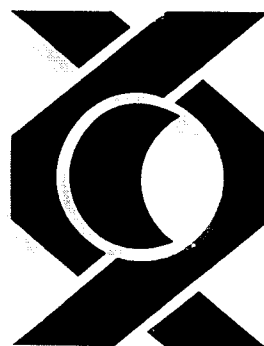


**ANAIS DO 15º ENCONTRO SOBRE
TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO
VOLUME 15**



**"RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS"**

**13 e 14 de OUTUBRO de 1998
PIRACICABA, SP**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

BANCO GENÉTICO DE ORQUÍDEAS: DIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

Cássio van den Berg
Laboratory of Molecular Systematics
Royal Botanic Gardens, Kew
RICHMOND, SURREY TW9 3DS
Reino Unido
e-mail: c.van.den.berg@rbgkew.org.uk

1. Introdução

As Orchidaceae são frequentemente citadas como a maior família vegetal (cerca de 20-25 mil espécies), representando cerca de 10% de todas as espécies de Angiospermas (Benzing 1981, Atwood 1986, Dressler 1990,1993). Existe uma enorme diversidade morfológica, mas extrema constância em alguns caracteres: sementes extremamente pequenas, associação obrigatória com micorrizas para germinação natural, processos de polinização especializados e um plano floral constante, perceptível mesmo em flores bastante modificadas, com a presença das partes reprodutivas totalmente fundidas numa estrutura chamada coluna ou ginostêmio. A família é presente em todas as áreas com vegetação no planeta, com uma diversidade maior nas regiões tropicais. Desde o século passado as Orchidaceae têm despertado grande interesse devido a mecanismos de polinização muito peculiares e especializados (Darwin 1877, van der Pijl e Dodson 1966).

Brieger (1961, 1976) considerou Orchidaceae uma família adequada para o estudo de evolução vegetal nos trópicos, devido à sua diversidade e também facilidade de manutenção em coleções vivas *ex-situ*. Apesar disso, tem havido pouca pesquisa na família, em comparação com outras famílias de grande número de espécies tais como Leguminosae e Compositae. Isto provavelmente é devido à complexidade morfológica do grupo e distribuição predominantemente tropical (Chase e Palmer 1993).

2. Características biológicas do material

2.1. Sistema reprodutivo

A grande maioria das espécies de Orchidaceae são alógamas com mecanismos extremamente sofisticados para evitar autopolinização (Darwin 1877, van der Pijl e Dodson 1966, Ackerman, 1986, Nilsson 1992, Catling 1990). O mecanismo mais básico consiste no fato de que o estigma fica numa posição mais interna que a antera, a qual por sua vez só pode ser deslocada na direção da saída do polinizador. Barreiras adicionais entre diferentes flores na mesma planta são mais raras mas em alguns grupos ocorrem dioécia (Catsetinae, 5 gêneros, 200 espécies, Romero & Nelson 1986), auto-incompatibilidade (*Dendrobium*, Johansen 1990; *Oncidium*, Charanasri e Kamemoto 1977; Vandeae, Agnew 1986). Autogamia ocorre muito mais raramente (Catling 1990), abaixo de 5% das espécies na maioria dos grupos, a apomixia é quase inexistente. Embora as consequências genéticas dos diferentes sistemas sejam bastante estudadas em outros grupos de plantas, há poucos trabalhos confirmando as predições em Orchidaceae. Peakall e Beattie (1991) encontraram evidências de intensa endogamia em populações de uma espécie australiana polinizada por formigas (com 51% autopolinização), bem como Scacchi et al. (1991), em uma espécie autógama de *Cephalanthera*.

2.2. Tipos de Polinização e dispersão

A maioria das espécies é adaptada à polinização por insetos, em todas as diferentes síndromes exceto cantarofilia (coleópteros), para a qual não existe comprovação nos casos alegados. A adaptação predominante é para polinização por Hymenoptera (abelhas e vespas). O caso clássico é a polinização de *Ophrys* por machos de abelhas e vespas que tentam copular com as flores que tem aparência e aroma das fêmeas, num mecanismo chamado pseudocopulação (van der Pijl e Dodson 1966). Certos gêneros mostram outras adaptações interessantes: na subtribo Catsetinae as flores são unisexuais e apresentam um mecanismo para arremessar as polínias sobre abelhas Euglossinae. O inseto se assusta com o choque e não retorna a outra flor masculina, mas deposita as polínias em uma flor feminina, que é bastante diferenciada morfológicamente (Romero e Nelson 1986). Em *Coryanthes* o labelo tem o formato de um copo, e uma glândula secreta líquido formando uma "piscina". O inseto cai e vai com a correnteza até o orifício de drenagem lateral e coleta ou deposita as polínias na saída (van der Pijl e Dodson 1966). Outras subtribos por

exemplo Pleurothallidinae e Bulbophyllinae têm síndromes de miofilia e sapromiofilia (moscas), o que exige adaptações para lidar com a ineficiência dos polinizadores. A maioria destas apresentam labelos móveis que arremessam o inseto sobre as polínias na posição correta. Como as moscas não voam grande distância e tendem a ficar nas flores por muito tempo existem outras adaptações para evitar autopolinização, como por exemplo anteras que saem como uma capa sobre as polínias e so caem após um período de desidratação durante o vôo do inseto ou polínias que não se encaixam no estigma sem passar por uma brusca mudança de formato ao se desidratar (Borba, no prelo). De uma forma geral é importante notar mais uma vez uma predominância de mecanismos que favorecem a polinização cruzada.

A dispersão das sementes, como regra, é por vento a longas distâncias. As sementes são reduzidas e sem endosperma, e requerem associação com micorrizas para germinação natural. Isto faz com que, apesar das milhares (ou milhões) de sementes produzidas por cápsula, apenas algumas cheguem a germinar, e as densidades em populações naturais sejam relativamente baixas.

Em termos de estratégia de vida, a maioria das espécies seria classificada como estratégia -k, apesar do grande número de sementes. De fato, o número de sementes é contrabalançado pelo fato de que polinização natural é bastante rara. Uma espécie média de Orchidaceae leva de 5-7 anos para atingir a primeira floração, e floresce por 10-15 dias anualmente, com 5-10 flores por planta. Por outro lado o hábito epifítico e simpodial faz com que as plantas tenham uma existência muito prolongada, geralmente interrompida apenas no caso de morte do forófito (planta-suporte). É observado (van der Pijl e Dodson 1996), que em muitos anos não há produção de cápsulas, e é raro se observar mais de uma cápsula por indivíduo no campo, em espécies que não se autopolinizam.

2.3. Padrões geográficos

As Orchidaceae ocupam praticamente todas as áreas vegetadas no planeta, entretanto as espécies epifíticas (cerca de 2/3) ocorrem somente em áreas tropicais e subtropicais. Ambientalmente, as áreas com maior diversidade são áreas montanhosas com

alta pluviosidade e variação altitudinal (Holtum 1960). As áreas de baixadas litorâneas tendem a ter espécies de larga distribuição continental, enquanto as áreas montanas têm uma proporção maior de espécies endêmicas (van den Berg 1996, van den Berg e Martins 1998). Mundialmente as áreas com maior número de espécies são o Neotrópico (8300 spp.) e Ásia Tropical (6800 spp.), com um número comparativamente menor na África Tropical (3100 spp.) (Dressler 1990). Do ponto de vista biogeográfico existem grupos de dispersão mundial (ex. gêneros *Vanilla*, *Corymborchis*, *Habenaria*, *Bulbophyllum*), mas outros restritos a regiões (ex. subtribos Laeliinae (1500 spp.) e Pleurothallidinae (3000 spp.), neotropicais; Dendrobiinae (1600 spp.) paleotropical). Na zona temperada da América do Norte e Eurásia existem diversas espécies de distribuição generalizada, mas entre Américas e África muito poucas (*Oeceoclades maculata*, *Eulophia alta*, *Polystachya* sp.).

2.4. Taxonomia, classificação e filogenia

Um dos maiores problemas taxonômicos das Orchidaceae é que até tão recentemente quanto na década de 80 não havia consenso da posição da família dentro das monocotiledôneas. A existência de caracteres bem definidos nos membros da família significa que nunca houve maiores problemas para a sua delimitação. Por outro lado, a inexistência de tais caracteres em outros grupos deixou um vazio para especulações taxonômicas. No sistema de Cronquist (1981), Orchidaceae ainda são agrupadas com Burmanniaceae, uma família saprofítica que também apresenta sementes reduzidas. Com o recente avanço de estudos filogenéticos por sequenciamento chegou-se à posicionamento atual. Dentro das monocotiledôneas petalóides existem dois grupos bem definidos de gêneros, que passam a ser as ordens Liliales e Asparagales, e as Orchidaceae têm um claro posicionamento nas Asparagales (Dressler e Chase 1995). Burmanniaceae, por sua vez, não tem qualquer relação com estes dois grupos, ficando na ordem Alismatales.

Dentro da família existem cinco subfamílias: Apostasioideae, Cyripedioideae, Spiranthoideae, Orchidoideae e Epidendroideae. No total existem aproximadamente 20 tribos, englobando 70 subtribos e 880 gêneros. A subfamília com maior número de gêneros e espécies são as Epidendroideae. Recentemente estudos moleculares dentro da família (Kores et al. 1997, Cox et al. 1997) têm causado uma modificação nos conceitos das

subfamílias, que devem ser reformuladas em breve. Similarmente estudos a longo prazo devem alterar substancialmente os conceitos no nível de subtribo e genérico. Isto se deve ao fato de que uma grande parte da taxonomia atual é baseada em caracteres florais diagnósticos. Devido à grande pressão seletiva na adaptação aos polinizadores, muitos destes caracteres não passam de convergência, e a maioria das filogenias encontradas mostra a importância de caracteres vegetativos e micromorfológicos que foram ignorados ou descartados no passado (Whitten et al, dados não publicados, van den Berg e Higgins, dados não publicados).

2.5. Diversidade morfológica e genética em Orchidaceae

Existem alguns trabalhos avaliando a diversidade genética intra e interpopulacional em alguns gêneros terrestres de orquídeas européias, através de isoenzimas (Scacchi et al. 1987, 1990, 1991; Scacchi e De Angelis 1989; Rossi et al. 1992; Arduino et al. 1995). Além de aplicações taxonômicas em cada caso estudado, um padrão geral foi de que a maioria da diversidade nas populações em questão estava no nível intraespecífico, mas pouca diversidade entre populações foi encontrada. Portanto há alto fluxo gênico entre populações, e conseqüente baixa diferenciação das populações em subespécies. O fluxo gênico por sua vez, pode ser atribuído à sementes em pó, com dispersão por vento a longas distâncias. Os valores de diversidade intraespecífica e intrapopulacional se mostraram similares a outras monocotiledôneas de polinização animal e dispersão por vento (revisão em Hamrick e Godt 1990). Similarmente, existem trabalhos analisando variação morfológica através de métodos morfométricos (Bateman e Denholm 1988, 1989; Dufêne et al. 1991; Tyteca e Dufêne 1994), mas a maioria tem uma ênfase mais taxonômica do que de distribuição de variabilidade. Não existem estudos de diversidade com marcadores genéticos em orquídeas tropicais, embora existam alguns trabalhos com caracterização morfométrica (Martins 1967, 1970; Chacur 1973; Resende 1991; van den Berg 1996, Carlini 1996).

3. Conservação de Germoplasma de Orquídeas: Situação Atual

3.1. Conservação *in situ*

Existem muito poucos exemplos de conservação de germoplasma *in situ*, provavelmente devido à dificuldade e custo. Em geral tais empreendimentos envolvem a compra de áreas de terra e o aproveitamento econômico é muito difícil. Um exemplo em orquídeas terrestres é suportado pelo Nature Conservancy Council na Inglaterra, em projetos-piloto com espécies muito ameaçadas no país, tais como *Himantoglossum hircinum*, *Ophrys sphegodes*, *Orchis militaris* e *Orchis simia* (Farrel e Fitzgerald 1989). Este projeto envolve a compra das áreas de ocorrência das espécies, manutenção de um “zelador” durante o período em que as plantas não estão dormentes, mapeamento e acompanhamento de cada indivíduo, polinização artificial e caracterização morfológica e genética (Bateman e Farrington 1989, Qamaruz-Zaman 1998) entre as diferentes populações e populações na Europa Continental, onde as espécies não são ameaçadas. Embora haja planos para re-introdução das espécies ameaçadas, devido à pouca informação disponível a respeito da variabilidade não se decidiu ainda estratégias adequadas para isso (S. Bell, comunicação pessoal). Até o momento o sistema de manutenção das reservas (English Nature) não permite introdução de material que não seja exatamente do mesmo local de origem.

Em regiões tropicais há pouquíssimas iniciativas de conservação diretamente com orquídeas. Um exemplo brasileiro é a reserva em Macaé de Cima, Nova Friburgo-RJ, onde existe uma fazenda para conservação de uma área especificamente rica em espécies de Orchidaceae (230 espécies em 56 gêneros). Segundo Warren (1989), o projeto consistiu da compra das terras com dinheiro arrecadado por uma ONG, seguido da montagem de uma fazenda para ecoturismo. Os habitats de orquídeas foram protegidos e cápsulas com sementes são transportadas para um laboratório e germinadas *in vitro*. A manutenção financeira do local é obtida através de turismo, algumas atividades agrícolas em áreas previamente degradadas e venda de plantas produzidas das sementes. Alguns testes estão sendo feitos com reintrodução de espécies particularmente ameaçadas (Warren e Miller,

1992, 1993). O projeto também possibilitou a produção de um guia de campo para identificação das orquídeas do local (Miller et al. 1994.)

3.2. Conservação *ex situ*

3.2.1. Conservação em coleções de material vivo

Com respeito à manutenção de orquídeas em coleções vivas, um detalhe importante é o fato de que certos grupos específicos são difíceis de manter. De forma geral o cultivo de espécies epifíticas é consideravelmente mais fácil do que terrestres. Orquídeas de mata nebulosa em regiões de alta altitude e pluviosidade também são problemáticas, e estes ambientes têm uma concentração em espécies endêmicas. Por outro lado estes ambientes normalmente têm a vegetação preservada em função da topografia. Em seguida vemos algumas coleções *ex-situ* importantes.

3.2.1.1. Royal Botanic Gardens, Kew

A coleção no Royal Botanic Gardens, Kew, é uma das mais antigas do mundo, com plantas em cultivo desde, pelo menos 1789. Em 1848, a coleção já contava com aproximadamente 750 espécies e atualmente tem aproximadamente 3700 espécies em 390 gêneros, o que a coloca como a maior do mundo em termos de número de espécies. Entre fatores históricos interessantes estão o fato de que a coleção de Kew proveu as plantas utilizadas por Darwin nos estudos em que ele se baseou em "The various contrivances by which Orchids are fertilised by insects" (1877). A ênfase de manutenção, entretanto, é na diversidade específica e genérica, e não há amostragem populacional, embora alguns gêneros nos quais foram feitas monografias acabaram por ter uma melhor amostragem da variação geográfica natural.

No momento existem diversos projetos em parceria com instituições britânicas e estrangeiras, para reintrodução de espécies ameaçadas em Bornéu, Índia e Tailândia e projetos sendo organizados com o México e Pacífico Sul. Existe também um grande projeto em Madagáscar, que visa reduzir a coleta de orquídeas através de organização de um laboratório de propagação de sementes vindas da natureza. Eventualmente, parte das plantas

será utilizada para re-introdução e aumento das populações existentes (S. Bell, comunicação pessoal).

3.2.1.2. Instituto de Botânica de São Paulo

A coleção do Instituto de Botânica (Orquidário do Estado, Jardim Botânico de São Paulo), foi iniciada no início do século e teve uma grande parte de suas coletas feitas por F.C. Hoehne, em associação com o herbário. A coleção contou com um aumento muito grande, tanto recebendo materiais-duplicata de Piracicaba, como em coletas do Prof. H.D. Bicalho. Algumas espécies contam com amostragem populacional, mas a maior importância dessa coleção ainda é o número de espécies representadas.

3.2.1.3. Departamento de Genética

A coleção foi iniciada pelo Prof. Brieger na década de 40, porém com a parcela mais significativa de material coletada entre 1951-1970. A grande maioria do material é Sul-Americano, cobrindo especificamente orquídeas epifíticas desde os Andes Colombianos até o Sul do Brasil. Existem também materiais de outras regiões tropicais do mundo, a maioria comprada de viveiros particulares. As subtribos mais bem representadas são Laeliinae, Oncidiinae e Maxillariinae. O material que foi coletado pela coleção contém, dentro de grupos taxonômicos-alvo (exemplo, gêneros *Brassavola*, *Cattleya*, *Laelia*, *Encyclia*, *Prosthechea*, *Miltonia*), uma amostragem populacional das espécies representadas, em outros casos tem-se apenas alguns indivíduos que foram coletados nas mesmas viagens de coleta. Adicionalmente existe uma larga coleção de híbridos F1 interespecíficos e intergenéricos, que foram feitos para estudo de herança de caracteres. O total de coleta chega a 33000 acessos, dos quais aproximadamente 10000 ainda estão vivos. Grande parte dos acessos foi também herborizado em fichas florais (20000), como "vouchers" para estudos de variabilidade morfológica, e também como exsicatas de herbário (2000). Esta coleção de vouchers agora está associada ao herbário ESA para fins de registro. A estrutura da coleção torna-a um recurso extremamente importante para estudos de variabilidade genética em orquídeas tropicais, provavelmente sem similar em

qualquer outra instituição de pesquisa no mundo. Similarmente, não há uma coleção que seria mais importante do que esta para reintrodução de espécies de orquídeas no Brasil.

3.2.2. Conservação em bancos de sementes

Bancos de sementes e pólen de orquídeas têm sido um assunto controverso nos anos recentes. Em teoria o material seria extremamente adequado para conservação: uma cápsula produz em geral de 500 mil a 3 milhões de sementes de tamanho reduzido (pó). Entretanto, Pritchard (1986) observou uma perda de viabilidade em testes preliminares, provavelmente devido ao uso de métodos de congelamento em temperaturas sub-ótimas. Em estudos posteriores, com a utilização de temperaturas inferiores a -40°C a conservação foi satisfatória, e mesmo com 25 ciclos de degelo-recongelamento a perda de viabilidade ficou na faixa de 20% (Thornhill e Koopowitz 1992). Amostras armazenadas em temperaturas inferiores a -70°C teriam uma viabilidade estimada de 200 anos (inferido por regressão). Pelo menos um banco de sementes em funcionamento existe na Universidade da Califórnia, Irvine (Koopowitz 1986). Após 10 anos de armazenamento em congeladores elétricos a -80°C , alíquotas retiradas mostraram germinação perfeitamente satisfatória (Koopowitz e Thornhill 1994). Entretanto devido a falta de financiamento, o projeto no momento conta com apenas cerca de 100 espécies africanas de *Eulophia* e não existe aparentemente nenhum projeto similar (Koopowitz, comunicação pessoal). Em termos de pesquisa ainda é muito importante um projeto que analise a conservação criogênica de sementes de orquídeas de diferentes gêneros e subtribos, antes de se ter uma estratégia definida para banco de sementes.

4. Conclusão

A diversidade das Orchidaceae é uma consequência direta do número de espécies e extensa distribuição em diferentes ambientes do planeta. Embora existam alguns estudos de diversidade morfológica e genética em espécies terrestres de zona temperada, pouco se sabe sobre a organização da diversidade genética em espécies epifíticas tropicais, que compõem dois terços da família. Existem poucas coleções de germoplasma da família num senso

estrito, embora ocorram existam algumas coleções *ex-situ*, e conservação *in-situ* é ainda mais rara e restrita. Bancos de semente são praticamente inexistentes, mas deviam ser encorajados com uma das alternativas mais viáveis e baratas de conservação.

5. Literatura Citada

- Ackerman, J.D. 1986. Coping with the epiphytic existence: pollination strategies. *Selbyana* 9:52-60
- Agnew, J.D. 1986. Self compatibility/incompatibility in some orchids of the subfamily Vandoideae. *Plant Breeding* 97:183-186
- Arduino, P.; Cianchi, R.; Rossi, W.; Corrias, B.; Bullini, L. 1995. Genetic variation in *Orchis papilionacea* (Orchidaceae) from the central Mediterranean region: Taxonomic inferences at the intraspecific level. *Plant Systematics and Evolution* 194:9-23
- Atwood, J. 1986. The size of the Orchidaceae and the systematic distribution of epiphytic orchids. *Selbyana* 9:171-186
- Bateman, R.M. e Denholm, I. 1988. A reappraisal of the British and Irish dactylorchids, 3. The spotted-orchids. *Watsonia* 17:319-349
- Bateman, R.M. e Denholm, I. 1989. On measuring marsh-orchids. *Watsonia* 17:449-462
- Benzing, D.H. 1981. Why is Orchidaceae so large, its seeds so small and its seedlings mycotrophic? *Selbyana* 5:241-242
- Borba, E.L. no prelo. Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution*.
- Brieger, F.G. 1961. A evolução filogenética nos trópicos. *In*: Cadeira de Citologia e Genética Geral da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (F.G. Brieger et al. (coords.)). Atas do Primeiro Congresso Sul-Americano de Genética: pp. 154-161
- Brieger, F.G. 1976. On the orchid system: general principles and the distinction of subfamilies. *Proceedings of the 8th World Orchid Conference (1975)*: 488-504
- Carlini, L.A. 1996. Estudo dos padrões de variabilidade intra e interespecífica em *Miltonia* Ldl. (Orchidaceae). Tese de Mestrado, ESALQ-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Catling, P.M. 1990. Auto-pollination in the Orchidaceae. *In*: Arditti, J. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. Vol 5. Timber Press, Portland.
- Chacur, F. 1973. Análise da variação e da taxonomia no gênero *Brassavola* R. Br. (Orchidaceae-Epidendrineae). Tese de Doutorado. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto
- Charanasri, U. e Kamemoto, H. 1977. Self incompatibility in the *Oncidium* alliance. *Hawaii Orchid Journal* 6:12-15
- Chase, M.W. e Palmer, J.D. 1993. Floral morphology and chromosome number in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae): evolutionary insights from a phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site variation. *In*: Soltis, P.S.; Soltis, D.E. e Doyle, J.J. *Molecular Systematics of Plants*. Chapman e Hall, New York, pp. 324-339

- Cox, A.V.; Pridgeon, A.M.; Albert, V.A.; Chase, M.W. 1997. Phylogenetics of the slipper orchids (Cypripedioideae, Orchidaceae): nuclear rDNA sequences. *Plant Systematics and Evolution* 208:197-223
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Darwin, C. 1862. The various contrivances by which orchids are fertilised by insects. John Murray, London.
- Dressler, 1990. The orchids: natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge.
- Dressler, 1993. Phylogeny and classification of the orchid family. Dioscorides Press, Portland
- Dressler, R.L. e Chase, M.W. 1995. Whence the orchids? *In*: Rudall, P.J.; Cribb, P.J.; Cutler, D.F.; Humphries, C.J. Monocotyledons: systematics and evolution. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 217-226
- Dufrêne, M.; Gathoye, J-L.; Tyteca, D. 1991. Biostatistical studies on western european *Dactylorhiza* (Orchidaceae) - the *D. maculata* group. *Plant Systematic and Evolution* 175:55-72
- Farrell, L. e Farrington, R. 1989. The Nature Conservancy Council and orchid conservation. *In*: Pritchard, H.W. Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 147-151
- Hamrick, J.L. e Godt, M.J.W. 1990. Allozyme diversity in plant species. *In*: Brown, A.D.H.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L.; Weir, B.S. Plant Population, genetics, breeding and genetic resources. Sinauer Associates, Sunderland. pp. 43-63
- Holttum, R. 1960. The ecology of tropical epiphytic orchids. Proceedings of the Third World Orchid Conference, pp. 196-203
- Johansen, B. 1990. Incompatibility in *Dendrobium* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 103:165-196
- Kores, P.J.; Cameron, K.M.; Molvray, M.; Chase, M.W. 1997. The phylogenetic relationships of Orchidoideae and Spiranthoideae (Orchidaceae) as inferred from *rbcL* plastid sequences. *Lindleyana* 12:1-11
- Koopowitz, H. 1986. A gene bank to conserve orchids. *American Orchid Society Bulletin* 55:247-250
- Koopowitz, H. e Thornhill, A. 1994. Gene banking and orchid seeds. *American Orchid Society Bulletin* 63:1383-1386.
- Martins, P.S. 1967. Análise de clines e revisão taxonômica da espécie *Miltonia spectabilis* Ldl. (Orchidaceae-Oncidieae). Tese de Mestrado, ESALQ-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Martins, P.S. 1970. Estudo da variação intra-específica no gênero *Miltonia* Ldl. (Orchidaceae-Oncidiae). Tese de Doutorado. ESALQ-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Miller, D.; Warren, R.; Miller, I.M. 1994. Orchids of the high mountain atlantic rain forest in southeastern Brazil: a field and hobbyist guide. Salamandra Consultoria Editorial S.A., Rio de Janeiro
- Nilsson, L.A. 1993. Orchid pollination biology. *Trends in Ecology and Evolution* 7:255-289

- Peakall, R. e Beattie, A.J. 1991. The genetic consequences of worker ant pollination in a self-compatible, clonal orchid. *Evolution* 45:1837-1848
- Pritchard, H.W. 1986. Orchid seed storage at the Royal Botanic Gardens, Kew, England. *Orchid Research Newsletter* 7:18
- Resende, R.M.S. 1991. Aplicação de técnicas de análise multivariada e eletroforese de isoenzimas em estudos de relações fenéticas no gênero *Laelia* seção *Parviflorae*. Tese de Mestrado, ESALQ-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Romero, G.A. e Nelson, C.E. 1986. Sexual dimorphism in *Catasetum* orchids: forcible pollen emplacement and male flower competition. *Science* 232:1538-1540
- Rossi, W.; Corrias, B.; Arduino, P.; Cianchi, R.; Bullini, L. 1992. Gene variation and gene flow in *Orchis morio* (Orchidaceae) from Italy. *Plant Systematics and Evolution* 179:43-58
- Scacchi, R.; Lanzara, P.; De Angelis, G. 1987. Study of electrophoretic variability in *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, *E. pallustris* (L.) Crantz and *E. microphylla* (Ehrh.) Swartz (fam. *Orchidaceae*). *Genetica* (Holanda) 72:217-224
- Scacchi, R. e De Angelis, G. 1989. Isoenzyme polymorphisms in *Gymnadenia conopsea* and its inferences for systematics within this species. *Biochemical Systematics and Ecology* 17:25-33
- Scacchi, R.; De Angelis, G.; Lanzara, P. 1990. Allozyme variation among and within eleven *Orchis* species (fam. *Orchidaceae*), with special reference to hybridizing aptitude. *Genetica* (Holanda) 81:143-150
- Scacchi, R.; De Angelis, G.; Corbo, R.M. 1991. Effect of the breeding system on the genetic structure in three *Cephalanthera* spp. (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 176:53-61
- Thornhill, A. e Koopowitz, H. 1992. Viability of *Disa uniflora* Berg (Orchidaceae) seeds under variable storage conditions: is orchid gene-banking possible? *Biological Conservation* 62:21-27
- Tyteca, D. e Dufrière, M. 1994. Biostatistical studies of Western European allogamous Populations of the *Epipactis helleborine* (L) Crantz species group (Orchidaceae). *Systematic Botany* 19:424-442
- van den Berg, C. 1996. Estudo dos padrões de variabilidade intra e interespecífica em espécies brasileiras de *Cattleya* Lindley (Orchidaceae-Laeliinae). Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.
- van den Berg, C. e Martins, P.S. 1998. Biogeography of Brazilian *Cattleyas*: geographic distribution, morphological variability, evolutionary and taxonomic consequences. In: C.E.B. Pereira. *Proceedings of the 15th World Orchid Conference*. *Naturalia Publications*, Turriers, France pp. 315-320.
- van der Pijl, L. e Dodson, C.H. 1966. *Orchid flowers: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables
- Warren, R. 1989. A private conservation project in the coastal rainforest in Brazil: the first ten years. In: Pritchard, H.W. *Modern methods in orchid conservation: the role of physiology, ecology and management*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 153-158.

- Warren, R. e Miller, D. 1992. Re-establishment of *Laelia crispa* I. American Orchid Society Bulletin 61:146-149
- Warren, R. e Miller, D. 1993. Re-establishment of *Laelia crispa* II. American Orchid Society Bulletin 62:386-389