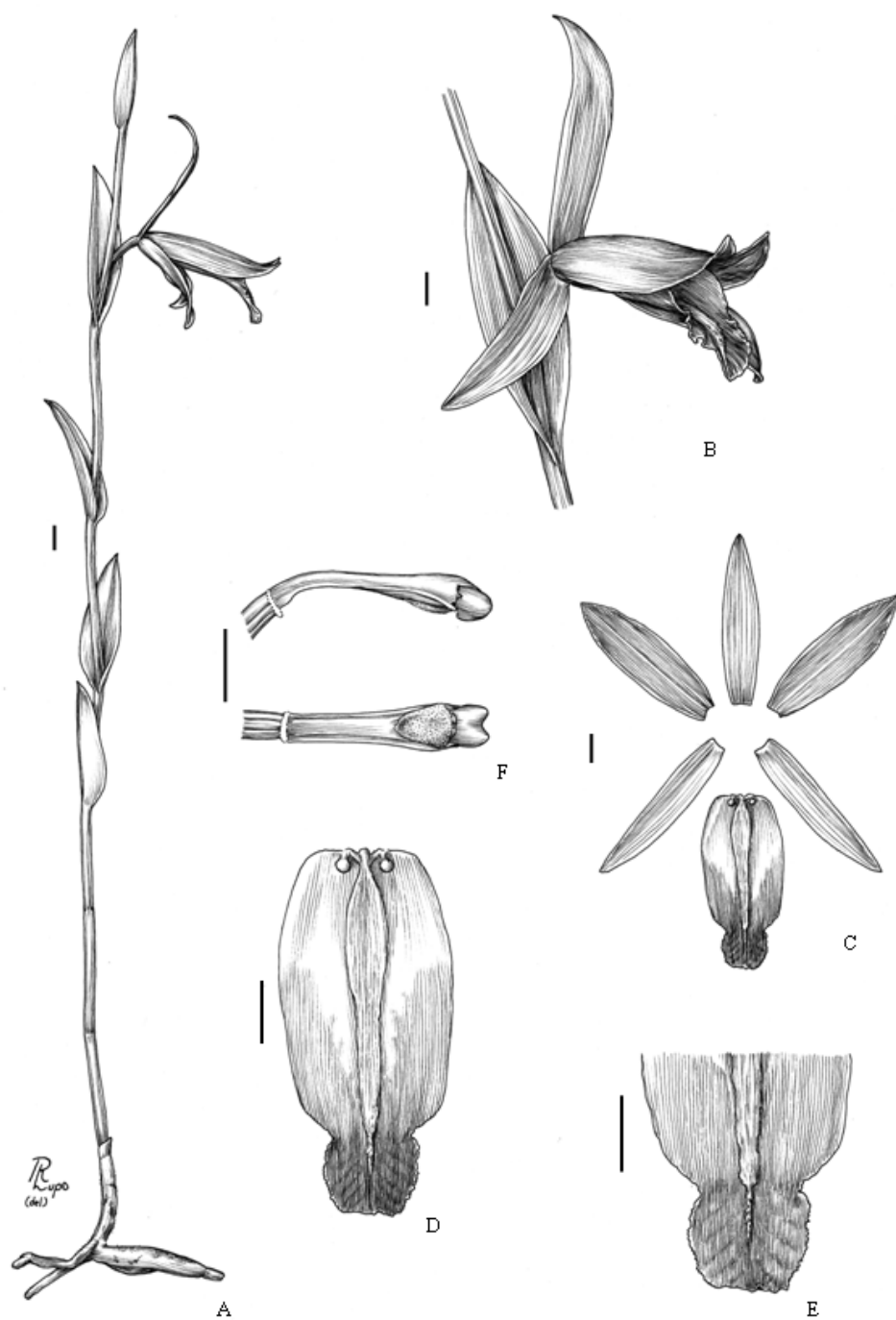
**Figura 9:** *Cleistes gracilis* (Barb. Rodr.) Schltr. A. Hábito; B. Flor; C. Perianto; D. Labelo; E. Detalhe do ápice do labelo; F. Coluna em vistas lateral com antera articulada, ventral com antera articulada e ventral com antera desarticulada. Barras de escala: A-F = 1 cm. E.R. Fansarin 698 (UEC).



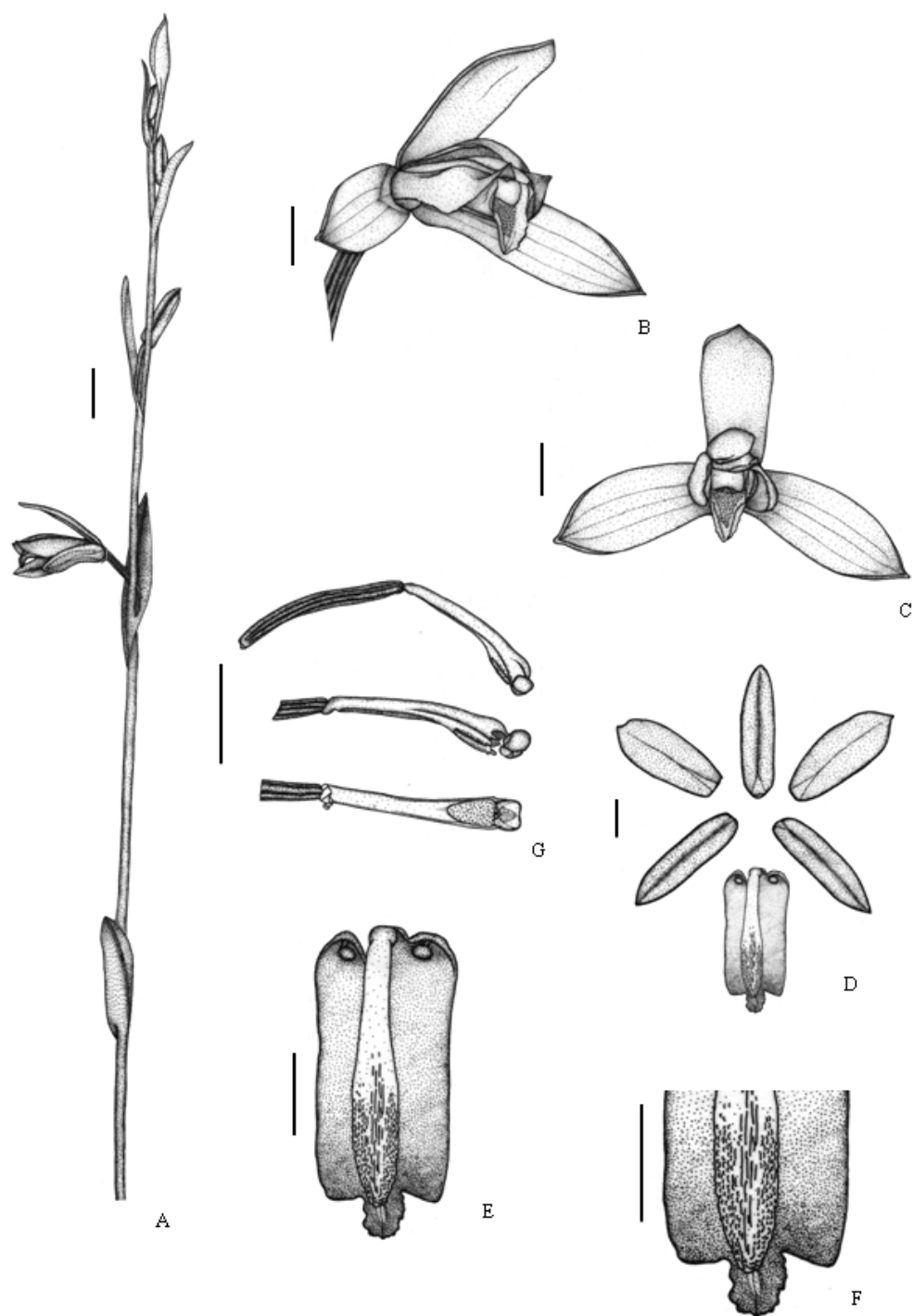
**Figura 10:** *Cleistes libonii* (Rchb. f.) Schltr. **A.** Hábito; **B.** Flor; **C.** Perianto; **D.** Labelo; **E.** Detalhe do ápice do labelo; **F.** Coluna em vistas ventral, lateral com antera articulada e lateral com antera desarticulada. Barras de escala: A-C = 2 cm; D-F = 1 cm. *E.R. Fansarin 462* (UEC).



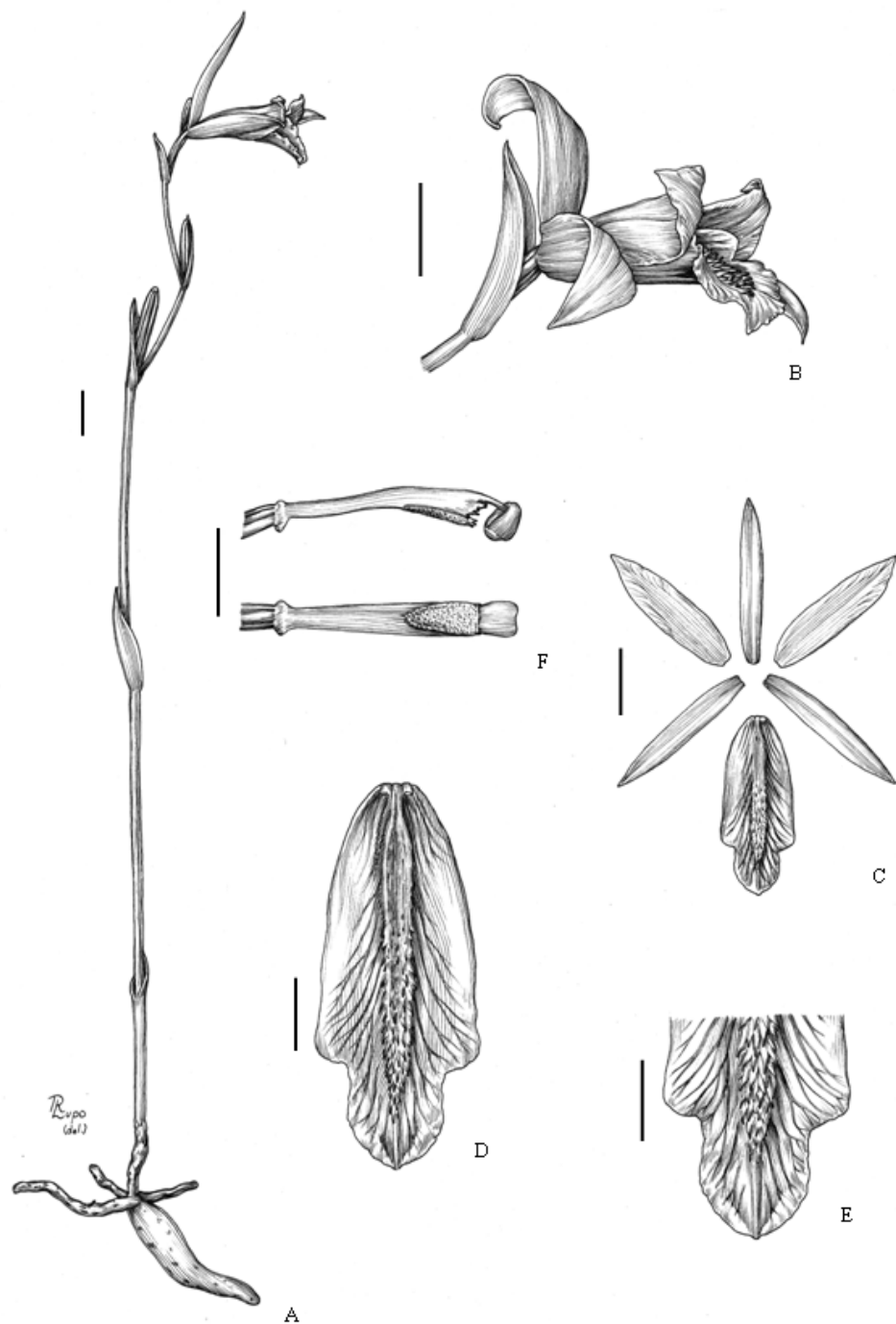
**Figura 11:** *Cleistes mantiqueirae* (Rchb. f. & Warm.) Schltr. **A.** Hábito; **B.** Flor; **C.** Perianto; **D.** Labelo; **E.** Detalhe do ápice do labelo; **F.** Coluna em vistas lateral com antera articulada e ventral. Barras de escala: A-F = 1 cm. *E.R. Pansarin 1170* (UEC).



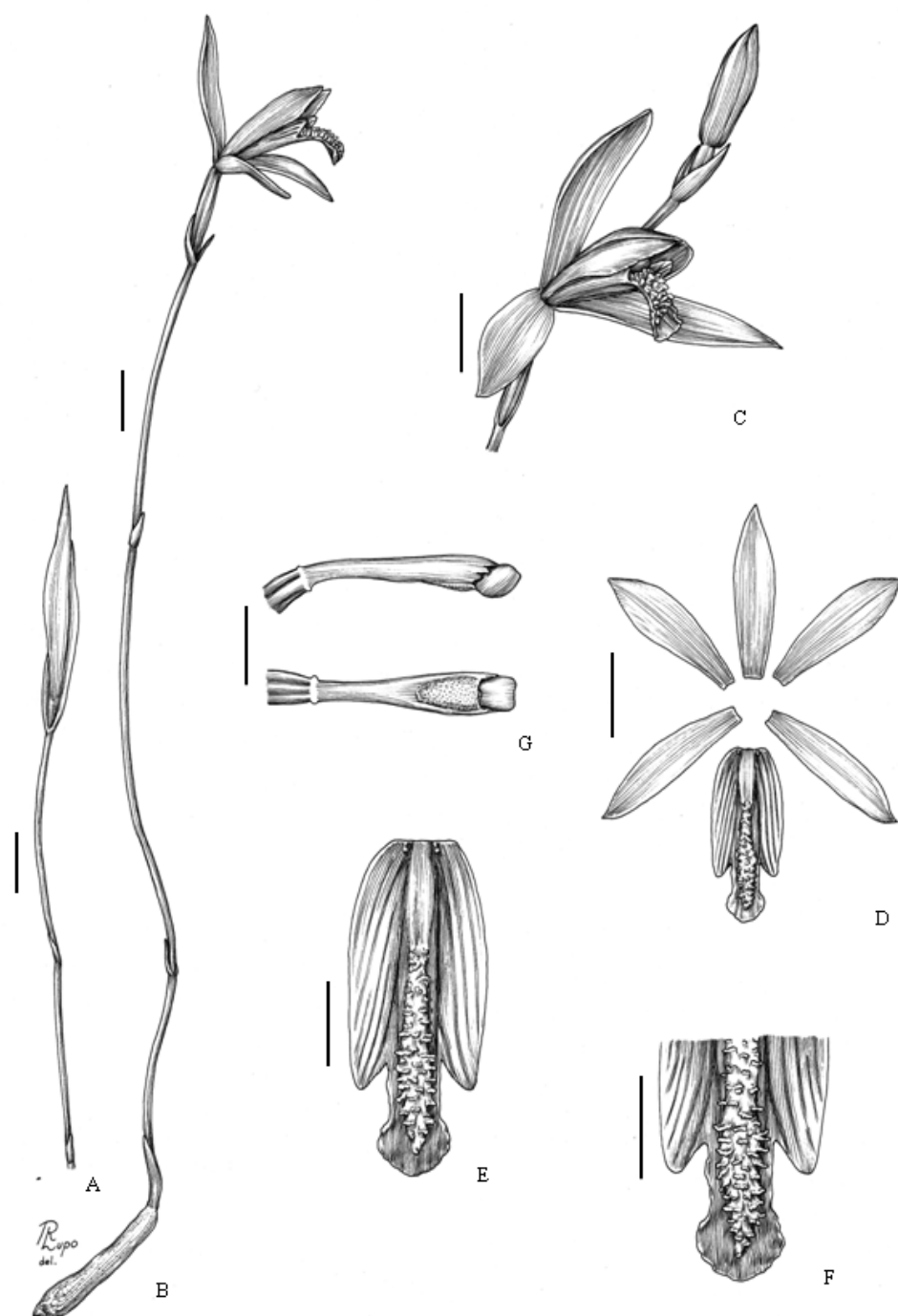
**Figura 12:** *Cleistes metallina* (Barb. Rodr.) Schltr. A. Hábito; B. Flor; C. Perianto; D. Labelo; E. Detalhe do ápice do labelo; F. Coluna em vistas lateral com antera articulada e ventral. Barras de escala: A-F = 1 cm. E.R. Pansarin & L. Mickeliunas 1119 (UEC).



**Figura 13:** *Cleistes moritzii* (Rchb. f.) Garay & Dunsterv. A. Hábito; B. Flor; C. Flor em vista frontal; D. Perianto; E. Labelo; F. Detalhe do ápice do labelo; G. Coluna em vistas lateral com antera articulada, lateral com antera desarticulada e ventral. Barras de escala: A = 2 cm; B-G = 1 cm. *E.R. Pansarin et al. 782* (UEC).

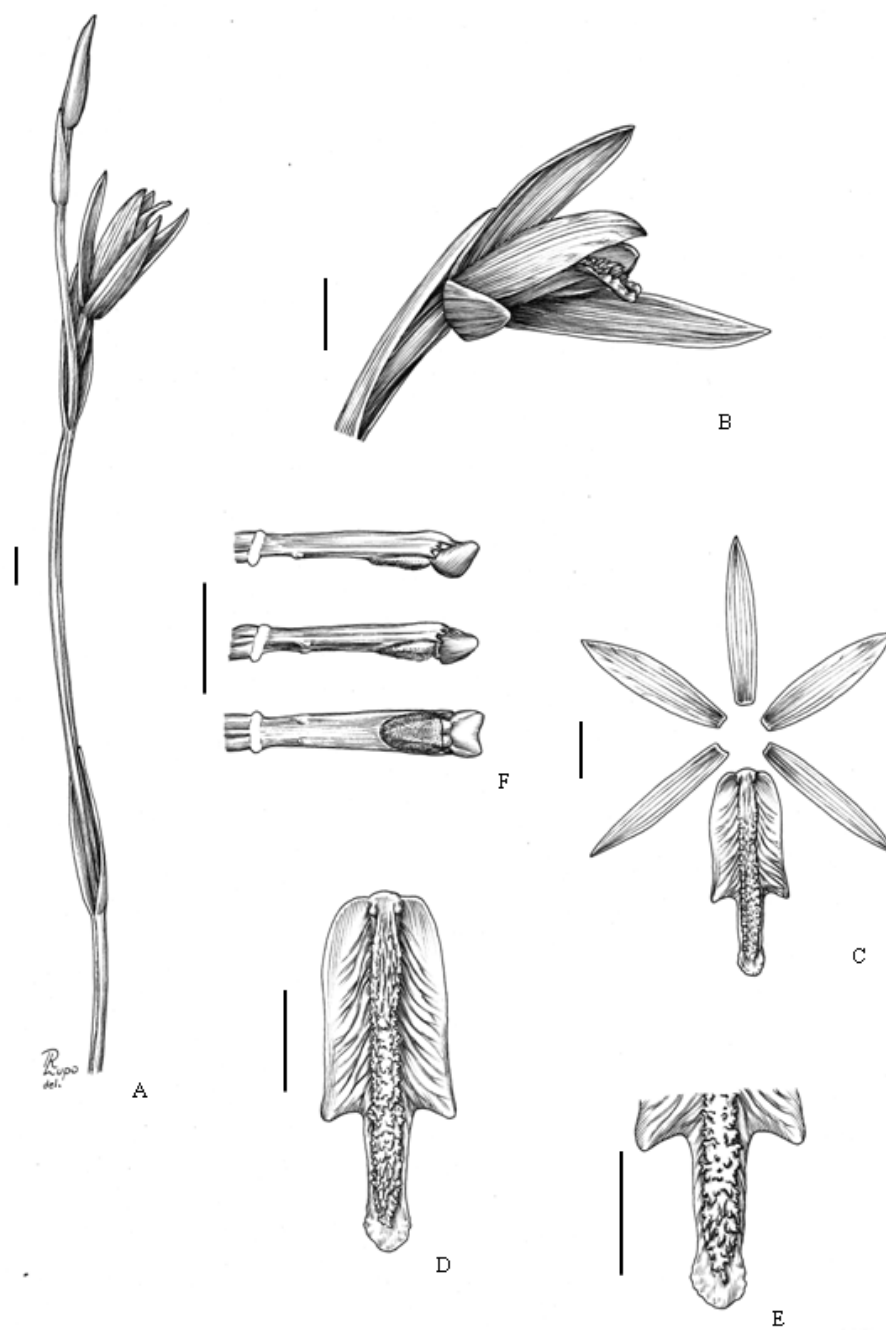


**Figura 14:** *Cleistes paranaensis* (Barb. Rodr.) Schltr. **A.** Hábito; **B.** Flor; **C.** Perianto; **D.** Labelo; **E.** Detalhe do ápice do labelo; **F.** Coluna em vistas lateral com antera desarticulada e ventral. Barras de escala: A-C = 2 cm; D-F = 1 cm. *L. Mickeliunas & E.R. Pansarin 31* (UEC).

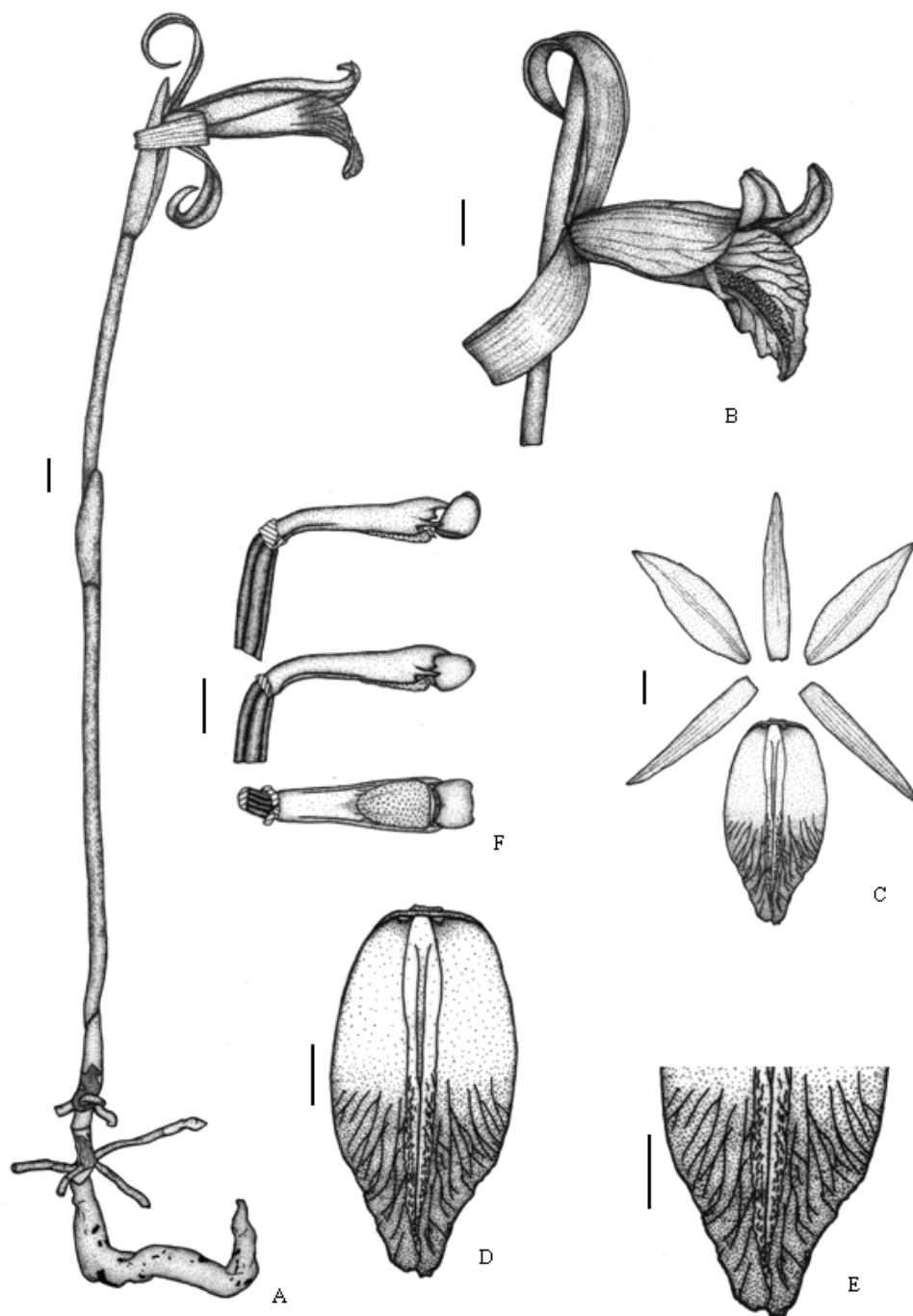


**Figura 15:** *Cleistes pusilla* Pansarin. A. Plântula; B. Planta em flor; C. Flor; D. Perianto; E. Labelo; F. Detalhe do ápice do labelo; G. Coluna em vistas lateral com antera articulada e ventral. Barras de escala: A-D = 1 cm; E-G = 5 mm. E.R.. Pansarin & L. Mickeliunas 922 (UEC).

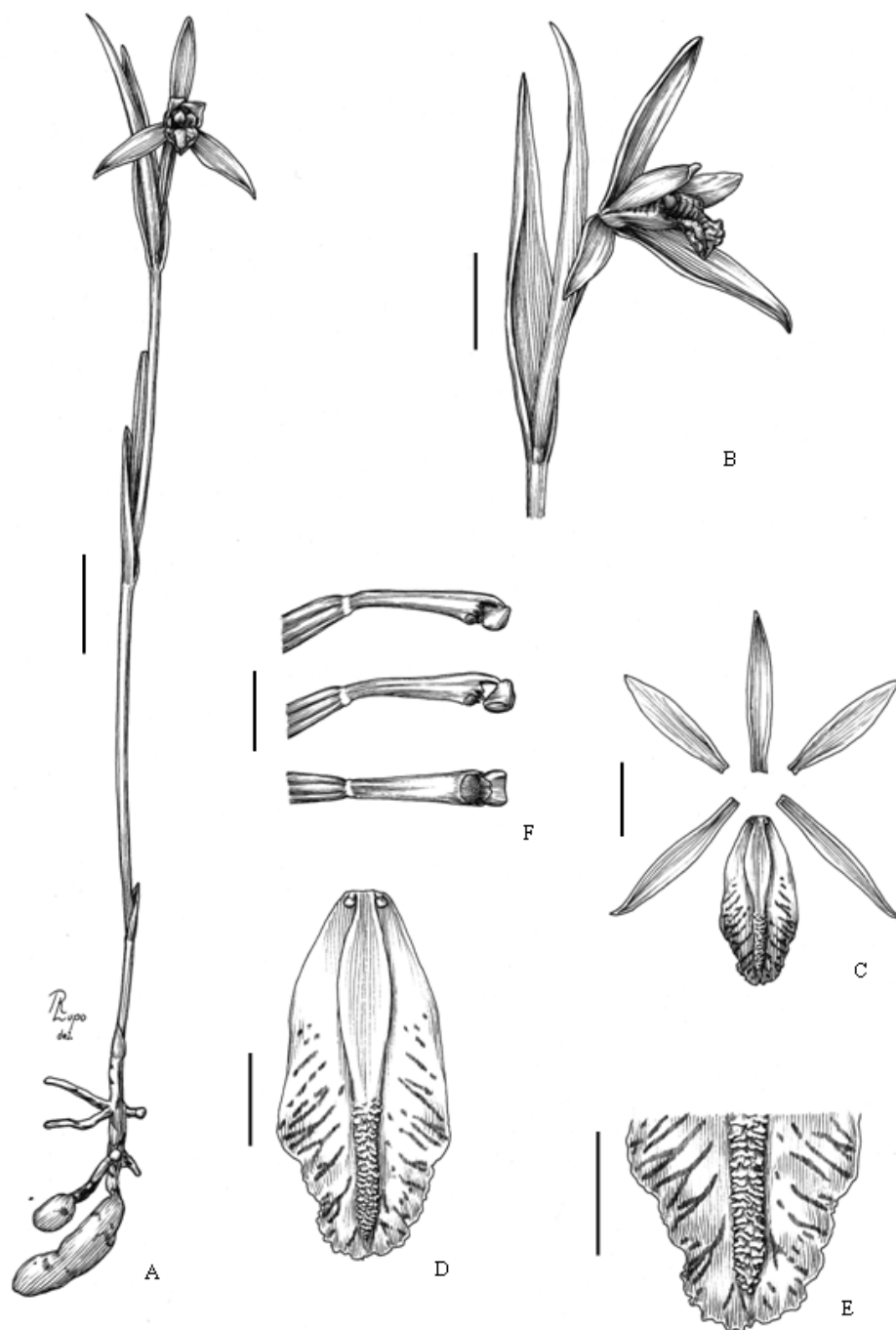




**Figura 16:** *Cleistes ramboi* Pabst. A. Hábito; B. Flor; C. Perianto; D. Labelo; E. Detalhe do ápice do labelo; F. Coluna em vistas lateral com antera desarticulada, lateral com antera articulada e ventral. Barras de escala: A-F = 1 cm. E.R. Fansarin & L. Michelunas 872 (UEC).



**Figura 17:** *Cleistes rosea* Lindl. A. Hábito; B. Flor; C. Perianto; D. Labelo; E. Detalhe do ápice do labelo; F. Coluna em vistas lateral com antera desarticulada, lateral com antera articulada e ventral. Barras de escala: A-F = 1 cm. E.R. Pansarin & L. Mickelionas 873 (UEC).



**Figura 18:** *Cleistes tenuis* (Rchb. f. ex Griseb.) Schltr. **A.** Hábito; **B.** Flor; **C.** Perianto; **D.** Labelo; **E.** Detalhe do ápice do labelo; **F.** Coluna em vistas lateral com antera articulada, lateral com antera desarticulada e ventral. Barras de escala: A = 2 cm; B-C = 1 cm; D-F = 5 mm. *E. R. Pansarin & L. Mickeliunas 890* (UEC).



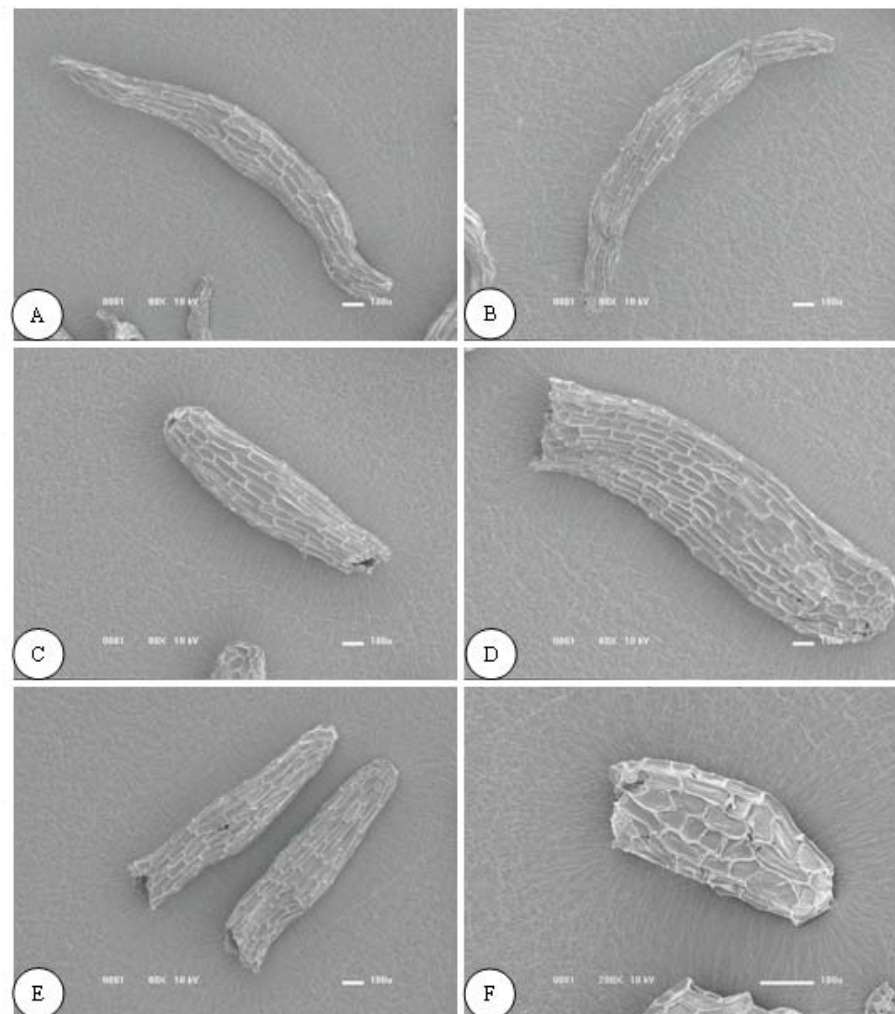
**Figura 19.** A. *Cleistes gracilis* (Barb. Rodr.) Schltr.; B. *C. rosea* Lindl.; C. *C. paranaensis* (Barb. Rodr.) Schltr.; D. *C. rosea* Lindl.; E. *C. libonii* (Rchb. f.) Schltr.; F. *C. metallina* (Barb. Rodr.) Schltr.



**Figura 20:** A. *Cleistes pusilla* Pansarin (hábito); B. *C. aphylla* (Barb. Rodr.) Schltr. (hábito); C. *C. pusilla* (flor); D. *C. aphylla* (flor); E. *C. moritzii* (Rchb. f.) Garay & Dunsterv.

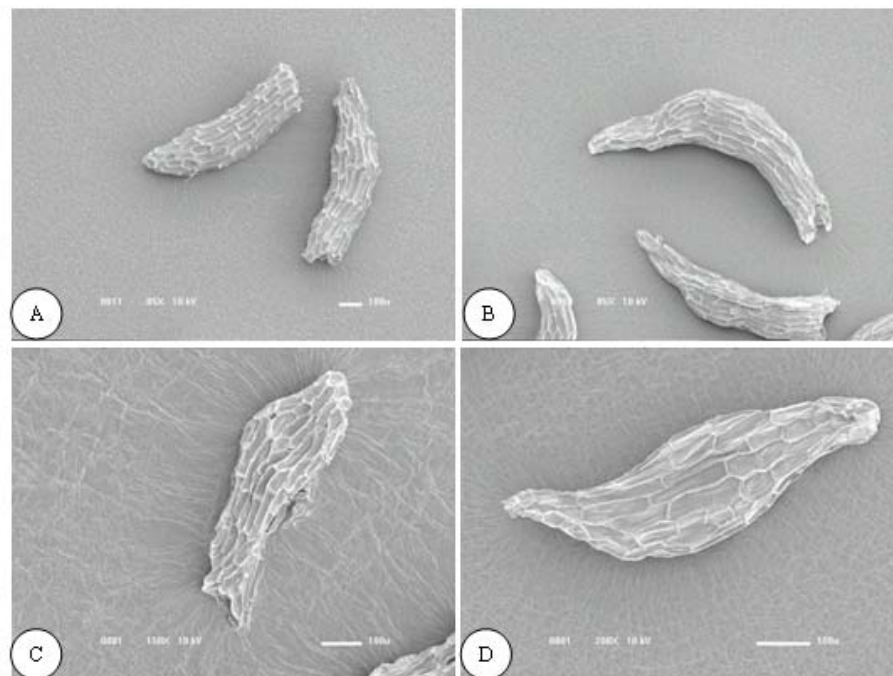


**Figura 21.** A. *Cleistes bella* Rchb. f. & Warm.; B. *C. exilis* Hoehne; C. *C. tenuis* (Rchb. f. ex Griseb.) Schltr.; D. *C. ramboi* Pabst; E. *C. elongata* Pansarin; F. *C. batistana* Pansarin.



**Figura 22:** Eletromicrografias obtidas em MEV de sementes de: **A.** *Cleistes gracilis* (Barb. Rodr.) Schltr.; **B.** *C. libonii* (Rchb. f.) Schltr.; **C.** *C. aff. macrantha* (Barb. Rodr.) Schltr.; **D.** *C. paranaensis* (Barb. Rodr.) Schltr.; **E.** *C. moritzii* (Rchb. f.) Garay & Dunsterv.; **F.** *C. aphylla* (Barb. Rodr.) Schltr. Barras de escala = 100µm.





**Figura 23:** Eletromicrografias obtidas em MEV de sementes de: **A.** *Cleistes exilis* Hoehne; **B.** *Cleistes metallina* (Barb. Rodr.) Schltr.; **C.** *C. tenuis* (Rchb. f. ex Griseb) Schltr.; **D.** *C. ramboi* Pabst. Barras de escala = 100 µm.





**Figura 24.** Mapa de distribuição de *Cleistes aphylla* (Barb. Rodt.) Hoehne.



**Figura 25.** Mapa de distribuição de *Cteistes batistozzi* Pansarin.



Figura 26. Mapa de distribuição de *Cleistes bella* Robb. f. & Warm.



**Figura 27.** Mapa de distribuição de *Cleistes elongata* Pansarin.



**Figura 28.** Mapa de distribuição de *Cleistes exilis* Hoehne.



**Figura 29.** Mapa de distribuição de *Cleistes gracilis* (Barb. Rodr.) Schltr.



**Figura 30.** Mapa de distribuição de *Cleistes grandiflora* (Aubl.) Schltr.



**Figura 31.** Mapa de distribuição de *Cleistes libonii* (Rohb. f.) Schltr.





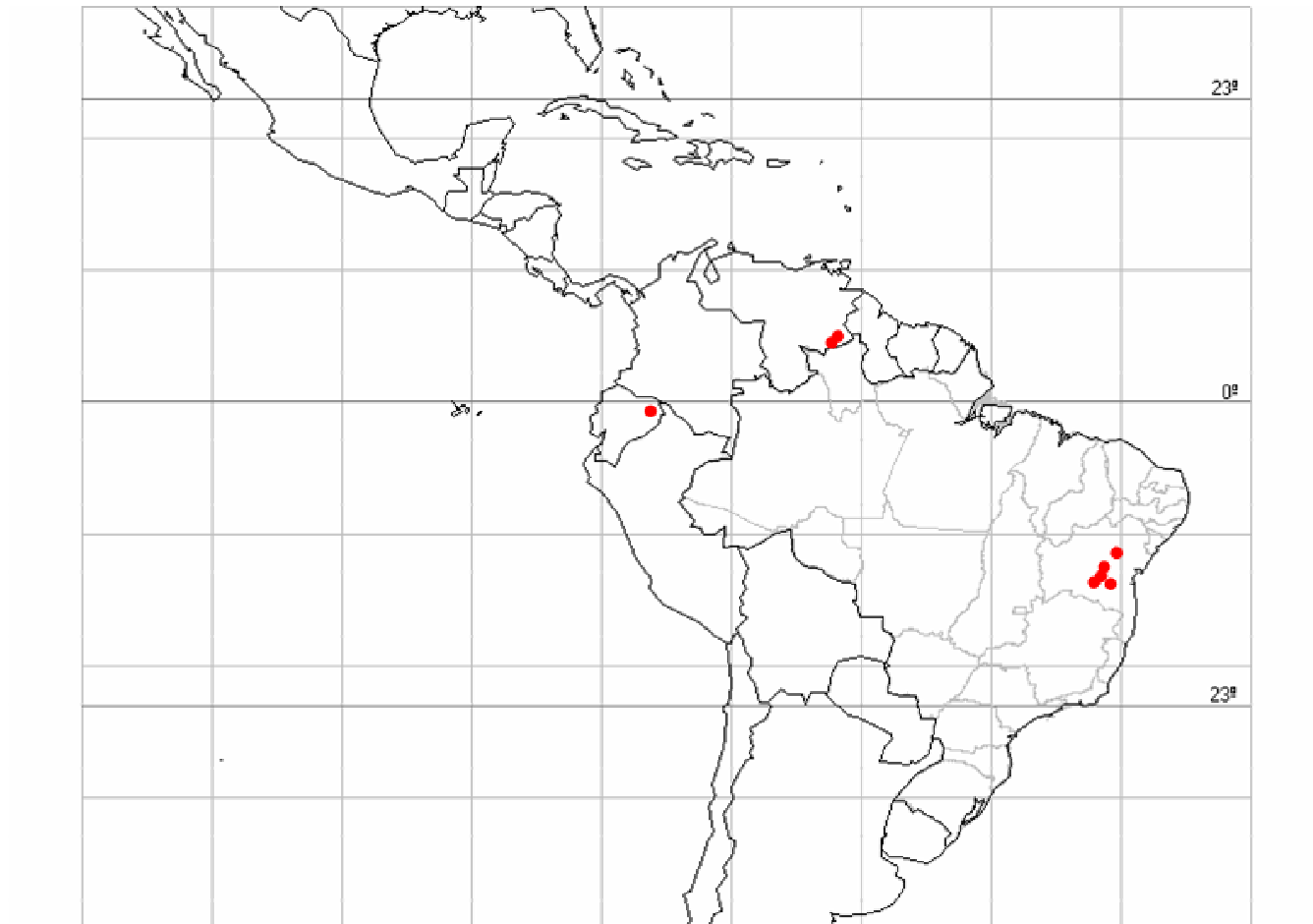
**Figura 32.** Mapa de distribuição de *Cleistes mantiqueirae* (Rehb. f. & Warm.) Schltr.



**Figura 33.** Mapa de distribuição de *Cleistes metallina* (Barb. Rodr.) Schltr.



**Figura 34.** Mapa de distribuição de *Cleistes montana* Gardn.



**Figura 35.** Mapa de distribuição de *Cleistes moritzii* (Rchb. f.) Garay & Dunsterv.



**Figura 36.** Mapa de distribuição de *Cleistes paranaensis* (Barb. Rodr.) Schltr.



**Figura 37.** Mapa de distribuição de *Cleistes pusilla* Pansarin



Figura 38. Mapa de distribuição de *Cleistes ramboi* Pabst.



**Figura 39.** Mapa de distribuição de *Cleistes rosea* Lindl.





**Figura 40.** Mapa de distribuição de *Cleistes stricta* (C. Schweinf.) Garay & Dunsterv.

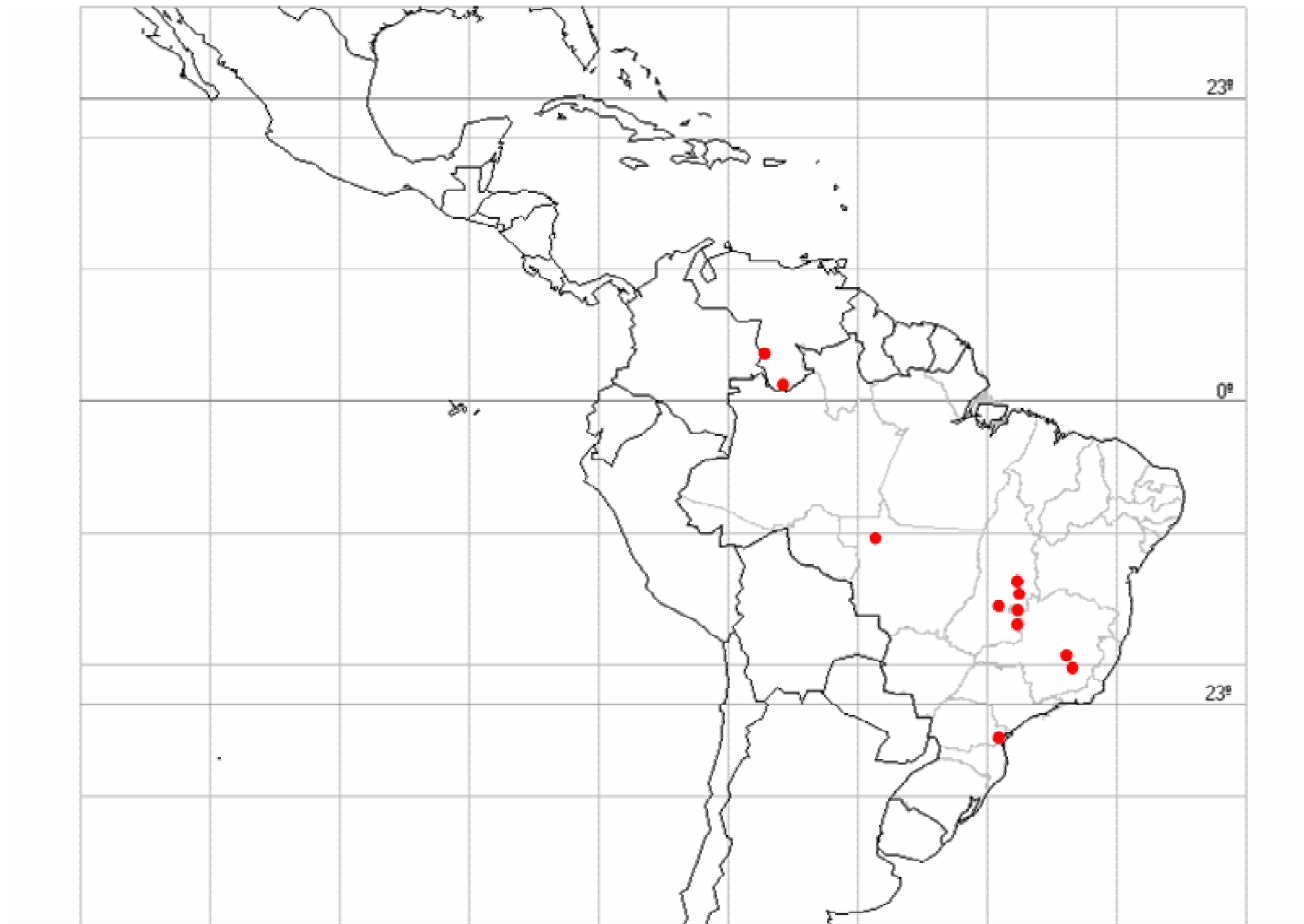


Figura 41. Mapa de distribuição de *Cleistes tenuis* (Rchb. f. ex Griseb.) Schltr.

## Capítulo 5

Publicado na *Kew Bulletin* (2004) 59: 555-558.

*Cleistes pusilla* (*Orchidaceae*): a new species from Central Brazil

**Emerson R. Pansarin**<sup>1</sup>

**Summary.** *Cleistes pusilla* Pansarin, a new species of *Orchidaceae*, is described and illustrated. The relationship of this new species to other taxa of the genus and the need to preserve the natural habitat of some *Cleistes* species are discussed.

**Resumo.** *Cleistes pusilla* Pansarin, uma nova espécie de *Orchidaceae*, é descrita e ilustrada. As relações da nova espécie com outros táxons do gênero, bem como a necessidade de conservação do habitat natural de algumas espécies de *Cleistes*, são discutidas.

### Introduction

The genus *Cleistes* Rich. ex Lindl. (*Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae*) comprises about 30 species distributed throughout Central and South America. According to Cameron & Chase (1999) and Pansarin *et al.* (unpubl. res.), *Cleistes* is paraphyletic. The North American species *C. divaricata* and *C. bifaria* are closer to the North American *Pogoniinae* genera *Isotria* and *Pogonia* than to the Central and South American *Cleistes*. The Central and South American species of *Cleistes* form a natural group (Cameron & Chase 1999). They are found in several habitats including disturbed areas on road margins, “campo limpo” (open grasslands), “campo sujo” (grassland with shrubs), “cerrado” (wooded savanna), “vereda” vegetation (wet grassland) in the Central Plateau, “restinga” (open seashore vegetation on sandy soil), sandy rocky soils or among rocks in “campos

---

<sup>1</sup> Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Cx. Postal 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil. email: epansarin@uol.com.br

*rupestres*” (vegetation of rocky outcrops), marshy areas and “*campos de altitude*” (high mountain grasslands). This new species, *Cleistes pusilla*, was found while preparing a taxonomic revision of the genus *Cleistes*.

### Material and methods

Fresh and herbarium material of flowering and fruiting plants were used for the description. Illustrations were based only on fresh material. The flowers and floral details were drawn using a stereomicroscope attached to a camera lucida. The terminology for the shapes of the leaves follows Harris & Harris (1994). The features specific to the *Orchidaceae* are based on Dressler (1993).

### Results and Discussion

***Cleistes pusilla* Pansarin sp. nov.** ab omnibus aliis speciebus sui generis caule gracili, foliis brevibus rectis et caulem adpressis, labello trilobato lobis lateralibus falcatis lobo intermedio rotundo cum marginibus undulatis distinguenda; a *C. aphylla* floribus roseis maioribus, labello roseo vinaceo-venulato, carina centrali papillis albis instructa, apice flavo dilatato et truncato differt. Typus: Brazil, Minas Gerais, Diamantina, estrada de terra que liga Diamantina a Conselheiro Mata, sentido Conselheiro Mata, ao lado direito da estrada, próximo ao Km 174, em campo alagado, 16 Jan. 2004, L. Mickeliunas & E. R. Pansarin 12 (holotypus UEC; isotypi CEN, SP, SPF).

Erect and slender herbs 9 – 30 (– 36) cm tall. Roots c. 0.5 mm in diameter, 3 – 4 (– 5) per plant, creamy, coated with brown trichomes. Tuberos roots 1.5 – 2.5 x 0.3 – 0.5 cm, oblong or conic, circular in transversal section, massive, creamy or brown, covered with light-brown trichomes. Aerial stem 0.5 – 1.3 mm in diameter, glabrous, glaucous, with 2 – 4 (– 6) leaves, one per node, sometimes in number of two on the apices. Leaves developed in sterile plants, reduced to scale-like leaves in flowering plants; leaves of sterile plants 30 – 50 x 8 – 10 mm, elliptic, erect and flat; leaves of flowering plants 3 – 9 x 1 – 2.5 mm, elliptic to ovate, erect, adpressed; apical leaves sometimes larger than the basal ones, linear

to narrowly elliptic. Inflorescences with 1 – 2 resupinate flowers, one per node. Flowers predominantly dark pink, with an abscission zone between flower and ovary; ovary and pedicel c. 1.1 – 2 cm long, dark green; sepals 15 – 20 (– 24) x 3 – 4 (– 4.5) mm, linear to narrowly elliptic, fleshy, with acute apex; petals 15 – 20 (– 23) x 3.5 – 5 (– 5.5) mm, oblanceolate to spatulate, membranous, with acute to acuminate apex; lip 15 – 20 (– 24) x 5 – 7 (– 7.5) mm, trilobate, light pink or white from base to middle portion and dark-pink from median portion to apex, with vinaceous veins; base with two spherical and white nectariferous glands up to 0.5 mm in diameter; central crest with white papillae; papillae with expanded and truncate yellow apices; lateral lobes falcate; apical lobe rounded, dark pink, with undulate margins. Column c. 1 – 1.3 (– 1.5) cm long, white; stigma ovate, smooth, covered with white-hyaline trichomes; anther pink, articulated with the apex of the column; pollinarium with two soft pollinia; pollinia c. 1.5 mm long, oblong, bipartite, yellow. Fruits c. 1.5 – 2.6 cm long, pedicel included, linear to oblong, dark green to green-purple. Seeds c. 0.5 – 0.7 mm long, fusiform, white. Fig. 1.

*Cleisthes pusilla* was collected in flower from December to February and with opened fruits from February to March.

**SPECIMENS EXAMINED: BRAZIL.** Goiás, Alto Paraíso de Goiás, estrada Alto Paraíso – São Jorge, a 10 Km da rodovia GO 118, sentido Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, 10 Jan. 2001, *Pansarin & Batista 752* (UEC); Alto Paraíso de Goiás, Rodovia GO 118, Km 157, sentido Alto Paraíso de Goiás, lado direito da pista, 6 Jan. 2002, *Pansarin & Mickeliunas 901* (UEC); Alto Paraíso de Goiás, sentido Teresina de Goiás, GO 118, Km 181, lado direito da pista, 4 Jan. 2003, *Pansarin & Mickeliunas 952* (UEC). Minas Gerais, Catas Altas, Serra do Caraça, Alto do Pico do Sol, Feb. 2002, *Pansarin & Mickeliunas 922* (UEC); Catas Altas, Santuário da Serra do Caraça, na trilha para o Pico do Sol, 19 Jan. 2004, *Mickeliunas & Pansarin 41* (UEC); Datas, estrada que liga Datas a Diamantina, sentido Diamantina, ao lado direito da pista, próximo ao Km 614, 15 Jan. 2004, *Mickeliunas & Pansarin s.n.* (UEC 134107); Diamantina, Jan. 1947, *Engler s.n.* (RB 59975); Diamantina, estrada para São João da Chapada, 29 Jan. 1986, *Menezes et al.*

CFCR<sup>2</sup> 9481 (SPF); Diamantina, estrada de terra que liga Diamantina a Conselheiro Mata, sentido Conselheiro Mata, ao lado direito da estrada, próximo ao Km 174, 16 Jan. 2004, *Mickeliunas & Pansarin 12* (UEC holotype; CEN, SP, SPF isotypes); Diamantina, estrada de terra que liga Diamantina a Conselheiro Mata, sentido Conselheiro Mata, ao lado esquerdo da estrada, próximo ao Km 170, 16 Jan. 2004, *Mickeliunas & Pansarin 22* (UEC); Diamantina, estrada de terra que liga Diamantina a Biribiri, sentido Biribiri, ao lado direito da estrada, próximo a ponte de um rio e uma placa para Biribiri, 17 Jan. 2004, *Mickeliunas & Pansarin 27* (UEC); Joaquim Felício, Serra do Cabral, Bocaina, 22 Nov. 1984, *Stannard et al. CFR 6299* (SPF); Itacolomi, Feb. 1982, *Ule s.n.* (R 3493); Santo Antonio do Itambé, campos no Pico do Itambé, 13 Feb. 2001, *Pansarin & Simões 815* (UEC); Inclinações orientais do Pico do Itambé, 1550 m de altitude; 12 Feb. 1972, *Anderson et al. 35840* (UB).

*Cleistes pusilla* grows in the “*campos de altitude*” vegetation of the Espinhaço Range (State of Minas Gerais), and “*vereda*” vegetation of the Central Plateau (State of Goiás). It occurs between 1100 – 2100 m alt., in dark and hydromorphic soils, among small grasses. Like several other species of the genus that grow in natural wet open grassland vegetation (e.g. *Cleistes aphylla* (Barb. Rodr.) Hoehne, *C. exilis* Hoehne and *C. tenuis* (Rchb. f. ex Griseb.) Schltr.), *C. pusilla* is threatened because this habitat has been almost completely destroyed by intense cultivation or establishment of pasture lands in Southern and Central-Western Brazil. Despite the creation of conservation areas in the Serra do Caraça and in parts of the Chapada dos Veadeiros, and Pico do Itambé, many regions in Diamantina and others, in the Chapada dos Veadeiros, are being transformed into pastures. Areas of natural vegetation in these regions are a priority for conservation.

*Cleistes pusilla* may be readily identified by its small and slender aerial stem with few reduced leaves, its pink flowers, usually one or two per plant, its lip with falcate lateral lobes and rounded apical lobe with undulate margins, and its central crest made up of white papillae with expanded and truncate yellow apices. Because of its small and slender stem with reduced and scale-like leaves, *C. pusilla* was frequently misnamed as *C. aphylla*. *Cleistes aphylla* occurs mainly in “*vereda*” vegetation near areas where “*buriti*” (palm swamp, *Mauritia flexuosa* L.) predominate in the Chapada dos Veadeiros, in the Central

---

<sup>2</sup>CFCR: “Coleção Flora de Campos Rupestres” (Collection Flora of the Rocky Fields)

Plateau, and more rarely in the Espinhaço Range (Southeastern) and in the South Brazil. *Cleistes pusilla* sometimes occurs together with *C. aphylla* and other species of the genus, such as *C. exilis* and *C. tenuis*.

*Cleistes aphylla* differs from *C. pusilla* in its delicate cream-white flowers, in the white-hyaline lip with very small yellow trichomes in the central crest, in the lack of dark veins, in the triangular to acute apical lobe, very close to the lateral ones, and in the lateral lobes that are truncate to slightly falcate with acute apices.

Like all the Central and South American species of *Cleistes*, *C. pusilla* has tuberous roots adapted for nutrient storage. The presence of tuberous roots is a synapomorphy of the genus (Pansarin *et al.*, unpubl. res.).

*Cleistes pusilla* belongs to the same section as *C. aphylla*. Hoehne (1940) suggested nine sections (as species alliances) for the genus *Cleistes*. In their treatment of the Brazilian *Orchidaceae*, Pabst & Dungs (1977) followed basically the same species alliances proposed by Hoehne (1940). According to Hoehne (1940) and Pabst & Dungs (1977), all members of the *C. aphylla* alliance, as is the case of *C. pusilla*, have slender and reduced stems with scale-like leaves and generally few small flowers.

The flowers of *Cleistes pusilla* only last one day, opening in the morning and wilting in the afternoon. *Cleistes pusilla* has three or four flowering peaks, when the mature buds of all the individuals in a population open on the same day. These flowering peaks occur at intervals of seven to 21 days. Such flowering peaks occur in all species of *Cleistes* (Pansarin unpubl. res), and have also been reported for some basal Epidendroids, like *Triphora trianthophora* (Sw.) Rydb. (Medley 1979) and *Psilochilus modestus* Barb. Rodr. (Pansarin 2000). This combination of one-day flowers and one-day flowering peaks in the species of *Cleistes* (Pansarin 2003) and some basal Epidendroids (Medley 1979, Pansarin 2000) may be a strategy favoring cross-pollination.

### **Acknowledgements**

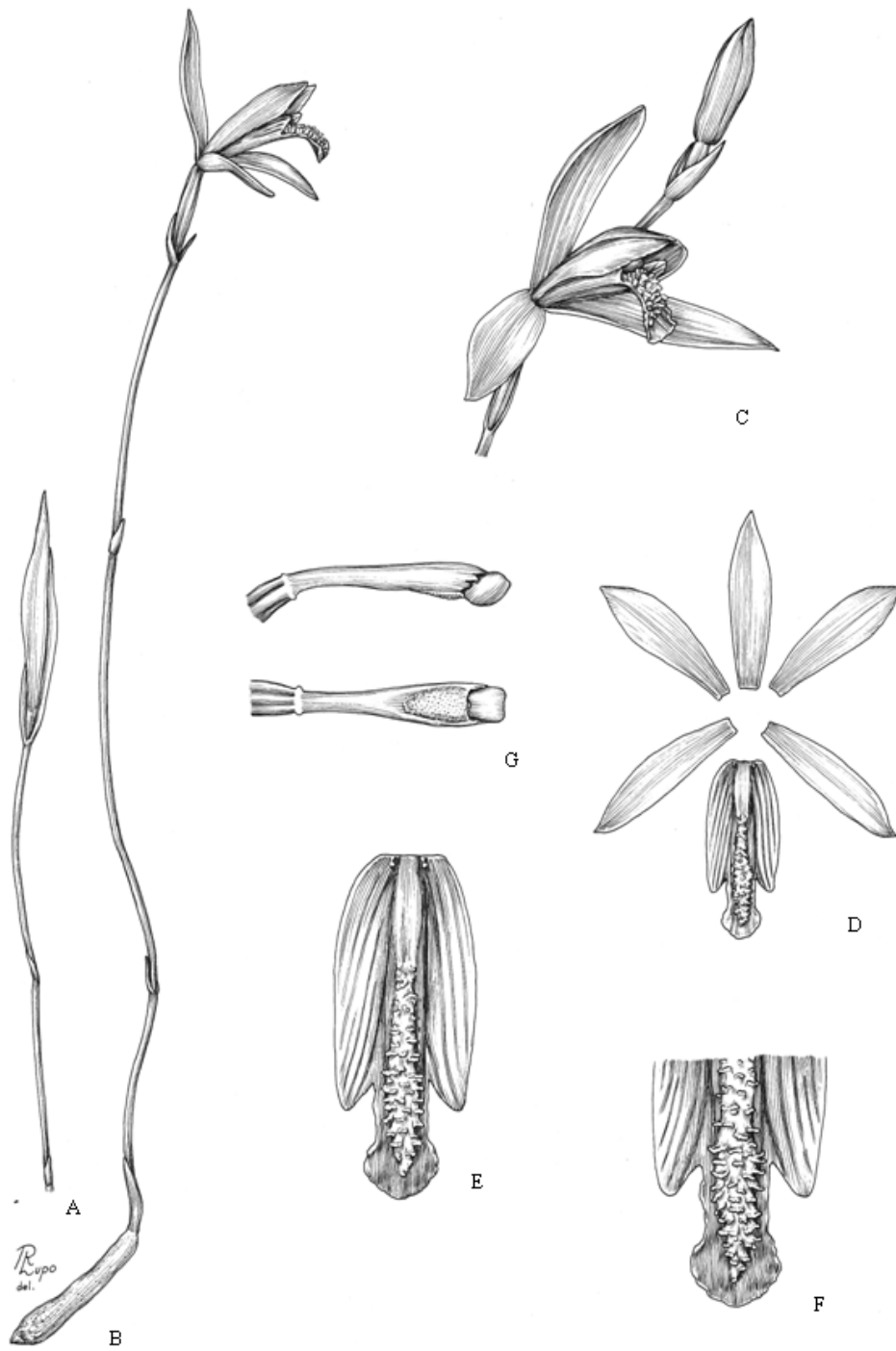
The author thanks the Curators of the Herbaria SPF, R, RB and UB for specimen loans, Marlies Sazima and Fábio de Barros for suggestions, Alain François for English correction, and Pe. Lauro Palú who improved the Latin diagnosis. This study is part of the

Doctoral thesis of the author at the Department of Botany, Post-graduation in Plant Biology, Campinas State University, São Paulo, Brazil. Financial support was provided by FAPESP (process number 00/11015-9).

## References

- Cameron, K. M. & Chase, M. W. (1999). Phylogenetic relationships of *Pogoniinae* (*Vanilloideae*, *Orchidaceae*): an herbaceous example of the eastern North America – eastern Asia phytogeographic disjunction. *J. Plant Res.* 112: 317 - 329.
- Dressler R. L. (1993). *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Harris, J. G. & Harris, M. W. (1994). *Plant identification terminology: an illustrated glossary*. Spring Lake Publishing, Utah.
- Hoehne, F. C. (1940). *Orchidaceae*. In: F. C. Hoehne (ed.), *Flora Brasílica*. Vol. 12. Fasc. 1, p. 1 – 254, tab. 1-153. Instituto de Botânica, São Paulo.
- Medley, M. E. (1979). Some aspects of the life story of *Triphora trianthophora* (Sw.) Rydb. (Three birds orchid) with reference to its pollination. MD Thesis, St Andrews University, St Andrews.
- Pabst, G. F. & Dungs, F. (1977). *Orchidaceae Brasiliensis*. Vol. 2. Kurt Schmiersow: Hildeshein.
- Pansarin, E. R. (2000). *Biologia reprodutiva e morfologia floral de espécies de Orchidaceae em diferentes ambientes no Estado de São Paulo*. MS Thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Pansarin, E. R. (2003). *Biologia floral de Cleistes macrantha* (Barb. Rodr.) Schltr. (*Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae*). *Revista Brasil. Bot.* 26: 73 – 80.





**Fig. 1.** *Cleistes pusilla*: **A** sterile plant x 1.5; **B** flowering plant showing a tuberous root, the aerial stem with two apical leaves, the ovary, and a flower on the apex x 1.5; **C** flower x 2; **D** perianth parts x 1.5; **E** lip x 2.5; **F** apex of the lip in detail showing the lateral and apical lobes and part of central crest x 3; **G** column in lateral and ventral view x 2.2. **A** from *L. Micheliumas & E. R. Pansarin 41*; **B - G** from *E. R. Pansarin & L. Micheliumas 922*. Drawn by the author and inked by R. Lupo.

## Capítulo 6

**Formatado de acordo com as normas da Botanical Journal of the Linnean Society**

**Epicuticular waxes in *Cleistes* Rich. ex Lindl. (Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae): micromorphology and chemical compounds**

EMERSON R. PANSARIN & ALBERTO S. PEREIRA

### ABSTRACT

Micromorphology of epicuticular waxes of leaves of 13 species of genus *Cleistes* Rich. ex Lindl. (Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae) were studied under scanning electron microscopy (SEM). For eleven species the chemical compounds of the epicuticular waxes were identified by gas chromatography. The studies were based on individuals of native populations occurring in South, Southeastern, Northeastern and Central-Western Brazil. The micromorphology of the epicuticular waxes varied from a single film until parallel stacked platelets. A positive correlation between micromorphology of waxes and environmental adaptations and certain morphological characters were observed. Some few chemical compounds were common for all analyzed species and seem to be characteristic of the genus. The majority of the identified substances, therefore, was specific for each analyzed species, and should be used for taxa delimitation within *Cleistes*. The presence of stomata at the adaxial surfaces of the leaves is variable and should also be used in *Cleistes* species delimitation.

**ADDITIONAL KEY WORDS:** chemotaxonomy - wax chemistry - wax micromorphology - wax ultrastructure.

## INTRODUCTION

Orchidaceae includes about 19,500 native species, being divided in five subfamilies (Dressler, 1993). Although, in recent molecular and morphological studies, the number of subfamilies is maintained, their arrangement presents modifications in relation to Dressler's (1993) classification (Cameron *et al.*, 1999; Freudenstein & Rasmussen, 1999; Freudenstein *et al.*, 2000). Vanilloid orchids (i.e., subfamily Vanilloideae; Cameron *et al.*, 1999; Freudenstein & Rasmussen, 1999; Freudenstein *et al.*, 2000; Cameron, 2004) are composed by three subtribes (Vanillinae, Galeoliinae and Pogoniinae), 15 genera and about 175 species (Cameron *et al.*, 1999). Vanillinae is the largest subtribe and includes the genus *Vanilla* with about 90 species. *Vanilla* is of interest of non-botanists because *V. planifolia* is a natural source of the flavoring vanillin (Correll, 1953). The second major subtribe within vanilloid orchids is Pogoniinae. According to Dressler (1993) and Cameron *et al.* (1999) Pogoniinae includes five genera. Recent molecular and morphological studies, however, reports *Pogoniopsis* as closely related to *Galeola* and *Cyrtosia*, being its placement in subtribe Galeoliinae more adequate (Pansarin *et al.*, in prep.). *Duckeella*, a genus considered as sister of all remaining Pogoniinae (Cameron & Chase, 1999; Cameron *et al.*, 1999), according to recent studies (Pansarin *et al.*, in prep.) should be placed in the subtribe Duckeellinae, as proposed previously by Szlachetko (1995). The genus *Cleistes* is paraphyletic. The North American *C. divaricata* and *C. bifaria* are more related to North American-Asiatic genera *Isotria* and *Pogonia* than South and Central American *Cleistes* (Cameron & Chase, 1999; Cameron *et al.*, 1999; Pansarin *et al.*, in prep.). The South and Central American species of *Cleistes* form a monophyletic group (Cameron & Chase, 1999; Cameron *et al.*, 1999; Pansarin *et al.*, in prep.). The genus *Cleistes* includes about 20 species (Pansarin & Barros, in prep.). The center of diversity for the genus *Cleistes* is the Central Brazil (Hoehne, 1940). The remaining genera within Pogoniinae are very small or monotypic (Cameron, 1999).

Characters of micromorphology of epicuticular waxes can be very important in the species delimitation of the genus *Zelkova* (Wang *et al.*, 2001) and in several other families of flowering plants (see Jeffree, 1986 and Barthlott, 1998). Epicuticular waxes are composed of a large mixture of different chemical compounds. They comprise cyclic and long-chain aliphatic components that further can be classified according to their structure,

functional groups and by the distribution of their homologues (Barthlott *et al.*, 1998). Chemical compositions of epicuticular waxes sometimes are used in environmental (e.g., Vioque *et al.*, 1994, 1995) and chemotaxonomical studies (e.g., Eglinton *et al.*, 1962; Tulloch, 1981; Cowlshaw *et al.*, 1983; Salasoo, 1988, 1989; Avato *et al.*, 1990; Vioque *et al.*, 1994, 1995). The shape of epicuticular waxes depends on their chemical composition and the dominant wax compounds are usually considered to be responsible for formation of crystalloids (review in Barthlott *et al.*, 1998). Thus, epicuticular wax can be classified by mean of their chemical composition and the compounds can be used to define systematically significant wax types (Baum *et al.*, 1988; Meusel *et al.*, 1994; Barthlott & Theisen, 1995).

In this study we report a micromorphological study of epicuticular waxes of 13 *Cleistes* species occurring in South, Southeastern, Central-Western and Northeastern Brazil: *C. aphylla* (Barb. Rodr.) Hoehne, *C. bella* Rchb. f. & Warm., *C. aff. caloptera* Rchb. f. & Warm., *C. castanoides* Hoehne, *C. cipoana* Hoehne, *C. exilis* Hoehne, *C. gracilis* (Barb. Rodr.) Schltr., *Cleistes libonii* (Barb. Rodr.) Schltr., *C. metallina* (Barb. Rodr.) Schltr., *C. paranaensis* (Barb. Rodr.) Schltr., *C. pusilla* Pansarin, *C. tenuis* (Rchb. f. ex Griseb.) Schltr., and *C. ramboi* Pabst. Analyzes of chemical compounds of eleven species were also performed. The studied species comprehend all habitat diversity observed for the genus (Pansarin, 2004). The ultrastructure of epicuticular waxes were compared with chemical compounds identified in analyzes. The micromorphological and chemical characters were used to discuss aspects of habitat diversity and systematics in the genus *Cleistes*.

## MATERIAL AND METHODS

### *Study sites and plant materials*

For the study of epicuticular waxes of *Cleistes* the leaves were collected from dried specimens (SEM study) or from natural populations (chemical analyzes). The species occur in “vereda” vegetation (wet camps) in the Chapada dos Veadeiros, in Central-Western (Goiás state), “campos de altitude” (high mountain grasslands) in South (Paraná state), Southeastern (Minas Gerais and São Paulo states) and Northwestern (Bahia state), “campo

limpo" (open grasslands) and "campo sujo" (grassland with shrubs) adjacent to "cerrado" vegetation (wooded savanna), in Southeastern (Minas Gerais state). The leaves were taken from the median portion of the aerial stem during the flowering period of each species. Vouchers are deposited at the herbarium of Universidade Estadual de Campinas (UEC). The sites and coordinates of the studied species are summarized in table 1.

### *SEM study*

The SEM study of the epicuticular waxes was based on fragments of abaxial and adaxial surfaces of leaves of the South American species of the genus *Cleistes*. The material was obtained from dried specimens collected in the field or housed in UEC and CEN herbaria. For each analyzed species were performed a minimum of three repetitions, using different herbaria specimens and, preferentially, collected on distinct localities. The analyzed species, recorded data and vouchers are listed in Table 1. The study of characters of epicuticular waxes was realized using a Jeol 5800 LV scanning electron microscope. For SEM analysis small pieces of leaves of the studied specimens were placed in aluminum SEM stubs by double-sided adhesive tape and directly sputter-coated with gold-palladium alloy. The specimens were examined and photographed at acceleration voltage of 10 kv and an average distance of 10-20 mm. The descriptions and measurements were made from the direct micrograph using the corresponding scale bar and magnification value for standardization. The terminology used for epicuticular waxes characterization followed Barthlott *et al.* (1998). For all studied specimens were recorded the presence of stomata on both adaxial and abaxial surfaces of the leaves.

### *Extraction, purification and chemical study of epicuticular waxes*

For extraction of waxes, fresh leaves of species of *Cleistes* were dipped in dichloromethane and shake at ambient temperature for 2 min. The dichloromethane was evaporated using N<sub>2</sub> at room temperature, the extract was derivatized using 100 µL of BSTFA (Sigma), and derivatization was performed at 40 °C by 30 min.

The analyses were performed in a gas chromatographer coupled to mass spectrometer HP-5972 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) and a capillary column HP-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm; Agilent, Palo Alto, CA, USA). The injection volume was 1 µL in split 1:20. The

temperature program was 40 °C / 5 min heating at 8 °C / min up to 350 °C / 30 min. The mass spectrometer was setting in electron impact (EI) at 70 eV and mass range 40 up 700 Daltons.

## RESULTS

### *Micromorphology of epicuticular waxes and stomata*

Species of *Cleistes* present scale-like to evident leaves, and spirally disposed along of the aerial stem. The leaves are sessile, generally erect and adpressed or patent, and glaucous due to the presence of epicuticular waxes. The epicuticular waxes in *Cleistes* varied from single film to parallel stacked platelets (see Figs 1-24). The stomata are anomocytic and sometimes absent at the adaxial surface of the leaf, which depends on the species. The specific differences in the habitat, leaf characteristics, stomata distribution and wax ornamentation are summarized in table 2.

### *Chemical composition of the epicuticular waxes*

The epicuticular waxes of the genus *Cleistes* are constituted mainly by alkyl acids, alkanes and alcohols. Alkyl esters are substances found mainly in *Cleistes exilis* and *C. metallina*, but also detectable in small proportions in *C. bella* and *C. ramboi*. Sterols are present in small quantities in *C. castanoides* and *C. tenuis*. The chemical compounds of the epicuticular waxes of the *Cleistes* species are given in appendix 1.

The major constituents of waxes of *Cleistes aphylla* are alcohols, but alkyl acids are presents in considerable proportions. The major compounds of the epicuticular wax of *C. aphylla* are the alcohols hexacosanol and octacosanol. As in *C. aphylla*, the main constituents of waxes of *C. bella*, are alcohols, with alkyl acids present as second major group of substances. The major compound of the epicuticular wax of *C. bella* is the alcohol octacosanol, but the alcohols hexacosanol and de alkyl acid octacosanoic are present in considerable quantities. In *C. aff. caloptera* the principal constituents are alkyl acids. The main compounds of *C. aff. caloptera* are the alkyl acids hexadecanoic, octadecanoic and tetradecanoic. The epicutular wax of *C. castanoides* is composed mainly by alkyl acids, principally by hexadecanoic and octadecanoic. The alcohol octacosanol is present in

considerable proportions in the wax of *C. castanoides*. *C. exilis* presents mainly alcohols as constituents of the wax, but several alkyl acids and the alkyl ester eicosanoic eicosyl are present in considerable concentrations. The major constituents of *C. exilis* are alcohols hexacosanol and octacosanol and the alkyl alcohol octacosanoic is present in considerable proportions. The epicuticular wax of *C. gracilis* is composed mainly by a combination of several alkanes. Same alkyl acids, however, are present in lower concentrations. The epicuticular waxes of *C. metallina* are composed by a combination of several alkyl acids, mainly exadecanoic, octadecenoic and octadecanoic, several alkanes and alkyl esters. The epicuticular wax of *C. paranaensis*, *C. pluriflora* e *C. tenuis* are composed mainly by the alkyl acids hexadecanoic and octadecanoic. In *C. ramboi*, the epicuticular wax presents predominantly the alcohol hexacosanol as constituent, but some alkanes are present in low concentrations.

## DISCUSSION

The ultrastructure of epicuticular waxes within the genus *Cleistes* varied from a single film to non entire platelets. In *C. castanoides* and *C. paranaensis* the epicuticular waxes varied from a film to platelets. Species with scale-like leaves presented epicuticular waxes less ornate than species with evident leaves. Species with well-developed leaves generally presented platelets, a structure similar to other monocotyledons, as in *Musa* (Freeman & Turner, 1985), and others liliiflorous families (Barthlott *et al.*, 1998). Epicuticular waxes influence foliar absorption and water loss (Freeman & Turner, 1985), and decreasing relative humidity stimulates wax production (Baker, 1974; Grout, 1975). Additionally, Vioque *et al.* (1994) reported that taxa growing at a low luminosity caused by the dense vegetation or in regions with high rainfall presents the lowest values of total waxes relative to dry weight. This fact is corroborated for *C. libonii* that presents well-developed leaves, but occurs exclusively in the Atlantic Rain Forests, where the relative humidity is higher than "cerrado" vegetation. In *Cleistes* species growing in grasslands, in "cerrado" vegetation, with great incidence of solar radiation and well developed leaves (e.g., *Cleistes castanoides*, *C. bella* and *C. paranaensis*), the presence of platelets forming epicuticular waxes can result in diminishes the evaporating water loss. Whilst changes in leaf wax

ultrastructure were not linked to obvious chemical differences, the variations between the species of *Cleistes* were more associated with variations in wax micromorphology. Wax chemistry composition of wax of *Cleistes* species were predominantly alkyl acids, alkanes and alcohols, all constituents common for other groups within monocotyledons (e.g., Freeman & Turner, 1985; Avato *et al.*, 1990; Meusel *et al.*, 1995; Barthlott *et al.*, 1998). Jeffree *et al.* (1975) considered that competition of certain wax mixtures may occur among constituents for expression of their typical morphologies. Thus, relative changes in the proportions of chemical groups in the wax mixtures among the studied species may be influencing factors in determining gross ultrastructure. Primary alcohols, as reported for species of *Cleistes* are correlated with the formation of platelets. Although studies of epicuticular waxes in Orchidaceae is lacking, this is confirmed for many monocotyledons as members of Poaceae and various taxa of different plant families of flower plants (review in Jeffree, 1986). Individual chemical compounds can be represented by specific structural forms, but when mixed together these can change with the predominant group, often influencing the structural form of minor groups (Barthlott *et al.*, 1998). The dominating constituents may be responsible for a particular ultrastructure of the epicuticular wax. The chemical compounds of epicuticular waxes in *Cleistes* fail in the correlation with environment and wax micromorphology, but are useful in taxa delimitation within *Cleistes*. Chemosystematics, using epicuticular surfaces of leaves, although poorly used in taxa delimitation in Orchidaceae, have been reported for several genera in a variety of plant groups (Eglinton *et al.*, 1962; Tulloch, 1981; Cowlshaw *et al.*, 1983; Salasoo, 1988, 1989; Avato *et al.*, 1990; Vioque *et al.*, 1994, 1995; Barthlott *et al.*, 1998).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ludmila Mickeliunas and João A.N. Batista, for help in the fieldwork. We thank Antonia Lima and Adriane Sprogis for assistance in SEM analyzes. This study is part of a PhD thesis by the first author for the `pós-graduação` course in Plant Biology at the 'Universidade Estadual de Campinas' (São Paulo, Brazil). Essential financial support was provided by FAPESP (grant 00/11015-9) and CNPq, which is gratefully acknowledged.



## REFERENCES

- Avato P, Bianchi G, Pogna N. 1990.** Chemosystematics of surface lipids from maize and some related species. *Phytochemistry* **29**: 1571-1576.
- Baker EA. 1974.** The influence of environment on leaf wax development in *Brassica oleracea* var. *gemmifera*. *New Phytologist* **73**: 955-966.
- Barthlott W, Theisen I. 1995.** Epicuticular wax ultrastructure and classification of Ranunculiflorae. *Plant Systematics and Evolution (Suppl.)* **9**: 39-45.
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H. 1998.** Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* **126**: 237-260.
- Baum BR, Tulloch AP, Bailey LG. 1989.** Epicuticular waxes of the genus *Hordeum*: a survey of their chemical composition and ultrastructure. *Canadian Journal of Botany* **67**: 3219-3226.
- Cameron KM. 1999.** Phylogeny and biogeography of Pogoniinae (Vanilloideae: Orchidaceae). *North American Native Orchid Journal* **5**: 151-163.
- Cameron KM. 2004.** Utility of plastid gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 1157-1180.
- Cameron KM, Chase MW. 1999.** Phylogenetic relationships of Pogoniinae (Vanilloideae, Orchidaceae): an herbaceous example of the eastern North America – eastern Asia phytogeographic disjunction. *Journal of Plant Research* **112**: 317-329.
- Cameron KM, Dickison WC. 1998.** Foliar architecture of vanilloid orchids: insights into the evolution of reticulate leaf venation in monocotyledons. *Botanical Journal of the Linnean Society* **128**: 45-70.
- Cameron KM, Chase MW, Whitten WM, Kores PJ, Jarrell DC, Albert VA, Yukawa T, Hills HG, Goldman DH. 1999.** A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *American Journal of Botany* **86**: 208-224.
- Correll DS. 1953.** *Vanilla* – Its botany, history, cultivation and economic import. *Economic Botany* **7**: 291-358.

- Cowlishaw MG, Bickerstaffe R, Young H. 1983.** Epicuticular wax of four species of *Chionochoa*. *Phytochemistry* **2**: 119-124.
- Dressler RL. 1993.** *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Eglinton G, Gonzalez AG, Hamilton RJ, Raphael RA. 1962.** Hydrocarbon constituents of the wax coatings of plant leaves: a taxonomic survey. *Phytochemistry* **1**: 89-102.
- Freeman B, Turner DW. 1985.** The epicuticular waxes on the organs of different varieties of banana (*Musa* spp.) differ in form, chemistry and concentration. *Australian Journal of Botany* **33**: 393-408.
- Freudenstein JV, Rasmussen FN. 1999.** What does morphology tell us about orchid relationships? – a cladistic analysis. *American Journal of Botany* **86**: 225-248.
- Freudenstein JV, van den Berg C, Goldman DH, Kores PJ, Molvray M, Chase MW. 2004.** An expanded plastid DNA phylogeny of Orchidaceae and analyses of Jackknife branch support strategy. *American Journal of Botany* **91**: 149-157.
- Grout BWW. 1975.** Wax development on leaf surfaces of *Brassica oleracea* var. Currawong, regenerated from meristem culture. *Plant Sci. Lett.* **5**: 401-405.
- Hoehne FC. 1940.** Orchidaceae. In Hoehne FC, ed. *Flora Brasílica*. Vol. 12, Fasc. 1. São Paulo: Instituto de Botânica, 1-254.
- Jeffree CE. 1986.** The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, functions and evolution. In Juniper BE, Southwood SR, eds. *Insects and the plant surface*. London: Edward Arnold, 23-63.
- Jeffree CE, Baker EA, Holloway PJ. 1975.** Ultrastructure and recrystallization of plant epicuticular waxes. *New Phytologist* **75**: 539-549.
- Meusel I, Leistner E, Barthlott W. 1994.** Chemistry and micromorphology of compound epicuticular wax crystalloids (*Strelitzia* type). *Plant Systematics and Evolution* **193**: 115-123.
- Pansarin ER. 2004.** *Cleistis pusilla* (Orchidaceae): a new species from Central Brazil. *Kew Bulletin* **59**: .
- Salasoo I. 1988.** Epicuticular wax hydrocarbons of Ericaceae in Pacific Northwest of U.S.A. *Biochemical Systematics and Ecology* **16**: 619-622.

- Salasoo I. 1989.** Epicuticular wax hydrocarbons of Ericaceae in British Columbia. *Biochemical Systematics and Ecology* **17**: 381-384.
- Szlachetko DL. 1995.** Systema Orchidarium. *Fragmenta floristica et geobotanica supplementum* **3**: 1-152.
- Tulloch AP. 1981.** Composition of epicuticular waxes from 28 genera of Gramineae: differences between subfamilies. *Canadian Journal of Botany* **59**: 1213-1221.
- Vioque J, Pastor JE, Vioque E. 1994.** Leaf waxes in *Coincya* Rouy (Brassicaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **114**: 147-152.
- Vioque J, Pastor JE, Vioque E. 1995.** Fatty acids of leaf wax esters in *Coincya* Rouy (Brassicaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **118**: 69-76.
- Wang Y, Ferguson DK, Zetter R, Denk T, Garfi G. 2001.** Leaf architecture and epidermal characters in *Zelkova*, Ulmaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **136**: 255-265.

Table 1. Specimens of the genus *Cleistes* analyzed in both SEM and chemical studies, their locations, coordinates and voucher numbers. Empty cells = data absence.

Species	Location	Coordinate	Collected data	Voucher
<i>C. aphylla</i>	Teresina de Goiás - GO	13°36'S 47°13'W	SEM chemical	<i>Pansarin &amp; Mickeliunas 899</i> (UEC)
<i>C. bella</i>	Brasília - DF	15°35'S 47°30'W	SEM	<i>Pansarin &amp; Batista 758</i> (UEC)
<i>C. bella</i>	Serra do Cipó - MG	19°17'S 43°35'W	chemical	<i>Pansarin &amp; Mickeliunas 921</i> (UEC)
<i>C. bella</i>	Serra do Cipó - MG	19°17'S 43°35'W	SEM	<i>Batista &amp; Bianchetti 887</i> (CEN)
<i>C. aff. caloptera</i>	Minaçu - GO	13°30'S 48°20'W	chemical	<i>Cavalcanti et al. 1130</i> (CEN)
<i>C. aff. caloptera</i>	Caldas Novas - GO	17°40'S 48°40'W	SEM	<i>Dias et al. 410</i> (CEN)
<i>C. castanoides</i>	Cavalcante - GO	13°45'S 47°45'W	SEM	<i>Batista 829</i> (UEC)
<i>C. castanoides</i>	Teresina de Goiás - GO	13°36'S 47°13'W	SEM chemical	<i>Pansarin &amp; Mickeliunas 897</i> (UEC)
<i>C. castanoides</i>	Teresina de Goiás - GO	13°36'S 47°13'W	SEM	<i>Pansarin &amp; Mickeliunas 889</i> (UEC)
<i>C. cipoana</i>	Serra do Cipó - MG	19°17'S 43°35'W	SEM	<i>Batista &amp; K. Proite 997</i> (CEN)
<i>C. exilis</i>	Teresina de Goiás - GO	13°36'S 47°13'W	chemical	<i>Pansarin &amp; Mickeliunas 895</i> (UEC)
<i>C. exilis</i>	Ibicoara - BA	13°30'S 41°25'W	SEM	<i>Koehler 20/00</i> (UEC)
<i>C. exilis</i>	Diamantina -MG	18°S 43°45'W	SEM	<i>Batista &amp; Proite 1019</i> (CEN)
<i>C. gracilis</i>	Atibaia - SP	23°13'S 46°35'W	SEM chemical	<i>Pansarin &amp; Mickeliunas 908</i> (UEC)
<i>C. libonii</i>	Caraguatatuba - SP	23°45'S 45°30'W	SEM	<i>Pansarin 857</i> (UEC)
<i>C. metallina</i>	Ouro Branco - MG	20°30'S 43°40'W		<i>Pansarin &amp; Mickeliunas 909</i> (UEC)
<i>C. paranaensis</i>	Serra do Cipó - MG	19°17'S 43°35'W	SEM chemical	<i>Pansarin &amp; Mickeliunas 920</i> (UEC)
<i>C. pluriflora</i>	Rio de Contas - BA	13°45'S 41°45'W	SEM	<i>Aona &amp; Moraes 642</i> (UEC)
<i>C. pluriflora</i>	Rio de Contas - BA	13°45'S 41°45'W	chemical	<i>Pansarin et al. 782</i> (UEC)
<i>C. pusilla</i>	Alto Paraíso de Goiás - GO	14°10'S 47°30'W	SEM	<i>Pansarin &amp; Mickeliunas 898</i> (UEC)
<i>C. ramboi</i>	Alto Paraíso de Goiás - GO	14°10'S 47°30'W	SEM	<i>Pansarin &amp; Batista s.n.</i> (UEC 117396)
<i>C. ramboi</i>	Teresina de Goiás - GO	13°36'S 47°13'W	chemical	<i>Pansarin &amp; Mickeliunas 872</i> (UEC)
<i>C. tenuis</i>	Alto Paraíso de Goiás - GO	14°10'S 47°30'W	SEM	<i>Pansarin &amp; Batista 741</i> (UEC)
<i>C. tenuis</i>	Cavalcante - GO	13°45'S 47°45'W	chemical	<i>Pansarin &amp; Mickeliunas 900</i> (UEC)

Table 2. Specific differences in the habitat, leaf characteristics, stomata distribution and wax ornamentation of the studied *Cleistes* species. Number between parenthesis = figure numbers.

Species	Habitat	Leaf characteristics	Stomata distribution	Wax ornamentation
<i>C. aphylla</i>	wet grasslands	scale-like, lanceolate to elliptic-lanceolate	hypostomatous	film, small granules (1, 2)
<i>C. bella</i>	grasslands with shrubs	evident, elliptic to ovate	amphistomatous	large granules, platelets (3, 4)
<i>C. aff. caloptera</i>	wet grasslands	evident, lanceolate to elliptic-lanceolate	amphistomatous	non entire platelets (5)
<i>C. castanoides</i>	marshy areas	evident, lanceolate to elliptic	amphistomatous	film, granules, non entire platelets (6-8)
<i>C. cipoana</i>	wet grasslands	scale-like, lanceolate to ovate-lanceolate	amphistomatous	film, rugose, small granules (9, 10)
<i>C. exilis</i>	wet grasslands	scale-like, lanceolate to ovate-lanceolate	amphistomatous	film rugose, small granules (11, 12)
<i>C. gracilis</i>	quartzite islands, disturbed areas	evident, lanceolate to elliptic-lanceolate	hypostomatous	granules, non entire platelets (13, 14)
<i>C. libonii</i>	disturbed areas, road margins, “restinga” vegetation	evident, lanceolate to ovate-lanceolate	hypostomatous	film, rugose, small granules (15, 16)
<i>C. metallina</i>	wet grasslands, road margins	evident, lanceolate to elliptic-lanceolate	amphistomatous	non entire platelets (17)
<i>C. paranaensis</i>	vegetation of rocky outcrops	evident, acute to lanceolate	amphistomatous	non entire platelets (18)
<i>C. pluriflora</i>	wet grasslands	evident, lanceolate to ovate-lanceolate	hypostomatous	non entire platelets (19)
<i>C. pusilla</i>	high mountain grasslands	scale-like, lanceolate to ovate-lanceolate	hypostomatous	film, rugose (20, 21)
<i>C. ramboi</i>	marshy areas, wet grasslands	evident, lanceolate	amphistomatous	non entire platelets (24)
<i>C. tenuis</i>	wet grasslands	evident, lanceolate to elliptic-lanceolate	hypostomatous	small non entire platelets (22, 23)

Appendix 1. Chemical composition (%) of the epicuticular waxes of 11 *Cleisthes* species. **1** = *Cleisthes aphylla*; **2** = *C. bella* **3** = *C. aff. caloptera*; **4** = *C. castanoides*; **5** = *C. exilis*; **6** = *C. gracilis*; **7** = *C. metallina*; **8** = *C. paranaensis*; **9** = *C. pluriflora*; **10** = *C. tenuis*; **11** = *C. ramboi*.

Compound	Concentration (%) of the compounds of epicuticular wax											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
<b>Alkyl acids</b>												
hydroxy-acetic	0.3				0.4	0.8	1.0					1.6
2-hydroxy-propanoic	0.3				0.8	0.3	0.3					0.5
2-hydroxy-propenoic					0.2		0.2					0.2
Hexanoic	0.3					0.2	0.3					
3-hydroxy-butanoic					0.1	0.1	0.1					0.2
Dihydroxy-acetic	0.3					0.1	Trace					0.2
Butanedioic	0.1		Trace	1.0		0.2	0.1		1.0			0.1
2,3-dihydroxy-propanoic	0.2				0.1	0.1						0.1
2,3,4-trihydroxy-butanoic	0.4					Trace						0.1
Nonanoic	Trace	0.1										
Decanoic	Trace	0.1	0.5	Trace								Trace
Hexanedioic		0.4					0.1					Trace
Dodecanoic		Trace	1.7	0.4					0.3			
Octanedioic		Trace	0.6	Trace								Trace
Malic	0.4			0.1								
Tetradecanoic	0.2	Trace	5.5	0.4	0.1	0.3	0.6	0.3	0.5	0.2		
Decanedioic	0.2	0.2	0.5	0.1					0.2	0.1		
Pentadecanoic	0.2	0.1	0.3	0.3	0.1	0.2		0.1	0.3	Trace		
Hexadecanoic	2.2	3.6	11.1	8.4	1.0	2.0	5.1	2.9	5.8	3.3	0.5	
Heptadecanoic	0.1	0.5	1.1	0.8	0.1	Trace	0.3	0.3	0.5	0.1		
Octadecadienoic	0.1	0.9	0.6	0.3				0.4	0.4	0.3		
Linolenic				2.6								
Octadecenoic	Trace			0.2			5.5	Trace	0.3	0.2		
Octadecanoic	1.0	3.6	8.6	7.9	0.4	0.7	6.0	1.7	4.4	2.5	0.3	
Nonadecenoic	Trace	0.2	0.5	0.6					0.1	0.2		
Nonadecanoic	Trace		0.3	0.1					0.1	0.1		
Eicosanoic	0.1	0.6	2.3	1.1	0.1		0.1	0.2	0.6	0.3		
Heneicosanoic	Trace	0.1	Trace									
Docosanoic	0.3	0.5	1.0	0.6	0.1	0.2	0.9	0.1	0.2	0.1	0.2	

*cont.*

Compound	Concentration (%) of the compounds of epicuticular wax										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Tricosanoic	Trace	0.2	0.5	0.3	Trace				Trace		
Tetracosanoic	0.1	0.7	2.1	2.5	0.3	0.4	0.2	0.2	0.1	0.4	
Pentacosanoic	0.1	0.2	0.3	0.2			0.3	Trace	Trace	0.1	
Hexacosanoic	2.7	Trace	0.4	0.2	1.9	0.3	0.2	0.1		0.2	2.1
Heptacosenoic			0.5								
Heptacosanoic	Trace		Trace	0.1		0.5	0.2	Trace	0.2	0.2	1.1
Octacosanoic	1.6	4.7	1.8	0.4	5.5	1.3	0.4	0.3	0.1	0.4	0.3
Nonacosanoic	Trace	Trace	0.1	0.1	0.1				Trace	Trace	0.1
Triacosanoic	0.9	0.1	1.8	0.5	1.9	1.6	0.6	0.2	0.1	0.2	0.1
Dotriacontanoic	0.2			Trace	0.1		0.2	Trace	Trace	0.1	
<b>Total of alkyl acids</b>	<b>12.3</b>	<b>13.3</b>	<b>42.1</b>	<b>29.2</b>	<b>13.3</b>	<b>9.3</b>	<b>22.7</b>	<b>6.8</b>	<b>15.2</b>	<b>9.0</b>	<b>5.3</b>
<b>Alkanes</b>											
Eicosane				0.1							
Heneicosane	0.1			0.1	Trace	0.7					0.4
Docosane	0.2				0.2	1.9	0.2				0.2
Tricosane	0.2	0.3	Trace		0.9	3.0	0.6		0.1		0.4
Tetracosane	0.2				1.3	3.7	0.8				0.8
Pentacosane	0.5	0.7	0.1		2.2	5.2	3.0	Trace	0.2	0.1	1.6
Hexacosane		0.9					0.1				
Hexacosane	0.5	0.6		Trace	1.3	7.4	3.0			0.1	1.8
Heptacosane	0.5	1.6	0.3	0.3	1.4	6.5	2.2	0.4	0.1		1.2
Octacosane	0.3	0.3	0.3	0.1	1.0	6.6	1.5	Trace		0.1	1.2
Nonacosane	0.4	0.3		0.4	0.7	5.9	1.1	0.2	0.1	0.3	0.5
Triacosane	0.2				0.2	4.4	0.3				0.3
Hentriacontane	0.2				1.7	3.5				0.1	0.3
Dotriacontane					0.1	2.0	0.1				0.2
Tritriacontene					0.2						Trace
Tritriacontane						0.3					
Tetratriacontane						0.1					
Pentatriacontane			0.1	Trace						Trace	
<b>Total of alkanes</b>	<b>3.3</b>	<b>4.7</b>	<b>0.8</b>	<b>1.0</b>	<b>11.2</b>	<b>51.2</b>	<b>12.9</b>	<b>0.6</b>	<b>0.5</b>	<b>0.7</b>	<b>8.9</b>
<b>Monoglycerides</b>											
2-hexadecanoic, 1,3-dihydroxy-propyl ester				0.1				Trace		Trace	

*cont.*

Compound	Concentration (%) of the compounds of epicuticular wax										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
hexadecanoic, 2,3-dihydroxi-propyl ester	0.1	Trace	0.6	0.5				0.4	0.3	0.2	
Heptadecanoic, 2,3-dihydroxi-propyl ester				0.1							
2-octadecanoic, 1,3-dihydroxi-propyl ester				0.1							
octadecenoic, 2,3-dihydroxi-propyl ester				Trace							
octadecanoic, 2,3-dihydroxi-propyl ester	Trace	0.3	Trace	0.1				0.2	0.2	0.1	
<b>Total of monoglycerides</b>	<b>0.1</b>	<b>0.3</b>	<b>0.6</b>	<b>0.9</b>	<b>Nd</b>	<b>Nd</b>	<b>Nd</b>	<b>0.6</b>	<b>0.5</b>	<b>0.3</b>	<b>Nd</b>
<b>Alcohols</b>											
Hexadecanol				Trace							0.1
Octadecanol	0.1	0.1			Trace	0.3	0.2				
Phytol				0.5							
Tricosanol	0.1				Trace						Trace
Tetracosanol	0.5	0.1		Trace	1.4	0.1	Trace	0.2	0.2	0.2	0.7
Pentacosanol	Trace	0.2		Trace	0.6		0.1	Trace	Trace	Trace	1.5
Hexacosenol					0.3						0.1
Hexacosanol	12.3	6.0	0.6	1.5	16.5			0.4	0.5	0.8	50.0
Heptacosenol		Trace									
Heptacosan-5-ol					Trace		0.4				
Heptacosan-4-ol					Trace		0.1				
Heptacosan-3-ol					Trace		0.2				0.2
Heptacosanol	0.1	3.2	0.2	0.1				0.1	0.1	0.1	0.1
Octacosenol		1.8		0.1	0.1		0.3				
Octacosanol	5.0	38.9	1.4	4.1	15.3		0.4	0.3	Trace	0.3	0.7
Nonacosanol		2.1	0.3	Trace							
Nonacosenol					0.4		0.1				2.3
Nonacosan-5-ol					0.1						0.3
Triacntanol	2.7	1.9	1.2	0.5	3.1	0.5	0.6	0.1		0.2	0.5
Untriacontanol				Trace						Trace	0.1
Dotriacontanol	1.6				0.3					0.2	

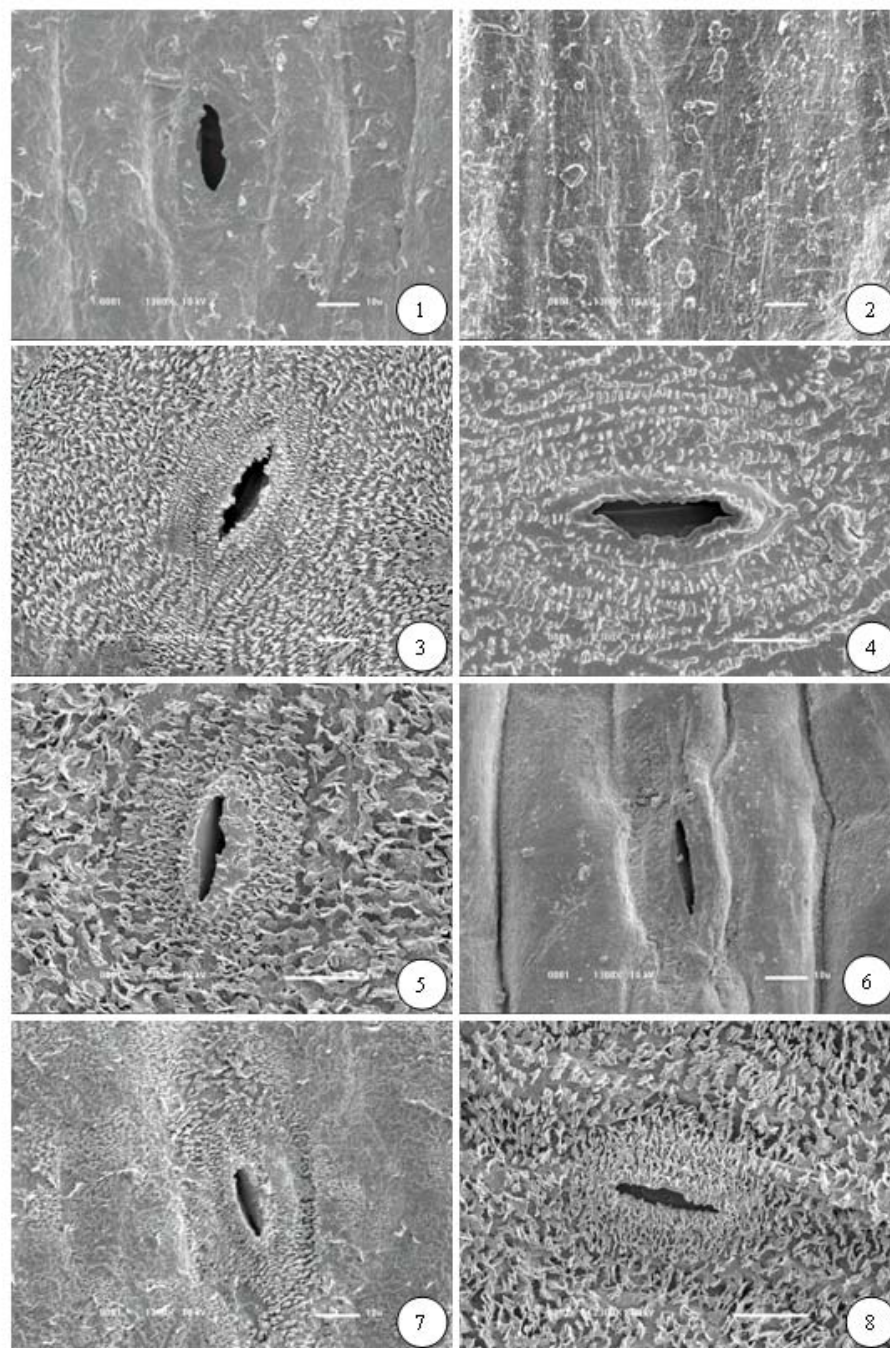


*cont.*

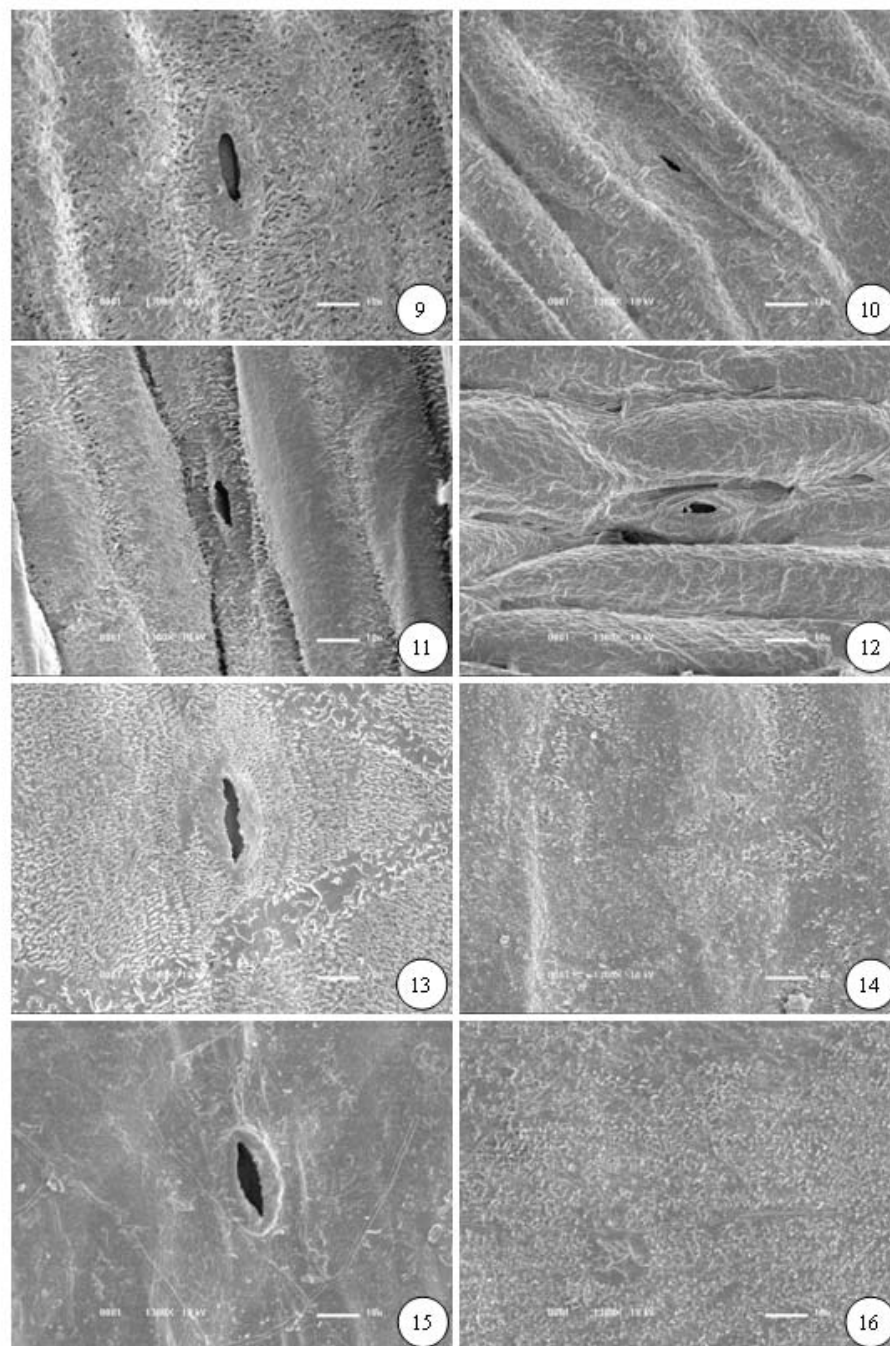
Compound	Concentration (%) of the compounds of epicuticular wax										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Total of alcohols</b>	<b>22.4</b>	<b>54.3</b>	<b>3.7</b>	<b>6.8</b>	<b>38.1</b>	<b>0.9</b>	<b>2.4</b>	<b>1.0</b>	<b>0.9</b>	<b>1.8</b>	<b>56.6</b>
<b>Aldehydes</b>											
Hexacosanal	1.5	Trace			0.7						0.7
Heptacosanal		0.1			1.9						
Octacosanal	Trace	2.7	Trace	Trace							
<b>Total of aldehydes</b>	<b>1.5</b>	<b>2.8</b>	<b>Trace</b>	<b>Trace</b>	<b>2.6</b>	<b>Nd</b>	<b>Nd</b>	<b>Nd</b>	<b>Nd</b>	<b>Nd</b>	<b>0.7</b>
<b>Alkyl esters</b>											
3-oxo-hexacosanoic methyl ester		0.4									
3-oxo-octacosanoic methyl ester			Trace	Trace							
3-oxo-triacontanoic methyl ester			Trace	Trace							
Hexadecanoic octadecyl ester							0.3				
Octadecanoic hexadecyl ester					0.2		1.3				
Eicosanoic tetradecyl ester					0.5		0.2				
Docosanoic dodecyl ester					0.2		Trace				
Tetracosanoic decyl ester					0.1						
Hexadecanoic tetracosyl ester							0.1				
Octacosanoic docosyl ester							1.2				
Eicosanoic eicosyl ester					4.4		1.3				0.5
Hexacosanoic hexacosyl ester					1.6						Trace
Octacosanoic tetracosyl ester					0.6						
<b>Total of alkyl esters</b>	<b>Nd</b>	<b>0.4</b>	<b>Trace</b>	<b>Trace</b>	<b>7.6</b>	<b>Nd</b>	<b>4.4</b>	<b>Nd</b>	<b>Nd</b>	<b>Nd</b>	<b>0.5</b>
<b>Sterols</b>											

*cont.*

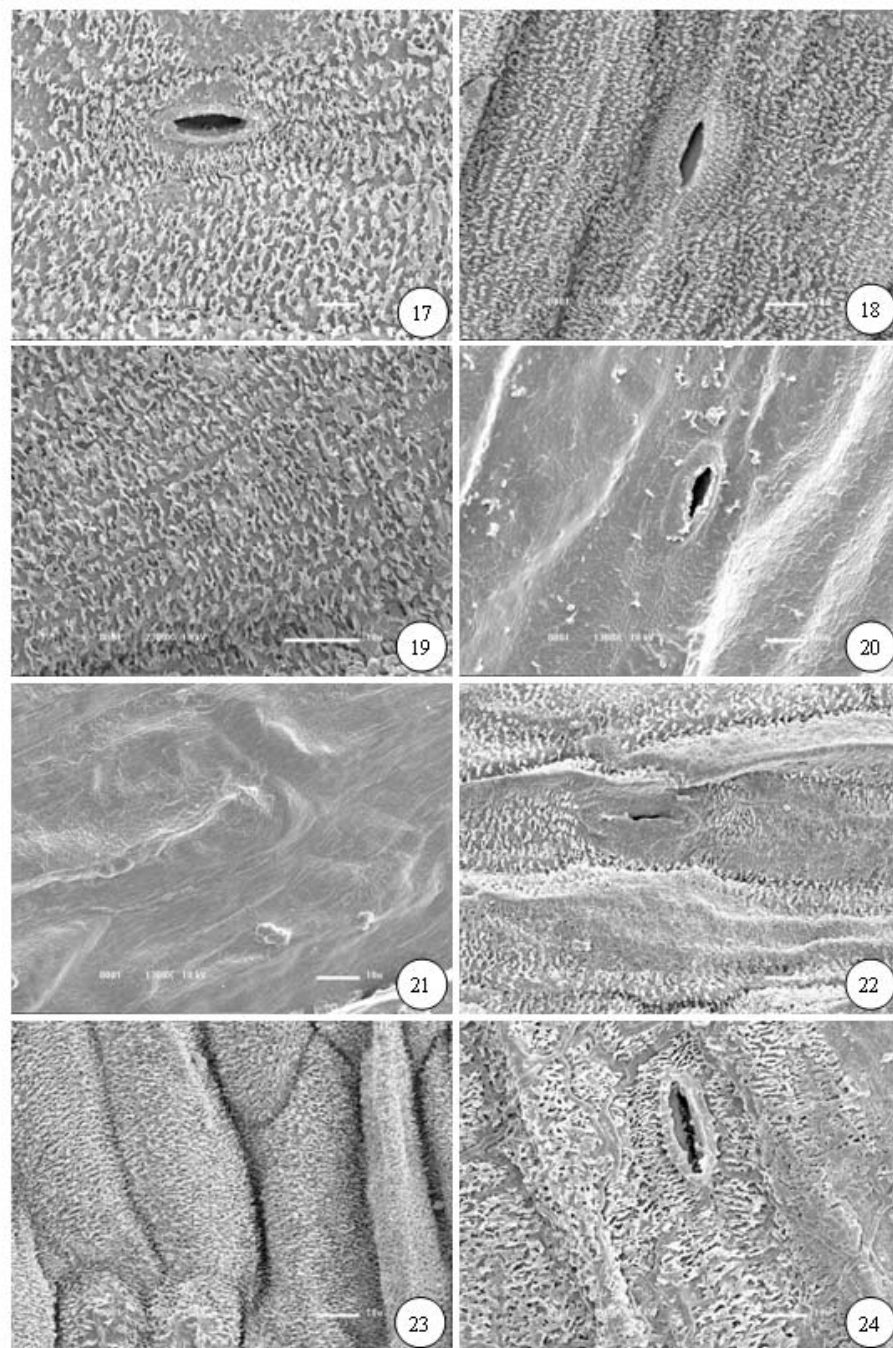
Compound	Concentration (%) of the compounds of epicuticular wax										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ergost-5-en-3-ol				0.1							
Stigmasterol				0.1							
Stigmast-4-en-3-one										0.1	
_sitosterol				0.3					Trace		
<b>Total of sterols</b>	<b>Nd</b>	<b>Nd</b>	<b>Nd</b>	<b>0.5</b>	<b>Nd</b>	<b>Nd</b>	<b>Nd</b>	<b>Nd</b>	<b>Trace</b>	<b>0.1</b>	<b>Nd</b>
<b>Other compounds</b>											
Glycerol	1.2	0.4	0.4	Trace	0.1	0.3					0.6
3,4-dihydroxy-dihydro 2(3H)-furanone	0.2										
Hydroxyl-benzoic acid	0.1				0.1	0.2					0.2
Hydroxyl-methoxy- benzoic acid				Trace							
Erytritol								0.4			
Pimaric acid				0.7							
Isopimaric acid				0.3							
Dehydroabiatic acid	Trace	0.5	1.1	1.7				0.3	0.1	0.6	
Dehydroabiatic methyl ester			0.4							0.1	
<b>Total of other compounds</b>	<b>1.5</b>	<b>0.9</b>	<b>1.9</b>	<b>2.7</b>	<b>0.2</b>	<b>0.5</b>	<b>Nd</b>	<b>0.7</b>	<b>0.1</b>	<b>0.7</b>	<b>0.8</b>



**Figures 1-8.** Epicuticular waxes of leaves of *Cleistes* species under SEM. Scale bars = 10  $\mu$ m. Fig. 1. *C. aphylla*: abaxial. Coll. Pansarin & Michelunas 899 (UEC). Fig. 2. *C. aphylla*: adaxial. Coll. Pansarin & Michelunas 899 (UEC). Fig. 3. *C. bella*: abaxial. Coll. Pansarin & Batista 758 (UEC). Fig. 4. *C. bella*: adaxial. Coll. Batista & Bianchetti 887 (UEC). Fig. 5. *C. aff. caloptera*: adaxial. Coll. Dias et al. 410 (CEN). Fig. 6. *C. castanoides*: abaxial. Coll. Pansarin & Michelunas 889 (UEC). Fig. 7. *C. castanoides*: abaxial. Coll. Pansarin & Michelunas 897 (UEC). Fig. 8. *C. castanoides*: adaxial. Coll. Batista 829 (UEC).



**Figures 9-16.** Epicuticular waxes of leaves of *Cleistes* species under SEM. Scale bars = 10  $\mu$ m. Fig. 9. *C. cipoana*: abaxial. Coll. *Batista & K. Proite 997* (CEN). Fig. 10. *C. cipoana*: adaxial. Coll. *Batista & K. Proite 997* (CEN). Fig. 11. *C. exilis*: abaxial. Coll. *Batista & Proite 1019* (CEN). Fig. 12. *C. exilis*: adaxial. Coll. *Koehler 20/00* (UEC). Fig. 13. *C. gracilis*: abaxial. Coll. *Pansarin & Mickelunas 908* (UEC). Fig. 14. *C. gracilis*: adaxial. Coll. *Pansarin & Mickelunas 908* (UEC). Fig. 15. *C. libonii*: abaxial. Coll. *Pansarin 857* (UEC); Fig. 16. *C. libonii*: adaxial. Coll. *Pansarin 857* (UEC).



**Figures 17-24.** Epicuticular waxes of leaves of *Cleistes* species under SEM. Scale bars = 10  $\mu$ m. Fig. 17. *C. metallina*: abaxial. Coll. Pansarin & Michelunas 909 (UEC). Fig. 18. *C. paranaensis*: adaxial. Coll. Pansarin & Michelunas 920 (UEC). Fig. 19. *C. pluriflora*: adaxial. Coll. Aona & Moraes 642 (UEC). Fig. 20. *C. pusilla*: abaxial. Pansarin & Michelunas 898 (UEC). Fig. 21. *C. pusilla*: adaxial. Pansarin & Michelunas 898 (UEC). Fig. 22. *C. tenuis*: abaxial. Coll. Pansarin & Batista 741 (UEC). Fig. 23. *C. tenuis*: adaxial. Coll. Pansarin & Batista 741 (UEC). Fig. 24. *C. ramboi*: abaxial. Pansarin & Batista s.n. (UEC 117396).

## CONCLUSÕES

Com a reconstituição da hipótese filogenética de Pogoniinae sul-americanas, baseando-se em dados morfológicos e macromoleculares, pode ser verificado que essa subtribo, assim como o gênero *Cleisthes* são grupos parafiléticos. As espécies norte-americanas de *Cleisthes* estão mais relacionadas com o gênero *Isotria* e *Pogonia* do que com as demais espécies de *Cleisthes* que ocorrem nas Américas Central e do Sul, concordando com os dados publicados por Cameron & Chase (1999). A inclusão de *Pogoniopsis* na análise revela que esse gênero está mais relacionado com espécies de *Cyrtosia* e *Galeola* (Galeolinae) do que com os demais gêneros pertencentes à subtribo Pogoniinae. O gênero *Duckeella*, irmão da subtribo Pogoniinae, não apresenta os caracteres sinapomórficos que definem a subtribo e sua transferência para Duckeellinae é mais adequada.

As espécies de *Cleisthes*, assim como ocorre com os demais gêneros em Pogoniinae, são polinizadas, principalmente, por abelhas. *Cleisthes libonii*, no entanto, apresentou beija-flores do gênero *Phaethornis* como co-polinizadores. As espécies *Cleisthes* apresentam picos de floração, as flores geralmente são pouco duráveis e as visitas ocorrem, principalmente, no primeiro dia de antese. O único recurso utilizado pelas abelhas é o néctar, produzido por glândulas na base do labelo. Para os táxons norte-americano-asiáticos esse tipo de nectário está ausente e as abelhas são atraídas às flores por engano. Esse trabalho, aliado aos estudos de filogenia realizados, sustenta a hipótese de evolução de flores de engano para flores de néctar.

Com a realização da revisão taxonômica de *Cleisthes* foi verificado que o gênero apresenta 17 espécies distribuídas entre as Américas Central e do Sul. Essas espécies ocorrem principalmente em regiões de cerrado do Brasil central. Três dessas espécies foram descobertas durante a elaboração do presente trabalho.

As ceras epicuticulares das espécies de *Cleisthes* apresentam variação desde lisas, formando grânulos ou placas e são constituídas, principalmente, por álcoois, ácidos e ésteres. A composição química das ceras epicuticulares das folhas de espécies de *Cleisthes* é muito variável entre espécies, podendo ser usada na delimitação específica dentro do gênero.

**BIBLIOGRAFIA GERAL**

- Atwood, J.T. 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9: 171-186.
- Barthlott, W. 1981. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nord. J. Bot.* 1: 345-355.
- Burns-Balogh, P. & Funk, V. 1986. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae. *Smithsonian Contributions to Botany*, N° 61, Smithsonian Institution, Washington, D.C.
- Cameron, K.M. 1999. Phylogeny and biogeography of Pogoniinae (Vanilloideae: Orchidaceae). *North Amer. Nat. Orchid J.* 5: 152-163.
- Cameron, K.M. 2004. Utility of plastid gene sequences for investigating intrafamilial relationships within Orchidaceae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31: 1157-1180.
- Cameron, K.M. & Chase, M.W. 1998. Seed morphology of vanilloid orchids (Vanilloideae: Orchidaceae). *Lindleyana* 13: 148-169.
- Cameron, K.M. & Chase, M.W. 1999. Phylogenetic relationships of Pogoniinae (Vanilloideae, Orchidaceae): an herbaceous example of the eastern North America – eastern Asia phytogeographic disjunction. *J. Plant. Res.* 112: 317-329.
- Cameron, K.M.; Chase, M.W.; Whitten, W.M.; Kores, P.J.; Jarrell, C.; Albert, V.A.; Yukawa, T.; Hills, H.G. & Goldman, D.H. 1999. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: evidence from *rbcL* nucleotide sequences. *Am. J. Bot.* 86: 208-224.
- Chase, M.W.; Cameron, K.M.; Hills, H. & Jarrell, D. 1994. DNA sequences and phylogenetics of the Orchidaceae and other lilioid monocots. In A. Pridgeon (ed.), *Proceedings of the Fourteenth World Orchid Conference* 61-73, Glasgow, UK: Her Majesty's Stationery Office.
- Clegg, M. & Zurawski, G. 1992. Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny: present status and future prospects. In P. Soltis, D. Soltis & J. Doyle (eds) *Molecular systematics of plants*. New York, NY: Chapman and Hall.
- Correll, D.S. 1953. *Vanilla* – Its botany, history, cultivation and economic import. *Economic Bot.* 7: 291-358.



- Dodson, C. 1962. The importance of pollination in the evolution of the orchids of Tropical America. *Am. Orchid Soc. Bull.* 31:525-554.
- Dressler, R.L. 1981. *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Dressler, R.L. 1993. *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Dressler, R.L. & Dodson, C. 1960. Classification and phylogeny of the Orchidaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 47: 25-68.
- Freudenstein, J.V. & Rasmussen, F.N. 1999. What does morphology tell us about orchid relationships? – a cladistic analysis. *Amer. J. Bot.* 86: 225-248.
- Freudenstein, J.V.; van den Berg, C.; Goldman, D.H.; Kores, P.J.; Molvray, M. & Chase, M.W. 2004. An expanded plastid DNA phylogeny of Orchidaceae and analyses of Jackknife branch support strategy. *Amer. J. Bot.* 91: 149-157.
- Garay, L. 1986. *Olim Vanillaceae*. *Bot. Mus. Leaf.* 30:223-237.
- Gregg, K.B. 1989. Reproductive biology of the orchid *Cleistes divaricata* (L.) Ames var. *bifaria* Fernald growing in West Virginia meadow. *Castanea* 54: 57-78.
- Hoehne, F.C. 1949. *Iconografia das Orchidáceas do Brasil*. São Paulo: Secretaria da Agricultura.
- Lindley, J. 1835. *Key to structural, physiological and systematic botany*. London: Longman.
- Lindley, J. 1936. *Natural system of botany*. 2<sup>a</sup> ed. London: Longman.
- Mehrhoff, L.A. 1983. Pollination in the genus *Isotria* (Orchidaceae). *Amer. J. Bot.* 70: 1444-1453.
- Pabst, G.F.J. & Dungs, F. 1975. *Orchidaceae Brasilienses v. 1*. Kurt Schmiersow: Hildesheim.
- Palmer, J.; Jansen, R.; Michaels, H.; Chase, M.W. & Manhart, J. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75: 1180-1206.
- Pansarin, E.R. 2003. Biologia floral de *Cleistes macrantha* (Barb. Rodr.) Schltr. (Orchidaceae: Vanilloideae: Pogoniinae). *Revista Brasil. Bot.* 26: 73–80.
- van der Pijl, L. & Dodson, C.H. 1966 *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Coral Gables, Florida: University of Miami.



- Rasmussen, F.N. 1982. The gynostemium of the neottioid orchids. *Opera Bot.* 65: 1-96.
- Rasmussen, F.N. 1985. Orchids. In R.M. Dahlgren, H.T. Clifford & P.F. Yeo (eds.), *The families of the monocotyledons*. Berlin: Springer Verlag.
- Schlechter, R. 1970. *Die Orchideen*, 3<sup>a</sup> ed. F.G. Brieger *et.al.* (eds.) Berlin: Paul Parey.
- Szlachetko, D.L. 1995. Systema Orchidaliium. *Fragm. Florist. Geobot. Suppl.* 3: 1-152.
- Thien, L.B. & Marcks, B.G. 1972. The floral biology of *Arethusa bulbosa*, *Calopogon tuberosus*, and *Pogonia ophioglossoides* (Orchidaceae). *Can. J. Bot.* 50: 2319-2325.