

**UNIwersYTET PRZYRODnicZY W LUBLINIE**  
**WYDZIAŁ OGRODnicTWA I ARCHITeKTURY KRAJOBRAZU**



**mgr inż. Agata Pacek-Bieniek**

**Budowa i aktywność elajoforów w kwiatach  
wybranych gatunków z rodziny storczykowatych  
(Orchidaceae)**

**Praca doktorska  
wykonana w Katedrze Botaniki  
pod kierunkiem  
dr hab. Małgorzaty Stpiczyńskiej, prof. nadzw. UP**

Lublin 2011

*dr hab. Małgorzacie Stpiczyńskiej, prof. nadzw. UP  
promotorowi i opiekunowi naukowemu  
składam najszczerze podziękowania  
za opiekę, dobre rady i wsparcie naukowe  
w czasie prac eksperymentalnych i redakcji niniejszej pracy*

*prof. Elżbiecie Weryszko-Chmielewskiej  
oraz wszystkim Pracownikom Katedry Botaniki  
za życzliwość i miłą atmosferę pracy*

*całemu Zespołowi Ogrodu Botanicznego UMCS w Lublinie  
a w szczególności dr Grażynie Szymczak  
za cenne wskazówki oraz opiekę nad storczykami*

*dr Michałowi Rudasiowi  
za przekazanie olbrzymiej wiedzy z dziedziny  
mikroskopii świetlnej i elektronowej  
oraz fachową pomoc*

*mgr Grażynie Siemińskiej  
za pomoc w zrealizowaniu badań nad  
*Phymatidium falcifolium**

*dr Agnieszce Najdzie  
za wsparcie w analizach statystycznych*

.....

*Mężowi  
za towarzystwo podczas wypraw na wystawy  
storczyków w Łodzi i przekazanie wiedzy  
z dziedziny obróbki graficznej zdjęć*

*Rodzicom i Bratu  
za wsparcie nie tylko duchowe ale i finansowe  
w czasie wykonywania tej pracy*

**Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2010/2011 jako projekt badawczy.**

**Niniejsza praca doktorska została wykonana w latach 2006-2010 w Katedrze Botaniki Wydziału Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie i była częściowo finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego z grantu badawczego promotorskiego Nr N N303 602938 oraz ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, Budżetu Państwa i Budżetu Samorządu Województwa Lubelskiego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Priorytetu VIII, Działania 8.2 Transfer Wiedzy, Poddziałania 8.2.2 Regionalne Strategie Innowacji.**



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI





## Spis treści

<b>1. WSTĘP I CEL PRACY .....</b>	<b>9</b>
<b>2. PRZEGLĄD LITERATURY .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Budowa kwiatu storczyków .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2. Hodowla i uprawa storczyków .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3. Systemy zapylania storczyków .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4. Nagrody oferowane zapylaczom .....</b>	<b>30</b>
2.4.1. Nektar.....	31
2.4.2. Olejki eteryczne .....	35
2.4.3. Tłuszcze .....	39
2.4.4. Woski i żywice.....	46
2.4.5. Pseudopyłek i włoski jadalne.....	49
<b>2.5. Mimikra i pseudokopulacja.....</b>	<b>51</b>
<b>3. MATERIAŁ I METODY.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1. Materiał roślinny .....</b>	<b>55</b>
3.1.1. <i>Gomesa echinata</i> (Barb.Rodr.) M.W.Chase & N.H.Williams .....	55
3.1.2. <i>Gomesa radicans</i> (Rchb.f.) M.W.Chase & N.H.Williams .....	56
3.1.3. <i>Gomesa ranifera</i> (Lindl.) M.W.Chase & N.H.Williams .....	57
3.1.4. <i>Oncidium cheiophorum</i> Rchb.f. ....	57
3.1.5. <i>Oncidium ornithorhynchum</i> Kunth.....	58
3.1.6. <i>Ornithocephalus ciliatus</i> Lindl. ....	59
3.1.7. <i>Ornithocephalus gladius</i> Hook.....	60
3.1.8. <i>Phymatidium falcifolium</i> Lindl. ....	60
3.1.9. <i>Sigmatostalix amazonica</i> Schltr.....	61
3.1.10. <i>Sigmatostalix oxyceras</i> Königler & J.G. Weinm.bis .....	61
3.1.11. <i>Zygostates grandiflora</i> (Lindl.) Mansf. ....	62
3.1.12. <i>Zygostates lunata</i> Lindl.....	62
<b>3.2. Systematyka i taksonomia .....</b>	<b>63</b>
<b>3.3. Metody badawcze .....</b>	<b>66</b>
3.3.1. Obserwacje makroskopowe .....	67

3.3.2.	Badanie receptywności znamion .....	68
3.3.2.1.	Test Peroxtesmo Ko .....	68
3.3.2.2.	Zdolność kiełkowania łagiewek pyłkowych na znamieniu .....	68
3.3.3.	Przygotowanie materiału do badań anatomicznych i ultrastrukturalnych.....	69
3.3.4.	Przygotowanie preparatów półcienkich i ultracienkich.....	70
3.3.5.	Testy histochemiczne tkanki wydzielniczej (elajoforów) .....	71
3.3.5.1.	Test na obecność nierozpuszczalnych polisacharydów .....	71
3.3.5.2.	Test na obecność tłuszczów .....	71
3.3.6.	Przygotowanie materiału do obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM).....	72
3.3.7.	Pomiary kwiatów i elajoforów.....	72
3.3.8.	Morfometria komórek wydzielniczych.....	73
3.3.9.	Określenie masy wydzielonego tłuszczu .....	74
3.3.10.	Analizy statystyczne .....	75
<b>4.</b>	<b>REZULTATY .....</b>	<b>76</b>
<b>4.1.</b>	<b><i>Gomesa echinata</i> (Barb.Rodr.) M.W.Chase &amp; N.H.Williams .....</b>	<b>76</b>
4.1.1.	Stadium pąka.....	76
4.1.2.	Początek antezy.....	78
4.1.3.	Końcowe stadium antezy .....	79
4.1.4.	Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu .....	80
<b>4.2.</b>	<b><i>Gomesa radicans</i> (Rchb.f.) M.W.Chase &amp; N.H.Williams.....</b>	<b>81</b>
4.2.1.	Stadium pąka.....	81
4.2.2.	Początek antezy.....	82
4.2.3.	Końcowe stadium antezy .....	83
4.2.4.	Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu .....	84
<b>4.3.</b>	<b><i>Gomesa ranifera</i> (Lindl.) M.W.Chase &amp; N.H.Williams.....</b>	<b>85</b>
4.3.1.	Stadium pąka.....	85
4.3.2.	Początek antezy.....	86
4.3.3.	Końcowe stadium antezy .....	87

4.3.4.	Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu .....	88
<b>4.4.</b>	<b><i>Oncidium cheiroporum</i> Rchb.f. ....</b>	<b>89</b>
4.4.1.	Stadium pąka.....	89
4.4.2.	Początek antezy.....	90
4.4.3.	Końcowe stadium antezy .....	91
4.4.4.	Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu .....	93
<b>4.5.</b>	<b><i>Oncidium ornithorhynchum</i> Kunth .....</b>	<b>93</b>
4.5.1.	Stadium pąka.....	94
4.5.2.	Początek antezy.....	95
4.5.3.	Końcowe stadium antezy .....	96
4.5.4.	Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu .....	98
<b>4.6.</b>	<b><i>Ornithocephalus ciliatus</i> Lindl. ....</b>	<b>98</b>
4.6.1.	Stadium pąka.....	99
4.6.2.	Początek antezy.....	100
4.6.3.	Końcowe stadium antezy .....	101
4.6.4.	Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu .....	102
<b>4.7.</b>	<b><i>Ornithocephalus gladiatus</i> Hook. ....</b>	<b>102</b>
4.7.1.	Stadium pąka.....	103
4.7.2.	Początek antezy.....	104
4.7.3.	Końcowe stadium antezy .....	105
4.7.4.	Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu .....	106
<b>4.8.</b>	<b><i>Phymatidium falcifolium</i> Lindl. ....</b>	<b>106</b>
4.8.1.	Stadium pąka.....	107
4.8.2.	Początek antezy.....	108
4.8.3.	Końcowe stadium antezy .....	108
4.8.4.	Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu .....	109

<b>4.9. <i>Sigmatostalix amazonica</i> Schltr. ....</b>	<b>109</b>
4.9.1. Stadium pąka.....	110
4.9.2. Początek antezy.....	110
4.9.3. Końcowe stadium antezy .....	111
4.9.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu .....	112
<b>4.10. <i>Sigmatostalix oxyceras</i> Königer &amp; J.G. Weinm.bis .....</b>	<b>113</b>
4.10.1. Stadium pąka.....	113
4.10.2. Początek antezy.....	114
4.10.3. Końcowe stadium antezy .....	115
4.10.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu .....	116
<b>4.11. <i>Zygostates grandiflora</i> (Lindl.) Mansf. ....</b>	<b>117</b>
4.11.1. Stadium pąka.....	117
4.11.2. Początek antezy.....	118
4.11.3. Końcowe stadium antezy .....	119
4.11.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu .....	120
<b>4.12. <i>Zygostates lunata</i> Lindl.....</b>	<b>121</b>
4.12.1. Stadium pąka.....	121
4.12.2. Początek antezy.....	122
4.12.3. Końcowe stadium antezy .....	123
4.12.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu .....	124
<b>5. DYSKUSJA.....</b>	<b>125</b>
<b>6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI .....</b>	<b>145</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>148</b>
<b>ANEKS NR 1. Fotografie</b>	
<b>ANEKS NR 2. Skróty stosowane do oznaczeń na fotografiach</b>	
<b>ANEKS NR 3. Opisy fotografii</b>	
<b>ANEKS NR 4. Tabele</b>	

## 1. WSTĘP I CEL PRACY

Bogactwo kolorów oraz wyszukane kształty kwiatów storczyków sprawiają, iż te rośliny ozdobne cieszą się coraz większym zainteresowaniem hodowców, zarówno w Polsce jak i w Europie. Obecnie uprawa storczyków w Polsce i na całym świecie to wielka gałąź produkcji roślin ozdobnych. O rozpowszechnieniu uprawy orchidei zadecydowało opracowanie metod skutecznego ich rozmnażania z nasion i tkanek w kulturze *in vitro*. Metody te są bardziej efektywne i szybsze niż konwencjonalne sposoby hodowli storczyków. W warunkach naturalnych owoce i nasiona zawiązują się rzadko ze względu na skrajnie wyspecjalizowane systemy zapylania. Kwiaty takich storczyków oferują zapylaczom różnego rodzaju nagrody. Najczęściej jest to nektar, rzadziej olejki eteryczne, żywice, woski i tłuszcze.

Tłuszcze wydzielane są przez struktury gruczołowe zwane elajoforami, które mogą być położone na doosiowej powierzchni *labellum*, kalusie czy kolumnie. U storczyków są to zarówno elajofory typu epitelialnego, jak i trichomowego. Elajofory epitelialne tworzy zwarta grupa epidermalnych komórek wydzielniczych, natomiast w przypadku elajoforów trichomowych są to włoski wydzielnicze jedno lub wielokomórkowe.

Wydzielony tłuszcz zbierany jest głównie przez samice pszczoł z rodziny Apidae (plemiona: Centridini, Ctenoplectrini, Tapinotaspidini, Tetrapediini) oraz Melittidae i służy jako źródło pokarmu lub uszczelnienie gniazda.

Niewiele wiadomo na temat budowy elajoforów, a dotychczas zbadane zostały w mniejszym lub większym stopniu epitelialne elajofory u kilku gatunków z rodziny Orchidaceae: *Oncidium paranaense*, *Oncidium ornithorhynchum*, *Rudolfiella picta*, *Trichocentrum cavendishianum*, *Oncidium loefgrenii*, *Gomesa recurva*, *Gomesa bifolia*, *Oncidium trulliferum*, *Ornithophora radicans* i *Cohniella ascendens* oraz trichomowe elajofory jedynie u *Grobya amherstiae*.

Dlatego też dane dotyczące struktury elajoforów są nadal niewystarczające, a powiązanie ich z danymi filogenetycznymi może być istotne w poznaniu ewolucji storczyków i ich systemów zapylania. Szczegóły budowy elajoforów mogą być istotnymi cechami taksonomicznymi u Oncidiinae.

Celem pracy jest zbadanie budowy morfologicznej, anatomicznej i ultrastruktury elajoforów u wybranych dwunastu gatunków z rodziny Orchidaceae tj. *Gomesa echinata* (Barb.Rodr.) M.W.Chase & N.H.Williams, *Gomesa radicans* (Rchb.f.) M.W.Chase & N.H.Williams, *Gomesa ranifera* (Lindl.) M.W. Chase & N.H. Williams, *Oncidium cheirophorum* Rchb.f, *Oncidium ornithorhynchum* Kunth, *Ornithocephalus ciliatus* Lindl, *Ornithocephalus gladius* Hook, *Phymatidium falcifolium* Lindl, *Sigmatostalix amazonica* Schltr, *Sigmatostalix oxyceras* Königer & J.G. Weinm.bis, *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf, *Zygostates lunata* Lindl, natywnych wyłącznie dla krajów Ameryki Południowej lub/i Ameryki Środkowej, oraz zbadanie korelacji pomiędzy stadium antezy i receptywności znamion a okresem aktywności wydzielniczej tych gruczołów.

## 2. PRZEGLĄD LITERATURY

### 2.1. Budowa kwiatu storczyków

Mianem „storczyk” lub „orchidea” potocznie nazywana jest każda roślina zaliczana do rodziny storczykowatych. Orchidaceae to największa i najbardziej różnorodna spośród wszystkich rodzin roślin kwitnących. Według “World Checklist of Selected Plant Families” zarejestrowanych jest dokładnie 26 049 gatunków (Kew Royal Botanic Gardens, 2009). Natomiast Singh i in. (2007) twierdzą, że na storczykowate składa się ok. 35 000 gatunków należących do ok. 800 rodzajów. Z ewolucyjnego punktu widzenia jest to bardzo młoda rodzina botaniczna, która jest obecnie w stadium intensywnego rozwoju i specjacji. Osady ze szczątkami *Dendrobium* i *Earina* szacuje się na ok. 15-20 milionów lat, podczas gdy większość roślin kwiatowych liczy sobie ponad 130 milionów lat lub nawet 215 milionów, jak podają najnowsze badania (Conran i in. 2009; Smith i in. 2010). Pomimo tak młodego wieku, z punktu widzenia ewolucji osiągnęły jednak bardzo wysoki stopień specjalizacji, plasując się na szczycie drabiny ewolucyjnej, zwłaszcza pod względem przystosowania się do zapylania przez zwierzęta, czyli tzw. zoogamii (zooidiogamii). Dowodem tego jest bardzo duża zmienność kwiatów, których wielkość waha się od kilku milimetrów do kilkudziesięciu centymetrów oraz kształtu i zestawu kolorów poszczególnych ich części (Conran i in. 2009; Smith i in. 2010).

Najmniejszym gatunkiem storczyka jest *Platystele jungermannioides* (Schltr.) Garay, którego kwiaty są mniejsze od główki szpilki, a długość całego kwiatostanu to zaledwie 5 mm. Gatunek ten zasiedla lasy Ameryki Środkowej. Z kolei największe kwiaty występują u *Cattleya warscewiczii* – również amerykańskiego gatunku, których średnica wynosi 30 cm. Najbardziej masywną rośliną osiągającą nawet 3 m długości i ponad jedną tonę świeżej masy jest *Grammatophyllum speciosum* Blume rosnący w południowej Azji (Szlachetko i Skakuj 1996; Fitch 2004; la Croix 2008).

Kwiaty storczyków występują pojedynczo lub w kwiatostanach. Zwykle są to grona lub kłosa. Okwiat jest najczęściej zygomorficzny (grzbiecisty) i składa się z sześciu listków (*tepala*) okwiatu ułożonych w dwóch okółkach: trzy listki zewnętrzne (*sepala*) i trzy wewnętrzne (*petala*). Jeden z listków okółka wewnętrznego zwany warżką (*labellum*) często jest większy od pozostałych sześciu listków okwiatu i może spełniać funkcję „ładowiska” dla zapylaczy. Warżka wyróżniać się może nie tylko wielkością, ale i barwą, kształtem lub obecnością różnego rodzaju narośli czy też włosków. U niektórych rodzajów jak np. kruszczyk (*Epipactis*) czy buławnik (*Cephalanthera*) w obrębie warżki wyróżnia się część nasadową – tzw. hipochil oraz część końcową – tzw. epichil. Odcinek przejściowy między obiema częściami bywa czasem wyróżniany jako tzw. mezochil. Warżka może być jednolita – niepodzielona na części tzw. łatki warżki (np. wyblin jednolistny *Malaxis monophyllos*), dwudzielna (np. listera jajowata *Listera ovata*), trójdzielna (np. koślaczek stożkowaty *Anacamptis pyramidalis*) lub trójdzielna, ze środkową łatką dodatkowo podzieloną na dwie części (np. storczyk kukawka *Orchis militaris*). Są też gatunki storczyków, których *labellum* jest mniejsze od pozostałych listków okwiatu lub nie odróżnia się od nich wcale. Przykładem jest *Aerangis arachnopus* (Rchb. f.) Schltr. czy *Mystacidium capense* (L.f.) Schltr, gdzie warżka ma ten sam biały kolor i podobny kształt do pozostałych listków okwiatu. W przypadku *Alamania punicea* Lexarza *labellum* nie odróżnia się kolorem, ale jest mniejsze niż listki okółka zewnętrznego (Rasmussen 1985; Buttler 1986; Szlachetko i Skakuj 1996; Nowicka-Falkowska i Falkowski 2005; la Croix 2008).

Kwiaty storczyków znane są z ogromnego bogactwa barw – od białego, przez żółty, pomarańczowy, zielony, czerwony, niebieski, fioletowy, brązowy, do purpurowoczarne. Podobna różnorodność dotyczy morfologii i kształtu okwiatu. Listki okwiatu mogą być znacznie wydłużone i wąskie, jak np. u *Acianthus caudatus* R. Parsons, *Bulbophyllum medusae* (Lindl.) Rchb. f, *Brassavola cucullata* (L.) R. Br, *Brassia longissima* (Rchb. f.) Schltr, *Dendrobium tetragonum* A. Cunn, *Restrepia* sp. czy *Masdevallia* sp, której listki okwiatu są



owalne i szerokie, a zwężające się w końcowej ich części. Charakterystyczny okwiat występuje również u *Dendrobium harveyanum* Rchb. f, *D. brymerianum* Rchb. f, *D. chrysotoxum* Lindl, *Platanthera ciliaris* (L.) Lindl, *P. grandiflora* (Bigelow) Lindl, *Pecteilis susannae* (L.) Raf. czy *Sievekingia reichenbachiana* Rolfe, których listki okwiatu są postrzępione. Taśmowate i spiralnie skręcone spotykane są u *Dendrobium discolor* Lindl, *D. tangerinum* P. J. Cribb, *D. spectabile* (Blume) Miquel, *Prosthechea cochleata* (L.) W. E. Higgins, *Schomburgkia* sp. i *Paphiopedilum* sp. (la Croix 2008).

*Labellum* może ulegać dodatkowo innym modyfikacjom, i tak np. u dwulistnika (*Ophrys*) przypomina samice owadów zwabiając tym samym samce lub tworzy pułapkę jak u *Cypripedium*, *Phragmipedium*, *Paphiopedilum* czy *Coryanthes*. Ponadto u nasady *labellum* może wykształcać się uchylek zwany ostrogą, który często wytwarza i gromadzi wydzielony nektar. Ostrogi mogą mieć różną długość i kształt (Rasmussen 1985; Buttler 1986; Szlachetko i Skakuj 1996; Nowicka-Falkowska i Falkowski 2005). Ta najdłuższa mierzy ok. 30 cm i występuje u *Angraecum sesquipedale* Thouars. U niektórych gatunków z rodzaju *Jumellea* i *Rangaeris* ostrogi osiągają ok. 15 cm. Krótsze występują u *Aerangis*, *Gymnadenia*, *Platanthera*, *Habenaria*, *Eulophia* (la Croix 2008).

U większości gatunków storczyków obserwuje się zjawisko resupinacji czyli skręcania kwiatów wokół własnej osi. Obraca się załącznia lub szypułka i zazwyczaj dochodzi do tego z powodu grawitacji. W wyniku tego procesu warzka staje się najniższym położonym listkiem okwiatu i może stanowić ewentualne lądowisko dla zapylaczy (Kull i Arditti 2002; Fisher i in. 2007).

W kwiatkach nieskręconych, np. u polskiego storzaka bezlistnego (*Epipogium aphyllum* Sw.), warzka skierowana jest ku górze. Podobnie jest u roślin, których kwiaty skręcają się o 360°. Najczęściej jednak kąt skręcenia wynosi ok. 180°, co sprawia, że warzka skierowana jest do dołu. W przypadku, kiedy zwrócona jest w bok skręt kwiatu wynosi 90°, czego przykładem jest również rodzimy lipiennik (*Liparis loeselii*; Szlachetko i Skakuj 1996; Nowicka-Falkowska i Falkowski 2005).

Kwiaty storczyków są w większości kwiatami obupłciowymi. Mniej lub bardziej wyraźny dymorfizm seksualny występuje w kwiatach *Catasetum* oraz *Cycnoches*. Kwiaty żeńskie i męskie u tych rodzajów mogą występować na kwiatostanie różnych lub tych samych roślin. Decydują o tym warunki klimatyczne, w których one dojrzewają. Jest to również czynnik warunkujący płęć kwiatu. Kwiaty męskie i żeńskie *Catasetum* sp. dalece różnią się kształtem i kolorem. Kwiaty żeńskie są żółto-zielone, natomiast męskie kolorowe. Budowa kwiatów męskich *Catasetum ochraceum* Lindl. pozwala na skuteczną depozycję dużego, ciężkiego *pollinarium* na tułowi owada. Awersja zapylacza do odwiedzin tych kwiatów skłania go do odwiedzania kwiatów żeńskich, co tym samym sprzyja zapyleniu. Spowodowało to prawdopodobnie powstanie konkurencji pomiędzy kwiatami męskimi i powstanie dymorfizmu (Romero i Nelson 1986).

Kwiaty storczyków to kwiaty górne o dolnej zalążni, powstającej z trzech owocolistków. Oznacza to, że jest ona zrosnięta z wklęsłym dnem kwiatowym i znajduje się poniżej okwiatu. Cechą charakterystyczną struktur płciowych jest połączenie pręcika lub pręcików z szyjką i znamieniem słupka w jedną całość, tzw. prętosłup (*gynostemium*, kolumna). Stopień zrosnięcia tych struktur jest różny w zależności od danej grupy storczyków. Np. u *Diseae* pręcik jest całkowicie zrosnięty z szyjką słupka tak, że nie widać granicy pomiędzy nimi. Natomiast u większości *Epidendroideae*, pręcik jest tylko lekko połączony z krótkim filamentem, który odpada, kiedy *pollinia* zostają zdeponowane na ciele owada. Podstawa kolumny w wielu przypadkach jest jednocześnie punktem osadzenia warżki i listków okwiatu tworząc stopę kolumny np. *Bifrenariinae*, *Maxillariinae*, *Lycastinae* (Davies i Stpiczyńska 2006).

Strukturą, która może je również łączyć jest *tabula infrastigmatica*, występująca u niektórych *Oncidiinae* np. u *Oncidium ornithorhynchum* Kunth. Zewnętrzne listki okwiatu oraz stopa kolumny mogą formować także tzw. *mentum*, np. *Aeranthes* sp, *Eria* sp. (Hermans i Bossler 2003; Bajracharya i Shrestha 2004). Liczba płodnych pręcików w kwiatach storczyków jest

zredukowana i może być różna w poszczególnych grupach storczyków. Stąd też budowa morfologiczna pręcikowia odgrywa istotną rolę w ich klasyfikacji. U obuwiowych (Cyripedioideae) płodne są tylko dwa pręciki okółka wewnętrznego. Jednak u zdecydowanej większości gatunków płodny pozostaje tylko jeden pręcik z okółka zewnętrznego. Pozostałe, według najprostszej interpretacji ulegają przekształceniu w bezpłodne prątniczki (*staminodia*), które mogą mieć postać wyrostków (*stelidia*), okrągławych struktur (*auricles*), skrzydełek (*wings*) czy innych dodatkowych struktur (*appendices*) znajdujących się po bokach kolumny lub u jej podstawy w postaci wybrzuszeń tzw. *bulges* (Kull i Arditti 2002). Płodny pylnik najczęściej zawiera dwa worki pyłkowe. W każdym z worków pyłkowych znajduje się jedna pyłkowina (*pollinium*). Tworzą ją ziarna pyłku złączone są ze sobą balsamem pyłkowym lub elastowiscyną. U większości gatunków ziarna pyłku zgrupowane są w tetrady. Monady występują m.in. u Apostasioideae i Cyripedioideae. Sypki pyłek często utożsamiany jest z pojęciem pyłkownin miękkich (*soft pollinia*), jakie występują np. u *Phragmipedium* sp. czy *Vanilla* sp. W wyniku tworzenia wtórnych przegród w pylniku liczba pyłkownin może się zwiększać. Pyłkowina zwykle jest woskowata, chrząstkowata lub bardzo twarda (*hard pollinia*). W kwiatkach niektórych storczyków spotykane są pyłkowiny pakietowe (*sectile*). Pakiety zbudowane są z mniejszych podjednostek, jakimi są *massule*. Te natomiast składają się z tetrad pyłkowych połączonych ze sobą cienką warstwą kalozy, pasmami elastowiscyny lub wspólnymi ścianami komórkowymi. Owad zaopatrzony w pyłkowiny pakietowe (*sectile*) może jedną pyłkowiną zapylić kilka kwiatów tj. średnio 6,6 kwiatów *Orchis mascula* L. i 13,8 *Platanthera chlorantha* (Custer), ponieważ *pollinia* łatwo rozpadają się i poszczególne pakiety przyklejają się do lepkiego znamienia. Pyłkowiny woskowe i chrząstkowe deponowane są na znamieniu w całości, dlatego owad może nimi zapylić tylko pojedyncze kwiaty. Jedno *pollinium* może zawierać od 5500 ziaren pyłku u buławnika mieczolistnego *Cephalanthera longifolia* (L.) Fritsch do 400 000 u *Coryanthes senhasiana* G. Gerlach (Johnson i Edwards 2000, Pacini 2000).

Ziarna pyłku są długo żywotne, dlatego też mogą być przenoszone na dalekie odległości, co nie wpływa lub ma znikomy wpływ na wydajność zawiązywania owoców. Spowodowane jest to tym, że storczyki rzadko występują w dużych grupach, w związku z tym, aby zapylacz mógł odwiedzić kolejny kwiat musi pokonać czasem długą drogę. W przypadku *Dactylorhiza purpurella* (T. Stephenson & T.A. Stephenson) Soó pyłek utrzymuje zdolność do kiełkowania aż 51 dni (Neiland i Wilcock 1995).

Płonny odcinek między workami pyłkowymi to łącznik, który często jest w szczytowej części powiększony i pokrywa całą lub część główki tworząc kieszonkowatą otoczkę tzw. czapczkę (*anther cap*). *Pollinia* są połączone z lepką częścią *rostellum* zwaną *viscidium*, tworząc całość tzw. *pollinarium* i w takiej postaci przenoszone przez zapylacza. Gdy zapylaczami są ptaki, *pollinarium* deponowane jest najczęściej na dziobie lub głowie, w przypadku motyli na oczach lub trąbce, a na tułowiu u pszczołowatych (Apidae). *Pollinium* może być przytwierdzone do *viscidium* pasmem sporegennej tkanki (*caudicula*) lub trzonkiem (*stipe*) pochodzenia znamieniowego (odróżnicowany z *rostellum*). Jeśli trzonek jest utworzony z pasma komórek epidermalnych, określany jest, jako *tegula* (u większości Vandoideae), natomiast, gdy stanowi zakrzywioną część *rostellum*, nazywany jest *hamulus*. Taki rodzaj trzonka występuje u niektórych Neottieae, Diurideae i kilku gatunków z rodzaju *Bulbophyllum* (Rasmussen 1985; Dressler 1993).

W rodzinie storczykowatych występuje znamię typu mokrego. Jego receptywna powierzchnia pokryta jest różnego rodzaju papillami. Budowa znamienia skorelowana jest z budową pyłkowiny (Heslop-Harrison i Shivanna 1977; Dannenbaum i in. 1989). Twarde *pollinia* deponowane są na znamionach wgłębionych, pokrytych warstwą gęstej wydzieliny, natomiast *pollinia* pakietowe występują w kwiatach posiadających znamiona płaskie lub wręcz wypukłe (Johnson i Edwards 2000). Kwiaty storczyków są bardzo trwałe. Znamię może pozostawać receptywne aż do 50-60 dni i 5-7 dni po zapyleniu. Wydzielina znamieniowa bogata jest w tłuszcze, węglowodany i białka. Charakterystyczny

typ znamienia posiada *Dendrobium speciosum* Sm. Pokrywa je węglowodanowy, galaretowaty śluz, w którym zawieszono są pojedyncze, oderwane komórki o ultrastrukturze komórek wydzielniczych (Calder i Slater 1985; Slater i Calder 1990; Clifford i Owens 1990). Mimo braku kutykuli na powierzchni znamiona, storczyków pozostają receptywne przez długi czas (Neiland i Wilcock 1995; Stpiczyńska 2003a,b).

Szyjka słupka w kwiatach storczyków jest mniej lub bardziej szczytowo zgięta i zakończona trójdzielny znamieniem, gdzie środkowy jego płat przekształcony jest w *rostellum*. Obszar *rostellum*, na którym ułożone jest *pollinarium* nazywany jest *clinandrium* (*androklinium*, *anther bed*). Wiscydowa substancja wytwarzana jest przez wierzchołkowy fragment *rostellum*, czyli uczepek (*viscidium*, *retinaculum*). Gdy *rostellum* jest dwudzielne obecne mogą być dwa uczepek. Substancja ta wysycha po kilku minutach od kontaktu z ciałem zapylacza. Uczepek może być także pokryty cienką membraną, która pod naciskiem łatwo pęka i odsłania wtedy świeżą, lepka substancję, gotową do przyczepienia *pollinarium* do tułowia zapylacza. Usunięcie membrany indukuje proces wysychania kleistej substancji (Buttler 1986; Rasmussen 1985; Dressler 1993; Szlachetko i Skakuj 1996, Johnson i Edwards 2000; Stpiczyńska 2004; Davies i Stpiczyńska 2009).

Zalążnia jest jednokomorowa, rzadko trójkomorowa, natomiast łożysko brzeżne lub kątowe. Liczba zalążków skorelowana jest z liczbą ziaren pyłku deponowanych na znamieniu podczas zapylenia. Mała liczba ziaren pyłku w stosunku do liczby zalążków spotykana jest u gatunków auto- i kleistogamicznych, podczas gdy największa (średnio 5900:1) u gatunków ksenogamicznych. Liczba ta może być zależna również od rodzaju pyłku i sposobu jego depozycji. I tak, w przypadku pyłkowin twardych stosunek liczby ziaren pyłku do liczby zalążków wynosić może 1:2, a dla pyłkowin pakietowych 19:1. Woreczek zalążkowy jest monosporowy typu *Polygonum*, czasem bisporowy typu *Allium*. Podwójne zapłodnienie generalnie nie występuje. Wyjątkiem jest m.in. *Amitostigma kinoshitae* (Makino) Schltr. Rozwój gametofitu żeńskiego u storczyków nie

kończy się z początkiem antezy. Dopiero zapylenie inicjuje megasporogenezę, natomiast zapłodnienie następuje po uformowaniu woreczka zalążkowego, ok. 21 dni po zapyleniu u *Platanthera bifolia* (L.) Rich. (Fredrikson 1991) czy 60 dni u *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* (Lee i in. 2008). Embriogeneza zachodzi według typu Asterad lub Onagrad i trwa średnio 2 tyg. (Veyret 1974; Rasmussen 1985; Sood i Rao 1986; Fredrikson 1991; Johnson i Edwards 2000; Batygina i in. 2003). Zarodek zazwyczaj nie posiada liścienia, a komórki tworzące łupinę nasienną są martwe, puste i przeważnie przezroczyste (Veyret 1974).

Owocem u storczyków jest torebka zawierająca ogromną ilość nasion, nawet do 4 mln u *Cycnoches ventricosum* var. *chlorochilon*. Są one mikroskopijnej wielkości, ponadto są lekkie jak pyłek. Nasiono mierzy od 0,05 do 6,0 mm długości i waży od 0,31-24 µg (Arditti i Ghani 2000). Mimo dużej liczby nasion, tylko niektóre z nich kiełkują w środowisku naturalnym, a rozwój rośliny trwa aż kilka lat. Powodem tego jest nie w pełni wykształcony zarodek oraz brak tkanki odżywczej w nasieniu. Funkcję odżywiania komórek embrionalnych przejmują grzyby z rodzaju *Rhizoctonia*, żyjące w symbiozie z tymi roślinami. Strzępki grzyba przenikają łupinę nasienną i docierają do głębszych warstw komórek. Substancje pochodzące z rozkładu strzępek stają się źródłem składników odżywczych dla rozwijającego się protokormu, czyli niezróżnicowanych jeszcze komórek powstających podczas kiełkowania (Veyret 1974).

## **2.2. Hodowla i uprawa storczyków**

Z powodu mikroskopijnej wielkości nasion oraz ich symbiozy z grzybami pierwsze próby hodowli storczyków nie udawały się. Do dziś zresztą rozmnażanie ich drogą generatywną jest trudne, a ozdobne orchidee, które spotkać można w kwaciarniach, rozmnaża się najczęściej metodą *in vitro* bez pośrednictwa nasion poprzez eksplantaty łodygowe lub liściowe albo metodą asymbiotyczną, czyli za pośrednictwem nasion, ale bez udziału grzybów. Metody



te są bardziej efektywne i szybsze niż konwencjonalne metody hodowli storczyków (Chen i Chang 2004, Chen i in. 2004, Tuong i Tanaka 2004). Dzięki zastosowaniu metod hodowli *in vitro* storczyki stały się tańsze i bardziej dostępne na rynku. Ponadto metody efektywnego rozmnażania storczyków w kulturze *in vitro* stosowane są również w celu gromadzenia materiału w banku genów, jak również rozmnażania w celu zachowania gatunku. Większość storczyków na świecie objętych jest ochroną prawną. W Polsce wszystkie storczyki, czyli według „Polskiej Czerwonej Księgi Roślin” 42 gatunki, zagrożone są wyginięciem. Spowodowane jest to głównie degradacją ich naturalnych stanowisk oraz nielegalnym handlem (Każmierczakowa i Zarzycki 2001).

Efektywność rozwoju nasion w kulturach *in vitro* jest zależna od wielu czynników środowiskowych, takich jak składniki pożywki, długość i intensywność naświetlania czy temperatura (Ueda i Torikata 1970; Wang i Huang 1976; Soontornchainaksaeng i in. 2001; Kull i Arditti 2002; Moraes i in. 2005; Faria i in. 2004, Wotavová-Novotná i in. 2007; Aktar i in. 2008; Pacek i in. 2010).

Rozmnażanie oraz uprawę storczyków w kulturze *in vitro* zrewolucjonizowało odkrycie Knudsona (1922), które pokazało, że nasiona mogą kiełkować na pożywce zawierającej cukier i to bez udziału grzybów. Natomiast w 1946 roku zaproponował on nowy skład pożywki do kiełkowania nasion storczyków. Od tej pory powstało wiele typów pożywek o zróżnicowanym składzie, przeznaczonych do rozmnażania roślin w warunkach sztucznych.

Oprócz metody asymbiotycznego rozmnażania storczyków stosuje się klonowanie (mikrorozmnażanie). Wprowadzone zostało przez Georga Morela w latach 60-tych XX wieku. Klonowanie pozwala na uzyskanie dużej liczby roślin o takim samym genotypie. Wykorzystuje ono zjawisko totipotencji, czyli nieograniczone dzielenie się i odtwarzanie (regenerację) całego organizmu. Poza możliwością szybkiego rozmnażania roślin, kultura *in vitro* tkanek storczyków ma znaczenie w otrzymywaniu materiału rozmnożeniowego wolnego od

wirusów. Odgrywa też dużą rolę w hodowli twórczej nowych form i wprowadzania ich do masowego obrotu (Woźny i Przybył 2004; Oszkinis 2004; Goede 2005; Erfkamp 2009). Oprócz stosowania kultur *in vitro*, można również wykorzystać naturalną ich zdolność do rozmnażania w sposób wegetatywny. Może to być dzielenie roślin, odcinanie ukorzenionych pędów, rozmnażanie ze starych pseudobulw, ukorzenianie bocznych pędów czy sadzonkowanie (Oszkinis 2004).

Obecnie zainteresowanie hodowców storczykami jest bardzo duże a uprawa mieszańców rozwinęła się na skalę przemysłową. Jej przyczyną jest zapewne wielkie zróżnicowanie kształtów i barw kwiatów, jak również to, że niegdyś były dostępne wyłącznie dla osób zamożnych. Według badań przeprowadzonych przez Taiwan Sugar Corporation, głównego producenta na świecie, Japończycy kupują ponad 10 mln roślin rocznie, Amerykanie 15 mln a Europejczycy 5 mln. Prognozuje się, że do 2014 roku produkcja storczyków doniczkowych na świecie wzrośnie do ponad 300 mln rocznie, podczas gdy jeszcze w roku 2000 wynosiła ok. 120 mln. Taiwan Sugar Corporation specjalizuje się głównie w produkcji *Phalaenopsis* sp., które eksportowane są przede wszystkim do Japonii, USA i Europy. Wzrost produkcji storczyków obserwowany jest również w Chinach (Wang 2004). W Europie największym producentem jest Holandia, która sprzedaje ok. 12 mln sztuk rocznie. Produkowane przez „Kraj Tulipanów” storczyki trafiają do obrotu również na polskim rynku. Czołową pozycję zajmuje *Phalaenopsis* sp.

Storczyki były pierwszymi roślinami uprawianymi dla „ozdoby”. Przekazy ze starożytnych Chin podają, że Konfucjusz szczególnie cenił zapach tych kwiatów. W XVIII i XIX w. kolekcjonerzy przywozili rośliny z kolonii w południowo-wschodniej Azji. Wtedy rozpoczęła się w Europie swego rodzaju moda na storczyki, czyli tzw. „storczykomania” (Cecot 2005; Erfkamp 2009).

Hodowlę w celu uzyskania nowych odmian storczyków rozpoczął ksiądz William Herbert, który w 1847 roku wydał pracę pt. „O krzyżowaniu pomiędzy roślinami”. Hodowlą zajmował się również Robert Gallier, który w 1849 roku



doniósł, że otrzymał torebkę nasienną w wyniku skrzyżowania *D. nobile* i *D. chrysanthum* Wall. (Lindl.). Pierwszym hodowcą, któremu dało się uzyskać kwitnące rośliny z nasion, pochodzących od uzyskanych mieszańców był John Dominy w 1856 r. Pierwszy mieszańiec nosił nazwę *Calanthe x dominii*. Od 1861 roku rozpoczęto krzyżowania gatunków należących do różnych rodzajów. Pierwszym tego typu była *Goodyera x dominii*, powstała ze skrzyżowania *Goodyera discolor* (Ker-Gawl.) A. Rich. i *Dassinia marmorata*. Jego dzieło kontynuował John Seden, który otrzymał ok. 500 mieszańców. Pierwszy spis mieszańców pojawił się w 1871 roku. W kolejnych latach prowadzono jego aktualizacje. Rejestrację storczyków przez wiele lat prowadziła firma brytyjska Frederick K. Sander i Syn. Obecnie rejestrację nowych mieszańców (The International Registration Authority for Orchid Hybrids - IRAOH) prowadzi Królewskie Towarzystwo Ogrodnicze (RHS) w Londynie, które publikuje ją w okresowych biuletynach (*The Orchid Review* i *The American Orchid Society Bulletin*). Dzięki pracom hodowlanym uzyskano wiele skomplikowanych mieszańców międzygatunkowych i międzyrodzajowych. Rośliny żadnej innej rodziny nie dały mieszańców złożonych z 2, 3, 4 lub 5 różnych rodzajów. Najstarszą i największą kolekcję storczyków posiadają Królewskie Ogrody Botaniczne (Royal Botanic Gardens) w Kew koło Londynu. Kolekcja ta utworzona została w 1770 roku i liczy ok. 5 tys. gatunków, 400 tys. odmian zielnikowych i ok. 2500 gatunków w banku genów. Pierwszym dyrektorem, który znacznie poszerzył kolekcję był William J. Hooker. Z ogrodami w Kew związane były ponadto takie osobowości jak George Bentham, John Lindley, Joseph Dalton Hooker czy Robert Allen Rolfe, które na stałe wpisały się w historię badań nad usystematyzowaniem i opisem nowych gatunków storczyków (Oszkinis 2004, Kew Royal Botanic Gardens).

Jedynym storczykiem wykorzystywanym w przemyśle spożywczym jest *Vanilla* sp, uprawiana od dawna, jako roślina przyprawowa. W celu zmniejszenia kosztów produkcji stosuje się często syntetycznie wytworzoną wanilinę.

Wanilia oprócz rośliny przyprawowej pełni jeszcze inną funkcję. Stosowana jest w diagnostyce choroby Alzheimera (pacjenci chorzy na tę chorobę nie czują zapachu wanilii) oraz jako lek redukujący wymioty będące efektem ubocznym chemioterapii. Posiada ona także właściwości antybakteryjne. Ze względu na zastosowanie lecznicze surowce pochodzące ze storczyków dzieli się na kilka grup. Największą stanowią storczyki dostarczające leczniczych korzeni. Surowiec pozyskiwany z ususzonych i zmielonych organów podziemnych, głównie *Orchis mascula* Linne i *Orchis militaris* Linne (storczyk kukawka) nazywa się *salep* (*salepi*, *sahlep*, *sahlab*). Proszek ten dostępny jest w greckich, egipskich, tureckich i libańskich sklepach. Salep, ze względu na zawartość glukomannanu (błonnik roślinny), działa łagodnie przeczyszczająco. Ponadto wykorzystywany jest do produkcji lodów, puddingów, napojów lub jako dodatek do herbaty i kawy. W medycynie chińskiej natomiast stosowany jest w chorobach płuc i brzucha proszek uzyskiwany z wysuszonych i zmielonych korzeni storczyka japońskiego *Bletilla striata* (*Bletilla asiatica*). Redukuje także opuchliznę i krwawienia wewnętrzne płuc czy brzucha np. krwawienia z wrzodów, pomaga też przy pęknięciach skóry. W Chinach sprzedawany jest także preparat o nazwie „Shihu”, uzyskiwany z kilku gatunków *Dendrobium*. Jest on zalecany przy rozwolnieniach i przy niedoborze białych krwinek. Najbardziej powszechnym gatunkiem storczyków używanym do produkcji tych preparatów jest *Dendrobium nobile* Lindl. (Bulpitt 2005; Drobnik 2007, Bulpitt i in. 2007).

### **2.3. Systemy zapylania storczyków**

Wyspecjalizowane systemy zapylania występują zwykle u tych roślin, których kwiaty odwiedzane są przez zaledwie kilka gatunków zapylaczy (Waser i in. 1996; Fenster i in. 2004; Armbruster 2006). Specyficzna budowa kwiatów rodziny Orchidaceae powstała na skutek stopniowych zmian, spowodowanych przez dostosowywanie się do budowy morfologicznej swoich zapylaczy oraz ich

potrzeb (Dressler 1968; Johnson i Steiner 2000; Fenster i in., 2004; Cozzolino i Widmer 2005). Następstwem zmiany sposobu zapylania często była zmiana oferowanej nagrody (Steiner 1998). Ewolucja dotyczyła głównie kwiatów, ponieważ to one są prawie całkowicie zależne od zapylaczy (Dafni 1983; Ackerman 1986; Johnson i Bond 1992; Nilsson 1992; Neiland i Wilcock 1999; Meléndez-Ackerman i Ackerman 2001). W ten sposób wykształciły się różne mechanizmy zapylania, wyodrębnione na podstawie wielkości, kształtu, barwy i zapachu kwiatu oraz nagrody oferowanej zapylaczom (Faegri i van der Pijl 1971; Proctor i Yeo 1973; Johnson i Steiner 2000).

Mimo, że pojęcie koewolucji zostało wprowadzone około 50 lat temu (Ehrlich i Raven 1964), to już 100 lat wcześniej zjawisko to zaobserwował Darwin i jako pierwszy opisał ten proces na przykładzie rurki kwiatowej koniczyny (*Trifolium* L.) i odpowiadającego jej długości języczka pszczoły (Darwin 1859). Zaobserwował również wyjątkowo długą ostrogę u *Angraecum sesquipedale* Thouars (Orchidaceae), której długość jest taka sama jak ssawka zawieszona należącego do rodziny Sphingidae (Darwin 1862). Ewolucja ostrogi, która powodowała specjalizację systemu zapylania mogła też prowadzić do jednoczesnego wzrostu liczebności gatunków roślin (Hodges i Arnold 1995; Hodges 1997). Hipotezę tą potwierdził Sargent (2004) podając, że kwiaty o symetrii grzbiecistej, które mają węższe spektrum zapylaczy i wyższy stopień specjalizacji zapylania są gatunkowo liczniejsze od tych, które mają symetrię promienistą. Interesujące okazały się też badania Smitha i in. (2008), które wykazały, że specjalizacja sposobu zapylania nie koniecznie powoduje wzrost różnorodności gatunków.

Innym powodem wykształcania specyficznych systemów zapylania jest czas, kiedy to zapylacze mogą odwiedzać kwiaty. Prawie wszystkie rośliny kwitną w określonej dla siebie porze roku. Im krótszy czas kwitnienia, tym system zapylania musi być bardziej wyspecjalizowany (Armbruster i in. 1992). Kwiaty mogą otwierać się również o określonej porze dnia lub nocy zwabiając

specyficznych zapylaczy (Muchhala 2003, 2006; Armbruster 1985, 1997, 2006; Stone i in. 1998).

Na specyficzności zapylacza opiera się także mechanizm izolacji pomiędzy sympatrycznymi gatunkami, np. *Prescottia densiflora* zapylanego przez pszczoły i *P. plantaginea* zapylanego przez ćmy (Singer i Sazima 2001b) czy *Aspidogyne argentea* zapylanego przez motyle, pszczoły i *A. longicornu* zapylanego przez pszczoły i kolibry (Singer i Sazima 2001a). Mechanizm izolacji może również opierać się na morfologicznych różnicach w budowie *labellum* czy *gynostemium* tak jak w przypadku dwóch endemicznych gatunków *Sophronitis*, występujących w Brazylii (Silva-Pereira i in. 2007). Sztuczne krzyżowanie manualne przeprowadzone pomiędzy trzema gatunkami z rodzaju *Satyrium* potwierdza, że może istnieć kompatybilność między gatunkami sympatrycznymi. Mimo tego w naturalnym środowisku istnieje mechanizm izolacji i nie spotyka się hybryd z krzyżowań pomiędzy tymi gatunkami lub spotyka się je niezwykle rzadko (Bolus 1913; Duthie 1917; Johnson 1996; Ellis i Johnson 1999).

Mechanizm izolacji występuje również u gatunków mających wspólnych zapylaczy jak *Disperis* (Steiner 1989) czy *Pterygodium* (Pauw 2006). Specyficzność w tym wypadku dotyczy miejsca depozycji *pollinarium* na tułowie owada. Różnice w kariotypie Orchidinae mogą być równie wydajnymi post-zygotycznymi barierami krzyżowalności pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami, które mają wspólnych zapylaczy (Cozzolino i in. 2004).

Niektóre gatunki storczyków podlegają głównie lub całkowicie samozapyleniu. Gatunki autogamiczne to tylko niewielki procent wśród storczykowatych i należą tu rośliny szczególnie z obszarów chłodniejszych, gdzie występuje mała ilość zapylaczy (Liu i in. 2006). Przeniesienie pyłkowiny na znamię kwiatu odbywa się najczęściej przy pomocy zwierząt, wody czy grawitacji. Istnieją jednak gatunki, u których występuje zupełnie inny sposób samozapylenia. Takim gatunkiem jest *Holcoglossum amesianum* (Rchb.f.) Christenson, opisany przez Liu i in. (2006). Następuje tu pomimo grawitacji

obrót i podniesienie trzonka (*stipe*) z pyłkowinami o 360° oraz depozycja pyłku na znamieniu własnego prętosłupa. Proces ten odbywa się podczas bezwietrznej, suchej pogody oraz przy braku jakichkolwiek zapylaczy w otoczeniu. Autogamia przyczynia się do obniżenia żywotności nasion (Hirayama i in. 2005), lecz czasami jest jedyną szansą na zapylenie. Gatunkami samopylnymi są np. *Dendrobium mirbellianum* (Jones 1983), *Spiranthes hongkongensis* Hu et Barretto (Sun 1997), *Oeceoclades maculata* (Lindley) Lindley (van der Cingel 2001; Pemberton 2007) czy *Cyrtopodium polyphyllum* (Vell.) Pabst ex F. Barros, u których do samozapylenia dochodzi przy udziale kropli deszczu (Pansarin i in. 2008). *Epipactis microphylla* (Ehrh.) Sw. jest również autogamicznym gatunkiem ze szczątkowymi zdolnościami do allogamii oraz tendencją do kleistogamii a więc zapylenia i zawiązywania się owoców bez otwierania kwiatów. Kiełkowanie ziaren pyłku następuje z ominięciem receptywnego znamienia (Bonatti i in. 2006). Owoce mogą powstawać również bez zapłodnienia (zjawisko apomiksji) i takim gatunkiem jest *Nigritella nigra* (L.) Rchb. f, *Zygopetalum mackayi* (Asker i Jerling 1992; Naumova i Merschchikova 1993) czy *Zeuxine strateumatica* (L.) Schlechter (Sun 1997; Pemberton 2007). Częściową samopylność stwierdzono u *Spathoglottis plicata* Blume (Pemberton 2007), *Arundina graminifolia* (Pablo i Ackerman 2003), *Phaius tankervilleae* (Pemberton 2007), czy *Platanthera leucophaea* (Stickler i in. 2004). Dochodzi do niej, gdy żadne inne systemy zapylenia nie są dostępne.

Większość roślin wykształciła różne mechanizmy zapobiegające autogamii (van der Pijl i Dodson 1966; Dressler 1981, 1993; Borba i Semir 1999). Często są to metody mechaniczne lub okresowo mechaniczne. U południowo-afrykańskiego gatunku *Eulophia foliosa* zapylanego przez trzmiele *Cardiophorus obliquemaculatus* (Elateridae) czapeczka nie spada z *pollinarium* przez pewien czas po pobraniu przez zapylacza. Wielkość czapeczki jest na tyle duża, że nawet po dotknięciu znamienia nie jest możliwe zdeponowanie pyłkowiny wraz z czapeczką na znamieniu (Peter i Johnson 2006). Inną metodą, polegającą na przeciwdziałaniu autogamii jest powiększone dwukrotnie

*pollinarium* na krótko po jego depozycji na tułowiu zapylacza. Aż około dwie godziny potrzebne są by rozmiary *pollinarium* wróciły do normy. Mechanizm ten odkryto u *Bulbophyllum involutum* i *B. ipanemense* (Borba i Semir 1999). Często spotykanym w świecie roślin sposobem na obronę przed samozapyleniem jest herkogamia, czyli ustawienie przestrzenne organów generatywnych względem siebie tak, że utrudniają one samozapylenie. Te metodę spotyka się również u większości storczyków. W wyniku tego *pollinarium* przykleja się do zapylacza dopiero przy opuszczaniu przez niego kwiat (van der Pijl i Dodson 1966, Dressler 1981).

U Orchidaceae powszechna jest dichogamia w formie przedprątności, która ma miejsce w rodzaju *Mormodes* i wielu przedstawicieli rodzaju *Stanhopea*. Kwiaty będące w fazie pręcikowej są niezdolne do zapylenia, do którego dochodzi dopiero po zabraniu *pollinarium* przez pszczołę (Michel 1996; Jersáková i Johnson 2007). Protandria występuje także m.in. w kwiatach rodzaju *Goodyera* (Ackerman 1975), *Prescottia* (Singer i Sazima 2001b) czy *Sauroglossum* (Singer 2002b).

Samoniezgodność może również odgrywać rolę bariery chroniącej przed samozapyleniem. Bariery genetyczne są zwykle związane z gatunkami orchidei zapyłanych przez owady (np. muchy), które to spędzają na kwiatostanie dłuższy okres czasu. Zachowanie takie może powodować także zapylenie geitonogamiczne (Christensen 1992; Pedersen 1995), toteż część metod ochrony przed autogamią działa również w przypadku ochrony przed geitonogamią.

Większość gatunków z rodziny storczykowatych jest allogamiczna i wymaga zapylaczy jako wektorów pyłku.

Około 60% storczykowatych przystosowanych jest do zapyłania przez pszczoły lub osy należące do rzędu błonkoskrzydłych (van der Pijl i Dodson 1966, Dressler 1981). Do tej grupy kwiatów storczyków zapyłanych przez błonkówki należy również wiele gatunków o kwiatach zwodniczych, czyli nieoferujących zapylaczom żadnej nagrody (Little 1983; Dafni 1984; Ackerman 1986; Nilsson 1992; Vogel 1993; Johnson 1994, 2000; Neiland i Wilcock 1998;



Roy i Widmer 1999; Gumbert i Kunze 2001; Vallius 2000, 2001; Sugiura i in. 2002; Cozzolino i Widmer 2005). Błonkówki to najważniejsza grupa owadów biorących udział w przenoszeniu pyłkowiń i zapyłaniu storczyków. Poszukują one pokarmu w ciągu dnia posługując się głównie zmysłem wzroku. Dlatego też kwiaty tych storczyków są zwykle jaskrawo zabarwione i mają najczęściej barwy fioletowe, niebieskie, żółte, rzadziej czerwone lub białe. Warzka jest zwykle dobrze wykształcona i wyraźnie różni się od pozostałych listków okwiatu. Funkcjonuje jednocześnie, jako swoiste „ładowisko” i powabnia dla owadów. Wzory pokrywające warzkę w postaci kontrastowo zabarwionych linii czy plam często kierują zachowaniem owadów na kwiatach. Dodatkowym bodźcem zwiększającym atrakcyjność kwiatów dla błonkówek jest emitowany przez nie słodkawy zapach (Kaiser 1993). Zapyłaczami storczykowej flory Starego Świata (Europa, Azja) są głównie *Apis* sp, *Vespa* sp. i *Bombus* sp. (Thien i Marcks 1972; Dafni i Ivri 1981a,b; Nilsson 1983a,b; Vallius 2000, 2001; Gumbert i Kunze 2001; Sugiura i in. 2002) oraz Halictidae, które występują również w Ameryce (Singer i Cocucci 1999a; Singer i Sazima 2001b). Natomiast storczyki Nowego Świata (Ameryka Północna, Ameryka Południowa, Australia) często są zapyłane przez bezżądłowe błonkówki z rodzajów *Melipona*, *Trigona* i *Plebeia* (Adams i Lawson 1993; Roubik 2000; Singer 2003) oraz błonkówki z rodzajów *Euglossa*, *Eulaema*, *Eufriesea* (Dressler 1968, 1982; Williams i Whitten 1983; Borrell 2004).

Do błonkoskrzydłych, które również zapyłają kwiaty storczyków należą mrówkowate (Formicidae). Rzadkość tego procesu wyjaśniają dwie hipotezy. Pierwsza z nich łączy się z budową morfologiczną mrówek. Są to owady bezskrzydłe, a zatem istnieje trudność w przenoszeniu pyłku na dalsze odległości. Ponadto mają one tendencję do wracania po pożywienie w to samo miejsce, co stanowi dodatkowo przeszkodę w rozprzestrzenianiu pyłku i przenoszeniu go na znamię innej rośliny (Faegri i van der Pijl 1971; Proctor i Yeo 1973). Druga hipoteza mówi o utracie żywotności i zdolności kiełkowania pyłku po jego zetknięciu z tułowiem mrówki. Związane jest to z wydzielaną przez mrówcze gruczoły (*metapleural glands*) substancją o charakterze antybiotycznym i

antygrzybicznym (Beattie i in. 1984, 1985). Obie hipotezy zostały jednak zakwestionowane przez Peakall i in. 1987. Zaobserwowali oni bowiem, że osobniki *Myrmecia urens* Lowne, będące wyłącznymi zapylaczami australijskiego storczyka *Leporella fimbriata* (Lindl.) George nie posiadają takich gruczołów, a kwiaty *Leporella* wcale nie są przystosowane do myrmekogamii.

Kolejną ważną grupą zapylaczy kwiatów storczyków są Lepidoptera. Łuskoskrzydłe można podzielić ze względu na cechy morfologiczne i biologiczne na motyle dzienne oraz motyle nocne, czyli ćmy. Kwiaty zapylane przez motyle mają słabo rozwiniętą warzkę, zwykle nie większą od pozostałych listków okwiatu, pozbawioną szlaków nektarowych. Ten rząd owadów w przeciwności do błonkówek ma bardzo długie aparaty gębowe i może lądować na dowolnej części kwiatu bez potrzeby wciskania się do jego wnętrza. Motyle dzienne posługują się głównie narządem wzroku, a w mniejszym stopniu węchem. Kwiaty przez nie zapylane mają intensywną barwę tj. od żółtych jak np. *Platanthera (Habenaria) ciliaris* (L.) Lindl. (Robertson i Wyatt 1990; Smith i Snow 1990) zapylane głównie przez motyle z rodziny paziowatych (Papilionidae), do czerwonych jak np. *Disa ferruginea* (Thunb.) Sw. zapylane przez motyle z rodziny rusałkowatych (Nymphalidae). Kwiaty takie nie muszą dostarczać zapylaczom silnych bodźców zapachowych. Szacuje się, że ok. 8% storczyków zapylanych jest przez ćmy. Kwiaty takich storczyków są niepozornie zabarwione. Mają bowiem kolor biały lub zielonawy i są pachnące, gdyż motyle nocne posługują się przede wszystkim narządem węchu. Zapach wabi owady do nektaru kwiatowego. Nektar w kwiatkach zapylanych przez motyle ukryty jest w ostrodze. Zapylają one przykładowo *Sauroglossum elatum* Lindl. (Spiranthinae) posiadające rurkowate zielono-białe kwiaty, pachnące nocą. Sphingidae zapylając kwiaty nie siadają na nich tylko zawisają w powietrzu (Johnson i Bond 1992; Johnson 1994; Szlachetko i Skakuj 1996, Stpicyńska 2004). W niektórych przypadkach kwiaty odwiedzane przez ćmy mogą mieć kolor brązowy jak np. u *Sauroglossum cf. organense* Szlach. (van der Pijl i Dodson 1966; Singer 2002b). Wśród nocnych zapylaczy są także omacnicowate (Pyralidae) - rodzina motyli



spotykana na jasnozielonych kwiatach *Prescottia stachyodes* (Swatz) Lindl. i *Prescottia plantaginea* Lindl, wydzielających silny słodkawo-pieprzowy zapach (Singer i Sazima 2001b).

Liczną grupę zapylaczy storczyków stanowią Diptera. Kwiaty takie mają często postać pułapek. Barwa kwiatów muchówkowych jest zwykle czerwono-brązowa lub zielonawa z czerwonymi lub brązowymi plamami. Wyróżniają się one nieprzyjemnym, aminoidalnym zapachem, nie oferując przy tym żadnego pokarmu (Vogel 1990b; Kaiser 1993). Zielonkawe kwiaty *Habenaria parviflora* Lindl. zapylane są nie tylko przez motyle, ale również przez komarnice (Tipulidae), należące do rzędu muchówek (Singer 2001). Rodzina komarów (Culicidae) spotykana jest natomiast na zielonkawych kwiatach *H. obtusata* (Banks ex Pursh) Richards (Thien 1969). Ponadto do rzędu muchówek należą inne rodziny owadów (Bibionidae - leniowate, Calliphoridae - plujkowate, Syrphidae - bzygowate, Tachinidae - rączycowate) odnotowane podczas wizyt na kwiatach storczyków *Earina* sp. (Lehenbach i Robertson 2004) czy *Paphiopedilum* (Shi i in. 2009). Dość nietypowymi kwiatami zapylanymi przez bąkowate (Tabanidae) o długich aparatach gębowych są różowe bezzapachowe kwiaty *Disa pulchra* posiadające długie ostrogi, lecz niezawierające nektaru (Jersáková i Johnson 2006). Znanych jest też kilka gatunków *Bulbophyllum* zapylanych przez dwuskrzydłe. Ich zapylaczami są m.in. muszki owocówki (Tephritidae) wabione przez kwiaty *Bulbophyllum cheiri* Lindl, które wydzielają zapach zawierający głównie metyloeugenol. Związek ten stosowany jest przez samce owocówek do wabienia pozostałych męskich osobników i jednocześnie do odstraszania kręgowców (Tan i in. 2002). Wśród muszek owocówek są też te szeroko znane z rodzaju *Drosophila* (Drosophilidae), będące efektywnymi zapylaczami *Masdevallia floribunda* Lindl. (Solano Gomez 2005).

Tylko około 3-5% gatunków storczyków zapylanych jest przez ptaki (van der Pijl i Dodson 1966). Należą one głównie do kolibrów (Trochilidae), rodziny ptaków z rzędu jerzykowych, występujących w Nowym Świecie (van der Pijl i Dodson 1966; Singer i Sazima 2000) i nektarników (Nectariniidae) - rodzinę

ptaków z rzędu wróblowych, występujących w Starym Świecie (Johnson 1996; Johnson i Brown 2004). Nektarniki są zapylaczami m.in. *Satyrium* (Johnson 1996), natomiast kolibry storczyków podrodziny Epidendroideae (van der Pijl i Dodson 1966), np. *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (Ackermann i in. 1994) i Spiranthoideae np. *Stenorrhynchos lanceolatus* Aublet. L. C. Rich (Singer i Sazima 2000). Kolibry są też zapylaczami kwiatów storczyków z rodzaju *Maxillaria*, *Masdevallia*, *Epidendrum*, *Cattleya* i *Laelia* (van der Pijl i Dodson 1969; Vogel 1990a, van der Cingel 2001; Stpiczyńska 2004; Stpiczyńska i in. 2003, 2005). Ptaki te żywią się nektarem produkowanym przez kwiaty. Posługują się głównie zmysłem wzroku, dlatego kwiaty zapylane przez nie są najczęściej jaskrawoczerwone do szkarłatnych i są bezwonne.

Zapylanie kwiatów przez chrząszcze jest bardzo rzadkie i zwykle zapylaczami takich kwiatów są jednocześnie inne owady (van der Pijl i Dodson 1966; Steiner i in. 1994). Wśród chrząszczy są to żukowate (Scarabaeidae) zapylające lekko pachnące lub całkiem bezwonne żółto-czerwone kwiaty *Ceratandra grandiflora* Lindl. (Steiner 1998). Efektywność chrząszczy, jako wektorów pyłku jest dużo niższa w porównaniu z innymi owadami. Tylko 6% populacji *Epipactis palustris* jest efektywnie zapylane przez chrząszcze, pozostałą część zapylają osy (Nilsson 1978; Dafni i in. 2000).

#### **2.4. Nagrody oferowane zapylaczom**

Kwiaty storczyków oferują zapylaczom różnego rodzaju nagrody (Buchmann 1987; Endress 1994). Najczęściej jest to nektar, rzadziej olejki eteryczne, żywice, woski i tłuszcze (Dodson i in. 1969; Vogel 1969; Armbruster 1985; Buchmann 1987; Endress 1994). Mimo to według Daviesa i in. (2005) tylko u ok. 8% gatunków z rodzaju *Maxillaria* sp. obecny jest nektar w kwiecie, a aż 56% z nich nie oferuje owadom żadnej nagrody. Żadnej nagrody nie oferują również przedstawiciele bardziej prymitywnych storczyków tj. Vanilloideae i

Cypripedioideae. Kwiaty Apostasioideae oferują natomiast swoim zapylaczom wyłącznie pyłek (Rasmussen 1985).

#### 2.4.1. Nektar

Nektar produkowany i wydzielany jest przez tzw. nektarniki. Znacznie zwiększa on skuteczność zapylenia i sukces reprodukcyjny u storczyków w porównaniu z gatunkami, których kwiaty oferują inne nagrody lub nie oferują ich wcale. Wyznacznikiem sukcesu reprodukcyjnego u roślin jest między innymi procent zawiązaných owoców. U roślin o kwiatach produkujących nektar obserwowana jest ponad dwukrotnie większy procent zawiązaných owoców niż u tych, które nektaru nie produkują (Neiland i Wilcock 1998).

Nektar jest głównym atraktantem u storczyków, a zarazem pożywieniem dla owadów. Nektarniki charakteryzują się nie tylko różnym kształtem czy wielkością - ich lokalizacja i budowa dostosowana jest do możliwości pobrania nektaru przez najbardziej skutecznego zapylacza.

Położenie nektarników może być zróżnicowane i charakterystyczne dla rodzaju, stanowiąc istotną cechę taksonomiczną. Ze względu na położenie nektarników można wyróżnić dwa ich rodzaje: kwiatowe tj. związane z okwiatem (perygonałne) i pozakwiatowe (extrafloral nectaries, EFN). Nektarniki kwiatowe mogą być umiejscowione u podstawy prętosłupa jak u *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Stpiczyńska i in. 2003), na warżce w zagłębieniach kalusa u *Bulbophyllum ipanemense* Hoehne, *B. involutum* Hoehne i *B. weddellii* (Lindl.) Rehb. f. [(prawdopodobnie muchy składają tam jaja); Teixeira i in. 2004], na powierzchni *labellum Epipactis thunbergii* A. Gray (Sugiura 1996) i *Listera ovata* (L.) R. Br, gdzie nektarnik w postaci długiej bruzdy zajmuje środek warżki (Nilsson 1981) czy *Platystyliparis aurita* (Ridl) Marg. i *Disticholiparis gregaria* (Lindl.) Marg. & Szlach, gdzie nektarniki są globularnego kształtu (Kowalkowska i Margońska 2009). Nektar produkowany jest przez kalus również u *Maxillaria anceps* Ames & C. Schweinf. Wydzielony nektar pokrywa warżkę i może gromadzić się u podstawy kolumny (Davies i in.

2005). W kwiatach *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb. f. tworzy się zbiorniczek na granicy *labellum* i prętosłupa (Stpiczyńska i in. 2005a). Nektarniki mogą także występować, jako dwa symetryczne gruczoły na doosiowej powierzchni warzki u *Beadlea dutraei* (Schltr.) Garay, *Pelexia bonariensis* (Lindl.) Schltr. i *S. orchioides* (Galetto i in. 1997). Inaczej jest u *Platanthera chlorantha* (Custer) Rchb. Kwiaty tego gatunku posiadają ostrogę, w której dochodzi do sekrecji i gromadzenia nektaru (Stpiczyńska i in. 2005b). Podobnie jest w przypadku kwiatów, *P. lacera* (Michx.) G. Don (Little i in. 2005), *P. bifolia* L. (Stpiczyńska 1997), *P. ciliaris* (L.) Lindl. (Sharp 2004), *P. mandarinorum* ssp. *hachijoensis* (Inoue 1986), *Limodorum abortivum* (L) Sw. (Figueiredo i Pais 1992), *Habenaria gourlieana* Gillies ex Lindl., *H. hieronymi* Kranzl. (Galetto i in. 1997) i niektórych gatunków *Cryptocentrum* sp. (Davies i Stpiczyńska 2007).

Nektarniki pozakwiatowe zlokalizowane mogą być na szypułkach lub u podstawy pąków, kwiatów czy owoców *Epidendrum denticulatum* Barb. Rodr. (Almeida i Figueiredo 2003), *Schomburgkia tibicinis* (Batem. ex Lindley) Batem. (Rico-Gray i Thien 1989), *Spathoglotis plicata* Blume (Jaffe i in. 1989), *Aspasia principissa* Rchb. f, na pędzie kwiatostanowym *Catasetum viridiflavum* Hook, *Oncidium stipitatum* Lindl (Fisher i Zimmerman 1988) oraz u nasady liści *Caularthron bilamellatum* (Rchb.f.) Schult. (Fisher i Zimmerman 1988; Fisher i in. 1990; Fisher 1992). U niektórych gatunków storczyków jak *Encyclia cordigera* (Kunth) Dressler, *E. chacaoensis* (Rchb. f.) Dressler & G.E. Pollard, *E. belizensis* var. *parviflora* nektarniki pozakwiatowe spotykane są zarówno u podstawy kwiatów jak i liści (Damon i Pérez-Soriano 2005).

Ze względu na zawartość węglowodanów nektar pozakwiatowy zwabia mrówkowate (Formicidae), które wykorzystują go jako pokarm. Te natomiast zabijają lub odstraszaają szkodniki, chroniąc przede wszystkim generatywne części kwiatów. Powoduje to wzrost sukcesu reprodukcyjnego u storczyków. Dochodzi zatem do interakcji zwanej mutualizmem. Nektar pozakwiatowy może stanowić od 11 aż do 48% całej diety u mrówek (Jeffrey i in. 1970; Schmid 1988; Fisher i in. 1990; Almeida i Figueiredo 2003; Damon i Pérez-Soriano 2005). Roślina może

również oferować schronienie lub swoiste gniazdo tzw. *domatia*, a materia organiczna dostarczana poprzez aktywność mrówek wewnątrz gniazda może stanowić dla rośliny dodatkowe źródło składników odżywczych. Gniazdo może być umiejscowione np. w pseudobulwach jak u *C. bilamellatum*, *S. tibicinis* czy *E. belizensis var. parviflora* (Fisher i Zimmerman 1988; Rico-Gray i in. 1989; Fisher 1992; Damon i Pérez-Soriano 2005).

Różnice w składzie chemicznym nektaru kwiatowego i pozakwiatowego są nieznaczne. Nektar w obu przypadkach jest wodnym roztworem cukrów. Węglowodany wchodzące w skład nektaru powstają w procesie fotosyntezy lub pochodzą z materiałów zapasowych. Stężenie cukru może wynosić nawet 95% (Baskin i Bliss 1969; Jeffrey i in. 1970; Pais i Chaves das Neves 1980; Pacini i in. 2003; Mizell 2004). Stanowią go głównie fruktoza, glukoza i sacharoza, które zwabiają szerokie spektrum pszczół. W mniejszych ilościach mogą to być również: rafinoza, maltoza, melibioza, gentobioza, stachioza, laktoza, melezitoza oraz inne niezidentyfikowane cukry. Sacharoza jest dominującym składnikiem nektaru u *P. chlorantha* (Stpiczyńska 2005b), *L. abortivum* (Figueiredo i Pais 1992) i *H. gourlieana*, natomiast glukoza u *H. hieronymi* (Galetto i in. 1997). Rafinoza nie występuje generalnie w nektarze u *Epidendrum* i *Cattleya*, ale jest obecna np. u *Laelia*, *Oncidium*, *Angraecum*, *Laeliocattleya*, *Epipactis*. Zaś stachioza u niektórych gatunków *Cymbidium* i *Mormodes*. Melibiozę stwierdzono w rodzajach *Sobralia*, *Laelia* i *Cattleyopsis*. Proporcje pomiędzy cukrami zawartymi w nektarze różnią się w zależności od gatunku rośliny i zapylacza. Nektar bogaty w sacharozę jest zazwyczaj ukryty w kwiecie (w długiej rurce korony lub ostrodze), podczas gdy fruktoza i glukoza dominuje w nektarze wyeksponowanym w kwiecie (nektarniki typu otwartego). Heksozy charakteryzują nektar kwiatów zapylanych przez cukrzyki (Pais i Chaves das Neves 1980; Singer i Sazima 1999; Nicolson i Fleming 2003). Koncentracja cukru w nektarze jest również istotna. Ptaki czy motyle preferują dość rozcieńczony nektar tj. z 15-25 % zawartością cukru, natomiast pszczoły nektar o 50% zawartości cukru. Obniżenie koncentracji nektaru jest spowodowane

hydrolizą sacharozy do fruktozy i glukozy. W konsekwencji wzrasta jego osmotyczność, powodując napływ wody z komórek wydzielniczych. Wraz z ilością cukru w nektarze rośnie także jego lepkość, dlatego owady o wąskich trąbkach preferują bardziej płynny nektar tj. o mniejszej zawartości cukru. Ilość wydzielanego nektaru rośnie proporcjonalnie do rozmiarów zapylacza, a więc im większy zapylacz tym więcej nektaru produkuje odwiedzany przez niego kwiat (Nicolson 1998; Dunne 2005).

Pozostałe 5% związków chemicznych zawartych w nektarze stanowią aminokwasy, tłuszcze, kwasy organiczne, witaminy, enzymy, antyoksydanty, jony mineralne i metabolity wtórne (Jakubska i in. 2005a,b). Aminokwasy decydują o charakterystycznym smaku nektaru mających wpływ na preferencje zapylaczy (Gardener i Gillman 2002). Nektarem bogatym w aminokwasy żywią się głównie motyle, które wykorzystują te związki, jako źródło energii, niedostępne dla nich w innej postaci (Erhardt i Baker 1990). Związki azotowe wpływają również korzystnie na płodność motyli, jeśli dostarczane są w okresie larwalnym na odpowiednio wysokim poziomie (Mevi-Schütz i Erhardt 2005; Jervis i Boggs 2005). Nie tylko lokalizacja nektarników czy ich budowa mają znaczenie taksonomiczne, ale i skład nektaru może odzwierciedlać stopień pokrewieństwa pomiędzy organizmami liniami rozwojowymi (Jeffrey i in. 1970; Pais 1986; Nicolson 1998; Mizell 2004).

Niektóre gatunki storczyków mogą produkować lekko toksyczne czy też narkotyczne substancje. Nektar *Epipactis helleborine* (L.) Crantz zawiera m.in. oksykodon, morfiniany czy etanol, które powodują, że owad czuje się oszołomiony. Dzięki temu spędza więcej czasu w kwiecie i zwiększa się prawdopodobieństwo zapylenia. Etanol produkowany jest przez grzyby (*Cladosporium*) lub bakterie w obecności cukrów, a mikroorganizmy te przenoszone są przez osy z owoców. Oprócz opioidów i alkoholu nektar może zawierać związki odpowiadające za jego charakterystyczny zapach np. wanilinę i estry kwasów karboksylowych (Ehlers i Olesen 1997; Jakubska i in. 2005a,b).



### 2.4.2. Olejki eteryczne

Okolo 75% wszystkich gatunków storczykowatych emituje zapach, ale tylko niektóre związki zawarte w olejkach eterycznych są odczuwane przez człowieka. Olejki eteryczne wydzielane są i gromadzone przez specjalne gruczoły zwane osmoforami (Vogel 1990b; Hamman 1999). Tkanę wydzielniczą stanowi jedna warstwa gładkich komórek epidermy (osmofory epitelialne) o bardzo gęstych protoplastach, dużym jądrze i licznych plastydach, np. *Cymbidium tracyanum* Rolfe (Stpiczyńska 1993), *Scaphosepalum microdactylum* Rolfe (Pridgeon i Stern 1985). Epiderma może być pokryta również brodawkami (papille) jak u *Cyclopogon elatus* (Sw.) Schltr. (Wiemer i in. 2009), *Restrepia hemsleyana* Schltr, *Scaphosepalum breve* (Rchb. f.) Rolfe (Pridgeon i Stern 1983, 1985), *Grobya amherstiae* (Pansarin i in. 2009) lub może być dodatkowo pomarszczona jak u *Stanhopea oculata* (Lodd.) Lindl. i *S. wardii* G. Lodd. ex Lindl. (Stern i in. 1987). U *Caladenia patersonii* R. Br. za produkcję zapachu odpowiedzialne są prawdopodobnie 1-3 komórkowe trichomy (Stoutamire 1983).

Pod wpływem izolacji geograficznej oraz braku zapylaczy na danym terenie może dochodzić do wykształcania osmoforów u gatunków, które pierwotnie ich nie posiadały, np. *Phalaenopsis amabilis*. Jest to cecha charakterystyczna tylko dla gatunków występujących w Nowej Gwinei. Te same gatunki występujące w innych regionach zapachu nie produkują. Niewiele związków chemicznych zawartych w olejkach jest toksycznych dla rośliny. Pod wpływem temperatury otoczenia (25-40 °C) stają się lotne i wtedy odczuwalne dla człowieka (Vogel 1990b; Hamman 1999).

Osmofory mogą być zlokalizowane w różnych miejscach okwiatu, np. u *Restrepia* sp., *Scaphosepalum* sp. czy *Disa* sp. na listkach okwiatu (Pridgeon i Stern 1983; 1985; Johnson 2005). Najczęściej jednak umieszczone są na warzcie np. *Stanhopea*, *Catasetum*, *Cyclopogon*, *Grobya* (Stern i in. 1987; Hamman 1999; van der Cingel 2001; Reis i in. 2004; Wiemer i in. 2009; Pansarin i in.

2009) czy *Bulbophyllum* sp, gdzie osmofory znajdują się na powierzchni kalusa pokrywającego warżkę (Teixeira i in. 2004). Niektóre gatunki jak *C. tracyanum* (Stpiczyńska 1993) czy *P. bifolia* (Vogel 1990b) posiadają osmofory położone zarówno na listkach okwiatu jak i na warżce. Gatunki należące do *Catasetinae* i *Gongorinae* produkują największe ilości zapachów spośród wszystkich orchidei (Hamman 1999).

Sekrecja olejków eterycznych jest procesem energochłonnym, dlatego aktywność wydzielnicza osmoforów jest skorelowana z aktywnością zapylaczy tj. największe ilości zapachu wydzielane są, gdy aktywność zapylaczy jest najwyższa. Storzycyki z gatunku *Brassavola nodosa* są zapylane przez motyle nocne, dlatego też zapach produkowany jest przez nie wyłącznie w nocy. Sekrecja rozpoczyna się tuż po zachodzie słońca i kończy się zaraz po jego wschodzie. Podobnie jest w warunkach sztucznej ciemności. W nocy produkowane są zapachy głównie przez przedstawicieli afrykańskiego rodzaju *Angraecum* i *Aerangis*. Inne storczyki jak *Epidendrum difforme* pachną zarówno w dzień jak i w nocy, ale szczyt aktywności wydzielniczej osiągają w nocy. Kwiaty zapylane przez pszczoły produkują substancje lotne wcześniej rano. Np. *Cattleya luteola* między 4.00 i 8.00 rano. Po zapadnięciu zmroku większość z nich nie wydziela żadnego zapachu. Podczas pochmurnych dni zapach kwiatów jest bardzo delikatny. Zapach może pojawiać się także dopiero po pewnym czasie. Ciemno ubarwione kwiaty *Catasetum tenebrosum* emitują żywiczny zapach z mocną cytrynową nutą, ale pojawia się on ok. 4 dnia antezy. Wydzielany jest do końca antezy tj. ok. 3 tygodnie. U *Catasetum* aktywność wydzielnicza zostaje wstrzymana już po kilku godzinach od zapylenia ze względu na oszczędne gospodarowanie energią. Anteza w kwiatach *Gongora* trwa zaledwie 2-3 dni, ale po usunięciu warżki, gdzie wydzielane są olejki eteryczne anteza wydłuża się do 2-3 tygodni. W przeważającej większości przypadków sygnały barwne czy zapachowe kwiatów pszczelich informują owady o znajdującym się wewnątrz nektarze (Hamman 1999). Kwiaty rodzajów *Catasetum*, *Coryanthes*, *Gongora*, *Cycnoches* czy *Stanhopea* (ok. 10% całej



populacji storczyków) zapylane są przez pszczoły z plemienia Euglossini. Prawdopodobnie, olejki te służą owadom do produkcji feromonów płciowych, stymulują samice do kopulacji lub przypominają zapach gniazda, co także ułatwia kontakty z samicami. Samce Euglossini zdrapują je przednimi odnóżami z powierzchni warzki i od czasu do czasu przenoszą na odnóża tylne, gdzie gromadzone są w butelczkowatych strukturach. Odnóża służące do zbierania olejków pokryte są włoskami. Kwiaty zwabiające Euglossini emitują wysoce specyficzną woń, która przyciąga tylko określone gatunki pszczół, nawet jeśli na tym samym terenie dostępne jest szersze spektrum zapylaczy. Jest to jednocześnie bariera przeciwko krzyżowaniu międzygatunkowemu (Dodson i in. 1969; Williams i Whitten 1983; Lunau 1992; Kaiser 1993; Singer i Koehler 2003; Eltz i in. 2005; Carr 2006).

Zapachy kwiatów zapylanych przez błonkoskrzydłe są bardzo różnorodne. Zawierają np. citronellol, nerol, geraniol, alkohol cynamonowy, jonony, wanilinę, eugenol, chavikol. Są to zapachy różane, ostre, jononowe, aromatyczne. Na woń kwiatów zapylanych w nocy składają się m.in. alkohol benzylowy, alkohol cynamonowy, linalol, alkohol feniloetylowy i indole, natomiast zapylanych w dzień również citronellol czy geraniol (Kaiser 1993). Głównym składnikiem zapachu wydzielanego przez kwiaty przyciągające muchówki z rodzaju *Bactrocera* np. jest zingeron (woń imbiru) u *Bulbophyllum patens* King ex Hook. f. (Tan i Nishida 2000) czy metyloeugenol (nadaje zapach goździków) u *B. cheiri* Lindl. (Tan i in. 2002) oraz keton malinowy u *B. apertum* Schltr. (Tan i Nishida 2005). Williams i Witthen (1983) wykryli 50 związków chemicznych wchodzących w skład olejków zapachowych u Stanhopeinae i Catasetinae, natomiast Flach i in. (2004) zidentyfikowali aż 55 związków (głównie terpenów i ich pochodnych) wytwarzanych przez warzki niektórych gatunków z rodzaju *Maxillaria* i *Trigonidium*. U *Gymnadenia conopsea* (L) R. Br. zapach wydzielany przez kwiaty tworzy 45 związków chemicznych (Huber i in. 2005). Najwięcej związków bo ok. 65 wykryto w olejku eterycznym produkowanym przez kwiaty

*Disa sankeyi* Rolfe, zapylanych przez osy. Aldehyd cynamonowy oraz eugenol są głównymi jego składnikami (Johnson 2005).

Zapachy można podzielić na przyjemne i nieprzyjemne dla nosa człowieka. Te pierwsze warunkuje obecność metylowych estrów kwasów tłuszczowych, alifatycznych i cyklicznych mono i seskwiterpenów, diterpenów, fenylopropanów. O przykrym zapachu decydują hydrokarbony, kwasy tłuszczowe, amoniak, indol, kadaweryna czy putrescyna (Vogel 1990b; Kaiser 1993; Knudsen i in. 2006).

Przyjemnym zapachem charakteryzują się kwiaty *Encyclia fragrans* pachnące wanilią i miodem (Hamman 1999) czy *Maxillaria acutifolia* Lindl. pachnące nie tylko wanilią, ale i czekoladą (Flach in 2004). *Cynoches chlorochilon* Klotsch wydziela zapach przypominający ten wydzielany przez jaśmin a *Dendrobium anosmum* Lindl. zapach podobny do zapachu maliny (Hamman 1999). Wśród *Oncidium* sp. występują również przyjemnie pachnące gatunki jak np. *Oncidium ornithorhynchum*, którego emitowany, mocny dość zapach, zbliżony jest do waniliowego. Według Vogla (1990) osmofory u tego gatunku zlokalizowane są na płatkach okwiatu i warzce. Znakomita jednak większość *Oncidium* sp. wydziela bardzo delikatny zapach.

Najbrzydszym zapachem charakteryzują się kwiaty zapylane przez muchy. Odczuwane jako zgniłe, putrescynowe czy pachnące fekaliami lub padliną. Kwiaty muchówkowe zwabiają owady nie tylko zapachem, ale także odpowiednią kolorystyką imitującą np. padlinę. Do tej grupy należą szczególnie storczyki *Cirrhopetalum*, występujące w południowo-wschodniej Azji oraz *Masdevallia* z Ameryki Południowej. *Dracula chestertonii* zwabia zapylaczy zarówno wyglądem, jak i zapachem imitując owocnik grzyba, na którym muchy składają jaja. Przykry zapach produkowany jest również przez listki okwiatów *Phragmipedium caudatum* i *Cirrhopetalum ornatissimum*, odpowiednio uryny i ryby (Kaiser 1993; Hamman 1999).

Skład chemiczny substancji zapachowych, jak również ich ilość może ulegać zmianom podczas cyklu wydzielniczego. *Clowesia rosea* pachnie rano leczniczą maścią na kaszel natomiast po południu cynamonem. *Catasetum*

*expansum* terpentyną a po południu żytnim chlebem. *Epidendrum falcatum* rano jaśminem a po południu lilią. Zapach wydzielany przez kwiaty *Encyclia radiata* ma natomiast zapach pieprzowy, ale pod koniec antezi staje się on nieprzyjemny (Hamman 1999).

### 2.4.3. Tłuszcze

Odkrycie systemu zapylania kwiatów z rodziny storczykowatych przez pszczoły zbierające substancje tłuszczowe stworzyło nowe pole do badań nad ekologią zapylania (Vogel 1969, 1974; Buchmann 1987; Roubik 1989; Steiner 1989; Wcisło i Cane 1996).

Wzmianki na temat sekrecji tłuszczu w kwiatach pochodzą z roku 1969, kiedy to wyniki swoich badań zaprezentował Stefan Vogel na Międzynarodowym Kongresie Botanicznym w Seattle („Flowers Offering Fatty Oils Instead Of Nectar”). Odkrycia dokonał w Argentynie podczas badań nad rodzajem *Angelonia* (Scrophulariaceae) zapylanym przez pszczoły z rodzaju *Centris* (Vogel 1974; Vogel i Machado 1991).

Mimo, że nektar jest najczęściej oferowaną nagrodą przez kwiaty z rodziny storczykowatych (Orchidaceae), znacząca liczba gatunków zaopatruje zapylacze w substancje tłuszczowe (van der Pijl i Dodson 1969; Arditti 1992; Dressler 1993; van der Cingel 2001). Wśród roślin okrytozalążkowych znanych jest osiem rodzin (Orchidaceae, Iridaceae, Krameriaceae, Malpighiaceae, Primulaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Cucurbitaceae), u których zachodzi sekrecja tłuszczu, będącego nagrodą dla zapylaczy (Vogel 1974; Buchmann 1987). Trzy dodatkowe rodziny: Caesalpiniaceae, Memecylaceae i Gesneriaceae były wcześniej włączone do tej listy, ale nie jest nadal jasne czy produkowany przez nie tłuszcz np. przez trichomy w koronie *Drymonia serrulata* (Gesneriaceae) jest nagrodą. Wydaje się on grać rolę swoistego kleju (tzw. *accessory pollenkit*) powodującego przyleganie ziaren pyłku to tułowia pszczoł gatunku *Epicharis*

(Steiner 1985; Buchmann 1987, Renner 1989). Produkcja tłuszczu w kwiatach jest zatem cechą wielu roślin jedno- i dwuliściennych.

Przedstawicielami rodziny storczykowatych, u których zachodzi sekrecja nietlotnych olejów są: Cranichidinae Lindl. (Dressler 1993), Coryciinae Benth. (Buchmann 1987; Steiner 1989, 1993; Pauw 2006), Satyriinae Schltr. (Garside 1922), Bulbophyllinae Schltr. (Pohl 1935; van der Cingel 2001), Ornithocephalinae Schltr. (Buchmann 1987; van der Cingel 2001), Catasetinae (Cyrtopodiinae; Mickeliunas i in. 2006; Pansarin i in. 2009), Oncidiinae Benth. (Dressler 1990; Singer i Cocucci 1999b; van der Cingel 2001; Aliscioni i in. 2009) i Maxillariinae (Davies i Stpiczyńska 2009). Produkcja tłuszczu kwiatowego u storczyków jest cechą polifiletyczną i uważa się, że ewoluowała przynajmniej pięć razy tylko u samych Oncidiinae (Buchmann 1987, Silvera 2002).

Tłuszcze wydzielane są przez struktury gruczołowe zwane elajoforami. Vogel (1974) wyróżnił dwa rodzaje elajoforów: elajofory typu epitelialnego i trichomowego. W rodzinie storczykowatych występują oba ich typy.

Elajofory mogą być położone na doosiowej powierzchni *labellum*, kalusie czy kolumnie (Singer i Cocucci 1999b; Singer i in. 2006; Stpiczyńska i in. 2007; Stpiczyńska i Davies 2008; Davies i Stpiczyńska 2009; Aliscioni i in. 2009). Elajofory epitelialne są najbardziej rozpowszechnionym typem elajoforów w rodzinie Orchidaceae. Występują one zwłaszcza w kwiatach Oncidiinae np. *O. loefgrenii* Cogn, gdzie rozpoznane są jako czerwono-żółte, kalusowate, mokre struktury na powierzchni *labellum* (Stpiczyńska i in. 2007). U *O. trulliferum* Lindl. elajofor ulokowany jest zarówno na kalusie, jak i na brzegach bocznych łatek warżki (Stpiczyńska i Davies 2008). W przypadku *O. cavendishianum* Bateman i *O. ornithorhynchum* Kunth elajofory to dwa owalne gruczoły znajdujące się u nasady warżki i rozmieszczone symetrycznie po obu jej stronach (Stpiczyńska i in. 2007, Davies i Stpiczyńska 2009). U *O. paranaense* Kraenzl. również są to dwa elajofory epitelialne umieszczone na bocznych łatkach warżki, podobne jak u *O. unicornum* Lindl. (Singer i Cocucci 1999b; van der Cingel 2001;

Singer 2004; Singer i in. 2006; Stpiczyńska i in. 2007). Szacuje się, że blisko 14% gatunków *Oncidium* posiada elajofory produkujące tłuszcz (Buchmann 1987). Odnotowano także obecność elajoforów w rodzaju *Ornithophora* (Oncidiinae) i *Rudolfiella* (Maxillariinae), gdzie elajofor znajduje się na kalusie (Stpiczyńska i Davies 2008, Davies i Stpiczyńska 2009), jak również w kwiatach gatunków z rodzaju *Gomesa* tj. *G. recurva* R. Br. czy *G. bifolia* (Sims) M.W. Chase & N.H. Williams, także należących do Oncidiinae (Stpiczyńska i in. 2007; Aliscioni i in. 2009).

Elajofory trichomowe są to włoski wydzielnicze jedno lub wielokomórkowe (Vogel 1974; Buchmann 1987). Trichomowe elajofory odkryte zostały w rodzinach: Cucurbitaceae, Primulaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Iridaceae i niektórych Orchidaceae (Vogel 1974; Buchmann 1987). W rodzinie Orchidaceae są obecne w kwiatach kilku gatunków z rodzaju *Zygostates*, *Ornithocephalus* (Ornithocephalinae), *Phymatidium* (Oncidiinae) czy *Grobya* (Catasetinae). Garside (1922) opisał również *Satyrium bicallosum* Thunb. (Satyriinae), jako gatunek produkujący tłustą wydzielinę zbieraną przez muchówki.

Tłuszcz może być produkowany przez elajofory trichomowe występujące zarówno na *labellum* jak, u podstawy kolumny czy ostrogi (Garside 1922; Reis i in. 2006; Singer i in. 2006, Toscano de Brito 2001; Mickeliunas i in. 2006, Pansarin i in. 2009). Zebranie tłuszczu z kwiatów o elajoforach trichomowych wymaga od pszczoły obecności różnego rodzaju struktur na odnóżach lub ich modyfikacji, w odróżnieniu od tych pszczoł, które zbierają substancje tłuszczowe z powierzchni elajoforów epitelialnych (Vogel 1974).

Niewiele danych dostępnych jest na temat przedstawicieli Cranichidinae również produkujących tłuszcz. Jedynym znanym takim gatunkiem jest *Ponthieva racemosa* (Walter) C. Mohr, u którego na warżce obecna jest wydzielina pełniąca prawdopodobnie funkcję pożywienia dla larw pszczoł (Dressler 1993). Wśród Bulbophyllinae wzmianki o produkcji tłuszczu dotyczą

*B. macranthum* Lindl, *B. lobbii* Lindl. i *B. campanulatum* Rolfe (Pohl 1935; van der Cingel 2001).

Uważa się, że występowanie nektaru, lipidów i cukrów w niektórych tłuszczach produkowanych w kwiatach (Vogel 1990a; Davies i in. 2003a) oraz występowanie terpenoidów w nektarze niektórych gatunków roślin (Davies i in. 2005) może dowodzić, że elajofory ewoluowały z nektarników.

Substancja lipidowa wydzielana przez kwiaty jest zwykle bezbarwna, czasem żółta i składa się z nasyconych kwasów tłuszczowych, parafiny, gliceroli. Inne składniki to: diglicerydy, aminokwasy, glukoza, karotenoidy, fenole, nietotne izoprenoidy i saponiny (Vogel 1974; Simpson i in. 1977; Cane i in. 1983; Buchmann 1987; Roubik 1989; Reis i in. 2000, 2003; Silvera 2002; Dumri 2008).

Pierwsze doniesienia na temat obecności tłuszczu w kwiatach gatunków *Oncidium* (Orchidaceae) dotyczą *Oncidium ornithorhynchum* Kunth (Vogel 1974), natomiast dopiero w roku 2009 (Davies i Stpiczyńska) opisano anatomie i ultrastrukturę elajoforów tego gatunku. Pierwsze badania nad biologią zapylania gatunków produkujących tłuszcz kwiatowy z chemiczną charakterystyką prowadzone były przez Reis i in. (2000, 2003) na *Oncidium pubes* Lindl. i *Ornithophora radicans* (Rchb.f.) Garay & Pabst. Analiza chemiczna wykazała, że głównym komponentem tłuszczu pochodzącego od tych dwu gatunków są diacyl- (oncidinol) i triacylglicerole. Kolejne badania Reis i in. (2006) potwierdziły te wyniki również dla *Phymatidium tillansioides* Barb. Rodr. W przypadku *P. delicatulum* Lindl. głównym składnikiem tłuszczów okazały się jednak proste liniowe węglowodory. Tłuszcz wydzielany przez trichomowe elajofory *Zygostaes lunata* Lindl. także zawiera mono-, di- i triacylglicerole, ale głównie nasycone i nienasycone kwasy tłuszczowe (Dumri i in. 2006, Dumri 2008).

Silvera (2002) dowiodła, że ilość tłuszczu może się różnić między poszczególnymi osobnikami tego samego rodzaju. *Oncidium cheirophorum* Rchb.f. może produkować około dwa razy więcej tłuszczu w jednym kwiecie niż



*O. ornithorhynchum* Kunth i nawet ponad 20 razy więcej niż *O. klotzschianum* Rchb.f. Innymi gatunkami z rodziny Orchidaceae, u których wykryto obecność tłuszczu kwiatowego są: *Sigmatostalix picturatissima* Kraenzl., *S. portillae* Königer, *S. oxyceras* Königer & J. G. Weinm, *S. marinii* Königer (Oncidiinae), *Ornithocephalus cochleariformis* C. Schweinf. czy *O. bicornis* Lindl, który to produkuje największe ilości tłuszczu wśród wyżej przebadanych. Zaskakujące jest też to, że tłuszcz pochodzący od *S. picturatissima* jest bardziej podobny pod względem chemicznym do tłuszczu wydzielanego przez kwiaty *Ornithocephalus* sp. niż innych gatunków z rodzaju *Sigmatostalix* (Silvera 2002).

Rośliny, które dostarczają nietłone tłuszcze jako nagrody dla zapylaczy mają jedne z bardziej interesujących, wyspecjalizowanych systemów zapylania spośród okrytozalążkowych a zapylacze mogą wykazywać odpowiednio zmodyfikowaną morfologię ciała i inne zachowanie w kwiatach w zależności od położenia elajoforów w kwiecie (Dressler 1968; Simpson i Neff, 1981; Armbruster 1985; Buchmann 1987; Vogel 1974; Cocucci 1991; Steiner i Whitehead 1991a).

Istnieje około 330 gatunków pszczół, które zbierają tłuszcz produkowany w kwiatach roślin z różnych rodzin (Alves-dos-Santos 2007; Alves-dos-Santos i in. 2007). U storczyków wydzielony tłuszcz zbierany jest głównie przez samice pszczół należące do jednego z czterech plemion rodziny Apidae, a mianowicie: Centridini, Ctenoplectrini, Tapinotaspidini, Tetrapediini (Vogel 1974, 1990; Simpson i Neff 1981; Cocucci i in. 2000), ale mechanizm taki występuje także u Melittidae (Buchmann 1987; Steiner i Whitehead 1988, 1990, 1991a, 1996; Whitehead i Steiner 2001; Michener 2000). Wydzielony tłuszcz służy, jako źródło pokarmu dla larw, gdy zmieszany jest z pyłkiem, jako jeden z materiałów do konstrukcji czy uszczelnienia gniazda lub nawet, jako pokarm dla osobników dorosłych (Vogel 1974; Simpson i in. 1977; Buchmann 1987; Endress 1994; Michener 2000; Rasmussen i Olesen 2000; Alves-dos-Santos i in. 2006; Buschini i Wolff 2006). Do konstruowania gniazd używany jest obok innych materiałów



tj. gleby, piasku, elementów drewna, w zależności od gatunku pszczoł (Vinson i in. 1996; Pereira i in. 1999; Jesus i Garófalo 2000).

Główną zaletą tłuszczu w porównaniu do nektaru jest jego kaloryczność (Simpson i in. 1983). Według Vogla (1989), tłuszcz kwiatowy jest około 8 razy bogatszy w kalorie w stosunku do tej samej ilości nektaru. Dlatego tłuszcze mogą zastąpić cukry zawarte w nektarze, jako źródło energii dla larw.

W odróżnieniu od nektaru, pszczoły nie zbierają tłuszczu ani nie transportują go za pomocą aparatu gębowego, ale za pomocą odnóży lub odwłoku, które to pokryte są odpowiednio wyspecjalizowanymi i rozgałęzionymi włoskami (Vogel 1974, Buchmann 1987).

Tylko dwa rodzaje pszczoł: *Macropis* i *Rediviva* z rodziny Melittidae obejmują gatunki zbierające tłuszcz kwiatowy z elajoforów trichomowych. Pierwszy z nich specjalizuje się w zbieraniu tłuszczu z kwiatów *Lysimachia*, należących do rodziny Primulaceae (Simpson i in. 1983; Cane i in. 1983; Steiner i Whitehead 1991a; Hoffmann i Kwak 2005; Dötterl i Schöffler 2007). Drugi przedstawiciel rodziny Melittidae - *Rediviva* zbiera tłuszcz z kwiatów rodzaju *Diascia*, *Bowkeria* czy *Hemimeris* (Scrophulariaceae) a tylko okazjonalnie z *Corycium* i *Disperis* (Coryciinae), będących przedstawicielami rodziny Orchidaceae (Steiner 1989; Steiner i Whitehead 1991a,b; Pauw 2005). Pauw (2006) zaobserwował również obecność samic *Rediviva peringueyi* w kwiatach z rodzaju *Pterygodium* (Coryciinae). Jedynym jak dotąd gatunkiem pszczoł z rodziny Melittidae, jaki odnotowano w kwiatach posiadających elajofory epitelialne jest *Rediviva gigas* (Manning i Goldblatt 2002). Pszczoły z rodzaju *Rediviva* używają przednich odnóży do zbierania tłuszczu. Tłuszcz ten jest następnie przenoszony na odnóża tylne i transportowany do gniazda gdzie staje się częścią pożywienia dla larw (Steiner i Whitehead 1991a).

Przedstawicielami rodziny Apidae, najczęściej spotykanymi na kwiatach produkujących tłuszcz są Tetrapediini. Zbierają tłuszcz wydzielany przez elajofory epitelialne w kwiatach *Banisteriopsis* sp. (Malpighiaceae), *Oncidium pubes* (Orchidaceae) czy *O. paranaense* (Singer i Cocucci 1999b; Attala i

Machado 2003; Singer 2003; Machado 2004; Sigrist i Sazima 2004). Pszczoła zbiera wydzielony tłuszcz za pomocą odnóży przednich i transportuje go odnóżami tylnymi (Singer i Cocucci 1999b). Spotykane są również w kwiatach z rodziny kosaćcowatych *Sisyrinchium* sp. o elajoforach trichomowych zlokalizowanych na kolumnie (Vogel 1974; Alves-dos-Santos 1999; Cocucci i Vogel 2001).

Mimo, że pszczoły z rodzaju *Tetrapedia* zbierają tłuszcze w kwiatach głównie z rodziny Orchidaceae (Buchmann 1987), wiele gatunków *Oncidium* jest zapylanych przez pszczoły z rodzaju *Centris*, np. *O. sphacelatum* Lindl. (Pemberton 2008). Kwiaty kilku gatunków *Oncidium*, takich jak *O. guianense* (Aubl.) Garay, *O. haitiense* Leonard & Ames, *O. quadrilobium* C. Schweinf, *O. osmentii* Withner, *O. compressicaule* Withner czy *O. cosymbephorum* C. Morren (Dod 1976; Carmona-Díaz i García-Franco 2009), teraz najczęściej zaliczanych do rodzaju *Tolumnia* Raf, są na tyle przebiegłe, że pozorują tylko produkcję tłuszczu podobną do tych jak u gatunków z rodziny Malpighiaceae, zwabiając tym samym podobnych zapylaczy. Pszczoły z rodzaju *Centris* (Centridini), oprócz aparatu zbierającego i transportującego pyłek, posiadają jeszcze specjalne struktury, zlokalizowane na przednich i środkowych odnóżach (np. haczykowaty organ tzw. *hood organ*), które odgrywają rolę w zbieraniu tłuszczu kwiatowego (Vogel 1974; Buchmann 2004; Machado 2004). Centridini często spotykane są na kwiatach o elajoforach trichomowych jak *Angelonia* (Vogel i Machado 1991), *Nierembergia* - Solanaceae (Cocucci 1991) czy *Calceolaria* - Scrophulariaceae (Buchmann 1987, 2004; Rasmussen i Olesen 2000), ale i na tych posiadających elajofory epidermalne jak np. *Krameria* - Krameriaceae (Machado 2004; Gimenes i da Lobão 2006), *Byrsonima*, *Malpighia*, *Stigmaphyllon* - Malpighiaceae (Vinson i in. 1997; Vogel i Machado 1991; Teixeira i Machado 2000; Buchmann 2004; Machado 2004; Giese 2005; Carvalho i in. 2005).

Przedstawiciele z Ctenoplectrini zaobserwowano jedynie na kwiatach Cucurbitaceae (*Momordica*, *Thladiantha*). Pszczoły takie używają wysoce wyspecjalizowanych struktur umieszczonych na odwłoku, które służą do

zbierania tłuszczu z elajoforów trichomowych bez używania odnóży (Buchmann 1987; 2004).

Pszczoły z rodzaju *Tapinotaspis* (Tapinotaspidini) także odwiedzają kwiaty posiadające elajofory trichomowe np. *Nierembergia* (Solanaceae), ale tłuszcz zbierają za pomocą szczoteczek umieszczonych na stopach odnóży środkowych. Tłuszcz jest przenoszony podczas lotu z odnóży środkowych na odnóża tylne za pomocą zmodyfikowanych ostróg (Cocucci 1991). Pszczoła taka odwiedza również kwiaty *Byrsonima* - Malpighiaceae i *Angelonia* - Scrophulariaceae (Buchmann 2004; Machado 2004). Innym rodzajem należącym do plemienia Tapinotaspidini jest *Paratetrapedia* sp, która jest zapylaczem dla niektórych storczykowatych z elajoforami epitelialnymi lub trichomowymi: *Ornithocephalus cochleariformis* C. Schweinf, *O. bicornis* Lindl, *Oncidium cheirophorum* Rchb.f, *Sigmatostalix picturatissima* Kraenzl. czy *Grobya amherstiae* Lindl. (Buchmann 1987, 2004; van der Cingel 2001; Silvera 2002; Mickeliunas i in. 2006).

#### 2.4.4. Woski i żywice

Woskowa lub żywiczna substancja produkowana jest wśród storczyków głównie przez przedstawicieli Maxillariinae Benth. (Porsch 1905; van der Pijl i Dodson 1969; Senghas 1993; Davies i in. 2003a; Davies i in. 2003b; Davies i Turner 2004a), Bifrenariinae Dressler (Davies i Stpiczyńska 2006), Cyrtopodiinae Benth. (Davies i in. 2006) i Eriinae Benth. (von Kirchner 1925). Davies i in. (2005) oszacowali, że ok. 13% gatunków wśród Maxillariinae produkuje woski i żywiczne substancje bogate w tłuszcze oraz aminokwasy. Poza rodziną Orchidaceae żywice występują w kwiatach z rodziny wilczomleczowatych (Euphorbiaceae; *Dalechampia* sp; Armbruster 1985) i kluzjowatych (Clusiaceae; *Clusia* sp, *Chrysochlamys* sp, *Clusiella* sp; Bittrich i Amaral 1997; Hammel 1999).

Woski produkowane przez struktury na powierzchni *labellum*, głównie przez różnego rodzaju papille lub trichomy. Papille zwykle są stożkowate o szerokiej podstawie, zaokrąglone lub spiczaste na szczycie lub prawie całkiem płaskie, mało wystające ponad powierzchnię (Davies i in. 2003a,b; Davies i Turner 2004a; Matusiewicz i in. 2004).

Występowanie wosków opisano u niektórych przedstawicieli Orchidaceae z rodzaju *Maxillaria* tj. *M. uncata*, *M. acuminata* i *M. discolor* alliances (Faegri i van der Pijl 1971; Davies i in. 2003a, Singer i Koehler 2004). Epidermalne papille na *labellum* u *M. acuminata* i *M. discolor* alliances wykazują typowe cechy komórek wydzielniczych, a synteza tłuszczów występuje w gładkim ER lub/i plastydach (Davies i in. 2003a). Substancja ta ma wartość odżywczą dzięki zawartości lipidów i aromatycznych aminokwasów (Davies i in. 2003a,b; Davies i Turner 2004a; Flach i in. 2004) i może być wykorzystywana raczej, jako źródło pożywienia niż swego rodzaju klej do budowania i reperowania gniazd, co wcześniej zostało zasugerowane przez pewnych autorów (van der Pijl i Dodson 1969; van der Cingel 2001). Komórki epidermy na *labellum* *M. chrysantha* Barb. Rodr. również produkują wosk (Davies i Winters 1998), tworząc na powierzchni warzki ochronny połyskujący film niedopuszczający do nadmiernego wysychania tkanki. Podobnie jest w przypadku innych kseromorficznych gatunków posiadających papille o cienkiej kutykuli tj. *M. pumila*, *M. subulata* i *M. madida* alliances (Pabst i Dungs 1977). Papille występujące na *labellum* posiadają stosunkowo cienką kutykulę. Zasugerowano, że owa połyskująca powierzchnia może imitować wodę (Warren 1999) lub nektar ażeby zwabiać owady (Davies i Turner 2004a). U przedstawicieli rodzaju *Maxillaria* wosk zbierany jest przez pszczoły bezządlę z rodziny Apidae, plemienia *Meliponini* (Flach et al. 2004).

Żywiczne wydzieliny znaleziono u pewnych gatunków *Maxillaria* Ruiz & Pav (Orchidaceae): *M. friedrichsthalii* Rchb. f, *M. superflua* Rchb.f, *M. nasuta* Rchb. f, *M. violaceopunctata* Rchb.f, *M. equitans* (Schltr.) Garay, jak również *M. acutifolia* Lindl, *M. tenuibulba* Christenson, *M. cerifera* Barb. Rodr. i *M.*

*notylioglossa* Rchb.f, gdzie mają postać kryształków pokrywających warzkę (Singer i Koehler 2004; Davies i Turner 2004a). Są one bogate w triterpenoidy (pochodne cykloartenolu) i zbierane są przez pszczoły lub osy (Braga 1977; Dressler 1993; Dondon i in. 2002; Flach i in. 2004). Triterpenoidy są głównym składnikiem żywicy produkowanej przez kwiaty *Dalechampia* (Armbruster 1985), natomiast pochodne benzofenonów są głównym składnikiem żywicy u gatunków z rodzaju *Clusia* (de Oliveira i in. 1996, 1999; Porto i in. 2000; Cuesta-Rubio i in. 2001). Żywica produkowana przez *Clusia* wykorzystywana jest przez zapylające je pszczoły do konstruowania gniazd (de Oliveira i in. 1996) i ich uszczelniania (Simpson i Neff 1981). Lopes i Machado (1998) wykazali, że pszczoły te należą do plemienia Euglossini i są to wyłącznie samice a żywica produkowana jest przez *staminodia* (*Clusia nemorosa* G. Mey). Żywica jest także doskonałym, antymikrobiologicznym składnikiem i obroną przed atakiem mrówek (Armbruster 1985; Dressler 1982; Sakagami i in. 1989; Lokvam i Braddock 1999; Michener 1990; Roubik 1989). Do innych zapylaczy kwiatów oferujących tę nagrodę należą Meliponini (Kaminski i Absy 2006). Identyczny skład żywicy jak ten u niektórych rodzajów *Clusia* występuje u blisko spokrewnionego rodzaju *Tovomitopsi* (Bittrich i in. 2003).

Substancje pochodzenia tłuszczowego produkowane są także przez papille znajdujące na *labellum* u *Cymbidium lowianum* (Rchb.f.) Rchb.f. i *C. dayanum* Rchb.f, należących do Cyrtopodiinae (Davies i in. 2006) oraz kalusie położonym na *labellum* u *Ceratandra* - storczyka południowo-afrykańskiego (Steiner 1998). Macpherson i Rupp (1934) dowiedli, że pszczoły bezżądłe *Trigona hockingsii* zbierają lepką substancję produkowaną wzdłuż środkowej osi warzki *C. iridifolium* A. Cunn. Ex Lindl. (syn. *C. madidum* Lindl.). Materiał jest wtedy przenoszony z przednich odnóży na drugą parę i w końcu do pyłkowych koszyczków na odnóżach tylnych.

von Kirchner (1925) opisał, bogatą w tłuszcze wydzielinę na warzce *Eria vulpine* Rchb.f. syn. *Trichotosia vulpine* (Rchb.f.) Kraenzl (Eriinae), jako twardą, grubą i mokrą, lepką masę, przypominającą gumę z wyglądu i konsystencji.

#### 2.4.5. Pseudopyłek i włoski jadalne

Pyłek w kwiatkach Orchidaceae skleiony jest w pyłkowiny, które nie stanowią pokarmu zapylaczy. Jedynie sypki pyłek w rodzaju *Neuwiedia* jest dostępny dla pszczół (Kocyan i Endress 2001). Dlatego też niektóre gatunki storczyków zamiast pyłku oferują owadom pseudopyłek. Występowanie pseudopyłku i włosków jadalnych u storczykowatych stwierdzono u przedstawicieli rodzajów *Dendrobium*, *Eria*, *Polystachya*, *Maxillaria*, *Thelymitra*, *Gastrodia*, zapylanych przez pszczoły (Dodson i Frymire 1961; Jones 1985; Bernhardt i Burns-Balogh 1986; Kjellsson i Rasmussen 1987; Davies i Winters 1998; Davies i in. 2000; van der Cingel 2001; Davies i in. 2002, 2003; Davies i Turner 2004b,c). Włoski jadalne zawierają w komórkach duże ciała białkowe, czasem ziarna skrobi, rzadko tłuszcze (Davies i in. 2000, 2002, 2003).

Włoski jadalne wykazują znaczną różnorodność morfologiczną w zależności od gatunku rośliny. Te występujące na *labellum* u *Polystachya* Hook. są paciorkowate (Davies i in. 2002). Trichomy jadalne występujące w kwiatkach innych gatunków jak np. *Maxillaria villosa* (Barb. Rodr.) Cogn. są najczęściej cztero-sześciokomórkowe z maczugowatą komórką na szczycie włoska (Davies i in. 2003a) lub maczugowate jednokomórkowe jak u *Eria monostachya* Lindl. (Davies i Turner 2004c) czy z wielokomórkową główką jak u *Dendrobium unicum* Seidenf. (Kjellsson i Rasmussen 1987; Davies i Turner 2004b). Inne są cylindryczne, trzy-pięciokomórkowe z zaokrąglonym końcem *Maxillaria violaceopunctata* Rchb.f. (Davies i in. 2003b) lub kuliste i pomarszczone u *Thelymitra nuda* R. Br. (Bernhardt i Burns-Balogh 1986). Obecność danego typu trichomów na *labellum* nie oznacza różnorodności w budowie wegetatywnej (Davies i in. 2000, 2002, 2003).

Pseudopyłek występuje na powierzchni *labellum* jako białawy proszkowaty nalot, powstający przez fragmentację trichomów. Różnica pomiędzy pseudopyłkiem a włoskami jadalnymi polega na tym, że włoski jadalne nie rozpadają się na pojedyncze komórki i zawierają głównie białka (van der Pijl i



Dodson 1969). U *Dendrobium unicum* Seidenf. pseudopyłek formowany jest przez fragmentację wielokomórkowej główki włoska (Kjellsson i Rasmussen 1987; Davies i Turner 2004b). Synonimem pseudopyłku spotykanym w literaturze jest słowo *farina*, pochodzące z łaciny, oznaczającego mąkę (Davies i Winters 1998).

Według Daviesa i in. (2000, 2003) kwiaty, które oferują zapylaczom pseudopyłek nie produkują nektaru. Jedynymi dotychczas poznanymi wyjątkami są *Thelymitra nuda* R.Br. i *Gastrodia sesamoides* R.Br. (Jones 1985; Bernhardt i Burns-Balogh 1986; van der Cingel 2001) wabiące zapylaczy również zapachem. Także *Maxillaria violaceopunctata* Rchb.f. i *M. villosa* (Barb. Rodr.) Cogn. (Davies i in. 2003b), które produkują zarówno pseudopyłek jak i substancję żywiczną zawierającą tłuszcze i aminokwasy oraz *M. lepidota* Lindl, która oprócz pseudopyłku i żywicy dodatkowo wydziela także nektar oraz odczuwalny przez człowieka zapach (Matusiewicz i in. 2004). Davies i in. (2005) oszacowali, że spośród 100 przebadanych gatunków *Maxillaria* ok. 16-23 % produkuje pseudopyłek (Davies i Winters, 1998; Davies i in. 2000, 2002, 2003a).

Pszczoły zbierające pseudopyłek zaobserwowano także w kwiatkach *Maxillaria sandariana* i *M. grandiflora* (Dodson i Frymire 1961; Dodson 1962). U *M. ochroleuca* Lodd. ex Lindl. i *M. brasiliensis* Brieger & Bicalho odnotowano obecność *Trigona spp.* (Meliponini; Singer 2003), natomiast u storczyka *Polystachya flavescens* (Lindl.) J. J. Sm. pszczoły *Dialictus aff. creberrimus* (Halictidae; Goss 1977). Samice pszczół z rodziny Halictidae (*Lasioglossum* sp.) zauważono również u *Thelymitra nuda* (Bernhardt i Burns-Balogh 1986). Kjellsson i Rasmussen (1987) uważają, że zapylaczem dla *Dendrobium unicum* są małe pszczoły lub osy zbierające pseudopyłek. Pszczoły z rodzaju *Exoneura* (Apidae, podrodzina Xylocopinae) zbierają pseudopyłek z kalusa umiejscowionego na warzce australijskiego gatunku storczykowatych *Gastrodia sesamoides* R.Br. (Jones 1985; van der Cingel 2001).



## 2.5. Mimikra i pseudokopulacja

Około jedna trzecia spośród wszystkich gatunków kwiatów z rodziny storczykowatych nie oferuje żadnej nagrody zapylaczom (Little 1983; Dafni 1984; Ackerman 1986; Nilsson 1992; Vogel 1993; Johnson 1994, 2000; Neiland i Wilcock 1998; Roy i Widmer 1999; Gumbert i Kunze 2001; Vallius 2000, 2001; Sugiura i in. 2002; Cozzolino i Widmer 2005).

W celu zwabienia zapylaczy kwiaty te wykorzystują mimikrę, polegającą na stosowaniu różnego rodzaju podstępów. Wyróżnia się mimikrę Müllera (*Müllerian mimicry*, mimikra niemodelowa), gdy gatunki naśladują inne poprzez wykształcenie podobnych cech lub behawioru, ale nie oferują nagrody. Drugi rodzaj mimikry to mimikra Batesa (*Batesian mimicry*) - powstaje, gdy gatunek imituje inny, liczniejszy w danym siedlisku takson (Dafni i Ivri 1981a; Nilsson 1983b; Dafni 1984; Nilsson 1992). Istnieje również pojęcie fakultatywnej mimikry kwiatowej. Oznacza ono, że roślina naśladowcza oferująca nagrodę lub ją imitująca, zwabia zapylaczy zarówno, gdy występuje samodzielnie jak i w towarzystwie rośliny modelowej. Wtedy liczba zwabionych zapylaczy dodatkowo się zwiększa (Dafni i Ivri 1981a).

Wy tłumaczeniem dla tego rodzaju oszustwa jest to, że mimikra u storczyków pełni rolę mechanizmu ułatwiającego allogamię (obcopolność) i powoduje lepsze rozprzestrzenianie pyłku a tym samym wydajniejszą reprodukcję (Dafni i Ivri 1979; Dressler 1981; Ackerman 1986; Neiland i Wilcock 1998; Johnson i Nilsson 1999). Stopień podobieństwa może być tak wysoki, że zapylacz nie jest w stanie odróżnić rośliny modelowej od naśladowczej (Johnson 1994, 2000).

Dość popularną metodą na zwabienie zapylaczy jest imitowanie obecności nagród (*food deception*) w kwiecie lub podobieństwo pod względem koloru czy kształtu do innych kwiatów oferujących nagrody dla zapylaczy (Dafni 1983; Nilsson 1983a,b; Beardsell i in. 1986; Johnson 1994; Roy i Widmer 1999).

Na przykład *Disa pulchra* Sond. (Orchidaceae) przypomina morfologicznie gatunek z rodziny Iridaceae (*Watsonia lepida* N.E. Brown.), który wydziela nektar. Powoduje to u zapylaczy omyłkowe szukanie nagrody w kwiecie *Disa*, a przy okazji zapylenie (Johnson 2000). Podobnie zachowują się kwiaty *D. ferruginea* (Thunb.) Sw. (Johnson 1994) czy *Cephalanthera rubra* (L.) Rich. (Nilsson 1983b).

Istnieją także kwiaty, które zwabiają zapylaczy zapachem nie oferując tak naprawdę żadnej nagrody. *Cypripedium tibeticum* King ex Rolfe zwabia słodką, owocową wonią królowe trzmieli, które dodatkowo prawdopodobnie mylą ciemny pułpkowy kwiat z własnym gniazdem (Li i in. 2006). Wiele gatunków *Bulbophyllum* produkuje nieprzyjemny dla człowieka zapach padliny, ale atrakcyjny dla muchówek z rodziny bzygowatych (*Syrphidae*) lub słodkawych zapach przyciągający muchówki z rodzaju *Bactrocera* (Tephritidae), zachęcając je tym samym do odwiedzenia kwiatu. Część z nich charakteryzuje dodatkowo obecność nektaru lub ruchome *labellum* (van der Pijl i Dodson 1969; Dressler 1981; Tan i Nishida 2000; Tan i in. 2002; Teixeira i in. 2004; Tan i Nishida 2005; Wood 2005; Jersáková i in. 2006).

Wśród storczyków są również i takie, które imitują obecność w kwiecie nagrody w postaci pyłku. W ten sposób zachowuje się *Calypso bulbosa* (L.) Oakes, który posiada żółte włoski - pseudopręciki na *labellum*, oferując pozornie pyłek trzmielom (Thien i Marcks 1972; Proctor i Harder 1995; van der Cingel 2001). Innym przykładem jest buławnik mieczolistny *Cephalanthera longifolia* (L.), u którego na warżce występują pomarańczowe papille (Dafni i Ivri 1981b). Wśród owadów żywiących się pyłkiem są również bzygowate (*Syrphidae*). Zdarza się, że w poszukiwaniu pożywienia zostają uwięzione w pułpkowych kwiatkach *Paphiopedilum barbigerum* T. Tang et F. T. Wang. W kwiecie tych storczyków występuje intensywnie żółte *staminodium*, które je zwabia. Podczas próby wydostania się z pułpki dochodzi do depozycji pyłku na tułowiu owada (Shi i in 2008).

Mimikra może również dotyczyć naśladownictwa miejsc lęgowych zapylaczy. Kwiaty z rodzaju *Dracula* wyjątkowo zaskakują swym wyglądem i zapachem. Upodabniają się one do owocnika grzyba, na którym muchy składają jaja (Kaiser 2006; Dentinger i in. 2008). Bulbophyllinae (rodzaj *Pedilochilus* Schltr.) prawdopodobnie też zwabiają samice owadów do złożenia jaj w kwiecie. Często posiadają one pęcherzykową warzkę, okrytą płatkami. Owad dostając się przez otwór uformowany przez warzkę nie może wydostać się z niej, gdyż brzegi warzki są skierowane do środka. Płatki okrywają warzkę i są prawie przezroczyste. Poszukując innej drogi wyjścia owad musi przejść poniżej kolumny, ocierając się o nią i zabierając pyłkowiny (van der Cingel 2001). Spektakularny sposób na zwabienie zapylacza mają kwiaty z rodzaju *Brassia* sp., które posiadają mocno wydłużone listki okwiatu będące odpowiednikiem odnóży pajaków. Osy z rodzajów *Pepsis* i *Campsomeris*, jako drapieżniki składają swoje jaja na świeżo zabitym przez siebie pająku. Zdarza się, że mylą kwiat ze swoją ofiarą i atakują go a wtedy dochodzi do depozycji *pollinarium* na tułowi owada (Pupulin i Bogarín 2005).

Specyficzny przykład mimikry występuje u *Ophrys*, który imituje kształtem i zapachem okwiatu kształty samic i ich feromony (mimikra seksualna, *sexual deception*), prowokując samce (niektóre trzmiele, osy i pszczoły samotnice) do tzw. pseudokopulacji, podczas której dokonuje się zapylenie kwiatu (Dafni 1984; Kullenberg 1961; Paulus i Gack 1990; Nilsson 1992; Schiestl i in. 1999, 2000; Delforge 2001; Pichersky i Gershenzon 2002). Z badań wynika, że 38 składników z 41 produkowanych przez *labellum* u *Ophrys iricolor* wywołuje reakcję u samców *Andrena morio* (rodzina Andrenidae, pszczolinkowate) prowadzącą do pseudokopulacji. Składnikami ekstraktu produkowanego przez okwiat a więc jednocześnie składnikami feromonów samic *Andrena* są głównie proste łańcuchy alkanów i alkanów z 20-29 atomami węgla, nierozgałęzione aldehydy (C9-C24), i dwa estry typu woskowego (Stöckl 2007). Obok rodzaju *Ophrys* oraz rodzajów australijskich (*Arthrochilus*, *Caladenia*, *Caleana*, *Calochilus*, *Chiloglottis*, *Cryptostilis*, *Drakaea*, *Leporella*, *Spiculaea*)

(Kullenberg 1961; Stoutamire 1983; Adams i Lawson 1993, Schiestl 2004; Gaskett i in. 2008) wymienianych jest jeszcze kilka rodzajów storczyków neotropikalnych, u których można również zaobserwować mimikrę seksualną: *Lepanthes*, zapylane przez muchówki (Diptera) z rodziny ziemórkowatych (Sciaridae: *Bradysia floribunda*) (Blanco i Barboza 2005) a także *Trichoceros*, *Telipogon*, *Trigonidium* (van der Pijl i Dodson 1966; Singer 2002a; Pulpin 2005), *Mormolyca* (Singer i in. 2004), *Geoblasta* (Ciotek i in. 2006). Nawet wśród przedstawicieli *Oncidium* (*Oncidium henekenii* syn. *Tolumnia henekenii*) występują gatunki prowokujące samca trzmieli do pseudokopulacji (Dod 1976; Pulpin 2005).

Pseudokopulacja jest obserwowana głównie w okresie deficytu samic, który wywołuje silną konkurencję samców. Kalusowate wyrostki i włoski stanowią dodatkowe bodźce dotykowe, które pomagają owadom przyjąć odpowiednią pozycję umożliwiającą zapylenie (Singer 2002a).

### 3. MATERIAŁ I METODY

#### 3.1. Materiał roślinny

Kolekcja storczyków założona została w 2006 roku w Ogrodzie Botanicznym UMCS w Lublinie. W skład jej wchodzi dwanaście gatunków z rodziny Orchidaceae tj. *Gomesa echinata* (Barb.Rodr.) M.W.Chase & N.H.Williams, *Gomesa radicans* (Rchb.f.) M.W.Chase & N.H.Williams, *Gomesa ranifera* (Lindl.) M.W. Chase & N.H. Williams, *Oncidium cheirophorum* Rchb.f, *Oncidium ornithorhynchum* Kunth, *Ornithocephalus ciliatus* Lindl, *Ornithocephalus gladius* Hook, *Phymatidium falcifolium* Lindl, *Sigmatostalix amazonica* Schltr, *Sigmatostalix oxyceras* Königler & J.G. Weinm.bis, *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. oraz *Zygostates lunata* Lindl. Rośliny należące do założonej kolekcji są epifitami. Pochodzą z Ameryki Południowej lub/i Ameryki Środkowej (Tab. 1). Sprowadzone zostały dzięki dwóm polskim firmom Orchidarium oraz Orchidsklepik, które zajmują się importem storczyków z całego świata. Te należące do założonej kolekcji importowano z Ekwadoru. Ze względu na różną nomenklaturę stosowaną w literaturze, za nazwy gatunkowe badanych storczyków przyjęto te według Kew World Checklist, a ich synonimy umieszczone zostały w Tabeli 1.

##### 3.1.1. *Gomesa echinata* (Barb.Rodr.) M.W.Chase & N.H.Williams

*G. echinata* to sympodialny epifit występujący w Brazylii (Tab. 1), o wielkości do 30 cm. Pseudobulwy u tego gatunku mierzą od 6 do 12 cm długości i ok. 2 cm szerokości. Na szczycie każdej pseudobulwy wyrastają dwa ostro zakończone liście o kształcie wstążkowym do owalnego. Liście mają do 18 cm długości i 3,0 cm szerokości (Fot. 1a-b). Rośliny *G. echinata* kwitną od stycznia

do lutego, a kwiatostanem jest wiecha, której długość to ok. 22 cm (Tab. 2). Zwisający pęd kwiatowy pojawia się przy podstawie ostatnio dojrzałej pseudobulwy (Fot. 1b-d). Warżka, a szczególnie jej końcowy odcinek zabarwiony jest na ciemnokarmazynowo (Fot. 1d-f). *Labellum* mierzy ok. 1,3 cm długości i składa się z trzech łatek, gdzie boczne łatki są jaskrawożółte. Powierzchnia warżki pokryta jest pofałdowanym, błyszczącym kalusem, który w środkowej części posiada dwa wyrostki, przypominające zęby. Pozostałe listki okwiatu, zarówno okółka wewnętrznego, jak i zewnętrznego mają kolor żółty lub żółtozielony, z bladoczerwonymi lub różowymi poprzecznymi plamkami (Fot. 1e-f). Liczne kwiaty są gęsto ułożone na górnej połowie pędu kwiatowego i wydzielają zapach. Mierzą one około 2,0 cm średnicy (Tab. 2). Prętosłup jest cylindrycznego lub maczugowatego kształtu, o długości ok. 0,6 cm. Opatrzony jest on z obu stron skrzydełkami, na których widoczne są czerwone plamki (Fot. 1f). *Pollinarium* tego gatunku tworzą dwa *pollinia*.

### 3.1.2. *Gomesa radicans* (Rchb.f.) M.W.Chase & N.H.Williams

*G. radicans*, podobnie jak *G. echinata* występuje w Brazylii (Tab. 1). Gatunek ten osiąga do 23 cm wysokości. Wąskie pseudobulwy mają maksymalnie 5 cm wysokości. Ich kształt zbliżony jest do wąsko-jajowatego, a kolor do jasnozielonego. Na szczycie każdej pseudobulwy wyrastają dwa wąskie, trawiaste liście o szerokości średnio 0,6 cm i długości 18 cm. Mają one delikatną teksturę, ale ich wierzchołki są ostro zakończone. Z podstawy ostatnio dojrzałej pseudobulwy wyrasta wysmukły, wygięty pęd kwiatostanowy (grono), zwykle dłuższy niż liście (Fot. 2a-b). Na każdym kwiatostanie wyrasta 8-11 kwiatów. Kwiaty są pachnące i małe o średnicy ok. 1,0 cm. Roślina kwitnie od sierpnia do października (Tab. 2). Listki obu okółków są zielonożółte, jedynie warżka jest białego koloru. *Labellum* jest też zdecydowanie większe od pozostałych listków okwiatu i posiada duży, żółtopomarańczowy kalus. Pozostałe listki mają podobną wielkość i kształt, są szeroko rozłożone, a nawet wygięte do tyłu, zależnie od

stadium antezy (Fot. 2b-d). Pręciosłup jest ciemnobordowy i łączy się z *labellum* za pomocą *tabula infrastigmatica*. *Pollinarium* opatrzone jest dwoma pyłkowinami.

### 3.1.3. *Gomesa ranifera* (Lindl.) M.W.Chase & N.H.Williams

*G. ranifera* jest również gatunkiem charakterystycznym dla Brazylii (Tab. 1). Organy wegetatywne w postaci pseudobulw są wydłużone, a ich średnie wymiary to 6,5 x 2,0 cm. Liście (ok. 17 x 1,5 cm) mają lancetowaty kształt i wyrastają z wierzchołków pseudobulw (Fot. 3a-b). Roślina kwitnie od maja do września. Kwiatostan osiąga ok. 22 cm długości, a średnica kwiatu nie przekracza 1,5 cm (Tab. 2). Kwiaty osadzone są na długich szypułkach i rozmieszczone są regularnie na pędzie kwiatowym, w postaci wiechy (Fot. 3c-d). Warżka składa się z trzech łatek, przy czym pozostałe dwie łatki boczne są dużo mniejsze. Łatka środkowa, największa, jest koloru jaskrawożółtego, natomiast boczne są żółte i posiadają dodatkowo brązową nasadę. W centralnej części *labellum* położony jest dość duży, pofałdowany, brązowy kalus, z którym bezpośrednio łączy się pręciosłup. Ten jest również żółtego koloru, a pod czapeczką znajdują się dwie pyłkowiny. Pozostałe listki okwiatu tj. dwa okółka wewnętrzne oraz trzy zewnętrzne są koloru żółtego z brązowymi pręgami (Fot. 3c-e).

### 3.1.4. *Oncidium cheiroporum* Rchb.f.

Zasięg tego gatunku obejmuje tereny Nikaragui, Kostaryki, Panamy i Kolumbii (Tab. 1). Jest to epifit, którego pseudobulwy osiągają ok. 3,0 cm długości. Organy te są eliptycznego lub prawie okrągłego kształtu. Młode pseudobulwy mają zielony kolor, natomiast w miarę strzenia stają się coraz bardziej bordowo nakrapiane, szczególnie w wierzchołkowej ich części. Liście



wyrastają z wierzchołka lub z podstawy pseudobulwy. W pierwszym przypadku ich liczba ogranicza się do dwóch, natomiast, gdy wyrastają z podstawy może być ich więcej (Fot. 4a). Kwitnienie u *O. cheirophorum* trwa od listopada do maja. Kwiaty zebrane są w wiechowaty kwiatostan, podobnie jak u *G. echinata* (Fot 4b). Długość pędu to ok. 18 cm, a wymiary kwiatów ok. 1,5 x 1,2 cm (Tab. 2). Kwiaty są cytrynowożółte, pachnące, osadzone są na długiej szypułce posiadającej bordowe prążki (Fot. 4b-d) Rozmieszczenie kwiatów na pędzie jest dość równomierne. Również tak samo jak u *G. echinata* warzka jest trójdzielna. U jej nasady, symetrycznie, po obu stronach znajdują się dwie owalne, błyszczące struktury (Fot. 4c-d). W centralnej części *labellum* znajduje się białawy kalus, na który składają się trzy wyrostki. W budowie okwiatu wyróżnić można *tabula infrastigmatica*, która łączy prętosłup i *labellum*. Prętosłup opatrzony jest z obu stron relatywnie dużym skrzydełkiem, a w workach pyłkowych znajdują się dwa *pollinia*. Okwiat *O. cheirophorum* zbudowany jest standardowo z dwóch okółków, zawierających po trzy listki. Listki okółka zewnętrznego mogą mieć czasem żółtozielone zabarwienie (Fot. 4c-d).

### 3.1.5. *Oncidium ornithorhynchum* Kunth

*O. ornithorhynchum* jest największą rośliną spośród tych, znajdujących się w założonej kolekcji storczyków. W naturalnym środowisku występuje od Meksyku po Kolumbię (Tab. 1). Jest sympodialnym epifitem, osiągającym 20-50 cm wielkości i tworzy gęste kępy bardzo skupionych pseudobulw. Pseudobulwy te mierzą 2,5-9,0 cm długości i 3,0-5,0 cm szerokości. Mają one kształt owalny lub elipsowaty i zwykle są nieco spłaszczone. Liście mogą mieć długość od 20 do 50 cm i szerokość od 1,5 do 3,5 cm. Na szczycie każdej pseudobulwy wyrastają dwa lub trzy łukowato wygięte liście o kształcie wydłużonym do lancetowatego. Jeżeli liście wyrastają przy podstawie są nieco mniejsze niż liście wyrastające z wierzchołka pseudobulwy (Fot. 5a). Kwitnienie trwa od listopada do marca. Wiechowaty kwiatostan ma ok. 40 cm długości (Tab. 2). Przy

podstawie ostatnio dojrzałej pseudobulwy wyrasta od 1 do 3 wygiętych lub zwisających pędów kwiatowych (Fot. 5a). Na każdym rozgałęzieniu kwiatostanu wyrasta wiele pachnących kwiatów, mających ok. 2,4 cm wielkości (Fot. 5b; Tab. 2). Kwiaty osadzone są na długich, ponad 3 cm długości szypułkach. Listki okwiatu są koloru różowopurpurowego, a warzka opatrzona jest żółtym kalusem w postaci licznych wyrostków ułożonych w pięciu rzędach (Fot. 5b-c). U jej nasady, po obu stronach znajdują się parzyste, białe struktury, których powierzchnia mocno się błyszczy (Fot. 5c). Swoje położenie zmieniają w zależności od stadium antezy. Boczne listki okółka wewnętrznego są odchylone pod kątem prostym w stosunku do warzki. Prętosłup ma około 0,5 cm długości i posiada z obu stron trójkątne skrzydełko. Prętosłup z warzką łączy *tabula infrastigmatica* (Fot. 5c). Podobnie jak u poprzedniego gatunku, pyłek zlepiony jest w dwie pyłkowiny.

### 3.1.6. *Ornithocephalus ciliatus* Lindl.

Gatunek ten jest storczykiem miniaturowym i cechuje go brak pseudobulw. Jego obszar występowania pokrywa się w części z *O. gladius* (Tab. 1). *O. ciliatus* posiada liście ułożone wachlarzykowato, pomiędzy którymi pojawiają się grona (Fot. 6a-d), mające ok. 6,0 cm długości (Tab. 2). Liście są lancetowate, ciemnozielone i ostro zakończone. Na osi kwiatostanu widoczne są trójkątne przysadki. Zielony pęd kwiatostanowy pokryty jest włoskami, podobnie zresztą jak listki okwiatu (Fot. 6c-e). Listki okwiatu są białe i okrągłe, zwężające się u nasady. Kwiaty są liczne, mają ok. 5,0 mm średnicy i pojawiają się między styczniem a lutym (Tab. 2). *Labellum* jest silnie wydłużone i przybiera barwę zieloną od strony odosiowej i białą od strony doosiowej (Fot. 6f). Pomiędzy prętosłupem a warzką usytuowany jest zielony kalus, po obu stronach opatrzony białymi wyrostkami. W centralnej części kalusa widoczne są włoski. *Pollinarium* składa się z czterech pyłkowin (Fot. 6f).

### 3.1.7. *Ornithocephalus gladius* Hook.

Gatunek ten, podobnie jak *O. ciliatus* jest miniaturowy. Ma bardzo szeroki zasięg i występuje na obszarze zarówno Ameryki Środkowej, jak i Ameryki Południowej, spotykany jest także w Indiach (Tab. 1). Liście *O. gladius* mają ok. 10 x 0,6 cm wielkości, są ostro zakończone i wachlarzykowato ułożone (Fot. 7a-b). Brak jest pseudobulw. Pęd kwiatostanowy w postaci grona wyrasta z kątów liści, a kwiaty pojawiają się ok. lutego. Kwiatostan mierzy średnio 5 cm, ale może osiągać nawet 11 cm. Kwiaty są szypułkowe i mają zaledwie ok. 8 x 6 mm (Tab. 2). Szypułki wyrastają z kątów przysadek (Fot. 7c). Listki okwiatu mają białozielony kolor, jednak warzka jest jaśniejsza i mocno wydłużona. Po obu jej stronach osadzone są małe, prawie owalne i bardziej zielone struktury, przez co *labellum* wygląda na trójdzielne (Fot. 7d). Ich powierzchnia pokryta jest błyszczącą wydzieliną. Prętosłup jest również zielony, a pyłek upakowany jest w postaci czterech pyłkowni.

### 3.1.8. *Phymatidium falcifolium* Lindl.

Gatunek ten występuje w Brazylii (Tab. 1). Kwitnie od czerwca do sierpnia. Kwiaty mają ok. 4 mm średnicy (Tab. 2) i jest ich od 3-10 na jednym gronie. Liście (ok. 3-6 cm długości), wyrastają w postaci jasnozielonych, trawiastych kęp. Kwiatostany mogą być dłuższe niż liście (Fot. 8a-b). Listki okwiatu są białe i wydłużone. Warzka kształtem przypomina trójkąt, którego ramiona są postrzępione. Jest ona koloru białego lub żółtobiałego, natomiast na jej powierzchni znajduje się błyszczący, zielony kalus. Ma on postać trzech kulistych części, z których środkowa jest największa i najintensywniej zabarwiona (Fot. 8c). U *P. falcifolium* występuje *pollinarium* z czterema pyłkowniami.

### 3.1.9. *Sigmatostalix amazonica* Schltr.

*S. amazonica* spotykany jest w takich krajach jak: Gujana Francuska, Surinam, Wenezuela, Kolumbia, Brazylia, Boliwia, Peru (Tab. 1). Kwiatostanem jest grono, które mierzy ok. 12 cm długości i często jest dłuższe niż liście. Kwiaty są miniaturowe i mają ok. 1 cm średnicy. Roślina kwitnie od maja do lipca (Tab. 2). Pseudobulwy są również stosunkowo małe i bocznie spłaszczone o wymiarach 4,5 x 1,5 cm. Z ich podstawy wyrasta kilka lancetowatych liści, ale dłuższe są zazwyczaj te wyrastające z wierzchołka pseudobulwy (Fot. 9a). Boczne listki okwiatu w okółku wewnętrznym, jak również trzy pozostałe w okółku zewnętrznym są żółte, ale posiadają brązowe pręgi. Nie różnią się znacznie kształtem, ani rozmiarem. Największym listkiem okwiatu jest warżka, która także posiada żółty kolor z brązowym cieniem w pobliżu kalusa (Fot. 9b). Ten ma postać masywnej żółtej struktury (czasem z brązowymi pręgami), otoczonej brązową obwódką. Jego powierzchnia jest błyszcząca i lekko wgłębiona. Kalus znajduje się w centrum okwiatu, a jego krawędzie znajdujące się od strony warżki zakończone są spiczasto. Pręciosłup jest cytrynowożółty, a pod żółtą czapeczką ukryte są dwie pyłkowiny (Fot. 9b).

### 3.1.10. *Sigmatostalix oxyceras* Königler & J.G. Weinm.bis

*S. oxyceras* jest małym epifitem, który zasiedla tereny Ekwadoru (Tab. 1). Morfologicznie bardzo przypomina *S. amazonica*. Pseudobulwy u tej rośliny są bardzo małe, ale wydłużone i silnie spłaszczone. Z ich wierzchołka wyrasta pojedynczy, lancetowaty liść. W przypadku, kiedy pojawia się on u podstawy pseudobulwy liczba ta może się zwiększać (Fot. 10a). Kwitnienie przypada na okres od lutego do maja. Wiechowaty kwiatostan ma zaledwie ok. 5,0 cm a kwiaty 3,0 mm wielkości (Tab. 2). Kwiaty rozmieszczone są równomiernie na pędzie kwiatostanowym, ale ich liczba jest niewielka (Fot. 10b-c). Listki okwiatu są koloru żółtego, z bordowobrązowymi pręgami. *Labellum* jest od nich znacznie

większe (Fot. 10b-d). Pomiedzy warzką a prętosłupem znajduje się duży, błyszczący kalus. Jest on sercowatego kształtu, otoczony bordową obwódką. Żółte jego wnętrze wypełnia wydzielina. Prętosłup odróżnia się od pozostałych części kwiatu swoim białym kolorem (Fot. 10d). Pod białą czapeczką znajdują się dwie pyłkowiny.

### **3.1.11. *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf.**

Gatunek ten występuje w Brazylii (Tab. 1). Jego jasnozielone liście ułożone są w luźno rozłożony wachlarz (Fot. 11a). Obecne są liście przykwiatowe. Z kąta przysadek wyrastają jasnozielone, długie szypułki (Fot. 11b-d). Kwiatostan (grono) jest zwykle dłuższy niż liście i osiąga ok. 12 cm. Kwiaty *Z. grandiflora* pojawiają się od maja do czerwca, mają ok. 2,0 cm średnicy (Tab. 2). Okwiat jest dwubarwny, u nasady listków okwiatu jest on ciemnozielony, natomiast w wyższych partiach biały. Brzegi listków okółka wewnętrznego są postrzępione i większe od pozostałych (Fot. 11e-f). Prętosłup jest także biały. *Pollinarium* jest stosunkowo długie i duże, z czterema pyłkowinami (Fot. 11e). Środek kwiatu zajmuje żółty lub żółtozielony kalus z włoskami (Fot. 11e).

### **3.1.12. *Zygostates lunata* Lindl.**

*Z. lunata* podobnie jak poprzedni gatunek z rodzaju *Zygostates* zamieszkuje lasy Brazylii (Tab. 1). Jest to mniejsza roślina od *Z. grandiflora*, ale również nie posiada pseudobulw. Liście *Z. lunata* mierzą średnio 7,0 x 2,0 cm, mają kształty od eliptycznych do lancetowatych i tworzą kępy (Fot. 12a-b). Kwiatostany w postaci gron pojawiają się od maja do sierpnia (Fot. 12c-d). Osiągają ok. 9,0 cm długości, natomiast kwiaty średnio 8,0 x 6,0 mm (Tab. 2) i wydzielają zapach. Na osi kwiatostanu obecne są małe, trójkątne przysadki.

Okwiat jest trójbarwny tj. zielono-żółto-biały. Listki okółka wewnętrznego są koloru żółtego o postrzępionych brzegach, u nasady zielonkawe. *Labellum* jest małe w porównaniu z pozostałymi listkami kwiatu i ma odmienny, biały kolor i wydłużony kształt. Listki okółka zewnętrznego są lekko wydłużone, podobnie jak warzka, ale w przeciwności do niej są zielonkawe. W centralnej części kwiatu widoczny jest błyszczący zielony kalus. Pokryty jest on włoskami, a po obu stronach opatrzony jest dość długimi wyrostkami (Fot. 12e-f). Zielony jest również pręciosłup. U *Z. lunata* występują cztery pyłkowiny (tak jak u poprzedniego gatunku) i okryte są żółtą czapeczką.

### 3.2. Systematyka i taksonomia

Brak jasnych poglądów na temat pochodzenia storczyków znajduje swoje przełożenie na system klasyfikacji tych roślin. Prace nad ich usystematyzowaniem prowadzone są od niemal 200 lat i do tej pory zaproponowano kilkanaście systemów klasyfikacji tej grupy roślin. Opierają się one na badaniach morfologicznych, cytologicznych, cytogenetycznych i biochemicznych, a obecnie coraz większą rolę odgrywa biologia molekularna. Cechami morfologicznymi, jakie brane są pod uwagę przy grupowaniu tych roślin są przede wszystkim: tekstura *pollinium*, typ trzonka *pollinarium*, budowa *viscidium*, miejsce połączenia pyłkowin oraz *viscidium*, pozycja i kształt pylników, trwałość ściany komórkowej pylników, liczba pyłkowin, struktura *rostellum*, rodzaj kwiatostanu oraz listowie (Rasmussen 1985; Rutkowski 1998).

Storczykowate według „Angiosperm Phylogeny Group III” (2009) należą obecnie do rzędu szparagowców (Asparagales Bromhead). W obrębie rodziny Orchidaceae Jussieu wyróżnia się pięć podrodzin tj. Apostasioideae, Cyripedioideae, Vanilloideae, Orchidioideae i Epidendroideae. Podrodziny są dzielone dodatkowo na plemiona, a te na podplemiona i rodzaje. Używa się również tzw. *alliance*, określającego w filogenetyce bliski stopień pokrewieństwa pomiędzy rodzajami. Długo istniały jednak niejasności dotyczące

taksonomi tych pięciu głównych grup. Dwie pierwsze tj. Apostasioideae i Cyripedioideae zaliczane były często jako samodzielne rodziny (Apostasciaceae i Cyripediaceae) należące do rzędu storczykowców Orchidales Bromhead (Szlachetko 1995).

John Lindley usystematyzował ok. 2000 znanych na ten czas gatunków storczyków i zaklasyfikował je do 7 plemion. Podział ten stanowi podstawę wszelkich badań nad systematyką tych roślin do dnia dzisiejszego (Lindley 1830-1840). Pierwsze próby grupowania orchidei dokonano przede wszystkim na podstawie liczby płodnych pręcików. Stąd też rośliny te podzielono na monandryczne (o jednym płodnym pręciku), wśród których jest znakomita większość storczyków i niemonandryczne (posiadające więcej niż jeden płodny pręcik). Wśród nich są bardziej prymitywne podrodziny Apostasioideae i Cyripedioideae (Pfitzer 1889; Schlechter 1926). Niektórzy autorzy zaliczają do rodziny Orchidaceae tylko takie storczyki, które posiadają jeden płodny pręcik (Monandrae), tworząc tym samym z Diandrae oddzielną rodzinę (Rasmussen 1985). Wstępną analizę numeryczną (fenetyczną) storczykowców przedstawił Clifford i Lavarack (1974). Posłużyła ona do obliczenia podobieństwa pomiędzy organizmami. W tym celu uwzględniono 93 rodzaje storczyków, po jednym z każdego wyróżnionego wówczas podplemienia i przyporządkowano je do 20 grup. Dendrogramy utworzone zostały na podstawie szeregu charakterystycznych cech, zarówno budowy morfologicznej, jak i anatomicznej organów wegetatywnych i generatywnych. W kolejnych latach opracowane zostały również dwie kompleksowe analizy kladystyczne storczyków oparte na cechach wspólnie zaawansowanych tzw. synapomorfii (Burns-Balogh i Funk 1986; Dressler 1993). W wyniku przeprowadzonych badań Burns-Balogh i Funk wyszczególniły sześć podrodzin Orchidaceae: Apostasioideae, Cyripedioideae (dwie pierwsze klasyfikowane są często jako rodziny), Neottioideae, Orchidoideae, Spiranthoideae i największą Epidendroideae. Podobną klasyfikację przyjął Dressler (1993) oraz Cameron i in. (1999), ale z wyłączeniem Neottioideae. Według klasyfikacji zaproponowanej przez Dresslera



(1993) oraz Sterna i in. (2004) podplemiona Oncidiinae i Ornithocephalinae należą do rodziny Orchidaceae, podrodziny Epidendroideae, grupy (phylad) Cymbidioid i plemienia Maxillarieae, które składa się z ok. 2600 gatunków należących do 165 rodzajów (ok. 10% wszystkich storczyków).

Zupełnie inny pogląd zaprezentowany został przez Szlachetko (1995), który do rzędu Orchidales przyporządkował trzy rodziny storczyków tj. Apostasiaceae Lindl, Cyripediaceae Lindl. oraz Orchidaceae Juss. Utrzymał podział Dresslera (1993) na podplemiona Oncidiinae i Ornithocephalinae, jednak oba zaklasyfikował do podrodziny Vandoideae oraz odpowiednio do plemion Oncidieae oraz Ornithocephaleae Szlach, wśród którego obok Ornithocephalinae znalazło się utworzone przez autora podplemię Hintonellinae Szlach. Główną cechą różnicującą te dwa ostatnie taksony była długość rostellum i kształt pollinium.

W celu zbadania stopnia pokrewieństwa pomiędzy gatunkami oraz ustalenia stopnia zaawansowania ewolucyjnego wykorzystywane są również molekularne analizy filogenetyczne. Wyniki badań Whittena i in. (2000) oparte na analizie fragmentów DNA jądrowego i plastydowego wykazały, że Oncidiinae nie jest taksonem monofiletycznym a podplemię Ornithocephalinae jest blisko z nim spokrewnione i dlatego zostało przez autorów włączone do tej samej grupy roślin (Oncidiinae). Badania te zostały potwierdzone również trzy lata później (Williams i Whitten 2003). Molekularną analizę filogenetyczną przeprowadzili również Chase i in. (2003), skupiając się na usystematyzowaniu całej rodziny storczykowatych. Owy system klasyfikacji zakładał istnienie również pięciu podrodzin tj. Apostasioideae, Cyripedioideae, Orchidoideae i Epidendroideae, jednak zamiast Spiranthoideae wyróżniono inną podrodzinę – Vanilloideae. Nowością było również utworzenie większego plemienia Cymbidieae (zamiast Maxillarieae) i zaklasyfikowanie do niego Oncidiinae. Ponadto kolejny raz potwierdzono, że podplemię Ornithocephalinae jest ściśle związane z Oncidiinae i nie powinno być wyodrębniane tylko ze względu na zwiększoną liczbę *pollinium* (cztery zamiast dwóch). Stąd autorzy zasugerowali,

że nie należy polegać wyłącznie na cechach morfologicznych przy tworzeniu taksonów.

Podział systematyczny gatunków Orchidaceae, badanych w niniejszej pracy jest różny w zależności od przyjętego systemu klasyfikacji. Ten przyjęty przeze mnie oparty jest o badania wykonane przez „Angiosperm Phylogeny Group III” (2009) oraz Chase i in. (2003).

Rodzina: Orchidaceae Juss.

Podrodzina: Epidendroideae Lindl.

Plemię: Cymbidieae Pfitz.

Podplemię: Oncidiinae Benth.

*Baptistonia* Barb.Rodr.

*Gomesa* R.Br.

*Oncidium* Sw.

*Sigmatostalix* Reich.

*Ornithocephalus* Hook.

*Phymatidium* Lindl.

*Zygostates* Lindl.

### 3.3. Metody badawcze

Badania nad budową morfologiczną, anatomiczną i ultrastrukturą elajoforów oraz korelacją pomiędzy stadium antezy i receptywności znamion a okresem aktywności wydzielniczej tych gruczołów, prowadzone były na kwiatach będących w trzech stadiach rozwojowych:

- a) pąk (1 tydz. przed otwarciem kwiatu u *G. ranifera*, *O. ciliatus*, *P. falcifolium*, *Z. grandiflora*, 3 tyg. przed rozpoczęciem kwitnienia u *G. echinata*, *O. cheirophorum* oraz *O. gladius*, natomiast 4 tyg. przed rozpoczęciem kwitnienia u *O. ornithorhynchum*, *G. radicans*, *S. oxyceras* i *Z. lunata*),

- b) pierwszy dzień antezi (dzień rozpoczęcia kwitnienia tj. pełnego rozchylenia wszystkich listków okwiatu) u każdego z gatunków,
- c) stadium końcowe antezi, w którym następuje więdnienie listków okwiatu (w zależności od długości kwitnienia danego gatunku przyjęto 5 dzień antezi *P. falcifolium*, 7 dzień antezi *S. amazonica*, 4-9 dzień antezi *S. oxyceras*, 9 dzień antezi *O. ciliatus*, 9-13 dzień antezi *O. gladius*, 10 dzień antezi *G. ranifera*, 12 dzień antezi *Z. grandiflora*, 13 dzień antezi *G. echinata*, 16-19 dzień antezi *O. cheirophorum*, 16 dzień antezi *O. ornithorhynchum*, 18 dzień antezi *G. radicans* i 21-34 dzień antezi *Z. lunata*).

Kwiaty w różnych stadiach antezi oznaczano kolorowymi nitkami.

### 3.3.1. Obserwacje makroskopowe

Przeprowadzone obserwacje makroskopowe, obejmowały określenie:

- a) Długości kwitnienia poszczególnych gatunków - za wyznacznik przyjęto moment rozchylenia się pierwszego i więdnienia ostatniego kwiatu w kwiatostanie w danym sezonie wegetacyjnym.
- b) Długości życia kwiatu
  - od antezi do więdnienia okwiatu - kwiaty niezapylone (6 = liczba obserwacji, wyjątkiem jest *P. falcifolium* i *S. amazonica*, gdzie liczba obserwacji = 2),
  - od antezi do więdnienia okwiatu - kwiaty zapylone w drugim dniu antezi (2 = liczba obserwacji, wyjątkiem jest *P. falcifolium* i *S. amazonica*, gdzie brak jest danych ze względu na małą liczbę kwiatów na pędzie kwiatostanowym),
  - od antezi do więdnienia okwiatu - kwiaty po usunięciu pyłkowiny w drugim dniu antezi (2 = liczba obserwacji, wyjątkiem jest *P. falcifolium* i *S. amazonica*, gdzie brak jest danych ze względu na małą liczbę kwiatów na pędzie kwiatostanowym).

### **3.3.2. Badanie receptywności znamion**

#### **3.3.2.1. Test Peroxtesmo Ko**

Testy receptywności znamion przeprowadzono za pomocą zmodyfikowanej metody Dafni i Maués (1998) wykorzystującej papierki wskaźnikowe Peroxtesmo Ko (MACHEREY-NAGEL D-52313 Dren, Germany). Metoda ta opiera się na identyfikacji aktywności enzymatycznej peroksydazy charakteryzującej znamię receptywne. Papierek Peroxtesmo Ko o wymiarach 15 x 15 mm umieszczano w probówce Eppendorf, po czym dodawano 1 ml wody destylowanej. Tak otrzymany roztwór nakraplano bezpośrednio na znamię. Barwa niebieska na znamieniu świadczyła o jego receptywności. W przypadku znamion o naturalnie ciemnym zabarwieniu odsączano nakroplony roztwór po ok. 3 min bibułą Whatman nr 1 by sprawdzić czy kolor roztworu uległ zmianie. Ocenę receptywności znamion prowadzono w stadium pąka, w pierwszych dniach antezy oraz w końcowych dniach antezy. Wyniki przeprowadzonych testów zostały udokumentowane fotograficznie. Zmianę zabarwienia roztworu testowego obserwowano przy użyciu mikroskopu stereoskopowego Olympus SZX12.

#### **3.3.2.2. Zdolność kiełkowania łagiewek pyłkowych na znamieniu**

W celu stwierdzenia zdolności kiełkowania ziaren pyłku na znamieniu w trzech (powyżej opisanych stadiach antezy) przygotowywano preparaty barwione błękitem anilinowym według metody Curriera (1957). Wyizolowane znamię 24 godz. po manualnym zapyleniu geitonogamicznym, macerowano w 1N NaOH w temp. 60 °C. Następnie materiał płukano w wodzie destylowanej i umieszczano na szkiełkach podstawowych w kropli 0,01% błękitu anilinowego

rozpuszczonego w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 9,5 i delikatnie rozgniatano. W celu zabezpieczenia preparatów przed zbyt szybkim wysychaniem pod szkiełko nakrywkowe nanoszono dodatkowo kroplę gliceryny. Bezpośrednio po wykonaniu, preparaty oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon Eclipse 90i, wyposażonym w filtr DAPI (światło wzbudzające 340-380 nm, filtr barierowy 435-485 nm) oraz dokumentowano fotograficznie przy użyciu kamery Nikon DS-Qi1Mc. Preparaty niebarwione błękitem anilinowym analizowane były również w mikroskopie świetlnym (LM) Jenaval lub Nikon Eclipse E-600 i E-200.

### **3.3.3. Przygotowanie materiału do badań anatomicznych i ultrastrukturalnych**

Elajofory bezpośrednio po wyizolowaniu z kwiatów, utrwalno w 4% aldehydzie glutarowym zbuforowanym 0,1 M buforem fosforanowym o pH 7,0. Utrwalanie przeprowadzono przez 2 godz. w temperaturze 4 °C, po czym materiał płukano w 0,1M buforze fosforanowym przez 24 godz. w 4 °C. Po wypłukaniu materiał był kontrastowany w wodnym roztworze 1,5% czterotlenku osmu przez 1,5 godz. Następnie po dwukrotnym przepłukaniu wodą destylowaną ponownie dokontrastowywany w 0,5% wodnym roztworze octanu uranylu przez 2 godz. w temp. pokojowej i ponownie wypłukany w wodzie destylowanej.

Kolejnym etapem było odwadnianie materiału w serii roztworów alkoholu etylowego o stężeniu 30%, 50%, 70%, 90%, 96% i 99,8%, po 15 min w każdym roztworze.

Odwodniony materiał przesycano żywicą LR White (LR White acrylic resin, medium grade, Sigma). Materiał umieszczano na 1 godz. kolejno w mieszaninie żywicy i acetonu w stosunku 2:1 oraz 1:1. Następnie trzykrotnie na 1 godz. w mieszaninie o stosunku 1:2, gdzie wyższe było stężenie żywicy.

W ostatnim etapie materiał umieszczano w plastikowych kapsułkach wypełnionych czystą żywicą LR White, szczelnie zamykano i polimeryzowano przez 24 godz. w temp. 60 °C.

#### **3.3.4. Przygotowanie preparatów półcienkich i ultracienkich**

Zatopiony materiał krojono nożem szklanym na skrawki przy użyciu ultramikrotomu Reichert Ultracut S. Grubość skrawków półcienkich wynosiła 1 µm, natomiast ultracienkich 70 nm.

Skrawki półcienkie barwiono przez ok. 5-7 min w temp. 60 °C w 1% błękitie metylenowym i 1% azurem II (1:1) po czym płukano wodą destylowaną i 5% alkoholem etylowym oraz suszono. Barwienie to różnicuje elementy struktur komórkowych w odcieniach od granatowego do szarego. Preparaty zamykano używając Eukittu i oglądano w mikroskopie świetlnym Jenaval lub Nikon Eclipse 600 i E-200.

Z kolei skrawki ultra cienkie kontrastowano w 8% wodnym roztworze octanu uranylu, przez 40 min, a następnie w odczynniku Reynoldsa (2,5% azotan ołowiu i 3,5% cytrynian sodu o pH 4-5, regulowanym przy użyciu 1N NaOH), przez 10 min. Po każdym z odczynników materiał płukano trzykrotnie w wodzie destylowanej przez 5 min. i suszono na bibule filtracyjnej. Preparaty oglądano w mikroskopie elektronowym transmisyjnym (TEM) TESLA BS-340 i fotografowano na błonach Kodak wielkości 6,5 cm × 9 cm (Sigma) lub oglądano na mikroskopie FEI Tecnai Spirit G<sup>2</sup> a obrazy zapisywano w postaci plików graficznych przy użyciu kamery Megaview G<sup>2</sup> Olympus Soft Imaging Solutions.



### **3.3.5. Testy histochemiczne tkanki wydzielniczej (elajoforów)**

#### **3.3.5.1. Test na obecność nierozpuszczalnych polisacharydów**

Nierozpuszczalne polisacharydy barwiono wykorzystując reakcję PAS, przy użyciu odczynnika Schiffa (odbarwiona fuksyna zasadowa). Reakcja ta stosowana jest do wykrywania polisacharydów, np. skrobi, celulozy, pektyn. W tym celu szkiełka podstawowe ze skrawkami półcienkimi umieszczane były w 1% kwasie nadjodowym na 10 min, po czym płukane i wybarwiane odczynnikiem Schiffa przez ok. 20 min aż do momentu kiedy barwa odczynnika zacznie się zmieniać z pomarańczowej na różową. Po wypłukaniu w wodzie bieżącej preparaty były osuszane w temp. 60 °C. Preparaty zamykano używając Eukittu i oglądano w mikroskopie świetlnym Jenaval lub Nikon Eclipse 600 i E-200. W tak przygotowanych preparatach skrobia przybiera kolor różowofioletowy (Jensen 1962).

Dodatkowo w celu wykrycia skrobi w skrawkach ręcznie krojonych stosowano również płyn Lugola.

#### **3.3.5.2. Test na obecność tłuszczów**

Test wykrywający obecność tłuszczów w tkance elajoforu wykonano przy pomocy takich barwników jak Sudan III oraz auramina O.

Sudan III stosowano do barwienia skrawków ręcznie krojonych. Tak wybarwione preparaty oglądano w mikroskopie Jenaval lub Nikon Eclipse 600 i E-200. O obecności tłuszczów świadczy pomarańczowoczerwona barwa.

Do wyznakowania tłuszczów oraz kutykuli w skrawkach półcienkich zastosowano auraminę O. Skrawki półcienkie, wybarwione auraminą O zamykano stosując glicerynę i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon

Eclipse 90i, wyposażonym w filtr FITC (światło wzbudzające 465-495 nm, filtr barierowy 515-555 nm).

### **3.3.6. Przygotowanie materiału do obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM)**

Utrwalanie materiału do mikroskopii skaningowej przeprowadzono podobnie jak w przypadku przygotowania materiału do badań w mikroskopie świetlnym oraz elektronowym transmisyjnym, a wypreparowane elajofory pochodziły również z kwiatów będących w trzech stadiach rozwojowych.

Utrwalony materiał odwadniano w seriach acetonowych, kolejno 15%, 30%, 50%, 70%, 90%, 99,5% i acetonie bezwodnym 100%, w każdym przypadku po 15 min. Preparaty wysuszone w punkcie krytycznym w ciekłym CO<sub>2</sub>, napyłano złotem i obserwowano w mikroskopie elektronowym TESLA BS-300 lub Tescan Vega II LS.

### **3.3.7. Pomiary kwiatów i elajoforów**

W przypadku każdego z badanych gatunków dokonano następujących pomiarów:

- a) długość pędu kwiatostanowego, od nasady do szczytowej części ostatniego kwiatu,
- b) wielkość kwiatu (długość mierzona była od prętosłupa lub szczytowej części listka w okółku zewnętrznym do szczytowej części *labellum*, natomiast szerokość określano biorąc pod uwagę szczytowe części najbardziej wysuniętych listków okwiatu).
- c) długość i szerokość elajoforu.

### 3.3.8. Morfometria komórek wydzielniczych

W celu odnotowania zmian zachodzących podczas sekrecji w warstwie wydzielniczej elajoforu wykorzystano analizę ilościową, inaczej stereologię, polegającą na pomiarach poszczególnych składników komórki w danym stadium rozwojowym kwiatu (Steer 1981; Sundberg 1992; Davis i Gunning 1992; Razem i Davis 1999; Martinez i in. 2004). Na przekroju poprzecznym tkanki wydzielniczej mierzono następujące parametry:

- grubość kutykuli,
- grubość ściany komórkowej zewnętrznej i wewnętrznej promienistej,
- średnicę porów w ścianie zewnętrznej komórek epidermy oraz w ścianach promienistych,
- powierzchnię protoplastu,
- powierzchnię wakuomu (zespół wakuol w jednej komórce),
- powierzchnię jądra komórkowego,
- powierzchnię cytoplazmatyczną,
- powierzchnię kropeł tłuszczu na zewnątrz tkanki,
- liczbę amyloplastów w komórce,
- liczbę ziaren skrobi w plastydzie,
- długość włosków i papilli wydzielniczych.

Aby oszacować powierzchnię cytoplazmatyczną komórki, od całkowitej powierzchni protoplastu odejmowano powierzchnię zajmowaną przez wakuole oraz jądro komórkowe. W przypadku długości włosków, brano pod uwagę również obrazy z mikroskopu elektronowego skaningowego.

W celu zebrania danych podczas powyższych pomiarów wykorzystano program komputerowy CoolView. Dodatkowo dokładność niektórych pomiarów z mikroskopu świetlnego (tj. grubość kutykuli i ściany komórkowej oraz średnica porów w ścianie komórkowej) weryfikowano przy użyciu programu komputerowego TEM Imaging & Analysis. Pomiary wykonywano w 10 powtórzeniach. Wyniki tych badań opracowano statystycznie.

### 3.3.9. Określenie masy wydzielonego tłuszczu

Wydzielony przez elajofory tłuszcz odsączano za pomocą bibulek wcześniej ekstrahowanych w 70% acetonie według zmodyfikowanej metody Reis i in. (2006). W celu określenia masy tłuszczu wyprodukowanego przez elajofory, na analitycznej wadze elektronicznej Radwag XA 60/220 ważono oznaczone i wysuszone w acetonie bibułki, a następnie zbierano za pomocą tych bibulek tłuszcz bezpośrednio z powierzchni elajoforu i ponownie ważono papiercek wraz z pobranym tłuszczem. Pod uwagę brano skumulowaną masę tłuszczu wydzielonego przez kwiat w trzech jego stadiach rozwojowych. I tak, dla gatunków:

- *G. echinata*: pąk 3 tyg. przed otwarciem kwiatu, 1 dzień antezy, 3-11 dzień antezy;
- *G. radicans*: pąk 3 tyg. przed otwarciem kwiatu, 1 dzień antezy, 7-19 dzień antezy;
- *G. ranifera*: pąk 1 tydz. przed otwarciem kwiatu, 1 dzień antezy, 3-10 dzień antezy;
- *O. cheiroporum*: pąk 3 tyg. przed otwarciem kwiatu, 1 dzień antezy, 7-19 dzień antezy;
- *O. ciliatus*: pąk 1 tydz. przed otwarciem kwiatu, 1 dzień antezy, 3-13 dzień antezy;
- *O. ornithorhynchum*: pąk 4 tyg. przed otwarciem kwiatu, 1 dzień antezy, 4-14 dzień antezy;
- *Z. grandiflora*: pąk 1 tydz. przed otwarciem kwiatu, 1 dzień antezy, 2-12 dzień antezy;
- *Z. lunata*: pąk 4 tyg. przed otwarciem kwiatu, 1 dzień antezy, 4-19 dzień antezy.

W przypadku takich gatunków jak *O. gladius*, *P. falcifolium*, *S. amazonica* oraz *S. oxyceras*, stosując powyższą metodę, niemożliwym było ustalenie masy wydzielanego tłuszczu. Powodem była zbyt mała jego ilość.

Jednak obserwacje sekrecji tłuszczu prowadzone były dla wszystkich gatunków od stadium pąka oraz przez cały okres kwitnienia, jak również po zapyleniu lub usunięciu pyłkowiny.

### **3.3.10. Analizy statystyczne**

Uzyskane wyniki dotyczące pomiarów ultrastrukturalnych organelli komórkowych poddano analizie statystycznej metodą analizy wariancji dla klasyfikacji jednoczynnikowej. Istotność różnic opracowano za pomocą testu T-Tukeya oraz dokonano obliczeń NIR (największa istotna różnica) na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

## 4. REZULTATY

### 4.1. *Gomesa echinata* (Barb.Rodr.) M.W.Chase & N.H.Williams

*G. echinata* kwitnie ok. 25 dni, natomiast długość życia jednego kwiatu wynosi ok. 17 dni (Tab. 2). Gruczołem wydzielniczym jest elajofor typu epitelialnego. Umiejscowiony jest on na doosiowej stronie warzki, w postaci kalusa, pokrytego biało-bordowymi pręgami (Fot. 1e-f; Fot. 13a-b). Elajofor zajmuje prawie całą długość *labellum*. Powierzchnia gruczołu jest brodawkowata, a w środkowym jego fragmencie wyrastają dwa kalusowe wyrostki (Fot. 13a-b). Epitel stanowi jedną warstwę komórek wydzielniczych o wydłużonym kształcie, ułożonych palisadowo, pod którym znajdują się 1-2 warstwy subsekrecyjne. Komórki tych warstw są spłaszczone i posiadają stosunkowo duże jądro. W miękiszu zasadniczym znajduje się szereg wiązek przewodzących kolateralnych zamkniętych oraz rafidy w wakuolach (Fot. 13c-d).

#### 4.1.1. Stadium pąka

Sekrecja tłuszczu u *Gomesa echinata* Barb.Rodr. rozpoczyna się ok. 3 tyg. przed otwarciem kwiatu. Pąk jest wtedy we wczesnym stadium rozwoju, jest on mocno ściśnięty i ma żółtawy kolor (Fot. 1c; Fot. 14a). Elajofor nie jest jeszcze w pełni wykształcony, a wydzielina na jego powierzchni jest słabo widoczna (Fot. 14b). Elajofor mierzy ok. 4,0 x 1,5 mm (Tab. 2) i ma postać białego, kalusowatego pasma (Fot. 14b). Połyskująca warstwa tłuszczu widoczna jest na zewnątrz elajoforu ok. 2 tyg. przed rozpoczęciem antezi. Pąk ma już jasnozielone zabarwienie, jest lekko rozchylony i widoczna jest szczytowa część warzki (Fot. 14c-d). Zmienia się również zabarwienie elajoforu na bordowo-białe, a jego powierzchnia staje się bardziej brodawkowata (Fot. 14d).



Wydzielina pokrywa całą powierzchnię kalusa, choć największa jej ilość gromadzi się w pobliżu kalusowatych wyrostków (Fot. 14e). Wśród komórek wydzielniczych elajoforu wyróżnić można dwa ich typy tj. płaskie położone u nasady *labellum* i w środkowym odcinku elajoforu, w tym na wyrostkach (Fot. 14f-h) oraz stożkowate znajdujące się na krawędziach i w dystalnej części kalusa, na powierzchni których gromadzi się szczególnie dużo wydzieliny (Fot. 14i-j). Na granicy kalusa i bocznej powierzchni warzki zlokalizowane są aparaty szparkowe (Fot. 14j).

Barwienie Sudanem III ręcznie krojonych skrawków ze świeżego materiału pokazuje, że tłusta wydzielina pojawia się ok. 3 tyg. przed otwarciem kwiatu, zarówno na zewnątrz tkanki, jak i wewnątrz komórek (Fot. 15a). Ok. 7 dni przed otwarciem kwiatu ilość wydzieliny wzrasta i widoczna jest także rozciągnięta kutykula, pod którą gromadzi się wydzielany tłuszcz (Fot. 15b). W cytoplazmie komórek sekrecyjnych krople tłuszczu gromadzą się głównie tuż pod zewnętrzną ścianą komórkową (Fot. 15c). Zewnętrzna ściana komórkowa jest dość gruba i pokryta również grubą warstwą kutykuli (Fot. 15c-d; Tab. 3a; Tab. 4a). Komórki zarówno warstwy wydzielniczej jak i podwydzielniczej charakteryzują się jasną cytoplazmą (Fot. 15c; Tab. 3a). W stadium wczesnego pąka tj. 3 tyg. przed kwitnieniem reakcja PAS nie wykazuje obecności ziaren skrobi w komórkach elajoforu. Skrobia pojawia się na kilka dni przed kwitnieniem, a liczne amyloplasty gromadzą się głównie wokół jądra komórek wydzielniczych oraz w mniejszej ilości, w komórkach warstwy podwydzielniczej (Fot. 15e-f). Mimo obecności skrobi w komórkach, zastosowanie płynu Lugola na świeżym materiale nie daje pozytywnej reakcji.

W transmisyjnym mikroskopie elektronowym (TEM) kutykula widoczna jest jako podwójna warstwa, gdzie zewnętrzną warstwę tworzą lamelle, pod którymi gromadzi się tłuszcz, natomiast wewnętrzna ma budowę siatkowatą (Fot. 16a-c). W zewnętrznej ścianie komórek epitelu nie występują pory. Niewielkie perforacje pojawiają się w ścianie promienistej komórek wydzielniczych (Fot. 16d; Tab. 3a; Tab. 4a). Ponadto, w ścianach tych występują plazmodesmy (Fot.

16e). Mimo, że reakcja PAS ani płyn Lugola nie wykazały obecności ziaren skrobi w stadium wczesnego pąka (3 tyg. przed otwarciem kwiatu) to w TEM skrobia jest widoczna w amyloplastach (Fot. 16d-e). W jednym plastydzie komórki epidermy znajdować się może od 6 do 29 ziaren skrobi. To stadium rozwojowe charakteryzuje się również największą liczbą amyloplastów, przypadającą na jedną komórkę wydzielniczą (Tab. 3a; Tab. 4a). Widoczne są również krople tłuszczu występujące w komórkach parenchymy (Fot. 16f).

#### **4.1.2. Początek antezy**

W kwiatach pierwszego dnia antezy (Fot. 1d) elajofor jest znacznie większy i mierzy ok. 6,0 x 3,5 mm (Tab. 2). Na jego powierzchni znajduje się większa ilość tłuszczu niż w stadium pąka (Fot. 17a-b; Tab. 3a). Wydzielina pokrywa powierzchnię zarówno komórek płaskich, jak i stożkowatych (Fot. 17c-e), a kutykula okrywająca komórki epitelu jest lekko pomarszczona (Fot. 17d; Fot. 17f). Krople tłuszczu wydzielone na zewnątrz tkanki barwią się Sudanem III w ręcznie krojonych skrawkach i obecne są również w komórkach epitelu i głębiej położonej parenchymie (Fot. 18a-b). Powierzchnia kropli tłuszczu na zewnątrz tkanki istotnie zwiększa się w stosunku do stadium pąka (Tab. 3b; Tab. 4b). Zewnętrzna ściana komórek epitelialnych jest istotnie grubsza, za to pokryta jest istotnie cieńszą kutykulą (Fot. 18c-d; Tab. 3a; Tab. 4a). Ponadto, w komórkach epidermy wydzielniczej znajduje się dwukrotnie większe, centralnie położone jądro komórkowe, zajmujące ok. 25% powierzchni całego protoplastu oraz ciemniejsza cytoplazma (Fot. 18c; Tab. 3a; Tab. 4a). Amyloplasty są obecne w komórkach wydzielniczych w dużej ilości i są one dobrze widoczne w mikroskopie świetlnym, choć liczba ziaren skrobi w pojedynczym plastydzie ulega istotnemu zmniejszeniu tj. ponad trzykrotnie (Fot. 18e-f; Tab. 3a; Tab. 4a). Zmniejsza się także wielkość ziaren skrobi. Podobnie jak w stadium wczesnego pąka (3 tyg. przed kwitnieniem) płyn Lugola nie barwi ziaren skrobi, z tą różnicą, że reakcja PAS daje wynik pozytywny (Fot. 15e; Fot. 18e-f).

Fotografie TEM wskazują na obecność wydzielanej substancji pod kutykulą oraz w porach zewnętrznej ściany komórkowej. Materiał ten widoczny jest jako jednolita, szara wydzielina (Fot. 19a). Pory obecne są nie tylko w ścianie zewnętrznej komórek epidermy, ale i w ścianach promienistych (Fot. 19a-b; Tab. 3a). W wewnętrznej promienistej ścianie komórkowej znajdują się również jamki łączące sąsiadujące komórki wydzielnicze (Fot. 19c). W cytoplazmie występują plastydy, zawierające poza ziarnami skrobi plastoglobule oraz dużą ilość szorstkiego ER (Fot. 19c-e). Pęcherzyki sekrecyjne wypełnione są szarą wydzieliną lub kłaczkowatym materiałem (Fot. 19c-e), który znajduje się również w przestrzeni peryplazmatycznej komórek sekrecyjnych (Fot. 19b; Fot. 19e-f). Pęcherzyki sekrecyjne wypełnione kłaczkowatą substancją oraz kropelki tłuszczu zawieszony w cytoplazmie zajmują dużą część powierzchni komórki wydzielniczej (Fot. 20a-c). Większe pęcherzyki otaczają jądro komórkowe (Fot. 20d). W przestrzeni peryplazmatycznej komórek sekrecyjnych oprócz kłaczkowatego materiału znajdują się też figury mielinowe (Fot. 20c), podobnie jak w wakuolach komórek subepidermalnych (Fot. 20e-f).

#### **4.1.3. Końcowe stadium antezy**

Pod koniec antezy elajofor jest jeszcze większy niż w początkowym stadium antezy i mierzy 8,0 x 4,5 mm (Tab. 2). Na powierzchni kalusa widoczne są zmiany. Brodawki zaczynają się zapadać, a kalusowate wyrostki zmniejszają się. Na powierzchni jest znacznie mniej wydzieliny (Fot. 21a-b; Tab. 3a).

W elektronowym mikroskopie skaningowym (SEM) widać, że powierzchnia elajoforu pokryta jest zasychającą wydzieliną (Fot. 21c-e). Kutykula okrywająca zarówno płaskie, jak i stożkowate komórki epidermy, rozciąga się pod naporem gromadzonego tłuszczu, przez co staje się mniej pomarszczona (Fot. 21f-h). Wydzielina nadal intensywnie barwi się pod wpływem Sudanu III (Fot. 22a-b), choć powierzchnia kropeł tłuszczu wydzielonych na zewnątrz tkanki istotnie zmniejsza się (Tab. 3b; Tab. 4b).

Cytoplazma w komórkach epitelu jest jaśniejsza niż we wcześniejszym stadium, ale jądra komórkowe nadal ułożone są centralnie (Fot. 22c), natomiast zewnętrzna ściana komórek epitelu wydzielniczego jest nadal dość gruba, a kutykula cienka i akumulują się pod nią małe kropelki tłuszczu (Fot. 22d). Liczba amyloplastów w komórkach warstwy epidermalnej w porównaniu z początkiem antezy, utrzymuje się na podobnym poziomie (Fot. 22e-f; Tab. 3a).

Zmniejszenie ilości wydzieliny, gromadzonej pod kutykulą obserwuje się również na mikroelektronogramach (Fot. 23a-c). Zewnętrzna ściana komórkowa staje się jeszcze bardziej siatkowata i porowata (Fot. 23b; Fot. 23d; Tab. 3a). Cytoplazma w komórkach epitelu jest jaśniejsza i następuje stopniowy rozkład zawartości komórek. Błony otaczające plastydy rozpadają się i ziarna skrobi uwalniane są do cytoplazmy, w której nadal obecne są krople tłuszczu (Fot. 23e-h). W ścianie łączącej komórki wydzielnicze, tak jak we wcześniejszym stadium występują plazmodesmy oraz pory, które to są najmniejsze pod koniec antezy (Fot. 23h; Tab. 3a). Średnica porów w promienistej ścianie komórkowej epitelu istotnie zmniejsza się w stosunku do stadium pąka (Tab. 4a).

#### **4.1.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu**

Sekrecja rozpoczyna się w stadium pąka, ok. 3 tyg. przed otwarciem kwiatu (Tab. 5a), ale zwiększa się ok. 4 dnia antezy i utrzymuje się na podobnym poziomie do 10 dnia, po czym zaczyna się zmniejszać. Maksymalna masa tłuszczu uzyskana z pojedynczego kwiatu to ok. 0,30 mg (Tab. 5a). Zapylenie kwiatu lub pobranie pyłkowiny nie wpływa na intensywność sekrecji. W przypadku kwiatów zapylonych w drugim dniu antezy pierwsze oznaki żółknięcia listków okwiatu pojawiają się już po ok. 6 dniach antezy. Do zapłodnienia jednak nie dochodzi. Dzień później więdnąć zaczynają również kwiaty, z których została usunięta pyłkowina (Tab. 6).

Receptywność znamienia, podobnie jak aktywność wydzielnicza widoczna jest już w stadium wczesnego pąka tj. ok. 3 tyg. przed kwitnieniem (Tab. 5a), chociaż reakcja barwna po zastosowaniu testu Peroxtesmo Ko jest słaba (Fot. 24a-b). Wzmacnia się ona ok. 2 tyg. przed rozpoczęciem antezy (Fot. 24c-d). Znamię jest receptywne również po otwarciu kwiatu, z tym, że 1 dnia antezy reakcja z użyciem testu Peroxtesmo Ko jest silniejsza niż w końcowym stadium życia kwiatu (Fot. 24e-f; Fot. 24h). Receptywność znamienia potwierdzają także obecność łagiewek pyłkowych po zapyleniu (Fot. 24g; Fot. 24i-j; Tab. 5a).

#### **4.2. *Gomesa radicans* (Rchb.f.) M.W.Chase & N.H.Williams**

Średnia długość życia kwiatu *G. radicans* to ok. 19 dni, choć cała roślina kwitnie nawet 61 dni (Tab. 2). Kwiaty *G. radicans* mają elajofor epitelialny, który rozmieszczony jest na kalusie składającym się z dwóch części różniących się kształtem tj. kulistej i podłużnej. Część kulista elajoforu może mieć zabarwienie żółte lub pomarańczowe, natomiast fragment podłużny wyłącznie kolor żółty (Fot. 2c-d; Fot. 25a-b). Tłuszcz produkowany jest przez epitel wydzielniczy obu tych części i jest on jednowarstwowy, o komórkach ułożonych palisadowo (Fot. 25c-d). Poniżej znajdują się 3-4 warstwy podwydzielnicze, zbudowane z drobnych komórek oraz miękisz zasadniczy, w którym występują wiązki przewodzące kolateralne zamknięte. W komórkach parenchymy obecne są także kryształki szczawianu wapnia w postaci rafidów (Fot. 25d).

##### **4.2.1. Stadium pąka**

Wielkość elajoforu w stadium wczesnego pąka tj. ok. 4 tyg. przed otwarciem kwiatu to ok. 1,0 x 0,8 mm (Tab. 2). Pąk jest wtedy zielony i mocno

ściśnięty (Fot. 2a; Fot. 26a). Na tym etapie rozwoju rozpoczyna się sekrecja tłuszczu, który widoczny jest na powierzchni gruczołu (Fot. 26b; Tab. 3b). Trzy dni przed rozpoczęciem antezi, kiedy pąk jest jasnozielony i lekko zaczyna się rozchyłać powierzchnia elajoforu błyszczący się intensywniej (Fot. 26c-d). Zdjęcia SEM pokazują, że kutykula w stadium wczesnego pąka nie jest jeszcze rozciągnięta, pod wpływem gromadzonego tłuszczu, co zmienia się kilka dni przed kwitnieniem (Fot. 26e-g).

Tłuszcz barwi się Sudanem III na zewnątrz i wewnątrz tkanki (Fot. 27a), choć krople tłuszczu na zewnątrz tkanki w stadium wczesnego pąka są niewielkie (Tab. 3b; Tab. 4b). Epidermę pokrywa wtedy kutykula, która ściśle przylega do zewnętrznej ściany komórkowej (Fot. 27b). Rozciągnięciu ulega w części podłużnej elajoforu, ok. 1 tydz. przed otwarciem kwiatu (Fot. 27c). Komórki epitelu wydzielniczego są wydłużone i widoczne jest centralnie położone jądro komórkowe (Fot. 27d). Reakcja PAS 4 tyg. przed antezą jest negatywna (Fot. 27e). Podobny wynik daje barwienie odczynnikami Schiffa 4 dni przed otwarciem kwiatu (Fot. 27f-g).

Pory w zewnętrznej ścianie komórkowej nie występują, a te w ścianach promienistych pojawiają się ok. 1 tydz. przed rozpoczęciem antezi (Fot. 27d; Tab. 3b; Tab. 4b). Na mikroelektronogramach widać, że kutykula w stadium wczesnego pąka jest stosunkowo gruba i zaczyna delikatnie się rozciągać (Fot. 28a-d; Tab. 3b; Tab. 4b). Widoczne jest również duże jądro komórkowe w porównaniu z całą powierzchnią komórki wydzielniczej (Fot. 28a-c; Tab. 3b; Tab. 4b). W komórkach warstwy epitelialnej amyloplasty nie występują (Tab. 3b; Tab. 4b), ale pojedyncze ziarna skrobi w plastydach widoczne są w komórkach podwydzielniczych i miękiszowych (Fot. 28e-f), choć nie wykrywa ich odczynnik Schiffa ani płyn Lugola.

#### **4.2.2. Początek antezi**

Elajofor w 1 dniu antezi osiąga wielkość 2,5 x 0,9 mm (Tab. 2). Produkuje on dużo wydzieliny, która pokrywa cały elajofor (Fot. 29a-b).



Rozciągnięta pod naporem tłuszczu kutykula w części podłużnej gruczołu widoczna jest zarówno okiem nieuzbrojonym (Fot. 29b), jak i na obrazach SEM (Fot. 29c-d). Fragment kulisty elajoforu pokrywają płaskie komórki, od powierzchni których również zaczyna odstawać kutykula (Fot. 29e-f).

Krople tłuszczu na zewnątrz tkanki intensywnie barwią się pod wpływem Sudanu III, podobnie jak te we wnętrzu komórek warstwy epitelialnej i istotnie zwiększają swoją powierzchnię w stosunku do stadium pąka (Fot. 30a; Tab. 3b; Tab. 4b). W skrawkach barwionych auraminą O wydzielina widoczna jest także pomiędzy komórkami epitelu (Fot. 30b). Komórki wydzielnicze podłużnej części kalusa pokrywa kutykula, która odstaje od zewnętrznej ściany komórkowej na całej powierzchni gruczołu (Fot. 30c). Jądra w komórkach epidermy są większe niż w stadium pąka i nadal centralnie ulokowane. Zwiększa się również prawie 10-krotnie powierzchnia protoplastu (Tab. 3b). W wakuolach obecne są krople tłuszczu (Fot. 30d), natomiast w cytoplazmie amyloplasty, których liczba zwiększa się istotnie w stosunku do stadium pąka (Fot. 30e-f; Tab. 4b). Najwięcej amyloplastów znajduje się jednak w warstwie podsekrecyjnej i w miększym zasadniczym (Fot. 30e-f). Największe amyloplasty występują zaś w skórcie odosiowej (Fot. 30e).

Kutykula okrywająca epidermę istotnie zwiększa swoją grubość (Tab. 3b; Tab. 4b), jest zbita i nie ma lamellarnej struktury (Fot. 31a). Na zdjęciach TEM widać, że pod wpływem gromadzącej się pod nią wydzieliny, zaczyna się odrywać od zewnętrznej ściany komórkowej (Fot. 31a-b). Pory w zewnętrznej ścianie komórkowej nie występują, ale te w ścianach promienistych epidermy są duże i gromadzą tłuszcz, choć ich średnica nie zmienia się istotnie (Fot. 31c-d; Tab. 3b; Tab. 4b).

#### **4.2.3. Końcowe stadium antezy**

Pod koniec antezy tj. 18 dnia elajofor jest największy, ma ok. 3,5 x 2,0 mm wielkości (Tab. 2) i produkuje mniej wydzieliny niż we wcześniejszym stadium rozwojowym, choć nie jest to istotna zmiana (Fot. 32a-c; Tab. 3b; Tab.

4b), jednak kutykula jest jeszcze bardziej rozciągnięta (Fot. 32b-d). Odstaje ona od zewnętrznej ściany komórkowej obu części elajoforu tj. kulistej oraz podłużnej (Fot. 32d-f) i akumuluje się pod nią tłuszcz, obecny także we wnętrzu komórek epitelu (Fot. 33a-b). W przypadku podłużnego fragmentu kalusa kutykula rozciągnięta jest na całej jego powierzchni (Fot. 33c). Komórki epitelu wydzielniczego po zakończeniu sekrecji deformują się (Fot. 33b-d). Reakcja PAS jest negatywna - amyloplasty nie występują w komórkach żadnej z warstw tkanki (Fot. 33d).

Pory w zewnętrznej ścianie komórkowej epidermy nie występują (Tab. 3b), ale widoczne są te pomiędzy kutykulą a ścianą komórkową. Powstają one w wyniku rozciągania kutykuli, pod wpływem akumulowanego tłuszczu (Fot. 34a-b). Mimo rozpoczętej wakuolizacji (powierzchnia wakuomu istotnie zwiększa się) i rozpadu organelli mitochondria oraz krople tłuszczu obecne są w cytoplazmie komórek epitelialnych i miększu (Fot. 34c-f; Tab. 4b).

#### **4.2.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu**

Sekrecja rozpoczyna się już w stadium wczesnego pąka tj. ok. 4 tyg. przed otwarciem kwiatu i trwa do końca antezy, jednak największa jest podczas pełni kwitnienia. Masa oleju wydzielonego przez elajofor *G. radicans* to od 0,01 mg 4 tyg. przed kwitnieniem, do 0,15 mg ok. 10 dnia antezy (Tab. 5b). Zapylenie czy usunięcie pyłkowiny nie wpływa znacznie na intensywność sekrecji. Zmienia się natomiast długość antezy tj. po usunięciu pyłkowiny z 19 na 6 dni, a po zapyleniu na 8 dni (Tab. 6), przy czym prętosłuo ulega powiększeniu (Fot. 35a). Do rozwoju owoców dochodzi, zarówno po zapyleniu geitono-, jak i allogamicznym (Fot. 35b-g).

Znamię jest receptywne już w stadium wczesnego pąka (Tab. 5b), ale reakcja przy użyciu testu Peroxtesmo Ko jest słaba (Fot. 36a-b), słabo też

kiełkują ziarna pyłku. Reakcja jest silniejsza 1 dnia antezy (Fot. 36c-e). Pod koniec życia kwiatu receptywność znamienia nieznacznie się zmniejsza (Fot. 36f-g).

### **4.3. *Gomesa ranifera* (Lindl.) M.W.Chase & N.H.Williams**

Średni czas antezy dla *G. ranifera* to 13 dni, podczas gdy cała roślina kwitnie ok. 20 dni (Tab. 2). Tłuszcz produkowany jest przez elajofor epitelialny umiejscowiony na doosiowej powierzchni *labellum* w postaci brązowego kalusa. Jest on pofałdowany tj. posiada trzy zagłębienia, w których gromadzi się wydzielony tłuszcz, natomiast od strony prętosłupa ma kształt owalny (Fot. 3c-e; Fot. 37a).

Epitel wydzielniczy to jedna warstwa komórek o wydłużonym kształcie, pod którym znajduje się jedna warstwa komórek subsekrecyjnych. Komórki podwydzielnicze są spłaszczone, posiadają gęstą cytoplazmę i stosunkowo duże jądra komórkowe. Poniżej, w miększu zasadniczym obecne są liczne rafidy oraz kolateralne wiązki przewodzące (Fot. 37b-c).

#### **4.3.1. Stadium pąka**

Około 3 tyg. przed rozpoczęciem antezy (Fot. 3b-c) tłuszcz nie jest jeszcze wydzielany na zewnątrz tkanki. Proces ten rozpoczyna się ok. 7 dni przed kwitnieniem, kiedy pąk jest jeszcze ściśnięty (Fot. 38a). Elajofor w tym stadium osiąga ok. 1,0 x 1,0 mm (Tab. 2). Wydzielina widoczna jest zarówno wewnątrz komórek, jak i na zewnątrz tkanki (Fot. 38b-c). Zewnętrzną ścianę komórkową epitelu pokrywa delikatnie rozciągnięta kutykula (Fot. 38d). Centralną pozycję w komórce wydzielniczej zajmuje jądro komórkowe (Fot. 38d), natomiast w cytoplazmie występuje duża liczba amyloplastów, które zawierają nawet 11 ziaren skrobi (Tab. 3c; Tab. 4c). Ziarna skrobi obecne są również w plastydach

komórek warstwy podwydzielniczej oraz parenchymy i barwią się intensywnie odczynnikami Schiffa (Fot. 38e-f). Najwięcej amyloplastów jest wokół wiązek przewodzących, tam występują również największe ziarna skrobi (Fot. 38e). Mimo tak dużej ich ilości, płyn Lugola nie daje pozytywnej reakcji na świeżym materiale.

Zewnętrzna ściana komórkowa epidermy jest dość gruba i nie posiada porów (Fot. 39a-b; Tab. 3c; Tab. 4c). Wewnętrzna promienista ściana komórkowa jest cieńsza, ale zawiera pory i plazmodesmy (Fot. 39c; Tab. 3c; Tab. 4c). Wakuole i pęcherzyki sekrecyjne w komórkach epidermy i miękiszu wypełnione są kłaczkowatym materiałem oraz kroplami tłuszczu. Liczne krople tłuszczu występują również w cytoplazmie tych komórek (Fot. 39d-f).

#### **4.3.2. Początek antezy**

Po otwarciu kwiatu (Fot. 3c-e) elajofor jest większy i osiąga wielkość 2,0 x 1,5 mm (Tab. 2). Jego powierzchnia jest błyszcząca (Fot. 40a), a w SEM widać uwypuklenia epidermy (Fot. 40b-d). Dotyczy to głównie komórek, które znajdują się w zagłębieniach elajoforu oraz w jego owalnej części (Fot. 40b-d). Ilość tłuszczu wydzielonego na zewnątrz tkanki zwiększa się istotnie w stosunku do stadium pąka. Krople tłuszczu obecne są również wewnątrz komórek (Fot. 40e-f; Tab. 3c; Tab. 4c).

Pod kutykulą znajduje się porowata zewnętrzna ściana komórkowa (Fot. 41a-b; Tab. 3c). Cytoplazma komórek wydzielniczych jest gęsta, a ułożone centralnie jądra komórkowe są niewiele większe od tych w stadium pąka (Fot. 41a-b; Tab. 3c; Tab. 4c). W komórkach parenchymy zmniejsza się ilość kryształków szczawianu wapnia w porównaniu z wcześniejszym stadium. Liczba amyloplastów w komórkach wydzielniczych utrzymuje się na podobnym poziomie, natomiast w komórkach miękiszu ulega nieznacznemu zmniejszeniu (Fot. 41c-d; Tab. 3c; Tab. 4c). W porach zewnętrznej ściany komórkowej widoczna jest lipidowa substancja (Fot. 41e-f).

Zewnętrzna ściana komórkowa epidermy jest nieco grubsza niż w stadium pąka, ale nie jest to istotna różnica (Tab. 3c; Tab. 4c). Tworzące się w niej pory pojawiają się najpierw głównie pod kutykulą, po czym ich średnica zaczyna się istotnie zwiększać (Fot. 42a-b; Tab. 3c; Tab. 4c), natomiast od strony błony komórkowej pojawiają się wypustki (Fot. 42c). Pory oraz wypustki występują również w promienistej ścianie komórkowej (Fot. 42d; Tab. 3c). W cytoplazmie komórek wydzielniczych pojawiają się liczne krople tłuszczu (Fot. 42c-g), które obecne są także w wakuolach i pęcherzykach sekrecyjnych (Fot. 42d; Fot. 42f; Fot. 42g). Cytoplazma komórek sekrecyjnych oprócz kropli tłuszczu zawiera również dużą liczbę amyloplastów o dużych ziarnach skrobi, jak również gładkie i szorstkie ER (Fot. 42d; Fot. 42f-g). W komórkach warstwy podsekrecyjnej widoczne są amyloplasty i krople tłuszczu (Fot. 42h-i). Krople tłuszczu występują zarówno w cytoplazmie, jak i w wakuoli (Fot. 42i). Plazmodesmy natomiast znajdują się w ścianach promienistych epidermy, ścianach stycznych pomiędzy komórkami wydzielniczymi a podwydzielniczymi oraz w ścianach komórkowych miękiszu (Fot. 42e; Fot. 42i). W komórkach parenchymy następuje rozpad błon otaczających amyloplasty i ziarna skrobi wydostają się do cytoplazmy. Jądra komórkowe miękiszu zepchnięte są na obrzeże komórek.

### **4.3.3. Końcowe stadium antezy**

Pod koniec antezy elajofor zmniejsza się do 1,3 x 1,0 mm (Tab. 2), natomiast zagłębienie zajmuje większą jego część (Fot. 43a). Połyskujący film na powierzchni elajoforu widać nawet gdy listki okwiatu zaczynają usychać tj. ok. 13 dnia antezy. Powierzchnia wydzielonego na zewnątrz tkanki tłuszczu zmniejsza się w nieistotnie, ale nadal występuje on wewnątrz komórek (Fot. 43b-c; Tab. 3c; Tab. 4c) oraz wewnątrz porów w zewnętrznej ścianie komórkowej (Fot. 43c-e; Tab. 3c). Ta sama wypełnia liczne wakuole komórek epidermy (Fot. 43e-f). Jądra w komórkach epitelu nie zmieniają swojej powierzchni i nadal są centralnie usytuowane (Fot. 43f; Tab. 3c; Tab. 4c). Ziarna skrobi w plastydach

zanikają i dotyczy to wszystkich warstw tkanki (Fot. 43g; Tab. 3c; Tab. 4c). Stąd też, reakcja z użyciem odczynnika Schiffa i płynu Lugola daje wynik negatywny.

Zewnętrzna ściana komórkowa epidermy jest nieco cieńsza niż w poprzednich stadiach rozwojowych, ale istotnemu powiększeniu ulegają występujące w niej pory (Fot. 44a-c; Tab. 3c; Tab. 4c). Podobnie jak we wcześniejszym stadium rozwojowym obecne są wypustki w zewnętrznej ścianie epidermy (Fot. 44b) oraz pory w ścianach promienistych (Fot. 44d; Tab. 3c). Wakuole komórek epitelu są istotnie większe i bardziej wypełnione kłaczkowatym materiałem oraz figurami mielinowymi, ale zawierają mniejszą ilość kropeł tłuszczu (Fot. 44d-j; Tab. 3c; Tab. 4c). W cytoplazmie występują liczne krople tłuszczu (Fot. 44e; Fot. 44g) oraz mitochondria i struktury mielinowe (Fot. 44g), jednak dominującym elementem jest gładkie ER (Fot. 44e-g; Fot. 44i).

#### **4.3.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu**

Masa wyprodukowanego tłuszczu przez jeden kwiat waha się od zaledwie 0,01 mg w stadium pąka do 0,20 mg ok. 8 dnia antezy (Tab. 5c). Sekrecja trwa począwszy od stadium pąka (ok. 7 dnia przed otwarciem kwiatu), maksymalną wartość osiąga ok. 8-12 dnia antezy i zmniejsza się pod koniec życia kwiatu (Tab. 5c). Zapylenie nie wpływa na intensywność sekrecji, ale pobranie pyłkowiny hamuje ją. Kwiat zaczyna usychać następnego dnia po usunięciu pyłkowiny oraz po 2 dniach od dokonania zapylenia. Nie dochodzi też do rozwoju owoców (Tab. 6). Znamiona receptywne są od momentu rozpoczęcia sekrecji tłuszczu tj od stadium pąka aż do końca antezy (Tab. 5c).

#### 4.4. *Oncidium cheirophorum* Rchb.f.

*O. cheirophorum* kwitnie ok. 57 dni, podczas gdy jeden kwiat średnio 16 dni (Tab. 2). Tłuszcz wydzielany jest przez elajofory epitelialne o żółtym zabarwieniu. Zlokalizowane są one u nasady warżki, po obu jej stronach i mają kształt owalny (Fot. 4c-d; Fot. 45a-b). Wydzielony tłuszcz powoduje powstanie połyskującej warstwy na powierzchni warżki, w szczególności na łatkach bocznych i kalusie (Fot. 45a). Epitel wydzielniczy tworzy jedna warstwa lekko wydłużonych komórek (Fot. 45c). Poniżej warstwy wydzielniczej znajdują się 1-2 warstwy podwydzielnicze o komórkach spłaszczonych, wypełnionych gęstą cytoplazmą. W mięksiszu zasadniczym obecne są zaś wiązki przewodzące kolateralne zamknięte a w wakuolach komórek mięksiszu kryształki szczawianu wapnia w postaci rafidów (Fot. 45c-d).

##### 4.4.1. Stadium pąka

Wielkość elajoforu w stadium wczesnego pąka (ok. 3 tyg. przed kwitnieniem) to 1,4 x 1,0 mm (Tab. 2). Pąk jest wtedy zielony i mocno ściśnięty, ale tłuszcz jest już produkowany (Fot. 46a-b). Kilka dni przed rozpoczęciem kwitnienia tłuszcz wydostaje się na zewnątrz pąka (Fot. 46c). Powierzchnia elajoforu w pąku jest lekko pofałdowana. Pokrywa ją kutykula, która zaczyna się rozciągać, pod wpływem gromadzonego tłuszczu (Fot. 46d-f). Na obecność niewielkiej ilości wydzieliny na powierzchni elajoforu również 3 tyg. przed kwitnieniem wskazują fotografie SEM (Fot. 46g-h; Tab. 3d) oraz ręcznie krojone skrawki ze świeżego materiału barwione Sudanem III (Fot. 47a-b; Tab. 3d). Krople tłuszczu obecne są ponadto w komórkach epitelu wydzielniczego oraz parenchymy (Fot. 47a-c). Grubą zewnętrzną ścianę komórkową pokrywa dodatkowo gruba warstwa kutykuli, pod którą gromadzi się tłuszcz (Fot. 47a-b; Fot. 47d-f; Tab. 3d; Tab. 4d). Cytoplazma komórek jest gęsta i ma bardzo duże centralnie położone jądra komórkowe (Fot. 47e-f; Tab. 3d; Tab. 4d). W



wakuolach widoczne są krople tłuszczu, zarówno 3 tyg, jak i 1 tydz. przed rozpoczęciem antezy (Fot. 47e-f). Reakcja PAS uwidacznia małe ziarna skrobi w plastydach komórek elajoforu na 3 tyg. przed otwarciem kwiatu. Znajdują się one w komórkach epidermy i subepidermy (Fot. 47g-h). Kilka dni przed otwarciem kwiatu reakcja barwna staje się intensywniejsza, a ziarna skrobi widoczne są również w komórkach miękiszu (Fot. 47i). Amyloplasty nie występują (Tab. 3d).

Podobnie jak u *G. echinata* kutykula jest dwuwarstwowa, z tą różnicą, że u *O. cheirophorum* pod zewnętrzną lamellarną warstwą kutykuli, znajduje się wyłącznie ciemna globularna warstwa (Fot. 48a). W zewnętrznej ścianie komórkowej epidermy występują pory, gdzie niektóre z nich wypełnia tłuszcz, w postaci szarej wydzieliny (Fot. 47i; Fot. 48a-b; Tab. 3d). W ścianach promienistych komórek epitelu pory nie występują (Tab. 3d; Tab. 4d), natomiast obecne są wypustki, jamki i plazmodesmy (Fot. 48c-d). W pobliżu jądra komórkowego znajdują się plastydy zawierające plastoglobule lub/i ziarna skrobi (Fot. 48e-f). Ponadto w cytoplazmie obecne są mitochondria, aparaty Golgiego i duża ilość szorstkiego ER układającego się miejscami kuliście (Fot. 48g-i). Dodatkowo w cytoplazmie zawieszono są krople tłuszczu o strukturze podobnej jak w porach zewnętrznej ściany epidermy (Fot. 48c; Fot. 48i). Widoczna jest także kłaczkowata substancja, występująca m.in. w licznych pęcherzykach sekrecyjnych i wakuolach, czasem obok figur mielinowych (Fot. 48e; Fot. 48j).

#### **4.4.2. Początek antezy**

W pierwszym dniu antezy wydzielina obficie pokrywa powierzchnię elajoforu i tworzy połyskującą warstwę (Fot. 49a-b; Tab. 3d). Powierzchnia gruczołu jest bardziej pofałdowana niż w stadium pąka. Kutykula jest mocno rozciągnięta lub miejscami zapadnięta (Fot. 49c-e). Produkowany tłuszcz wybarwia się pod wpływem Sudanu III na zewnątrz tkanki i wewnątrz komórek (Fot. 49e-f).

Kutykula oraz zewnętrzna ściana komórkowa jest nieistotnie grubsza w porównaniu z wcześniejszym stadium rozwojowym (Fot. 50a-b; Tab. 3d; Tab. 4d). Jądro komórkowe położone jest w komórce wydzielniczej centralnie i nie obserwuje się istotnych zmian w jego wielkości (Fot. 50c; Tab. 3d; Tab. 4d). Na skrawkach półcienkich barwionych auraminą widoczne są krople tłuszczu, znajdujące się w wakuolach (Fot. 50b). Pomiędzy komórkami miękiszu zaczyna gromadzić się kłaczkowaty materiał (Fot. 50d). W komórkach epitelu pojawiają się amyloplasty (Tab. 3d; Tab. 4d), gdzie jest największa ich ilość, ale obecne są też w komórkach warstwy podwydzielniczej oraz w komórkach parenchymy (Fot. 50e-f).

W TEM widać, że rozciągnięciu ulega tylko zewnętrzna, lamellarna warstwa kutykuli (Fot. 51a). Pory w zewnętrznej ścianie komórkowej epidermy ulegają nieznacznemu powiększeniu, ale nadal nie są obecne w ścianach promienistych (Tab. 3d; Tab. 4d). Niektóre pory wypełnia tłuszczowa szara wydzielina (Fot. 51b). Wnętrze komórek wypełniają wakuole oraz pęcherzyki sekrecyjne, których prawie całą powierzchnię zajmują figury mielinowe, jak również tłuszcze i struktury kłaczkowate (Fot. 51c-f). W cytoplazmie znajdują się liczne mitochondria oraz duża ilość szorstkiego ER (Fot. 51d-h). W cytoplazmie komórek wydzielniczych występują głównie amyloplasty z 1-7 ziarnami skrobi (Fot. 51g; Tab. 3d), natomiast plastydy w komórkach miękiszu zawierają nie tylko ziarna skrobi, ale i plastoglobule. W przyściennej cytoplazmie obecna jest większość aparatów Golgiego, a w ścianach promienistych znajdują się plazmodesmy (Fot. 51h).

#### **4.4.3. Końcowe stadium antezy**

Wydzielany przez elajofor tłuszcz widoczny jest na powierzchni tkanki również w końcowym stadium antezy tj. ok. 16-19 dnia (Fot. 52a-b), z tym, że 19 dnia antezy elajofor zaczyna zmieniać barwę na biało-żółtą (Fot. 52b). Kutykula w tym stadium jest bardzo pofałdowana tj. rozciągnięta pod wpływem

akumulowanego tłuszczu lub zapadnięta w przypadku gdy tłuszcz wydostał się na powierzchnię gruczołu. (Fot. 52c-e). Wydzielina znajdująca się na powierzchni elajoforu widoczna jest również w SEM, zarówno 16, jak i 19 dnia antezi (Fot. 52c; Fot. 52f).

W końcowym stadium antezi tłuszcz nadal barwi się Sudanem III na zewnątrz tkanki i wewnątrz komórek (Fot. 53a-b). Krople tłuszczu widoczne są w wakuolach komórek wydzielniczych (Fot. 53c). W wyniku postępującej wakuolizacji jądra komórkowe zajmują bardziej przyścienną lokalizację, a cytoplazma staje się jaśniejsza (Fot. 53d-e). Zewnętrzną porowatą ścianę komórkową (Tab. 3d; Tab. 4c) okrywa mocno rozciągnięta kutykula, która doskonale widoczna jest na skrawkach półcienkich, zarówno tych barwionych błękitem metylenowym, jak i auraminą O (Fot. 53c-f). Barwienie fluorescencyjne świeżego materiału pokazuje również wydzielinę na zewnątrz tkanki (Fot. 53g). Pory w ścianach promienistych epidermy, podobnie jak w poprzednich stadiach rozwojowych nie występują (Tab. 3d). Amyloplasty zanikają pod koniec antezi, w 16 dniu antezi występują tylko plastydy z małymi ziarnami skrobi, ale w 19 dniu obserwowany jest ich całkowity zanik (Fot. 53h). Kłaczki, który wypełniał przestrzeń między komórkami parenchymy w początkowym okresie życia kwiatu, nie jest już widoczny.

Biorąc pod uwagę wcześniejsze stadia rozwojowe elajoforu, zaobserwować można, że kutykula staje się grubsza, choć nie jest to istotna różnica, a zewnętrzna ściana komórkowa jest istotnie cieńsza (Fot. 54a-b; Tab. 3d; Tab. 4d). Na zdjęciach TEM widać gromadzącą się wydzielinę pod globularną warstwą kutykuli (Fot. 54a-b). Krople tłuszczu obecne są również w cytoplazmie, choć następuje rozpad błon i degeneracja komórek (Fot. 54c-f).

#### **4.4.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadiem antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu**

Sekrecja rozpoczyna się już 3 tyg. przed otwarciem kwiatu, tak samo jak u *G. echinata*, jednak najbardziej obfita jest podczas pierwszych dni antezy tj. do ok. 8 dnia, trwa do końca antezy. Podczas antezy kwiat wydziela 0,15 – 0,48 mg tłuszczu (Tab. 5d). Po usunięciu pyłkowiny czas ten skraca się czterokrotnie. Po kontrolowanym zapyleniu geitonogamicznym ok. 3 dnia antezy pojawiają się pierwsze oznaki zasychania listków okwiatu (Tab. 6), a następnie dochodzi do rozwoju owocu, który pęka po ok. 131 dniach od momentu zapylenia i dochodzi do uwolnienia nasion (Fot. 55a-k). Zapylenie nie wpływa na intensywność sekrecji tłuszczu (Fot. 55l).

Receptywność znamienia pojawia się ok. 2 tyg. przed kwitnieniem i trwa do ok. 16 dnia antezy (Fot. 56a-g; Tab. 5d). Pojawienie się pierwszych oznak strzenia się kwiatu 19 dnia antezy, w tym zmiany koloru elajoforu na biało-żółty nie wpływa na hamowanie sekrecji, jednak znamię przestaje być receptywne (Fot. 56h-i; Tab. 5d).

#### **4.5. *Oncidium ornithorhynchum* Kunth**

Kwitnienie u *O. ornithorhynchum* trwa ok. 45 dni, natomiast średni czas antezy jednego kwiatu to 23 dni (Tab. 2). Tłuszcz wydzielany jest przez elajofory epitelialne. Podobnie jak u *O. cheiophorum* elajofory są owalne i umiejscowione są po obu stronach nasady *labellum*. Elajofory te mają białe zabarwienie (Fot. 5c; Fot. 57a-d). Pozycja gruczołów zmienia się w zależności od stadium rozwojowego kwiatu. I tak, pierwszego dnia antezy elajofory znajdują się na tej samej płaszczyźnie co *labellum*, 3 dnia antezy są odchylają się w dół pod kątem 90° w stosunku do warzki, natomiast pod koniec antezy

elajofory tworzą już kąt ostry z warzątką i nie są widoczne od strony doosiowej kwiatu (Fot. 57a-d). Epitel wydzielniczy zbudowany jest z jednej warstwy lekko wydłużonych komórek sekrecyjnych. Pod nią znajdują się dwie warstwy subsekrecyjne, których komórki posiadają duże jądra komórkowe. W mięksiszu zasadniczym znajdują się też wiązki przewodzące kolateralne zamknięte oraz rafidy (Fot. 57e-g).

#### **4.5.1. Stadium pąka**

Elajofor w stadium wczesnego pąka tj. 4 tyg. przed otwarciem kwiatu mierzy zaledwie 0,8 x 1,0 mm (Fot. 58a-d; Tab. 2). Mimo tego, powierzchnia kalusa pokryta jest już delikatną warstwą tłuszczu (Fot. 58a). Ilość wydzielonego na zewnątrz tkanki tłuszczu zwiększa się, kiedy listki okwiatu zaczynają się rozchyłać na kilka dni przed kwitnieniem (Fot. 58e-g).

Wydzielina na powierzchni elajoforu widoczna jest również w SEM. W stadium wczesnego pąka ma postać zbitego, kłaczkowatego materiału (Fot. 59a), natomiast kilka dni przed otwarciem kwiatu, tłuszcz na powierzchni gruczołu występuje w formie kulistych kropeł (Fot. 59b-d), które barwią się pod wpływem Sudanu III zarówno na zewnątrz tkanki, jak i wewnątrz komórek (Fot. 60a-b). W stadium wczesnego pąka komórki warstwy sekrecyjnej posiadają bardzo duże, centralnie położone jądra komórkowe, zajmujące ok. 30% powierzchni całego protoplastu (Tab. 3e; Tab. 4e). Poniżej znajdują się komórki parenchymy o równie dużych jądrach komórkowych (Fot. 60c-d). Warstwa podsekrecyjna nie jest jeszcze odróżnicowana od mięksiszu zasadniczego (Fot. 60c-d). Tydzień przed rozpoczęciem kwitnienia zwiększa się powierzchnia protoplastu komórek epitelu wydzielniczego i wykształcają się 1-2 warstwy podwydzielnicze (Fot. 60e). Barwienie odczynnikami Schiffa nie wykazuje obecności ziaren skrobi w komórkach pąka 4 tyg. przed otwarciem kwiatu. Jednak 1 tydz. przed kwitnieniem ziarna skrobi pojawiają się w plastydach komórek wydzielniczych, podwydzielniczych i komórek mięksiszu, szczególnie wokół wiązek

przewodzących. W epitelu zgromadzone są w pobliżu centralnie położonego jądra komórkowego (Fot. 60f-g).

Odstającą od zewnętrznej ściany komórkowej kutykulę pokazują dopiero obrazy TEM (Fot. 61a). Znajdująca się pod nią ściana komórkowa epidermy jest dość cienka i nie posiada porów w stadium wczesnego pąka (Fot. 61b-d; Tab. 3e; Tab. 4e). Te pojawiają się ok. 7 dni przed otwarciem kwiatu (Fot. 60e). Na zdjęciach TEM widać, że pod zewnętrzną ścianką komórkową w przestrzeni peryplazmatycznej obecne są szare krople tłuszczu oraz kłaczkowaty materiał, które występują również w wakuoli komórek epitelu i pęcherzykach sekrecyjnych (Fot. 61b-e). W cytoplazmie zawieszono są liczne plastydy, we wnętrzu których znajdują się plastoglobule (Fot. 61e-f). Ściany promieniste w pobliżu, których często gromadzą się plastydy oraz aparaty Golgiego posiadają plazmodesmy (Fot. 61e-f). Pory w ścianach promienistych nie występują (Tab. 3e).

#### **4.5.2. Początek antezy**

Pierwszego dnia antezy elajofor osiąga 2,0 x 4,0 mm (Tab. 2). Sekrecja tłuszczu jest intensywniejsza niż w stadium pąka (Tab. 3e). Na powierzchni gruczołu tworzy się gruba, błyszcząca warstwa, a wydzielina zatrzymuje się pomiędzy grzebieniami kalusa (Fot. 62a-b), w SEM widoczna jest ona w postaci kropeł (Fot. 62c). Komórki epidermy wydzielniczej są płaskie i pokrywa je kutykula, która miejscami ulega rozciągnięciu, pod wpływem akumulowanego tłuszczu (Fot. 62d-f).

W ręcznie krojonym, świeżym materiale barwionym Sudanem III krople oleistej wydzieliny obecne są wewnątrz komórek epitelu i parenchymy oraz na zewnątrz tkanki (Fot. 63a-c). Powierzchnia kropeł tłuszczu na zewnątrz tkanki wzrasta trzykrotnie w porównaniu ze wcześniejszym stadium, ale jest to różnica nieistotna (Tab. 3e; Tab. 4e). Ilość wydzielonego na zewnątrz tłuszczu wzrasta w czasie kolejnych 3 dni (Fot. 63d). W komórkach epitelu znajdują się centralnie

położone jądra komórkowe, które stają się istotnie większe, ale zajmują mniejszą część protoplastu w porównaniu ze stadium pąka (Fot. 63e; Tab. 3e; Tab. 4e). Jądra komórkowe otoczone są amyloplastami, które występują we wszystkich komórkach, zarówno tkanki wydzielniczej jai i w parenchymie (Fot. 63f-h; Tab. 3e; Tab. 4e).

Ściana komórkowa pokrywająca komórki wydzielnicze posiada pory, ale tak samo jak w stadium pąka nie występują one w ścianach promienistych epidermy. Pory w ścianie, jak również wakuole wypełnione są tłuszczem (Fot. 63e; Fot. 63h; Fot. 63i-j; Fot. 64a-c; Tab. 3e; Tab. 4e). Na skrawkach półcienkich, barwionych auraminą O widoczna jest ponadto kłaczkowata substancja w przestworach międzykomórkowych parenchymy, podobna do tej u *O. cheirophorum* (Fot. 63i-j).

Pory w zewnętrznej ścianie komórkowej na skrawkach ultracienkich mają kształt okrągły, jak u *O. cheirophorum* lub bardzo wydłużony (Fot. 64a-c). Dodatkowo widoczne są wypustki w ścianie (Fot. 64a), która to 1 dnia antezy jest istotnie (prawie sześciokrotnie) grubsza w porównaniu ze stadium pąka (Fot. 64a-c; Tab. 3e; Tab. 4e). W ścianie komórkowej pomiędzy komórkami epitelu a subepidermy znajdują się plazmodesmy (Fot. 64d). W pobliżu ściany zewnętrznej i ścian promienistych w cytoplazmie występują mitochondria (Fot. 64d-e). Natomiast w pęcherzykach sekrecyjnych i wakuolach obecne są krople tłuszczu, jak również zbity kłaczkowaty materiał i struktury mielinowe (Fot. 64f-h).

#### **4.5.3. Końcowe stadium antezy**

Pod koniec antezy tj. ok. 16 dnia wielkość elajoforu pozostaje bez zmian (Tab. 2). Sekrecja nadal trwa, a warstwa wydzielonego na zewnątrz tłuszczu jest jeszcze grubsza niż 1 dnia antezy i okrywa ona nie tylko powierzchnię gruczołu, ale także struktury przyległe (Fot. 65a-b). Rozciągniętą pod wpływem wyprodukowanej wydzieliny kutykulę widać nie tylko w SEM (Fot. 65c-f), ale



nawet okiem nieuzbrojonym, ponieważ tworzy się swoista „poduszka”, z której po naciśnięciu wypływa tłuszcz.

Proces ten nie jest aż tak widoczny w 10 dniu antezy, ponieważ w tym stadium kutykula odstaje od pojedynczych komórek (Fot. 65d). Pod koniec antezy kutykula odstaje już od całej powierzchni ściany komórkowej epidermy (Fot. 65e-f). Tłuszcz pod nią gromadzony widoczny jest po barwieniu Sudanem III, zarówno 10, jak i 16 dnia antezy. Powierzchnia kropeł tłuszczu zwiększa się istotnie w porównaniu ze stadium pąka (Fot. 66a-c; Tab. 3e; Tab. 4e).

Jądra w komórkach wydzielniczych ułożone są nadal centralnie i mają podobną wielkość jak w 1 dniu życia kwiatu, natomiast wakuole niezmiennie wypełnione są tłuszczem (Fot. 66d; Tab. 3e; Tab. 4e). Przestrzenie międzykomórkowe w parenchymie zajmują większą jej część, jednak wypełnione są już niewielką ilością tłuszczu (Fot. 66e-f). Zmniejsza się natomiast liczba i wielkość ziaren skrobi w plastydach, choć w komórkach warstwy subepidermalnej i parenchymy jest ich więcej, a ziarna skrobi są większe niż w komórkach epitelu wydzielniczego (Fot. 66g).

Komórki epitelu wydzielniczego pokrywa porowata ściana komórkowa, w zagłębieniach której gromadzi się tłuszcz widoczny po zastosowaniu auraminy O (Fot. 66f). Średnica porów jest istotnie (ponad dwukrotnie) większa od tych w początkowym stadium antezy i dodatkowo pory pojawiają się w ścianach promienistych (Fot. 66f-g; Fot. 67a-d; Tab. 3e; Tab. 4e), a te w zewnętrznych ścianach komórkowych mają charakter wyłącznie podłużny (Fot. 67a-c). Zewnętrzna ściana komórki epidermy posiada także wypustki, podobnie jak we wcześniejszym stadium, a ściany promieniste plazmodesmy (Fot. 67c; Fot. 67d).

Cytoplazma komórek wydzielniczych zawiera liczne mitochondria, pecherzyki sekrecyjne ze strukturami mielinowymi, krople tłuszczu, natomiast w wakuoli obecne są nie tylko krople tłuszczu, ale i również figury mielinowe (Fot. 67d-i).

#### **4.5.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu**

Sekrecja tłuszczu rozpoczyna się w stadium pąka ok. 4 tyg. przed otwarciem kwiatu i trwa do końca antezy (Tab. 5e). Masa wydzielonego tłuszczu wyprodukowanego przez pojedynczy kwiat w stadium pąka tj. ok. 4 tyg. wynosi ok. 0,07 mg. Sekrecja zwiększa się sukcesywnie z każdym dniem antezy. Maksymalna ilość tłuszczu wydzielonego na zewnątrz tkanki wynosi ok. 1,05 mg (Tab. 3e; Tab. 5e). Zapylenie nie wpływa na masę produkowanego tłuszczu. Długość antezy skraca się po usunięciu pyłkowiny z kwiatu do 5 dni. Okres życia kwiatu skraca się jeszcze bardziej w przypadku usunięciu tłuszczu z elajoforów. W ciągu ok. 3 dni od odsączenia tłuszczu za pomocą bibuły listki okwiatu zaczynają usychać. Po dokonaniu zapylenia kwiat usycha następnego dnia, podobnie jak w przypadku *O. cheirophorum*, jednak tu nie dochodzi do rozwoju owocu (Tab. 6).

Znamię jest zdolne do przyjęcia pyłkowiny już 4 tyg. przed otwarciem kwiatu (Fot. 68a-b; Tab. 5e). Reakcja barwna, w wyniku zastosowania testu Peroxtesmo Ko staje się intensywniejsza ok. 7 dni przed rozpoczęciem antezy (Fot. 68c). Receptywność znamienia występuje również na początku, w pełni i pod koniec antezy (Fot. 68d-j; Tab. 5e). Wykonanie testu Peroxtesmo Ko nawet w 26 dniu życia kwiatu pokazuje, że reakcja zachodzi, choć jest już słabsza (Fot. 68i-j). Mimo to łagiewki pyłkowe po zapyleniu są nadal widoczne.

#### **4.6. *Ornithocephalus ciliatus* Lindl.**

Kwitnienie u *O. ciliatus* trwa ok. 29 dni (Tab. 2), natomiast długość życia jednego kwiatu to średnio 15 dni (Tab. 2). Tłuszcz u tego gatunku wydzielany jest przez zielono-biały elajofor trichomowy, który tworzy warstwa

jednokomórkowych włosków, pokrywających środkową część kalusa (Fot. 6f; Fot. 69a-d). Kalus posiada dodatkowo dwa bocznie usytuowane wyrostki, które nie produkują oleju (Fot. 69b). Pod warstwą epidermy z włoskami wydzielniczymi znajduje się warstwa subsekrecyjna utworzona z niewielkich komórek miękiszowych. W głębszej parenchymie znajdują się wiązki przewodzące kolateralne zamknięte oraz rafidy (Fot. 69c-d).

#### 4.6.1. Stadium pąka

Elajofor w stadium wczesnego pąka (Fot. 6b-c) nie wydziela oleju. Około 7 dni przed otwarciem kwiatu pąk lekko się rozchyła (Fot. 70a), a elajofor rozpoczyna wtedy produkcję tłuszczu. Wielkość gruczołu mieści się w granicach 0,8 x 1,0 mm (Tab. 2). Włoski wydzielnicze są krótkie tj. od ok. 50-72  $\mu\text{m}$ , te najdłuższe znajdują się na krawędziach elajoforu (Fot. 70b; Tab. 3f; Tab. 4f). Trichomy pokrywa pomarszczona kutykula (Fot. 70c). Wydzielina występuje wewnątrz komórek i na zewnątrz tkanki wydzielniczej, we włoskach gromadzi się ona głównie w wakuoli (Fot. 70d-e; Fot. 71a-b). Centralną pozycję we włoskach zajmuje jądro komórkowe. W cytoplazmie obecne są zaś małe amyloplasty z pojedynczymi ziarnami skrobi. Amyloplasty występują także w komórkach podwydzielniczych i w komórkach parenchymy, lecz tam ziarna skrobi są większe (Fot. 71a; Fot. 71c-d; Tab. 3f; Tab. 4f). Kutykula rozciąga się pod wpływem akumulowanego tłuszczu głównie u podstawy i w środkowej części trichomów (Fot. 70c; Fot. 71b; Fot. 72a).

W ścianie komórkowej okrywającej komórki włosków wydzielniczych występują pory (Fot. 72b; Tab. 3f; Tab. 4f). Pory w ścianach promienistych nie występują (Tab. 3f). W cytoplazmie przysciennej trichomów gromadzą się liczne mitochondria (Fot. 72a-c). Wakuole są duże a wewnątrz nich znajduje się kłaczkowaty materiał oraz błoniaste struktury z ciemno szarą zawartością (Fot. 71a-b; Fot. 72d; Tab. 3f; Tab. 4f). Wakuole otoczone są m.in. przez krople tłuszczu. W cytoplazmie dominuje gładkie ER, obecne są również aparaty

Golgiego (Fot. 72b; Fot. 72d; Fot. 72f-h). Oprócz amyloplastów, w komórkach włosków występują chromoplasty z bardzo licznymi plastoglobulami (Fot. 72c; Fot. 72f; Fot. 72h). W cytoplazmie komórek subsekrecyjnych obecne są amyloplasty zawierające kilka ziaren skrobi (Fot. 72i).

#### **4.6.2. Początek antezi**

W pierwszym dniu antezi elajofor jest już większy niż w stadium pąka i mierzy ok. 1,5 x 2,0 mm (Tab. 2), a włoski są dwukrotnie dłuższe niż w poprzednim stadium (Fot. 73a-b; Tab. 3f; Tab. 4f). Podobnie jak w stadium pąka najdłuższe znajdują się na krawędziach elajoforu oraz w pobliżu znamienia (Fot. 73b). Ilość wydzieliny na powierzchni włosków zwiększa się, ale nieistotnie w porównaniu z wcześniejszym stadium (Fot. 73c-f; Tab. 3f; Tab. 4f). Zmienia się również faktura kutykuli - jest ona mniej pomarszczona, choć niewiele grubsza (Fot. 73c-d; Tab. 3f). Podobnie jak w pąku, rozciąga się ona u podstawy i w środkowej części trichomów (Fot. 74a-d). Wakuole zawierają duże ilości tłuszczu (Fot. 74c), a w cytoplazmie włosków istotnie zwiększa się liczba amyloplastów oraz zwiększa się wielkość i liczba ziaren skrobi w jednym plastydzie (Fot. 74e-f; Tab. 3f; Tab. 4f). W komórkach subsekrecyjnych i parenchymy obecna jest mniejsza liczba amyloplastów niż przed otwarciem kwiatu, a gromadzą się one głównie w komórkach miękiszu, wokół wiązek przewodzących (Fot. 74e-f).

Zdjęcia TEM pokazują, że kutykula w 1 dniu antezi odstaje od zewnętrznej ściany komórkowej również w szczytowej części włosków (Fot. 75a), a pod nią gromadzi się tłuszczowa szara wydzielina (Fot. 75b). Komórki włosków posiadają ciemną cytoplazmę i centralnie ułożone, nieznacznie większe jądro komórkowe (Fot. 75a-b; Tab. 3f; Tab. 4f). Pory w ścianie komórkowej otaczającej włoski mają podobną wielkość, jak w stadium pąka i również brak jest porów w ścianach promienistych (Fot. 74a; Fot. 75c-d; Tab. 3f; Tab. 4f). W cytoplazmie trichomów znajdują się, podobnie jak we wcześniejszym stadium,

plastydy z ziarnami skrobi lub/i plastoglobulami oraz mitochondria (Fot. 75b-e). Wakuole i liczne pęcherzyki sekrecyjne wypełnione są kłaczkowatym materiałem lub figurami mielinowymi (Fot. 75a-b; Fot. 75d-g). W pobliżu wakuol znajduje się głównie gładkie ER, ale i fragmenty szorstkiego ER, których błony łączą się z tonoplastem (Fot. 76a-b). Krople tłuszczu w cytoplazmie włosków są większe niż te we włoskach przed otwarciem kwiatu (Fot. 76c-d). Komórki włosków i warstwy subsekrecyjnej łączą się za pośrednictwem plazmodesm (Fot. 76e). W cytoplazmie komórek warstwy podwydzielniczej i w komórkach parenchymy obecne są także krople tłuszczu oraz plastydy z ziarnami skrobi lub/i plastoglobulami (Fot. 76f-h).

#### **4.6.3. Końcowe stadium antezy**

Pod koniec antezy elajofor osiąga 2,0 x 3,0 mm wielkości, a włoski są nieznacznie dłuższe, ale mają podobną długość na całej powierzchni gruczołu (Fot. 77a-c; Tab. 2; Tab. 3f; Tab. 4f). Pokrywa go gruba warstwa wydzieliny (Fot. 77c), która gromadzi się też pod kutykulą. Kutykula włosków jest mocno rozciągnięta na całej ich długości (Fot. 77d-e). Ilość wydzielonego na zewnątrz tłuszczu zwiększa się istotnie (Fot. 78a-b; Tab. 3f; Tab. 4f). Jądro komórkowe jest nadal centralnie położone w komórce włoska i ma podobną wielkość, jak w poprzednich stadiach rozwojowych (Fot. 78c-d; Tab. 3f; Tab. 4f). Cytoplazma jest rzadsza, a liczba amyloplastów zmniejsza się na tyle, że wynik reakcji PAS nie jest dobrze widoczny (Fot. 78e-f; Tab. 3f; Tab. 4f). Amyloplasty widać dopiero na mikroelektronogramach. W wakuolach komórek wydzielniczych obserwowana jest większa ilość kłaczków oraz struktur mielinowych w porównaniu z początkowym stadium antezy (Fot. 79a-g). Ponadto otaczają je szereg cystern i małych pęcherzyków sekrecyjnych, zawierających wiele kropelek tłuszczu (Fot. 79a-g). W cytoplazmie komórek włosków i parenchymy plastydy oprócz ziaren skrobi posiadają również plastoglobule (Fot. 79e; Fot.

79h). Grubość zewnętrznej ściany komórkowej nieco się zmniejsza, ale wielkość porów pozostaje bez zmian (Fot. 79c; Tab. 3f; Tab. 4f).

#### **4.6.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu**

Sekrecja tłuszczu u tego gatunku rozpoczyna się na tydzień przed otwarciem kwiatu i trwa do końca antezy. W stadium pąka kalus produkuje średnio 0,02 mg tłuszczu. Maksymalna ilość oleju wydzielona przez jeden kwiat to ok. 0,11 mg i obserwowana jest ok. 9 dnia antezy (Tab. 3f; Tab. 5f). Zapylenie lub usunięcie pyłkowiny nie wpływa znacznie na aktywność sekrecyjną elajoforów ale powoduje więdnienie okwiatu, które zaczyna się nazajutrz po dokonaniu zapylenia. Po zapyleniu geitonogamicznym nie dochodzi do rozwoju owoców. W przypadku kwiatów z usuniętą pyłkowiną, długość antezy to ok. 6 dni (Tab. 6). Receptywność znamienia obserwowana jest w kwiecie począwszy od stadium pąka, aż po koniec antezy. Reakcja jest najsilniejsza ok. 7 dnia antezy, natomiast najslabsza ok. 7 dni przed otwarciem kwiatu.

#### **4.7. *Ornithocephalus gladius* Hook.**

Kwiaty *O. gladius* żyją średnio 11 dni, natomiast cała roślina kwitnie ok. 39 dni (Tab. 2). Elajofory u tego gatunku są owalnego kształtu i zlokalizowane są podobnie jak u *O. cheirophorum* oraz *O. ornithorrhynchum* u nasady warzki, po obu jej stronach (Fot. 7d; Fot. 80a-b). Cechą charakterystyczną elajoforów u *O. gladius* jest występowanie na ich powierzchni papilli, które widoczne są szczególnie w wierzchołkowej części gruczołów, od strony znamienia (Fot. 80b). Gruczoły wydzielnicze mają kolor zielony, przy czym jaśniejsze są w miejscu występowania papilli (Fot. 80a-b).

Wydzielony tłuszcz gromadzi się przede wszystkim w zagłębieniach *labellum*, pomiędzy elajoforami (Fot. 80a).

Epitel stanowi jedną warstwę komórek o lekko wydłużonym kształcie. Poniżej znajduje się jedna warstwa komórek podwydzielniczych, które są zdecydowanie mniejsze od komórek parenchymy zasadniczej (Fot. 80c-d). W komórkach miękiszu zasadniczego znajdują się rafidy oraz wiązki przewodzące kolateralne zamknięte (Fot. 80c).

#### **4.7.1. Stadium pąka**

W momencie kiedy rozpoczyna się produkcja tłuszczu tj. ok. 3 tyg. przed otwarciem kwiatu, pąk jest jeszcze zielony i mocno ściśnięty (Fot. 7b; Fot. 81a). Elajofory mierzą wtedy zaledwie 0,8 x 0,5 mm (Tab 2), a ich powierzchnia pokryta jest krótkimi papillami o długości 27-38  $\mu\text{m}$  (Tab. 3g) i nie widać obecności tłuszczu na ich powierzchni.

Około 7 dni przed otwarciem kwiatu pąk staje się luźniejszy a jego kolor jaśniejszy (Fot. 7c; Fot. 81b). Dłuższe są także papille wyrastające z komórek epidermy (Fot. 81d-e) i pokrywa je gładka kutykula. Taka sama okrywa płaskie komórki (Fot. 81f-h). Na tym etapie rozwoju, wydzielina na powierzchni elajoforów widoczna jest w postaci nitkowatej substancji, która znajduje się zarówno na płaskich komórkach epidermy, jak i papillach (Fot. 81e-h). Sudan III pozwala na wykrycie tłuszczu już 3 tyg. przed rozpoczęciem antezy (Fot. 82a-b).

Kutykula jest cienka, ale delikatnie odstaje od zewnętrznej ściany komórkowej epitelu (Fot. 82c-d; Tab. 3g; Tab. 4g). Jądro komórkowe zajmuje większą, centralną część komórek warstwy wydzielniczej, dotyczy to głównie komórek o płaskiej powierzchni (Fot. 82c; Fot. 82e; Tab. 3g; Tab. 4g), natomiast w cytoplazmie znajdują się liczne plastydy z małymi, pojedynczymi ziarnami skrobi. W cytoplazmie komórek parenchymy ziarna skrobi w plastydach są znacznie większe (Fot. 82f-h).



Zewnętrzna ściana komórkowa nie posiada porów, podobnie jak ściany promieniste komórek epidermy (Fot. 83a-d; Tab. 3g). Na skrawkach ultracienkich widoczny jest również tłuszcz, który gromadzi się pod rozciągniętą kutykulą (Fot. 83a-b). W cytoplazmie tłuszcz obecny jest w postaci kropeł w komórkach epitelu i parenchymy. Gromadzi się on głównie w pobliżu wakuol oraz w ich wnętrzu, jak również w pęcherzykach sekrecyjnych (Fot. 83c-h). Protoplasty komórek wydzielniczych są gęste i zawierają szorskie ER, liczne mitochondria oraz plastydy (Fot. 83a-d, Fot. 83f). W ścianach promienistych epitelu i w ścianach komórkowych parenchymy występują plazmodesmy (Fot. 83c-d; Fot. 83g-h).

#### **4.7.2. Początek antezy**

W pierwszym dniu antezy ilość wydzielanego tłuszczu wzrasta - nie jest to różnica istotna, ale powierzchnia elajoforów intensywnie połyskuje (Fot. 84a; Tab. 3g; Tab. 4g). Papille epidermalne stają się istotnie dłuższe (najdłuższe ok. 82  $\mu\text{m}$ ), ale ich liczba nie zwiększa się (Fot. 84b-c; Tab. 3g; Tab. 4g), zwiększa się natomiast wielkość elajoforów i osiągają one wielkość 1,2 x 8,0 mm (Tab. 2). Kutykula papilli i płaskich komórek jest pomarszczona, a miejscami odstaje od powierzchni ściany (Fot. 84c-d).

Wnętrze papilli wypełnione jest tłuszczem (Fot. 85a), podobnie jak wnętrze płaskich komórek epidermy (Fot. 85b) i skórki dolnej (Fot. 85c-d). Centralne miejsce w komórce epitelu zajmuje duże jądro, które w porównaniu ze stadium pąka istotnie zwiększa swoją powierzchnię (Fot. 85e-f; Tab. 3g; Tab. 4g). W cytoplazmie wszystkich komórek tkanki widoczna jest duża liczba plastydów (Fot. 85e-f). Te, które zawierają ziarna skrobi są nieliczne i małe, natomiast w parenchymie reakcja PAS nie zachodzi wcale (Fot. 85g-h). Ilość rafidów w parenchymie ulega zmniejszeniu w stosunku do stadium pąka.

Zewnętrzna ściana komórkowa jest istotnie (ponad dwukrotnie) grubsza w porównaniu z wcześniejszym stadium (Fot. 86a; Tab. 3g; Tab. 4g). Nieco

grubsza jest również kutykula, na powierzchni której w TEM widoczna jest wydzielina (Fot. 86a; Tab. 3g; Tab. 4g). W przestrzeni peryplazmatycznej występują figury mielinowe, podobne w pęcherzykach sekrecyjnych oraz cytoplazmie (Fot. 86a-g), w której obecne są też krople tłuszczu oraz elajoplasty (Fot. 86b-d; Fot. 86f-h). W ścianie zewnętrznej oraz w ścianach promienistych nie występują pory, obecne są jedynie plazmodesmy w ścianach promienistych warstwy wydzielniczej (Fot. 86d; Tab. 3g).

#### **4.7.3. Końcowe stadium antezy**

W przypadku 13 dnia antezy elajofory osiągają wielkość ok. 1,4 x 1,0 mm (Tab.2). Mimo widocznych oznak starzenia się kwiatu tj. żółknięcia listków okwiatu i elajoforów, warstwa tłuszczu intensywnie połyskuje (Fot. 87a-b). Papille wydzielnicze są w tym stadium najdłuższe, choć parametr ten nie jest istotnie różny w porównaniu z początkiem antezy, ale pokrywają one już nie tylko szczytową część elajoforu lecz także jego doosiową, centralną część (Fot. 87c-f; Tab. 3g; Tab. 4g). Kutykula na powierzchni epidermy jest mniej pomarszczona w porównaniu z początkiem antezy, ze względu na akumulowany pod nią tłuszcz. Miejscami jest też zapadnięta, w przypadku gdy tłuszcz wydostał się na zewnątrz (Fot. 87e-f). Powierzchnia kropel tłuszczu na zewnątrz tkanki jest jeszcze większa w stosunku do wcześniejszego stadium (Tab. 3g; Tab. 4g), a wydzielina obecna jest nadal wewnątrz komórek epidermy, w tym wewnątrz papilli (Fot. 88a-b). Swoją pozycję w komórce zmieniają jądra komórkowe - ułożone są bardziej brzeźnie, a cytoplazma jest jaśniejsza (Fot. 88c-d) i nie występują w niej amyloplasty (Fot. 88e; Tab. 3g). Plastydy obecne w cytoplazmie nie zawierają ziaren skrobi, a najwięcej jest ich w komórkach parenchymy (Fot. 88c-d).

W tym stadium antezy kutykula staje się grubsza, podobnie zewnętrzna ściana komórkowa (Fot. 89a-c; Tab. 3g). W pierwszym przypadku jest to różnica istotna (Tab. 4g). Na obrazach TEM widać, że kutykula jest bardzo

rozciągnięta (Fot. 89a-b). Wnętrze komórek jest silnie zwakuolizowane (Fot. 89d-f; Tab. 3g; Tab. 4g). Wakuole wypełnione są małymi, licznymi kropelkami tłuszczu (Fot. 89d-e). W ścianie stycznej, pomiędzy komórką wydzielniczą a podwydzielniczą obecne są plazmodesmy (Fot. 89f).

#### **4.7.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu**

Sekrecja w kwiatach rozpoczyna się ok. 3 tyg. przed rozpoczęciem kwitnienia i trwa do końca antezy (Tab. 5g). Masa tłuszczu wydzielonego przez elajofory u tego gatunku jest na tyle niska, że przyjęta w pracy metoda w celu jej określenia, okazała się zbyt mało czuła. Jednak obserwacje makroskopowe pokazują, że ilość wydzielanego na zewnątrz tkanki tłuszczu wzrasta sukcesywnie od momentu rozpoczęcia sekrecji aż do pierwszych oznak starzenia kwiatu (Tab. 5g). Szczególnie intensywna jest w drugiej połowie antezy. Wzrost masy tłuszczu związany jest m.in. ze zwiększającą się powierzchnią wydzielniczą elajoforu. Długość życia kwiatu może ulec zmianie w przypadku zapylenia bądź usunięcia pyłkowiny. Skraca się ona wtedy o ok. 5 dni. (Tab. 6).

Znamię nie jest receptywne w momencie rozpoczęcia aktywności wydzielniczej (Tab 3g). Nie przyjmuje niebieskiego koloru po wykonaniu testu Peroxtesmo Ko, jak również nie dochodzi do rozwoju łagiewek pyłkowych po zapyleniu. Receptywność pojawia się 1 dnia antezy i trwa do ok. 13 dnia, a więc do końca antezy (Fot. 90a-e; Tab. 5g)

#### **4.8. *Phymatidium falcifolium* Lindl.**

Anteza u tego gatunku jest bardzo krótka i wynosi zaledwie ok. 6 dni, przy czym roślina kwitnie ok. 32 dni (Tab. 6). Centralną część w kwiecie zajmuje

kalus, zbudowany z dwóch części tj. nasadowej w postaci zielonego zgrubienia oraz białej wydłużonej, pokrytej włoskami i produkującej tłuszcz (Fot. 8c; Fot. 91a-b). Trichomy są jednokomórkowe i nie zawierają amyloplastów (Tab. 3h). Poniżej znajduje się jedna warstwa małych, spłaszczonych komórek subsekrecyjnych oraz miękisz zasadniczy z wiązkami przewodzącymi kolateralnymi zamkniętymi (Fot. 91c). W komórkach parenchymy obecne są również rafidy. Pory w ścianach komórkowych zewnętrznych i promienistych epidermy nie występują (Tab. 3h).

#### **4.8.1. Stadium pąka**

Elajofor w stadium pąka mierzy jedynie 0,7 x 0,6 mm (Tab. 2). Gruczoł ten rozpoczyna wydzielanie tłuszczów już ok. 3 tyg. przed otwarciem kwiatu. Pąk jest wtedy jasnożółty, ale mocno ściśnięty (Fot. 92a). Włoski wydzielnicze są krótkie, mierzące od ok. 29 do 68  $\mu\text{m}$  długości (Tab. 3h; Tab. 4h), pofałdowane, a miejscami zapadnięte (Fot. 92b). Wydzielina barwi się pod wpływem Sudanu III, głównie wewnątrz włosków oraz wewnątrz komórek parenchymy (Fot. 92c). Kutykula okrywająca zewnętrzną ścianę komórkową jest cienka, choć intensywnie barwi się auraminą O (Fot. 92d; Tab. 3h; Tab. 4h). Centralną pozycję w komórce włoska zajmuje duże jądro komórkowe (Fot. 92e-f; Tab. 3h; Tab. 4h), w cytoplazmie natomiast występują plastydy z pojedynczymi ziarnami skrobi, które obecne są również w komórkach miękiszu (Fot. 92g-h).

Kutykula zbudowana jest z dwóch warstw tj. zewnętrznej lamellarnej i wewnętrznej siatkowatej (Fot. 93a-b). Kutykula ta delikatnie się rozciąga i pęka, a tłuszcz wydostaje się na zewnątrz tkanki (Fot. 93b-c). Krople oleju obecne są także w cytoplazmie włosków (Fot. 93d).

#### **4.8.2. Początek antezy**

Pierwszego dnia antezy elajofor jest większy niż w stadium pąka i osiąga 1,5 x 1,1 mm (Tab. 2), a włoski są istotnie dłuższe o długości nawet ok. 152  $\mu\text{m}$  (Tab. 3h; Tab. 4h) i mniej pofałdowane (Fot. 94a-c). Wydzielina widoczna jest na ich powierzchni (Fot. 94b-d), jak również wewnątrz komórek (Fot. 94e-f).

Kutykula jest podobnej grubości jak we wcześniejszym stadium, ale zewnętrzna ściana komórkowa staje się ponad dwukrotnie grubsza, choć nie jest to istotna różnica w stosunku do stadium pąka (Tab. 3h; Tab. 4h). Jądra komórkowe nadal zajmują centralną część włosków i mają podobną powierzchnię (Fot. 95a; Tab. 3h; Tab. 4h). Podobnie jak we wcześniejszym stadium w cytoplazmie trichomów obecne są nieliczne plastydy z pojedynczymi ziarnami skrobi. Te występujące w komórkach parenchymy są znacznie większe i liczniejsze (Fot. 95b-c). U podstawy trichomów znajdują się zagłębienia widoczne zarówno na skrawkach półcienkich, jak i ultracienkich (Fot. 95a; Fot. 95d-e).

#### **4.8.3. Końcowe stadium antezy**

Pod koniec antezy elajofor jest największy i mierzy ok. 1,7 x 1,4 mm (Tab. 2), choć włoski wydzielnicze nie są istotnie dłuższe niż w początkowym okresie antezy (Tab. 3h; Tab. 4h). Elajofor trichomowy wtedy tworzą dwie grupy włosków tj. napęczniałe i zapadnięte (Fot. 96a-b). Te pierwsze występują głównie na krawędzi elajoforu i pokrywa je mała ilość wydzieliny, natomiast drugie znajdują się na krawędziach oraz w centrum i pokryte są obficie tłuszczem (Fot. 96a-b). W wyniku postępującej wakuolizacji (Tab. 3h; Tab. 4h) w komórkach włosków jądro ułożone jest przyściennie (Fot. 96c). W przeciwności do wcześniejszych stadiów rozwojowych kwiatu plastydy z pojedynczymi ziarnami skrobi występują włącznie w miększu (Fot. 96d). Kutykula delikatnie odstaje od zewnętrznej ściany komórkowej (Fot. 96c) i

widoczna jest po wybarwieniu auraminą O (Fot. 96e). Zewnętrzna ściana komórkowa jest nieco cieńsza w porównaniu z początkiem antezy (Fot. 96f-g; Tab. 3h; Tab. 4h) i następuje autoliza komórki (Fot. 96f).

#### **4.8.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu**

Sekrecja tłuszczu u *P. falcifolium* rozpoczyna się w stadium wczesnego pąka tj. ok. 3 tyg. przed otwarciem kwiatu i trwa do końca antezy (Tab 3h; Tab. 5h). Wydzielony przez elajofor tłuszcz błyszczący się na powierzchni gruczołu. Podobnie jak u *O. gladiatus* masa wydzielonego przez elajofory tłuszczu jest zbyt niska aby określić ją przyjętą w pracy metodą. Ze względu na małą liczbę kwiatów na pędzie kwiatostanowym brak jest również danych dotyczących receptywności znamion.

#### **4.9. *Sigmatostalix amazonica* Schltr.**

*S. amazonica* kwitnie ok. 30 dni, natomiast długość życia jednego kwiatu wynosi średnio tylko 7 dni (Tab. 2). W kwiecie znajduje się elajofor epitelialny, który umiejscowiony jest na kalusie. Ma on żółte zabarwienie a dookoła bordową obwódkę (Fot. 9b; Fot. 97a-b). Wydzielony na zewnątrz tłuszcz gromadzi się w zagłębieniach kalusa (Fot. 97c). W szczytowej części kalusa znajduje się wyrostek o charakterze miękiszowym, który nie pełni funkcji wydzielniczych. Epitel pokrywa boczne krawędzie gruczołu i stanowi jedną warstwę komórek o wydłużonym kształcie (Fot. 97c-e). Pod warstwą sekrecyjną znajduje się jedna warstwa podwydzielnicza o spłaszczonych komórkach (Fot. 97d). Poniżej w miękiszu zasadniczym występują wiązki przewodzące kolateralne zamknięte oraz idioblasty w postaci wakuol wypełnionych barwnikami (Fot. 97c; Fot. 97e).

#### 4.9.1. Stadium pąka

Sekrecja u *S. amazonica* rozpoczyna się w stadium wczesnego pąka tj. 4 tyg. przed otwarciem kwiatu. Pąk jest wtedy żółtozielony i mocno ściśnięty (Fot. 98a). Elajofor ma biało-żółty kolor (Fot. 98b), jest bardzo mały i mierzy 0,8 x 0,7 mm (Tab. 2). Około 2 tyg. przed kwitnieniem (Fot. 98c) w miejscach zagłębień gruczołu pojawiają się bordowe pręgi oraz dookoła gruczołu bordowa obwódka (Fot. 98d). Wydzielony na zewnątrz tkanki tłuszcz powoduje powstanie błyszczącej warstwy na powierzchni elajoforu, głównie w miejscach zagłębień (Fot. 98b; Fot. 98d). Powierzchnia ta jest lekko pofałdowana (Fot. 98e-f) a wydzielony tłuszcz jest bardzo lepki i zabarwia się pod wpływem Sudanu III (Fot. 99a) oraz auraminy O (Fot. 99b). Kropelki oleju widoczne są również wewnątrz komórek epitelu i parenchymy (Fot. 99a). Jądra komórkowe są bardzo duże i zajmują ok. 30% powierzchni protoplastu, zarówno w komórkach warstwy wydzielniczej, jak i miękiszu (Fot. 99b-c; Tab. 3i; Tab. 4i). W stadium wczesnego pąka w cytoplazmie tych komórek amyloplasty nie występują (Fot. 99d). Obecne są natomiast plastydy w komórkach wydzielniczych, ponadto pęcherzyki sekrecyjne wypełnione kłaczkowatym materiałem (Fot. 99e). Kutykula zaczyna się mocno rozciągać pod wpływem gromadzonego tłuszczu (Fot. 99f-g). Pory w ścianach nie występują, ale w ścianach promienistych epidermy widoczne są plazmodesmy (Fot. 99h; Tab. 3i; Tab. 4i).

#### 4.9.2. Początek antezy

Pierwszego dnia antezy elajofor osiąga ponad dwukrotnie większą wielkość niż w stadium pąka (Tab. 2), a bordowe pręgi i obwódka, które pojawiają się 2 tyg. przed otwarciem kwiatu ulegają rozjaśnieniu (Fot. 100a-b). W zagłębieniach gruczołu widoczna jest większa ilość wydzielonego tłuszczu (Fot. 100b). Powierzchnia gruczołu w tych miejscach jest nierówna tj. występuje tam wiele obszarów, z reguły w postaci kręgów z mocno odstającą lub



zapadniętą kutykulą (Fot. 100c-d). Wydzielina jest lepka, podobnie jak we wcześniejszym stadium i barwi się Sudanem III (Fot. 101a-b). Komórki tworzące warstwę sekrecyjną stają się prawie 4-krotnie większe niż w stadium pąka (Fot. 101c; Tab. 3i; Tab. 4i). Zewnętrzna ściana komórkowa posiada pory, wypełnione miejscami kroplami tłuszczu i pokrywa ją istotnie grubsza niż w stadium pąka kutykula (Fot. 101c-f; Tab. 3i; Tab. 4i). Jądra w komórkach epidermy mają podobną wielkość jak w poprzednim stadium (Tab. 3i; Tab. 4i), a w cytoplazmie pojawiają się plastydy z pojedynczymi ziarnami skrobi (Fot. 101g-h; Tab. 3i). Są one zdecydowanie mniejsze od tych występujących w komórkach warstwy subepidermalnej czy parenchymy (Fot. 101g-h).

Na zdjęciach TEM widać, że kutykula zbudowana jest z dwóch warstw tj. zewnętrznej lamellarnej, która się rozciąga pod wpływem akumulowanego tłuszczu oraz wewnętrznej siatkowatej (Fot. 102a-b). Pory w zewnętrznej ścianie komórkowej są bardzo duże i pojawiają się w pobliżu kutykuli siatkowatej (Fot. 102a-c; Tab. 3i; Tab. 4i). Pod ścianą w cytoplazmie komórki wydzielniczej występują aparaty Golgiego oraz plastydy o nieregularnych kształtach (Fot. 102a; Fot. 102c). Obecnych jest też wiele pęcherzyków sekrecyjnych, których liczba zwiększa się w porównaniu ze wcześniejszym stadium rozwojowym. Tworzą one często kompleks i łączą się ze sobą, a niektóre z nich wypełnione są figurami mielinowymi (Fot. 102d-h). W ścianach promienistych epitelu, podobnie jak w zewnętrznej ścianie komórkowej występują duże pory (Fot. 101c-d; Fot. 102d-e; Fot. 102g-h; Tab. 3i; Tab. 4i).

#### **4.9.3. Końcowe stadium antezy**

Elajofor pod koniec antezy jest największy i mierzy 2,7 x 2,5 mm (Tab. 2). Wydzielina wypełnia obficie całe zagłębienie elajoforu i wyraźnie się błyszczy (Fot. 103a-c). Cała powierzchnia gruczołu pokryta jest miejscami gdzie kutykula jest albo rozciągnięta i znajduje się pod nią tłuszcz, albo zapadnięta, kiedy wydzielina wydostała się na zewnątrz (Fot. 103d-f). Obszary te, tak jak w początkowym okresie życia kwiatu mają owalny lub okrągły kształt (Fot. 103d-

f). Olej jest mniej lepki, ale bardziej intensywnie barwi się pod wpływem Sudanu III, zarówno na zewnątrz tkanki, jak i wewnątrz komórek (Fot. 104a-b), jednak powierzchnia kropeł tłuszczu nie zmienia się istotnie wraz z wiekiem kwiatu (Tab. 4i). Tłuszcz wybarwia się także auraminą O na świeżym materiale i skrawkach połączonych (Fot. 104c-d). Komórki epidermy wypełniają duże, centralnie położone jądra komórkowe oraz duże wakuole i pęcherzyki sekrecyjne (Fot. 104e; Tab. 3i; Tab. 4i). W cytoplazmie znajdują się plastydy z ziarnami skrobi. W warstwie subsekrecyjnej i parenchymie ziarna skrobi są większe (Fot. 104f).

Pory w zewnętrznej ścianie komórkowej wypełnione są tłuszczem i są one większe choć nieistotnie niż na początku antezy (Fot. 104d-f; Fot. 105a-c; Tab. 3i; Tab. 4i). W plazmalemmie pojawiają się uwypuklenia (Fot. 105c). Pory w ścianach promienistych nie zmieniają znacznie swoich rozmiarów (Fot. 105d; Tab. 3i; Tab. 4i). Pęcherzyki sekrecyjne wypełnione są kłaczkowatym materiałem (Fot. 104e; Fot. 105d-g). Na zdjęciach TEM widać również liczne plastydy, które różnicują się w regularne chromoplasty, zawierające wiele plastoglobul (Fot. 105g-h). Cytoplazma komórek wydzielniczych jest gęsta, ze względu na duże ilości rER (Fot. 105c-h).

#### **4.9.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadiem antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu**

Sekrecja u *S. amazonica* rozpoczyna się w stadium wczesnego pąka, tj. 4 tyg. przed otwarciem kwiatu i zwiększa się 1 dnia antezy (Tab. 3i). Aktywność wydzielnicza utrzymuje się do końca antezy, jednak masa tłuszczu jest na tyle niska, że określenie jej przyjętą metodą jest niemożliwe.

Znamiona są receptywne od momentu rozpoczęcia sekrecji (Tab. 5i), przy czym reakcja po zastosowaniu testu Peroxtesmo Ko jest silniejsza w 1 dniu

antezy (Fot. 106a-d). Pod koniec antezy tj. 7 dnia receptywność znamion jest już słabsza (Fot. 106e-f).

#### **4.10. *Sigmatostalix oxyceras* Königer & J.G. Weinm.bis**

*S. oxyceras* kwitnie ok. 46 dni, natomiast anteza trwa 6-10 dni (Tab. 2). Tłuszcz produkowany jest przez mały elajofor epitelialny, umiejscowiony na kalusie, w postaci sercowatego zagłębienia (Fot. 10b-d; Fot. 107a-b). Ma on żółte zabarwienie, a od stony przęsłupa na krawędzi bordową obwódkę (Fot. 10d; Fot. 107b). Wydzielony na zewnątrz tłuszcz gromadzi się na powierzchni kalusa (Fot. 107b). Elajofor u *S. oxyceras* morfologicznie przypomina ten u *S. amazonica*.

Epitel wydzielniczy to jedna warstwa komórek ułożonych palisadowo (Fot. 107c-d), w których nie występują amyloplasty (Tab. 3j). Poniżej znajduje się jedna warstwa subsekrecyjna. W miękiszu zasadniczym znajdują się wiązki kolateralne zamknięte oraz liczne idioblasty w postaci dużych wakuol wypełnionych barwnikami (Fot. 107c-d).

##### **4.10.1. Stadium pąka**

Sekrecja u tego gatunku rozpoczyna się ok. 4 tyg. przed otwarciem kwiatu, a więc w stadium wczesnego pąka. Pąk jest wtedy żółtozielony i mocno ściśnięty (Fot. 108a). Elajofor mierzy ok. 0,4 x 0,5 mm (Tab. 2) i nie jest ostatecznie wykształcony. Ma on zieloną barwę, a jego zagłębienie błyszczący się (Fot. 108b). Powierzchnia gruczołu jest pofałdowana i miejscami pokryta wydzielonym na zewnątrz tłuszczem (Fot. 108c-f). Krople tłuszczu obecne są nie tylko na powierzchni kutykuli, ale również wewnątrz komórek tkanki (Fot. 109a-b).

Kutykula pokrywająca zewnętrzną ścianę komórkową jest gruba, a w cytoplazmie komórki wydzielniczej znajduje się duże, centralnie ułożone

jądro (Fot. 109b-c; Tab. 3j; Tab. 4j). Wakuole w tych komórkach wypełnione są tłuszczem (Fot. 109b). Idioblasty obecne w miękiszu zasadniczym nie są liczne (Fot. 109d), a amyloplasty w komórkach parenchymy nie występują wcale (Fot. 109e-f).

Na zdjęciach TEM widać, że kutykula rozciąga się pod wpływem gromadzonego tłuszczu i zbudowana jest z dwóch warstw tj. zewnętrznej lamellarnej, która ulega ulega rozciągnięciu oraz wewnętrznej siatkowatej (Fot. 110a-b). Pod nią znajduje się zewnętrzna ściana komórkowa posiadająca drobne pory (Fot. 110b; Tab. 3j; Tab. 4j). Pory w ścianach promienistych epidermy nie występują (Tab. 3j; Tab. 4j). Natomiast w cytoplazmie tych komórek obecne są liczne plastydy o nieregularnych kształtach z niewielkimi plastoglobulami (Fot. 110c-f). W cytoplazmie dominuje również szorstkie ER (Fot. 110f). Niektóre wakuole wypełnione są obficie tłuszczem (Fot. 110g), natomiast te w komórkach warstwy subsekrecyjnej zawierają kłaczkowaty materiał (Fot. 110h). Plastydy występujące w cytoplazmie komórek podwydzielniczych i miękiszu także są wydłużone, ale te obecne w parenchymie są dodatkowo agranalne (Fot. 110h). W cienkich ścianach promienistych epitelu widoczne są plazmodesmy (Fot. 110e-f; Tab. 3j; Tab. 4j).

#### **4.10.2. Początek antezy**

Pierwszego dnia antezy zagłębienie elajoforu jest bardziej wypełnione tłuszczem i intensywniej połyskuje niż w stadium pąka (Fot. 111a-b). Elajofor mierzy wtedy ok. 1,2 x 1,2 mm (Tab.2). Jego powierzchnia jest pofałdowana, podobnie jak przed otwarciem kwiatu (Fot. 111c-d). Wydzielina intensywnie barwi Sudanem III i jest obecna wewnątrz komórek oraz na zewnątrz tkanki (Fot. 112a-b). Zewnętrzna ściana komórkowa staje się bardziej porowata, co widać nawet na skrawkach półcienkich (Fot. 112c-f). Pory pojawiają się również w ścianach promienistych epidermy (Fot. 112d-f; Tab. 3j; Tab. 4j). Powierzchnia protoplastu zwiększa się prawie 3-krotnie i jest to różnica istotna (Tab. 3j; Tab. 4j). Wakuole komórek sekrecyjnych wypełnione są obficie tłuszczem (Fot. 112d-

e), a w cytoplazmie, tak jak we wcześniejszym stadium nie występują amyloplasty (Fot. 112f).

Kutykula jest znacznie cieńsza niż w stadium pąka, a zewnętrzna ściana komórkowa posiada prawie 5-krotnie większe pory (Fot. 113a; Tab. 3j; Tab. 4j). Pory, zarówno te występujące w zewnętrznej ścianie komórkowej, jak i w ścianach promienistych epidermy wypełnione są tłuszczem (Fot. 113a-d). W ścianach promienistych występują dodatkowo wyrostki (Fot. 113d). W cytoplazmie komórek wydzielniczych znajdują się liczne wydłużone plastydy, które zawierają krople lipidowe (Fot. 113c-f). W niektórych plastydach komórek epitelu i parenchymy obecne są niewielkie ziarna skrobi, których nie wykrywa reakcja PAS. Ponadto w cytoplazmie widoczne są krople tłuszczu (Fot. 113c-e) i duże aparaty Golgiego (Fot. 113b). Jednakże dominującym elementem cytoplazmy jest sER oraz nieliczne błony rER (Fot. 113d-i). Wakuole otoczone są często przez pęcherzyki sekrecyjne, które włączają się do ich wnętrza, podobnie jak błony z cytoplazmy (Fot. 113g-h). Wakuole i pęcherzyki sekrecyjne wypełnione są kłaczkowatym materiałem (Fot. 113c-d; Fot. 113f; Fot. 113h-i).

#### **4.10.3. Końcowe stadium antezy**

Pod koniec antezy zagłębienie elajoforu jest w całości wypełnione tłuszczem (Fot. 114a-b), a elajofor mierzy 1,5 x 1,5 mm (Tab. 2). Powierzchnia kutykuli pokrywającej komórki wydzielnicze jest nadal mocno pofałdowana. Na jej powierzchni widoczny jest tłuszcz (Fot. 114c-d).

Wydzielina znajduje się zarówno na powierzchni gruczołu, jak i wewnątrz komórek, choć powierzchnia kropeł jest istotnie mniejsza niż w 1 dnia antezy (Fot. 115a-b; Tab. 3j; Tab. 4j). Tłuszcz jest również widoczny w porach zewnętrznej ściany komórkowej (Fot. 115c). Cytoplazma w komórkach warstwy sekrecyjnej jest jaśniejsza niż we wcześniejszych stadiach rozwojowych (Fot. 115d). Obecne są w niej plastydy z pojedynczymi ziarnami skrobi, które

odczynnik Schiffa wykrywa dopiero 9 dnia antezy (Fot. 115e-f). Większe ziarna skrobi występują w plastydach komórek parenchymy (Fot. 115f). Powierzchnia protoplastu komórek gruczołu nie jest istotnie różna od tej na początku antezy (Fot. 115c-d; Tab. 3i; Tab. 3j).

Grubość kutykuli oraz zewnętrznej ściany komórkowej jest podobna jak na początku antezy (Tab. 3j; Tab. 4j), ale w ścianie tej obecna jest jeszcze większa ilość porów wypełnionych olejem (Fot. 116a-d). Podobnie jak 1 dnia antezy pory obecne są również w ścianach promienistych epidermy i również wypełnione są wydzieliną, ale ich średnica jest istotnie mniejsza (Fot. 116c; Tab. 3j; Tab. 4j). Pod koniec antezy rozpoczyna się degradacja komórek, a ziarna skrobi wydostają się do cytoplazmy, ze względu na rozpad otaczających je błon (Fot. 116g-h). Błony rER stają się krótkie, a sER nie występuje wcale (Fot. 116e-h).

#### **4.10.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadiem antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu**

Sekrecja u *S. oxyceras* rozpoczyna się 4 tyg. przed otwarciem kwiatu (Tab. 5j), natomiast największa aktywność wydzielnicza jest notowana w początkowej fazie antezy (Tab. 3j). Tłuszcz gromadzi się w zagłębieniu elajoforu przez cały okres sekrecji, ilość ta zmniejsza się dopiero ostatniego dnia życia kwiatu. Mimo tego, masa wydzielonego tłuszczu jest trudna do oszacowania przyjętą metodą, ze względu na małą wielkość elajoforu i małą masę tłuszczu. Zapylenie oraz usunięcie pyłkowiny nie wpływa na intensywność sekrecji, ale skraca czas antezy. W pierwszym przypadku kwiat zaczyna usychać już nazajutrz po dokonaniu zapylenia, natomiast po usunięciu pyłkowiny proces ten rozpoczyna się po ok. 2 dniach (Tab. 6).

Receptywność znamion pojawia się ok. 4 tyg. przed otwarciem kwiatu, choć reakcja z użyciem testu Peroxtesmo Ko jest słaba (Fot. 117a-b; Tab. 5j).

Silniejsza jest 1 dnia antezy (Fot. 117c-d), obecne są również łagiewki pyłkowe po zapyleniu. Test jest pozytywny również na znamionach pod koniec antezy, kiedy okwiat zaczyna usychać (Fot. 117e-f).

#### **4.11. *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf.**

Anteza u *Z. grandiflora* trwa od 14 do 24 dni, a kwitnienie ok. 24 dni (Tab. 2). W kwiecie obecny jest żółtozielony elajofor trichomowy, zlokalizowany na kalusie. Przez jego dystalną część przechodzi fragment prętosłupa (Fot. 11e; Fot. 118a-b).

Gruczoł pokryty jest na całej powierzchni jednokomórkowymi włoskami tworzącymi warstwę wydzielniczą (Fot. 118a-c). Pod nią znajduje się jedna warstwa podwydzielnicza o zdecydowanie mniejszych komórkach niż te w miększu zasadniczym (Fot. 118c). W głębszej parenchymie występują wiązki przewodzące, natomiast w wakuolach komórek parenchymy obecne są rafidy (Fot. 118d-e). W cytoplazmie komórek włosków nie występują amyloplasty, natomiast pory pojawiają się jedynie w zewnętrznej ścianie komórkowej (Tab. 3k).

##### **4.11.1. Stadium pąka**

Pąk 3 tyg. przed rozpoczęciem antezy jest zielony, mocno ściśnięty, a elajofor nie produkuje tłuszczu (Fot. 11a-b). Aktywność wydzielnicza w stadium pąka rozpoczyna się dopiero ok. 1 tydz. przed otwarciem kwiatu. Pąk jest wtedy biało-zielony i stosunkowo luźny (Fot. 11c; Fot. 119a). Elajofor w tym stadium mierzy ok. 4,0 x 4,0 mm (Tab. 2). Trichomy są jeszcze krótkie od 60-95  $\mu\text{m}$  długości (Tab. 3k; Tab. 4k), ale sekrecja już jest obfita (Fot. 119b). Tłuszcz intensywnie barwi się Sudanem III wewnątrz włosków i na zewnątrz tkanki (Fot. 119c-d).



Cytoplazma w komórkach włosków jest ciemna i obecne są w niej liczne plastydy (Fot. 120a-b), nie zawierające ziaren skrobi (Fot. 120c). Amyloplasty występują wyłącznie w miękiszu zasadniczym, głównie wokół wiązek przewodzących (Fot. 120d). Wakuole w komórkach trichomów są duże i większość z nich wypełniona jest tłuszczem (Fot. 119d; Fot. 120a-b; Fot. 120e; Tab. 3k; Tab. 4k).

Kutykula pokrywająca włoski jest stosunkowo cienka (Tab. 3k) i rozciąga się pod wpływem gromadzonej wydzieliny na całej długości włosków (Fot. 120e; Fot. 121a). Znajdująca się pod kutykulą zewnętrzna ściana komórkowa jest porowata (120b; Fot. 120e; Fot. 121b; Tab. 3k; Tab. 4k). Pory są duże, a w zewnętrznej ścianie komórkowej dodatkowo występują niewielkie wyrostki (Fot. 121c). Olej widoczny jest nie tylko na zewnątrz kutykuli i pod nią (Fot. 121c-e), ale również w porach ścian komórkowych. W ścianach promienistych epidermy obecne są jamki (Fot. 121f). Mitochondria w cytoplazmie włosków są duże (Fot. 121e-f), a plastydy posiadają plastoglobule (Fot. 121g). Przeważającym elementem cytoplazmy jest gładkie ER (Fot. 121c; Fot. 121e-g). Krople tłuszczu pojawiają się nie tylko w cytoplazmie komórek włosków, ale także w komórkach podwydzielniczych (Fot. 121h). We włoskach występują także liczne pęcherzyki sekrecyjne oraz wakuole, gdzie niektóre z nich zawierają kłaczkowaty materiał (Fot. 121a), natomiast w wakuolach komórek miękiszu widoczne są błony ułożone kółkiem oraz globule osmofilne (Fot. 121i-j). Plazmodesmy częściej pojawiają się w ścianach wewnętrznych stycznych niż promienistych epidermy (Fot. 121h).

#### **4.11.2. Początek antezy**

Pierwszego dnia antezy elajofor trichomowy jest większy i mierzy ok. 6,0 x 5,0 mm (Tab. 2). Jego powierzchnia bardziej się błyszczy, a włoski są istotnie dłuższe (Fot. 122a-b; Tab. 3k; Tab. 4k).

Podobnie jak w stadium pąka tłuszcz znajduje się zarówno we wnętrzu włosków, jak na zewnątrz tkanki (Fot. 122c-d). Kutykula pokrywająca powierzchnię włosków rozciąga się pod wpływem akumulowanego tłuszczu (Fot. 122e; Fot. 123 a-c).

Cytoplazma w komórkach włosków nadal jest ciemna, a istotnie większe wakuole wypełnia oleista substancja (Fot. 122e; Fot. 123a-b; Tab. 3k; Tak. 4k). Amyloplasty, podobnie jak we wcześniejszym stadium obecne są jedynie w komórkach parenchymy wokółwiązkowej, jednak ich liczba jest już mniejsza (Fot. 123d). W wakuolach komórek parenchymy widoczne są duże krople tłuszczu (Fot. 123b).

Średnica porów w ścianie komórkowej zewnętrznej zwiększa się ponad 4-krotnie, w porównaniu ze stadium pąka (Fot. 123a; Fot. 123e-f; Tab. 3k; Tab. 4k). Plastydy w cytoplazmie włosków są małe, a niektóre z nich posiadają pojedyncze, duże ziarna skrobi (Fot. 123a; Fot. 123e-f; Fot. 124a-b). Nadal dominującym elementem cytoplazmy włosków jest gładkie ER (Fot. 123f; Fot. 124c-e). Krople tłuszczu w TEM widoczne są pod kutykulą oraz w cytoplazmie komórek trichomów (Fot. 124a; Fot. 124f). Dużą powierzchnię wewnątrz włosków zajmują wakuole wraz z przyległymi do nich licznymi pęcherzykami sekrecyjnymi, w których znajdują się figury mielinowe lub koliste, ale mniejsze struktury błoniaste (Fot. 124a-b; Fot. 124g-i; Tab. 3k). Dużych rozmiarów są także mitochondria (Fot. 124e-f; Fot. 124h-i). Podobnie jak w stadium pąka w ścianie komórkowej zewnętrznej obecne są wyrostki, a w ścianach promienistych epidermy jamki (Fot. 124c; Fot. 124i). Ponadto, tak samo jak we wcześniejszym stadium rozwojowym niektóre plastydy posiadają plastoglobule (Fot. 124e).

#### **4.11.3. Końcowe stadium antezy**

Elajofor trichomowy pod koniec antezy jest największy i mierzy ok. 7,0 x 6,0 mm (Tab. 2), Mimo zasychającego okwiatu, powierzchnia gruczołu nadal się błyszczy (Fot. 125a). Włoski wydzielnicze w tym stadium również są najdłuższe,

a ich długość istotnie wzrasta z porównaniem wcześniejszych stadiów rozwojowych, niektóre z nich osiągają ponad 283  $\mu\text{m}$  długości (Tab. 3k; Tab. 4k). Liczne krople tłuszczu są nadal obecne w komórkach włosków oraz na zewnątrz tkanki (Fot. 125b-d). Wydzielina wypełnia także pory w zewnętrznej ścianie komórkowej (Fot. 125e). Cytoplazma w porównaniu z poprzednimi stadiami rozwojowymi kwiatu staje się jaśniejsza, a wakuole wraz z kroplami tłuszczu wypełniają większą część komórek trichomów (Fot. 126a-b). Jądra komórkowe we włoskach są nadal centralnie ułożone i mają podobą powierzchnię, jak na początku antezy (Fot. 126a-b), a amyloplasty występują wyłącznie wokół wiązek przewodzących w parenchymie (Tab. 3k).

Pory w zewnętrznej ścianie komórkowej epidermy są jeszcze większe, choć nie jest to różnica istotna (Fot. 125e; Fot. 126b-d; Fot. 127a; Tab. 3k; Tab. 4k), a pokrywająca ścianę kutykula mocno się rozciąga i gromadzi się pod nią tłuszcz, który lekko zmienia swoją strukturę (Fot. 125d; Fot. 127b). Powierzchnia wakuomu w tym stadium również jest największa i różni się istotnie w stosunku do stadium pąka (Tab. 3k; Tab. 4k). Wakuole wypełnione są kłaczkowatą substancją oraz figurami mielinowymi (Fot. 127c-d), a cytoplazma w przeważającej części szorstkim ER (Fot. 127e). Ponadto w cytoplazmie występują krople tłuszczu oraz plastydy zawierające liczne plastoglobule lub krople tłuszczu (Fot. 127a; Fot. 127d; Fot. 127f). Zewnętrzna ściana komórkowa wciąż posiada wyrostki (Fot. 127e), a w ścianach wewnętrznych stycznych tj. tych pomiędzy komórkami włosków a komórkami podwydzielniczymi obecne są plazmodesmy ułożone szeregowo (Fot. 127g-h).

#### **4.11.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadium antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu**

Sekrecja tłuszczu u *Z. grandiflora* rozpoczyna się ok. 1 tydz. przed otwarciem kwiatu i sukcesywnie wzrasta po otwarciu kwiatu, aż do końca antezy

(Tab. 5k). Maksymalną masę wydzielonego oleju zaobserwowano 8 dnia antezy (Tab. 5k). Zasychanie elementów okwiatu, jak również zapylenie nie wpływa na sekrecję, jednak kwiaty zapyłone żyją krócej tj. ok. 5 dni (Tab. 6). Usunięcie pyłkowiny powoduje nieznaczne zmniejszenie aktywności wydzielniczej i skrócenie antezy do 11 dni (Tab. 6). W przypadku zapylenia geitonogamicznego dochodzi do zapłodnienia i rozwoju owocu (Fot. 128a-i), a nasiona uzyskane z torebki są żywotne (niepublikowane dane). Znamiona są receptywne od stadium pąka do końca antezy (Tab. 5k).

#### **4.12. *Zygostates lunata* Lindl.**

Kwiaty tego gatunku mają zróżnicowany czas antezy, który waha się od zaledwie 15 do aż 54 dni, podczas gdy roślina kwitnie ok. 76 dni (Tab. 2). Elajofor u *Z. lunata*, podobnie jak u *O. ciliatus*, *P. falcifolium* i *Z. grandiflora* zlokalizowany jest na kalusie i jest trichomowy (Fot. 12e-f; Fot. 129a-c). Gruczoł ma zielonożółte zabarwienie i cały pokryty jest jednokomórkowymi włoskami, które tworzą warstwę wydzieliczą (Fot. 129a-c). Pod nią znajduje się jedna warstwa małych komórek subsekrecyjnych oraz miękisz zasadniczy, w którym obecne są wiązki kolateralne zamknięte. W wakuolach komórek parenchymy znajdują się liczne rafidy (Fot. 129c-d). W ścianie komórkowej zewnętrznej ani w ścianach promienistych epidermy nie występują pory (Tab. 31). Brak jest również amyloplastów w cytoplazmie komórek włosków (Tab. 31).

##### **4.12.1. Stadium pąka**

Wydzielina produkowana jest w przez elajofor już ok. 4 tyg. przed rozpoczęciem kwitnienia (Fot. 12c), mimo, że włoski pokrywające jego powierzchnię są jeszcze bardzo krótkie (Fot. 130a-b; Tab. 31). Elajofor jest wtedy bardzo mały i mierzy ok. 0,3 x 0,2 mm (Tab. 2), natomiast długość trichomów

ok. 23  $\mu\text{m}$  (Tab. 3l; Tab. 4l). Na kilka dni przed otwarciem kwiatu włoski mierzą już ok. 110  $\mu\text{m}$ . Najdłuższe znajdują się w pobliżu znamienia i widać na ich powierzchni tłuszcz (Fot. 130c-d).

W stadium wczesnego pąka (4 tyg. przed otwarciem kwiatu) krople tłuszczu na zewnątrz tkanki są bardzo małe i barwią się głównie u podstawy włosków (Fot. 131a; Tab. 3l; Tab. 4l). Krople tłuszczu zwiększają swoją powierzchnię ok. 1 tydz. przed otwarciem kwiatu, a wydzielina barwi się intensywniej i widoczna jest również na zewnątrz tkanki (Fot. 131b). Jądra komórkowe w komórkach włosków zajmują większą, centralną ich część (Fot. 131c; Tab. 3l; Tab. 4l). Powierzchnia protoplastu zwiększa się zdecydowanie ok. 1 tydz. przed rozpoczęciem antezy (Fot. 131d). Amyloplasty obecne są wyłącznie w cytoplazmie komórek parenchymy (Fot. 131e), a kilka dni przed otwarciem kwiatu najwięcej jest ich wokół wiązek przewodzących (Fot. 131f). W komórkach warstwy wydzielniczej w plastydach występują duże, ale pojedyncze ziarna skrobi (Fot. 132a-c). Niektóre plastydy są wydłużone i zawierają dodatkowo plastoglobule (Fot. 132c). Cytoplazma w komórkach włosków jest stosunkowo rzadka i przeważającym w niej elementem jest gładkie ER (Fot. 132a-e). Wakuole wypełnia niewielka ilość figur mielinowych (Fot. 132c-e). Kutykula pokrywająca epidermę składa się z cienkiej, zewnętrznej warstwy lamellarnej oraz wewnętrznej globularnej (Fot. 132a).

#### **4.12.2. Początek antezy**

Pierwszego dnia antezy (Fot. 12d) elajofor jest zdecydowanie większy niż w stadium wczesnego pąka i osiąga ok. 1,2 x 1,2 mm (Tab. 2). Istotnie dłuższe są również włoski (Tab. 3l; Tab. 4l). Pokrywają one całą powierzchnię elajoforu (Fot. 133a-d) i są oblepione wydzieliną (Fot. 133e-f). Ilość produkowanego tłuszczu wyraźnie się zwiększa i barwi się on w komórkach parenchymy, komórkach wydzielniczych oraz na zewnątrz tkanki (Fot. 134a). Pozycja jądra w komórce włoska nie ulega zmianie, ale wakuom staje się istotnie większy (Fot.

134b-c; Tab. 3l; Tab. 4l). Kutykula okrywająca trichomy zaczyna się rozciągać, pod wpływem gromadzonego tłuszczu (Fot. 134d). Tłuszcz obecny jest także w wakuolach komórek włosków (Fot. 134c-d). W przeciwieństwie do wcześniejszego stadium, amyloplasty w komórkach parenchymy nie występują (Fot. 134e). Plastydy obecne w komórkach warstwy sekrecyjnej i miększu zawierają pojedyncze ziarna skrobi lub/i plastoglobule, a niektóre liczne krople tłuszczu tworząc elajoplasty (Fot. 134e; Fot. 134f-i). Ponadto w cytoplazmie włosków, która nadal jest dość rzadka znajdują się mitochondria i gładkie ER (Fot. 134h), a wakuole oprócz kropli tłuszczu wypełniają figury mielinowe i błony włączające się z cytoplazmy (Fot. 134f-h).

#### **4.12.3. Końcowe stadium antezy**

Pod koniec antezy tj. 21 dnia elajofor jest największy i mierzy ok. 1,5 x 1,4 mm (Tab. 2), a niektóre włoski osiągają nawet ponad 242  $\mu\text{m}$  i są one podobnej długości na całym obszarze elajoforu (Fot. 135a-c; Tab. 3l; Tab. 4l). Wydzielina pokrywa całą powierzchnię gruczołu oraz struktury przyległe (Fot. 135a-b). Fotografie SEM pokazują, że kutykula pokrywająca włoski wydzielnicze jest bardziej pomarszczona i bardziej oklejona wydzieliną (Fot. 135d). Wydzielina obecna jest również w porach kutykuli, wewnątrz komórek włosków oraz w komórkach parenchymy (Fot. 136a-c). Wypełnia ona głównie wakuole, choć ilość zawieszzonego w nich tłuszczu zmniejsza się w ostatnich dniach życia kwiatu (Fot. 136d-e). Wakuole pod koniec antezy zajmują istotnie większą część komórki włoska niż we wcześniejszych stadiach (Tab. 3l; Tab. 4l). W głębszej parenchymie widoczne są liczne plastydy (Fot. 136f). Część z nich zawiera pojedyncze ziarna skrobi. Ziarna skrobi są znacznie większe w porównaniu ze stadium pąka i występują również w plastydach komórek trichomów (Fot. 136c; Fot. 136g-i).

Obrazy TEM pokazują, że kutykula składa się z dwóch warstw tj. wewnętrznej siatkowatej (z kroplami tłuszczu) oraz zewnętrznej lamellarnej (Fot.

137a). Ściana komórkowa włosków jest najgrubsza pod koniec antezy (Fot. 137a-e; Tab. 3l; Tab. 4l) i pokrywa ją odstająca kutykula (Fot. 137c). W pobliżu zewnętrznej ściany komórkowej często występują mitochondria (Fot. 137c-e). Cytoplazma jest lekko jaśniejsza niż w poprzednim stadium, ale nadal zawiera głównie gładkie ER (Fot. 137b; Fot. 137d-i). Ponadto w cytoplazmie komórek wydzielniczych obecne są oprócz plastydów z dużymi ziarnami skrobi, również takie, które posiadają liczne krople tłuszczu tworząc elajoplasty (Fot. 137b; Fot. 137e-g; Fot. 137i). W wakuolach oraz pęcherzykach sekrecyjnych znajdują się figury mielinowe oraz fragmenty cytoplazmy. Dotyczy to zarówno komórek wydzielniczych, jak i podwydzielniczych (Fot. 137b; Fot. 137f-i).

#### **4.12.4. Korelacja pomiędzy aktywnością wydzielniczą, stadiem antezy a receptywnością znamion oraz wpływ zapylenia na sekrecję tłuszczu**

Sekrecja u *Z. lunata* rozpoczyna się w stadium wczesnego pąka i 2 tyg. przed otwarciem kwiatu masa wydzielonego na zewnątrz tłuszczu wynosi ok. 0,06 mg. Wartość ta zdecydowanie wzrasta 1 dnia antezy. Największą masę tłuszczu, wynoszącą 0,25 mg odnotowano 6 dnia antezy. Około 10 dnia rozpoczyna się stopniowe zmniejszanie aktywności wydzielniczej, gdzie 19 dnia antezy masa tłuszczu wynosi już tylko ok. 0,04 mg (Tab. 5l). Nie wpływa na nią zapylenie, ale po usunięciu pyłkowiny nieznacznie się zmniejsza. W obu przypadkach skraca się długość życia kwiatu. Kwiaty zapyłone żyją wtedy ok. 7 dni a te, z których została usunięta pyłkowina 5 dni (Tab. 6). Nie dochodzi do rozwoju owoców w wyniku zapylenia geitonogamicznego.

Znamię nie jest receptywne w momencie rozpoczęcia produkcji tłuszczu (Fot. 138a). Receptywność pojawia się ok. 1 tydz. przed antezą (Fot. 138b) i trwa do jej końca (Fot. 138c-f), przy czym reakcja przy użyciu testu Peroxtesmo Ko zachodzi szybciej w pierwszych dniach życia kwiatu.



## 5. DYSKUSJA

Elajofory u dwunastu przebadanych gatunków storczyków z podplemienia *Oncidiinae* są morfologicznie i anatomicznie różne. Pod względem położenia w kwiecie gruczoły te podzielić można na dwie grupy tj. występujące w postaci kalusa na doosiowej stronie *labellum* oraz owalne struktury umiejscowione u nasady warzki, po obu jej stronach. Pierwszą grupę obejmują elajofory epitelialne i trichomowe, a drugą wyłącznie epitelialne.

U *Oncidium cheirophorum*, *Oncidium ornithorhynchum* i *Ornithocephalus gladius* elajofory rozmieszczone są symetrycznie po obu stronach warzki, podobnie jak u *Oncidium trulliferum*, *Trichocentrum cavendishianum* i *Oncidium paranaense*, podczas gdy u *Gomesa radicans*, *Gomesa ranifera*, *Ornithocephalus ciliatus*, *Ornithocephalus gladius*, *Phymatidium falcifolium*, *Sigmatostalix amazonica*, *Sigmatostalix oxyceras*, *Zygostates grandiflora* oraz *Zygostates lunata* za sekrecję odpowiedzialny jest kalus, tak samo jak u *Oncidium loefgrenii*, *Rudolfiella picta* i *Gomesa bifolia* (Singer i Cocucci 1999b; Stpiczyńska i in. 2007; Stpiczyńska i Davies 2008; Davies i Stpiczyńska 2009; Aliscioni i in. 2009).

Elajofory mogą również występować w postaci mięsistego zgrubienia w centralnej części warzki tak jak u *Cohniella ascendens* (Lindl.) Christenson (syn. *Trichocentrum ascendens*) lub w dystalnej jej części oraz u podstawy kolumny, np. w kwiatach *Grobya amherstiae* z *Catasetinae* (Pansarin i in. 2009; Kostelecka i in. 2010).

Niektóre gatunki storczyków jak *Gomesa recurva* nie posiadają odróżnionego morfologicznie elajoforu. Mimo wszystko w takim przypadku tłuszcz produkowany jest przez warzkę równie intensywnie (Stpiczyńska i in. 2007). Wśród astrukturalnych gruczołów spotykane są też takie, które produkują nektar, choć najczęściej nie są one zlokalizowane w kwiecie (Nepi 2007).

Elajofory występują nie tylko w kwiatach z rodziny *Orchidaceae*. U *Krameriaceae* i *Malpighiaceae* spotyka się elajofory epitelialne, natomiast

trichomowe u Cucurbitaceae, Primulaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae oraz Iridaceae (Vogel 1974; Buchmann 1987). Jednak rodzaj *Calceolaria* z rodziny Scrophulariaceae obejmuje największą liczbę gatunków produkujących tłuszcz, gdyż na 260 gatunków aż 210 wydziela tłuszcz (Vogel 1974; Molau 1988).

Różnice w budowie morfologicznej oraz duża gama kolorystyczna kwiatów (od białawych do ciemnokarmazynowych) wśród 12 analizowanych gatunków storczyków dowodzą, że kwiaty te mogą być zapylane przez różne gatunki pszczół. Pszczoły zapylające orchidee poszukują pokarmu w ciągu dnia posługując się głównie zmysłem wzroku, dlatego też kwiaty storczyków muszą być atrakcyjne i są zwykle jaskrawo zabarwione (fioletowe, niebieskie, żółte, rzadziej czerwone lub białe). Badania Gumberta i Kunzea (2001) pokazują, że istnieje selekcja pod względem koloru kwiatu wśród zapylających je omyłkowo trzmieli, np. u *Orchis boryi* Rchb.f. Brak jest jednak podobnych badań dotyczących pszczół odwiedzających kwiaty produkujące tłuszcz.

W przypadku *G. radicans*, *O. cheirophorum* i *O. ornithorhynchum* wyróżnić można w budowie kwiatu *tabula infrastigmatica*. W kwiatkach Malpighiaceae pszczoły podczas przenoszenia tłuszczu z odnóży przednich na tylnie chwytają zuwaczkami *tabula infrastigmatica* (Dressler 1981). Występowanie tej struktury u Oncidiinae może być spowodowane naśladowaniem kwiatów Malpighiaceae, to tym samym poszerzać może spektrum potencjalnych zapylaczy. *Tabula infrastigmatica* występuje także u *O. paranaense*, *T. cavendishianum*, *O. loefgrenii*, *O. trulliferum* i *G. bifolia* (Singer i Cocucci 1999b; Stpiczyńska i in. 2007; Stpiczyńska i Davies 2008; Aliscioni i in. 2009). Ponadto *G. echinata*, *G. radicans*, *O. cheirophorum*, *O. ornithorhynchum* i *Z. lunata* nie tylko wydzielają tłuszcz, ale dodatkowo pachną. Storczykami, które produkują jednocześnie tłuszcz i zapach są również *T. cavendishianum*, *O. loefgrenii*, *G. recurva*, *Gomesa crispa* (Lindl.) Klotzsch ex Rchb.f. i *G. amherstiae* (Stpiczyńska i in. 2007; Pansarin i in. 2009). Obecność jednocześnie obu nagród w kwiecie zachęcać może do odwiedzin zarówno pszczoły zbierające tłuszcz, jak i te z plemienia Euglossini.

Kwiaty *G. amherstiae* oraz *Ornithocephalus cochleariformis*, *Ornithocephalus bicornis*, *O. cheirophorum* i *Sigmatostalix picturatissima*, zapylane są przez pszczoły z rodzaju *Paratetrapedia* sp, należące do plemienia Tapinotaspidini (Buchmann 1987, 2004; van der Cingel 2001; Silvera 2002; Mickeliunas i in. 2006), natomiast *G. recurva* przez pszczoły z rodzaju *Monoeca* sp. z tego samego plemienia (Stpiczyńska i in. 2007). Możliwe, że brak morfologicznego odróżnicowania elajoforu u *G. recurva* zwiększa szanse na odwiedziny różnych zapylaczy, zarówno tych zbierających olej z elajoforów epitelialnych, jak i trichomowych (Stpiczyńska i in. 2007). Natomiast ze względu na bardzo duże podobieństwo kwiatów *S. oxyceras* i *S. amazonica* do *S. picturatissima* oraz *O. ciliatus* do *O. bicornis* są podstawy do tego by uważać, że storczyki te są zapylane przez te same grupy owadów. Wektorem pyłku w przypadku wielu gatunków *Oncidium* m.in. *O. sphacelatum*, *O. guianense*, *O. haitiense*, *O. quadrilobium*, *O. osmentii*, *O. compressicaule*, *O. cosymbephorum* są Centridini (Dod 1976; Pemberton 2008; Carmona-Díaz i García-Franco 2009). Jednak na kwiatach *Oncidium pubes*, *O. paranaense*, *O. loefgrenii* zanotowano obecność przedstawicieli innego plemienia tj. Tetrapediini (Singer i Cocucci 1999b; Attala i Machado 2003; Singer 2003; Machado 2004; Sigrist i Sazima 2004; Stpiczyńska i in. 2007; Stpiczyńska i Davies 2008). Ogromne podobieństwo kwiatów *O. loefgrenii* i *G. ranifera* oraz ten sam obszar występowania nasuwa hipotezę, że oba gatunki mogą być odwiedzane przez pszczoły z rodzaju *Tetrapedia* sp.

Pierwsze doniesienia na temat obecności tłuszczu w kwiatach gatunków *Oncidium* dotyczą *O. ornithorhynchum* (Vogel 1974), ale dopiero w roku 2009 Davies i Stpiczyńska opisali anatomie i ultrastrukturę elajoforów tego gatunku. W przypadku *O. cheirophorum*, *O. gladiatus*, *G. ranifera*, *O. ciliatus*, *O. gladiatus*, *P. falcifolium*, *S. amazonica*, *S. oxyceras*, *Z. grandiflora* oraz *Z. lunata* nie opublikowano dotąd żadnych detali dotyczących morfologii czy anatomii elajoforów. Dotychczas przebadano epitelialne elajofory u *O. paranaense*, *O. ornithorhynchum*, *R. picta*, *T. cavendishianum*, *O. loefgrenii*, *G. recurva*, *G.*

*bifolia*, *O. trulliferum* i *G. radicans* (syn. *Ornithophora radicans*) oraz trichomowe elajofory jedynie u *G. amherstiae* (Singer i Cocucci 1999b; Stpiczyńska i in. 2007; Stpiczyńska i Davies 2008; Davies i Stpiczyńska 2009; Aliscioni i in. 2009, Pansarin i in. 2009). Budowę elajoforów *O. paranaense*, *G. amherstiae* oraz *C. ascendens* zbadano wyłącznie przy użyciu mikroskopii świetlnej (Singer i Cocucci 1999b; Pansarin i in. 2009; Kostelecka i in. 2010), nie publikując żadnych detali z mikroskopii elektronowej transmisyjnej ani informacji dotyczących sekrecji tłuszczów. W niniejszym opracowaniu uzupełniono brakujące dane. Do ustalenia różnic w wielkości struktur komórkowych pomiędzy trzema stadiami rozwojowymi kwiatu zastosowano metodę zwaną stereologią. Stereologia to analiza obiektów trójwymiarowych poprzez interpretację zdjęć dwuwymiarowych. Jest to metoda przydatna nie tylko dlatego, że pozwala na badanie struktur całej komórki czy tkanki na podstawie zdjęć skrawków cienkich, ale również dlatego, że pozwala na badania ilościowe. W ten sposób analizowano zmiany w komórkach wydzielniczych w różnych stadiach rozwojowych nektarników u *Vicia faba* L i *Pisum sativum* L, (Davis i Gunning 1992; Razem i Davis 1999).

Warstwę sekrecyjną elajoforów epitelialnych u *G. echinata*, *G. radicans*, *G. ranifera*, *O. cheirophorum*, *O. ornithorhynchum*, *S. amazonica*, *S. oxyceras* i *O. gladius* tworzy zwarta grupa komórek epidermalnych o wydłużonym kształcie. Podobny kształt komórek wydzielniczych posiadają elajofory u *T. cavendishianum*, *O. loefgrenii*, *O. trulliferum*, *R. picta* i *G. bifolia* (Stpiczyńska i in. 2007; Stpiczyńska i Davies 2008; Davies i Stpiczyńska 2009; Aliscioni i in. 2009). Za sekrecję u *O. gladius* odpowiedzialne są nie tylko płaskie epidermalne komórki, ale również papille, zbliżone budową do tych, które pokrywają dodatkowo powierzchnię *labellum* u *R. picta* i *G. bifolia* (Davies i Stpiczyńska 2009, Aliscioni i in. 2009). Owalne komórki wydzielnicze spotykane są jedynie u *O. paranaense* i *G. recurva* (Singer i Cocucci 1999b; Stpiczyńska i in. 2007).

Tylko 4 z 12 przebadanych gatunków posiada elajofory trichomowe tj. *Ornithocephalus ciliatus*, *Phymatidium falcifolium*, *Zygostates grandiflora* oraz *Zygostates lunata*. Ten typ gruczołu tworzą jednokomórkowe włoski wydzielnicze, takie jak u *G. amherstiae* (Pansarin i in. 2009). Inaczej niż u *Nierembergia* (Solanaceae) czy *Colpias mollis* (Scrophulariaceae), gdzie są one kilkukomórkowe (Cocucci 1991; Steiner i Whitehead 2002).

Elajofory trichomowe składają się z wielu setek, do tysięcy gęstych gruczołowych włosków, o powierzchni od 1,2 mm<sup>2</sup> u *Calceolaria* (Scrophulariaceae) do 183 mm<sup>2</sup> u *Bowkeria* (Scrophulariaceae). Długość trichomów może sięgać do ok. 100 µm (Vogel 1974; Raman 1989). Z zebranych danych wynika jednak, że u Oncidiinae włoski wydzielnicze są dłuższe. Te najdłuższe, osiągające nawet 283,22 µm odnotowano w kwiatach *Z. grandiflora* pod koniec antezi.

Przeprowadzone badania wykazały różnice w budowie histologicznej elajoforów, tak jak w przypadku gruczołów wytwarzających nektar, u których również obserwowana jest znaczna różnorodność strukturalna. Wśród nektarników wyróżnić można aż trzy ich rodzaje tj. epitelialne (epidermalne), mezenchymatyczne (mezofilowe) oraz trichomowe. Epitelialne nektarniki występują np. pomiędzy *labellum* a przętosłupem u *Hexisea imbricata*. Nektar wydzielany jest przez jedną warstwę komórek epidermy i gromadzi się pod rozciągniętą kutykulą (Stpiczyńska i in. 2005a). Natomiast gdy wydzielany jest nie tylko przez epidermę, ale i przez wiele warstw komórek miękiszowych mówi się o nektarnikach mezenchymatycznych (Davies i in. 2005). Ten rodzaj gruczołów rzadko występuje wśród storczykowatych. Trzeci typ - nektarniki trichomowe to jednokomórkowe włoski, np. *Platanthera chlorantha* (Stpiczyńska i in. 2005b), *Platanthera bifolia* (Stpiczyńska 1997) czy *Gymnadenia conopsea* (Stpiczyńska i Matusiewicz 2001).

Niezależnie od typu gruczołu warstwie sekrecyjnej towarzyszy warstwa subsekrecyjna. Pod epitelem wydzielniczym elajoforów znajdują się 1-4 warstwy podwydzielnicze, prawdopodobnie wspomagające sekrecję. W przebadanych

elajoforach trichomowych występuje tylko jedna taka warstwa. Przeważnie jeden pokład komórek podwydzielniczych występuje także w epitelialnych elajoforach *Oncidium* np. *O. loefgrenii* (Stpiczyńska i in. 2007) czy *O. trulliferum* (Stpiczyńska i Davies 2008), najwięcej bo aż cztery warstwy komórek zaobserwowano u *G. radicans*. W przypadku nektarników pod epidermą, znajdują się najczęściej trzy lub cztery warstwy mniejszych komórek subepidermalnych (Stpiczyńska i in. 2003; Teixeira i in. 2004).

Zewnętrzną powierzchnię ściany komórkowej elajoforów wszystkich analizowanych w pracy gatunków pokrywa kutykula. Zbudowana może być ona z dwóch warstw tj. zewnętrznej tzw. kutykuli właściwej, która często ma lamellarną postać ok. 50-150 nm grubości oraz wewnętrznej tzw. kutykuli wtórnej, którą mogą stanowić dwie warstwy - globularna oraz siatkowata bądź tylko jedna z nich. Struktura kutykuli zależy od gatunku oraz stadium rozwojowego kwiatu. W najwcześniejszym stadium obserwowana jest prokutykula, która jest zbita, amorficzna i ciemna (Jeffrey 1996). Kutykula właściwa i wtórna na powierzchni epitelu wydzielniczego elajoforów wykształca się u *G. echinata*, *O. cheirophorum*, *P. falcifolium*, *S. amazonica*, *S. oxyceras* i *Z. lunata*. Na podstawie fotografii TEM wykonanych przez Aliscioni i in. (2009) stwierdzić można, że kutykula pokrywająca elajofory u *G. bifolia* również jest dwuwarstwowa (warstwa lamellarna i siatkowata). Pozostałe badane w niniejszej pracy elajofory przez cały okres antezy pokrywa tylko jedna kutykularna powłoka.

Kutykula tworzy fizyczną barierę pomiędzy tkanką roślinną a środowiskiem zewnętrznym – chroni roślinę przed nadmierną utratą wody, jak również przed wnikaniem patogenów czy przed uszkodzeniami powodowanymi przez szkodniki. Może ona także rozciągać się i tworzyć przestrzeń, w której gromadzą się wydzieliny. Substancje te wydostają się na zewnątrz tkanki przez pory w kutykuli (mikrokanaly, ektodesmy) lub w wyniku mechanicznego jej pęknięcia (Jeffrey 1996).



Najcieńsza kutykula występuje u *Z. lunata* pod koniec antezy (0,126  $\mu\text{m}$ ) oraz *P. falcifolium* w stadium pąka (0,140  $\mu\text{m}$ ), a najgrubsza u *G. radicans* 1 dnia antezy (3,392  $\mu\text{m}$ ). U *G. echinata*, *G. ranifera*, *O. cheirophorum*, *O. ciliatus*, *O. gladius* i *P. falcifolium* grubość kutykuli zwiększa się wraz z kolejnym stadium rozwojowym, jednak nie obserwuje się w większości przypadków istotnych różnic. Stwierdzić można zatem, że grubość kutykuli nie jest powiązana z wiekiem kwiatu. Najgrubsza kutykula wśród roślin spoza Orchidaceae występuje u telomowych roślin *Aglaophyton major* i mierzy ok. 5  $\mu\text{m}$  (Jeffree 1996). W kwiatach innych rodzin niż Orchidaceae (np. Scrophulariaceae) włoski wydzielające tłuszcz zwykle nie są pokryte zabezpieczającą je kutykulą i dlatego są eksponowane na działanie powietrza i odwiedziny zapylaczy różnych taksonów, natomiast tłuszcz wydzielany jest przez dojrzałe już kwiaty (Vogel 1974; Buchmann 1987). U Oncidiinae sekrecja rozpoczyna się już w stadium pąka, nawet 4 tyg. przed otwarciem kwiatu, a tłuszcz gromadzony jest pod kutykulą, która rozciąga się mniej lub bardziej pod jego wpływem. Według Buchmanna (1987) oraz Singera i in. (2006) owady by dostać się do oleju zdrapują kutykulę, a substancje lipidowe wydostają się na powierzchnię. W przypadku *G. recurva* i *G. amherstiae* wiadomo natomiast, że tłuszcz nie zbiera się pod kutykulą tylko wydostaje się bezpośrednio na powierzchnię gruczołowych włosków (Stpiczyńska i in. 2007; Pansarin i in. 2009). Brak przestrzeni subkutykularnej obserwuje się u *G. recurva*, *O. trulliferum* i *R. picta* (Stpiczyńska i in. 2007; Stpiczyńska i Davies 2008; Davies i Stpiczyńska 2009).

Wydzielina akumulowana jest nie tylko pod kutykulą, ale również w porach ścian komórkowych epidermy 7 spośród 12 analizowanych gatunków tj. *G. ranifera*, *O. cheirophorum*, *O. ornithorhynchum*, *S. amazonica*, *S. oxyceras*, *O. ciliatus*, *Z. grandiflora* lub/i w przestrzeniach międzykomórkowych u *O. cheirophorum* oraz *O. ornithorhynchum*. Wcześniejsze badania nad *O. ornithorhynchum* i *G. radicans* nie wykazały obecności porów w zewnętrznej ścianie komórkowej (Stpiczyńska i Davies 2008; Davies i Stpiczyńska 2009). Odnotowano je natomiast u *T. cavendishianum*, *O. loefgrenii* (Stpiczyńska i in.



2007), *O. trulliferum* (Stpiczyńska i Davies 2008), *G. bifolia*, choć w u tego gatunku są one pojedyncze i bardzo małe (Aliscioni i in. 2009) oraz *Dinemandra ericoides* z rodziny Malpighiaceae, zapylanej przez pszczoły *Centris* (Cocucci i in. 1996). Największą średnicę mają pory występujące w zewnętrznej ścianie komórkowej epidermy *S. amazonica* (pod koniec antezi). Porównywalnie duże są te u *T. cavendishianum* (Stpiczyńska i in. 2007). Uważa się, że pory mogą wspomagać transport przez ścianę komórkową hydrofobowych komponentów wydzieliny, tak jak podczas formowania się kutykuli (Kunst i Samuels 2003). W większości przypadków pory w zewnętrznej ścianie komórkowej ulegają powiększeniu z wiekiem kwiatu (wyjątek *G. echinata* i *O. ciliatus*) i są to różnice istotne. Pory w ścianach promienistych epidermy występują u *G. echinata*, *G. radicans*, *G. ranifera*, *O. ornithorhynchum*, *S. amazonica* i *S. oxyceras*. Największe są 1 dnia antezi lub pod koniec życia kwiatu, a u *O. ornithorhynchum* pojawiają się dopiero pod koniec antezi. Istotne różnice w wielkości porów ściany promienistej komórek wydzielniczych pomiędzy stadiami rozwojowymi odnotowano tylko dla *G. echinata*, *G. ranifera* i *S. oxyceras*.

Ściana komórkowa zewnętrzna elajoforów zbudowana jest głównie z celulozy i różni się grubością pomiędzy gatunkami. Grubość ściany zewnętrznej zmienia się w zależności od stadium rozwojowego i jest zawsze cieńsza w pąku niż 1 dnia antezi, wyjątkiem jest *Z. grandiflora*, którego zewnętrzna ściana epidermy jest najgrubsza właśnie w pąku. Istotne różnice pomiędzy stadiami obserwuje się w przypadku *G. echinata*, *O. gladiatus*, *O. cheirophorum*, *S. oxyceras*, *O. ornithorhynchum* i *S. amazonica*, przy czym dwa ostatnie gatunki charakteryzują się obecnością najgrubszej zewnętrznej ściany komórkowej (odpowiednio 3,443  $\mu\text{m}$  i 3,329  $\mu\text{m}$ ) w porównaniu z pozostałymi elajoforami. Mimo, że *O. ornithorhynchum* i *S. amazonica* nie należą do tego samego rodzaju to istnieje konwergencja pod względem tej cechy. Podobne wyniki dotyczące grubości ściany dla *O. ornithorhynchum* (3,48  $\mu\text{m}$ ) uzyskali Davies i Stpiczyńska (2009). Parametry takie mogą powodować efektywniejsze zabezpieczenie kwiatu

przed mechanicznymi uszkodzeniami podczas aktywności zapylaczy. Ściany promieniste są zazwyczaj cieńsze niż ściana zewnętrzna epidermy (Stpiczyńska i in. 2007; Stpiczyńska i Davies 2008; Davies i Stpiczyńska 2009), a najcieńszą obserwuje się w stadium pąka, podobnie jak w przypadku zewnętrznej ściany epidermy. W ścianach promienistych komórek sekrecyjnych występują plazmodesmy, a czasem dodatkowo jamki (*G. echinata*, *O. cheirophorum*, *Z. grandiflora*). U *Z. grandiflora* plazmodesmy pojawiają się częściej w ścianach wewnętrznych stycznych niż promienistych i ułożone są szeregowo.

Niektóre komórki wydzielnicze wzmocnione mogą być przez kolenchymę np. te w nektarnikach *Maxillaria coccinea* czy *H. imbricata*. Kolenchyma chroni kwiat przed uszkodzeniem przez odwiedzające je ptaki (Stpiczyńska i in. 2003; Stpiczyńska i in. 2005a). W elajoforach storczyków nie spotyka się tego typu wzmocnienia, prawdopodobnie dlatego, że zapylane są przez pszczoły. Struktura komórek warstwy sekrecyjnej wszystkich przebadanych gatunków jest typowa dla komórek wydzielniczych (Fahn 2000). Cytoplazma jest gęsta, ciemna i dominuje w niej gładkie lub szorstkie retikulum endoplazmatyczne, w zależności od gatunku oraz stadium rozwojowego kwiatu (np. u *Z. grandiflora* pod koniec antezi przeważa rER). Gładkie ER jest charakterystyczne dla komórek wydzielających tłuszcz u *G. radicans*, *G. ranifera*, *O. ornithorhynchum*, *O. ciliatus*, *Z. grandiflora* i *Z. lunata* oraz *T. cavendishianum*, *G. recurva*, *O. loefgrenii*, *R. picta* i *G. bifolia* (Stpiczyńska i in. 2007, Stpiczyńska i Davies 2008, Davies i Stpiczyńska 2009; Aliscioni i in. 2009). Dopiero pod koniec antezi cytoplazma staje się jaśniejsza i rzadsza, co świadczy o postępującym rozkładzie zawartości i degeneracji komórek. Komórki podczas aktywności wydzielniczej posiadają ponadto duże, centralnie położone jądro komórkowe, które otoczone jest licznymi plastydami, zawierającymi krople lipidowe albo plastoglobule lub/i ziarna skrobi, podobnie jak w elajoforach innych Orchidaceae (Stpiczyńska i in. 2007, Stpiczyńska i Davies 2008, Davies i Stpiczyńska 2009; Aliscioni i in. 2009).

W gruczołach produkujących tłuszcz obecność skrobi została stwierdzona do tej pory wyłącznie w komórkach parenchymy *G. radicans* (Stpiczyńska i Davies 2008) i *O. ornithorhynchum* (Davies i Stpiczyńska 2009), barwionych płynem Lugola. Ten sam test histochemiczny przeprowadzony w niniejszej pracy na badanym materiale roślinnym nie wykazał obecności skrobi w komórkach żadnego spośród 12 gatunków storczyków. Zastosowane dodatkowo barwienie odczynnikami Schiffa skrawków półcienkich wykazało jednak różnice w skuteczności obu tych metod. Okazało się bowiem, że mimo obecności skrobi w komórkach, potwierdzonej reakcją PAS, użycie płynu Lugola na świeżym materiale nie daje pozytywnej reakcji. Zatem drugi test histochemiczny uznać można za skuteczniejszy. Wyjątkiem jest jedynie *G. echinata* (stadium wczesnego pąka tj. 3 tyg. przed kwitnieniem) i *O. ciliatus* (9 dzień antezy), gdzie w reakcja PAS nie wykazuje obecności ziaren skrobi w komórkach elajoforu, mimo, że na zdjęciach TEM widoczne są amyloplasty. Powodem tego może być niewielki rozmiar ziaren skrobi słabo widocznych w LM. W przypadku *G. echinata* pierwszego dnia antezy reakcja jest już pozytywna, a ziarna skrobi większe. Amyloplasty formują się ponadto w cytoplazmie komórek epitelu *G. ranifera*, *G. radicans*, *O. cheirophorum* i *O. ornithorhynchum*. Liczba ziaren skrobi w plastydzie uzależniona jest od stadium rozwojowego kwiatu i są to różnice istotne - pod koniec antezy liczba ta zmniejsza się lub nie występuje wcale. Obecność ziaren skrobi jest charakterystyczna dla komórek nektarników i osmoforów wielu gatunków roślin, ale dotyczy to głównie stadium przedsekrecyjnego. Skrobia funkcjonuje bezpośrednio jako źródło energii w procesach metabolicznych lub pośrednio jako źródło cukru w nektarze. Jednocześnie z ubywaniem skrobi może dochodzić do zmian kształtu plastydów (Pais i Figueiredo 1994; Pacini i in. 2003; Stpiczyńska i in. 2005b; Pacini i Nepi 2007). Plastydy w komórkach wydzielniczych elajoforów mają zazwyczaj wydłużony kształt, a te zawierające duże ziarna skrobi kształt owalny, jednak nie obserwuje się tendencji do jego specyficznej zmiany. W przypadku osmoforów, synteza związków zapachowych odbywa się także przy udziale plastydów

posiadających liczne ziarna skrobi, które to ziarna zanikają wraz z emisją zapachu. Ponadto w syntezie tej bierze udział gładkie retikulum endoplazmatyczne (Pridgeon i Stern 1983; Vogel 1990b).

Duża ilość plastydów zawierających plastoglobule lub/i krople tłuszczu występuje w komórkach papilli wydzielających żywice na *labellum* u *Maxillaria* cf. *notylioglossa* Rchb.f. Dodatkowo w cytoplazmie widoczne jest dominujące gładkie ER oraz towarzyszące mu krople lipidowe. Ciała tłuszczowe różnią się stopniem zabarwienia (Davies i in. 2003a). U *O. ornithorhynchum* krople tłuszczu obecne w wakuoli z reguły są ciemniejsze niż te występujące w cytoplazmie, prawdopodobnie ze względu na różnice w składzie chemicznym (Davies i in. 2003a). Elajoplasty występują u *O. gladius* i *Z. lunata*, przy czym spora ilość kropli lipidowych obecna jest także w plastydach u *S. oxyceras* i *Z. grandiflora*. Krople tłuszczu u *G. ranifera*, *O. ciliatus*, *P. falcifolium* i *Z. grandiflora* obecne są także w cytoplazmie komórek wydzielniczych. Chromoplasty występują jedynie u *O. ciliatus* w stadium pąka i *S. amazonica* pod koniec antezy i mają one owalny kształt.

Charakterystyczną cechą m.in. w komórkach elajoforów jest występowanie figur mielinowych głównie w wakuoli oraz w mniejszym stopniu w cytoplazmie. W pierwszym przypadku mogą powstawać z błon gładkiego ER, włączającego się do wakuoli i błon plastydów, natomiast w drugim poprzez spiralizację rozerwanych błon otaczających plastydy (Stpiczyńska i in. 2007). Obecność tych struktur nie jest związana z filogenetycznym pokrewieństwem gatunków. Według Wista i Davisa (2006) powodem ich pojawiania się jest różnicowanie i starzenie tkanki. Wcześniej natomiast figury mielinowe uważano za artefakty, powstałe w wyniku stosowania glutaraldehydu i czterotlenku osmu podczas preparatyki. Substancje te prawdopodobnie wiążą się z fosfolipidami (Glauert 1974). Figury mielinowe występują w komórkach elajoforów *T. cavendishianum* (Stpiczyńska i in. 2007), *O. trulliferum* (Stpiczyńska i Davies 2008) i *O. ornithorhynchum* (Davies i Stpiczyńska 2009), przy czym dla ostatniego gatunku otrzymano takie same wyniki podczas prowadzenia

niniejszych badań. Ponadto odnotowano je u *G. echinata*, *G. ranifera*, *O. cheirophorum*, *O. ciliatus*, *O. gladius*, *S. amazonica*, *Z. grandiflora* i *Z. lunata*. Nie są obecne natomiast u *O. loefgrenii*, *G. recurva* (Stpiczyńska i in. 2007), *R. picta* (Davies i Stpiczyńska 2009) i *G. bifolia* (Aliscioni i in. 2009), a wśród analizowanych gatunków u *P. falcifolium*, *S. oxyceras* oraz *G. radicans*, podobnie jak u Stpiczyńskiej i Daviesa (2008).

Według Fahna (2000) istnieją trzy hipotezy dotyczące syntezy substancji pochodzenia tłuszczowego w różnych przedziałach komórkowych (plastydy, cytoplazma): 1) każde organellum zawierające krople tłuszczu jest zdolne do jego syntezy, 2) każdy z etapów syntezy tłuszczów zachodzi w poszczególnym organellum, 3) różne składniki tworzące wydzielinę syntetyzowane są przez różne organelle. Retikulum endoplazmatyczne może nie tylko brać udział w syntezie związków lipofilnych, ale także w transporcie wewnątrzkomórkowym i sekrecji poza protoplast, która może odbywać się w dwojaki sposób (Fahn 2000). W przypadku nektaru za pomocą egzocytozy, przy udziale pęcherzyków wydzielniczych pochodzących z błon retikulum endoplazmatycznego lub aparatów Golgiego (*granulocrine secretion*). Nektar może być też aktywnie przemieszczany przez transportery cukrów w błonach komórek wydzielniczych, tzw. *eccrine secretion* (Stpiczyńska 1997; Fahn 2000; Stpiczyńska i in. 2005a,b; Stpiczyńska i Davies 2006). Sekrecja olejków eterycznych poza protoplast odbywać się może, podobnie jak w przypadku nektaru poprzez pęcherzyki wydzielnicze lub za pomocą transporterów cukru. Wydzielony olejek gromadzi się pod kutykulą lub przesącza się przez pory (Pridgeon i Stern 1983, 1985; Vogel 1990b; Caissard i in. 2004). Prawdopodobnym wydaje się, że sekrecja tłuszczów poza protoplast u storczyków odbywa się przy udziale pęcherzyków wydzielniczych. Widoczne jest to szczególnie w przypadku *S. amazonica*, gdzie chromoplasty zawierające duże ilości plastoglobul otoczone są gęstą siecią szorstkiego ER, a w plazmolemie występują uwypuklenia (inwaginacje), powstałe prawdopodobnie przez recykling błon.

W parenchymie wszystkich przebadanych gatunków, tak jak u innych Oncidiinae czy Catasetinae znajdują się idioblasty zawierające rafidy lub/i barwniki (Stpiczyńska i in. 2007; Stpiczyńska i Davies 2008; Davies i Stpiczyńska 2009; Pansarin i in. 2009; Aliscioni in. 2009). Mimo, że rola rafidów nie jest znana, sądzi się, że potencjalną ich funkcją może być wzmocnienie tkanki przed aktywnością zapylaczy podczas usuwania tłuszczu z powierzchni gruczołu oraz przed zgryzaniem przez szkodniki (Aliscioni in. 2009). Kryształki szczawianu wapnia występujące w komórkach mezofilu liści *Peperomia glabella* (Piperaceae) przystosowanych fotosyntezy mieszanego typu (C3, CAM, CAM-cycling) prawdopodobnie ułatwiają rozprowadzanie promieni świetlnych do chloroplastów. Autorzy uważają także, że intensywność światła wpływa na zwiększenie rozmiarów kryształków szczawianu wapnia (Kuo-Huang i in. 2007).

Parenchymę elajoforów, również tych analizowanych w niniejszej pracy charakteryzuje ponadto występowanie wiązek kolateralnych zamkniętych (Stpiczyńska i in. 2007; Stpiczyńska i Davies 2008; Davies i Stpiczyńska 2009; Pansarin i in. 2009; Aliscioni i in. 2009). W miękiszu nektarników ponad 80% roślin okrytozalążkowych występuje tylko floem (Galetto i in. 1997; Fahn 2000; Stpiczyńska i in. 2003; Stpiczyńska i in. 2005a). Penetracja tkanki nektarnika przez floem zapewnia szybkie dostarczanie asymilatów do komórek wydzielniczych (Stpiczyńska 2004). Niektórzy twierdzą, że zarówno cukry, jak i woda są transportowane przez łyko (Fahn 2000). Pasma łyka i drewna obecne są natomiast w miękiszu nektarnika np. u *P. chlorantha* (Stpiczyńska 2003c, 2004), *H. imbricata* (Stpiczyńska i in. 2005a) czy *M. anceps* (Davies i in. 2005). W roślinach obserwuje się ustawiczne współdziałanie tkanek przewodzących w utrzymaniu w nich gradientu potencjału wody, a w konsekwencji - turgoru. Ksylem jest również alternatywną tkanką dostarczającą cukry, pochodzące z uruchamiania substancji zapasowych (najczęściej skrobi) nie tylko na wiosnę, jak u drzew lecz również w przypadkach konieczności szybkiej likwidacji różnego typu zranień i uszkodzeń tkanek lub zaburzeń w transporcie floemowym (Starck 2003).



Sekrecja u wszystkich dwunastu analizowanych gatunków rozpoczyna się już w stadium pąka, inaczej niż u *T. cavendishianum*, *O. loefgrenii* (Stpiczyńska i in. 2007) i *O. trulliferum* (Stpiczyńska i Davies 2008). Jedynym znanym dotychczas gatunkiem z Orchidaceae produkującym olej w stadium pąka jest *O. ornithorhynchum*, choć autorzy zaznaczyli, że jest to późny pąk (Davies i Stpiczyńska 2009). Jednak przeprowadzone badania pokazały, że elajofory *O. ornithorhynchum* rozpoczynają aktywność wydzielniczą już 4 tyg. przed otwarciem kwiatu, podobnie *G. radicans*, *S. oxyceras* i *Z. lunata*, natomiast 3 tyg. przed rozpoczęciem kwitnienia *G. echinata*, *O. cheirophorum* i *O. gladius*, a 1 tydz. przed otwarciem kwiatu wydzielina produkowana jest u *G. ranifera*, *O. ciliatus*, *P. falcifolium* oraz *Z. grandiflora*. Sekrecja trwa przez cały okres antezy. Tłuszczem pokryte są najczęściej poza powierzchnią elajoforu, *labellum* i pozostałe listki okwiatu. Możliwe, że świeżą powierzchnią struktur kwiatowych dodatkowo zachęca zapylaczy do odwiedzin.

Głównymi zapylaczami kwiatów posiadających elajofory są pszczoły, które aktywne są w ciągu dnia. Dobowa aktywność zapylaczy jest często odzwierciedleniem dynamiki sekrecji. Na przykład maksymalna akumulacja nektaru występuje tuż przed, lub w czasie ich wzmożonej działalności, natomiast zatrzymanie sekrecji lub resorpcja nektaru ma miejsce gdy zapylacze są nieaktywne (Nepi i Stpiczyńska 2008). Większa objętość nektaru skłania zapylaczy do dłuższych wizyt w kwiecie, co zwykle powoduje skuteczniejsze zapylenie (Cruden i in. 1993). Zdarza się, że nektar ulega resorpcji po zapyleniu lub w przypadku jeśli nie zostanie wykorzystany przez zapylacza. Taki proces zachodzi u *Aerangis verdickii* (De Wild.) Schltr. (Koopowitz i Marchant 1998) i *Mystacidium venosum* Harv. ex Rolfe (Luyt i Johnson 2002). Umożliwia on utrzymanie odpowiedniej koncentracji cukrów w nektarze podczas antezy oraz regulację jego lepkości. Ponadto węglowodany zawarte w nektarze ulegają ponownemu wykorzystaniu i stanowią cenne źródło węgla i energii w procesach metabolicznych. Mogą być wykorzystane np. podczas rozwoju owoców (Luyt i Johnson 2002; Stpiczyńska i Pielecki 2002; Stpiczyńska 2003c; Pacini i Nepi



2007). W przypadku elajoforów wydaje się, że wydzielony tłuszcz wysycha i do resorpcji nie dochodzi. Tłuszcz kumuluje się jedynie na powierzchni elajoforów na co wskazuje często zwiększona jego masa w drugiej połowie antezy oraz powierzchnia kropel tłuszczu na zewnątrz epitelu, ale kiedy okwiat zaczyna usychać wydzielina prawdopodobnie również zasycha.

Ilość produkowanego tłuszczu przez elajofory trichomowe jest zawsze niższa od tej w kwiatach o elajoforach epitelialnych i biorąc pod uwagę maksymalną masę oleju uzyskaną z elajoforu epitelialnego i trichomowego różnica wynosi 0,94 mg. Podobne tendencje obserwowali Vogel (1974) i Buchmann (1987). Obserwacje przeprowadzone przez Daviesa i Stpiczyńską (2009) pokazują, że *O. ornithorhynchum* produkuje dużo więcej tłuszczu niż *R. picta*, choć istnieje obawa, że powodem tego może być różnica w wieku kwiatów, ponieważ kwiaty *R. picta* były kilka dni starsze podczas badań. Według Silvera (2002) *O. ornithorhynchum* produkuje dwa razy mniej tłuszczu w jednym kwiecie niż *O. cheiophorum*. Jednak pomiary masy wydzielonego tłuszczu u analizowanych gatunków wskazują, że największą masę oleju uzyskano właśnie z elajoforów *O. ornithorhynchum* 14 dnia antezy i wynosi ona 1,05 mg. Masa tłuszczu wyprodukowanego przez elajofory u *O. gladius*, *P. falcifolium*, *S. amazonica* i *S. oxyceras* jest na tyle niska, że przyjęta w pracy metoda (Reis i in. 2006) w celu jej określenia, okazała się zbyt mało czuła. Wiadomo jednak, że ilość tłuszczu może się różnić między poszczególnymi osobnikami tego samego rodzaju (Silvera 2002). Aby określić skład chemiczny wydzieliny potrzebne jest w sumie ok. 15-17  $\mu\text{g}$  tłuszczu z danego gatunku lub tak jak u Reis i in. (2000) ok. 50 kwiatów. Do wyekstrahowania oleju z bibułki zastosować można octan etylu odpowiednio przygotowany. Po odparowaniu rozpuszczalnika uzyskuje się ekstrakt do badań (Reis i in. 2000, 2006). Poza stosowaniem bibulek, inną metodą pozyskiwania oleju do badań są szklane kapilary (Reis i in. 2000, 2003). Próby pobrania tłuszczu w ten sposób nie powiodły się w przypadku analizowanych gatunków. Przyczyną tego są zapewne zbyt małe rozmiary kwiatów, a tym samym małe ilości wydzieliny, jak również duża jej lepkość. W

literaturze spotykane jest także ekstrahowanie tłuszczu poprzez zanurzenie całego kwiatu w heksanie (Silvera 2002; Chiron i in. 2009). Ta metoda nie wydaje się wiarygodna, ze względu na inne substancje pochodzenia tłuszczowego pokrywające powierzchnię okwiatu, mogące zakłócać wynik dotyczący składu czy ilości tłuszczów wydzielanych przez elajofory.

Skład chemiczny tłuszczowej wydzieliny jest dobrze znany dla kilkunastu gatunków storczyków (Reis i in. 2000, 2003, 2006; Silvera 2002, Chiron i in. 2009). Na przykład analiza oleju otrzymanego z kwiatów należących do 'kladu Gomesa R. Br.', monofiletycznej grupy storczyków (Reis i in. 2000; Singer i in. 2006; Chase i in. 2009; Chiron i in. 2009), do której należą m.in. *O. pubes*, *O. trulliferum* i *G. radicans* wykazała obecność diacylgliceroli. Ponadto, podobne substancje występują u gatunków, wcześniej kwalifikowanych jako Ornithocephalinae tj. *Phymatidium falcifolium* i *Zygostates lunata* (Reis i in. 2000, 2003). Głównym komponentem tłuszczu u *G. radicans* jest oncidinol, zidentyfikowany jako (2S,3'R,7'R)-1-acetyl-2-(3',7'-diacetoxy-eicosanoyl)-glycerol (Reis i in. 2003). Obecność związków lipidowych odnotowano m.in. w nektarze u *Helleborus* sp. z rodziny Ranunculaceae (Vesprini i in. 1999). Różnice pomiędzy osobnikami tego samego rodzaju pojawiają się nie tylko na tle ilości produkowanego tłuszczu, ale również składu chemicznego. Wydzielina produkowana przez kwiaty *O. ornithorhynchum* ma inny skład od tej u *O. cheirophorum*, mimo, że analiza DNA wskazuje na ich pokrewieństwo genetyczne, natomiast tłuszcz pochodzący od *S. picturatissima* jest bardziej podobny pod względem chemicznym do tłuszczu wydzielanego przez kwiaty *Ornithocephalus* sp. niż innych gatunków z rodzaju *Sigmatostalix*. Wyjątkiem jest *S. oxyceras*, którego olej ma zbliżony skład chemiczny do tego u *Sigmatostalix marinii* i *Sigmatostalix portillae* (Williams i in. 2001; Silvera 2002). Reis (2005) pokazała, że kompozycja tłuszczu nie zależy od czynników abiotycznych i warunkowany jest genetycznie. Wydzielina produkowana zarówno przez kwiaty storczyków występujących w środowisku naturalnym, jak i tych pochodzących z kolekcji ma taki sam skład. Czasem może jednak

dochodzić do zmian w składzie wydzielanych substancji. Tak się dzieje w przypadku nektaru, gdzie podwyższony poziom dwutlenek węgla w powietrzu może wywołać zmniejszenie koncentracji lub zmianę składu aminokwasów w nektarze (Erhardt i Rusterholz 1997). Wzrost koncentracji tych związków może powodować również inny czynnik, jakim jest starzenie się kwiatu lub niska temperatura otoczenia (Petanidou i in. 1996; Terrab i in. 2007). Zróżnicowany poziom nawożenia roślin także nie pozostaje bez znaczenia (Gardener i Gillman 2001).

Aktywność wydzielnicza tłuszczów w trzech stadiach rozwojowych kwiatu skorelowana jest z receptywnością znamienia w przypadku większości badanych gatunków storczyków, podobnie jak u *Gymnadenia conopsea*, produkującej nektar (Stpiczyńska 2003b). Zastosowanie zarówno testu Peroxtesmo Ko, jak i obserwacji łagiewek pyłkowych po zapyleniu daje takie same rezultaty. Znamiona kwiatów podczas antezy barwią się szybciej na niebiesko niż znamiona w pąku czy pod koniec życia kwiatu, a w przypadku tych ostatnich zabarwiona powierzchnia znamienia zmniejsza się. U innych gatunków reakcja po zastosowaniu testu Peroxtesmo Ko może być szybsza pod koniec antezy lub też jest taka sama przez cały jej okres (Galen i Plowright 1987). Ze względu na zbyt małą ilość kwiatów na pędzie kwiatowym nie było możliwym ustalenie korelacji dla *P. falcifolium* oraz *S. amazonica*. Wiadomo jednak, że u *O. cheirophorum*, *O. gladiatus* oraz *Z. lunata* receptywność nie pokrywa się z produkcją oleju. Jednocześnie kwiaty *Z. lunata* mają najdłuższy okres antezy, nawet 54 dni. Najkrócej jednak żyją kwiaty *P. falcifolium* (6 dni), *S. amazonica* (7 dni) i *S. oxyceras* (8 dni). Receptywność znamienia jest bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na efektywność zapylenia i może przyczyniać się do obniżonego owocowania (Stpiczyńska 2004). Obecność atraktantów w kwiecie zwiększa prawdopodobieństwo odwiedzin zapylacza a w następstwie szanse na zapylenie, podobnie jak długa żywotność kwiatów (Neiland i Wilcock 1998; Stpiczyńska 2003b). Wnioskować zatem można, że *P. falcifolium*, *S. amazonica* i *S. oxyceras* nie są odwiedzane przez wąską grupę wyspecjalizowanych

zapylaczy. Storczyki są często zależne od wysoce wyspecjalizowanych zwierząt, będących wektorami pyłku. Występowanie kwiatów o długim okresie życia, oczekujących na odwiedziny potencjalnych zapylaczy wydaje się być wydajną strategią. Pomiedzy usunięciem pyłkowiny a jej depozycją na znamieniu innego kwiatu może minąć kilka dni. Dlatego efektywne zapylenie jest ściśle związane z żywotnością pyłku i czasem trwania receptywności znamienia (Neiland i Wilcock 1995; Johnson i Edwards 2000; Stpiczyńska 2003b).

Długość antezi znacznie skraca się po zapyleniu lub usunięciu pyłkowiny, a zmiany morfologiczne w okwiecie pojawiają się nawet następnego dnia. Jest to zgodne z obserwacjami Stpiczyńskiej (2004), dotyczącymi sekrecji nektaru u *P. chlorantha*, które wykazały, że zapylenie wpływa istotnie na długość okresu sekrecji oraz prezentacji nektaru poprzez skrócenie antezi. Z kolei u *Zygopetalum mackaii* Hook, *Cleisostoma koordresii*, *C. latifolium* Lindl. i *Phalaenopsis violacea* Witte zapylenie powoduje zamknięcie lub zazielenienie okwiatu. Natomiast u *Lycaste skinneri* (Batem.) Lindl. i *Anguloa uniflora* Ruiz and Pavon zapylenie dwukrotnie wydłuża okres świeżości kwiatu i nie wywołuje widocznych zmian w okwiecie (van Doorn 1997).

Zapylenie u badanych gatunków nie wpływa na hamowanie sekrecji tłuszczu, ale czasem delikatnie ją zmniejsza. Jednakże według Stpiczyńskiej (2004) zapylenie powoduje niewielkie zwiększenie objętości wydzielanego nektaru, choć również nie są to istotne zmiany. Usunięcie pyłkowiny u *Z. lunata* powoduje również niewielkie zmniejszenie sekrecji tłuszczu, a w przypadku *G. ranifera* całkowite jej zablokowanie, tak jak u *Catasetum* sp. i *Cycnoches* sp, gdzie po usunięciu *pollinarium* gwałtownie zmniejsza się produkcja olejków lotnych (Williams 1982).

Po zapyleniu geitonogamicznym nie dochodzi do rozwoju owoców u *G. echinata*, *G. ranifera*, *O. ciliatus*, *O. ornithorhynchum* i *Z. lunata*. Zapylenie inicjuje dopiero megasporogenezę oraz rozwój woreczka zalążkowego (Fredrikson 1991; Lee i in. 2008), dlatego też widoczne są zmiany w wyglądzie zalążni (zwiększa swoje rozmiary), ale do zapłodnienia nie dochodzi i kwiat po

kilku dniach zasycha całkowicie, prawdopodobnie ze względu na barierę prezygotyczną. Bariery takie chronią głównie przed samozapyleniem, przede wszystkim kwiaty *Cryptostylis* oraz u większość Oncidiinae (Dressler 1993).

Na indukcję starzenia się kwiatu może również wpływać zebranie wydzielonego nektaru (Galetto i in. 1997). Potwierdza się to u *O. ornithorhynchum*, gdzie po trzech dniach od odsączenia wydzieliny z powierzchni elajoforów listki okwiatu zaczynają brązowieć. Powodem tego może być też mechaniczne uszkodzenie powierzchni gruczołu podczas pobierania tłuszczu.

W niniejszej pracy przedstawiono budowę morfologiczną, anatomiczną i ultrastrukturalną elajoforów 12 gatunków z podplemienia Oncidiinae. Opisano także aktywność gruczołów i masę wydzielanego tłuszczu w zależności od stadium rozwojowego kwiatu, jak również skorelowano uzyskane dane z receptywnością znamion. Niestety brak jest w literaturze danych biochemicznych tłuszczów dla części przebadanych gatunków storczyków, w związku z tym porównanie składu chemicznego oleju jest w tej chwili niemożliwe i aby to określić wymagane są dalsze badania. Pewnym jest jednak, że Oncidiinae nie są monofiletycznym taksonem, a w budowie morfologicznej kwiatów istnieją różnice. Mimo to, niektóre cechy takie jak położenie elajoforu, jego wygląd czy budowa anatomiczna są podobne w obrębie pewnych grup storczyków, co oznacza, że mogły one ewoluować jednocześnie zwiększając swoją atrakcyjność pod wpływem deficytu zapylaczy. W celu dokładnego zbadania stopnia pokrewieństwa pomiędzy gatunkami, jak również ustalenia stopnia zaawansowania ewolucyjnego i systemu zapylania wykorzystywane powinny być nie tylko molekularne analizy filogenetyczne, ale pod uwagę powinny być również brane dane dotyczące budowy kwiatu czy składu chemicznego wydzielin przez nie produkowanych. Tylko kompleksowo stosowane metody zwiększą prawdopodobieństwo uzyskania wiarygodnych wyników. Skoro tłuszcz stanowi cenne źródło związków odżywczych dla larw pszczół i nie posiada on toksycznych właściwości, zastanowić się można również nad jego charakterem

aplikacyjnym. Mogłoby się bowiem okazać, że byłby on doskonałym surowcem do produkcji np. kosmetyków. Potrzebna jest zatem analiza składu chemicznego wydzieliny oraz opracowanie metody efektywnego pozyskiwania w krótkim czasie osobników zdolnych do produkcji oleju w kulturze *in vitro*, co pozwoliłoby na otrzymanie większej masy tłuszczu. Alternatywą mogą być też badania molekularne nad wyznakowaniem genu warunkującego produkcję tłuszczu.

## 6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzić można że:

- 1) W kwiatach analizowanych gatunków storczyków z podplemienia Oncidiinae obecne są elajofory epitelialne lub trichomowe. Elajofory epitelialne występują u *Gomesa echinata*, *Gomesa radicans*, *Gomesa ranifera*, *Oncidium cheirophorum*, *Oncidium ornithorhynchum*, *Ornithocephalus gladius*, *Sigmatostalix amazonica* i *Sigmatostalix oxyceras*, natomiast trichomowe u *Ornithocephalus ciliatus*, *Phymatidium falcifolium*, *Zygostates grandiflora* oraz *Zygostates lunata*. W przypadku *O. cheirophorum*, *O. ornithorhynchum* i *O. gladius* gruczoły rozmieszczone są symetrycznie po obu stronach warzki, zaś u pozostałych gatunków występują w postaci kalusa na doosiowej stronie *labellum*.
- 2) W budowie anatomicznej elajoforów epitelialnych i trichomowych można wyróżnić trzy warstwy tj. wydzielniczą, podwydzielniczą oraz parenchymę. Warstwę sekrecyjną stanowi jeden pokład komórek epidermy o wydłużonym kształcie (u *O. gladius* dodatkowo papille) lub jednokomórkowe włoski wydzielnicze. Pod epitelem wydzielniczym elajoforów występują 1-4 warstwy podwydzielnicze. Parenchyma charakteryzuje się natomiast występowaniem idioblastów z rafidami lub/i barwnikami oraz wiązek przewodzących kolateralnych zamkniętych.
- 3) Zewnętrzną powierzchnię ściany komórkowej elajoforów pokrywa jedno- lub dwuwarstwowa kutykula, a jej struktura zależy od gatunku oraz stadium rozwojowego kwiatu. Grubość kutykuli nie jest powiązana z wiekiem kwiatu.
- 4) Istnieją różnice w grubości zewnętrznej ściany komórkowej epidermy pomiędzy gatunkami, jak również pomiędzy stadiami rozwojowymi kwiatu. Ściana ta z wyjątkiem *Z. grandiflora* jest cieńsza w pąku niż 1 dnia antezy. Istotne różnice w grubości ściany pomiędzy stadiami obserwuje się w przypadku 6 z 12 gatunków.



- 5) Tłuszcz gromadzony jest pod kutykulą, która rozciąga się mniej lub bardziej pod jego wpływem lub/i w porach ścian komórkowych epidermy czy przestrzeniach międzykomórkowych parenchymy. Na poziomie komórki akumuluje się on w wakuoli, cytoplazmie i plastydach.
- 6) Sekrecja tłuszczów poza protoplast w komórkach elajoforów badanych gatunków storczyków odbywa się prawdopodobnie przy udziale pęcherzyków wydzielniczych, natomiast na zewnątrz tkanki olej wydostaje się prawdopodobnie po uszkodzeniu kutykuli przez odnóża owadów.
- 7) Ultrastruktura komórek warstwy sekrecyjnej w stadium pąka i w trakcie antezy jest typowa dla komórek wydzielniczych tj. cytoplazma jest gęsta, jądro komórkowe jest duże i centralnie położone, w cytoplazmie występuje wiele mitochondriów i gładkie lub szorstkie retikulum endoplazmatyczne. Dopiero pod koniec antezy cytoplazma staje się rzadsza i następuje degeneracja komórek.
- 8) Skrobia prawdopodobnie stanowi źródło energii w procesie wydzielniczym. Amyloplasty formują się w cytoplazmie komórek epitelu u *G. echinata*, *G. ranifera*, *G. radicans*, *O. ciliatus*, *O. cheirophorum* i *O. ornithorhynchum*. Liczba ziaren skrobi w plastydzie istotnie różni się w zależności od stadium rozwojowego kwiatu - pod koniec antezy liczba ta zmniejsza się lub skrobia nie występuje wcale.
- 9) Ilość produkowanego tłuszczu przez elajofory trichomowe jest niższa od tej w kwiatach o elajoforach epitelialnych. Maksymalną masę oleju uzyskano z elajoforów *O. ornithorhynchum* 14 dnia antezy i wynosi ona 1,05 mg.
- 10) Aktywność wydzielnicza elajoforów w trzech stadiach rozwojowych kwiatu skorelowana jest z receptywnością znamienia u większości gatunków (wyjątek *O. cheirophorum*, *O. gladius*, *Z. lunata*). Zapylenie nie wpływa na hamowanie sekrecji tłuszczu, ale czasem delikatnie ją zmniejsza. U *O. ornithorhynchum* odsączenie wydzieliny z powierzchni elajoforów indukuje proces starzenia kwiatu.

11) Długość antezi jest uzależniona od gatunku. Najdłuższy okres antezi mają kwiaty *Z. lunata*, a najkrótszy *P. falcifolium*, *S. amazonica* i *S. oxyceras*. Długość antezi znacznie skraca się po zapyleniu lub usunięciu pyłkowiny.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Ackerman JD. 1975. Reproductive biology of *Goodyera oblongifolia* (Orchidaceae). *Madroño*, 23: 191-198.
2. Ackerman JD. 1986. Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana*, 1: 108–113.
3. Ackermann JD, Rodríguez-Robles JA, Meléndez EJ. 1994. A meager offering of nectar by an epiphytic orchid is better than nothing. *Biotropica* 26: 44-49.
4. Adams PB, Lawson SD. 1993. Pollination in Australian Orchids: a Critical-Assessment of the Literature 1882-1992. *Australian Journal of Botany*, 41: 553-575.
5. Aguiar CML, Garófalo AG. 2004. Nesting biology of *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Revista Brasileira de Zoologia*, 21: 477-486.
6. Aktar S, Nasiruddin KM, Hossain K. 2008. Effects of different media and organic additives interaction on *in vitro* regeneration of *Dendrobium* orchid. *Journal of Agriculture and Rural Development*, 6: 69-74.
7. Aliscioni SS, Torretta JP, Bello ME, Galati BG 2009. Elaiophores in *Gomesa bifolia* (Sims) M.W. Chase & N.H. Williams (Oncidiinae: Cymbidieae: Orchidaceae): structure and oil secretion. *Annals of Botany*, 104:1141-1149.
8. Almeida AM, Figueiredo RA. 2003. Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a Brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. *Brazilian Journal of Biology*, 63: 551-558.
9. Alves-dos-Santos I . 2007. Natural history and conservation of the Brazilian oil-collecting bees. The Association for Tropical Biology and Conservation, Annual Meeting: Linking Tropical Biology with Human Dimensions. July 15-19, Morelia, Mexico.
10. Alves-dos-Santos I, Capelari Naxara SR, Eflra P. 2006. Notes on the morphology of *Tetrapedia diversipes* Klug 1810 (Tetrapediini, Apidae), an oil-collecting bee. *Brazilian Journal of Morphological Science*, 23: 425-430.

11. Alves-dos-Santos I, Machado IC, Gaglianone GC. 2007. História natural das abelhas coletoras de óleo. *Oecologia Brasiliensis*, 11: 544-557.
12. Alves-dos-Santos I. 1999. Abelhas e plantas melíferas da Mata Atlântica, Restinga e Dunas do litoral norte do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 43:191-223.
13. Arditti J, Abdul Karim Abdul Ghani. 2000. Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications. *New Phytologist*, 145: 367-421.
14. Arditti J. 1992. *Fundamentals of Orchid Biology*, Wiley-Interscience, New York.
15. Armbruster WS, Herzig AL, Clausen TP. 1992. Pollination of two sympatric species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Suriname by male euglossine bees. *American Journal of Botany*, 79:1374–1381.
16. Armbruster WS. 1985. Patterns of character divergence and the evolution of reproductive ecotypes of *Dalechampia scandens* (Euphorbiaceae). *Evolution*, 39:733–752.
17. Armbruster WS. 1997. Exaptations link the evolution of plant-herbivore and plant-pollinator interactions: a phylogenetic inquiry. *Ecology*, 78:1661–1674.
18. Armbruster WS. 2006. Evolutionary and ecological perspectives on specialization: from the arctic to the tropics. In: Waser N, Ollerton J (eds), *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*. University of Chicago Press, Chicago: 260–282.
19. Asker SE, Jerling L. 1992. *Apomixis in Plants*, CRC Press Inc Boca-Raton, Florida, USA.
20. Attala NC, Machado SR. 2003. Anatomy and ultrastructure of *Banisteriopsis variabilis* gates (Malpighiaceae) calyx glands. *Acta Microscopica*, 12: 635–636.
21. Bajracharya DM, Shrestha KK. 2004. Two new records of *Eria* Lindl. (Orchidaceae) for Nepal. *Himalayan Journal of Sciences*, 2: 46-50.

22. Baskin SI, Bliss CA. 1969. Sugar content in extrafloral exudates from orchids. *Phytochemistry*, 8: 1139-1145.
23. Batygina TB, Bragina EA, Vasilyeva VE. 2003. The reproductive system and germination in orchids. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45: 21-34.
24. Beardsell DV, Clements MA, Hutchinson JF, Williams EG. 1986. Pollination of *Diuris maculata* R. Br. (Orchidaceae) by floral mimicry of the native legumes *Daviesia* spp. and *Pultenea scabra* R.Br. *Australian Journal of Botany*, 34: 165-173.
25. Beattie AJ, Turnbull CL, Hough T, Jobson S, Knox B. 1985. The vulnerability of pollen and fungal spores to ant secretions: Evidence and some evolutionary implications. *American Journal of Botany*, 72: 606-614.
26. Beattie AJ, Turnbull CL, Knox B, Williams E. 1984. Ant inhibition of pollen function: A possible reason why ant pollination is rare. *American Journal of Botany*, 71 : 421-426.
27. Bernhardt P, Burns-Balogh P. 1986. Floral mimesis in *Thelymitra nuda* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 151: 187-202.
28. Bittrich V, Amaral CME. 1997. Floral biology of some *Clusia* species from Central Amazonia. *Kew Bulletin*, 52: 617-635.
29. Bittrich V, Amaral MCE, Machado SMF, Marsaioli AJ. 2003. Floral Resin of *Tovomitopsis saldanhae* (Guttiferae) and 7-epi-nemorosone: Structural Revision. *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, 58: 643-648.
30. Blanco MA, Barboza G. 2005. Pseudocopulatory pollination in *Lepanthes* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by fungus gnats. *Annals of Botany*, 95: 763-772.
31. Bolus H. 1913. *Icones orchidearum Austro-Africanarum extra-tropicarum; or figures, with descriptions, of extra-tropical South African orchids*. Wesley & Son, London.

32. Bonatti PM, Sgarbi E, Del Prete C. 2006. Gynostemium micromorphology and pollination in *Epipactis microphylla* (Orchidaceae). *Journal of Plant Research*, 119: 431-437.
33. Borba EL, Semir J. 1999. Temporal variation in pollinarium size after its removal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 217:197-204.
34. Borrell BJ. 2004. Suction feeding in orchid bees (Apidae: Euglossini). *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)* 271, S164–S166.
35. Braga PIS. 1977. Aspectos biológicos das Orchidaceae de uma campina da Amazônia Central. *Acta Amazonica*, 2 (Suppl.): 1–89.
36. Buchmann SL. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 343-369.
37. Buchmann SL. 2004. Aspects of Centridine biology (*Centris* spp.) importance for pollination, and use of *Xylocopa* spp. as greenhouse pollinators of tomatoes and other crops. In: Freitas BM, Pereira JOP (eds), *Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination*. Fortaleza, Federal University of Ceara, Brazil, 203-211.
38. Bulpitt ChJ, Li Y, Bulpitt PF, Wang J. 2007. The use of orchids in Chinese medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 100: 558-563.
39. Bulpitt ChJ. 2005. The uses and misuses of orchids in medicine. *The Quarterly Journal of Medicine*, 98: 625-631.
40. Burns-Balogh P, Funk VA. 1986. A phylogenetic analysis of the Orchidaceae. *Smithsonian Contributions to Botany*, 61: 1-79.
41. Buschini MLT, Wolff LL. 2006. Nesting biology of *Centris (Hemisiella) tarsata* Smith in Southern Brazil (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Brazilian Journal of Biology*, 66: 1091-1101.
42. Buttler KP. 1986. *Leksykon Przyrodniczy - Storczyki. Dziko rosnące gatunki i podgatunki Europy, Północnej Afryki i Bliskiego Wschodu*. Mosaik Verlag GmbH, Munchen.

43. Caissard J-C, Joly C, Bergougnoux V, Hugueneu P, Mauriat M, Baudino S. 2004. Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants. *Recent Research Developments in Cell Biology*, 2: 1-15.
44. Calder DM, Slater AT. 1985. The stigma of *Dendrobium speciosum* Sm. (Orchidaceae): a new stigma type comprising detached cells within a mucilaginous matrix. *Annals of Botany*, 55: 297-307.
45. 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.
46. Cane JH, Eickwort GC, Wesley FR, Spielholz J. 1983. Foraging, grooming and mate-seeking behaviors of *Macropis nuda* (Hymenoptera, Melittidae) and use of *Lysimachia ciliata* (Primulaceae) oils in larval provisions and cell linings. *American Midland Naturalist*, 110: 257–264.
47. Carmona-Díaz G, García-Franco JG. 2009. Reproductive success in the Mexican rewardless *Oncidium cosymbephorum* (Orchidaceae) facilitated by the oil-rewarding *Malpighia glabra* (Malpighiaceae). *Plant Ecology*, 203:253–261.
48. Carr GF. 2006. The genus *Cycnoches* and its species. *The Orchid Review*, 114: 221-225.
49. Carvalho de PD, Borba EL, Lucchese AM. 2005. Variação no número de glândulas e produção de óleo em flores de *Stigmaphyllon paralias* A. Juss. (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 19: 209-214.
50. Cecot A. 2005. Czas na storczyki? *Hasło Ogrodnicze*, 10. Plantpress Sp. z o.o.
51. Chase MW, Barrett RL, Cameron KM, Freudenstein JV. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: Dixon KM, Kell SP, Barrett RL, Cribb PJ (eds), *Orchid conservation*. Natural History Publications, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.



52. Chase MW, Williams NH, de Faria AD, Neubig KM, Amaral MdCE, Whitten WM. 2009. Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. *Annals of Botany*, 104: 387-402.
53. Chen JT, Chang WC. 2004. TIBA affects the induction of direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium*. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 79: 315-320.
54. Chen TY, Chen JT, Chang WC. 2004. Plant regeneration through direct shoot bud formation from leaf cultures of *Paphiopedilum* orchids. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 76: 11-15.
55. Chiron GR, Oliveira RP, Santos TM, Bellvert F, Bertrand C, van den Berg C. 2009. Phylogeny and evolution of *Baptistonia* (Orchidaceae, Oncidiinae) based on molecular analyses, morphology and floral oil evidences. *Plant Systematics and Evolution*, 281: 35–49.
56. Christensen DE. 1992. Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. *Lindleyana*, 7: 28-33.
57. Ciotek L, Giorgisa P, Benitez-Vieyrab S, Cocucci AA. 2006. First confirmed case of pseudocopulation in terrestrial orchids of South America: Pollination of *Geoblasta pennicillata* (Orchidaceae) by *Campsomeris bistrimacula* (Hymenoptera, Scoliidae). *Flora*, 201: 365–369.
58. Clifford HT, Lavarack PS. 1974. The role of vegetative and reproductive attributes in the classification of the Orchidaceae. *Biological Journal of the Linnean Society*, 6: 97–110.
59. Clifford SC, Owens SJ. 1990. The stigma, style, and ovarian transmitting tract in the Onciidinae (Orchidaceae): morphology, developmental anatomy, and histochemistry. *Botanical Gazette*, 151: 440-451.
60. Cocucci AA, Holgado A, Anton A. 1996. Estudio morfológico y anatómico de los eleóforos pedicelados de *Dinemandra ericoides*, Malpigiácea endémica del desierto de Atacama. *Darwiniana*, 34: 189-192.

61. Cocucci AA, Sérsic A, Roig-Alsina A. 2000. Oil-collecting structures in Tapinotaspidini: their diversity, function and probable origin. *Mitteilungen Muenchner Entomologischen Gesellschaft*, 90: 51-74.
62. Cocucci AA, Vogel. 2001. Oil-producing flowers of *Sisyrinchium* species. (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. *Flora*, 196: 26-46.
63. Cocucci AA. 1991. Pollination biology of *Nierembergia* (Solanaceae). *Plant Systematic and Evolution*, 174: 17-35.
64. Conran JG, Bannister JM, Lee DE. 2009. Earliest orchid macrofossils: Early Miocene *Dendrobium* and *Earina* (Orchidaceae: Epidendroideae) from New Zealand. *American Journal of Botany*, 96: 466-474.
65. Cozzolino S, D'Emérico S, Widmer A. 2004. Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity. *Proceedings Of The Royal Society B - Biological Sciences*, 271: S259-S262.
66. Cozzolino S, Widmer A. 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution*, 20:487–494.
67. Cruden RW, Hermann SM, Peterson S. 1993. Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. In: Elias TS, Bentely A (eds), *The biology of nectaries*. Columbia University Press, New York: 88-125.
68. Cuesta-Rubio O, Velez-Castro H, Frontana-Urbe BA, Cárdenas J. 2001. Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. *Phytochemistry*, 57: 279-283.
69. Currier HB. 1957. Callose substances in plant cells. *American Journal of Botany*, 44: 478-488.
70. Dafni A, Hesse M, Pacini E. 2000. *Pollen and Pollination*. Springer-Verlag, Wien (Special edition of *Plant Systematics and Evolution*).
71. Dafni A, Ivri Y. 1979. Pollination ecology of, and hybridization between, *Orchis coriophora* L. and *O. collina* Sol. Ex Russ. (Orchidaceae) in Israel. *New Phytologist*, 83: 181–187.

72. Dafni A, Ivri Y. 1981a. Floral mimicry between *Orchis israelitica* Baumann and Dafni (Orchidaceae) and *Bellevalia felexuosa* Boiss (Liliaceae). *Oecologia*, 49:229–232.
73. Dafni A, Ivri Y. 1981b. The flower biology of *Cephalanthera longifolia* (Orchidaceae) - pollen imitation and facultative floral mimicry. *Plant Systematics and Evolution*, 137: 229-240.
74. Dafni A, Maués MM. 1998. A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. *Sexual Plant Reproduction*, 11: 177-180.
75. Dafni A. 1983. Pollination of *Orchis caspia* - a nectarless plant which deceives the pollinators of nectariferous species from other plant families. *Journal of Ecology*, 71:467-474.
76. Dafni A. 1984. Mimicry and deception in pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15: 259–278.
77. Damon A, Pérez-Soriano MA. 2005. Interaction between ants and orchids in the Soconusco region, Chiapas, Mexico. *Entomotropica*, 20: 59-65.
78. Dannenbaum Ch, Wolter M, Schill R. 1989. Stigma morphology of the orchids. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 110: 441-460.
79. Darwin C. 1859. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* Facsimile of the 1st edn. Harvard University Press: Cambridge.
80. Darwin C. 1862. *The Various Contrivances by which Orchids are Fertilized by Insects*. John Murray: London.
81. Davies KL, Turner MP. 2004c. Pseudopollen in *Eria* Lindl. Section *Mycaranthes* Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 94: 707–715.
82. Davies KL, Roberts DL, Turner MP. 2002. Pseudopollen and food-hair diversity in *Polystachya* Hook. (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 90:477-484.
83. Davies KL, Stpiczynska M, Gregg A. 2005. Nectar-secreting floral stomata in *Maxillaria anceps* Ames & C. Schweinf. (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 96: 217–227.

84. Davies KL, Stpiczyńska M, Turner MP. 2006. A rudimentary labellar speculum in *Cymbidium lowianum* (Rchb.f.) Rchb.f. and *Cymbidium devonianum* Paxton (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 97:975-984.
85. Davies KL, Stpiczyńska M. 2006. Labellar Micromorphology of Bifrenariinae Dressler (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 98:1215-1231.
86. Davies KL, Stpiczyńska M. 2007. Micromorphology of the labellum and floral spur of *Cryptocentrum* Benth. and *Sepalosaccus* Schltr. (Maxillariinae: Orchidaceae). *Annals of Botany*, 100: 797-805.
87. Davies KL, Stpiczyńska M. 2009. Comparative histology of floral elaiophores in the orchids *Rudolfiella picta* (Schltr.) Hoehne (Maxillariinae *sensu lato*) and *Oncidium ornithorhynchum* H.B.K. (Oncidiinae *sensu lato*). *Annals of Botany*, 104: 221-234.
88. Davies KL, Turner MP, Gregg A. 2003a. Lipoidal labellar secretions in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 91: 439-446.
89. Davies KL, Turner MP, Gregg A. 2003b. Atypical pseudopollen-forming hairs in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 143: 151-158.
90. Davies KL, Turner MP. 2004a. Morphology of floral papillae in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 93: 75-86.
91. Davies KL, Turner MP. 2004b. Pseudopollen in *Dendrobium unicum* Seidenf. (Orchidaceae): reward or deception? *Annals of Botany*, 94: 129-132.
92. Davies KL, Winters C, Turner MP. 2000. Pseudopollen: its structure and development in *Maxillaria* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 85: 887-895.
93. Davies KL, Winters C. 1998. Ultrastructure of the labellar epidermis in selected *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 126: 349-361.
94. Davis AR, Gunning BES. 1992. The modified stomata of the floral nectary of *Vicia faba* L. 1: development, anatomy and ultrastructure. *Protoplasma*, 166: 134-152.

95. de Oliveira CMA, Porto AM, Bittrich IV, Marsaioli AJ. 1999. Two polyisoprenylated benzophenones from the floral resins of three *Clusia* species. *Phytochemistry*, 50: 1073.
96. de Oliveira CMA, Porto AM, Bittrich V, Vencato I, Marsaioli AJ. 1996. Floral resins of *Clusia* spp.: Chemical composition and biological function. *Tetrahedron Letters*, 37: 6427-6430.
97. Delforge P. 2001. *Guide des orchidées d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche-Orient*, 2nd ed. Delachaux et Niestlé S.A., Paris, France.
98. Dentinger BTM, Roy BA, Jenkinson TS, Policha T, Manobanda R. 2008. *Inoculum*, Supplement to *Mycologia*, 59: 28.
99. Dod DD. 1976. *Oncidium henekenii* – bee orchid pollinated by bee. *American Orchid Society Bulletin*, 45: 792-794.
100. Dodson CH, Dressler RL, Hills HG, Adams RM, Williams NH. 1969. Biologically active compounds in orchid fragrances. *Science*, 1: 1243-1249.
101. Dodson CH, Frymire GP. 1961. Natural pollination of orchids. *Missouri Botanical Garden Bulletin*, 49: 133-139.
102. Dodson CH. 1962. The importance of pollination in the evolution of the orchids of tropical America. *American Orchid Society Bulletin*, 31: 525-534, 641-649, 731-735.
103. Dondon R, Marsaioli AJ, Koehler S, Singer R., Amaral MC. 2002. A química das recompensas florais de Maxillarieae (Orchidaceae). 25a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 20-23 de Maio.
104. Dötterl S, Schäffler I. 2007. Flower scent of floral oil-producing *Lysimachia punctata* as attractant for the oil-bee *Macropis fulvipes*. *Journal of Chemical Ecology*, 33:441-445.
105. Dressler R. 1981. *The Orchids – Natural History and Classification*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
106. Dressler RL. 1968. Pollination by euglossine bees. *Evolution*, 22: 202–210.
107. Dressler RL. 1982. Biology of the orchid bees (Euglossini). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 13:373-394.

108. Dressler RL. 1990. The orchids; natural history and classification. London: Harvard University Press.
109. Dressler RL. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Cambridge, Massachusetts: Dioscorides Press.
110. Drobnik J. 2007. Lecznicze storczyki a teoria sygnatur. *Annales Academiae Medicae Silesiensis*, 61: 443-448.
111. Dumri K, Lars J, Gerlach G, Seipold S, Wessjohann L. 2006. 19th Annual Conference of the Section Plant Population Biology of the Ecological Society of Germany, Switzerland and Austria. Plant Population Biology, Germany.
112. Dumri K. 2008. Chemical analyses of non-volatile flower oils and related bee nest cell linings. Doctor dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
113. Dunne N. 2005. The nature of nectar. *Plants & Gardens News*, 20(2).
114. Duthie AV. 1917. On hybrid forms in the genus *Satyrium*, with descriptions of two new forms. *Transactions of the Royal Society*, 6: 289-297.
115. Ehlers BK, Olesen JM. 1997. The fruit-wasp route to toxic nectar in *Epipactis* orchids? *Flora*, 192: 223-229.
116. Ehrlich PR, Raven PH. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, 18: 586-608.
117. Ellis AG, Johnson SD. 1999. Do pollinators determine hybridization patterns in sympatric *Satyrium* (Orchidaceae) species? *Plant Systematics and Evolution*, 219:137-150.
118. Eltz T, Sager A, Lunau K. 2005. Juggling with volatiles: exposure of perfumes by displaying male orchid bees. *Journal of Comparative Physiology A*, 191: 575-581.
119. Endress PK. 1994. Diversity and Evolutionary Biology of Tropical Flowers. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
120. Erfkamp J. 2009. *Storczyki w mieszkaniu*. Wyd. Delta Agencja.
121. Erhardt A, Baker I. 1990. Pollen amino acids - an additional diet for a nectar feeding butterfly? *Plant Systematics and Evolution*, 169: 111-121.

122. Erhardt A, Rusterholz H. 1997. Effects of elevated CO<sub>2</sub> on flowering phenology and nectar production. *Acta Oecologica*, 18: 249-253.
123. Faegri K, van der Pijl L. 1971. The principles of pollination ecology. Pergamon, Oxford.
124. Fahn A. 2000. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research*, 31: 37-75.
125. Faria RT, Rodrigues FN, Oliveira LVR, Müller C. 2004. *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira*, 22: 780-783.
126. Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson JT. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 35:375–403.
127. Figueiredo ACS, Pais MS. 1992. Ultrastructural aspects of the nectary spur of *Limodorum abortivum* (L) Sw. (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 70: 325-331.
128. Fischer GA, Gravendeel B, Sieder A, Andriantiana J, Heiselmayer P, Cribb PJ, Smidt E de C, Samuel R, Kiehn M. 2007. Evolution of resupination in Malagasy species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45: 358-376.
129. Fisher BL, Sternberg LSL, Price D. 1990. Variation in the use of orchid extrafloral nectar by ants. *Oecologia*, 83:263-266.
130. Fisher BL, Zimmerman JK. 1988. Ant/orchid associations in the Barro Colorado National Monument, Panama. *Lindleyana*, 3: 12-16.
131. Fisher BL. 1992. Facultative ant association benefits a Neotropical orchid. *Journal of Tropical Ecology*, 8: 109-114.
132. Fitch ChM. 2004. *The Best Orchids for Indoors*. Brooklyn Botanic Garden.
133. Flach A, Dondon RC, Singer RB, Koehler S, Amaral MCE, Marsaioli AJ. 2004. The Chemistry of pollination in selected Brazilian Maxillariinae orchids: floral rewards and fragrance. *Journal of Chemical Ecology*, 30: 1045–1056.



134. Fredrikson M. 1991. An embryological study of *Platanthera bifolia* (*Orchidaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 174: 213-220.
135. Galen C, Plowright RC. 1987. Testing the accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. *Canadian Journal of Botany*, 65: 107-111.
136. Galetto L, Bernardello G, Rivera GL. 1997. Nectar, nectaries, flower visitors, and breeding system in five terrestrial *Orchidaceae* from central Argentina. *Journal of Plant Research*, 110: 393-403.
137. Gardener MC, Gillman MP. 2001. The effects of soil fertilizer on amino acids in the floral nectar of corncockle, *Agrostemma githago* (*Caryophyllaceae*). *Oikos*, 92, 101-106.
138. Gardener MC, Gillman MP. 2002. The taste of nectar – a neglected area of pollination ecology. *Oikos*, 98: 552–557.
139. Garside S. 1922. The pollination of *Satyrium bicallosum* Thunb. *Annals of the Bolus Herbarium*, 3: 147–154.
140. Gaskett AC, Winnick CG, Herberstein ME. 2008. Orchid sexual deceit provokes ejaculation. *The American Naturalist*, 171: E206–E212.
141. Giese SOK. 2005. Estudo da composição química dos óleos florais de *Byrsonima brachybotrya* (*Malpighiaceae*). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de Mestre em Química Orgânica. Curitiba.
142. Gimenes M, da Lobão CS. 2006. Ecology, Behavior And Bionomics- A polinização de *Krameria bahiana* B.B. Simpson (*Krameriaceae*) por abelhas (*Apidae*) na Restinga, BA. *Neotropical Entomology*, 35: 440-445.
143. Glauert AM. 1974. Practical methods in electron microscopy. *Strangeways Research Laboratory*, Cambridge.
144. Goede B. 2005. *Storczyki*. Wyd. Bertelsmann Media, Świat Książki.
145. Goss GJ. 1977. The reproductive biology of the epiphytic orchids of Florida. 6. *Polystachya flavescens* (Lindley) J.J. Smith. *American Orchid Society Bulletin*, 46: 990-994.

146. Gumbert A, Kunze J. 2001. Color similarity to rewarding model plants affects pollination in a food deceptive orchid, *Orchis boryi*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 72:419–433.
147. Hamman L. 1999. Fragrance and orchids. LOG seminar.
148. Hammel BE. 1999. Synopsis of *Chrysochlamys* (Clusiaceae: Clusioideae: Clusieae) in Mesoamerica. *Novon*, 9: 360-374.
149. Hermans J, Bosser J. 2003. A new species of *Aeranthes* (Orchidaceae) from the Comoro Islands. *Adansonia*, 25 : 215-217.
150. Heslop-Harrison Y, Shivanna KR. 1977. The receptive surface of the Angiosperm stigma. *Annals of Botany*, 41: 1233-1258.
151. Hirayama K, Ishida K, Tomaru N. 2005. Effects of pollen shortage and self-pollination on seed production of an endangered tree, *Magnolia stellata*. *Annals of Botany*, 95: 1009-1015.
152. Hodges SA, Arnold ML. 1995. Spurring plant diversification: are floral nectar spurs a key innovation? *Proceedings Of The Royal Society B - Biological Sciences*, 262:343-348.
153. Hodges SA. 1997. Floral nectar spurs and diversification. *International Journal of Plant Sciences*, 158: S81-S88.
154. Hoffmann F, Kwak MM. 2005. The vulnerability to pollinator species loss of plant - species with various pollination syndromes and degrees of specialization. In: Hoffmann F (ed), *Biodiversity and pollination - flowering plants and flower-visiting insects in agricultural and semi-natural landscapes*: 102-111.
155. Huber FK, Kaiser R, Sauter W, Schiestl FP. 2005. Floral scent emission and pollinator attraction in two species of *Gymnadenia* (Orchidaceae). *Oecologia*, 142: 564-575.
156. Inoue K. 1986. Experimental studies on male and female reproductive success: effects of variation in spur length and pollinator activity on *P. mandarinorum* ssp. *hachijoensis* (Orchidaceae). *Plant Species Biology*, 1: 207-215.

157. Jaffe K, Pavis C, Vansuyt G, Kermarrec A. 1989. Ants visit extrafloral nectaries of the orchid *Spathoglottis plicata* Blume. *Biotropica*, 21: 278-279.
158. Jakubska A, Kadej M, Przado D, Steininger M. 2005b. Pollination ecology of *Epipactis helleborine* (L.) Crantz (Orchidaceae, Neottieae) in the southwestern Poland. *Acta Botanica Silesiaca*, 2: 131-144.
159. Jakubska A, Przado D, Steininger M, Anioł-Kwiatkowska J, Kadej M. 2005a. Why does pollinators became sluggish? Nectar chemical constituents from *Epipactis helleborine* (L.) Crantz (Orchidaceae). *Applied Ecology & Environmental Research*, 3: 29-38.
160. Jeffrey CE. 1996. Structure and ontogeny of plant cuticles. In: Kerstiens G (ed), *Plant cuticles – an integrated functional approach*, (2): 33-82.
161. Jeffrey DC, Arditti J, Koopowitz A. 1970. Sugar content in floral and extrafloral exudates of orchids: pollination, myrmecology and chemotaxonomy implication. *New Phytologist*, 69: 187-195.
162. Jensen WA. 1962. *Botanical histochemistry*. W. H. Freeman and Co., San Francisco.
163. Jersáková J, Johnson SD, Kindlmann P. 2006. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews*, 81: 219-235.
164. Jersáková J, Johnson SD. 2006. Lack of floral nectar reduces self-pollination in a fly-pollinated orchid. *Oecologia*, 147: 60–68.
165. Jersáková J, Johnson SD. 2007. Protandry promotes male pollination success in a moth-pollinated orchid. *Functional Ecology*, 21: 496-504.
166. Jervis MA, Boggs CL. 2005. Linking nectar amino acids to fitness in female butterflies. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 585-587.
167. Jesus BMV, Garófalo CA. 2000. Nesting behaviour of *Centris* (Heterocentris) analis in southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Apidologie*, 31: 503–515.
168. Johnson SD, Bond WJ. 1992. Habitat dependent pollination success in a Cape orchid. *Oecologia*, 91: 455-456.

169. Johnson SD, Brown M. 2004. Transfer of pollinaria on bird's feet: a new pollination system in orchids. *Plant Systematics and Evolution*, 244: 181–188.
170. Johnson SD, Edwards TJ. 2000. The structure and function of orchid pollinaria. *Plant Systematics and Evolution*, 222: 243-269.
171. Johnson SD, Nilsson LA. 1999. Pollen carryover, geitonogamy and the evolution of deception in orchids. *Ecology*, 80: 2607-2619.
172. Johnson SD, Steiner KE. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution*, 15:140-143.
173. Johnson SD. 1994 Evidence for Batesian mimicry in a butterfly-pollinated orchid. *Biological Journal of the Linnean Society*, 53, 91–104.
174. Johnson SD. 1996. Bird pollination in South African species of *Satyrium* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 203: 91-98.
175. Johnson SD. 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.
176. Johnson SD. 2005. Specialized pollination by spider-hunting wasps in the African orchid *Disa sankeyi*. *Plant Systematics and Evolution*, 251: 153-160.
177. Jones DL. 1983. The pollination and occurrence of natural hybrids in Australian species of the genus *Dendrobium*. *Proceedings 8<sup>th</sup> Australian Orchid Conference*: 127-131.
178. Jones DL. 1985. The pollination of *Gastrodia sesamoides* R.Br. in southern Victoria. *Victorian Naturalist*, 102: 52–54.
179. Kaiser R. 1993. *The Scent of Orchids: Olfactory and Chemical Investigations*. Elsevier Science Ltd.
180. Kaiser R. 2006. Flowers and fungi use scents to mimic each other. *Science*, 311: 806-807.
181. Kaminski AC, Absy ML. 2006. Bees visitors of three species of *Clusia* (Clusiaceae) flowers in Central Amazonia. *Acta Amazonica*, 36: 259 – 264.
182. Kaźmierczakowa R, Zarzycki K. 2001. *Polska Czerwona Księga Roślin*. Polska Akademia Nauk, Kraków.

183. Kjellsson G, Rasmussen FN. 1987. Does the pollination of *Dendrobium unicum* Seidenf. involve pseudopollen? *Die Orchidee*, 38: 183–187.
184. Knudson L. 1922. Non-symbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, 73: 1-25.
185. Knudson L. 1946. A new nutrient solution for orchid seed germination. *American Orchid Society Bulletin*, 15: 214-17.
186. Kocyan A, Endress PK. 2001. Floral structure and development of *Apostasia* and *Neuwiedia* (Apostasioideae) and their relationships to other Orchidaceae. *International Journal of Plant Sciences*, 162: 847-867.
187. Koopowitz H, Marchant TA. 1998. Postpollination nectar reabsorption in the african epiphyte *Aerangis verdickii* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 85: 508–512.
188. Kostelecka J, Kowalkowska AK, Bohdanowicz J. 2010. Zróżnicowanie atraktantów warżki u storczyków podplemienia Oncidiinae Benth. LV Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego, Warszawa.
189. Kowalkowska A, Margońska HB. 2009. Diversity of labellar micromorphological structures in selected species of Malaxidinae (Orchidales). *Acta Societatis Botanicorum*, 78: 141-150.
190. Kull T, Arditti J. 2002. *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*, VIII. Kluwer/ Springer.
191. Kullenberg B. 1961. Studies in *Ophrys* pollination. *Zoologiska Bidrag fran Uppsala*, 34: 1-340.
192. Kunst L, Samuels AL. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research*, 42: 51-80.
193. Kuo-Huang L-L, KU MSB, Franceschi VR. 2007. Correlations between calcium oxalate crystals and photosynthetic activities in palisade cells of shadeadapted *Peperomia glabella*. *Botanical Studies*, 48: 155-164.
194. la Croix I. 2008. *The New Encyclopedia of Orchids: 1500 Species in Cultivation*. Timber Press.

195. Lee Y-I, Yeung EC, Lee N, Chung M-C. 2008. Embryology of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa*: embryo development. *Botanical Studies*, 49: 139-146.
196. Lehenbach CA, Robertson AW. 2004. Pollination ecology of four epiphytic orchids of New Zealand. *Annals of Botany*, 93: 773-781.
197. Li P, Luo YB, Bernhardt P, Yang XQ, Kou Y. 2006. Deceptive pollination of the Lady's Slipper *Cypripedium tibeticum* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 262: 53–63.
198. Lindley J. 1830-1840. *The Genera and Species of Orchidaceous Plants*. London, Ridgways, Piccadilly.
199. Little KJ, Dieringer G, Romano M. 2005. Pollination ecology, genetic diversity and selection on nectar spur length in *Platanthera lacera* (Orchidaceae). *Plant Species Biology*, 20: 183–190.
200. Little RJ. 1983. A review of floral food deception mimics with comments on floral mutualism. In: Jones CE, Little RJ (eds), *Handbook of experimental pollination biology*. New York: Van Nostrand Reinhold: 294–309.
201. Liu KW, Liu ZJ, Huang L, Li LQ, Chen LJ, Tang GD. 2006. Pollination: self-fertilization strategy in an orchid. *Nature*, 441: 945-946.
202. Lokvam J, Braddock JF. 1999. Anti-bacterial function in the sexually dimorphic pollinator rewards of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). *Oecologia*, 119: 534-540.
203. Lopes AV, Machado IC. 1998. Floral biology and reproductive ecology of *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) in northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 213: 71-90.
204. Lunau K. 1992. Evolutionary aspects of perfume collection in male euglossine bees (Hymenoptera) and of nest deception in bee-pollinated flowers. *Chemoecology*, 3: 65-73.
205. Luyt R, Johnson SD. 2002. Postpollination nectar reabsorption and its implications for fruit quality in an epiphytic orchid. *Biotropica*, 34: 442-446.
206. Machado IC. 2004. Oil-collecting bees and related plants: a review of the studies in the last twenty years and case histories of plants occurring in NE

- Brazil. In: Freitas B, Pereira JOP (eds), Solitary Bees, Conservation, Rearing and Management for Pollination, Editora Universitária, Fortaleza: 255-280.
207. Macpherson K, Rupp HMR. 1934. The pollination of *Cymbidium iridifolium* Cunn. North Queensland Naturalist, 3: 26.
208. Manning J, Goldblatt P. 2002. The pollination of *Tritoniopsis parviflora* (Iridaceae) by the oil-collecting bee *Rediviva gigas* (Hymenoptera: Melittidae): the first record of oil-secretion in African Iridaceae. South African Journal of Botany, 68: 171-176.
209. Martinez MIF, Griffiths G, Raposo G, Prevost M-Ch. 2004. EMBO/ FEBS Practical Course: Electron Microscopy and Stereology in Cell Biology. Institut Pasteur in collaboration with the Curie Institute, Paris.
210. Matusiewicz J, Stpiczyńska M, Davies KL. 2004. Pseudopollen in the flowers of *Maxillaria lepidota* Lindl. (Orchidaceae). Proceedings of the 53rd Meeting of the Polish Botanical Society, Toruń, pp. 14.
211. Meléndez-Ackerman EJ, Ackerman JD. 2001. Density-dependent variation in breeding system and reproductive success in a terrestrial orchid. Plant Systematics and Evolution, 227: 27-36.
212. Mevi-Schütz J, Erhardt A. 2005. Amino acids in nectar enhance butterfly fecundity: a long-awaited link. The American Naturalist, 165: 411-419.
213. Michel E. 1996. Species seed propagation. Proceedings of the 15th World Orchid Conference. Rio de Janeiro.
214. Michener CD. 1990. Classification of the Apidae (Hymenoptera), The University of Kansas Science Bulletin, 54: 75–164.
215. Michener CD. 2000. The bees of the world. Johns Hopkins Univ. Press. Baltimore and London.
216. Mickeliunas L, Pansarin ER., Sazima M. 2006. Biologia floral, melitofilia e influência de besouros Curculionidae no sucesso reprodutivo de *Grobya amherstiae* Lindl. (Orchidaceae: Cyrtopodiinae). Revista Brasileira de Botânica, 29: 251-258.



217. Mizell RF. 2004. Many plants have extrafloral nectaries helpful to beneficials. Department of Entomology and Nematology, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
218. Molau U. 1988. Flora Neotropica. Scrophulariaceae. Part I. Calceolariaceae. New York Botanical Gardens, New York.
219. Moraes LM, Faria RT, Cuquel FL. 2005. Activated charcoal for in vitro propagation of Brazilian orchids. *Acta Hort. (ISHS)*, 683: 383-390.
220. Muchhala N. 2003. Exploring the boundary between pollination syndromes: bats and hummingbirds as pollinators of *Burmeistera cyclostigmata* and *B. tenuiflora* (Campanulaceae). *Oecologia*, 134: 373-380
221. Muchhala N. 2006. The pollination biology of *Burmeistera* (Campanulaceae): specialization and syndromes. *American Journal of Botany*, 93:1081-1089
222. Naumova TN, Mershchikova I. 1993. Apomixis in Angiosperms: Nucellar and Integumentary Embryony. CRC Press.
223. Neiland MR, Wilcock CC. 1998. Fruit set, nectar reward and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany*, 85: 1657-1671.
224. Neiland MRM, Wilcock CC. 1995. Maximisation of reproductive success by European Orchidaceae under conditions of infrequent pollination. *Protoplasma*, 187: 39-48.
225. Neiland MRM, Wilcock CC. 1999. The presence of heterospecific pollen on stigmas of nectariferous and nectarless orchids and its consequences for their reproductive success. *Protoplasma*, 208: 65–75.
226. Nepi M, Stpiczyńska M. 2008. Do plants dynamically regulate nectar features through sugar sensing? *Plant Signaling & Behavior*, 3: 874-876.
227. Nepi M. 2007. Nectary structure and ultrastructure. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E (eds), *Nectaries and Nectar*. Springer, The Netherlands.

228. Nicolson SW, Fleming PA. 2003. Nectar as food for birds: the physiological consequences of drinking dilute sugar solutions. *Plant Systematics and Evolution*, 238: 139-153.
229. Nilsson LA. 1981. The pollination ecology of *Listera ovata* (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany*, 1: 461–480.
230. Nilsson LA. 1978. Pollination ecology of *Epipactis palustris* (Orchidaceae). *Botaniska Notiser*, 131: 355-368.
231. Nilsson LA. 1983a. Anthecology of *Orchis mascula* (Orchidaceae). *Nordic Journal of Botany*, 3: 157-179.
232. Nilsson LA. 1983b. Mimesis of bellflower (*Campanula*) by the red helleborine orchid *Cephalanthera rubra*. *Nature*, 305: 799-800.
233. Nilsson LA. 1992. Orchid pollination biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 7: 255-259.
234. Nowicka-Falkowska K, Falkowski M. 2005. *Storczyki żywe klejnoty polskiej przyrody*. Towarzystwo Przyrodnicze Bocian. Siedlce.
235. Oszkinis K. 2004. *Storczyki*. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne. Warszawa.
236. Pablo J HG, Ackerman JD. 2003. A naturalized tropical orchid in Puerto Rico behaves as a native. University of Puerto Rico. Rio Piedras.
237. Pabst GFJ, Dungs F. 1977. *Orchidaceae Brasilienses Band II*. Hildesheim: Brücke-Verlag Kurt Schmiersow.
238. Pacek A, Dyduch M, Rudaś M. 2010. Influence of activated charcoal on seed germination and seedling development by asymbiotic method in *Zygostates grandiflora* (Lindl.) Mansf. (Orchidaceae). *Folia Horticulturae*, 22/2: 45-50.
239. Pacini E, Nepi M, Vesprini JL. 2003. Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution*, 238: 7-21.
240. Pacini E, Nepi M. 2007. Nectar production and presentation. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E (eds), *Nectaries and Nectar*. Springer, The Netherlands.

241. Pacini E. 2000. From anther and pollen ripening to pollen presentation. In: Dafni A, Hesse M, Pacini E (eds), Pollen and Pollination. Springer-Verlag, Wien (Special edition of Plant Systematics and Evolution).
242. Pais MS, Chaves das Neves H. 1980. Sugar content of the nectar exudate of *Epipactis atropurpurea*. *Apidologie*, 1: 39-45.
243. Pais MS, Figueiredo ACS. 1994. Floral nectaries from *Limodorum abortivum* (L.) Sw. and *Epipactis atropurpurea* Rafin (Orchidaceae): ultrastructural changes in plastids during the secretory process. *Apidologie*, 25: 615-626.
244. Pais MSS. 1986. Amino acid and sugar content of the nectar exudate from *Limodorum abortivum* (Orchidaceae). Comparison with *Epipactis atropurpurea* nectar composition. *Apidologie*, 17: 125-136.
245. Pansarin LM, Castro M De M, Sazima M. 2009. Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catasetinae, Orchidaceae) and their relation to pollination. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159: 408-415.
246. Pansarin LM, Pansarin ER, Sazima M. 2008. Facultative autogamy in *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae) through a rain-assisted pollination mechanism. *Australian Journal of Botany*, 56: 363-367.
247. Paulus HF, Gack C. 1990. Pollinators as prepollinating isolation factors: evolution and speciation in *Ophrys* (Orchidaceae). *Israel Journal of Botany*, 39: 43-79.
248. Pauw A. 2005. Inversostyly: a new stylar polymorphism in an oil-secreting plant, *Hemimeris racemosa* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, 92: 1878-1886.
249. Pauw A. 2006. Floral syndromes accurately predict pollination by a specialized oil-collecting bee (*Rediviva peringueyi*; Melittidae) in a guild of South African orchids (Coryciinae). *American Journal of Botany*, 93: 917-926.
250. Peakall R, Beattie AJ, James SH. 1987. Pseudocopulation of an orchid by male ants: a test of two hypotheses accounting for the rarity of ant pollination. *Oecologia*, 73: 522-524.

251. Pedersen HA. 1995. Anthecological observations on *Dendrochilum longibracteatum* - a species pollinated by facultatively anthophilous insects. *Lindleyana*, 10: 19-28.
252. Pemberton RW. 2007. Pollination of *Guarianthe skinneri*, an ornamental food deception orchid in Southern Florida, by the naturalized orchid bee *Euglossa viridissima*. *Lankesteriana*, 7: 461-468.
253. Pemberton RW. 2008. Pollination of the ornamental orchid *Oncidium sphacelatum* by the naturalized oil-collecting bee (*Centris nitida*) in Florida. *Selbyana*, 29: 87-91.
254. Pereira M, Garófalo CA, Camillo E, Serrano JC. 1999. Nesting biology of *Centris (Hemisiella) vittata* Lepeletier in southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae, Centridini). *Apidologie*, 30:327-338.
255. Petanidou T, Van Laere AJ, Smets E. 1996. Change in floral nectar components from fresh to senescent flowers of *Capparis spinosa* (Capparidaceae), a nocturnally flowering Mediterranean shrub. *Plant Systematics and Evolution*, 199: 79-92.
256. Peter GI, Johnson SD. 2006. Anther cap retention prevents self-pollination by elaterid beetles in the South African orchid *Eulophia foliosa*. *Annals of Botany*, 97: 345-355.
257. Pfitzer E. 1889. Orchidaceae. In: Engler A, Prantl P (eds), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. Leipzig, Englemann, II (6): 52-218..
258. Pichersky E, Gershenzon J. 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 237-243.
259. Pohl F. 1935. Zwei *Bulbophyllum* - Arten mit besonders bemerkenswert gebauten Gleit- und Klemfallenblumen. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt*, 53: 501-518.
260. Porto ALM, Machado SMF, de Oliveira CMA, Bittrich V, Amaral MCE, Marsaioli AJ. 2000. Polyisoprenylated benzophenones from *Clusia* floral resins. *Phytochemistry*, 55: 755-768.

261. Pridgeon AM, Stern WL. 1983. Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 70: 1233-1243.
262. Pridgeon AM, Stern WL. 1985. Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). *Botanical Gazette*, 146: 115-123.
263. Proctor HC, Harder LD. 1995. Effect of pollination success on floral longevity in the orchid *Calypso bulbosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 82: 1131-1136
264. Proctor M, Yeo P. 1973. *The pollination of flowers*. Collins, London.
265. Pulpin F. 2005. *Trichocentrum dianthum* (Orchidaceae). *The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens*, 521: 56-62.
266. Pupulin F, Bogarín D. 2005. The genus *Brassia* in Costa Rica: A survey of four species and a new species. *Orchids*, 74 : 202-207.
267. Raman S. 1989. The trichomes on the corolla of the Scrophulariaceae- II: Tribes Hemimeridae and Calceolarieae. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen*, 64: 141-155.
268. Rasmussen CR, Olesen JM. 2000. Oil flowers and oil-collecting bees. *Det Norske Videnskaps-Akademi. I. Matematisk Naturvidenskapelige Klasse, Skrifter, Ny Serie*, 39: 23-31.
269. Rasmussen FN. 1985. Orchids. In: Dahlgren R, Clifford HT, Yeo PF (eds) *The families of the monocotyledons - structure, evolution and taxonomy*. Springer, Berlin: 249-274.
270. Razem FA, Davis AR. 1999. Anatomical and ultrastructural changes of the floral nectary of *Pisum sativum* L. during flower development. *Protoplasma*, 206: 57-72.
271. Reis MG, de Faria AD, Bittrich V, Amaral MCE, Marsaioli AJ. 2000. The chemistry of flower rewards- *Oncidium* (Orchidaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 11: 600-608.
272. Reis MG, de Faria AD, do Amaral MdoCE, Marsaioli AJ. 2003. Oncidinol - a novel diacylglycerol from *Ornithophora radicans* Barb. Rodr. (Orchidaceae) floral oil. *Tetrahedron Letters*, 44: 8519-8523.

273. Reis MG, Pansarim ER, da Silva UF, Amaral MCE, Marsaioli AJ. 2004. Pollinator attraction devices (floral fragrances) of some Brazilian orchids. *Arkivoc*, vi: 103-111.
274. Reis MG, Singer RB, Goncalves R, Marsaioli AJ. 2006. The chemical composition of *Phymatidium delicatulum* and *P. tillandsioides* (Orchidaceae) floral oils. *Natural Product Communications*, 1: 757-761.
275. Reis MG. 2005. Caracteres químicos em estudos de filogenia e biologia de polinização de espécies de Oncidiinae (Orchidaceae). Tese de Doutorado. Universidad Estadual de Campinas.
276. Renner S. 1989. A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecyclaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 76: 496-518.
277. Rico-Gray V, Barber JT, Thien LB, Ellgaard EG, Toney JJ. 1989. An unusual animal - plant interaction: feeding of *Schomburgkia tibicinis* (Orchidaceae) by ants. *American Journal of Botany*, 76: 603-608.
278. Rico-Gray V, Thien LB. 1989. Effect of different ant species on reproductive fitness of *Schomburgkia tibicinis* (Orchidaceae). *Oecologia*, 81: 487-489.
279. Robertson JL, Wyatt R. 1990. Evidence for pollination ecotype in the yellow-fringed orchid, *Platanthera ciliaris*. *Evolution*, 1: 121-133.
280. Romero GA, Nelson CE. 1986. Sexual dimorphism in *Catasetum* orchids: Forcible pollen emplacement and male flower competition. *Science*, 232: 1538-1540.
281. Roubik DW. 1989 Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge University Press.
282. Roubik DW. 2000. Deceptive orchids with Meliponini as pollinators. *Plant Systematics and Evolution*, 222: 271-279.
283. Roy BA, Widmer A. 1999. Floral mimicry: a fascinating yet poorly understood phenomenon. *Trends in Plant Sciences*, 4: 325-330.

284. Rutkowski P. 1998. Klasyfikacja rzędu Orchidales w świetle analizy fenetycznej. Rozprawa doktorska. Katedra Taksonomii Roślin i Ochrony Przyrody, Uniwersytet Gdański.
285. Sakagami SF, Inoue J, Yamane S, Salmanah S. 1989. Nests of the myrmecophilous stingless bee *Trigona moorei*: how do bees initiate their nest within and arboreal ant nest? *Biotropica*, 21: 256-274.
286. Sargent RD. 2004. Floral symmetry affects speciation rates in angiosperms. *Proceedings Of The Royal Society B - Biological Sciences*, 271: 603-608
287. Schiestl FP, Ayasse M, Paulus HF, Löfstedt C, Hansson BS, Ibarra F, Francke W. 1999. Orchid pollination by sexual swindle. *Nature*, 399: 421-422.
288. Schiestl FP, Ayasse M, Paulus HF, Loöfstedt C, Hansson BS, Ibarra F, Francke W. 2000. Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception. *Journal of Comparative Physiology A*, 186: 567-574.
289. Schiestl FP. 2004. Floral evolution and pollinator mate choice in a sexually deceptive Orchid. *Journal of Evolutionary Biology*, 17: 67-75.
290. Schlechter R. 1926. Das System der Orchidaceen. *Notizblatt Bot. Gart. Mus. Berlin-Dahlem*, 9: 563-591.
291. Schmid R. 1988. Reproductive versus extra-reproductive nectaries – historical perspective and terminological recommendations. *The Botanical Review*, 54:179-232.
292. Sharp PC. 2004. *Platanthera ciliaris* (L.) Lindl. (Yellow-fringed Orchis) conservation and research plan for New England. New England Wild Flower Society, Framingham, Massachusetts, USA.
293. Shi J, Luo YB, Bernhardt P, Ran JC, Liu ZJ, Zhou Q. 2009. Pollination by deceit in *Paphiopedilum barbigerum* (Orchidaceae): a staminode exploits the innate colour preferences of hoverflies (Syrphidae). *Plant Biology*, 11: 17-28.
294. Sigrist MR, Sazima M. 2004. Pollination and Reproductive Biology of Twelve Species of Neotropical Malpighiaceae: Stigma Morphology and its Implications for the Breeding System. *Annals of Botany*, 94: 33-41.



295. Silva-Pereira V, de Camargo Smidt E, Leite Borba E. 2007. Isolation mechanisms between two sympatric *Sophronitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 269: 171-182.
296. Silvera K. 2002. Adaptive Radiation of Oil-reward Compound Among Neotropical Orchid Species (Oncidiinae). Master Thesis, University of Florida.
297. Simpson BB, Neff JL, Seigler D. 1977. *Krameria*, free fatty acids and oil collecting bees. *Nature*, 267: 150-151.
298. Simpson BB, Neff JL. 1981. Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 68: 301-322.
299. Singer RB, Cocucci AA. 1999a. Pollination mechanism in southern Brazilian orchids which are exclusively or mainly pollinated by halictid bees. *Plant Systematics and Evolution*, 217: 101-117.
300. Singer RB, Cocucci AA. 1999b. Pollination mechanisms in four sympatric southern Brazilian Epidendroideae orchids. *Lindleyana*, 14: 47-56.
301. Singer RB, Flach A, Koehler S, Marsaioli AJ, Amaral MC. 2004. Sexual mimicry in *Mormolyca ringens* (Lindl.) Schltr. (Orchidaceae: Maxillariinae). *Annals of Botany*, 93: 755-762.
302. Singer RB, Koehler S. 2003. Notes on the pollination biology of *Notylia nemorosa* (Orchidaceae): do pollinators necessarily promote cross pollination? *Journal of Plant Research*, 116: 19-25.
303. Singer RB, Koehler S. 2004. Pollinarium morphology and floral rewards in Brazilian Maxillariinae (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 93: 39-51.
304. Singer RB, Marsaioli AJ, Flach A, Reis MG. 2006. The ecology and chemistry of pollination in Brazilian orchids: recent advances. In: Teixeira da Silva JA (ed), *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*. Global Science Books, vol. IV.

305. Singer RB, Sazima M. 1999. The pollination mechanism in the '*Pelexia* alliance' (Orchidaceae: Spiranthinae). *Botanical Journal of Linnean Society*, 131: 249-262.
306. Singer RB, Sazima M. 2000. The pollination of *Stenorrhynchos lanceolatus* (Aublet) L. C. Rich. (Orchidaceae: Spiranthinae) by hummingbirds in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 223: 221-227.
307. Singer RB, Sazima M. 2001a. Flower morphology and pollination mechanism in three sympatric Goodyerinae orchids from Southern Brazil. *Annals of Botany*, 88: 989-997.
308. Singer RB, Sazima M. 2001b. The pollination mechanism of three sympatric *Prescottia* (Orchidaceae: Prescottinae) species in Southeastern Brazil. *Annals of Botany*, 88: 999-1005.
309. Singer RB. 2001. Pollination biology of *Habenaria parviflora* (Orchidaceae: Habenariinae) in Southeastern Brazil. *Darwiniana*, 39: 201-207.
310. Singer RB. 2002a. The pollination mechanism in *Trigonidium obtusum* Lindl (Orchidaceae: Maxillariinae): sexual mimicry and trap-flowers. *Annals of Botany*, 89: 157-163.
311. Singer RB. 2002b. The pollination biology of *Sauroglossum elatum* Lindl. (Orchidaceae: Spiranthinae): moth-pollination and protandry in neotropical Spiranthinae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 138: 9-16 .
312. Singer RB. 2003. Orchid pollination: recent developments from Brazil. *Lankesteriana*, 7: 111-114.
313. Singer RB. 2004. Orquídeas brasileiras e abelhas. [www.webbee.org.br](http://www.webbee.org.br)
314. Singh MK, Sherpa AR, Hallan V, Zaidi AA. 2007. A potyvirus in *Cymbidium* spp. in northern India. *Australasian Plant Disease Notes*, 2: 11-13.
315. Slater AT, Calder DM. 1990. Fine structure of the wet. Detached cell stigma of the orchid *Dendrobium speciosum* Sm. *Sex Plant Reprod*, 3: 61-69.
316. Smith CI, Pellmyr O, Althoff DM, Balcazar-Lara M, Leebens-Mack J, Segraves KA. 2008. Pattern and timing of diversification in *Yucca*

- (Agavaceae): specialized pollination does not escalate rates of diversification. *Proceedings Of The Royal Society B - Biological Sciences*, 275: 249-258
317. Smith GR, Snow GE. 1990. Pollination ecology of *Platanthera (Habenaria) Ciliaris* and *P. blephariglottis* (Orchidaceae). *Evolution*, 44: 121-133.
318. Smith SA, Beaulieu JM, Donoghue MJ. 2010. An uncorrelated relaxed-clock analysis suggests an earlier origin for flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 5897-5902.
319. Solano Gomez R. 2005. *Masdevallia floribunda*: variation in a Mexican and Central American orchid. *Orchids*, 74: 760-763.
320. Sood SK, Rao PRM. 1986. Gametophytes, embryogeny and pericarp of *Microstylis wallichii* Lindl. (Orchidaceae). *Journal of Plant Research*, 99: 351-359.
321. Soontornchainaksaeng P, Chaicharoen S, Sirijuntarut M, Kruatrachue M. 2001. *In vitro* studies on the effect of light intensity on plant growth of *Phaius tankervilleae* (Banks ex L' Herit.) Bl. and *Vanda coerulea* Griff. *ScienceAsia*, 27: 233-237.
322. Starck Z. 2003. Transport i dystrybucja substancji pokarmowych w roślinach. Wydawnictwo SGGW.
323. Steer MW. 1981. *Understanding cell structure*. Cambridge University Press, London.
324. Steiner KE, Whitehead VB. 1988. The association between oil-producing flowers and oil-collecting bees in the Drakensberg of Southern Africa. *Monographs in Systematic Botany of the Missouri Botanical Garden*, 25: 259-277.
325. Steiner KE, Whitehead VB. 1990. Pollinator adaptation to oil-secreting flowers—*Rediviva* and *Diascia*. *Evolution*, 44:1701-07.
326. Steiner KE, Whitehead VB. 1991a. Oil flowers and oil bees: further evidence for pollinator adaptation. *Evolution*, 45: 1493-1501.

327. Steiner KE, Whitehead VB. 1991b. The pollination of *Bowkeria* and *Anastrabe* by oil-collecting bees. Abstract from Seventeenth Annual Congress of the South African Association of Botanists, Pietermaritzburg, South Africa.
328. Steiner KE, Whitehead VB. 1996. The consequence of specialization for pollination in a rare South African shrub, *Ixianthes retzioides* (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 201: 131-138.
329. Steiner KE, Whitehead VB. 2002. Oil secretion and pollination of *Colpias mollis* (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 235: 53-66.
330. Steiner KE. 1985. The role of nectar and oil in the pollination of *Drymonia serrulata* (Gesneriaceae) by *Epicharis* bees (Anthophoridae) in Panama. *Biotropica*, 17: 217-229.
331. Steiner KE. 1989. The pollination of *Disperis* (Orchidaceae) by oil-collecting bees in southern Africa. *Lindleyana*, 4: 164–183.
332. Steiner KE. 1993. Oil orchids and oil bees in southern Africa – *Disperis* and *Rediviva*. *South African Orchid Journal*, 42: 2–5.
333. Steiner KE. 1998. The evolution of beetle pollination in a South African orchid. *American Journal of Botany*, 85: 1180-1193.
334. Steiner KE, Whitehead VB, Johnson SD. 1994. Floral and pollinator divergence in two sexually deceptive South African orchids. *American Journal of Botany*, 81: 185-194.
335. Stern WL, Curry KJ, Pridgeon AM. 1987. Osmophores of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 74: 1323-1331.
336. Stern WL, Judd WS, Carlsward BS. 2004. Systematic and comparative anatomy of Maxillarieae (Orchidaceae), *sans* Oncidiinae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 144: 251–274.
337. Stickler MM, Theiss K, Vitt P. 2004. Effects of self versus outcross pollination on pollen tube growth in *Platanthera leucophaea*. Chicago Botanic Garden.
338. Stökl J. 2007. Pollinator driven radiation in sexually deceptive orchids of the genus *Ophrys*. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Österreich.

339. Stone GN, Willmer P, Rowe JA. 1998. Partitioning of pollinators during flowering in an African Acacia community. *Ecology*, 79: 2808-2827
340. Stoutamire W.P. 1983. Wasp-pollinated species of *Caladenia* (Orchidaceae) in South-western Australia. *Australian Journal of Botany*, 31: 383-94.
341. Stpiczyńska M, Davies KL, Gregg A. 2003. Nectary structure and nectar secretion in *Maxillaria coccinea* (Jacq.) L.O. Williams ex Hodge (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 93: 87-95.
342. Stpiczyńska M, Davies KL, Gregg A. 2005a. Comparative account of nectary structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 95: 749-56.
343. Stpiczyńska M, Davies KL, Gregg A. 2007. Elaiophore diversity in the three members of Oncidiinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 155: 135-148.
344. Stpiczyńska M, Davies KL. 2006. Nectary structure in *Symphyglossum sanguineum* (Rchb.f.) Schltr. (Orchidaceae). *Acta Agrobotanica*, 56: 7-16.
345. Stpiczyńska M, Davies KL. 2008. Elaiophore structure and oil secretion in flowers of *Oncidium trulliferum* Lindl. and *Ornitophora radicans* (Rchb.f) Garay & Pabst (Oncidiinae: Orchidaceae). *Annals of Botany*, 101: 375-384.
346. Stpiczyńska M, Milanesi C, Faleri C, Cresti M. 2005b. Ultrastructure of the nectary spur of *Platanthera chlorantha* (Custer) Rchb. (Orchidaceae) during successive stages of nectar secretion. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47: 111–119.
347. Stpiczyńska M, Pielecki J. 2002. Sekrecja, resorbcja i skład chemiczny nektaru podkolana zielonawego *Platanthera chlorantha* (Custer). Rchb. (Orchidaceae). *Annales UMCS, Sec. EEE*, 10: 173-179.
348. Stpiczyńska M. 1993. Anatomy and ultrastructure of osmophores of *Cymbidium tracyanum* Rolfe (Orchidaceae). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 62: 5-9.
349. Stpiczyńska M. 1997. The structure of nektary of *Platanthera bifolia* L. (Orchidaceae), *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 66: 5-11.

350. Stpiczyńska M. 2003a. Stigma receptivity during the life span of *Platanthera chlorantha* (Rchb.) flowers. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45: 37-41.
351. Stpiczyńska M. 2003b. Stigma receptivity in *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (Orchidaceae) during anthesis. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin - Polonia*, 13: 9-16.
352. Stpiczyńska M. 2003c. Nectar resorption in the spur of *Platanthera chlorantha* Custer (Rchb.) Orchidaceae – structural and microautoradiographic study. *Plant Systematics and Evolution*, 238: 119-126.
353. Stpiczyńska M. 2004. Rola nektaru w kwiatach podkolanu zielonawego *Platanthera chlorantha* (Custer) Rchb. (Orchidaceae). *Rozprawy naukowe Akademii Rolniczej w Lublinie*, zeszyt 286.
354. Stpiczyńska M, Matusiewicz J. 2001. Anatomy and ultrastructure of spur nectary of *Gymnadenia conopsea* (L.) Orchidaceae. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 70: 267-272.
355. Sugiura N, Goubara M, Kitamura K, Inoue K. 2002. Bumblebee pollination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae): a possible case of floral mimicry of *Pedicularis schistostegia* (Orobanchiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 235: 189-195.
356. Sugiura N. 1996. Pollination of the orchid *Epipactis thunbergii* by syrphid flies (Diptera: Syrphidae). *Ecological Research*, 11: 249-255.
357. Sun M. 1997. Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems. *American Journal of Botany*, 84: 224–232.
358. Sundberg MD. 1992. An Introduction to Stereological Analysis: Morphometric Techniques for Beginning Biologists. In: Goldman CA, Andrews SE, Hauta PL, Ketchum R (eds), *Tested Studies for Laboratory Teaching. Proceedings of the 6th Workshop Conference of the Association for Biology Laboratory Education*, Toronto.
359. Szlachetko DL. 1995. *Systema Orchidarium. Fragmenta floristica et geobotanica*, 3: 1-152.



360. Szlachetko DL, Skakuj M. 1996. *Storczyki Polski*. Wydawnictwo Sorus, Poznań.
361. Tan K-H, Nishida R, Toong Y-C. 2002. Floral synomone of a wild orchid, *Bulbophyllum cheiri*, lures *Bactrocera* fruit flies for pollination. *Journal of Chemical Ecology*, 28: 1161-1172.
362. Tan K-H, Nishida R. 2000. Mutual reproductive benefits between a wild orchid, *Bulbophyllum patens*, and *Bactrocera* fruit flies via a floral synomone. *Journal of Chemical Ecology*, 26: 533- 546.
363. Tan K-H, Nishida R. 2005. Synomone or kairomone? – *Bulbophyllum apertum* flower releases raspberry ketone to attract *Bactrocera* fruit flies. *Journal of Chemical Ecology*, 31: 497-507.
364. Teixeira LAG, Machado IC. 2000. Sistema de polinização e reprodução de *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 14: 347-357.
365. Teixeira S de P, Borba EL, Semir J. 2004. Lip anatomy and its implications for the pollination mechanisms of *Bulbophyllum* species (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 93: 499-505.
366. Terrab A, García-Castaño JL, Romero JM, Berjano R, De Vega C, Talavera S. 2007. Analysis of amino acids in nectar from *Silene colorata* Poiret (Caryophyllaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 155: 49-56.
367. Thien LB, Marcks BG. 1972. The floral biology of *Arethusa bulbosa*, *Calopogon tuberosus* and *Pogonia ophioglossoides*. *Canadian Journal of Botany*, 50: 2319-2325.
368. Thien LB. 1969. Mosquito pollination of *Habenaria obtusata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 56: 232-237.
369. Toscano de Brito AVL. 2001. Systematic review of the *Ornithocephalus* group (Oncidiinae; Orchidaceae) with comments on *Hofmeisterella*. *Lindleyana* 16: 157-217.
370. Tuong HL, Tanaka M. 2004. Callus induction from protocorm-like body segments and plant regeneration in *Cymbidium* (Orchidaceae). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79: 406-410.



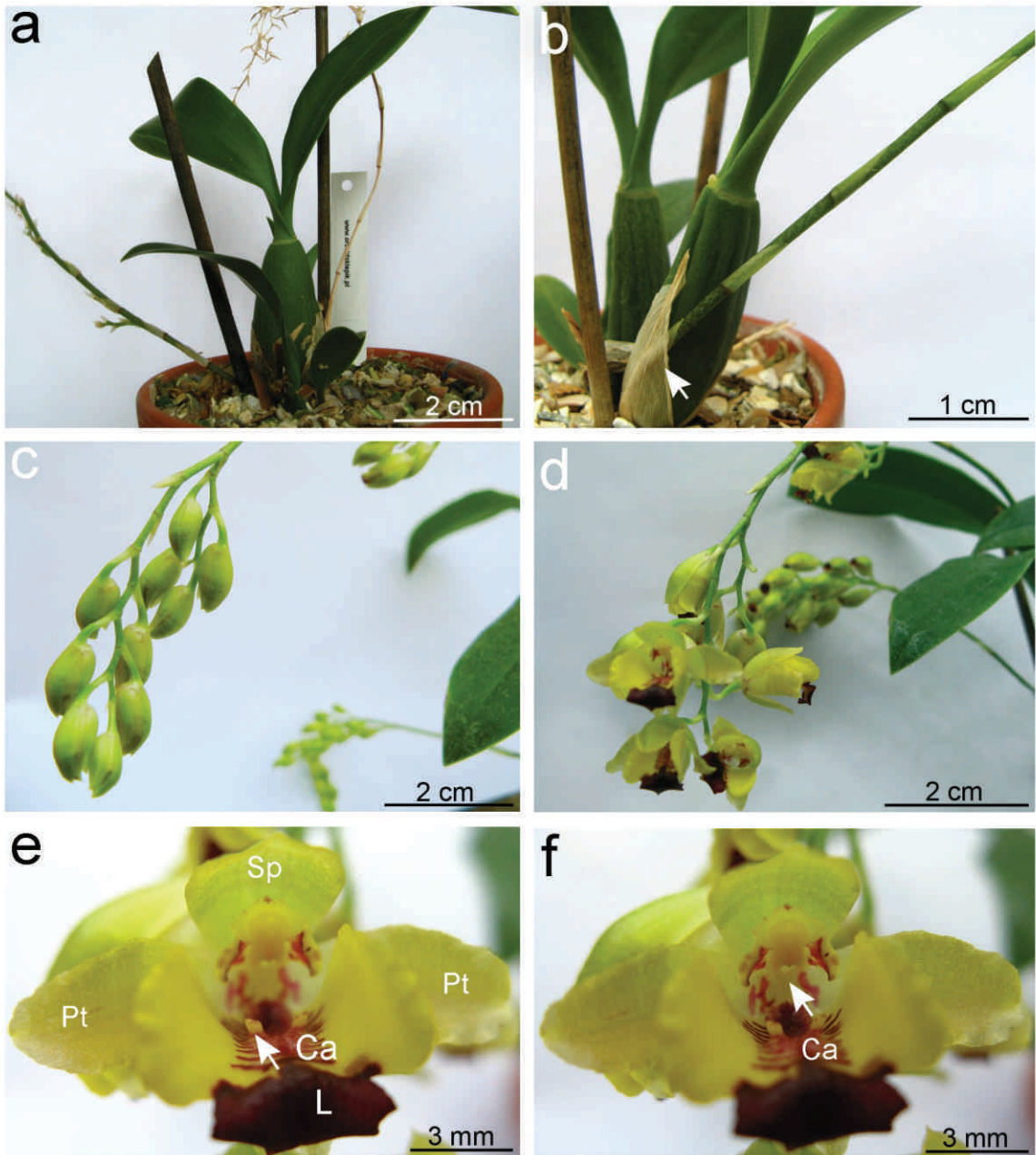
371. Ueda H, Torikata H. 1970. Organogenesis in the meristem cultures of cymbidiums. VI. Effects of light and culture medium on adventitious root formation. Japanese Society for Horticultural Science, 39: 73-78.
372. Vallius E. 2000. Position-dependent reproductive success of flowers in *Dactylorhiza maculata* (Orchidaceae). Functional Ecology, 14: 573-579.
373. Vallius E. 2001. Factors affecting fruit and seed production in *Dactylorhiza maculata* (Orchidaceae). Botanical Journal of the Linnean Society, 135: 89-95.
374. van der Cingel NA. 2001. An atlas of orchid pollination: America, Africa, Asia and Australia. Rotterdam: AA. Balkema.
375. van der Pijl L, Dodson C.H. 1969. Orchid flowers: their pollination and evolution. Coral Gables, Florida: University of Miami Press.
376. van der Pijl L, Dodson CH. 1966. Orchids flowers, their pollination and evolution. University of Miami Press, Edison, New Jersey, USA.
377. van Doorn WG. 1997. Effects of pollination on floral attraction and longevity. Journal of Experimental Botany, 48: 1615-1622.
378. Vesprini JL, Nepi M, Pacini E. 1999. Nectary structure, nectar secretion patterns and nectar composition in two *Helleborus* Species. Plant Biology, 1: 560-568.
379. Veyret Y. 1974. Development of the embryo and the young seedling stages of orchids. In: Withner C (ed), The Orchids: Scientific Studies: 223-265.
380. Vinson SB, Frankie GW, Williams HJ. 1996. Chemical ecology of bees of the genus *Centris* (Hymenoptera: Apidae). Florida Entomologist, 79:109-129.
381. Vinson SB, Williams HJ, Frankie GW, Shrum G. 1997. floral lipid chemistry of *Byrsonima crassifolia* (Malpigheaceae) and a use of floral lipids by *Centris* bees (Hymenoptera: Apidae). Biotropica, 29: 76-83.
382. Vogel S, Machado ICS. 1991. Pollination of four sympatric species of *Angelonia* (Scrophulariaceae), by oil-collecting bees of NE Brazil. Plant Systematics and Evolution, 178:153-178.
383. Vogel S. 1969. Flowers offering fatty oil instead of nectar. XI International Botanical Congress. Abstracts (Seattle): 229.

384. Vogel S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Tropische und Subtropische Pflanzenwelt*, 7: 1-267.
385. Vogel S. 1990a. History of the Malpighiaceae in the light of pollen ecology. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 55: 130-142.
386. Vogel S. 1990b. The role of scent glands in pollination. 1st edn. Smithsonian Institution, Washington, D.C, USA.
387. Vogel S. 1993. Betrug bei Pflanzen: die Täuschblumen. *Abhandlungen der Akademie der Wissenschaften und Literatur Mainz, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse*, 1: 1–48.
388. von Kirchner O. 1925. Über die sogenannten Pollenblumen und die Ausbeutestoffe der Blüten. *Flora*, 118/119: 312–330.
389. Wang PJ, Huang LC. 1976. Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 12: 260-262.
390. Wang YT. 2004. Flourishing market for potted orchids. *Flower Tech*, 7: 14-17.
391. Warren R. 1999. *Equatorial Plants Newsletter*, 16 (1).
392. Waser NM, Chittka L, Price M, Williams N, Ollerton J. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, 77: 1043–1060.
393. Weislo WT, Cane JH. 1996. Resource utilization by solitary bees (Hymenoptera: Apoidea), and exploitation of the stored food by their natural enemies. *Annual Review of Entomology*, 41: 257-286.
394. Whitehead VB, Steiner KE. 2001. Oil-collecting bees of the winter rainfall area of South Africa (Melittidae, *Rediviva*). *Annals of the South African Museum*, 108: 143-277.
395. Whitten WM, Williams NH, Chase MW. 2000. Subtribal and generic relationships of Maxillarieae (Orchidaceae) with emphasis on Stanhopeinae: combined molecular evidence. *American Journal of Botany*, 87: 1842-1856.

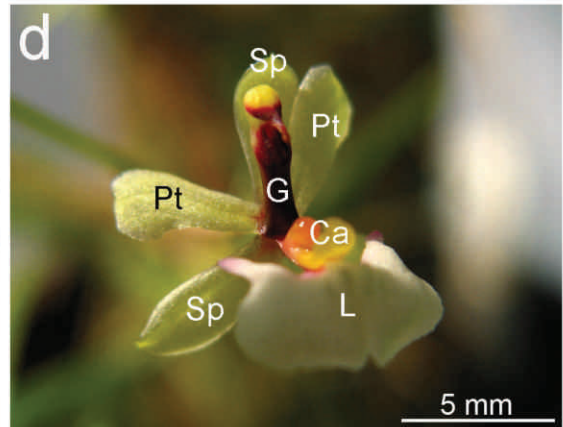
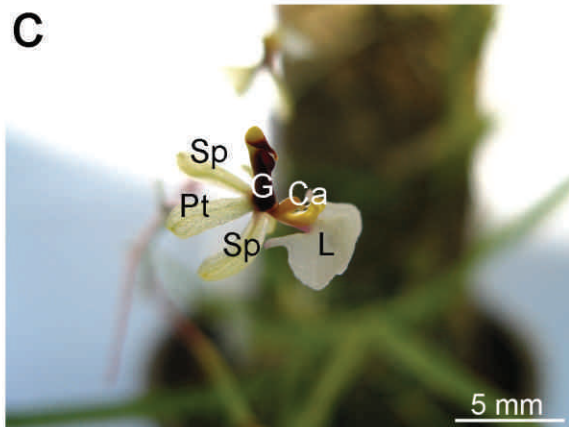
396. Wiemer AP, Moré M, Benitez-Vieyra S, Cocucci AA, Raguso RA, Séršic AN. 2009. A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cyclopogon elatus* (Orchidaceae). *Plant Biology*, 11: 506-514.
397. Williams NH, Chase MW, Fulcher T, Whitten WM. 2001. Molecular systematics of the Oncidiinae based on evidence from four DNA sequence regions: expanded circumscriptions of the *Cyrtochilum*, *Erycina*, *Otoglossum* and *Trichocentrum* and a new genus (Orchidaceae). *Lindleyana*, 16:113-139.
398. Williams NH, Whitten MW. 1983. Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sesquidecade. *Biological Bulletin*, 164: 355-395.
399. Williams NH, Whitten WM. 1983. Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sesquidecade. *The Biological Bulletin*, 164: 355-395.
400. Williams NH, Whitten WM. 2003. Molecular phylogenetics and generic concepts in the Maxillarieae (Orchidaceae). *Lankesteriana*, 7: 61-62.
401. Williams NH. 1982. The biology of orchids and euglossine bees. In: Arditti J (ed), *Orchid Biology: Reviews and Perspectives*. Cornell, University Press, Ithaca, New York: 119–171.
402. Wist TJ, Davis AR. 2006. Floral nectar production and nectary anatomy and ultrastructure of *Echinacea purpurea* (Asteraceae). *Annals of Botany*, 97: 177-193.
403. Wood J. 2005. *Bulbophyllum echinolabium* (Orchidaceae). *The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew*, 516: 32-37.
404. Wotavová-Novotná K, Vejsadová H, Kindlmann P. 2007. Effects of sugars and growth regulators on *in vitro* growth of *Dactylorhiza* species. *Biologia Plantarum*, 51: 198-200.
405. Woźny A, Przybył K. 2004. *Komórki roślinne w warunkach stresu. Tom II. Komórki in vitro*. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.

# **ANEKS NR 1. Fotografie**

Fot. 1

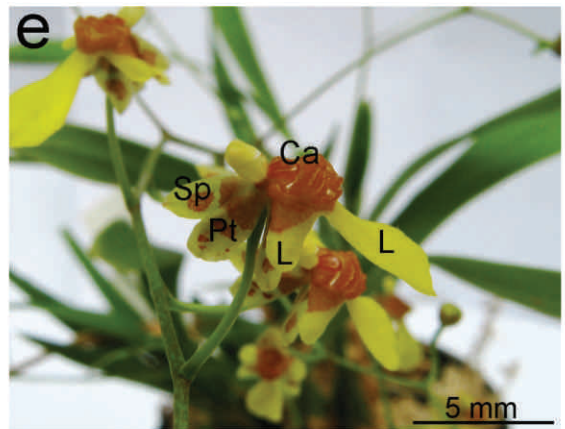
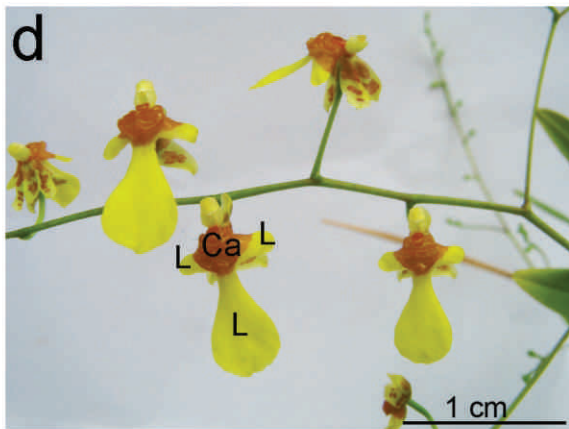
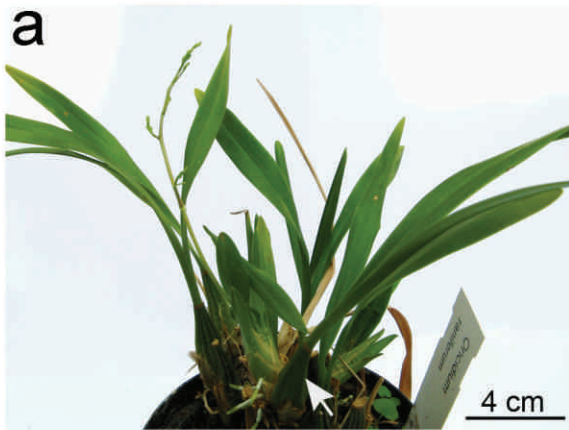


Fot. 2



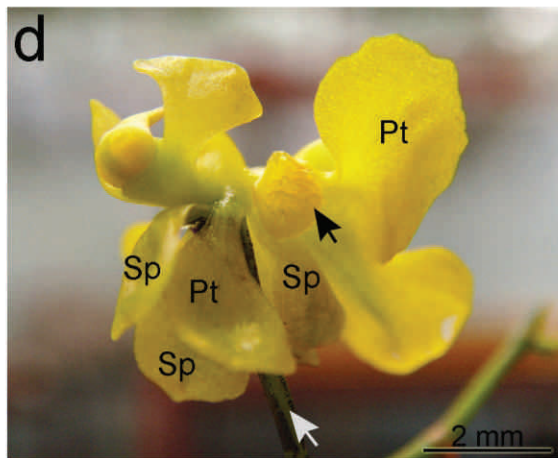
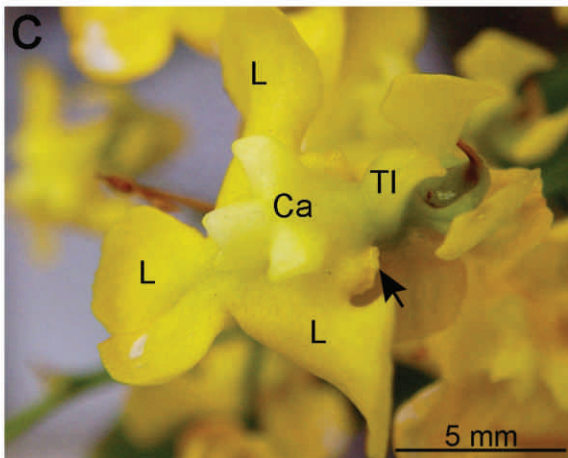


Fot. 3

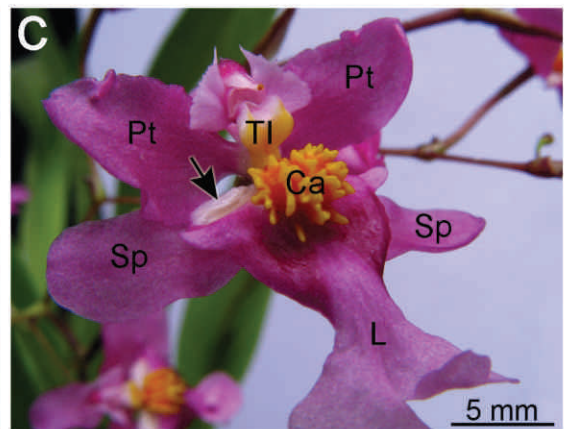




Fot. 4

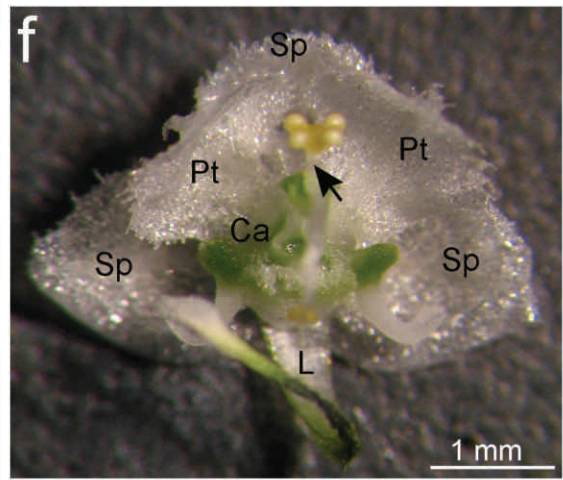
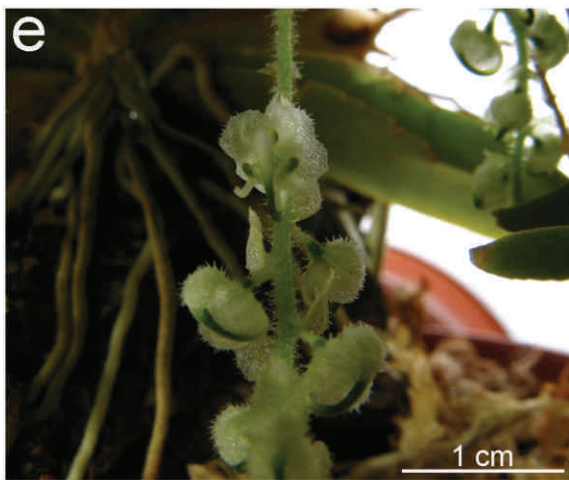
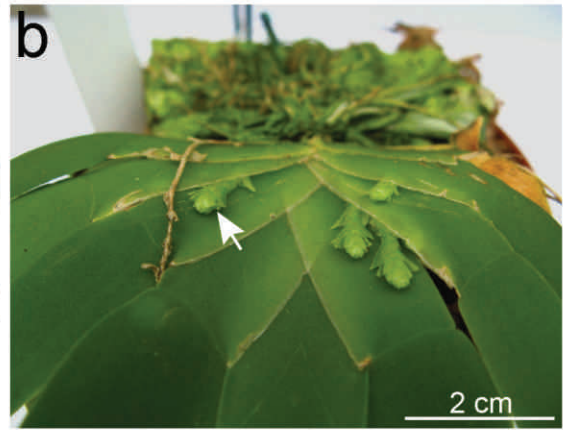


Fot. 5

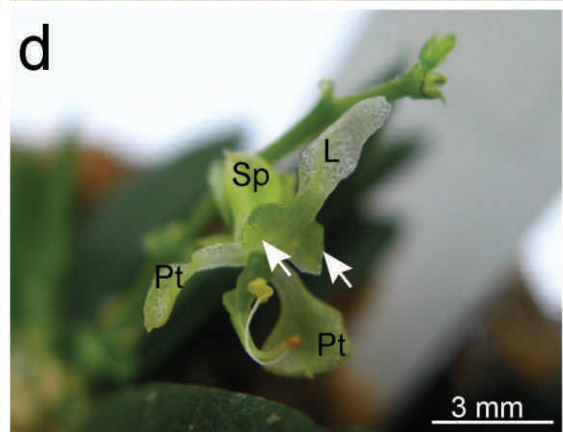




Fot. 6

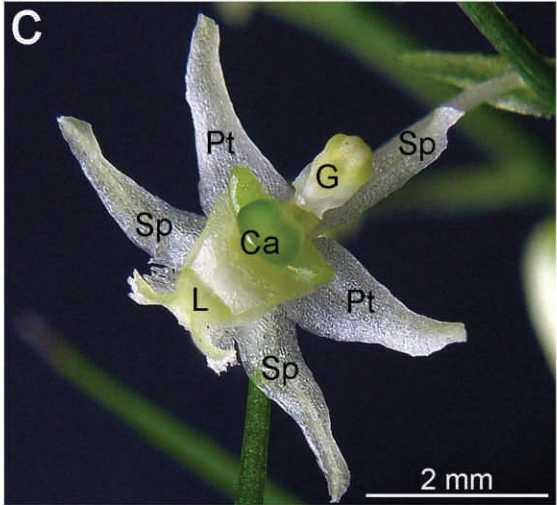
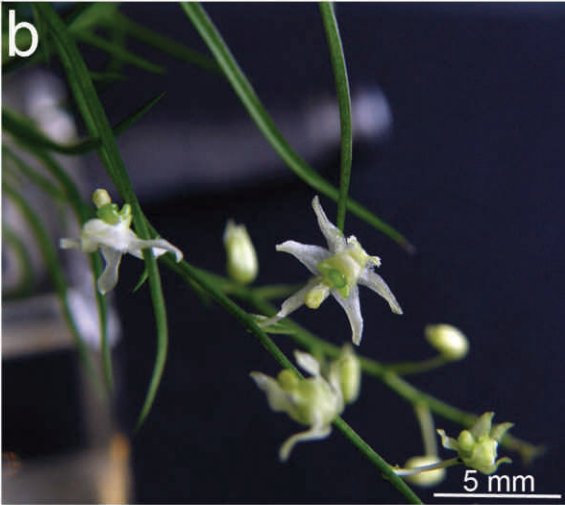


Fot. 7

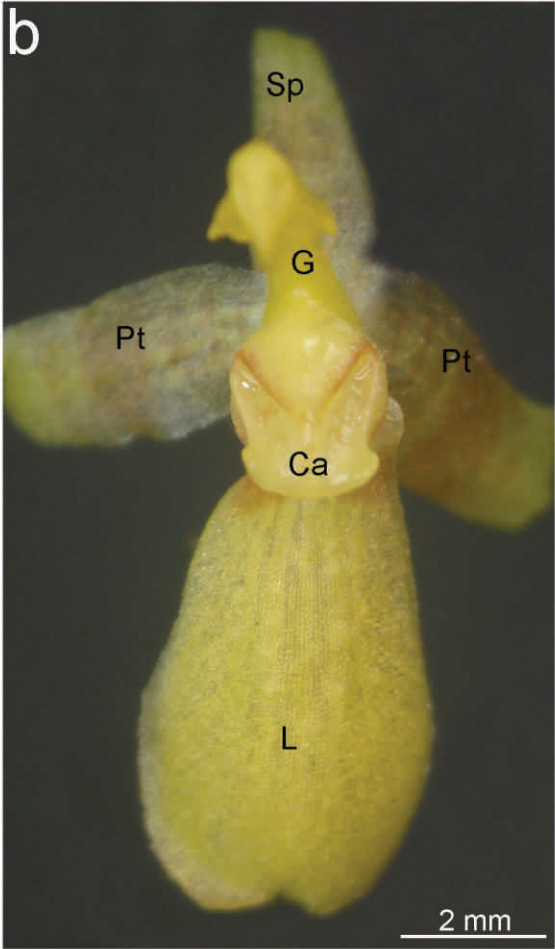




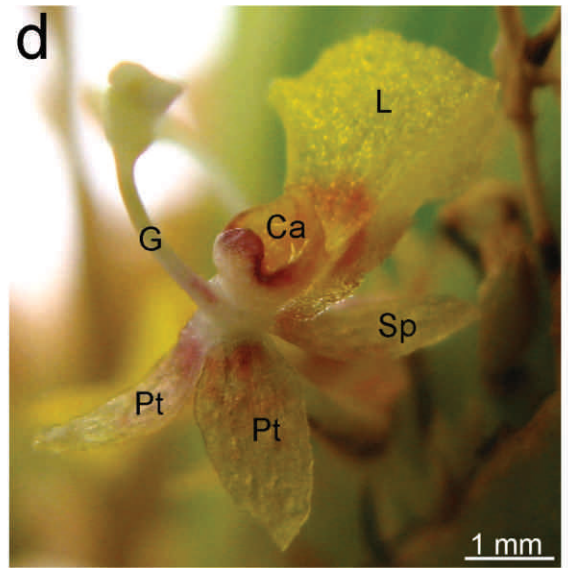
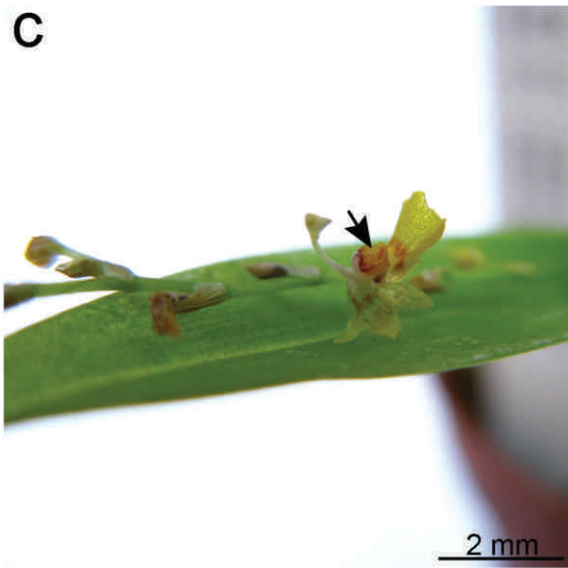
Fot. 8



Fot. 9

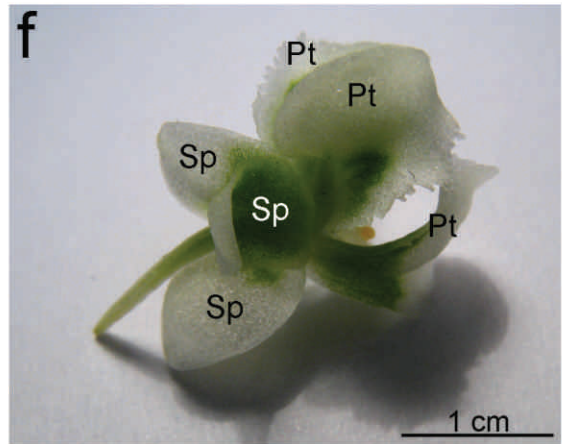
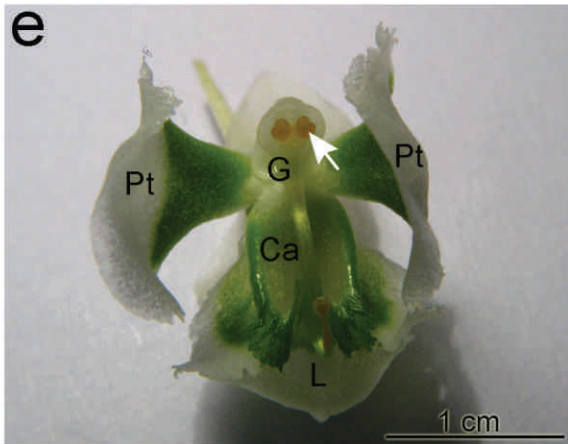
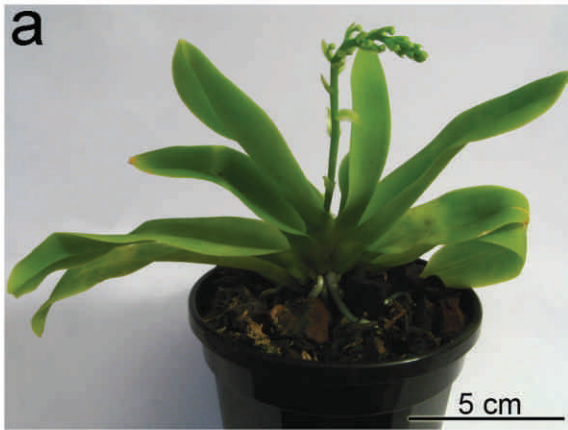


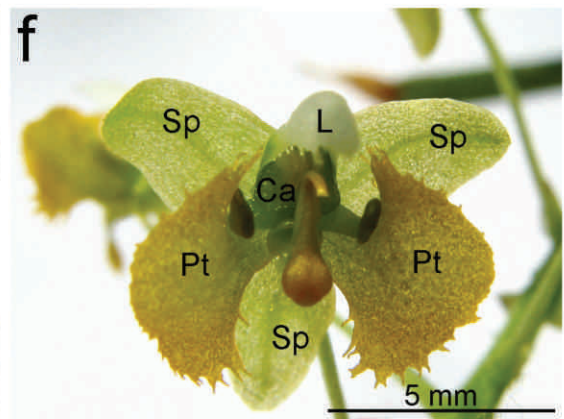
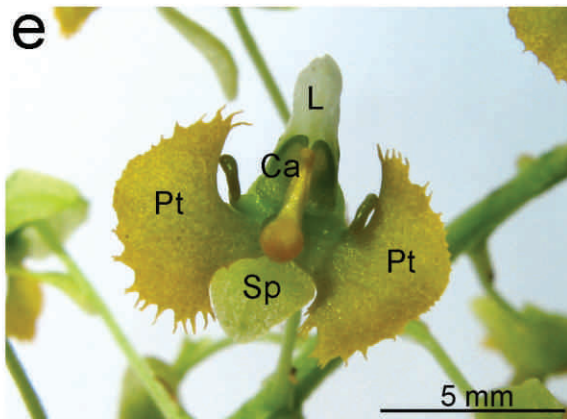
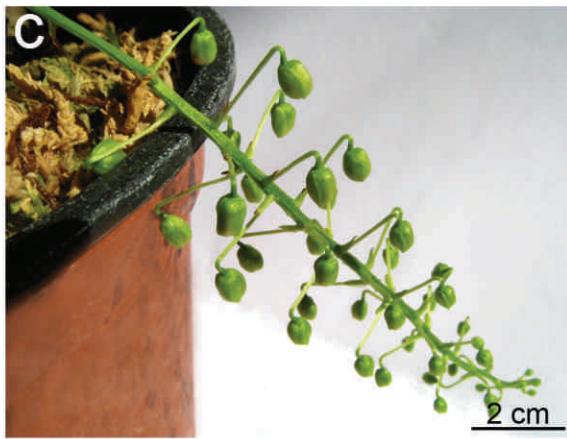
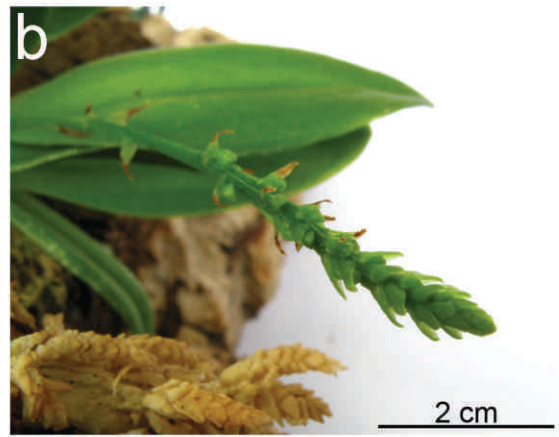
Fot. 10





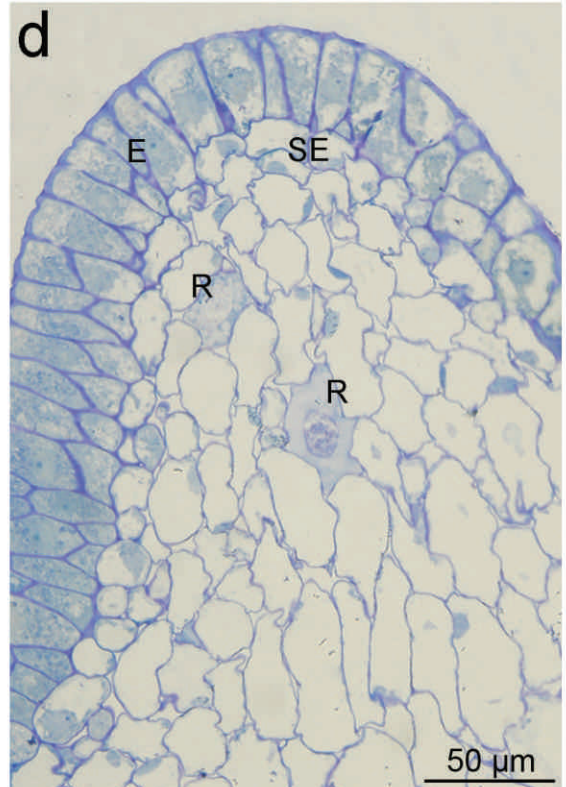
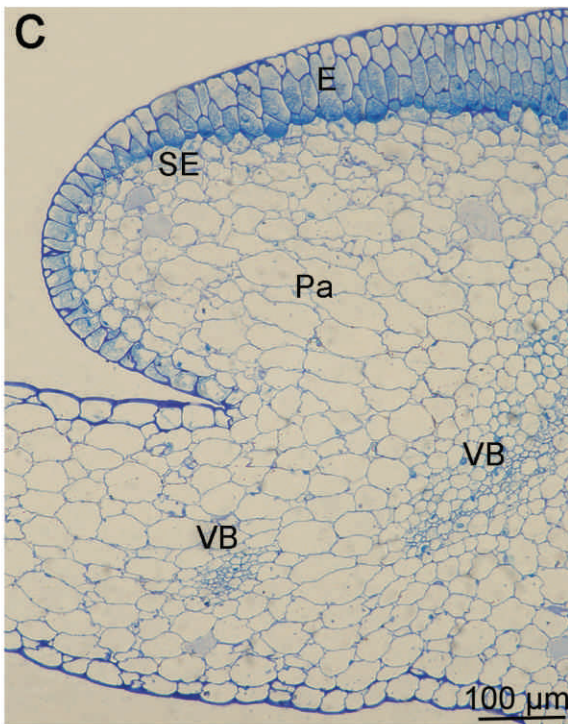
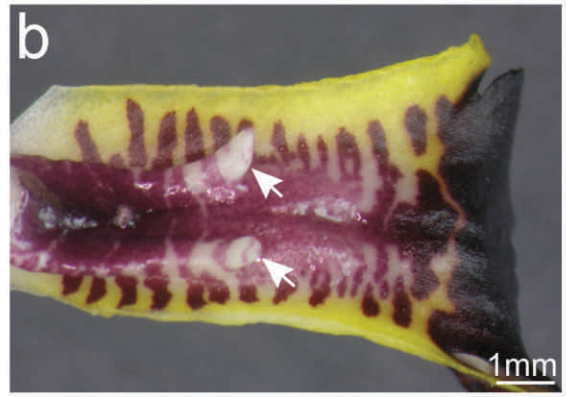
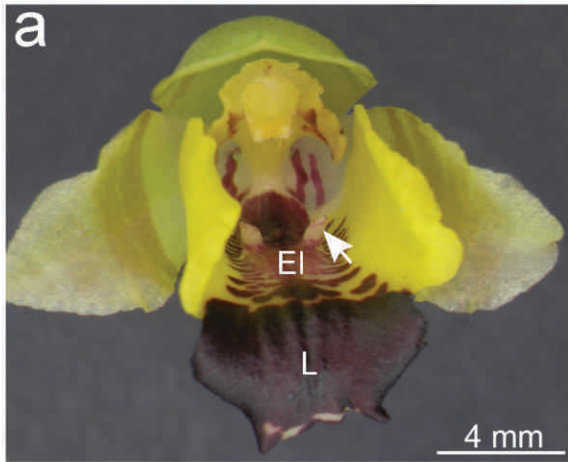
Fot. 11

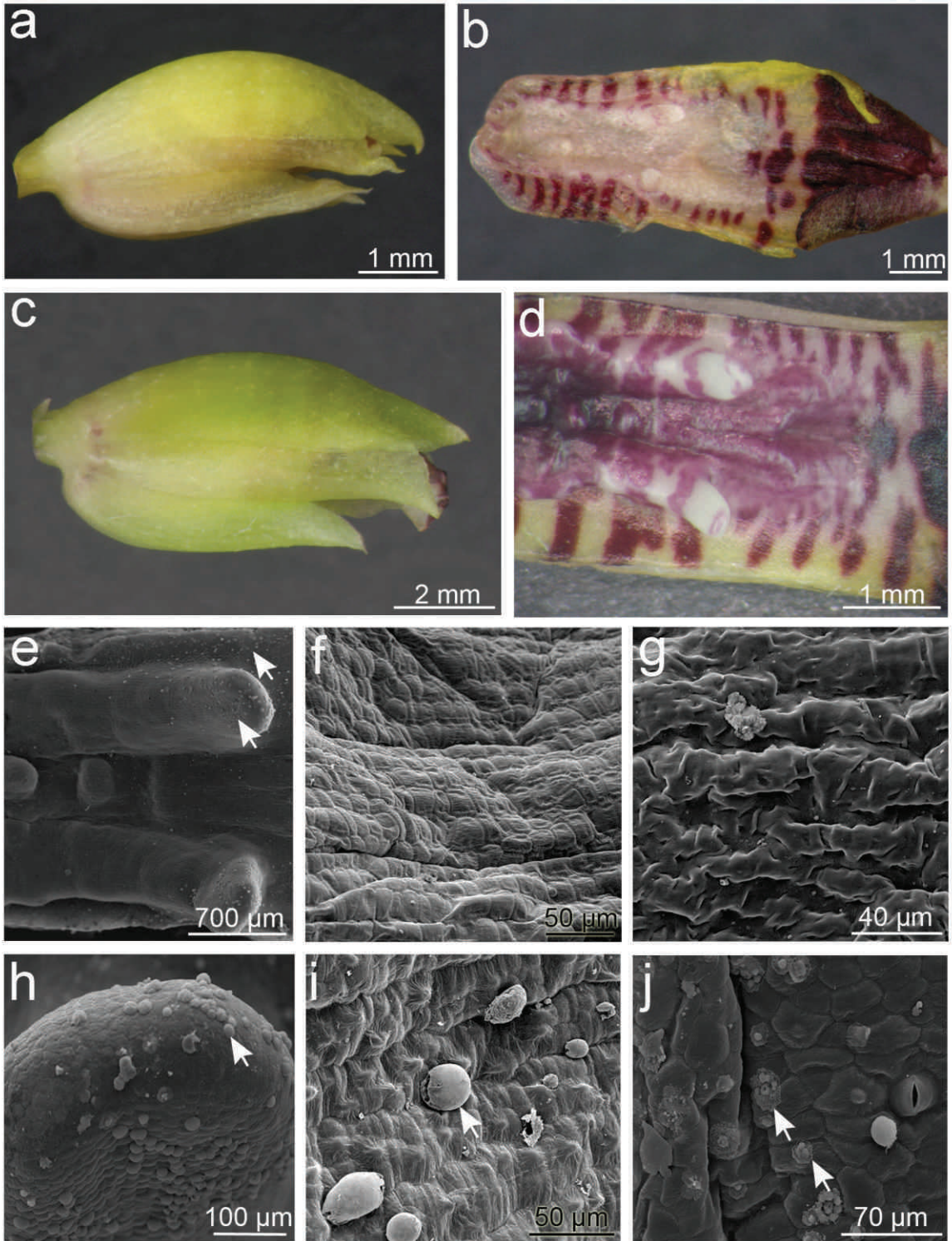






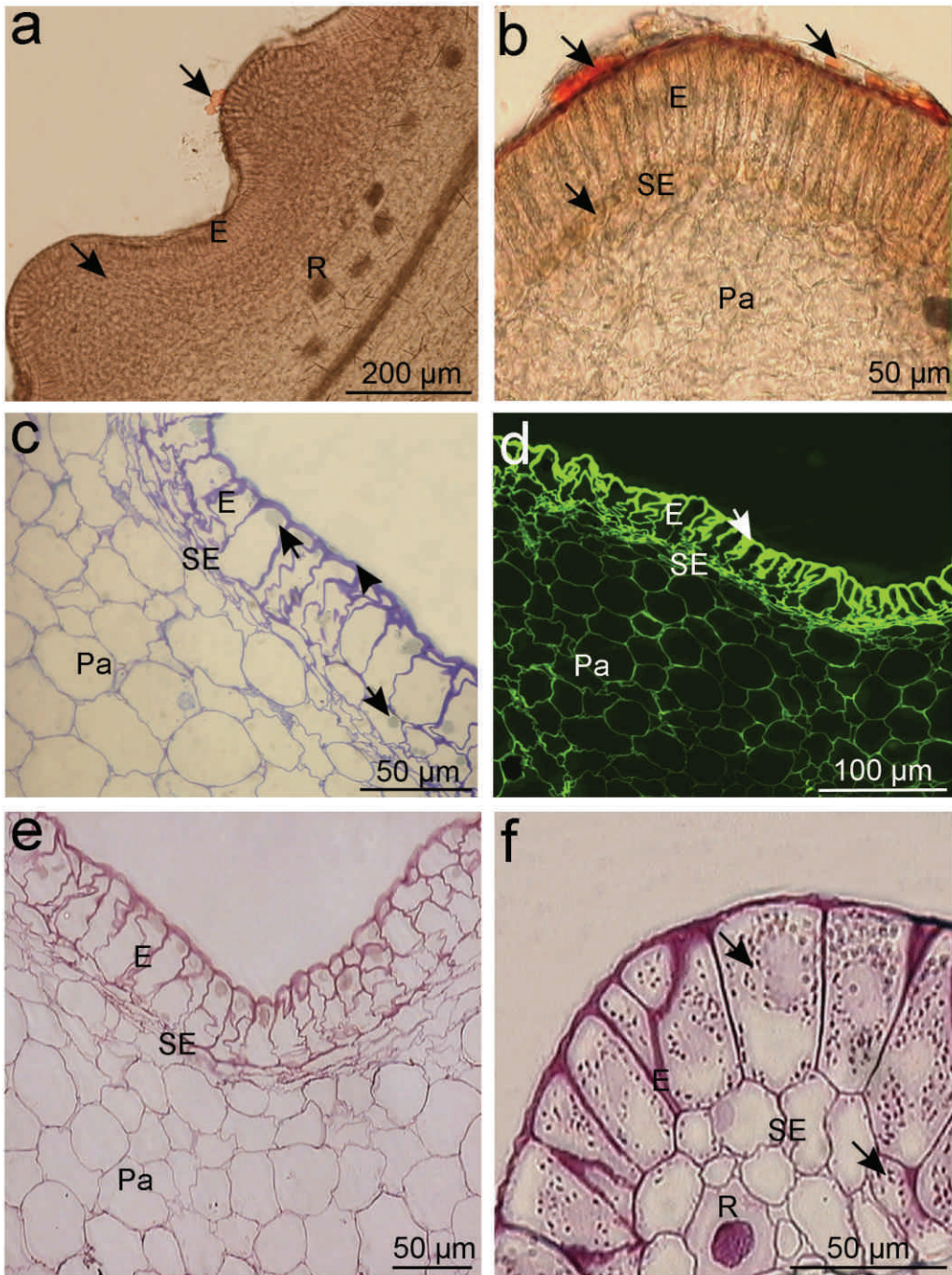
Fot. 13



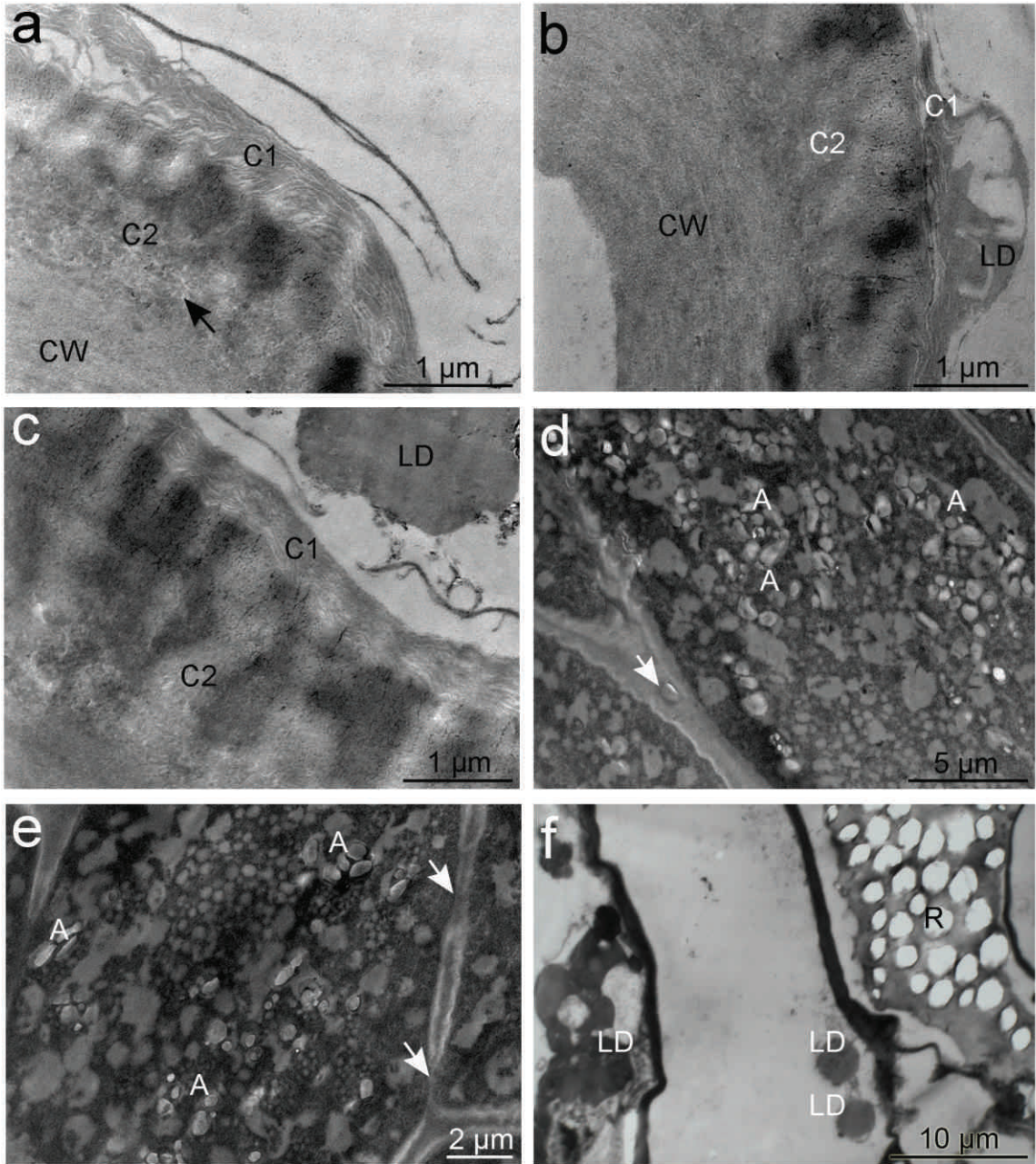




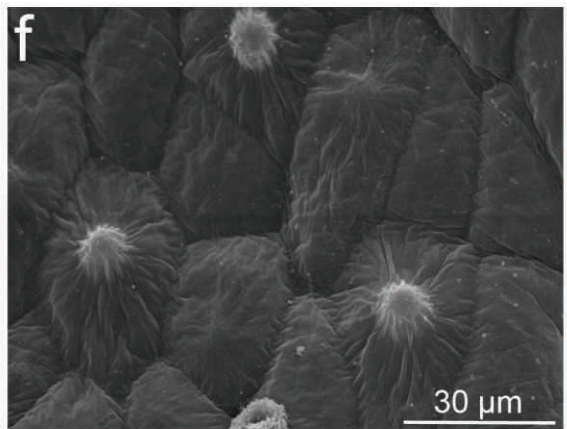
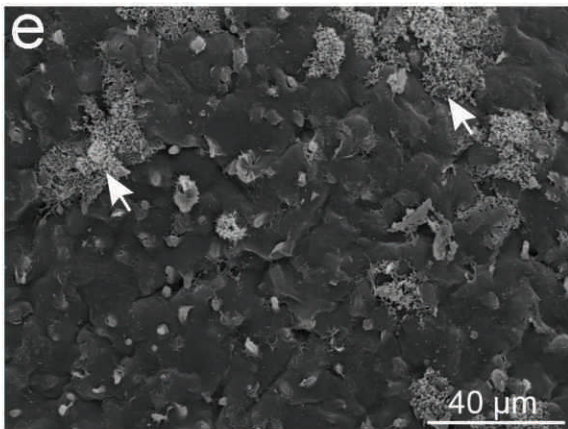
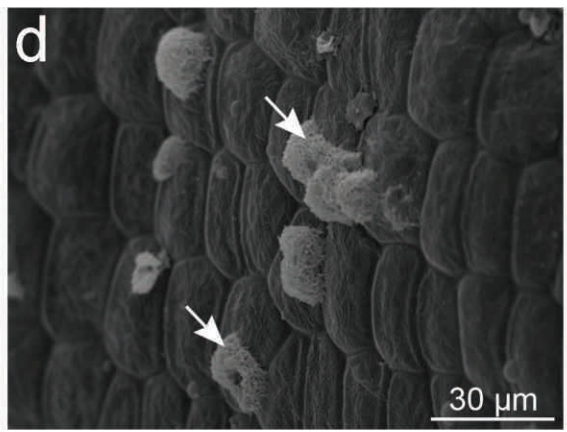
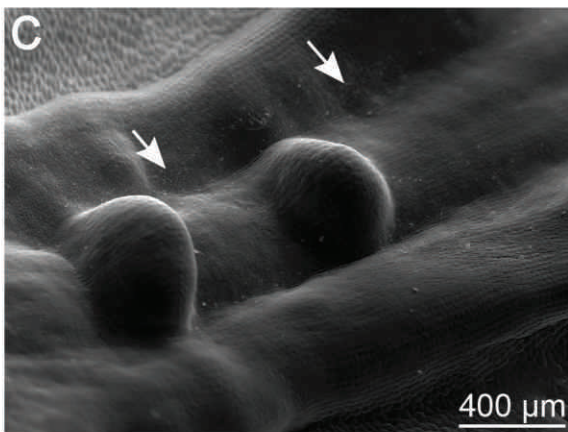
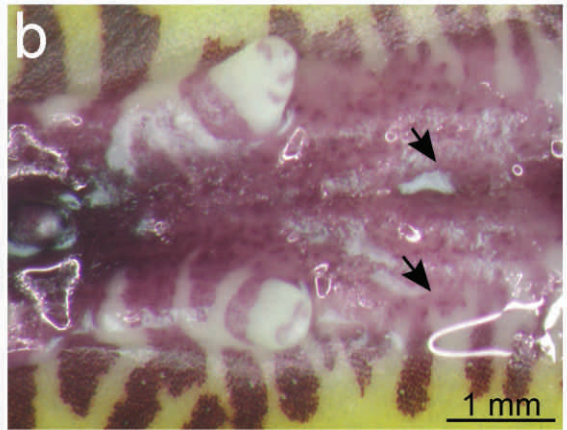
Fot. 15



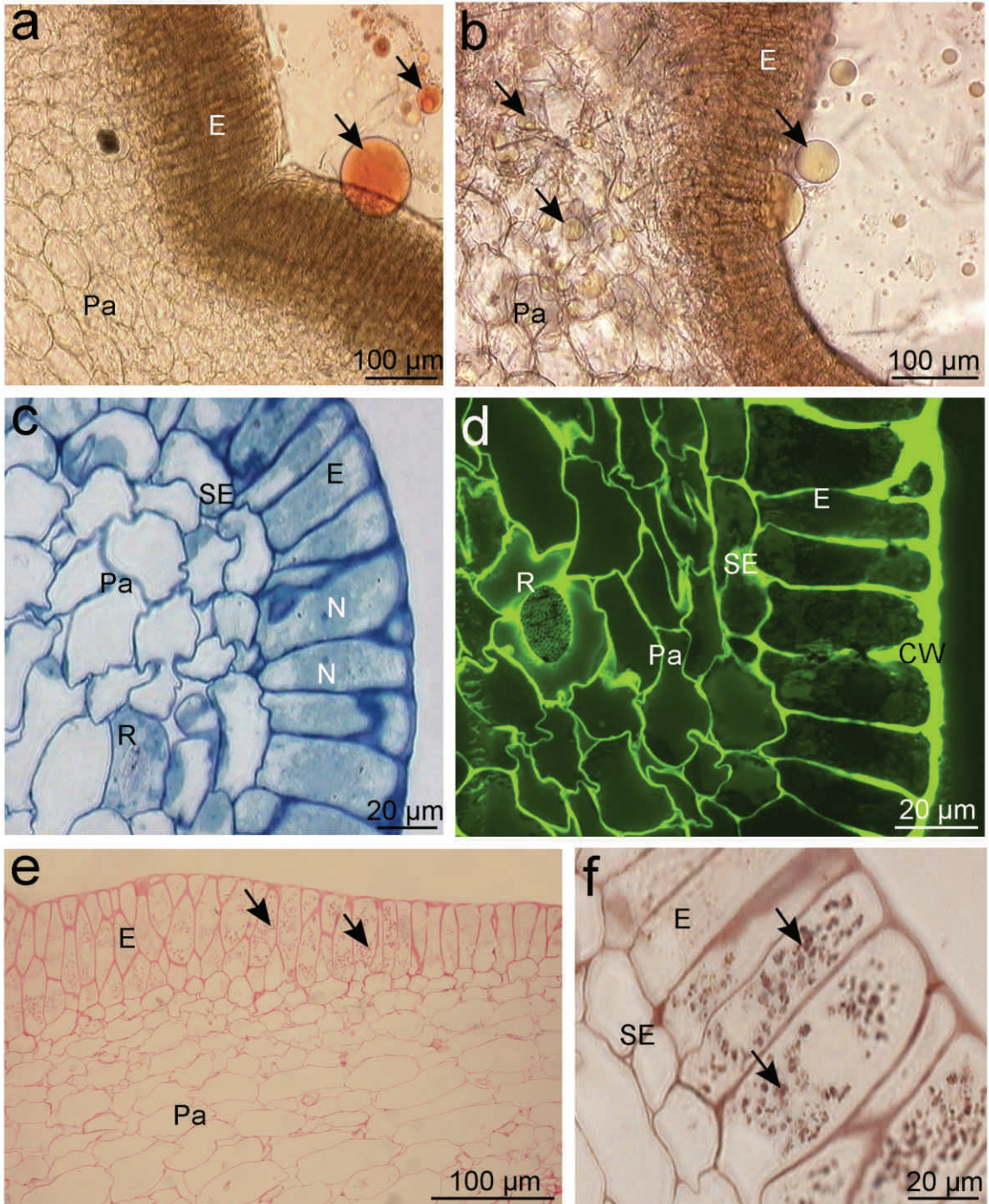
Fot. 16





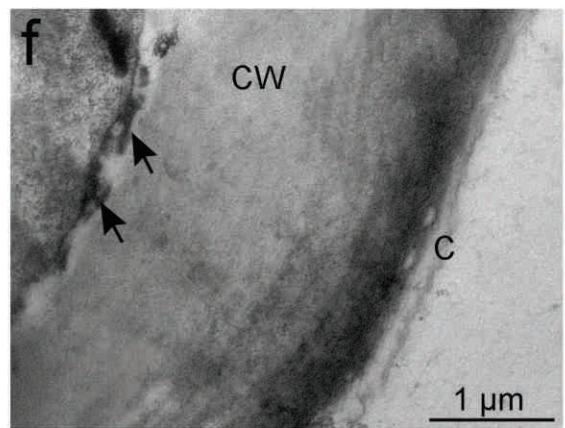
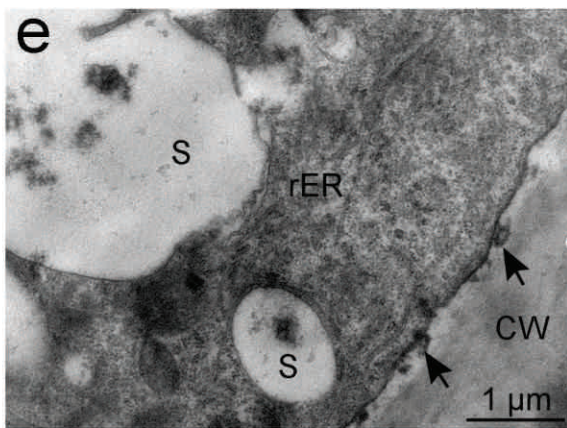
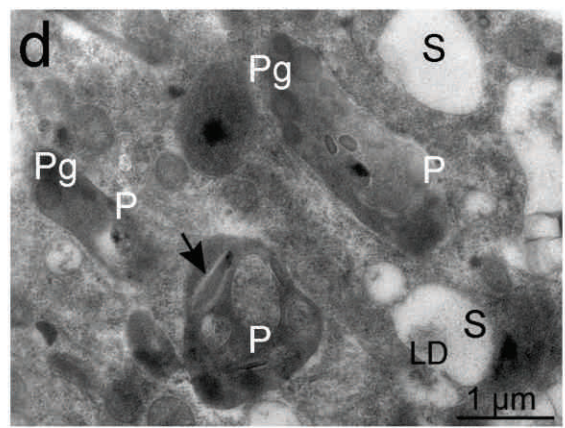
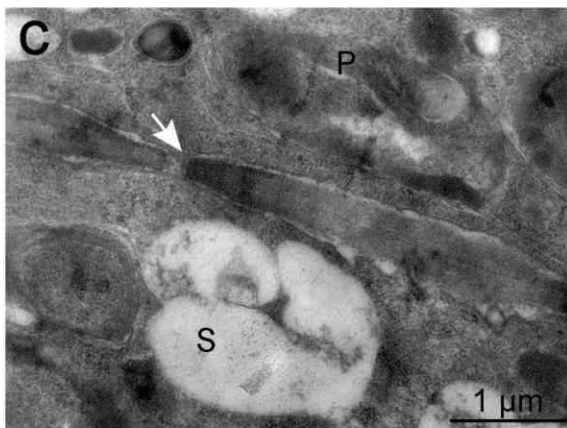
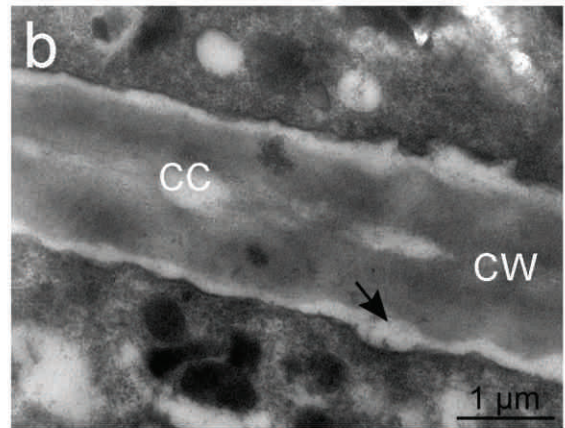
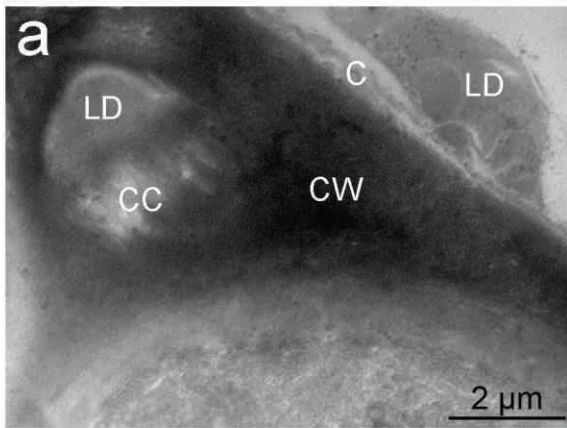


Fot. 18

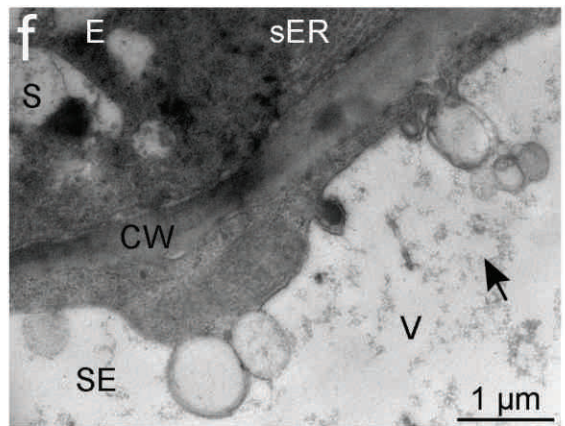
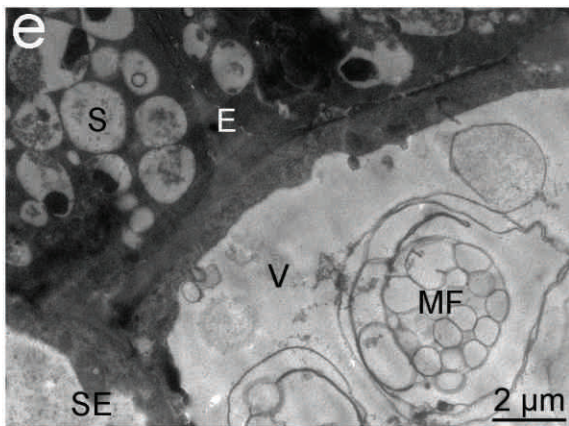
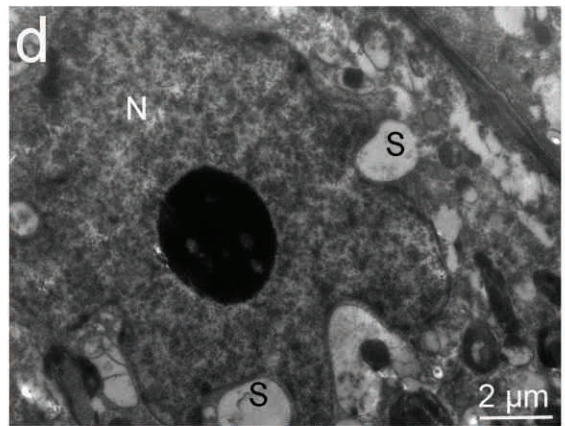
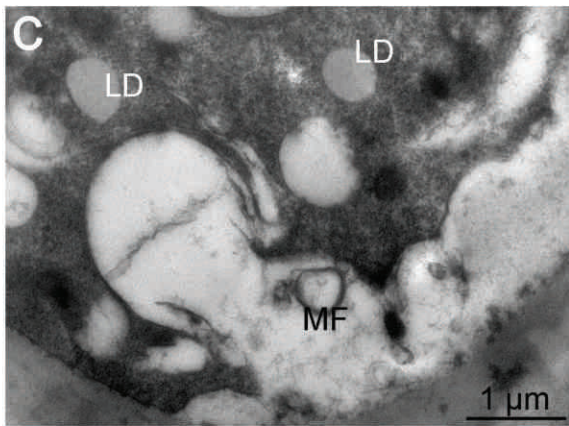
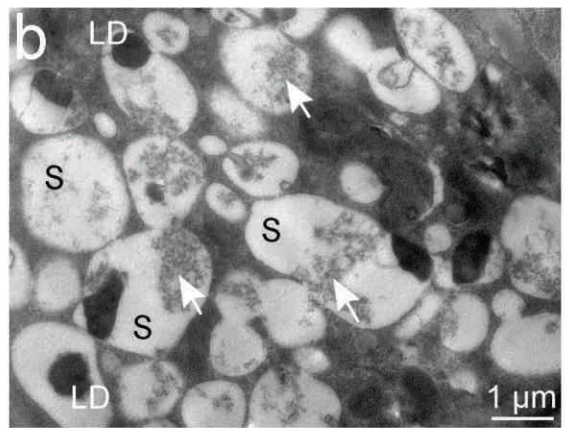
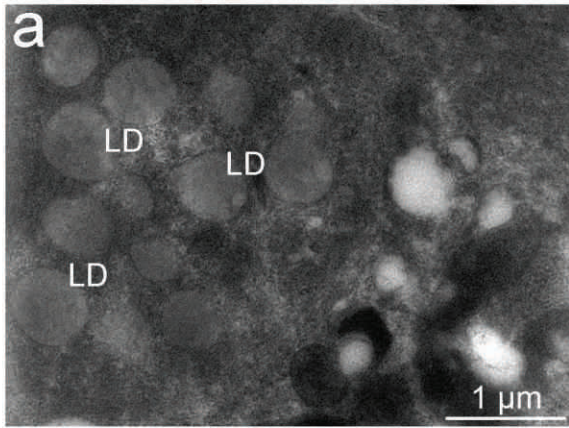




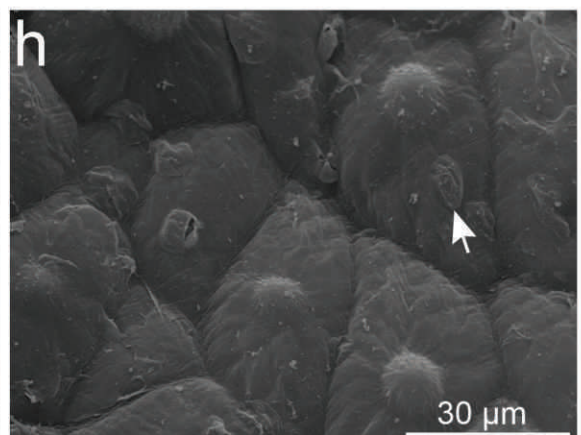
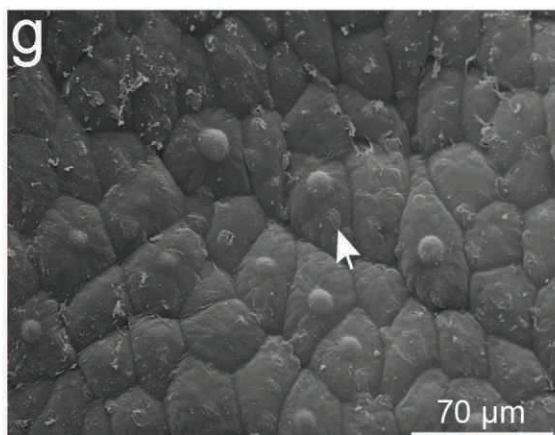
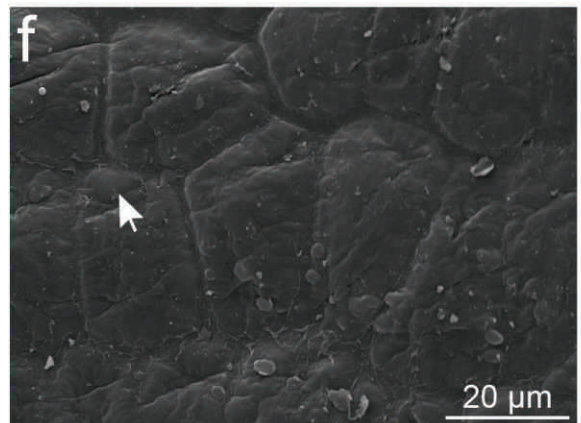
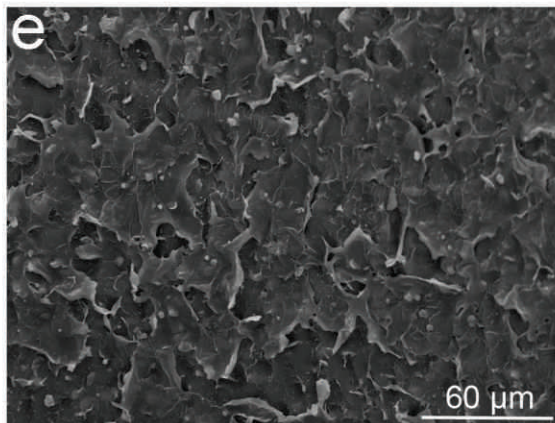
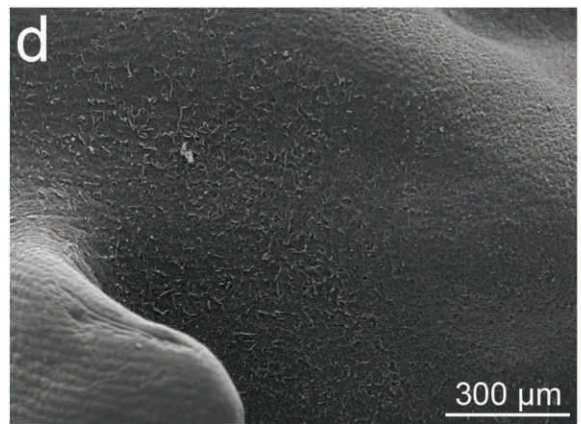
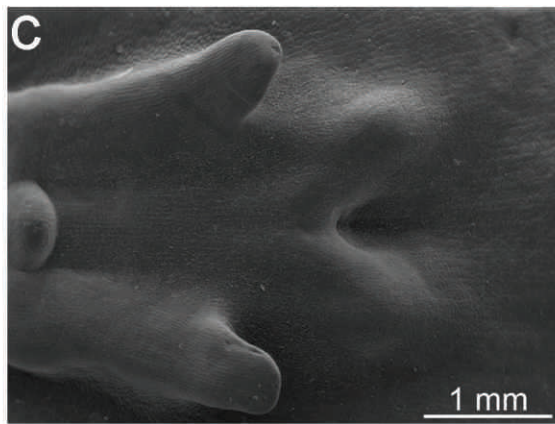
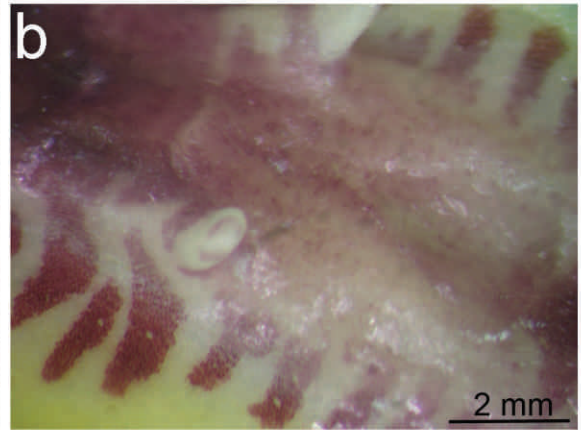
Fot. 19





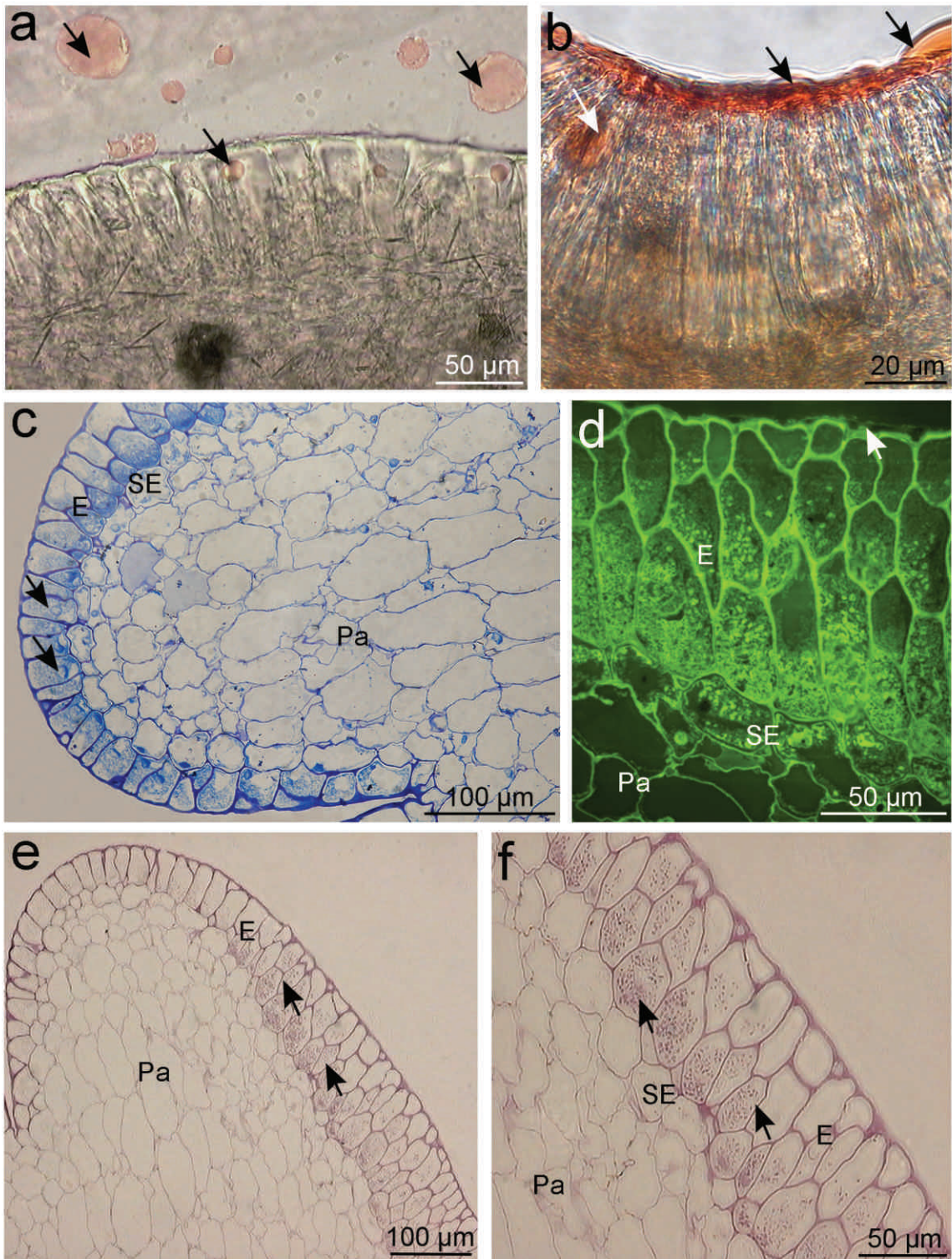




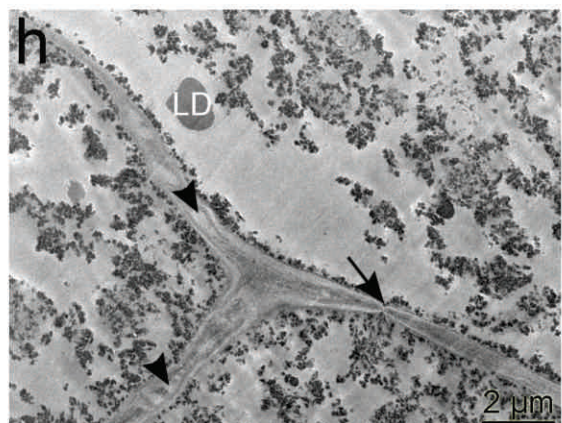
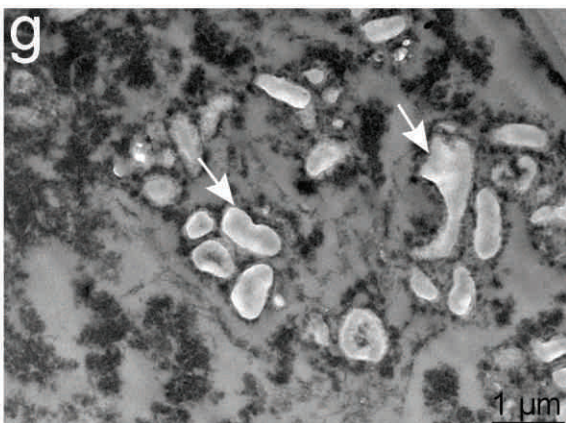
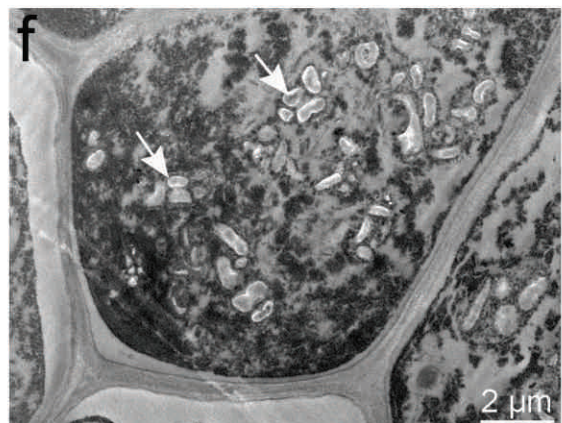
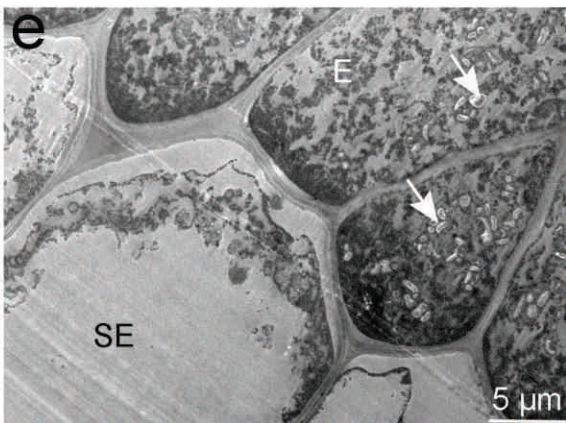
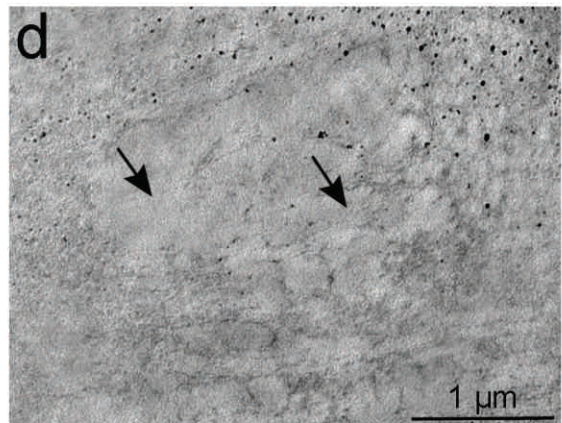
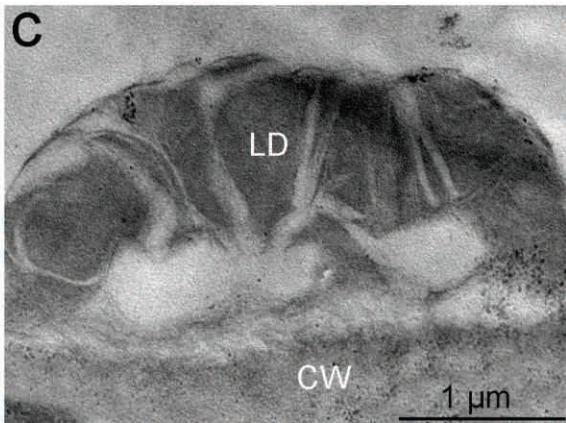
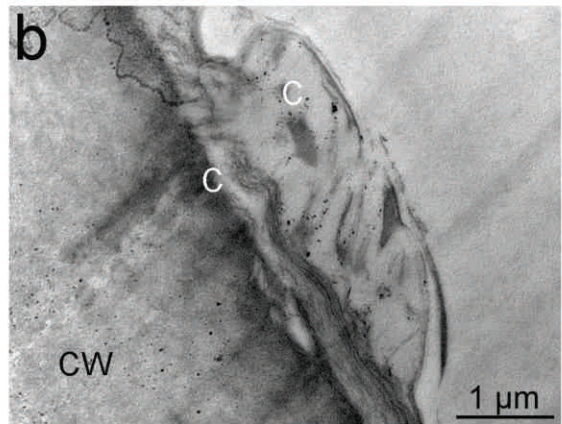
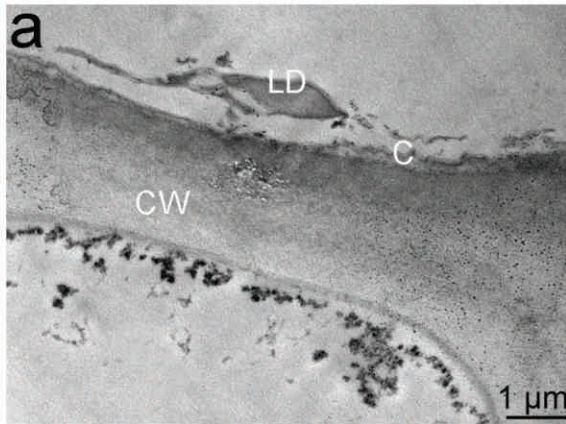




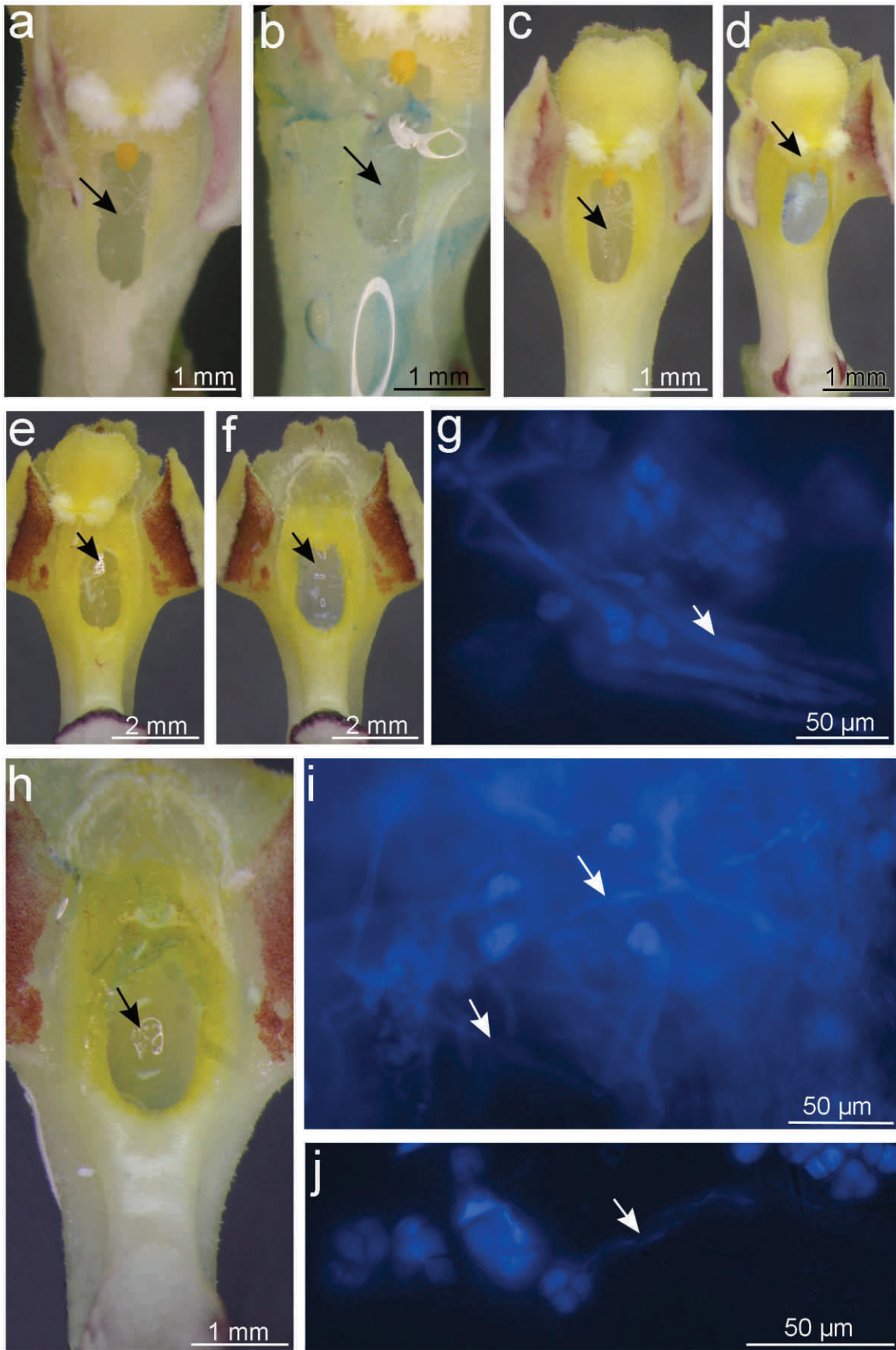
Fot. 22

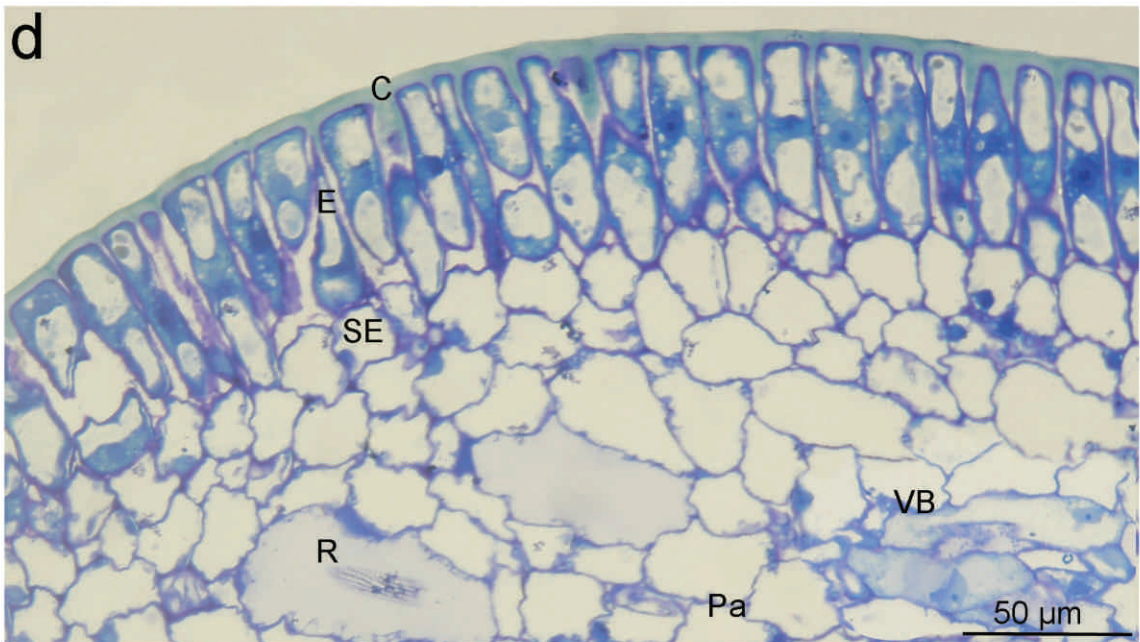
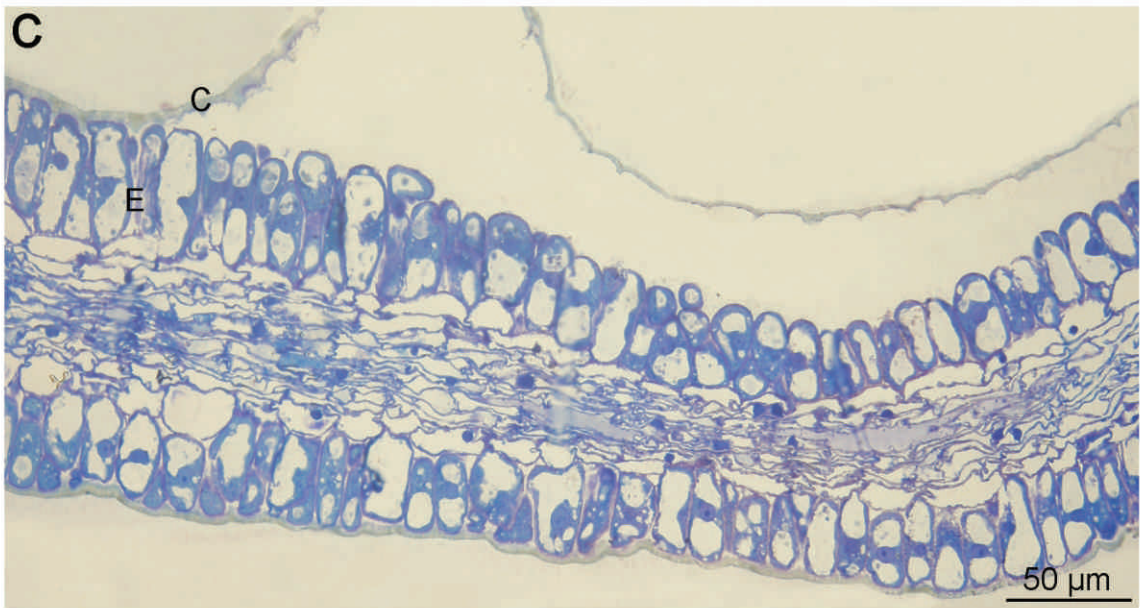
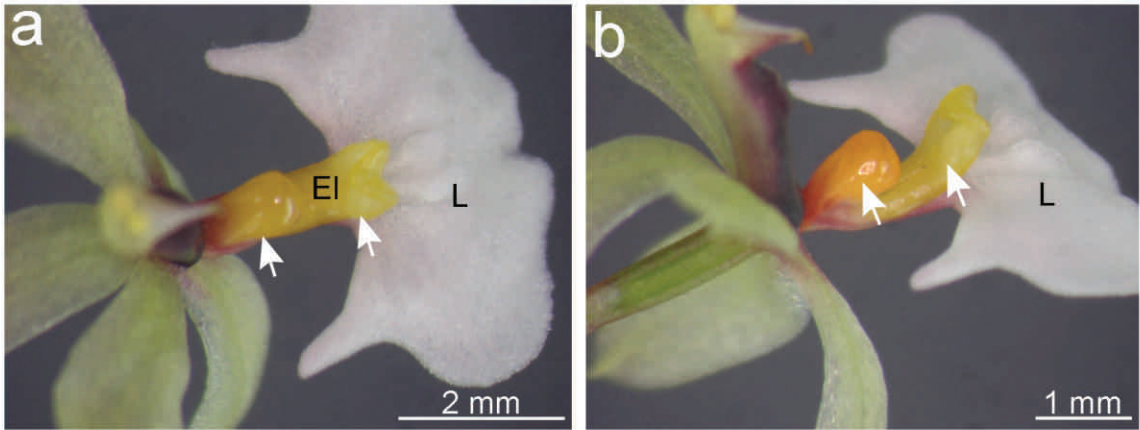




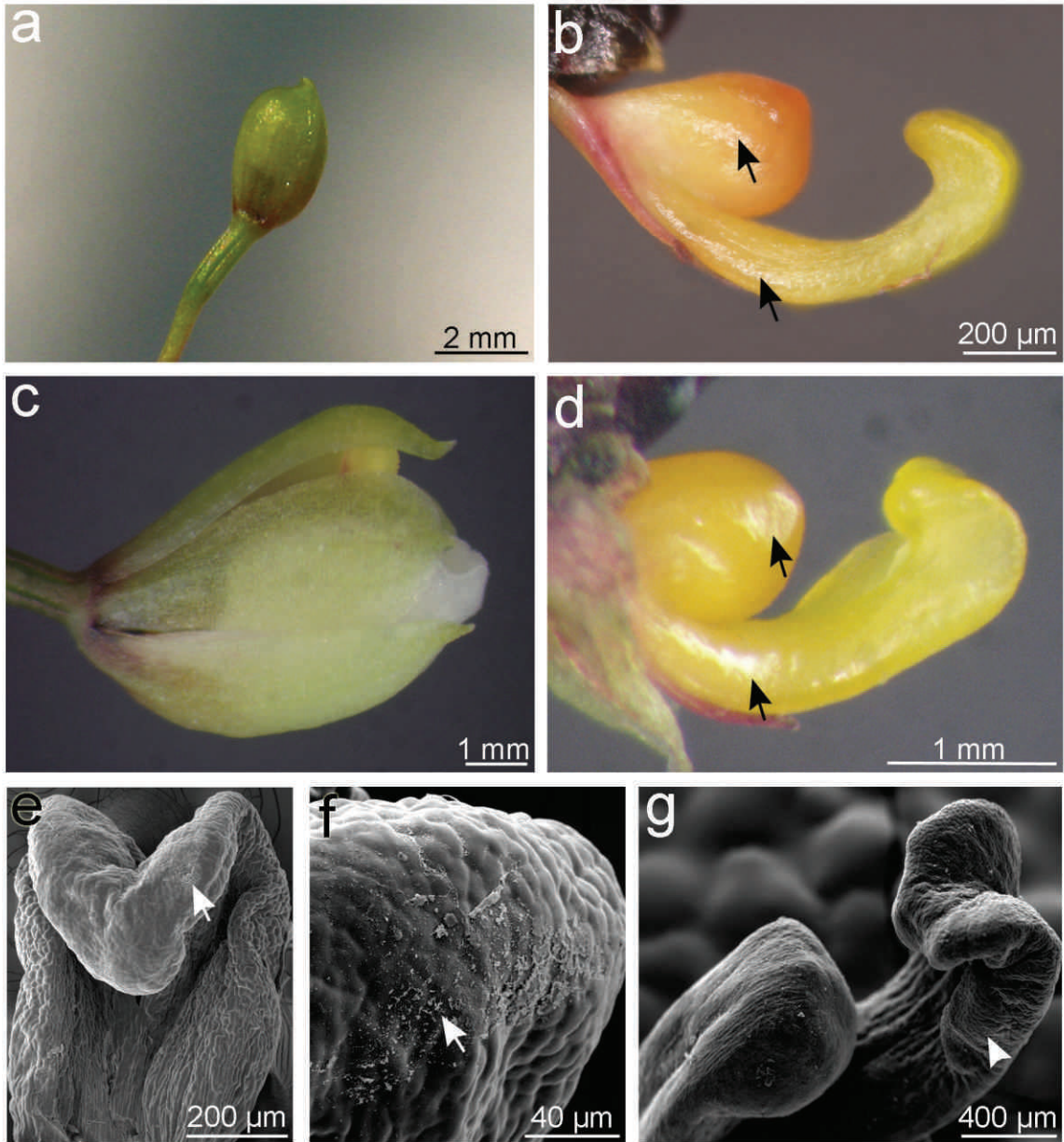


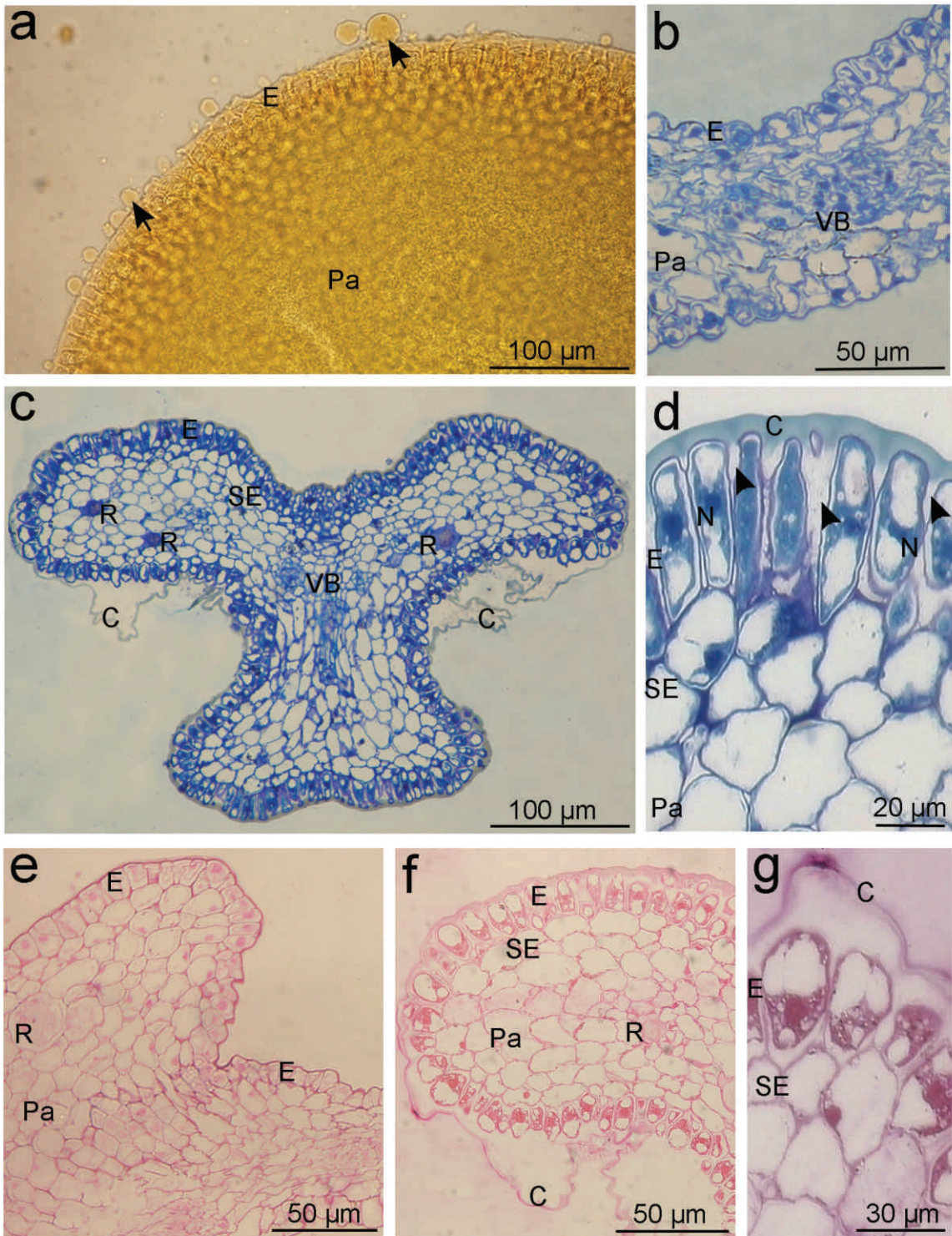




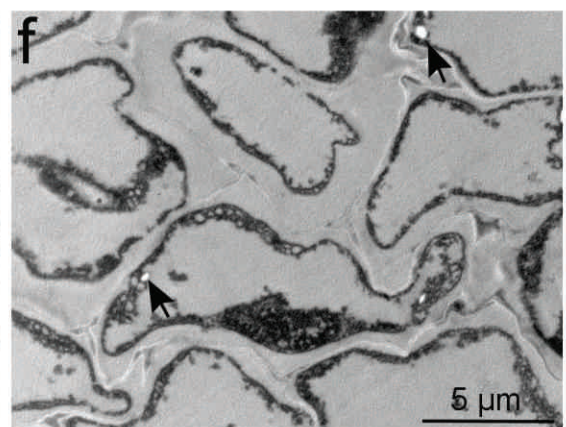
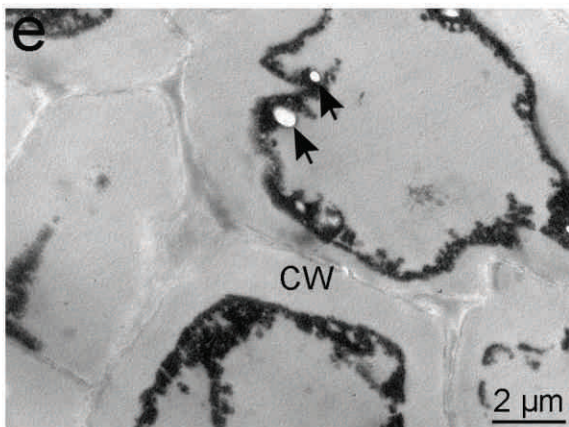
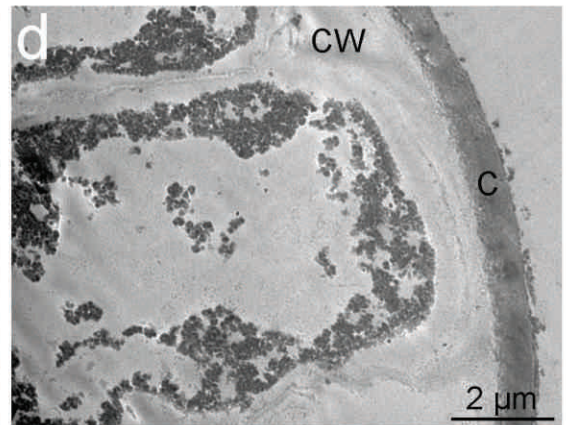
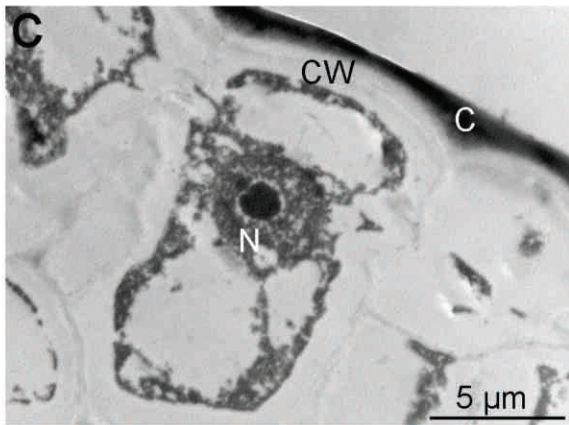
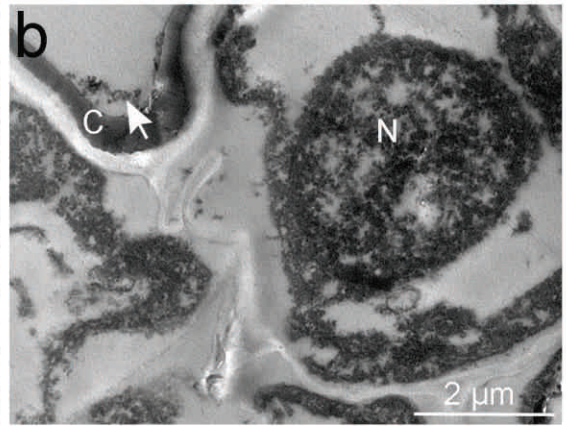
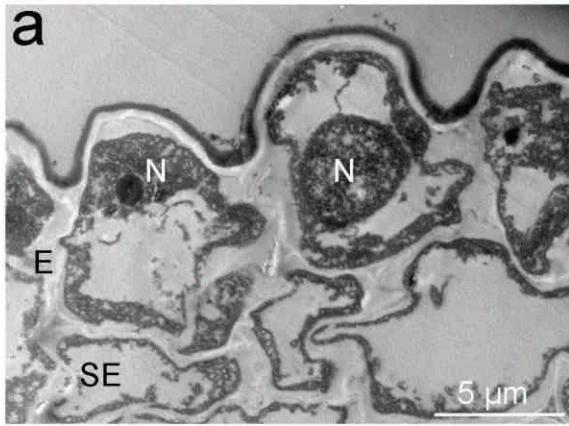




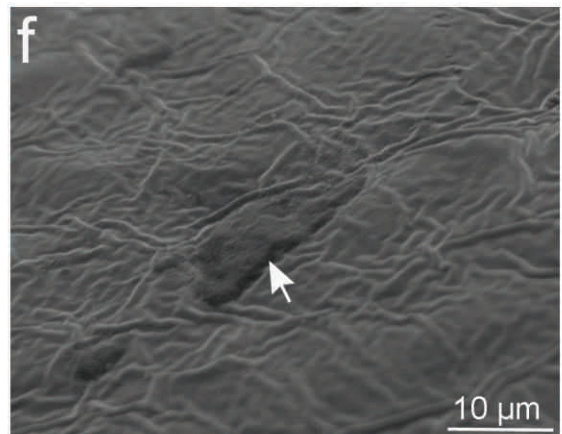
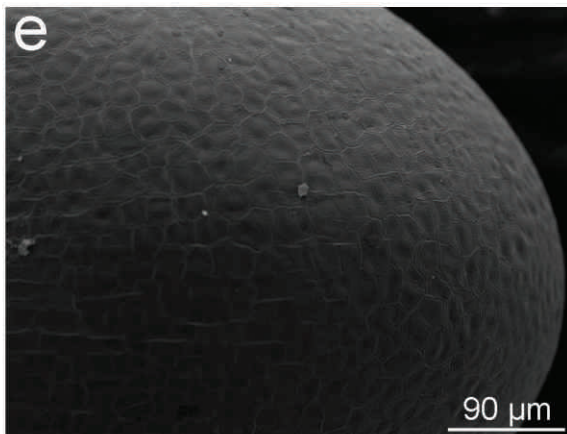
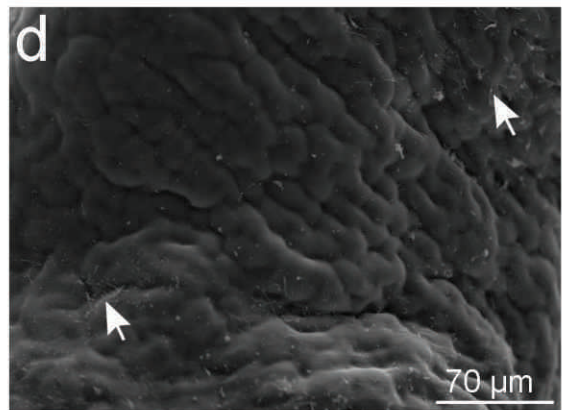
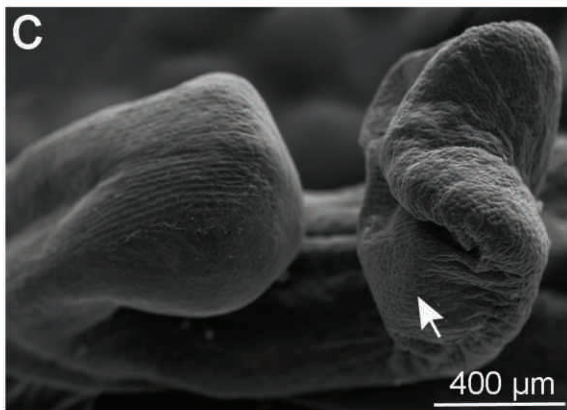
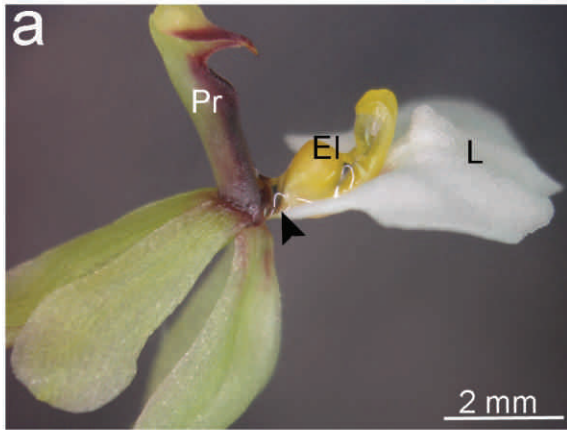




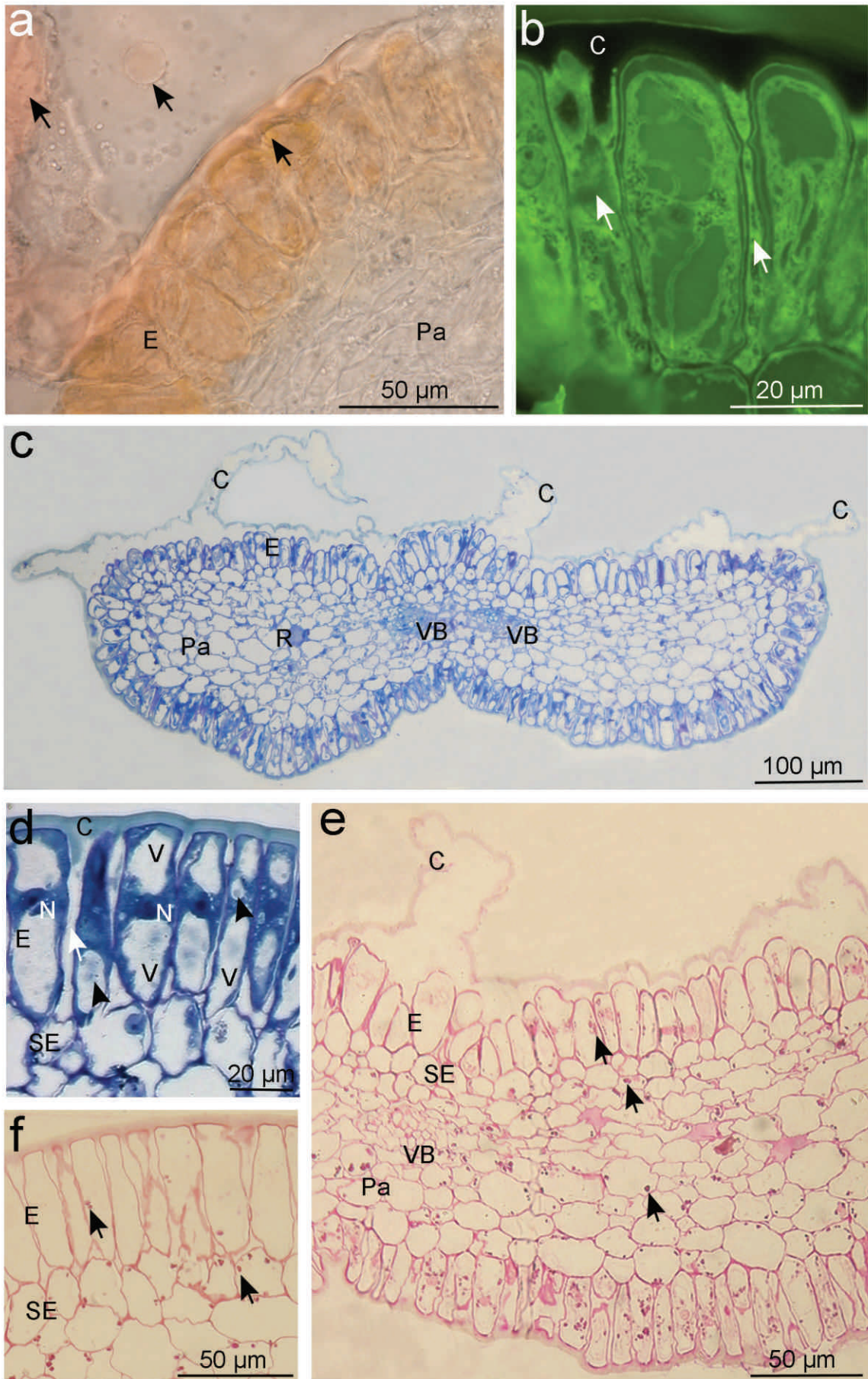






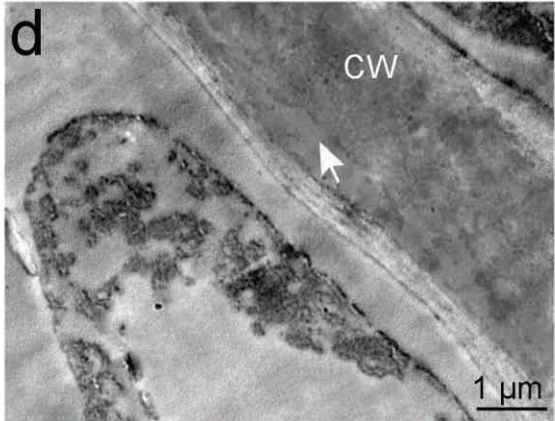
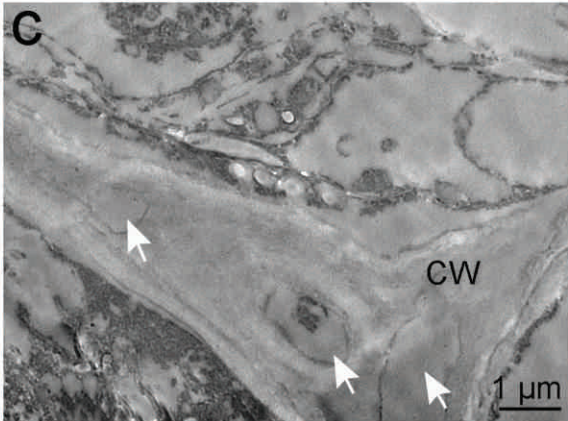
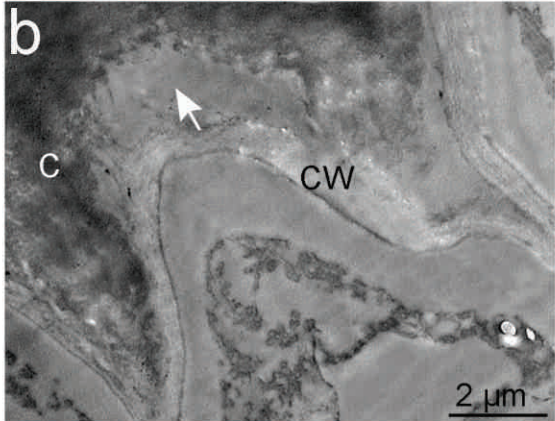
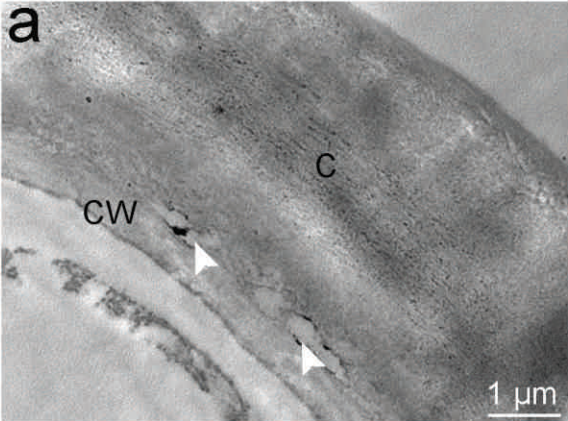


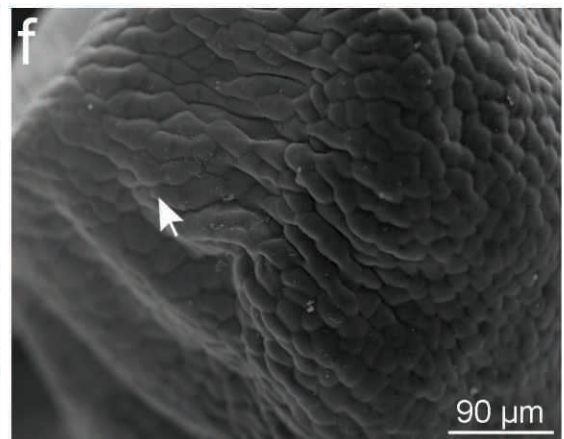
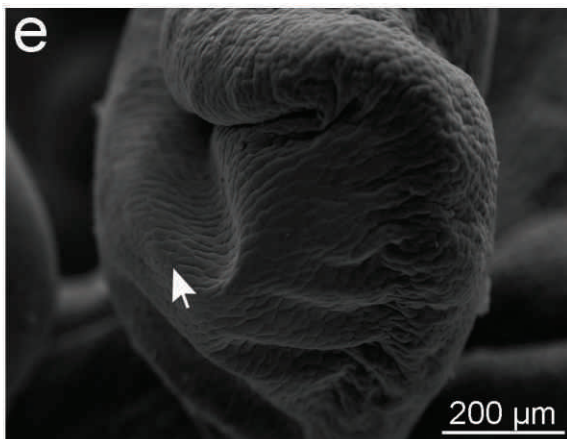
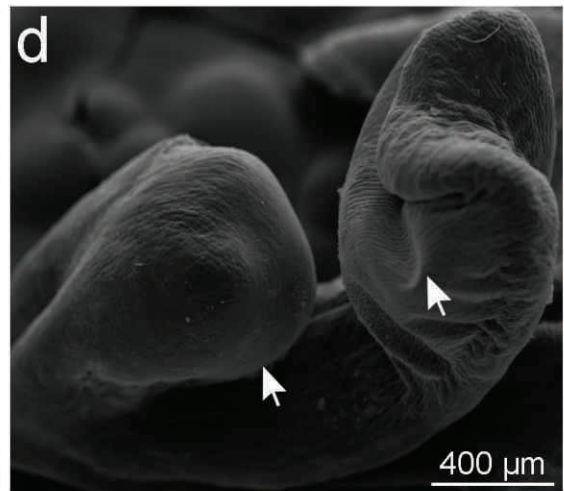
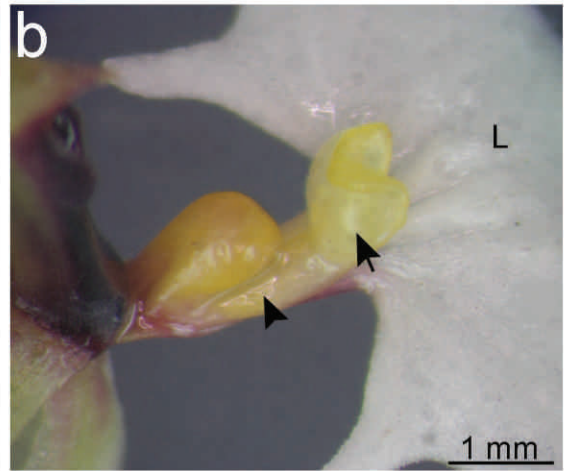
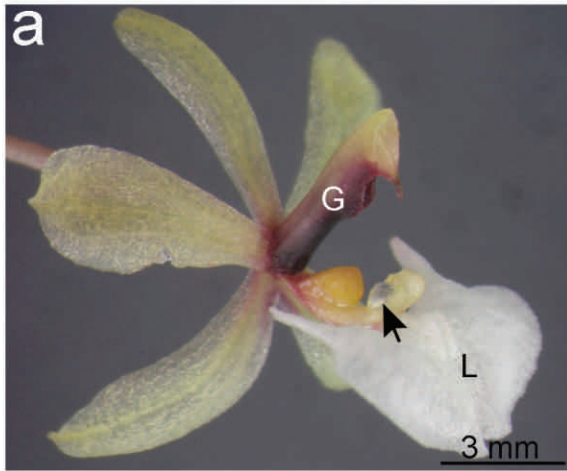
Fot. 30



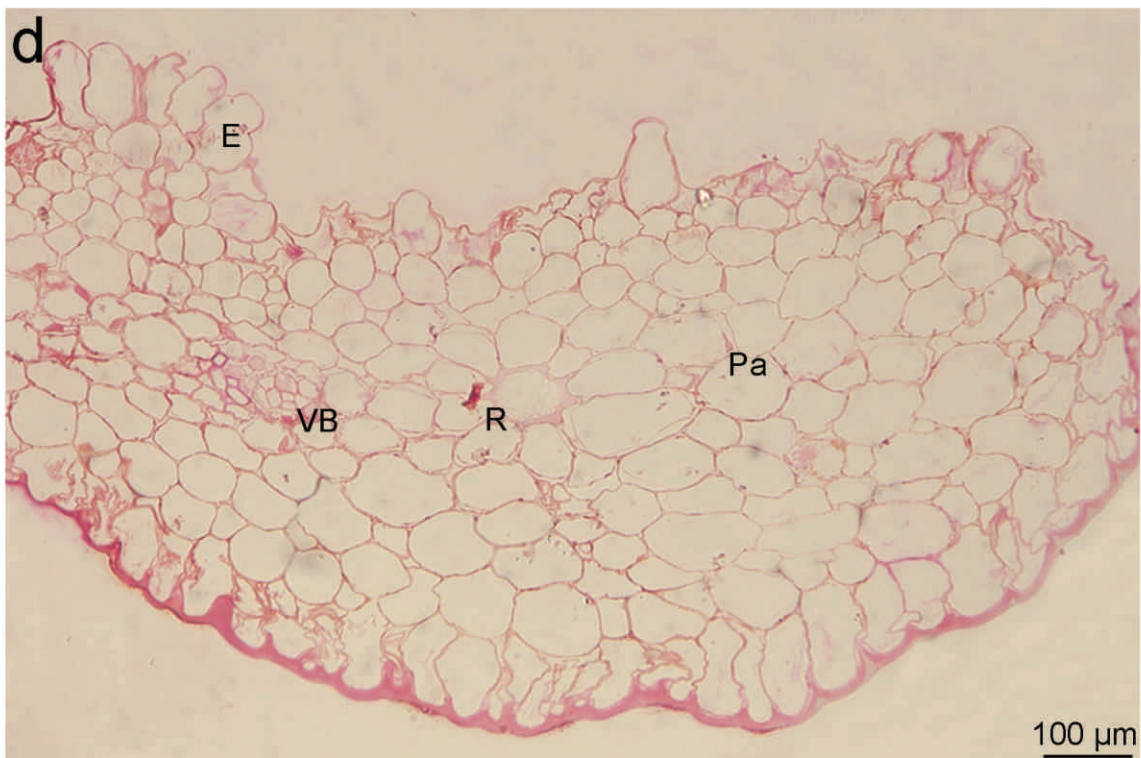
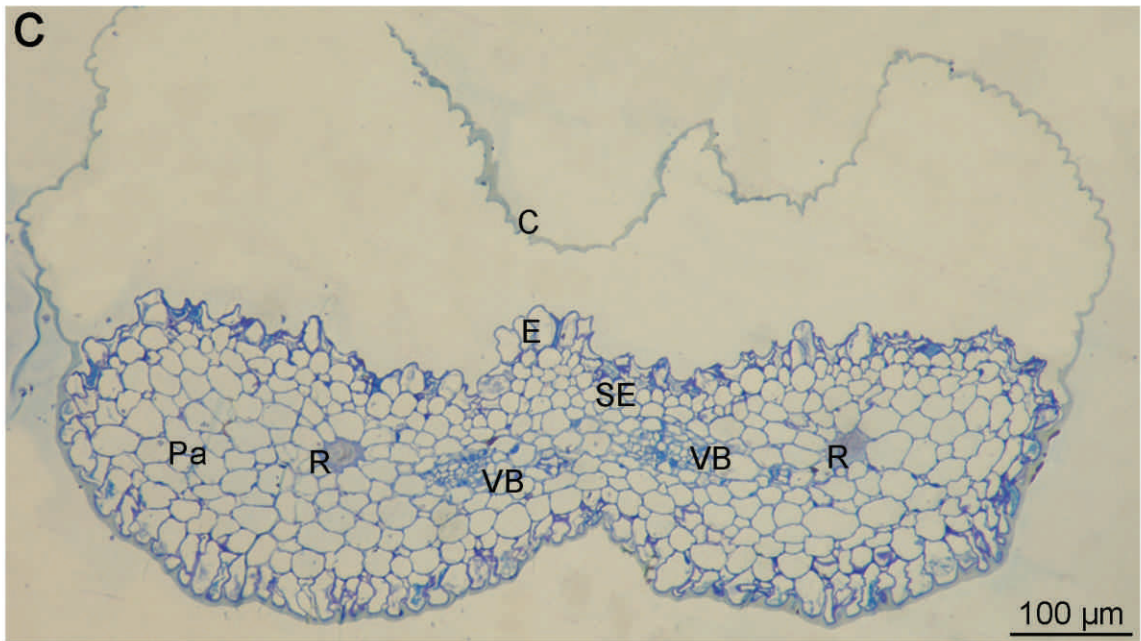
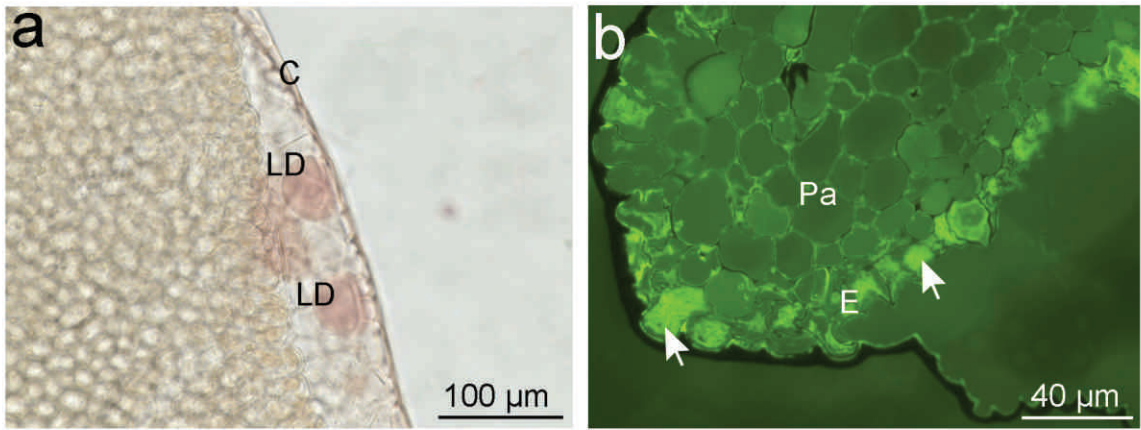


Fot. 31



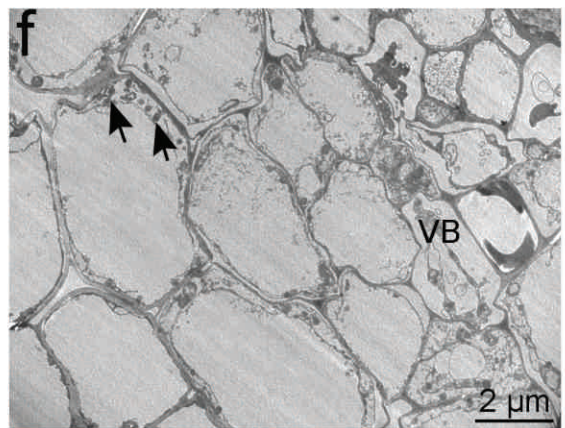
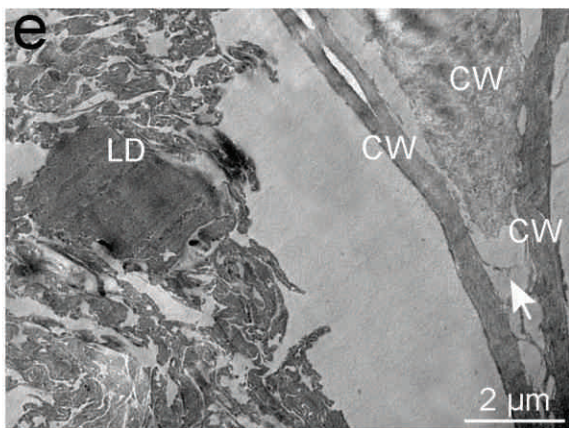
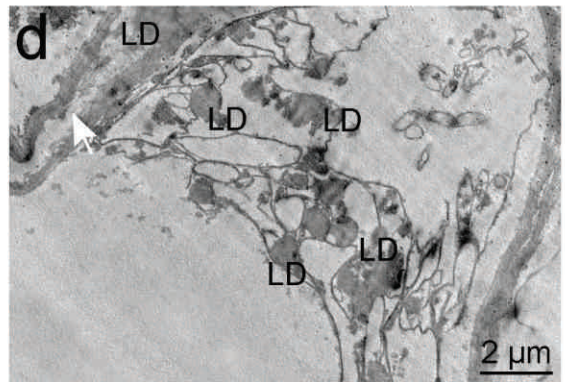
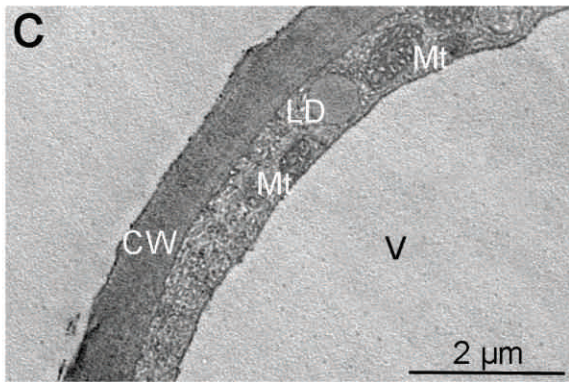
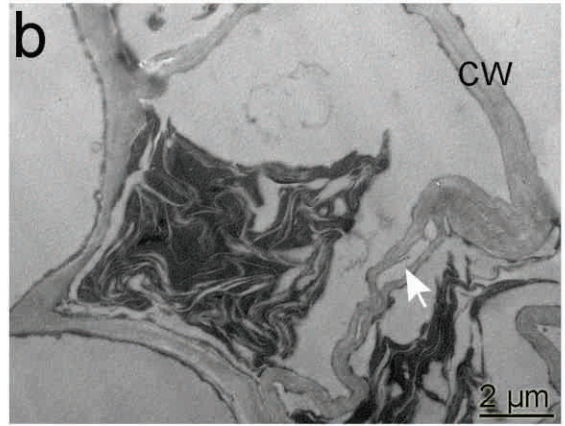
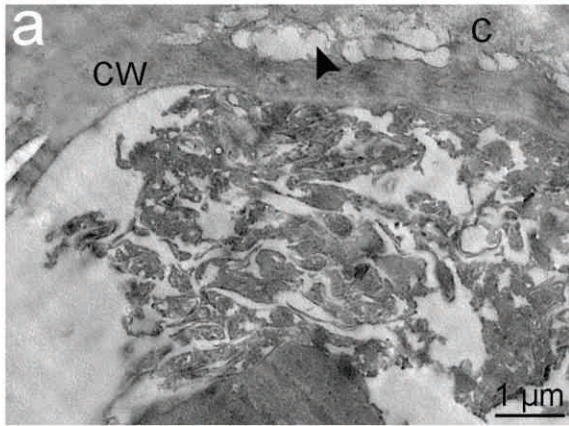


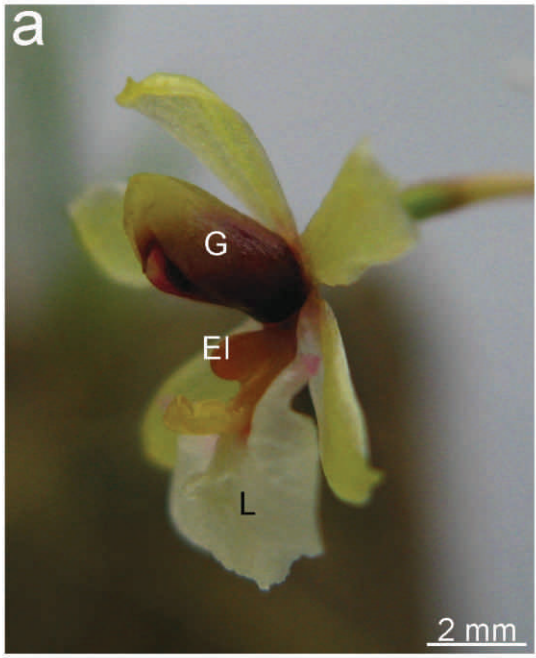






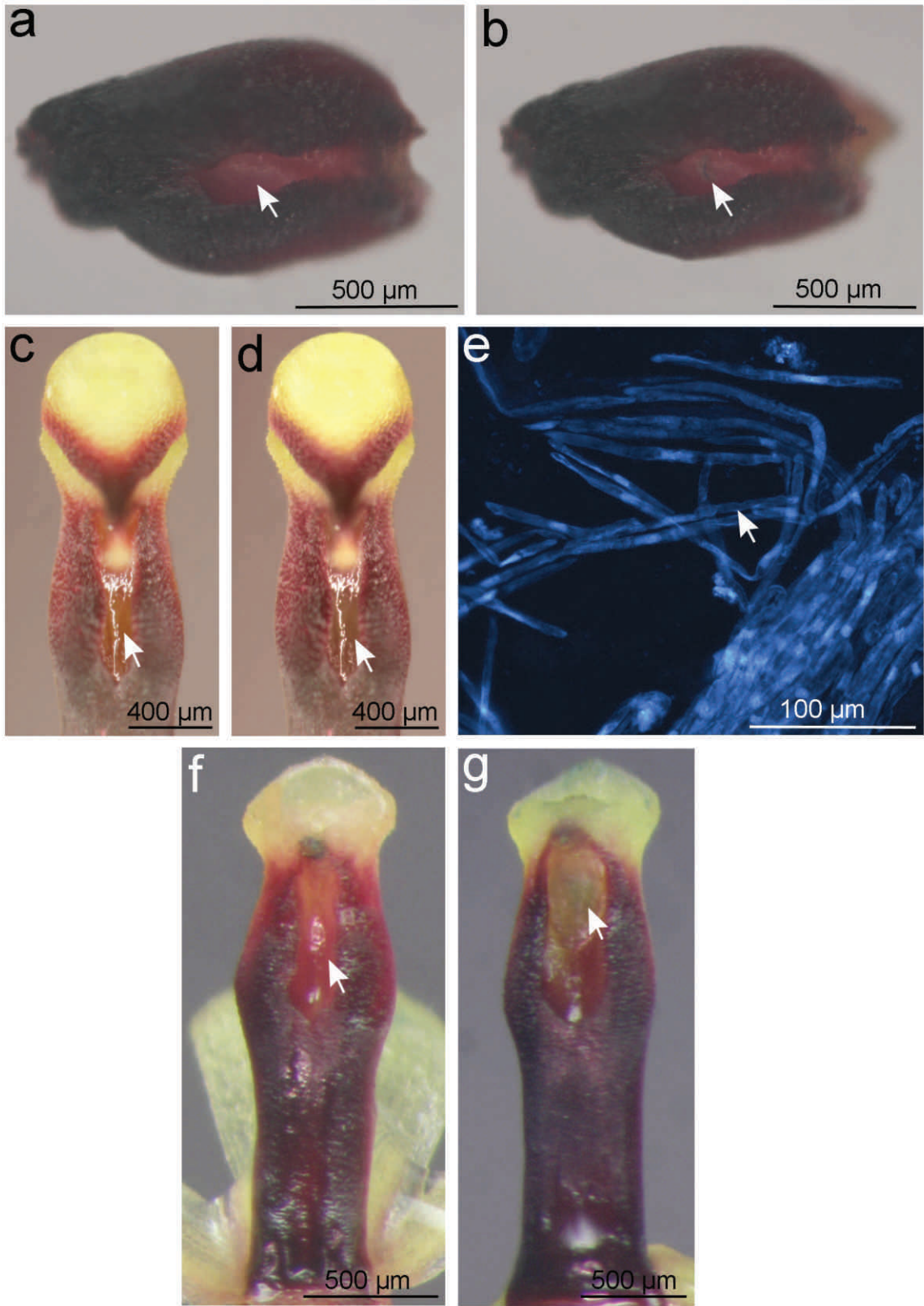
Fot. 34

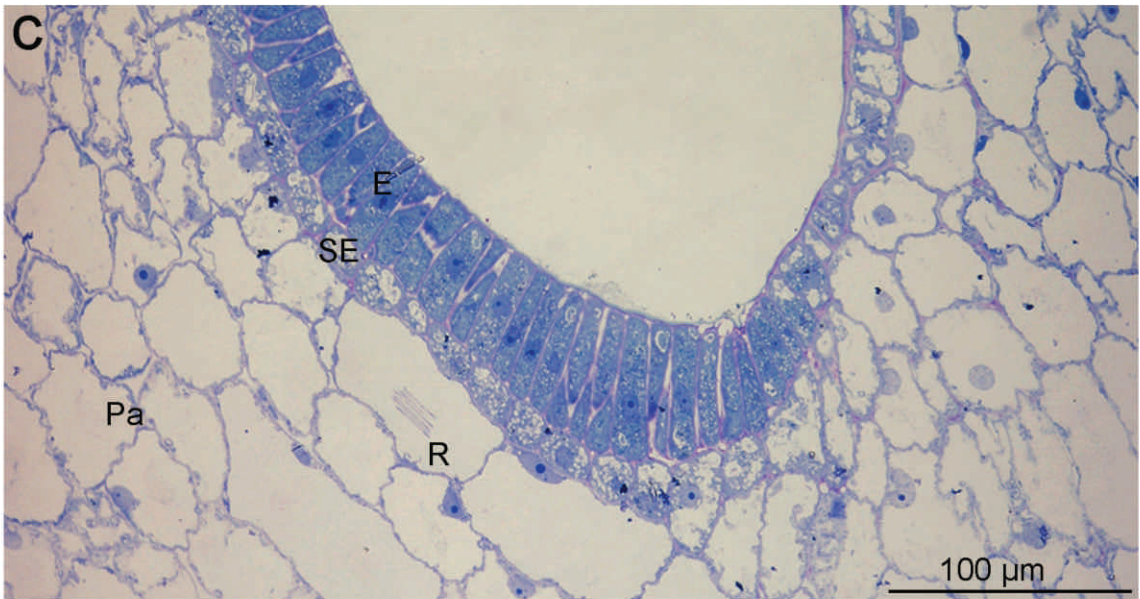
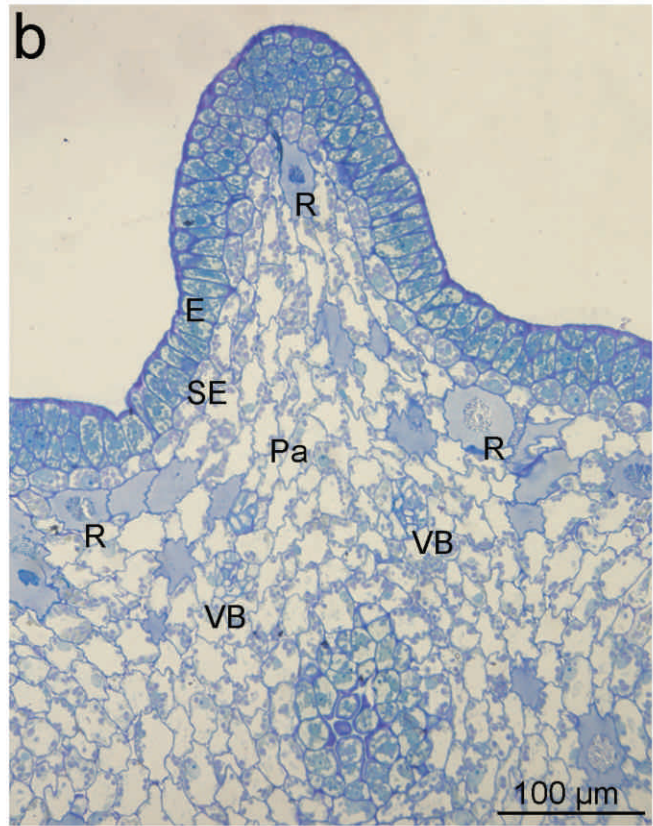
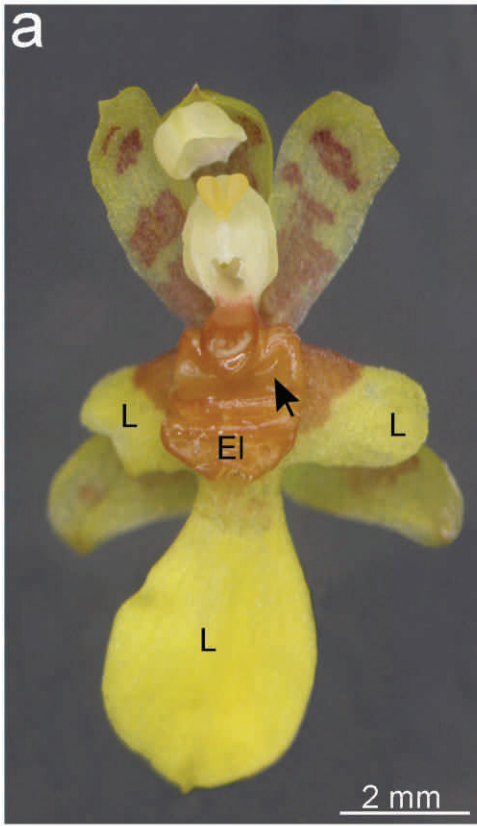






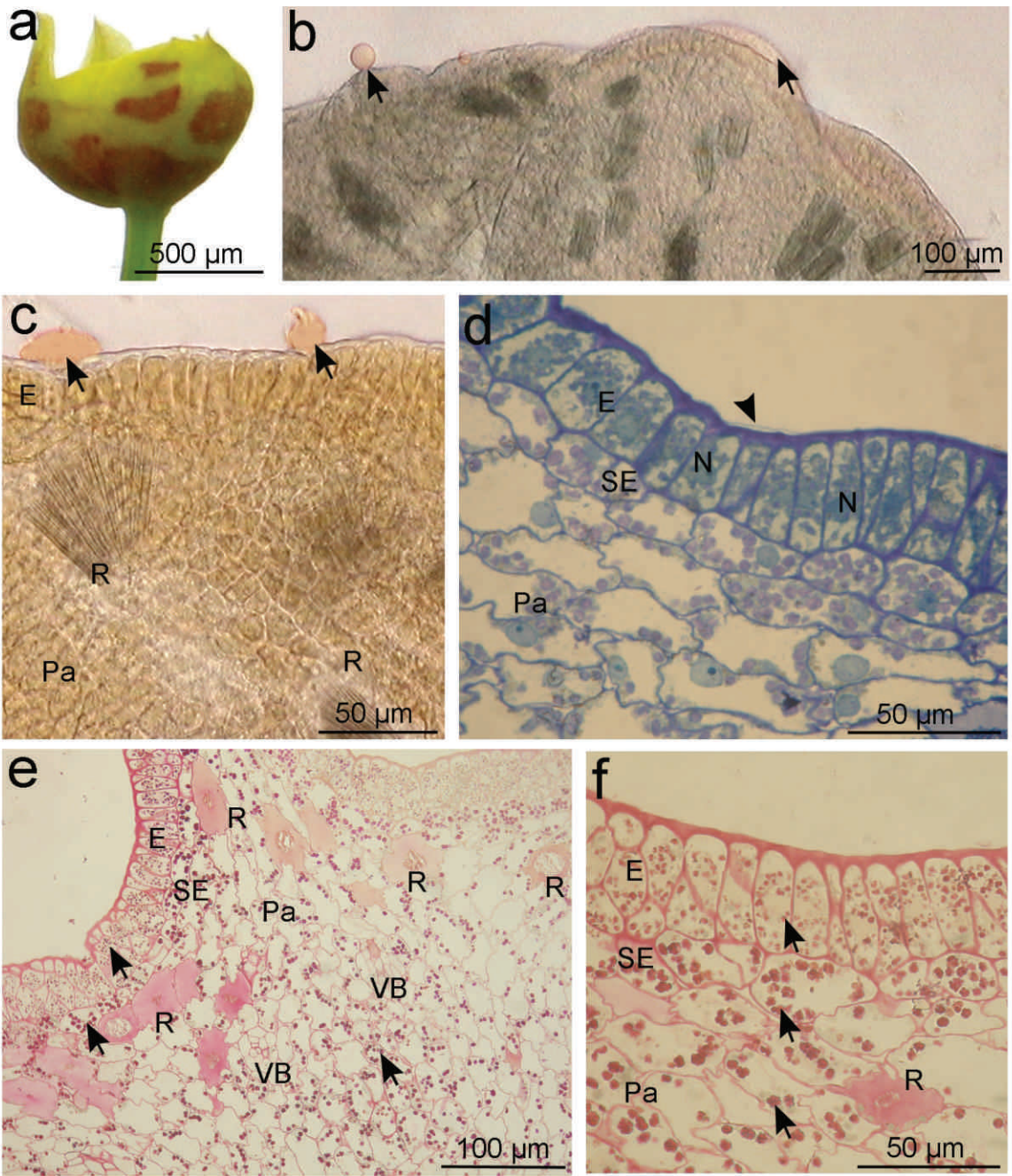
Fot. 36



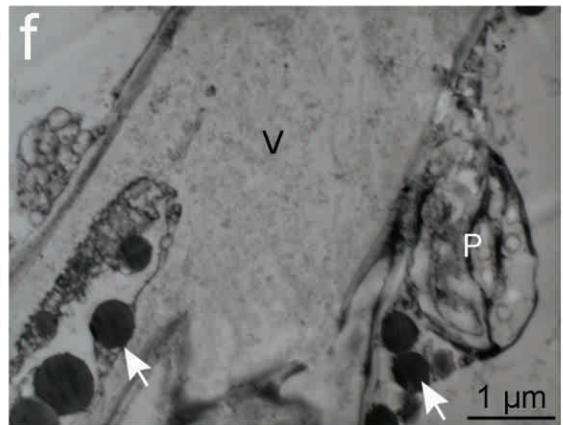
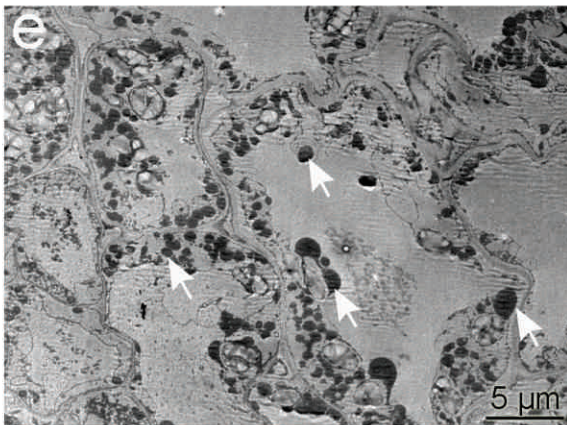
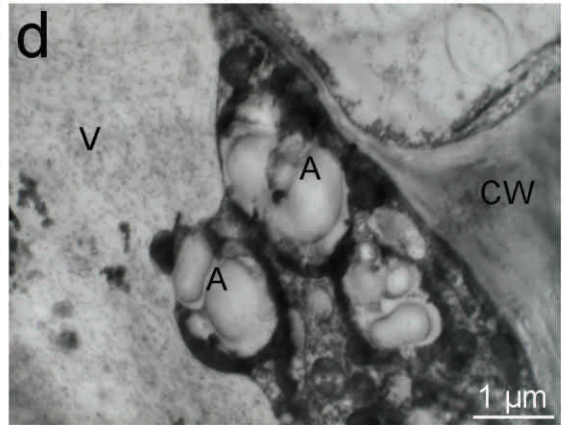
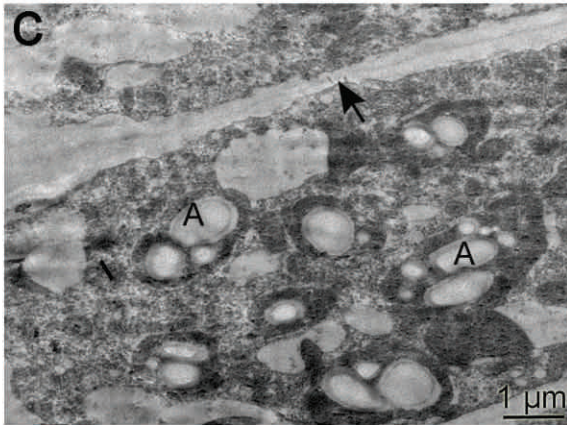
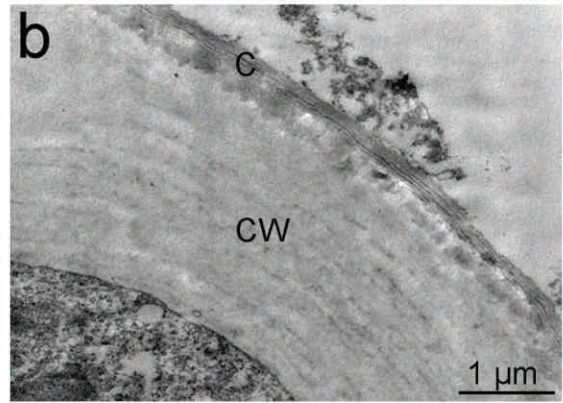
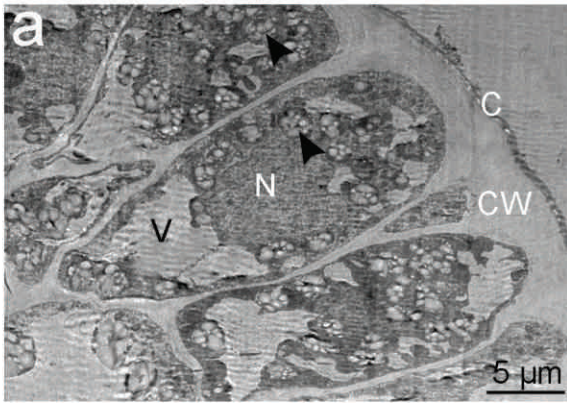




Fot. 38

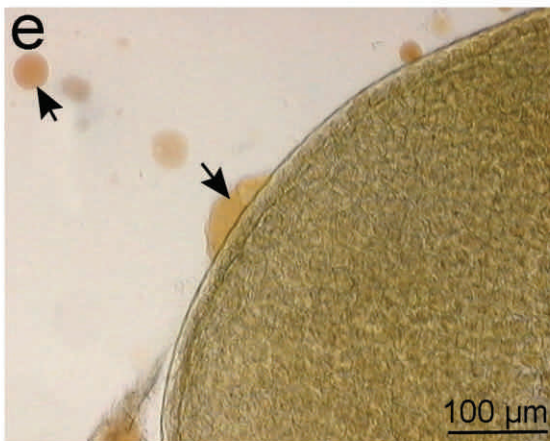
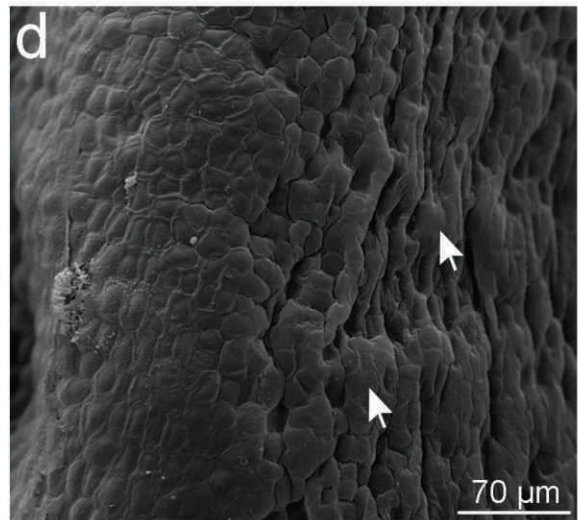
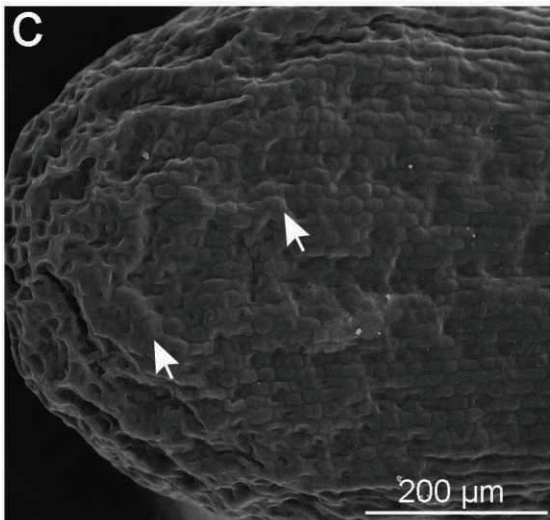
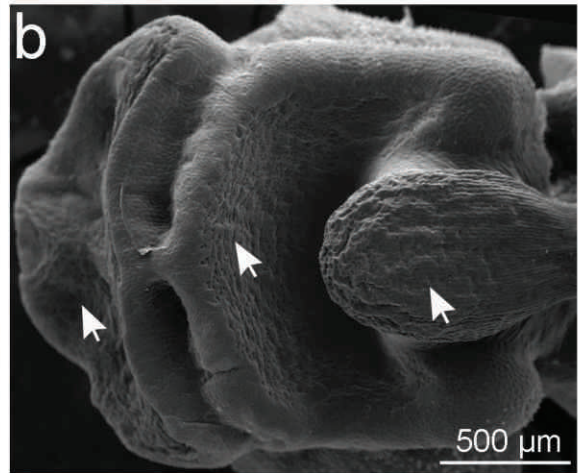
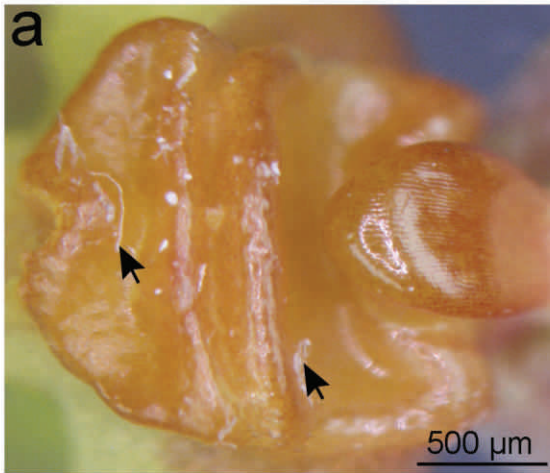




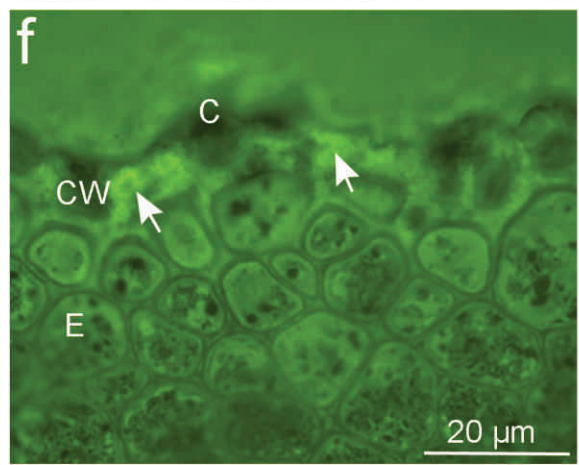
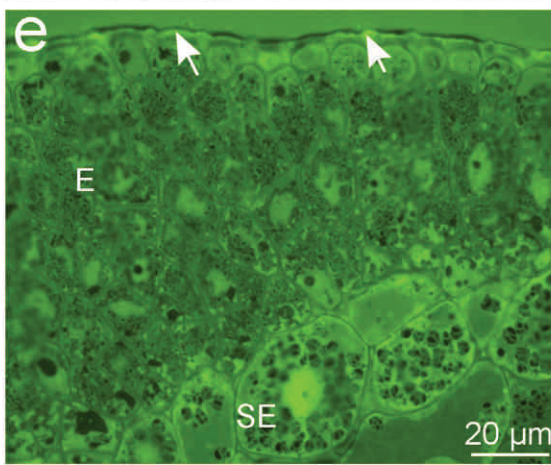
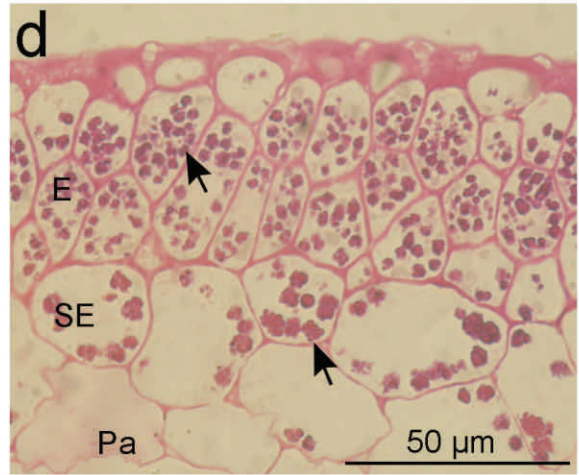
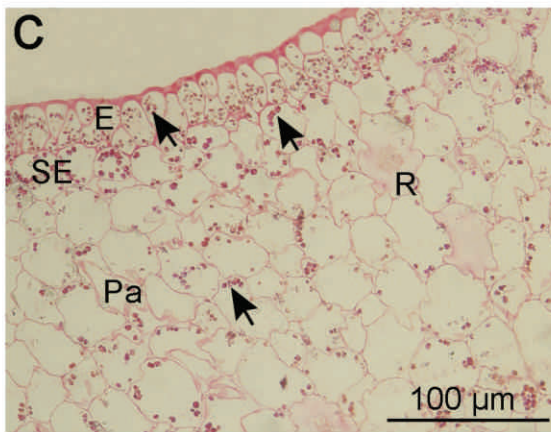
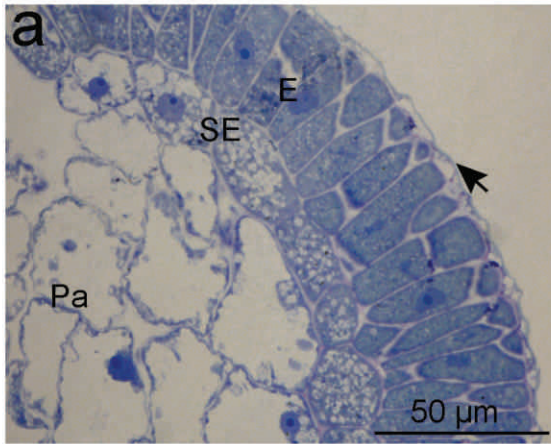




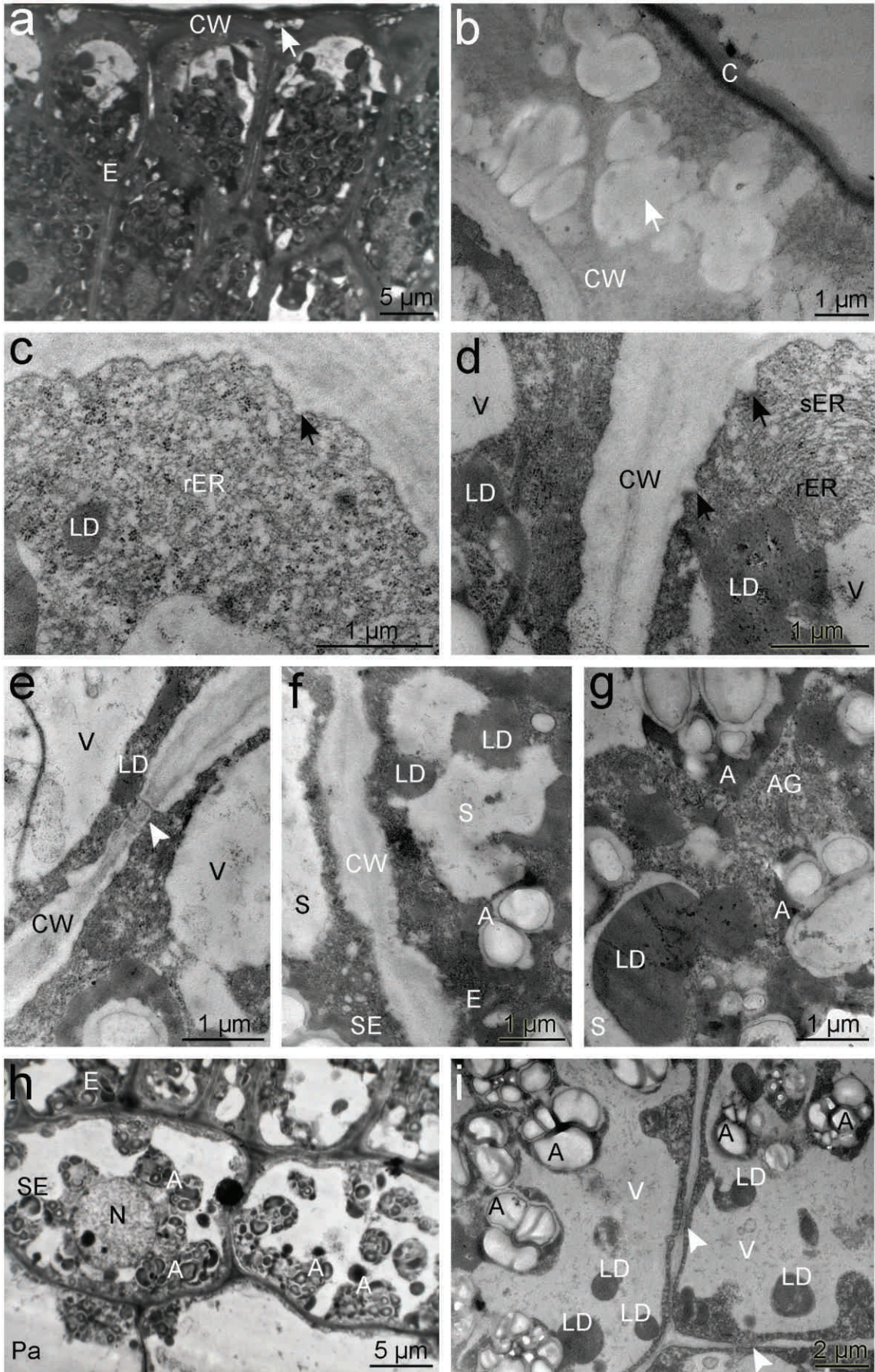
Fot. 40



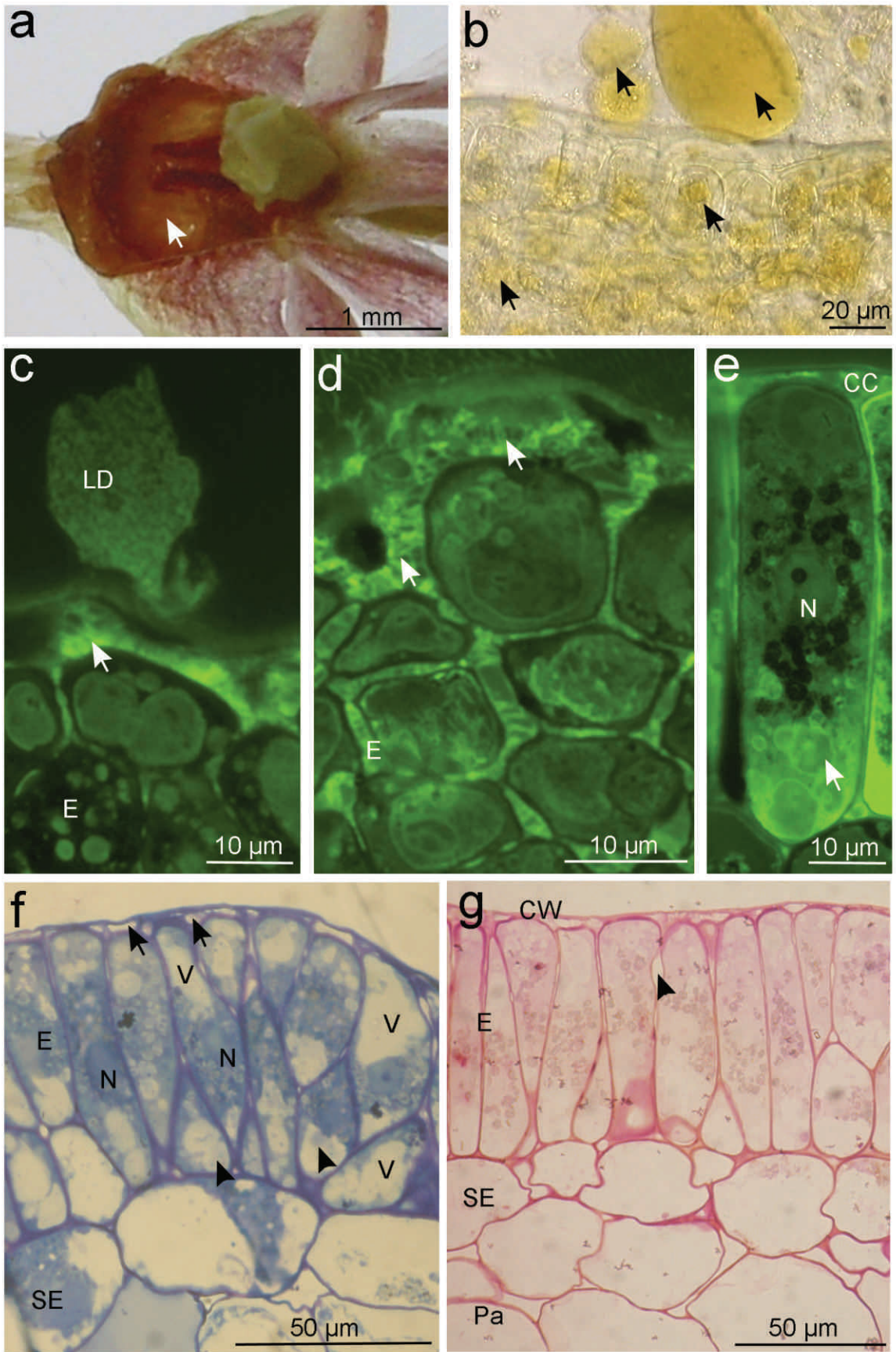
Fot. 41



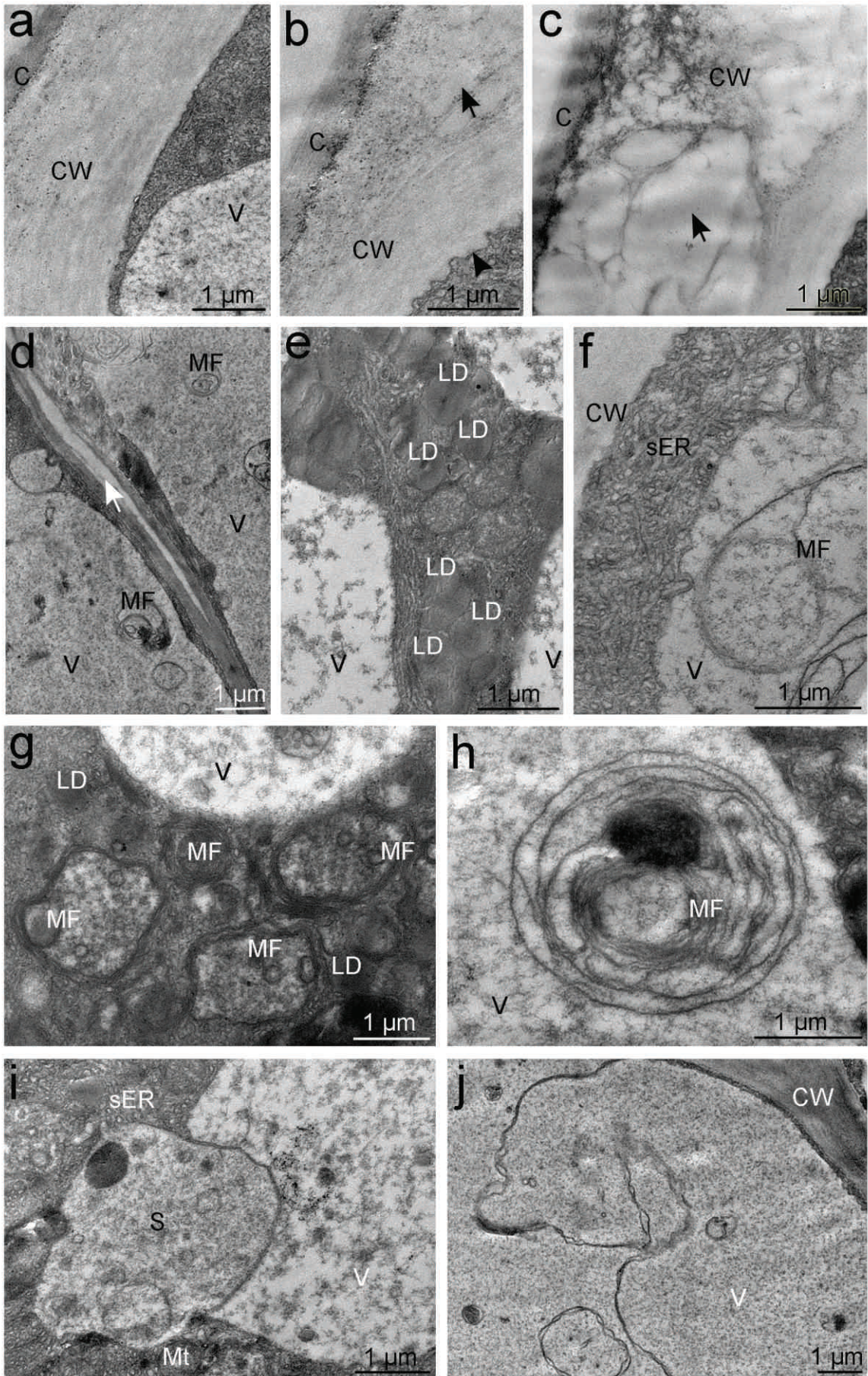














Fot. 45

