

# Experimentos de cruzamentos recíprocos como ferramenta para avaliar o isolamento reprodutivo numa zona de hibridação natural da família Orchidaceae Juss.

Reciprocal crosses as a tool to evaluate the reproductive isolation in a Orchidaceae hybrid zone

Tiago Manuel Zanfra de Melo e Gouveia\* e Fábio Pinheiro

Instituto de Botânica de São Paulo

\*Contato: tiago.melo.gouveia@gmail.com

**Resumo.** Híbridos são descendentes do cruzamento entre indivíduos de duas espécies cujas barreiras reprodutivas não estão completamente estabelecidas. Hibridação é particularmente comum em certos gêneros da família Orchidaceae.

Na Serra dos Órgãos no estado do Rio de Janeiro ocorrem em simpatria duas espécies irmãs do gênero *Epidendrum*: *E. secundum* Jacq e *E. xanthinum* Lindl, além de indivíduos com caracteres intermediários, supostos híbridos. Neste trabalho avaliamos a hipótese de hibridação e a intensidade do isolamento reprodutivo entre estas espécies. Utilizando experimentos de polinização recíproca foi possível detectar hibridação entre as espécies. O baixo sucesso reprodutivo dos híbridos formados é uma importante barreira reprodutiva que promove isolamento reprodutivo forte o suficiente para manter a coesão destas espécies.

**Palavras-chave.** Barreiras reprodutivas; *Epidendrum*; Híbridos; Sucesso reprodutivo

**Abstract.** Hybrids are individuals formed when reproductive barriers between closely related species aren't totally established, and individuals from different species cross. Hybridization is remarkably common in some genus within the Orchidaceae family.

On Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, two sister species from the genus *Epidendrum*: *E. secundum* Jacq and *E. xanthinum* Lindl occur sympatrically. Individuals with intermediate traces, supposedly hybrids, also occur. In this work, we evaluate the hypothesis of hybridization between these two species and the intensity of their reproductive isolation. It was possible to detect hybridization using experiments of reciprocal pollination. The low reproductive success observed on hybrid individuals plays a major role as a barrier that promotes reproductive isolation strong enough to maintain these two species apart.

**Keywords.** *Epidendrum*; Hybrid; Reproductive barriers; Reproductive success

## Introdução

### Zonas de hibridação

O estudo de zonas de hibridação tem ajudado Biólogos a compreender a origem e intensidade das barreiras reprodutivas entre espécies. Zonas de hibridação são regiões geográficas onde duas ou mais espécies ocorrem em simpatria (ocorrendo na mesma região), e os indivíduos de suas populações entram em contato. Diversos estudos realizados em zonas de hibridação natural entre plantas tem sido realizados tanto na América quanto na Europa, tais estudos envolvem geralmente uma abordagem multidisciplinar. Os objetivos e métodos utilizados são bastante variados e vão desde o uso de marcadores moleculares em DNA nuclear e/ou plastidial, neste caso com o objetivo de evidenciar a produção de híbridos através de identificação da estrutura genética das populações em contato (Pinheiro et al., 2010; Moraes et al., 2013;

Vega et al., 2013), até experimentos com ênfase em aspectos ecológicos como, por exemplo, identificação de agentes polinizadores (Pansarin e Amaral, 2008), em alguns casos tem sido realizados experimentos envolvendo a biologia reprodutiva, neste caso polinizações manuais são conduzidas em plantas que se encontram em cultivo em coleções biológicas para se inferir a compatibilidade reprodutiva das espécies em contato (Scopece et al., 2007; Scopece et al., 2008; Pinheiro et al., 2010; Pinheiro et al., 2013).

Em plantas é comum que espécies filogeneticamente relacionadas ocorrendo numa mesma localidade experimentem fluxo de pólen recíproco, o que pode levar a formação de descendentes de natureza híbrida. Híbridos são indivíduos que, em geral, apresentam características morfológicas intermediárias entre as características de suas espécies parentais, com genomas compostos pela mistura genética das duas espécies em questão (Cozzolino e Widmer, 2005)

Recebido: 15set14

Aceito: 08jan15

Publicado: 30jul15

Revisado por  
Déborah Yara Alves  
Cursino dos Santos  
e Anônimos

### **Conceito de espécie, isolamento reprodutivo e especiação**

A formação de um descendente viável pode, numa primeira análise, trazer dúvida quanto ao status de espécies distintas das populações que se inter cruzam. O conceito de espécie já foi alvo de muita discussão no campo da Biologia. Diversos autores propuseram uma série de enunciados distintos deste conceito, desde a sua formulação inicial por Mayr (Mayr, 1942). Com o acúmulo de conhecimento no campo da Biologia o conceito biológico de espécie se mostrou falho ou inconsistente em alguns casos. A partir daí novos autores passaram a propor novos conceitos de espécie que melhor se adequassem aos seus problemas de estudo em particular, surgiram então conceitos ecológicos, filogenéticos, evolutivos e muitos outros. Para uma reflexão mais aprofundada deste tema sugerimos a leitura de Queiroz (1996) e Coyne e Orr (2004).

Quando consideramos a diversidade de conceitos de espécie propostos, essas definições parecem ser mutuamente exclusivas e contraditórias. No entanto mais pontos de concordância do que de divergência podem ser encontrados entre os diferentes conceitos (Queiroz, 1996).

Os conceitos de espécie definem espécie como uma entidade que existe no nível populacional. Apesar de suas diferenças, todos eles afirmam, seja de uma maneira explícita ou implícita, que espécies são entidades biológicas compostas por grupos de indivíduos (Queiroz, 1996).

Outro ponto de concordância entre os conceitos de espécie é que estas entidades se mantêm existindo pela capacidade de reproduzir-se. São sempre definidas como sucessivas gerações produzidas, formando linhagens. Como consequência, deve haver um contínuo genético desde os organismos ancestrais até os atuais (Queiroz, 1996).

Os diferentes conceitos de espécie propõem ainda que espécies são entidades que se mantêm distintas de outras entidades semelhantes por mecanismos que promovem o isolamento reprodutivo entre suas populações. Estes mecanismos que previnem o inter cruzamento entre espécies são as chamadas barreiras reprodutivas (Ramsey et al., 2003; Widmer et al., 2009).

Quaisquer aspectos da biologia reprodutiva de espécies que promovam a incompatibilidade reprodutiva entre os grupos que estão em contato são considerados barreiras reprodutivas (Scopece et al., 2010). Em plantas, as barreiras reprodutivas entre espécies mais óbvias, porém não apenas, seriam: período de floração sem sobreposição, não compartilhamento de agentes polinizadores, incompatibilidade de germinação do pólen no estigma, incapacidade de formação de frutos viáveis, incapacidade de fusão de gametas, inviabilidade das sementes produzidas, inviabilidade ou infertilidade dos híbridos formados (Bradshaw et al., 1995; Lexer et al., 2005; Johnson, 2010; Greiner et al., 2011).

A instalação, manutenção e evolução das barreiras reprodutivas são elementos chaves no processo de especiação (Dobzhanski, 1970). Especiação consiste no processo biológico pelo qual novas espécies passam a existir. Em geral se assume que novas espécies são formadas a partir das espécies previamente existentes. Um grupo de indivíduos que se torne reprodutivamente isolado do grupo a que pertencia antes

deixa de compartilhar genes com este. O fato de não haver mais compartilhamento genômico entre dois grupos determina que, agora cada um tenha seu próprio trajeto evolutivo independente do outro, permite que com o passar das gerações as diferenças genéticas, ecológicas etc se aprofundem. Este processo está intimamente relacionado com a diversidade biológica encontrada na natureza (Wu, 2001; Schluter, 2009).

A especiação é um processo bastante complexo e provavelmente não depende de um único evento pontual, que determine sozinho o isolamento reprodutivo entre dois grupos que eram, até então, compatíveis para a reprodução. Diversas barreiras reprodutivas podem se instalar sequencialmente, apresentando uma grande variação em intensidade. Em alguns casos o isolamento pode ser o resultado da soma das diversas barreiras atuando sequencialmente no processo reprodutivo, sem que nenhuma delas sozinha seja a responsável pelo isolamento. Além disto, o processo evolutivo pode continuar atuando após a especiação e novas barreiras podem surgir, portanto a importância atual das barreiras entre duas espécies podem não refletir a importância histórica destas barreiras no processo de especiação (Coyne e Orr, 2004; Lowry et al., 2008).

O motivo de existirem tantas formas diferentes de se definir o que é uma espécie reside no próprio processo de especiação. Os diferentes conceitos de espécie enfocam diferentes etapas do processo de especiação. Por exemplo, o conceito biológico enfoca a capacidade de reprodução, já o conceito ecológico enfoca a zona adaptativa ocupada pelas espécies. Entretanto incompatibilidades ecológicas e reprodutivas são diferentes estágios de um processo contínuo de segregação (Sambatti et al., 2008; Schluter, 2009). A ordem em que se instalam estas incompatibilidades pode ser diferente em diferentes casos, portanto ao se utilizar um ou outro conceito de espécie podemos obter divergências quanto ao número de espécies considerado válido (Queiroz, 1996).

Zonas de hibridação oferecem uma grande oportunidade para que o processo de especiação seja estudado. É nas zonas de hibridação que as barreiras reprodutivas estão atuando e mantendo a coesão das espécies que estão em contato. Hipóteses sobre os mecanismos de especiação podem ser levantadas e testadas. Processos de especiação que ainda não foram totalmente concluídos podem ser identificados e novas ideias podem ser formuladas (Cozzolino et al., 2006; Baack e Rieseberg, 2007).

### **Zonas de hibridação na família Orchidaceae**

Hibridação é um processo bastante comum em plantas da família Orchidaceae, havendo relatos praticamente em todos os continentes onde gêneros da família ocorrem. A família Orchidaceae é uma das maiores famílias de Angiospermas e muito se discute a importância dos eventos de hibridação para a diversidade observada. Diferentes tipos de zonas de hibridação foram relatadas com diferentes consequências para as espécies envolvidas. Em alguns casos a hibridação se restringe a formação de híbridos de primeira geração (F1), configurando que a coesão das espécies é mantida apesar do inter cruzamento ser possível (Moccia et al. 2007, Cortis et al., 2009). O isolamento pode não ser completo em alguns

casos, e então pode haver a formação de híbridos de geração avançada, frutos de retrocruzamentos, isto é, cruzamentos realizados entre um indivíduo híbrido e um indivíduo pertencente a uma das espécies parentais. Neste caso algum grau de fluxo genético através da barreira das espécies pode ser detectado (Pinheiro et al. 2010; Moraes et al., 2013), sendo elementos genômicos de uma espécie encontrados no genoma de outra espécie, fenômeno conhecido como introgressão (Heiser, 1973).

### Complexo *Epidendrum secundum*: incertezas taxonômicas e hipótese de hibridação

O “complexo *Epidendrum secundum*” é um complexo de espécies, nele estão algumas das maiores incertezas taxonômicas do gênero *Epidendrum* (Brieger, 1976-1977). Tratam-se de plantas amplamente distribuídas por toda a América do Sul com elevada diversidade morfológica. O número exato de espécies é incerto e existem muitas divergências na nomenclatura. Os nomes *E. elongatum* Jacq, *E. crassifolium* Lindl, *E. ellipticum* Grah, *E. ansiferum* Rchb f, *E. versicolor* Hoehne & Schltr, *E. xanthinum* Lindl dentre outros, são tratados ora como sinônimos de *E. secundum* ora como espécies individuais.

Eventos de hibridação no gênero *Epidendrum* têm sido relatados por diversos autores (Dunsterville, 1979; Dresler, 1989; Hagsäter e Soto-Arenas, 2005; Pansarin e Amaral, 2008). A grande variação morfológica que diversos grupos de espécies possuem pode ter sido originada em eventos de hibridação, uma vez que indivíduos com morfologia floral intermediária são constantemente observados em populações simpátricas onde diferentes espécies compartilham o mesmo habitat e os mesmos polinizadores (Hagsäter e Soto-Arenas, 2005; Pansarin e Amaral, 2008; Pinheiro et al., 2010). Neste sentido, os eventos de hibridação podem ser interpretados como processos que geram a diversidade observada no grupo, inclusive podendo ocasionar o surgimento de novas linhagens e espécies. Dunsterville (1979) descreve a grande variação morfológica que é observada em populações onde *E. secundum* e *E. xanthinum* ocorrem em simpatria, onde é observada a ocorrência de indivíduos com características morfológicas intermediárias (flores em tons de laranja a creme) entre indivíduos que apresentam flores róseas (*E. secundum*) e amarelas (*E. xanthinum*) (Figura 1). Estes mesmos padrões são observados nas populações que ocorrem em determinados pontos da Floresta Atlântica, principalmente no Estado do Rio de Janeiro.

### *E. secundum* X *E. xanthinum* na Serra dos Órgãos, hipótese e objetivos do estudo

Em estudo utilizando marcadores moleculares e morfológicos (Pinheiro et al., 2009), com o intuito de revisar os limites interespecíficos e infragenéricos do complexo *E. secundum*, foi encontrado suporte a um grupo monofilético formado por *E. secundum* e *E. xanthinum*, sendo estas, então, consideradas como espécies irmãs. Em regiões onde estas espécies ocorrem em simpatria (estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais) podem ser encontradas formas com características morfológicas intermediárias, que podem ser híbridos entre *E. secundum* e *E. xanthinum*. Na Serra dos Órgãos, no município de Nova Friburgo, região serrana do estado do Rio de Janeiro, ocorre uma possível zona de hibridação entre *E. secundum* e *E. xanthinum*. Ambas as espécies e uma terceira variedade com características intermediárias são encontradas crescendo em habitat terrícola ou rupícola, inclusive em bancos de areia à beira da estrada.

Neste estudo a hipótese de hibridação entre estas espécies foi testada. Com o objetivo de quantificar a compatibilidade reprodutiva e o isolamento reprodutivo entre as espécies parentais *E. secundum* Jacq e *E. xanthinum* Lindl e entre estas e os híbridos detectados, foram realizadas diversas polinizações recíprocas, além da avaliação da viabilidade de frutos e sementes produzidos.

## Métodos

### Espécimes

No total, 22 espécimes foram utilizados em polinizações manuais, mantidos em cultivo no núcleo de pesquisas do orquidário do estado de São Paulo. Dentre estes, 9 espécimes são da espécie *E. secundum*, 8 de *E. xanthinum*, e 5 são híbridos entre as duas espécies. Todos foram coletados na região montanhosa da Serra dos Órgãos no estado do Rio de Janeiro.

Os indivíduos amostrados foram identificados visualmente pela presença de inflorescências, sendo as de *E. secundum* com coloração predominantemente rósea e uma mancha amarela na região do calus, *E. xanthinum* com coloração totalmente amarela em suas flores e híbridos com coloração variando de tons de laranja a creme com pigmentação violácea na base da coluna (Figura 1).

Os indivíduos amostrados estavam no mínimo a 5 metros de distância entre si, de forma que se evitasse a amostragem de clones.



Figura 1. Inflorescências e flores individuais desmontadas de *E. secundum* (esquerda), híbrido (centro) e *E. xanthinum* (direita) coletados na Serra dos Órgãos – RJ

### Cruzamentos manuais

Em cada cruzamento foi utilizado um par de indivíduos, selecionados pela presença de uma inflorescência saudável com um número de no mínimo dez flores. Os indivíduos de cada cruzamento foram selecionados de forma que todas as combinações possíveis entre as espécies parentais e híbridos fossem formadas, compondo seis categorias de cruzamento: *E. secundum* X *E. secundum*; *E. secundum* X *E. xanthinum*; *E. secundum* X híbrido; *E. xanthinum* X *E. xanthinum*; *E. xanthinum* X híbrido; híbrido X híbrido.

Todos os cruzamentos foram realizados de forma bidirecional, ou seja, cada indivíduo atuou como receptor e doador de pólen do seu parceiro. Em cada cruzamento três flores de uma inflorescência foram marcadas e cada uma teve sua polínia removida com estilete metálico e transferida para o estigma de uma flor do seu parceiro. As flores polinizadas tiveram seu desenvolvimento acompanhado nos meses subsequentes para que fosse verificada a formação de um fruto (Figura 2).

### Avaliação de viabilidade de frutos e sementes

Quando o fruto formado estava maduro era então coletado e aberto. As sementes obtidas de cada fruto foram mantidas sob refrigeração a 4° C por no máximo 7 dias. A viabilidade das sementes formadas foi avaliada pelo teste do tetrazólio, neste teste as semente são imersas em solução 1% de 2,3,5-trifenil tetrazólio e mantidas por 24 horas em temperatura de 30°C. Os embriões viáveis apresentam uma forte coloração vermelha e podem ser facilmente diferenciados dos embriões inviáveis, estes são identificados pela presença da testa da semente sem conteúdo ou contendo um embrião não colorido em vermelho (Figura 3). Amostras compostas por pelo menos 300 sementes de cada fruto foram analisadas sob estereomicroscópio, dispersas em solução de glicerina 50% para facilitar a individualização de cada semente. De cada fruto foram retiradas três amostras para contagens independentes.



Figura 2. Frutos de *Epidendrum* em desenvolvimento.

### Cálculos de viabilidade e índices de isolamento

A viabilidade dos frutos foi calculada pela razão entre o número de frutos formados e o número total de flores polinizadas, para cada categoria de cruzamento. O índice de isolamento reprodutivo no estágio de formação de fruto (Índice de Isolamento Reprodutivo no estágio de formação de Fruto, IRF) foi calculado como 1 menos a viabilidade dos frutos ( $IRF = 1 - [\text{número frutos viáveis} \div \text{número de flores polinizadas}]$ ). A porcentagem de sementes viáveis foi calculada pela razão entre o número de sementes viáveis e o número total de sementes computada naquela categoria de cruzamento. O índice de isolamento reprodutivo no estágio de formação de sementes viáveis (Índice de Isolamento Reprodutivo no estágio de formação de Semente, IRS) foi calculado como 1 menos a viabilidade das sementes ( $IRS = 1 - [\text{número de sementes viáveis} \div \text{número total de sementes amostradas}]$ ). Os índices de isolamento calculados desta maneira podem ter um valor entre 0 e 1. O valor 0 significa que não há isolamento reprodutivo, ou seja, a fertilidade é total neste estágio da reprodução e o maior número possível de descendentes pode ser formado entre os parentais avaliados, considerando-se apenas este estágio. Índice com valor de 1 significa isolamento total, ou seja, este estágio da reprodução não é viável e representa por si só uma importante barreira reprodutiva atuando no isolamento reprodutivo dos grupos analisados.

Os índices de isolamento IRF e IRS foram combinados de forma a se obter um único índice de isolamento correspondente aos estágios de formação de frutos e de sementes viáveis combinados (Índice de Isolamento Reprodutivo combinado nos estágios de formação de Fruto e Semente, IRFS). Neste novo índice o IRF é somado integralmente ao valor de IRS multiplicado por 1 menos IRF ( $IRFS = IRF + [(1 - IRF) \times IRS]$ ). Esta fórmula leva em consideração que a formação de frutos atua primeiro na sequência de eventos na reprodução e que o IRS somente atua limitando o número de descendentes formados a partir dos frutos viáveis ( $1 - IRF$ ).

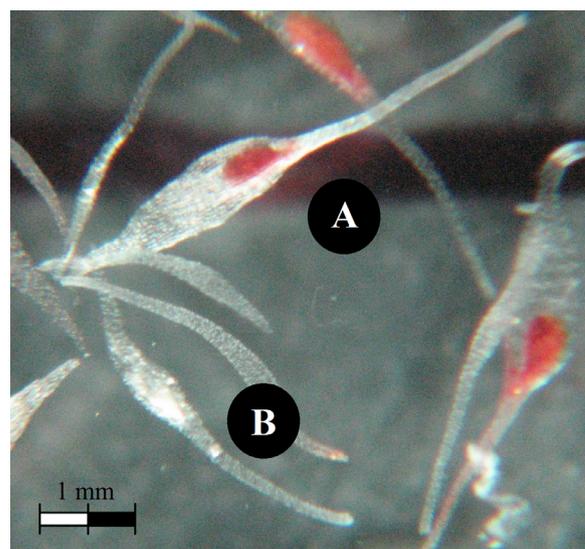


Figura 3. Resultado do teste do tetrazólio, sementes portadoras de embrião viável apresentam o embrião, estrutura arredondada com forte coloração em vermelho envolvido pela testa da semente (A). Sementes inviáveis apresentam embrião colorido em branco ou apenas a testa da semente sem embrião (B).

**Resultados**

A formação de frutos foi possível em todas as categorias de cruzamento realizadas. Considerando-se todas as polinizações realizadas, 58% delas desencadearam a formação de fruto. A viabilidade dos frutos foi elevada nos cruzamentos intraespecíficos, sendo 64,1% para *E. secundum* e 74,1% para *E. xanthinum*. Os cruzamentos interespecíficos também tiveram viabilidade elevada, 66,7% quando pólen de *E. xanthinum* foi usado em flores de *E. secundum* e 93,3% na direção oposta. Os cruzamentos envolvendo híbridos tiveram uma menor porcentagem de frutos formados, especialmente quando foi utilizado pólen híbrido (Tabela 1).

A viabilidade das sementes formadas foi elevada nos cruzamentos intraespecíficos e entre as espécies parentais variando entre 68,8% (*E. secundum* -> *E. secundum*) e 83,8% (*E. xanthinum* -> *E. xanthinum*). Nenhuma semente viável foi produzida nos cruzamentos de híbridos entre si. A viabilidade das sementes formadas nos cruzamentos entre híbridos e parentais foi baixa variando entre 7,4% e 14%. Esse padrão curiosamente não foi observado quando pólen híbrido foi usado em flores de *E. xanthinum* caso em que a viabilidade das sementes foi de 39,9% (Tabela 2).

Os índices de isolamento calculados revelam a baixa viabilidade reprodutiva dos híbridos. Nos cruzamentos em que híbridos participaram, o IRFS obteve valores muito próximos a 1 (isolamento total), variando entre 0,93 e 1, exceto nos cruzamentos em que pólen híbrido foi usado para polinizar flores de *E. xanthinum*. Neste caso, o IRFS teve valor 0,65. Nos cruzamentos intraespecíficos e interespecíficos este índice variou entre 0,35 e 0,56 (Tabela 3).

**Discussão**

A hipótese de hibridação entre *E. secundum* e *E. xanthinum* foi confirmada pelos dados obtidos nas polinizações realizadas entre as duas espécies. O IRFS encontrado entre *E. secundum* e *E. xanthinum* é semelhante ao encontrado nos cruzamentos intraespecíficos (Tabela 3), o que indica uma provável formação de indivíduos híbridos de primeira geração (F1) quando as populações ocorrem em simpatia, como é observado na Serra dos Órgãos. A hibridação ocorre de forma bidirecional, ambas as espécies podem atuar

como receptoras ou doadoras de pólen para a outra. Estes resultados reforçam a visão de que barreiras reprodutivas que evitam a transferência de pólen são fracas entre espécies de orquídeas que realizam polinização por engodo alimentar e compartilham agentes polinizadores. As barreiras reprodutivas que garantem o isolamento reprodutivo entre essas espécies são principalmente as que atuam em fases posteriores da reprodução, ou reduzindo a viabilidade ou fertilidade dos híbridos formados (Scopece et al., 2007).

No estudo aqui apresentado, o isolamento reprodutivo entre as espécies é mantido principalmente pelo baixo sucesso reprodutivo dos híbridos formados. O IRFS nos cruzamentos envolvendo híbridos entre si tem valor de 1, ou seja, o isolamento é completo e não se podem formar descendentes quando ambos os parentais são híbridos. Os cruzamentos envolvendo híbridos e parentais tem um nível de sucesso tão baixo, que a formação de descendentes destes cruzamentos deve ser incipiente quando comparado com a produção de descendentes de cruzamentos intraespecíficos ou interespecíficos (Tabela 3). Como sempre são necessários parentais envolvidos nos cruzamentos para que estes tenham elevada viabilidade e como os híbridos resultantes dos cruzamentos interespecíficos tem baixa fertilidade a continuidade das espécies parentais na Serra dos Órgãos depende dos cruzamentos intraespecíficos realizados. Sendo assim, o limite entre as espécies está bastante definido e a hipótese de que *E. secundum* e *E. xanthinum* consistem em duas espécies distintas encontra grande suporte em nossos resultados (Pinheiro et al., 2009).

Apesar do isolamento detectado, existe a possibilidade de que elementos ou regiões genômicas de uma espécie possam cruzar a barreira reprodutiva e serem transferidos para o genoma da outra espécie. Este fenômeno é chamado introgressão e já foi descrito anteriormente entre espécies próximas de orquídeas (Soliva e Widmer, 2003; Pinheiro et al., 2010). Os dados sugerem que, apesar de pouco provável, é possível se formar um descendente de natureza híbrida de geração tardia, ou seja, um híbrido que seja retrocruzado com uma das espécies parentais poderia gerar um descendente. Se este descendente for retrocruzado com a mesma espécie parental e então este fenômeno ocorrer por diver-

Tabela 1. Porcentagem de frutos viáveis formados para cada categoria de cruzamento realizado.

		doador de pólen		
		<i>E.sekundum</i>	híbrido	<i>E. xanthinum</i>
receptor de pólen	<i>E. secundum</i>	64,1%	11,1%	66,7%
	híbrido	74,1%	18,5%	88,9%
	<i>E.xanthinum</i>	93,3%	88,9%	74,1%

Tabela 2. Porcentagem de sementes portadoras de embrião viável para categoria de cruzamento realizado.

		doador de pólen		
		<i>E.sekundum</i>	híbrido	<i>E. xanthinum</i>
receptor de pólen	<i>E. secundum</i>	68,8%	14,0%	83,8%
	híbrido	9,0%	0,0%	7,4%
	<i>E.xanthinum</i>	69,9%	39,9%	79,3%

Tabela 3. Índice de Isolamento Reprodutivo combinado dos estágios formação de Fruto e viabilidade das Sementes (IRFS) para cada categoria de cruzamento realizado. Nota: valor igual a 1 indica isolamento total e valor igual a 0 indica ausência de isolamento, ou seja, fertilidade total.

		doador de pólen		
		<i>E.sekundum</i>	híbrido	<i>E. xanthinum</i>
receptor de pólen	<i>E. secundum</i>	0,56	0,98	0,44
	híbrido	0,93	1,00	0,93
	<i>E.xanthinum</i>	0,35	0,65	0,41

sas gerações, pode ser formado um indivíduo pertencente à uma das espécies parentais mas com alguns elementos genômicos da outra. Isto parece ser especialmente verdade quando se considera a possibilidade de introgressão sobre a espécie *E. xanthinum*, visto que nos cruzamentos em que pólen híbrido foi utilizado para fecundar flores de *E. xanthinum* o IRFS apresentou valor de 0,65 (Tabela 3), bem inferior aos demais cruzamentos envolvendo híbridos e com valor próximo ao observado nos cruzamentos intraespecíficos e interespecíficos.

## Conclusão

A execução de cruzamentos manuais se mostra um procedimento experimental bastante simples e interessante para avaliar a natureza e intensidade do isolamento reprodutivo em zonas de hibridação naturais. Em conjunto com outros trabalhos (Marques et al., 2014) isto reforça a importância da manutenção de coleções biológicas com espécimes vivos e em cultivo como as encontradas nos Jardins Botânicos.

Os resultados obtidos corroboram a possibilidade de intercruzamento e produção de híbridos de primeira geração (F1) viáveis, porém sub-férteis entre *E. secundum* e *E. xanthinum* na Serra dos Órgãos. A formação de outras categorias de híbridos, como híbridos de segunda geração e introgressantes, frutos de retrocruzamentos entre híbridos e parentais não pode ser verificada apenas com estes resultados. Análises complementares utilizando marcadores moleculares em DNA poderiam ajudar a compreender tanto a categoria dos híbridos coletados, quanto verificar se existe introgressão entre estas espécies (Pinheiro et al., 2010; Pinheiro et al., 2013; Vega et al., 2013; Marques et al., 2014). Análises desta natureza, utilizando microssatélites como marcadores moleculares no DNA nuclear e plastidial estão sendo executadas pelo nosso grupo de pesquisa.

Em especial, a análise de marcadores moleculares no DNA nuclear pode revelar a estrutura genética da população. Seria então possível caracterizar indivíduos pertencentes às espécies parentais e híbridos com maior segurança (Burgarella et al., 2009; Pinheiro et al., 2010). Como os fenótipos formam um gradiente contínuo de cores, alguns indivíduos podem ter sido identificados erroneamente como híbridos ou parentais. Isto poderia explicar, por exemplo, porque o IRFS foi tão elevado em *E. secundum*: talvez alguns indivíduos híbridos sub-férteis tenham sido classificados erroneamente como *E. secundum*, elevando o índice. Da mesma maneira, erros na identificação de indivíduos de *E. xanthinum*, que tenham sido classificados como híbridos, poderiam explicar o baixo IRFS entre pólen híbrido e flores de *E. xanthinum*. O erro na classificação pode ter aumentado a compatibilidade dos cruzamentos, reduzindo artificialmente o índice de isolamento.

## Agradecimentos

Agradecemos à FAPESP (Fundo de Amparo à Pesquisa de São Paulo) pelo financiamento realizado para as viagens de campo e materiais de laboratório dos experimentos.

## Referências

- Baack EJ, Rieseberg LH. 2007. A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Current opinion in genetics & development* 17:513-518.
- Bradshaw HD, Wilbert SM, Otto KG, Schemske DW. 1995. Genetic mapping of floral traits associated with reproductive isolation in Monkeyflowers (*Mimulus*). *Nature* 376:762-765.
- Brieger FG. 1976-1977. Gattungsreihe Epidendrea. In: Brieger FG, Maatsch R, Senghas K, editors. *Schlechter, Die Orchideen*. Berlin: Paul Parey, p.509-549.
- Burgarella C, Lorenzo Z, Jabbour-Zahab R, Lumaret R, Guichoux E, Petit RJ, Soto A, Gil L. 2009. Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Heredity* 102:442-452.
- Cortis P, Vereecken NJ, Schiestl FP, Barone-Lumaga MR, Scrugli A, Cozzolino S. 2009. Pollinator convergence and the nature of species boundaries in sympatric Sardinian *Ophrys* (Orchidaceae). *Annals of botany* 104:497-506.
- Coyne JA, Orr Ha. 2004. *Speciation*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Cozzolino S, Widmer A. 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution* 20:487-494.
- Cozzolino S, Nardella AM, Impagliazzo S, Widmer A, Lexer C. 2006. Hybridization and conservation of mediterranean orchids: should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biological conservation* 129:14-23.
- Dressler RL. 1989. Will the real *Epidendrum ibaguense* please stand up? *American orchid society bulletin* 58:796-800.
- Dobzhansky T. 1970. *Genetics of the evolutionary process*. New York: Columbia University Press.
- Dunsterville GC. 1979. Orchids of venezuela - *Epidendrum elongatum*. *American orchid society bulletin* 48:447-454.
- Greiner S, Rauwolf U, Meurer J, Herrmann RG. 2011. The role of plastids in plant speciation. *Molecular ecology* 20:671-691.
- Hágsater E, Soto-arenas MA. 2005. *Epidendrum L.* In: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN, editors. *Genera Orchidacearum vol 4*. Oxford: Oxford University Press p236-251.
- Heiser GB. 1973. Introgression re-examined. *The Botanical Review* 39:347-366.
- Johnson NA. 2010 Hybrid incompatibility genes: remnants of a genomic battlefield? *Trends in genetics* 26:317-325.
- Lexer C, Fay MF, Joseph JA, Nica M-S, Heinze B. 2005. Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. *Molecular ecology* 14:1045-1057.
- Lowry DB, Modliszewski JL, Wright KM, Wu CA, Willis JH. 2008. The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philosophical transactions of the royal society of London (series b: biological sciences)* 363:3009-3021.
- Marques I, Draper D, Riofrío L, Naranjo C. 2014. Multiple hybridization events, polyploidy and low postmating isolation entangle the evolution of neotropical species of *Epidendrum* (Orchidaceae). *BMC Evolutionary biology* 14:1-14.
- Mayr E. 1942. *Systematics and the origin of species*. New York: Columbia University Press.
- Moccia MD, Widmer A, Cozzolino S. 2007. The strength of reproductive isolation in hybridizing food deceptive orchids. *Molecular ecology* 16:2855-2866.
- Moraes AP, Chinaglia M, Palma-Silva C, Pinheiro F. 2013.

- Interploidy hybridization in sympatric zones: the information of *Epidendrum fulgens* x *E. puniceoluteum* hybrids (Epidendroideae, Orchidaceae). *Ecology and evolution* 3:3824-3837.
- Pansarin ER, Amaral MCE. 2008. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology* 10:211-219.
- Pinheiro F, Koehler S, Corrêa AM, Salatino MLE, Salatino A, Barros F. 2009. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *amphiglottium* (Laellinae, Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 283:165-177.
- Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Meyer D, Fay MF, Suzuki RM, Lexer C, Cozzolino S. 2010. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* 19:3981-3994.
- Pinheiro F, Cozzolino S, Barros F, Gouveia TMZM, Suzuki RM, Fay MF, Palma-Silva C. 2013. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. *Evolution* 67:2024-2039.
- Queiroz K. 1996. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: a conceptual unification and terminological recommendations. In: Howard DJ, Berlocher SH, editors. *Endless forms: species and speciation*. Oxford: Oxford University Press p57-75.
- Ramsey J, Bradshaw HD, Schemske DW. 2003. Components of reproductive isolation between the Monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution* 57:1520-1534.
- Sambatti JBM, Ortiz-Barrientos D, Baack EJ, Rieseberg LH. 2008. Ecological selection maintains cytonuclear incompatibilities in hybridizing sunflowers. *Ecology Letters* 11:1082-1091.
- Schluter D. 2009. Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science* 323:737-741.
- Scopece G, Musacchio A, Widmer A, Cozzolino S. 2007. Patterns of reproductive isolation in mediterranean deceptive orchids. *Evolution* 61:2623-2642.
- Scopece G, Widmer A, Cozzolino S. 2008. Evolution of postzygotic reproductive isolation in a guild of deceptive orchids. *The American Naturalist* 171:315-326.
- Scopece G, Lexer C, Widmer A, Cozzolino S. 2010. Polymorphism of postmating reproductive isolation within plant species. *Taxon* 59:1367-1374.
- Soliva M, Widmer A. 2003 Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive Ophrys (Orchidaceae) species. *Evolution* 57:2252-2261.
- Vega Y, Marques I, Castro S, Loureiro J. 2013. Outcomes of extensive hybridization and introgression in *Epidendrum* (Orchidaceae): can we rely on species boundaries? *Plos One* 8:1-13.
- Widmer A, Lexer C, Cozzolino S. 2009. Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity* 102:31-38.
- Wu C-I. 2001. The genic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology* 14:851-865.