

TIAGO MANUEL ZANFRA DE MELO E GOUVEIA

**Hibridação e isolamento reprodutivo entre
Epidendrum secundum Jacq e *E. xanthinum*
Lindl (Orchidaceae) na Serra dos Órgãos –
RJ**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2014

TIAGO MANUEL ZANFRA DE MELO E GOUVEIA

**Hibridação e isolamento reprodutivo entre
Epidendrum secundum Jacq e *E. xanthinum*
Lindl (Orchidaceae) na Serra dos Órgãos –
RJ**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR: DR. FÁBIO PINHEIRO

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Gouveia, Tiago Manuel Zanfra de Melo e
G719h Hibridação e isolamento reprodutivo entre *Epidendrum secundum* Jacq e *E. xanthinum* Lindl (Orchidaceae) na Serra dos Órgãos - RJ / Tiago Manuel Zanfra de melo e Gouveia -- São Paulo, 2014.
50 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2014

Bibliografia.

1. Orchidaceae. 2. Microsatélites. 3. Biologia reprodutiva. I. Título

CDU: 582.594.2

“Nunca o homem inventará nada mais simples nem mais belo do que uma manifestação da natureza. Dada a causa, a natureza produz o efeito no modo mais breve em que pode ser produzido.”

Leonardo da Vinci

Agradecimentos:

Ao Dr. Fábio Pinheiro, que tão generosamente dividiu comigo sua paixão pela evolução e pelos fenômenos da natureza, pela orientação, paciência infinita, gentileza sem igual e disposição em ensinar, discutir e ajudar.

À minha mãe, Claudia Zanfra, pelos valores que norteiam minhas escolhas, carinho e amor incondicional.

À minha avó, Anna Flora, meu maior exemplo de como agir na vida.

Aos meus irmãos Antônio e Giovani, por me ensinarem a conviver e pelo apoio.

À Maira Neves, quem me conhece mais profundamente e mesmo assim ainda me ama, companhia para todos os momentos.

Ao Dr. Sérgio Rosso, exemplo do que significa ser professor.

Aos amigos Carlos Tomba, Danilo Policastro, Felipe Paiva, Marcos Mori, Márcio Novaes, Rogério Vogt, Hamilton Bigatão, Fabrício Leotti, Daniel Stuginski, Ricardo Teles, Giancarlo Mucciolo, meus doze apóstolos.

À Dra. Clarisse Palma da Silva, pelo apoio e pelo acesso ao Laboratório de Biologia Molecular.

Ao Dr. Rogério Suzuki, pelos materiais indispensáveis para as horas de análises de sementes e acesso ao Laboratório de Micro propagação de Sementes do Orquidário.

Às pós-graduandas Monique e Poliana, pelas contagens de sementes e fotos de tubos polínicos.

A toda equipe de professores, pesquisadores, pós-graduandos e funcionários do Orquidário do Estado, muita simpatia, disposição para ajudar, conselhos, cafés e papos do dia a dia.

À comissão de pós-graduação do Instituto de Botânica, por todo o apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

Lista de Tabelas

Tabela 1- Variabilidade genética nas populações simpátricas de <i>E. secundum</i> , <i>E. xanthinum</i> e híbridos.....	32
Tabela 2- Variabilidade genética nos loci nucleares de marcadores microssatélites.....	33
Tabela 3- Resultados das simulações realizadas no programa STRUCTURE.....	34
Tabela 4- Índice de diversidade (F_{ST}) calculado par a par.....	35
Tabela 5- Haplótipos dos microssatélites plastidiais.....	36
Tabela 6- Porcentagem de indivíduos classificados erroneamente nas simulações com o STRUCTURE.....	37
Tabela 7- Índices de isolamento dos indivíduos utilizados em cruzamentos.....	38
Tabela 8- Índice de isolamento reprodutivo entre <i>E. secundum</i> , <i>E. xanthinum</i> e híbridos.....	39

Lista de Figuras

Figura 1- Probabilidade posterior atribuída pelo STRUCTURE nas populações.....	40
Figura 2- Rede de Haplótipos do DNA plastidial.....	41

Lista de abreviações

BCsec:	população virtual de híbridos introgressantes sobre E. secundum.
BCxan:	população virtual de híbridos introgressantes sobre E. xanthinum.
EHW:	equilíbrio de Hardy-Weinberg.
f :	coeficiente de endocruzamento.
F:	índice de isolamento no estágio de formação de fruto.
Ff:	índice de isolamento no componente feminino no estágio de formação de fruto.
Fm:	índice de isolamento no componente masculino no estágio de formação de fruto.
FS:	índice de isolamento combinado dos estágios de formação de fruto e sementes viáveis.
FSf:	índice de isolamento no componente feminino combinado dos estágios de formação de fruto e sementes viáveis.
FSm:	índice de isolamento no componente masculino combinado dos estágios de formação de fruto e sementes viáveis.
F_{ST} :	índice de diversidade genética entre grupos.
H_E :	heterozigosidade esperada.
HF1:	população virtual de híbridos de primeira geração.
HF2:	população virtual de híbridos de segunda geração.
H_O :	heterozigosidade observada.
PBsec:	população virtual de parentais de E. secundum.
PBxan:	população virtual de parentais de E. xanthinum.
q :	probabilidade posterior de um indivíduo pertencer a um agrupamento genético.
S:	índice de isolamento no estágio de formação de sementes viáveis.
Sf:	índice de isolamento no componente feminino no estágio de formação de sementes viáveis.
Sm:	índice de isolamento no componente masculino no estágio de formação de sementes viáveis.
tq :	nota de corte ou valor de atribuição, valor limite para se considerar um indivíduo como pertencente à espécie parental ou híbrido.

Lista de programas utilizados

FSTAT: análise estatística populacional

GENEPOP: análise estatística populacional

HYBRIDLAB: cria populações virtuais usadas em simulações

MSA: parâmetros de diversidade

NETWORK: constrói rede de haplótipos

STRUCTURE: teste de atribuição bayesiana

Resumo

Zonas de hibridação natural tem sido alvo de estudos para melhor compreender os fenômenos de especiação, hibridação e introgressão. Diversas espécies da família Orchidaceae apresentam fracas barreiras reprodutivas pré-cruzamento, especialmente quando realizam polinização por engodo alimentar. A baixa especificidade do polinizador permite transferência de pólen entre espécies diferentes, o que leva a formação de híbridos. Neste contexto, o isolamento reprodutivo entre espécies distintas envolve diversas barreiras, que atuam em diferentes etapas da reprodução. A intensidade de tais barreiras é muito variável de grupo para grupo, podendo nenhuma delas ser completa, mas o conjunto delas pode determinar um grau de isolamento reprodutivo suficiente para garantir a coesão das espécies. Em muitos casos a existência de híbridos não significa que exista fluxo gênico entre as espécies, porque outras barreiras podem atuar mantendo a coesão das espécies parentais. Marcadores moleculares de regiões neutras do DNA nuclear e plastidial têm sido frequentemente empregados para caracterizar a estrutura genética e padrões de diversidade em zonas de hibridação natural. Neste estudo, uma extensa zona de hibridação natural entre duas espécies de orquídeas, *Epidendrum secundum* e *E. xanthinum* foi investigada, localizada na Serra dos Órgãos, região serrana do Rio de Janeiro. Indivíduos de ambas as espécies parentais e supostos indivíduos híbridos foram analisados utilizando marcadores microssatélites nucleares e plastidiais, e cruzamentos recíprocos foram conduzidos com espécimes em cultivo. Foi observada uma grande viabilidade nos cruzamentos interespecíficos utilizando indivíduos de *E. secundum* e *E. xanthinum*. Porém, a presença de barreiras pré-zigóticas (ausência de formação de frutos) e pós-zigóticas (inviabilidade de sementes) foi observada nos cruzamentos envolvendo apenas híbridos, e entre espécimes parentais e híbridos. O teste de atribuição Bayesiana do programa STRUCTURE revelou a natureza híbrida dos indivíduos com caracteres intermediários e também de alguns indivíduos classificados morfologicamente como pertencentes às espécies parentais. Foram identificados 42 híbridos com haplótipos do DNA plastidial tanto de *E. secundum* quanto de *E. xanthinum*, indicando que a hibridação é bastante comum e ocorre de forma bidirecional. A ausência de compartilhamento de haplótipos entre as espécies parentais, e a baixa fertilidade dos cruzamentos envolvendo híbridos sugere que a hibridação entre *E. secundum* e *E. xanthinum* se restringe a formação de indivíduos F₁, e que a introgressão entre as espécies é pouco provável. Isto indica que barreiras reprodutivas pós-zigóticas de ação tardia, podem desempenhar um papel importante na coesão destas espécies.

Abstract

Hybrid zones have been investigated to better understand the phenomena of speciation, hybridization and introgression. Several species of Orchidaceae show weak pre-mating reproductive barriers, especially those with food deceptive pollination mechanism. The low pollinator specificity enables pollen transfer between species, leading to formation of hybrids. The reproductive isolation (RI) involves several barriers acting at different stages of reproduction. The strength of these barriers varies widely among taxa, although none of them needs to be complete, combined they can determine reproductive isolation. In many cases the existence of hybrids does not mean that there is gene flow across species barriers, because alternative components of RI can act as complementary barriers, keeping species cohesion. Neutral molecular markers from nuclear and plastid DNA regions have been frequently used to characterize the genetic structure and diversity patterns in natural hybrid zones. In this study, an extensive area of natural hybridization between two species of orchids, *Epidendrum secundum* and *E. xanthinum* was investigated, located in Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro state. Individuals of both parental species and putative hybrid were analyzed using nuclear and plastid microsatellite markers. Additionally, reciprocal hand pollination was conducted in specimens at controlled conditions. High viability was observed in interspecific crosses using individuals of *E. secundum* and *E. xanthinum*. However, the presence of prezygotic barriers (low fruit set) and postzygotic (low seed viability) was observed in crosses between hybrid individuals, and between parental and hybrid crosses. The Bayesian assignment tests, performed on STRUCTURE program, revealed the hybrid nature of individuals with intermediate characters and some individuals classified morphologically as belonging to the parental species. Forty-two hybrids were identified, with plastid DNA haplotypes of both parental species, thus indicating that the hybridization is very common and occurs in a bidirectional pattern. The absence of shared haplotypes between parental species and low fertility of hybrid plants suggests that hybridization between *E. secundum* and *E. xanthinum* is restricted to the formation of F₁ individuals, suggesting that introgression is absent or rare. This indicates that late postzygotic reproductive barriers, such as hybrid sterility, may play an important role in maintaining the cohesion of these orchid species.

Índice

1. Introdução	1
2. Materiais e métodos	7
2.1. Espécimes.....	7
2.2. Marcadores microssatélites nucleares e plastidiais	7
2.2.1. Análise dos dados – teste de atribuição a partir de marcadores nucleares	7
2.2.2. Análise dos dados – diversidade genética dos marcadores nucleares	8
2.2.3. Análise dos dados – rede de haplótipos de marcadores plastidiais	8
2.3. Simulações para avaliação de performance do programa STRUCTURE	9
2.4. Biologia Reprodutiva	11
2.4.1. Cruzamentos.....	11
2.4.2. Análise de frutos e sementes	12
2.4.3. Cálculo dos índices de isolamentos.....	12
3. Resultados	15
3.1. Marcadores microssatélites nucleares e plastidiais	15
3.1.1. Análise dos dados – teste de atribuição a partir de marcadores nucleares	15
3.1.2. Análise dos dados – diversidade genética dos marcadores nucleares	15
3.1.3. Análise dos dados – rede de haplótipos de marcadores plastidiais	16
3.2. Simulações para avaliação de performance do programa STRUCTURE	16
3.3. Biologia reprodutiva.....	17
4. Discussão.....	19
4.1. Hibridação entre populações simpátricas de <i>E. secundum</i> e <i>E. xanthinum</i> na Serra dos Órgãos	19
4.2. Apesar da hibridação detectada, não há evidência de introgressão entre <i>E. secundum</i> e <i>E. xanthinum</i>	20
4.3. O isolamento reprodutivo entre populações simpátricas de <i>E. secundum</i> e <i>E. xanthinum</i> pode existir devido à contribuição cumulativa de diversas barreiras, sem que nenhuma delas seja completa	21
4.4. Depressão por alogamia em <i>E. secundum</i> e <i>E. xanthinum</i>	23
5. Referências Bibliográficas	25
Tabelas e Figuras.....	32

1. Introdução

O isolamento reprodutivo desempenha um papel fundamental no processo de especiação, ou seja, a forma como novas espécies são formadas na evolução dos sistemas biológicos (Mayr 1942; Dobzhansky 1970; Coyne & Orr 2004). Embora existam controvérsias sobre a melhor forma de definir o que é uma espécie, a grande maioria das definições considera a existência de alguma limitação do fluxo gênico entre linhagens relacionadas que compartilham um ancestral em comum (Queiroz 1996). A limitação do fluxo gênico é imposta, em geral, pela existência de barreiras reprodutivas entre as espécies. Tais barreiras podem atuar em diferentes etapas da reprodução e podem envolver diversas particularidades da biologia reprodutiva dos organismos que os tornam reprodutivamente incompatíveis. No caso de populações de plantas podem ser destacados alguns fatores que afetam a intensidade das barreiras reprodutivas, tais como sobreposição do período de floração, o compartilhamento de agentes polinizadores, compatibilidade do pólen com o gineceu, viabilidade das sementes, capacidade de germinação, capacidade de desenvolvimento e viabilidade dos descendentes produzidos nas gerações seguintes etc (Ramsey *et al.* 2003). As barreiras reprodutivas são separadas em duas categorias: a) barreiras pré-zigótica, que atuam prevenindo o encontro dos gametas e a formação do zigoto; b) barreiras pós-zigóticas, que atuam após a união dos gametas. A importância relativa das diversas barreiras difere muito de táxon para táxon (Lowry *et al.* 2008; Widmer *et al.* 2009) e a atual importância de cada barreira pode não refletir a sua importância histórica (Coyne & Orr 2004). Isto significa que duas linhagens que hoje estão isoladas devido à divergência de agentes polinizadores, por exemplo, podem ter inicialmente compartilhado polinizadores e seu processo de isolamento pode ter se iniciado com a adaptação diferencial a diferentes habitats, ou com a incompatibilidade do pólen com o gineceu ou qualquer outro fator que gere isolamento reprodutivo.

As bases genéticas e moleculares do isolamento reprodutivo têm sido amplamente estudadas em animais e plantas. Grande parte da investigação conduzida até o momento busca por genes que contribuam majoritariamente com a formação de barreiras reprodutivas, tais como genes que determinem morfologia floral, produção de feromônios, adaptação diferencial ao ambiente dentre outros que também sejam passíveis de sofrer seleção natural (Bradshaw *et al.* 1995; Lowry *et al.* 2008; Schluter 2009; Widmer *et al.* 2009). Entretanto, mudanças recentes nos paradigmas da Biologia

Evolutiva e da Genética de Populações têm impulsionado novos estudos e novas maneiras de direcionar questionamentos evolutivos. Impulsionada inicialmente pelo advento da Teoria Neutra para Evolução Molecular (Kimura 1983) e posterior desenvolvimento da mesma teoria pela comunidade científica (Ohta 1992; Ohta & Gillespie 1996; Fay *et al.* 2002; Nei *et al.* 2010), a mudança na visão de que os genomas de duas espécies proximamente relacionadas podem coexistir em simpatria e manter sua integridade, mesmo que ocorra fluxo gênico entre estas espécies, teve um forte impacto no estudo da Evolução (Wu 2001; Coyne & Orr 2004). O uso de marcadores moleculares neutros, tais como microssatélites, ALFP (Amplified Length Fragment Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SNP (Single Nucleotide Polymorphism) dentre outros são importantes ferramentas para a caracterização da estrutura genética das populações naturais de plantas e animais (Zhang & Hewitt 2003; Schlötterer 2004; Holderegger *et al.* 2006; Pessoa *et al.* 2012). Desta forma, abordagens multidisciplinares são fundamentais para o estudo de zonas de hibridação, uma vez que altos níveis de misturas genéticas entre espécies não indicam, necessariamente, que as barreiras reprodutivas são fracas ou inexistentes (Widmer *et al.* 2009). Nestes casos, o isolamento reprodutivo pode estar ligado a um número limitado de regiões do genoma, as quais não são detectáveis através da utilização de marcadores neutros, sendo necessária a realização de testes complementares, como experimentos de compatibilidade reprodutiva, análise da viabilidade de híbridos e transplantes recíprocos. Como o processo de especiação é complexo, diversos passos, ou sub-processos, estão envolvidos na separação e manutenção dos genomas de linhagens que venham a constituir novas espécies. As barreiras reprodutivas que se instalam nem sempre são completas, especialmente em certos gêneros de plantas. Portanto, linhagens que estejam em especiação ou que tenham passado por uma divergência recente devem apresentar entre si algum grau de isolamento reprodutivo, mas também algum grau de fluxo genético interespecífico (Queiroz 1996; Coyne & Orr 2004; Widmer *et al.* 2009; Xu *et al.* 2011). Desde que o fluxo genético não seja substancial, e mais importante, desde que a possibilidade de fusão dos genomas em um só tenha sido perdida a hipótese de existência de duas espécies deve encontrar grande suporte. Desta forma o limite entre os genomas de espécies proximamente relacionadas, com ancestral comum recente pode ser poroso e certas regiões genômicas podem atravessar o limite da espécie (Wu 2001). Neste cenário, as regiões genômicas ligadas ao surgimento e manutenção de barreiras

reprodutivas seriam menos sujeitas ao fluxo gênico entre espécies distintas, revelando uma maior diferenciação genética.

Zonas de hibridação naturais, localidades onde ocorre o contato entre duas espécies e potencialmente o seu intercruzamento gerando descendentes de natureza híbrida, oferecem uma excelente oportunidade para a investigação do processo de especiação e para a avaliação das barreiras reprodutivas que estão atuando na manutenção do limite entre espécies. A investigação da composição genética de tais populações permite formular hipóteses sobre os eventos e mecanismos que fazem com que o limite entre as espécies surja e seja mantido (Boecklen & Howard 1997; Cozzolino *et al.* 2006; Baack & Rieseberg 2007; Moraes *et al.* 2013).

Processos de hibridação são comuns em Orchidaceae, havendo frequentes relatos em diversos continentes, e envolvendo vários gêneros da família (Pansarin & Amaral 2008; Cortis *et al.* 2009; Pinheiro *et al.* 2010; Hu *et al.* 2011; Marques *et al.* 2014). Os diversos mecanismos de polinização que ocorrem na família parecem divergir muito na prevenção de polinizações interespecíficas. Espécies de plantas que exibem sobreposição do período de floração, ocorrência em simpatria e compartilhamento de polinizadores, tem um enfraquecimento das barreiras reprodutivas pré-cruzamento (Scopece *et al.* 2007; Scopece *et al.* 2008). Em Orchidaceae é bastante comum a polinização por engodo, neste caso as flores não secretam nenhum tipo de substância de recompensa para o polinizador, porém sua visita é efetiva na transferência de pólen de uma flor para outra. Possivelmente, a síndrome floral da orquídea em questão, mimetiza a síndrome floral de alguma outra espécie que ofereça recompensa, da qual o polinizador possa retirar recursos para sua sobrevivência. A presença de tal polinizador inespecífico enfraquece as barreiras reprodutivas pré-cruzamento, uma vez que ele pode visitar flores de espécies diferentes, transferindo o pólen de uma para a outra (Cozzolino & Widmer 2005). Orquídeas que são polinizadas por engodo sexual, isto é, a flor mimetiza o parceiro sexual do polinizador e a transferência de pólen ocorre durante a tentativa de cópula, tem fortes barreiras reprodutivas pré-cruzamento (Scopece *et al.* 2007). Controversamente, orquídeas com polinização por engodo alimentar, tem fracas barreiras reprodutivas pré-cruzamento, neste caso mecanismos de isolamento pós-cruzamento são essenciais para manter a coesão das espécies (Coyne & Orr 2004).

Os principais mecanismos aceitos de isolamento reprodutivo pós-zigótico consistem na inviabilidade ou no baixo sucesso reprodutivo dos híbridos formados. Existem várias hipóteses para explicar esta inviabilidade dos híbridos, como por exemplo, a incompatibilidade citonuclear, o modelo de Bateson-Dobzhanski-Muller, conflitos genômicos, falhas no emparelhamento de cromossomos na meiose, formação de pólen e óvulos inviáveis etc (Coyne & Orr 2004; Johnson 2010). O sucesso reprodutivo dos híbridos pode ser avaliado objetivamente em termos de frutos formados após a polinização e formação de sementes viáveis (Scopece *et al.* 2008).

Existem diversos relatos em que híbridos podem ser viáveis e férteis, ainda que sua fecundidade seja reduzida. Tais híbridos férteis ou sub-férteis podem funcionar como elos que interligam os genomas de duas espécies, permitindo fluxo gênico. Neste caso é esperado encontrar algum grau de introgressão, ou seja, regiões genômicas características de uma espécie presentes no genoma da espécie com a qual a hibridação é possível (Baack & Rieseberg 2007; Pinheiro *et al.* 2010; Palma-Silva *et al.* 2011; Vega *et al.* 2013).

O processo de hibridação em Orchidaceae foi intensamente investigado em espécies que ocorrem na região do Mediterrâneo. Nestes trabalhos, foi possível verificar que a utilização de marcadores moleculares para a caracterização do processo de hibridação foi fundamental para um correto entendimento das consequências deste fenômeno evolutivo (Cozzolino *et al.* 2006; Moccia *et al.* 2007; Cortis *et al.* 2009). Nestes estudos, é possível notar que os eventos de hibridação podem promover (Soliva & Widmer 2003; Cortis *et al.* 2009) ou não (Moccia *et al.* 2007) o fluxo gênico entre espécies distintas, sendo fundamental para a conservação das espécies e das áreas onde os eventos de hibridação ocorrem (Cozzolino *et al.* 2006). O surgimento de novas linhagens e espécies através da hibridação natural também foi verificada (Vereecken *et al.* 2010), indicando que os processos de hibridação podem desencadear eventos de especiação em Orchidaceae, contribuindo para a elevada diversidade que se observa na família. Devido à importância das pesquisas em zonas de hibridação natural realizadas em regiões temperadas, crescentes esforços tem sido realizados na região Neotropical, embora ainda existam poucos estudos deste tipo na região (Pinheiro *et al.* 2010; Pinheiro *et al.* 2013; Vega *et al.* 2013; Marques *et al.* 2014).

Epidendrum L. é um dos maiores gêneros de orquídeas da região Neotropical, com cerca de 1150 espécies que ocorrem na maior parte da América do Sul, desde a Argentina até a Colômbia (Hágsater & Soto-Arenas 2005). Espécies do gênero podem ser encontradas numa grande variedade de habitats e apresentam grande variação morfológica, fato que dificulta a delimitação tanto de grupos infragenéricos como de espécies próximas. Como exemplo, podemos citar as espécies que integram o complexo *Epidendrum secundum*, um dos grupos de espécies de orquídeas que apresentam as maiores incertezas taxonômicas, uma vez que o grupo possui uma ampla variação morfológica (Pinheiro & Barros 2007). Eventos de hibridação entre espécies deste grupo são descritos na literatura (Dunsterville 1979; Dressler 1989; Hágsater & Soto-Arenas 2005) e podem ter um papel importante na variação morfológica e na delimitação de espécies no grupo.

Evidências de hibridação e introgressão foram relatadas numa extensa zona de hibridação com vegetação de restinga ao longo do litoral sul do estado de São Paulo (Pinheiro *et al.* 2010; Moraes *et al.* 2013). Neste caso a introgressão foi detectada sobre a espécie poliploide *Epidendrum puniceoluteum* ($2N = 52$) quando em contato com a espécie diploide *E. fulgens* ($2N = 24$). Extensa introgressão foi detectada entre *E. madsenii*, *E. rhopalostele* e *E. falcisepalum* no Equador (Marques *et al.* 2014), estes resultados exibem tamanha fraqueza nos mecanismos de isolamento pré e pós-zigóticos que trouxeram dúvidas a respeito de quantas e quais espécies tem suporte nesta região. Em outro trabalho, também no Equador, eventos de hibridação e introgressão entre *E. calanthum*, *E. cochlidium* e *E. schistochilum*, determinam extenso compartilhamento genômico, e semelhanças fenotípicas que sustentam a hipótese de formação de espécies crípticas (Vega *et al.* 2013). Alguns produtores de orquídeas, com finalidade comercial, exploram a grande capacidade hibridação, que ocorre no gênero *Epidendrum*, para a produção de variedades híbridas para enriquecimento de variabilidade genética ou com valor ornamental (Devadas *et al.* 2010).

Duas espécies irmãs do gênero *Epidendrum*, que já foram alvo de muitas incertezas são *Epidendrum secundum* Jacq. e *Epidendrum xanthinum* Lindl., anteriormente consideradas como sinônimos (Dunsterville & Garay 1961). Ambas as espécies apresentam um número muito variável de cromossomos, inclusive sendo encontradas variações intrapopulacionais importantes (Assis *et al.* 2013), *E. secundum* apresenta a maior diversidade com número de cromossomos, entre 28 e 84 com muitos

valores intermediários, enquanto *E. xanthinum* tem de 28 a 80. A contribuição desta variação no número cromossômico para a constituição de barreiras reprodutivas é incerto, assim como a importância dos eventos de hibridação na origem de indivíduos e populações poliplóides. Estudo utilizando marcadores moleculares e morfológicos, com o intuito de revisar os limites interespecíficos e infragenéricos do complexo *E. secundum*, deu suporte a um grupo monofilético formado por *E. secundum* e *E. xanthinum*, sendo estas, então, consideradas como espécies irmãs (Pinheiro *et al.* 2009a). 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.

Os principais objetivos deste trabalho são:

1. Caracterizar a estrutura genética de uma população simpátrica composta por indivíduos de *E. secundum*, *E. xanthinum* e supostos híbridos naturais, os quais apresentam características morfológicas intermediárias entre as espécies mencionadas.
2. Verificar se existe hibridação e fluxo gênico entre estas duas espécies;
3. A partir da estrutura genética obtida e da análise de diversidade genética, determinar os processos envolvidos na formação dos padrões de variação observados, como endocruzamento, fluxo gênico, introgressão, hibridação, deriva genética e desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg;
4. Verificar a existência de diferentes linhagens, sua provável origem e sua importância na formação de novas espécies;
5. Quantificar a intensidade de barreiras reprodutivas pós-cruzamento pré-zigóticas (formação de frutos) e pós-zigóticas (viabilidade de sementes formadas) entre *E. secundum*, *E. xanthinum* e supostos híbridos naturais, utilizando cruzamentos manuais.

2. Materiais e métodos

2.1. Espécimes

Foram utilizados 89 espécimes de *E. secundum*, *E. xanthinum* e supostos híbridos. Os indivíduos coletados foram identificados visualmente pela morfologia floral: *E. secundum* apresenta flores em tons de violeta variando até lilás, com pigmentação amarela na região do *calus*; *E. xanthinum* apresenta flores amarelas; indivíduos híbridos apresentam flores variando desde tons de laranja até creme, com pigmentação violeta na base da coluna. Os fenótipos exibidos nas populações são variáveis e pode ser detectado um gradiente contínuo de variação, fato que dificulta a identificação de híbridos no campo. Por este motivo o status de híbrido só foi atribuído após conduzidas as análises genéticas. Destes, 23 foram mantidos em cultivo na coleção do Núcleo de Pesquisas do Orquidário, Instituto de Botânica de São Paulo. Todos os espécimes foram coletados na Região da Serra dos Órgãos no município de Nova Friburgo – RJ. Os indivíduos foram amostrados aleatoriamente com distância mínima de 5 metros entre si. Espécimes crescendo muito próximos uns aos outros ou com diversos caules partindo de pontos próximos do solo forneceram uma única amostra para evitar amostragem de clones. De cada indivíduo amostrado foram coletadas folhas frescas, imediatamente desidratadas em sílica gel e acondicionadas à temperatura ambiente até processamento em laboratório para extração de DNA. A extração de DNA seguiu o protocolo de Pinheiro *et al* (2008a).

2.2. Marcadores Microssatélites Nucleares e Plastidiais

No total, foram genotipados oito loci nucleares (LSPE03, EFF26, EFF45, EFF48, EFF49, EPP56, EFF70 e EPP96) isolados por Pinheiro *et al.* (2008a, 2008b) e cinco loci plastidiais (EPCP02, EPCP04, EPCP07, EPCP08 e EPCP09) isolados por Pinheiro *et al.* (2009b) em 89 indivíduos, distribuídos entre as espécies parentais (*E. secundum* e *E. xanthinum*) e os supostos híbridos. A amplificação dos loci e a caracterização dos alelos foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Pinheiro *et al.* (2010).

2.2.1. Análise dos dados – teste de atribuição a partir de marcadores nucleares

O teste de atribuição implementado no programa STRUCTURE 2.3.3 (Hubisz *et al.* 2009) permite verificar a população de origem de indivíduos com procedência

desconhecida por análise *Bayesiana*, e é especialmente útil para comparar indivíduos de espécies distintas que ocorrem em simpatria. O programa identifica o mais provável número de agrupamentos genéticos presente no conjunto de dados. Comparando o genótipo de cada indivíduo com os grupos já identificados ele atribui um valor de probabilidade posterior (*admixture* ou *q*) de aquele indivíduo pertencer a cada um dos agrupamentos genéticos, dentre aqueles identificados pelo programa. A matriz de dados com os genótipos dos 89 indivíduos amostrados foi analisada pelo programa STRUCTURE 2.3.3 com os seguintes parâmetros: número de populações assumida igual a dois ($k = 2$), número de interações igual a 2.000.000 e *burn in* de 500.000 (Nota: *burn in* corresponde ao número de interações iniciais descartadas da análise: no princípio da análise a probabilidade de atribuições erradas é grande devido à pequena quantidade de informação acumulada). Os indivíduos com *q* igual ou superior a 0,90 foram classificados como espécimes puros de *E. secundum*, *q* igual ou inferior a 0,10 foram classificados como espécimes puros de *E. xanthinum*, indivíduos com valor de *q* superior a 0,1 e inferior a 0,9 foram classificados como híbridos.

2.2.2. Análise dos dados – diversidade genética dos marcadores nucleares

A diversidade genética para os loci nucleares analisados foi caracterizada pela determinação de parâmetros descritivos tais como número de alelos por locus, riqueza alélica, heterozigosidade esperada, heterozigosidade observada e coeficiente de endocruzamento *f* (Wright 1965; Weir & Cockerham 1984). Estes parâmetros foram calculados utilizando o programa MSA (Dieringer & Schlötter 2003). Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram calculados usando o programa GENEPOP (Raymond & Rousset 1995).

As populações de *E. secundum*, *E. xanthinum* e híbridos foram caracterizadas pelo número de alelos, riqueza alélica, heterozigosidade esperada e observada, além do coeficiente de endocruzamento *f*. Para os cálculos populacionais foi utilizado o programa FSTAT (Goudet 1995).

2.2.3. Análise dos dados – rede de haplótipos de marcadores plastidiais

Os alelos dos cinco loci de marcadores microssatélitas plastidiais foram combinados em diferentes haplótipos, onde cada haplótipo tem uma composição única de alelos. Utilizando o programa NETWORK (Bandelt *et al.* 1999) foi construída uma rede de haplótipos com o método de máxima parcimônia de forma a obter a rede mais

simples e mais informativa da relação filogenética entre os diferentes haplótipos. Para diminuir o número de homoplasias e simplificar a interpretação dos resultados, os haplótipos exclusivos de um único indivíduo (*singletons*) foram removidos (Excoffier & Smouse, 1994).

2.3. Simulações para avaliação de performance do programa STRUCTURE

O programa HYBRIDLAB (Nielsen *et al.* 2006) permite construir matrizes com dados de populações simuladas tendo como ponto de partida dados obtidos de populações reais. É possível requisitar ao programa que ele realize cruzamentos aleatórios entre os indivíduos presentes em uma matriz de dados genéticos, como por exemplo, genótipos identificados para marcadores de microssatélites. Ao realizar estes cruzamentos virtuais, o programa gera uma nova matriz de dados genéticos composta pelos virtuais descendentes dos indivíduos da matriz original.

Inicialmente foram utilizados os indivíduos classificados com *admixture* maior que 0,90 para compor uma matriz com indivíduos considerados puros de *E. secundum* e indivíduos com *admixture* menor que 0,10 para compor uma segunda matriz com indivíduos puros de *E. xanthinum*. Estes são espécimes coletados no campo, reais. No programa HYBRIDLAB foi produzida uma população virtual de 10.000 indivíduos cruzando apenas indivíduos puros de *E. secundum* entre si, esta população virtual fornece indivíduos parentais de *E. secundum* (PBsec) para as simulações realizadas. O mesmo procedimento foi realizado com os indivíduos puros de *E. xanthinum*, produzindo uma população virtual de 10.000 indivíduos parentais de *E. xanthinum* (PBxan). Cruzando indivíduos puros de *E. secundum* com os puros de *E. xanthinum* foi produzida uma população virtual com 10.000 indivíduos híbridos de primeira geração (HF1). Cruzando a população HF1 consigo mesma foi produzida uma população com 10.000 indivíduos híbridos de segunda geração (HF2). Populações representando resultados de retrocruzamentos foram produzidas cruzando a população HF1 com os puros de *E. secundum* (BCsec) e com puros de *E. xanthinum* (BCxan).

Em suma foram produzidas seis populações virtuais, cada uma composta de 10.000 indivíduos, como especificado abaixo:

1. PBsec: População de indivíduos puros de *E. secundum*.

2. PBxan: População de indivíduos puros de *E. xanthinum*.
3. HF1: População de híbridos de primeira geração, descendentes do cruzamento de PBsec X PBxan.
4. HF2: População de híbridos de segunda geração, descendentes do cruzamento de HF1 X HF1.
5. BCsec: População de retocruzantes sobre *E. secundum*, descendentes do cruzamento PBsec X HF1.
6. BCxan: População de retocruzantes sobre *E. xanthinum*, descendentes do cruzamento PBsec X HF1.

Para avaliar como os indivíduos simulados seriam classificados pelo programa STRUCTURE, foram construídas vinte matrizes de dados diferentes. Cada uma das vinte matrizes foi analisada em separado pelo programa STRUCTURE. Dentre estas vinte matrizes, dez foram compostas apenas por indivíduos parentais (populações PB de 1 a 10) e dez matrizes foram compostas com indivíduos parentais e híbridos de diversas categorias (populações HYB de 1 a 10), seguindo a metodologia proposta por Vähä & Primmer (2006) e Burgarella *et al.* (2009). As matrizes sem híbridos tem 60 indivíduos cada, sendo 30 retirados aleatoriamente da população PBsec e 30 da PBxan. As matrizes com híbridos tem 100 indivíduos, 30 de PBsec, 30 de PBxan, 10 de HF1, 10 de HF2, 10 de BCsec e 10 de BCxan. Cada indivíduo usado para compor tais matrizes foi excluído de sua população virtual original para evitar repetição dos indivíduos nas análises. Cada uma das 20 populações simuladas, PB e HYB, foi analisada no programa STRUCTURE realizando 200.000 interações com 50.000 de *burn in*. Foi possível, então, comparar a probabilidade posterior (q) atribuída a cada indivíduo pelo programa com a sua verdadeira natureza ancestral, se parental ou híbrido.

Para cada uma das 20 populações simuladas analisadas no STRUCTURE foram calculados os seguintes parâmetros: proporção de híbridos detectada (número de híbridos/população total), poder de detecção de híbridos (número de híbridos corretamente detectados/total de híbridos), poder de detecção de parentais (número de parentais corretamente detectados/total de parentais), acurácia de híbridos (número de híbridos corretamente detectados/total de híbridos detectados), acurácia de parentais (número de parentais corretamente detectados/total de parentais detectados), erro tipo 1

(número de parentais classificados como híbrido/total de parentais), erro tipo 2 (número de híbrido classificados como parentais/total de híbridos). Os parâmetros poder de detecção de híbridos, acurácia de híbridos e erro tipo 2 foram calculados apenas para as dez simulações com híbridos.

Todos os parâmetros supracitados foram calculados separadamente para quatro cenários diferentes. Em cada cenário a nota de corte (*tq*) assumida para classificar um indivíduo como parental ou híbrido era diferente. As *tq*'s utilizadas foram de 0,9; 0,85; 0,8 e 0,75. Podemos assumir que utilizar a nota de corte 0,9 é um cenário menos conservador, onde teremos muita segurança ao afirmar que um indivíduo pertence à uma espécie parental, entretanto o número de híbridos pode ser superestimado. Enquanto assumir uma nota de corte de 0,75 é um cenário mais conservador, onde alguns híbridos de geração tardia, possíveis introgressantes, podem ser considerados como pertencentes às espécies parentais puras, reduzindo o número total de híbridos detectados.

2.4. Biologia Reprodutiva

2.4.1. Cruzamentos

No total 23 espécimes de *E. secundum*, *E. xanthinum* e híbridos, mantidos em cultivo no Núcleo de pesquisas do Orquidário do Estado, foram utilizados em cruzamentos manuais. Os cruzamentos foram realizados de forma recíproca, ou seja, cada indivíduo de um par de espécimes atuou como doador e como receptor de pólen do outro indivíduo. Três flores foram polinizadas manualmente em cada caso. Utilizando um estilete metálico, a polínia de uma flor foi removida e transferida para o estigma de outra flor. As flores foram marcadas e seu desenvolvimento acompanhado nos meses subsequentes.

Os cruzamentos foram realizados com todas as combinações possíveis entre indivíduos das espécies parentais e híbridos: *E. secundum* X *E. secundum* (i), *E. secundum* X *E. xanthinum* (ii), *E. secundum* X híbrido (iii), *E. xanthinum* X *E. xanthinum* (iv), *E. xanthinum* X híbrido (v) e híbrido X híbrido (vi).

2.4.2. Análise de frutos e sementes

As flores polinizadas tiveram seu desenvolvimento acompanhado nos meses subsequentes. Os frutos formados, quando maduros, foram coletados, abertos e as sementes foram mantidas sob refrigeração a 4°C. Para determinar a viabilidade das sementes foi usado o teste do tetrazólio. As sementes foram imersas em solução 1% de 2,3,5-trifenil tetrazólio e mantidas por 24 horas em temperatura de 30°C. Neste teste embriões viáveis apresentam uma forte coloração vermelha. Amostras de 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. A porcentagem de embriões viáveis foi determinada pela divisão do número de sementes com embrião viável pelo número total de sementes.

2.4.3. Cálculo dos índices de isolamentos

Todos os cálculos descritos nesta seção foram realizados utilizando a metodologia descrita por Scopece *et al* (2008).

Dois importantes estágios da reprodução foram avaliados neste estudo: a formação de frutos e a viabilidade dos embriões formados. Estes dois estágios foram combinados em um único índice de isolamento que pode ser atribuído a um indivíduo ou a uma categoria de indivíduos. Em cruzamentos de indivíduos de diferentes categorias (cruzamentos interespecíficos ou cruzamentos de híbridos com uma das espécies parentais – retrocruzamentos) os componentes masculino e feminino são analisados separadamente, a fim de se identificar possíveis assimetrias de isolamento e depois combinados. O componente masculino é definido como a capacidade do pólen de induzir a formação de fruto e fecundar os óvulos que se desenvolvem em sementes com embrião viável. O componente feminino é definido como a capacidade do ovário de se desenvolver em fruto e produzir sementes portadoras de embrião viável quando polinizado (Scopece *et al.* 2008). Em cruzamentos intraespecíficos os componentes masculino e feminino não são separados.

O índice de isolamento masculino é calculado usando os dados provenientes das polinizações em que foi utilizado o pólen daquele indivíduo ou daquela categoria de indivíduos. No estágio de formação de fruto o índice de isolamento (Fm) é definido por 1 menos a razão do número de frutos formados pelo número de flores que receberam

pólen daquele indivíduo, ou seja, a porcentagem de polinizações falhas [$F_m = 1 - (\text{número de frutos formados/número de flores polinizadas})$]. No estágio de formação de semente o índice de isolamento é definido por 1 menos a razão do número de sementes portadoras de embrião viável pelo total de sementes contadas [$S_m = 1 - (\text{número de sementes com embrião viável/número total de sementes contadas})$]. Os índices de isolamento femininos nos estágios de formação de frutos F_f e de formação de sementes S_f são calculados da mesma forma, porém utilizando os dados provenientes de cruzamentos em que o indivíduo ou categoria de indivíduos em questão atuaram como receptores de pólen.

Os dois estágios foram combinados em um único índice para cada componente, masculino ou feminino, pela seguinte fórmula: $F_{Sm} = F_m + [(1 - F_m) \times S_m]$, para componente masculino e $F_{Sf} = F_f + [(1 - F_f) \times S_f]$, para componente feminino. Caso nenhum fruto tenha sido formado os índices S_m e S_f não são calculados, então F_{Sm} e F_{Sf} são automaticamente considerados iguais a F_m e F_f respectivamente e são iguais a um. Os índices F_m , S_m , F_{Sm} , F_f , S_f e F_{Sf} calculados podem assumir valores entre zero e um, sendo que zero representa ausência de isolamento, ou seja, total fertilidade daquele componente (masculino ou feminino) naquele estágio (formação de fruto ou de semente viável) da reprodução, enquanto um significa isolamento total, completa esterilidade daquele componente naquele estágio da reprodução. Para combinar os índices masculino e feminino de isolamento é calculada a média entre F_{Sm} e F_{Sf} , $FS = (F_{Sm} + F_{Sf})/2$.

Ao avaliar cruzamentos realizados entre indivíduos de mesma categoria, como parentais da mesma espécie ou híbridos entre si, a separação dos componentes masculino e feminino perde o sentido, portanto as fórmulas são ligeiramente simplificadas. O cálculo é realizado usando as mesmas fórmulas para o estágio de formação de frutos (F), de sementes viáveis (S) e dos dois estágios combinados (FS), mas são usados os dados de todas as flores polinizadas que estão naquela categoria de cruzamento.

Os índices de isolamento foram inicialmente calculados separadamente para cada indivíduo utilizado nos cruzamentos experimentais. Em seguida os índices de isolamento foram calculados para as diferentes combinações de cruzamentos (de i a vi) em dois possíveis cenários, representados por diferentes notas de corte para considerar

indivíduos como parentais ou híbridos. Em um cenário menos conservador foi assumida como nota de corte $tq = 0,9$, indivíduos com q maior ou igual a 0,9 de probabilidade posterior atribuída pelo programa STRUCTURE foram considerados como parentais de *E. secundum*, indivíduos com q inferior ou igual a 0,1 foram considerados como parentais de *E. xanthinum* e indivíduos com q inferior a 0,9 e superior a 0,1 foram considerados híbridos. Em outro cenário mais conservador foi assumida uma nota de corte $tq = 0,75$, neste caso indivíduos com q igual ou superior a 0,75 foram considerados como parentais de *E. secundum*, indivíduos com q igual ou inferior a 0,25 foram considerados parentais de *E. xanthinum* e indivíduos com q inferior a 0,75 e superior a 0,25 foram considerados híbridos. Em ambos os cenários os indivíduos na categoria híbridos não foram diferenciados em diferentes classes como F1, F2 ou retrocruzantes.

3. Resultados

3.1. Marcadores Microssatélites Nucleares e Plastidiais

3.1.1. Análise dos dados – teste de atribuição a partir de marcadores nucleares

A partir dos resultados obtidos nas simulações realizadas para avaliar a performance do programa STRUCTURE, foi escolhida uma nota de corte (tq) de $q \geq 0,9$ para identificação de indivíduos de *E. secundum* e $q \leq 0,1$ para *E. xanthinum*, sendo os indivíduos com $0,1 < q < 0,9$ considerados híbridos. Com esta nota de corte o programa teve o melhor desempenho observado (Tabela 3), com os menores valores de erro do tipo 2 (classificar erroneamente indivíduos híbridos como parentais). Esta análise *Bayesiana* revelou resultados consistentes em diversas repetições com a presença de 42 indivíduos híbridos ($0,1 < q < 0,9$) dentre os 89 amostrados. Foram identificados 24 indivíduos puros de *E. secundum* ($q \geq 0,9$) e 23 indivíduos puros de *E. xanthinum* ($q \leq 0,1$) (Tabela 1 e Figura 1). Diversos indivíduos classificados visualmente, pela morfologia e coloração de flores, como pertencentes às espécies parentais foram reclassificados como híbridos.

3.1.2. Análise dos dados – diversidade genética dos marcadores nucleares

Os oito loci utilizados se mostraram polimórficos nas populações de *E. secundum*, *E. xanthinum* e híbridos, apresentando até nove alelos por locus. Em *E. xanthinum* foram observados menor número de alelos por locus e menor riqueza alélica que em *E. secundum* e híbridos, tanto na análise por locus (Tabela 2) quanto na análise populacional (Tabela 1). A heterozigosidade esperada (H_e) variou entre 0,042 e 0,851 enquanto a heterozigosidade observada (H_o) variou entre 0,042 e 0,875 (Tabela 2). A riqueza alélica e número de alelos no grupo dos híbridos revelaram valores intermediários quando comparados com as duas espécies parentais. Três loci apresentaram significativos desvios do EHW em *E. secundum*, três em *E. xanthinum* e surpreendentemente cinco nos híbridos, destes apenas dois loci apresentaram desvio significativo nos três grupos simultaneamente. O índice de endocruzamento f foi baixo em *E. secundum* e nos híbridos, porém foi significativamente elevado em *E. xanthinum*. (Tabelas 1 e 2).

O índice de diversidade, F_{ST} , calculado par a par entre os três grupos revelou maior divergência entre as duas espécies parentais do que entre os híbridos e cada uma das espécies parentais (Tabela 4).

3.1.3. Análise dos dados – rede de haplótipos de marcadores plastidiais

No total 22 haplótipos diferentes foram identificados considerando os cinco loci utilizados (Tabela 5). Destes, três foram removidos para a construção da rede de haplótipos, pois estavam presentes em apenas um indivíduo cada (*singletons*). Embora haja um surpreendentemente grande número de haplótipos, dois grupos principais podem ser reconhecido, um deles pertencente à *E. secundum* e o outro a *E. xanthinum*. Tais grupos estão separados por pelo menos seis passos mutacionais um do outro, enquanto os haplótipos de um mesmo grupo são separados por apenas um ou dois passos mutacionais (Figura 2). Dos 19 haplótipos na rede 10 pertencem à *E. secundum* e são também encontrados em indivíduos híbridos e 9 pertencem à *E. xanthinum* e indivíduos híbridos. Apenas um indivíduo classificado como *E. xanthinum* possui um haplótipo típico de *E. secundum*, em suma a rede revela que os haplótipos não são compartilhados pelas espécies parentais, ou seja, cada espécie conserva seu conjunto específico de haplótipos. Já os indivíduos classificados como híbridos apresentam uma grande diversidade de haplótipos e podem possuir tanto os haplótipos típicos de *E. secundum* quanto os de *E. xanthinum*.

3.2. Simulações para avaliação de performance do programa STRUCTURE

Os resultados obtidos nas 20 simulações realizadas foram resumidos em tabela (Tabela 3). A proporção de híbridos estimada pelo programa foi inferior a 2% em todos os cenários (diferentes tq 's) nas simulações sem híbridos. Nas simulações com híbridos, em que a proporção de híbridos na amostra era conhecida de 40%, as proporções estimadas de híbridos foram de 37,9% ($tq = 0,9$), 30,2% ($tq = 0,85$), 23,9% ($tq = 0,8$) e 20,3% ($tq = 0,75$) (Tabela 3).

Nas simulações realizadas sem a presença de indivíduos híbridos, os parâmetros poder de detecção e acurácia de parentais tiveram sempre valores elevados, de 97,2% ($tq = 0,9$) a 99,5% ($tq = 0,75$) para poder de detecção e 100% para acurácia de parentais, o erro tipo 1 ficou sempre abaixo de 3% em todos os cenários (Tabela 3). Isto revela que o programa é bastante confiável para classificar indivíduos como parentais de *E.*

secundum e de *E. xanthinum* quando não existem híbridos na amostra, independentemente da nota de corte assumida.

Quando híbridos de diferentes categorias estão incluídos nas amostras os valores de poder de detecção de e acurácia para parentais são ligeiramente diminuídos, sendo de 89,3% ($tq = 0,9$) a 99% ($tq = 0,75$) para poder de detecção de parentais e de 86,6% ($tq = 0,9$) a 74,6% ($tq = 0,75$) para acurácia de parentais; e o valor do erro tipo 1 foi ligeiramente aumentado variando de 10,7% ($tq = 0,9$) a 1% ($tq = 0,75$). Nestas simulações foram calculados os valores de poder de detecção e de acurácia para híbridos e também de erro tipo 2. O valor de poder de detecção de híbridos foi de 78,8% ($tq = 0,9$) a 49,3% ($tq = 0,75$), acurácia para híbridos foi de 84% ($tq = 0,9$) a 97,5% ($tq = 0,75$), o erro tipo 2 foi de 21,2% ($tq = 0,9$) a 50,7% ($tq = 0,75$) (Tabela 3).

Neste conjunto de dados simulados, com a presença de híbridos de diversas categorias, o erro tipo 2 apresentou valores elevados (Tabela 3), sendo de 21,2% ($tq = 0,9$) a 50,7% ($tq = 0,75$). Convém ressaltar que as diferentes classes de híbridos F_1 , F_2 e produtos de retrocruzamentos foram todos alocados em uma mesma categoria: híbridos. Ao discriminar a categoria de cada híbrido nota-se que os erros são mais frequentes ao classificar indivíduos híbridos produtos de retrocruzamento (Tabela 6) em todos os cenários propostos.

3.3. Biologia reprodutiva

Em ambos os cenários de atribuição propostos ($tq = 0,9$ e $tq = 0,75$), os indivíduos classificados como híbridos apresentam um baixo sucesso reprodutivo, caracterizado por valores de índice de isolamento reprodutivo próximos a 1,0. Híbridos, quando cruzados entre si, apresentam FS de 0,83 ($tq = 0,9$) e 0,74 ($tq = 0,75$). Quando cruzados com *E. secundum* apresentam FSm de 0,80 ($tq = 0,9$) e 0,73 ($tq = 0,75$); e FSf de 0,74 ($tq = 0,9$) e 0,83 ($tq = 0,75$). Cruzamentos entre híbridos e *E. xanthinum* apresentam baixo valor de índice de isolamento no cenário menos conservador ($tq = 0,9$), isto indica possibilidade produção de descendentes nestes cruzamentos, tanto quando os híbridos são doadores de pólen (FSm = 0,13) quanto quando os híbridos atuam como receptores de pólen (FSf = 0,31); já no cenário com $tq = 0,75$ os híbridos tem elevado índice de isolamento também com *E. xanthinum* (FSm = 0,80 e FSf = 0,78) (Tabela 8).

Os cruzamentos intraespecíficos, entre indivíduos da mesma espécie parental, apresentaram valores de isolamento relativamente baixos em ambos os cenários, com

0,32 ($tq = 0,90$) e 0,49 ($tq = 0,75$). Os cruzamentos interespecíficos apresentaram valores próximos aos dos cruzamentos intraespecíficos no cenário menos conservador $tq=0,9$ (FS=0,45 quando pólen de *E. secundum* polinizou flores de *E. xanthinum* e FS=0,58 na direção inversa), e valores ligeiramente mais elevados no cenário mais conservador $tq=0,75$ quando pólen de *E. secundum* foi transferido para flores de *E. xanthinum* (FS=0,64). Neste último cenário, quando pólen de *E. xanthinum* foi transferido para flores de *E. secundum* o índice de isolamento foi elevado (FS=0,85).

4. Discussão

4.1. Hibridação entre populações simpátricas de *E. secundum* e *E. xanthinum* na Serra dos Órgãos

A presença de híbridos foi detectada entre os indivíduos analisados, provenientes da Serra dos Órgãos. Diversos autores têm sugerido que a grande variação morfológica e cromossômica observada entre as espécies do subgênero *Amphylottium* tenha sido gerada por eventos de hibridação (Dunsterville 1979, Dressler 1989, Hágsater & Soto Arenas 2005, Pansarin & Amaral 2008). De fato, a utilização de marcadores moleculares e experimentos de biologia reprodutiva têm confirmado a existência de hibridação entre diversas espécies no grupo (Pinheiro *et al.* 2010, Vega *et al.* 2013), indicando que tanto a variação morfológica como cromossômica aumentam nas zonas de contato entre espécies distintas. Provavelmente grande parte das incertezas taxonômicas no grupo são produzidas pela presença de um grande número de híbridos nas populações naturais, confundindo a dificultando a delimitação de espécies no grupo (Hágsater & Soto Arenas 2005, Pinheiro *et al.* 2010, Vega *et al.* 2013). Os cálculos de intensidade de isolamento reprodutivo revelaram que cruzamentos interespecíficos entre as duas espécies parentais apresentam viabilidade semelhante àquela observada em cruzamentos intraespecíficos de cada espécie (Tabela 8), confirmando a possibilidade de produção de híbridos de primeira geração (F₁). A estrutura genética revelada pela análise de atribuição, utilizando o programa STRUCTURE, é compatível com um cenário de hibridação (Figura 1). Eventos de hibridação são frequentes e o número de híbridos encontrados na amostra é bastante expressivo, no total, foram classificados como híbridos 42 em 89 indivíduos amostrados, uma proporção de híbridos de 47%. Porém, apesar do número elevado de híbridos e da alta compatibilidade reprodutiva entre *E. secundum* e *E. xanthinum*, o compartilhamento de haplótipos entre as espécies (Figura 2) e a fertilidade de cruzamentos envolvendo híbridos foi baixa (Tabela 8), indicando que barreiras reprodutivas estão presentes e atuam mantendo a coesão das espécies, como observado em diversos estudos com orquídeas (Moccia *et al.* 2007, Cortis *et al.* 2009).

A hibridação ocorre de forma bidirecional, isto é, híbridos são formados quando pólen de *E. secundum* é transferido para flores de *E. xanthinum* e também na direção oposta. Foram identificados 10 indivíduos híbridos portando haplótipos do DNA

plastidial típicos de *E. secundum* e 32 híbridos portando haplótipos típicos de *E. xanthinum* (Tabela 5). Esta maior frequência de haplótipos de *E. xanthinum* entre os híbridos é condizente com os resultados dos cruzamentos manuais que mostram ser menor o índice de isolamento entre híbridos e *E. xanthinum* (Tabela 8), provavelmente a hibridação tendo *E. xanthinum* como parental materno é mais frequente.

A existência de híbridos de segunda geração e/ou de gerações mais tardias não pôde ser confirmada, embora seja provável. Dentre os 42 indivíduos classificados como híbridos pelo teste de atribuição do programa STRUCTURE, 6 tinham sido classificados morfologicamente como *E. secundum* e 14 como *E. xanthinum*. Estes indivíduos podem ser híbridos de geração tardia, possíveis introgressantes resultantes um cruzamento ancestral envolvendo um híbrido e uma das espécies parentais, seguindo diversas gerações de cruzamentos com a mesma espécie parental. Híbridos de primeira geração usualmente tem seu genoma composto com igual contribuição das espécies parentais e tendem a apresentar valor de q próximo a 0,50, como relatado em estudos com gêneros de Orchidaceae do Mediterrâneo (Moccia *et al.* 2007; Cortis *et al.* 2009). Apenas 3 indivíduos amostrados tiveram q próximo a 0,50 (maior que 0,40 e menor que 0,60), embora este dado requeira uma avaliação conservadora e não permita tirar conclusões definitivas, aumenta a dúvida sobre a real natureza ancestral dos indivíduos classificados com híbridos neste estudo. Porém, a aparente ausência de compartilhamento de haplótipos entre as espécies parentais e a baixa fertilidade dos cruzamentos envolvendo híbridos indicam a existência de barreiras reprodutivas que impedem a produção de gerações avançadas de híbridos (F_2 e introgressantes). A análise de um número maior de loci, utilizando técnicas como AFLP (Vega *et al.* 2013, Marques *et al.* 2014) pode vir a esclarecer esta questão no futuro.

4.2. Apesar da hibridação detectada, não há evidência de introgressão entre *E. secundum* e *E. xanthinum*

A estrutura genética obtida pela análise do DNA plastidial e nuclear não sustenta a hipótese de introgressão entre as duas espécies. Na rede de haplótipos do DNA plastidial observam-se dois conjuntos de haplótipos bastante segregados entre si, um deles pertencendo a *E. secundum* e o outro a *E. xanthinum*. Não foram identificados indivíduos de *E. secundum* portadores de haplótipo de *E. xanthinum* nem a situação invertida (Figura 2). Tal identificação suportaria a hipótese de introgressão sobre a espécie portadora de haplótipos típicos da outra espécie. Apesar da extensa hibridação

detectada, o fluxo genético entre as espécies parentais parece pouco provável, e a existência de barreiras reprodutivas impedem que regiões genômicas típicas de uma espécie sejam efetivamente transferidas para a espécie irmã. Barreiras reprodutivas atuando de forma tardia devem prevenir o fluxo genético e devem consistir em importantes fatores que preservam o limite entre as espécies neste caso, como já foi relatado em diversos gêneros de orquídeas que realizam polinização por engôdo na região mediterrânea (Cozzolino & Widmer 2005, Scopece *et al.* 2007).

O resultado obtido nos cruzamentos manuais não é compatível com a estrutura genética das populações simpátricas da Serra dos Órgãos. Os cruzamentos manuais mostram alta produção de frutos e presença de sementes viáveis nos cruzamentos interespecíficos entre indivíduos das espécies parentais e, portanto, a alta probabilidade de formação de híbridos F₁. Cruzamentos envolvendo híbridos e *E. xanthinum* apresentam grande viabilidade, semelhante ou superior aquela observada nos cruzamentos intra e interespecíficos, sugerindo uma grande probabilidade de formação de introgressantes sobre *E. xanthinum*, fato que não foi comprovado pela estrutura genética obtida. Os cruzamentos envolvendo híbridos entre si e envolvendo híbridos com *E. secundum* são os que apresentam menor viabilidade com índice de isolamento próximo a 0,8 (Tabela 8). Neste caso a viabilidade é baixa, porém não representa uma barreira reprodutiva completa e, mesmo em pequena proporção os descendentes destes cruzamentos poderiam estar presentes na população. Desta forma, foi detectado um contraste nos resultados obtidos, onde a introgressão entre as espécies é possível em condições controladas, porém não foi observada em condições naturais, sugerindo a existência de barreiras de isolamento reprodutivo extrínsecas, ou combinação de outras barreiras de ação mais tardias estejam limitando o fluxo genético.

4.3. O isolamento reprodutivo entre populações simpátricas de *E. secundum* e *E. xanthinum* pode existir devido à contribuição cumulativa de diversas barreiras, sem que nenhuma delas seja completa

Nenhuma das barreiras reprodutivas testadas se mostrou suficiente para determinar, por si só, o isolamento reprodutivo entre *E. secundum* e *E. xanthinum* na Serra dos Órgãos. A visão de que, espécies de orquídeas que simulam a existência de recursos alimentares possuem barreiras reprodutivas pré-cruzamento fracas (Cozzolino & Widmer 2005; Scopece *et al.* 2007; Pinheiro *et al.* 2010) foi corroborada, as proporções de frutos e sementes viáveis produzidos em cruzamentos interespecíficos foi

semelhante à proporção obtida em cruzamentos intraespecíficos (Tabela 8). Frente a este cenário a inviabilidade ou esterilidade dos híbridos de gerações mais avançadas podem constituir importantes barreiras reprodutivas pós zigóticas tardias. A menor proporção de frutos e sementes viáveis produzidos por indivíduos híbridos podem ser somados em campo a uma menor aptidão e desvantagem na competição com os parentais no ambiente natural. Por exemplo, a germinação de sementes híbridas, sob condições naturais, pode ser desfavorável quando comparada com a capacidade de germinação das sementes das espécies parentais. A existência de tais barreiras não foi testada neste estudo, mas sua existência pode ser testada no futuro, uma vez que nem fluxo genético nem introgressão entre as espécies parentais foram detectados utilizando marcadores moleculares. Segundo Coyne & Orr (2004), trabalhos multidisciplinares são necessários para a identificação das barreiras reprodutivas responsáveis pela manutenção da integridade de espécies na natureza. Transplantes recíprocos (Johnston *et al.* 2001, Sambatti *et al.* 2008) e experimentos de biologia reprodutiva envolvendo gerações de híbridos avançadas (Widmer *et al.* 2009) podem ser importantes passos para investigar a origem do isolamento reprodutivo entre *E. secundum* e *E. xanthinum*.

Diversos mecanismos de isolamento podem contribuir para o isolamento reprodutivo entre as espécies analisadas. Incompatibilidade citonuclear pode ser um mecanismo de isolamento envolvido na coesão de diversas espécies de plantas (Sambatti *et al.* 2008, Palma-Silva *et al.* 2011). A rede de haplótipos recuperada na análise do DNA plastidial, mostra claramente dois agrupamentos distintos, um pertencente a *E. secundum* e outro pertencente a *E. xanthinum*, praticamente sem compartilhamento de haplótipos. Em geral indivíduos com genoma nuclear de *E. secundum* tem haplótipos de *E. secundum* e o mesmo vale para *E. xanthinum*. Logo indivíduos portadores de genoma nuclear com elementos de uma espécie e genoma plastidial com elementos da outra podem ser inviáveis ou sub-férteis devido à incompatibilidade entre estes dois genomas (Greiner *et al.* 2011).

Outro mecanismo que deve ser considerado como possível neste caso é o proposto pelo modelo de Bateson-Dobzhansky-Muller. Em uma zona de hibridação indivíduos de natureza híbrida devem apresentar maior diversidade genética que os parentais, devido a seus genomas serem compostos por elementos das duas espécies parentais (Coyne & Orr 2004). Entretanto, os indivíduos híbrido detectados na Serra dos Órgãos, apresentam desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg em

diversos loci (Tabela 2), tais desvios pode ser decorrentes de cruzamentos não aleatórios ou seleção contra os heterozigotos, ou viés amostral.

4.4. Depressão por alogamia em *E. secundum* e *E. xanthinum*

Os cruzamentos manuais realizados revelaram um valor surpreendentemente alto para os índices de isolamento reprodutivo intraespecíficos calculados. O valor de Índice de isolamento em *E. secundum* foi de 0,44 (Tabela 8), o que significa uma viabilidade de apenas 0,56. Este valor contrasta com aqueles obtidos em trabalhos com outras populações de Orchidaceae e com trabalhos realizados com o gênero *Epidendrum*, que revelam uma alta viabilidade em cruzamentos intraespecíficos, usualmente próxima a 80 ou 90% (Pansarin & Amaral 2008; Pinheiro *et al.* 2010; Vega *et al.* 2013). Em *E. xanthinum* o índice de isolamento foi de 0,33, ou seja 0,64 de viabilidade. *E. xanthinum* foi a única população que apresentou coeficiente de endocruzamento significativamente diferente de zero (Tabela 1). Possivelmente este maior índice de endocruzamento esta relacionado com a maior fertilidade observada nesta espécie quando comparada com *E. secundum* nesta região. O aumento na frequência de endocruzamentos possivelmente compensa a depressão por alogamia.

A rede de haplótipos revelou um número surpreendentemente grande de haplótipos, 22 no total (figura 2), especialmente se considerada a pequena área de amostragem, uma faixa de 8 x 20 km. Estudos anteriores realizados com o gênero *Epidendrum* revelaram um número expressivamente menor de haplótipos, 14 haplótipos numa espécie amostrada em diferentes habitats desde o sul da Bahia até o Paraná (Pinheiro *et al.* 2013), 6 haplótipos identificados em duas espécies que hibridizam coletadas no litoral do Brasil desde São Paulo até o Rio Grande do Sul (Pinheiro *et al.* 2010). A grande diversidade de haplótipos identificada pode ter influenciado os resultados de incompatibilidade reprodutiva identificados entre as espécies e também nos cruzamentos intraespecíficos. A Serra dos Órgãos é uma região montanhosa bastante acidentada, e provavelmente os diversos haplótipos observados na população de Nova Friburgo se originaram em períodos onde a distribuição das espécies foi descontínua ao longo destas cadeias de montanhas. Uma análise filogeográfica detalhada de populações de *E. secundum* e *E. xanthinum* ao longo da Serra dos Órgãos, associado a um estudo de modelagem de nicho pode esclarecer a origem da diversidade haplotípica destas espécies. Em regiões semelhantes, como na Cordilheira dos Andes (Vega *et al.* 2013, Marques *et al.* 2014) e em inselbergs próximos ao litoral (Palma-

Silva *et al.* 2011), foram observados haplótipos altamente diferenciados em populações bem próximas, sugerindo que o processo de deriva genética associado ao baixo fluxo gênico dentro das espécies podem ser determinantes no surgimento e manutenção de uma grande diversidade haplotípica. O papel deste tipo de incompatibilidade intraespecífica na formação de novas espécies é um tema ainda pouco explorado na literatura (Scopece *et al.* 2010), e um número maior de estudos com este enfoque são necessários na região Neotropical (Pinheiro *et al.* 2013).

5. Referências Bibliográficas

- ASSIS, F.N.M.; SOUZA, B.C.Q.; MEDEIROS-NETO E.; PINHEIRO, F.; SILVA, A.E.B.; FELIX, L.P. Karyology of Genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laellinae) with emphasis on subgenus *Amphyglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. *Botanical Journal of Linnean Society*, v. 172, p. 329-344, 2013.
- BAACK, E.J.; RIESEBERG, L.H. A genomic view of introgression and hybrid speciation. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 17, n. 6, p. 513-518, 2007.
- BANDELT, H-J; FORSTER, P.; ROEHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 16 p. 37–48, 1999.
- BOECKLEN, W.J.; HOWARD, D.J. Genetic analyses of hybrid zones: Number of markers and power of resolution. *Ecology*, v. 78, n. 8, p. 2611-2616, 1997.
- BRADSHAW, H.D.; WILBERT, S.M.; OTTO, K.G.; SCHEMSKE, D.W. Genetic mapping of floral traits associated with reproductive isolation in monkeyflowers (*Mimulus*). *Nature*, v. 376 n. 31, p. 762-765, 1995.
- BURGARELLA, C.; LORENZO, Z.; JABBOUR-ZAHAB, R.; LUMARET, R.; GUICHOUX, E.; PETIT, R.J.; SOTO, A.; GIL, L. Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Heredity*, v. 102 n. 5, p. 442–452, 2009.
- CORTIS, P.; VERECKEN, N.J.; SCHIESTL, F.P.; BARONE-LUMAGA, M.R.; SCRUGLI, A.; COZZOLINO, S. Pollinator convergence and the nature of species boundaries in sympatric Sardinian *Ophrys* (Orchidaceae). *Annals of Botany*, v. 104, n. 3, p. 497-506, 2009.
- COYNE, J.A.; ORR, H.A. *Speciation*. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2004. 545 p.
- COZZOLINO, S.; WIDMER, A. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution*, v. 20, n. 9, p. 487-494, 2005.

- COZZOLINO, S.; NARDELLA, A.M.; IMPAGLIAZZO, S.; WIDMER, A.; LEXER, C. Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: Should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biological Conservation*, v. 129, n. 1, p. 14–23, 2006.
- DEVADAS, R.; MEDHI, R.P.; DAS, S.P. Interspecific hybrid developed in *Epidendrum* orchid from the cross *E. radicans* Pav. ex. Lindl. × *E. xanthinum* Lindl. *Journal of Horticultural Science*, v. 5, n. 2, p. 144-147, 2010.
- DIERINGER, D.; SCHLÖTTER, C. Microsatellite analyzer (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, v. 3, n. 1, p. 167–169, 2003.
- DRESSLER, R.L. Will the real *Epidendrum ibaguense* please stand up? *American Orchid Society Bulletin*, v. 58, n. 8, p. 796–800, 1989.
- DOBZHANSKY, T. *Genetics of the evolutionary process*. New York: Columbia University Press, 1970. 505 p.
- DUNSTERVILLE, G.C. Orchids of Venezuela - *Epidendrum elongatum*. *American Orchid Society Bulletin*, v. 48, p. 447–454, 1979.
- DUNSTERVILLE, G.C.K.; GARAY, L.A. *Venezuelan orchids illustrated*. London: Andre Deutsch, 1961. v 2.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene tree within a species: molecular variance parsimony. *Genetics*, v. 136, p. 343-359, 1994.
- FAY, J.C.; WYCKOFF, G.J; WU, C-I. Testing the neutral theory molecular evolution with genomic data from *Drosophila*. *Nature*, v. 415, p. 1024-1026, 2002.
- GOUDET, J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, v. 86, p. 485–486, 1995.
- GREINER, S.; RAUWOLF, U.; MEURER, J.; HERRMANN, R.G. The role of plastids in plant speciation. *Molecular Ecology*, v. 20 n. 4, p. 671–691, 2011.

- HÁGSATER, E. & SOTO-ARENAS, M.A. 2005. *Epidendrum* L. In: PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N. (eds). *Genera Orchidacearum, vol 4*. Oxford: Oxford University Press, 2005. p. 236-251.
- HOLDEREGGER, R.; KAMM, U.; GUGERLI, F. Adaptive vs. Neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology*, v. 21, n. 6, p. 797-807, 2006.
- HU, S.J.; HU, H.; YAN, N.; HUANG, J.L.; LI, S.Y. Hybridization and asymmetric introgression between *Cypripedium tibeticum* and *C. yunnanense* in Shangrila County, Yunnan Province, China. *Nordic Journal of Botany*, v. 29, n. 5, p. 625-631, 2011.
- HUBISZ, M.J.; FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, v. 9, p. 1322-1332, 2009.
- JOHNSON, N.A. Hybrid incompatibility genes: remnants of a genomic battlefield? *Trends in Genetics*, v. 26, p. 317-325, 2010.
- JOHNSTON, J.A.; WESSELINGH, R.A.; BOUCK, A.C.; DONOVAN, L.A.; ARNOLD, M.L. Intimately linked or hardly speaking? The relationship between genotype and environmental gradients in a Louisiana Iris hybrid population. *Molecular Ecology*, v. 10, p. 673-681, 2001.
- KIMURA, M. *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. 367 p.
- LOWRY, D.B.; MODLISZEWSKI, J.L.; WRIGHT, K.M.; WU, C.A.; WILLIS, J.H. The strength and genetic basis of reproductive isolating barriers in flowering plants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London (Series B: Biological sciences)*, v. 363, n. 1506, p. 3009-3021, 2008.
- MARQUES, I.; DRAPER, D.; RIOFRÍO, L.; NARANJO, C. Multiple hybridization events, polyploidy and low postmating isolation entangle the evolution of neotropical species of *Epidendrum* (Orchidaceae). *BMC Evolutionary Biology*, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2014.

- MAYR, E. *Systematics and the Origin of Species*. New York: Columbia University Press, 1942. 372 p.
- MOCCIA, M.D.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. The strength of reproductive isolation in hybridizing food deceptive orchids. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 2855-2866, 2007.
- MORAES, A.P.; CHINAGLIA, M.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO, F. Interploidy hybridization in sympatric zones: the information of *Epidendrum fulgens* x *E. puniceoluteum* hybrids (Epidendroideae, Orchidaceae). *Ecology and Evolution*, v. 3, n. 11, p. 3824-3837, 2013.
- NEI, M.; SUZUKI, Y.; NOZAWA, M. The neutral theory of molecular evolution in the genomic era. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 11, p. 265-289, 2010.
- NIELSEN, E.E.; BACH, L.A.; KOTLICKI, P. Hybridlab (version 1.0): a program for generating simulated hybrids from population samples. *Molecular Ecology Notes*, v. 6, p. 971-973, 2006.
- OHTA, T. The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 23, p. 263-286, 1992.
- OHTA, T.; GILLESPIE, J.H. Development of neutral and nearly neutral theories. *Theoretical Population Biology*, v. 49, n. 2, p. 128-142, 1996.
- PALMA-SILVA, C.; WENDT, T.; PINHEIRO, F.; BARBARÁ, T.; FAY, M.F.; COZZOLINO, S.; LEXER, C. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology*, v. 20, n. 15, p. 3185-3201, 2011.
- PANSARIN, E.R.; AMARAL, M.C.E. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? *Plant Biology*, v. 10, n. 2, p. 211-219, 2011.

- PESSOA, E.M.; ALVES, M.; ALVES-ARAÚJO, A.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO, F. Integrating different tools to disentangle species complexes: A case study in *Epidendrum* (Orchidaceae). *Taxon*, v. 61, n. 4, p. 721-734, 2012.
- PINHEIRO, F.; BARROS, F. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany*, v. 25, p. 129-136, 2007.
- PINHEIRO, F.; SANTOS, M.O.; BARROS, F.; MEYER, D.; SALATINO, A.; SOUZA, A.P.; COZZOLINO, S. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Brazilian orchid *Epidendrum fulgens*. *Conservation Genetics*, v. 9, p. 1661-1663, 2008a.
- PINHEIRO, F.; SANTOS, M.O.; PALMA-SILVA, C.; BARROS, F.; MEYER, D.; SALATINO, A.; SOUZA, A.P.; COZZOLINO, S. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Epidendrum puniceoluteum*, an endemic orchid from the Atlantic Rainforest. *Molecular Ecology Resources*, v. 8, p. 1114-1116, 2008b.
- PINHEIRO, F.; KOEHLER, S.; CORRÊA, A.M.; SALATINO, M.L.F.; SALATINO, A.; BARROS, F. Phylogenetic relationships and infrageneric classification of *Epidendrum* subgenus *Amphiglottium* (Laellinae, Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 283, p. 165-177, 2009a.
- PINHEIRO, F.; PALMA-SILVA, C.; BARROS, F.; FÉLIX, L.P.; LEXER, C.; COZZOLINO, S.; FAY, M.F. Chloroplast microsatellite markers for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*, and cross-amplification in other Laeliinae species (Orchidaceae). *Conservation Genetics Resources*, v. 1, p. 505-511, 2009b.
- PINHEIRO, F.; BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; MEYER, D.; FAY, M.F.; SUZUKI, R.M.; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*, v. 19, p. 3981-3994, 2010.
- PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S.; BARROS, F.; GOUVEIA, T.M.Z.M.; SUZUKI, R.M.; FAY, M.F.; PALMA-SILVA, C. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the Neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. *Evolution*, v. 67, p. 2024-2039, 2013.

- QUEIROZ, K. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. In: DJ HOWARD, D.J.; BERLOCHER, S.H. (eds.). *Endless forms: Species and speciation*, Oxford: Oxford University Press, 1996. p. 57-75.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, v. 86, p. 248–249, 1995.
- RAMSEY, J.; BRADSHAW, H.D.; SCHEMSKE, D.W. Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution*, v. 57, n. 7, p. 1520-1534, 2003.
- SAMBATTI, J.B.M.; ORTIZ-BARRIENTOS, D.; BAACK, E.J.; RIESEBERG, L.H. Ecological selection maintains cytonuclear incompatibilities in hybridizing sunflowers. *Ecology Letters*, v. 11, p. 1082-1091, 2008.
- SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, v. 5, n. 1, p. 63-69, 2004
- SCHLUTER, D. Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science*, v. 323, n. 5915, p. 737-741, 2009
- SCOPECE, G.; MUSACCHIO, A.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. Patterns of reproductive isolation in mediterranean deceptive orchids. *Evolution*, v. 61, p. 2623-2642, 2007.
- SCOPECE, G.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. Evolution of postzygotic reproductive isolation in a guild of deceptive orchids. *The American Naturalist*, v. 171, p. 315-326, 2008.
- SCOPECE, G.; LEXER, C.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. Polymorphism of postmating reproductive isolation within plant species. *Taxon*, v. 59, p. 1367-1374, 2010.
- SOLIVA, M.; WIDMER, A. Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive *Ophrys* (Orchidaceae) species. *Evolution*, v. 57, p. 2252-2261, 2003.

- VÄHÄ, J-P.; PRIMMER, C.R. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology*, v. 15, p. 63-72, 2006.
- VEGA, Y.; MARQUES, I.; CASTRO, S.; LOUREIRO, J. Outcomes of Extensive Hybridization and Introgression in *Epidendrum* (Orchidaceae): Can We Rely on Species Boundaries? *PLoS ONE*, v. 8 n. 11, 13 p., 2013.
- VEREECKEN, R.N.J.; COZZOLINO, S.; SCHIESTL, F.P. Hybrid floral scent novelty drives pollinator shift in sexually deceptive orchids. *BMC Evolutionary Biology*, v. 10, 12 p., 2010.
- XU, S.; SCHLÜTER, P.M.; SCOPECE, G.; BREITKOPF, H.; GROSS, K.; COZZOLINO, S.; SCHIESTL, F.P. Floral isolation is the main reproductive barrier among closely related sexually deceptive orchids. *Evolution*, v. 65, n. 9, p. 2606-2020, 2011.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, v. 38, p. 1358-1370, 1984.
- WIDMER, A.; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity*, v. 102, p. 31-38, 2009.
- WRIGHT, S. The interpretation of populations structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, v. 19, p. 395-420, 1965.
- WU, C-I. The genic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 14, p. 851-865, 2001.
- ZHANG, D-X.; HEWITT, G.M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, v. 12, n. 3, p. 563-584, 2004.

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Caracterização das populações simpátricas de *E. secundum*, *E. xanthinum* e híbridos, a partir de oito loci nucleares de marcadores microssatélites. Número de alelos (A), riqueza alélica (AR), heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho) e coeficiente de endocruzamento (*f*).

Espécies (número amostrado)	A	AR	He	Ho	<i>f</i>
<i>E. secundum</i> (24)	43	4,827	0,611	0,539	0,115
Híbridos (42)	41	4,345	0,603	0,497	0,177
<i>E. xanthinum</i> (23)	25	3,049	0,465	0,375	0,280*

* Valor significativamente diferente de zero ($P < 0,05$)

Tabela 2. Variabilidade genética em oito loci nucleares de marcadores microsatélites em *E. secundum*, *E. xanthinum* e híbridos. Nome do locus, número de alelos (A), riqueza alélica (AR), riqueza de alelos privados (P), heterozigosidades esperada (He) e observada (Ho) e coeficiente de endocruzamento (f) para cada locus.

Locus	<i>E. secundum</i>						Híbridos						<i>E. xanthinum</i>					
	A	AR	P	He	Ho	f	A	AR	P	He	Ho	f	A	AR	P	He	Ho	f
LSPE03	3	3,00	0,03	0,613	0,417	0,33	3	2,97	0,00	0,587	0,310*	0,48	2	2,00	0,00	0,433	0,174*	0,60
EFF26	3	3,00	0,00	0,600	0,875*	-0,47	4	3,64	0,64	0,671	0,771*	-0,15	3	3,00	0,00	0,647	0,529*	0,19
EFF45	4	3,57	0,27	0,575	0,667	-0,16	4	3,55	0,23	0,624	0,548	0,12	2	2,00	0,00	0,414	0,304	0,27
EFF48	2	1,58	0,16	0,042	0,042	0,00	2	1,72	0,30	0,066	0,000*	1,00	1	1,00	0,00	0,000	0,000	-
EFF49	8	6,53	1,51	0,745	0,739	0,01	7	5,84	0,60	0,700	0,738	-0,06	6	5,68	0,19	0,746	0,826	-0,11
EPP56	5	4,60	0,19	0,614	0,375*	0,40	5	4,62	0,13	0,706	0,486*	0,31	4	4,00	0,01	0,711	0,176*	0,76
EFF70	9	8,00	1,84	0,851	0,792	0,07	9	6,78	0,39	0,781	0,634	0,19	5	4,97	0,27	0,714	0,565	0,21
EPP96	9	8,34	2,84	0,851	0,409*	0,53	7	5,64	0,12	0,687	0,486*	0,30	2	1,74	0,00	0,053	0,053	0,00

* Desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$); - = locus monomórfico.

Tabela 3. Resultados das análises realizadas com o programa STRUCTURE utilizando as populações virtuais compostas por indivíduos parentais (P) e híbridos (H) simuladas com o programa HybridLab. O valor de corte (tq), o número de híbridos nas análises (NH), o número de indivíduos parentais (NP), a proporção de indivíduos híbridos detectados nas populações virtuais (PH), o poder de detecção de um indivíduo numa determinada categoria (power), a proporção de indivíduos corretamente classificados numa determinada categoria (accuracy), a proporção de parentais identificados erroneamente como híbridos (erro tipo I) e a proporção de híbridos classificados erroneamente como parentais (erro tipo II) são detalhados a seguir.

Prop. de híbridos simulada	Tq	repetições	NH	NP	Total	PH	Power H	Power P	Accuracy H	Accuracy P	Erro tipo I	Erro tipo II
0	0,9	10	0	60	60	0,017	-	0,972	-	1,000	0,028	-
	0,85	10	0	60	60	0,011	-	0,982	-	1,000	0,018	-
	0,8	10	0	60	60	0,006	-	0,990	-	1,000	0,010	-
	0,75	10	0	60	60	0,003	-	0,995	-	1,000	0,005	-
0,4	0,9	10	40	60	100	0,379	0,788	0,893	0,840	0,866	0,107	0,212
	0,85	10	40	60	100	0,302	0,675	0,947	0,901	0,816	0,053	0,325
	0,8	10	40	60	100	0,239	0,563	0,977	0,947	0,772	0,023	0,437
	0,75	10	40	60	100	0,203	0,493	0,990	0,975	0,746	0,010	0,507

NH = número de indivíduos híbridos; NP = número de indivíduos parentais; PH = proporção de híbridos estimada; Power H = poder de detecção de indivíduos híbridos; Power P = poder de detecção de indivíduos parentais; Accuracy H = acurácia para a identificação de indivíduos híbridos; Accuracy P = acurácia para a identificação de indivíduos parentais.

Tabela 4. Índice de diversidade (F_{ST}) calculado par a par para *Epidendrum secundum*, *E. xanthinum* e híbridos.

	<i>E. secundum</i>	Híbridos	<i>E. xanthinum</i>
<i>E. secundum</i>	0		
Híbridos	0,073	0	
<i>E. xanthinum</i>	0,218	0,057	0

Tabela 5. Haplótipos (H) dos microssatélites plastidiais encontrados na zona de hibridação da Serra dos Órgãos. Grupo típico, valor médio de q e frequência absoluta de cada haplótipo, frequência em cada espécie parental e híbridos, considerando as atribuições feitas pelo programa STRUCTURE.

H	Grupo	Valor médio de q	Frequência do haplótipo	Frequência por grupo (atribuição feita pelo STRUCTURE)		
				<i>E. secundum</i>	Híbridos	<i>E. xanthinum</i>
H21	<i>E. secundum</i>	0,966	1*	1	0	0
H16	<i>E. secundum</i>	0,960	4	4	0	0
H10	<i>E. secundum</i>	0,944	3	2	1	0
H18	<i>E. secundum</i>	0,936	2	2	0	0
H8	<i>E. secundum</i>	0,928	3	2	1	0
H14	<i>E. secundum</i>	0,927	2	2	0	0
H11	<i>E. secundum</i>	0,915	7	5	2	0
H15	<i>E. secundum</i>	0,895	4	3	1	0
H22	<i>E. secundum</i>	0,786	1*	0	1	0
H9	<i>E. secundum</i>	0,677	3	2	1	0
H17	<i>E. secundum</i>	0,556	2	1	1	0
H19	<i>E. secundum</i>	0,321	3	0	2	1
H12	<i>E. xanthinum</i>	0,347	6	0	6	0
H6	<i>E. xanthinum</i>	0,245	20	0	11	9
H13	<i>E. xanthinum</i>	0,245	2	0	1	1
H1	<i>E. xanthinum</i>	0,240	6	0	3	3
H7	<i>E. xanthinum</i>	0,213	6	0	2	4
H5	<i>E. xanthinum</i>	0,211	6	0	4	2
H3	<i>E. xanthinum</i>	0,180	3	0	2	1
H4	<i>E. xanthinum</i>	0,129	2	0	2	0
H20	<i>E. xanthinum</i>	0,123	1*	0	1	0
H2	<i>E. xanthinum</i>	0,045	2	0	0	2

* Haplótipos com frequência igual a 1 (*singletons*)

Tabela 6. Porcentagem de indivíduos classificados erroneamente como híbridos ou parentais em 10 simulações realizadas no programa STRUCTURE. Tq: nota de corte assumida. Populações de origem dos indivíduos classificados erroneamente PBsec: parentais de *E. secundum*, PBxan: parentais de *E. xanthinum*, HF1: híbridos de primeira geração, HF2 híbridos de segunda geração, BCsec: retrocruzamentos de híbridos com *E. secundum*, BCcan: retrocruzamentos de híbridos com *E. xanthinum*.

Tq	parentais		Híbridos			
	PBsec	PBxan	HF1	HF2	BCsec	BCxan
0,9	14,7%	6,7%	2,0%	10,0%	44,0%	29,0%
0,85	8,0%	2,7%	9,0%	20,0%	59,0%	42,0%
0,8	3,3%	1,3%	19,0%	29,0%	72,0%	55,0%
0,75	1,3%	0,7%	25,0%	36,0%	81,0%	61,0%

Tabela 7: Índices de isolamento calculados para cada indivíduo utilizado nos cruzamentos experimentais. Índices de isolamento nos estágios de formação de fruto (F), de formação de sementes (S) e combinado nos dois estágios (FS). Índices de isolamento nos componentes masculino (m) e feminino (f). Probabilidade posterior atribuída pelo STRUCTURE (q).

indivíduo	componente masculino			componente feminino			FS	q	*
	Fm	Sm	F S m	Ff	Sf	F S f			
17841	0,33	0,49	0,66	0,53	0,31	0,68	0,67	0,960	
17840	0,67	0,78	0,93	0,33	0,89	0,93	0,93	0,951	c
17835	0,20	0,69	0,75	0,67	0,33	0,78	0,77	0,940	
17879	0,08	0,26	0,32	0,42	0,13	0,49	0,41	0,900	
17649	0,08	0,52	0,56	0,42	0,23	0,55	0,56	0,900	
17598	0,00	0,41	0,41	1,00	-	1,00	0,70	0,900	b
17597	0,00	0,08	0,08	0,00	0,16	0,16	0,12	0,900	
17669	1,00	-	1,00	0,00	0,41	0,41	0,70	0,900	a
13	0,67	0,77	0,92	0,17	1,00	1,00	0,96	0,841	c
19	0,48	0,94	0,97	0,62	0,81	0,93	0,95	0,730	c
15	0,80	0,14	0,83	0,20	0,99	0,99	0,91	0,727	c
17834	0,00	0,17	0,17	0,33	1,00	1,00	0,59	0,498	b
17	0,11	0,31	0,38	0,00	0,09	0,09	0,24	0,365	
18	0,50	0,80	0,90	0,00	0,55	0,55	0,73	0,295	a
16	0,50	0,13	0,57	0,17	0,23	0,36	0,46	0,245	
17837	0,33	0,91	0,94	0,78	0,85	0,97	0,95	0,140	c
21	0,33	0,62	0,75	0,33	0,29	0,53	0,64	0,122	
17839	1,00	-	1,00	0,60	0,95	0,98	0,99	0,106	c
12	1,00	-	1,00	0,67	0,74	0,91	0,96	0,064	c
17833	0,00	0,08	0,08	0,00	0,20	0,20	0,14	0,044	
17832	0,00	0,19	0,19	0,00	0,12	0,12	0,15	0,028	
20	0,00	0,20	0,20	0,00	0,12	0,12	0,16	0,026	

* a: elevado valor de índice de isolamento apenas no componente masculino, b: elevado valor de índice de isolamento apenas no componente feminino, c: elevado valor de índice de isolamento em ambos os componentes masculino e feminino.

Tabela 8: Índice de isolamento reprodutivo entre *E. secundum*, *E. xanthinum* e híbridos, utilizando diferentes valores de atribuição ($tq=0,90$ e $tq=0,75$) para a classificação de indivíduos parentais e híbridos

Valor de atribuição	Doador de pólen			
	Receptor de pólen	<i>E. secundum</i>	Híbridos	<i>E. xanthinum</i>
0,90	<i>E. secundum</i>	0,44	0,80	0,58
0,90	híbridos	0,74	0,83	0,31
0,90	<i>E. xanthinum</i>	0,45	0,13	0,32
0,75	<i>E. secundum</i>	0,44	0,73	0,86
0,75	híbridos	0,83	0,74	0,78
0,75	<i>E. xanthinum</i>	0,64	0,80	0,49

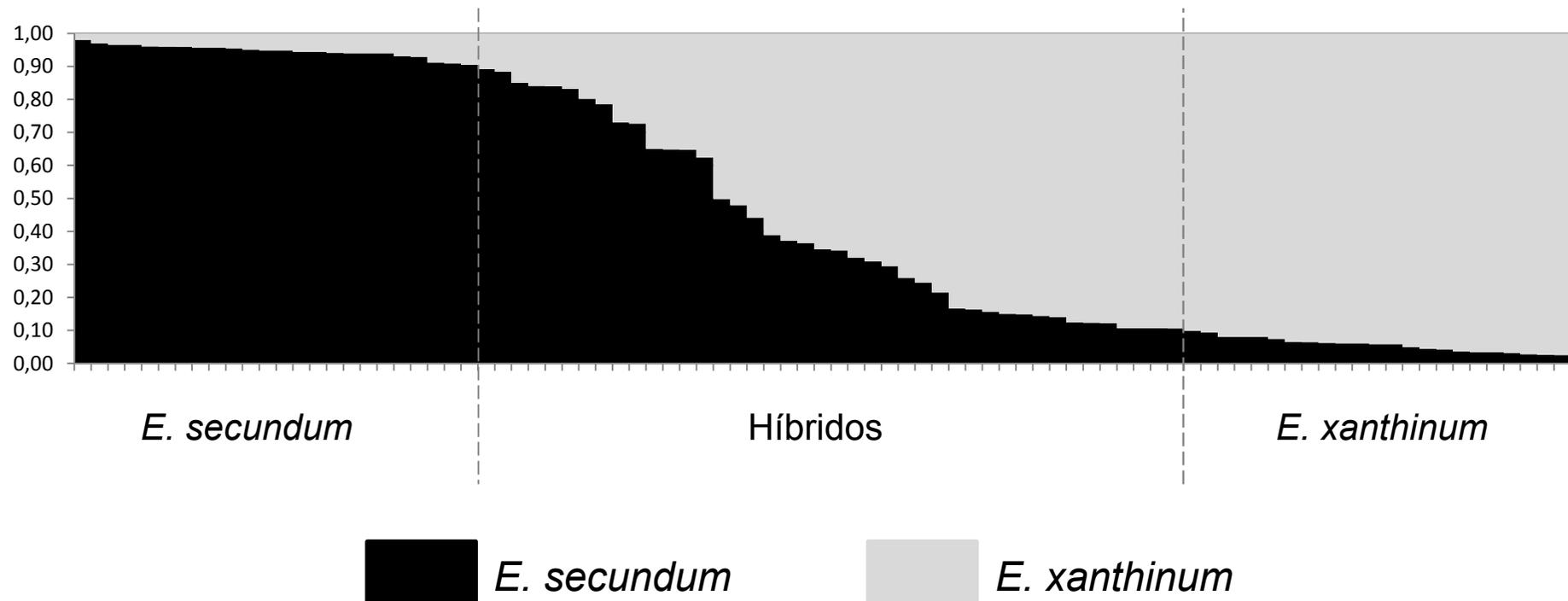


Figura 1. Probabilidade posterior (q) atribuída pelo programa STRUCTURE para as populações simpátricas da Serra dos Órgãos. Cada barra vertical representa um indivíduo, a proporção das cores de preenchimento corresponde à probabilidade de pertencer a um agrupamento ou ao outro.

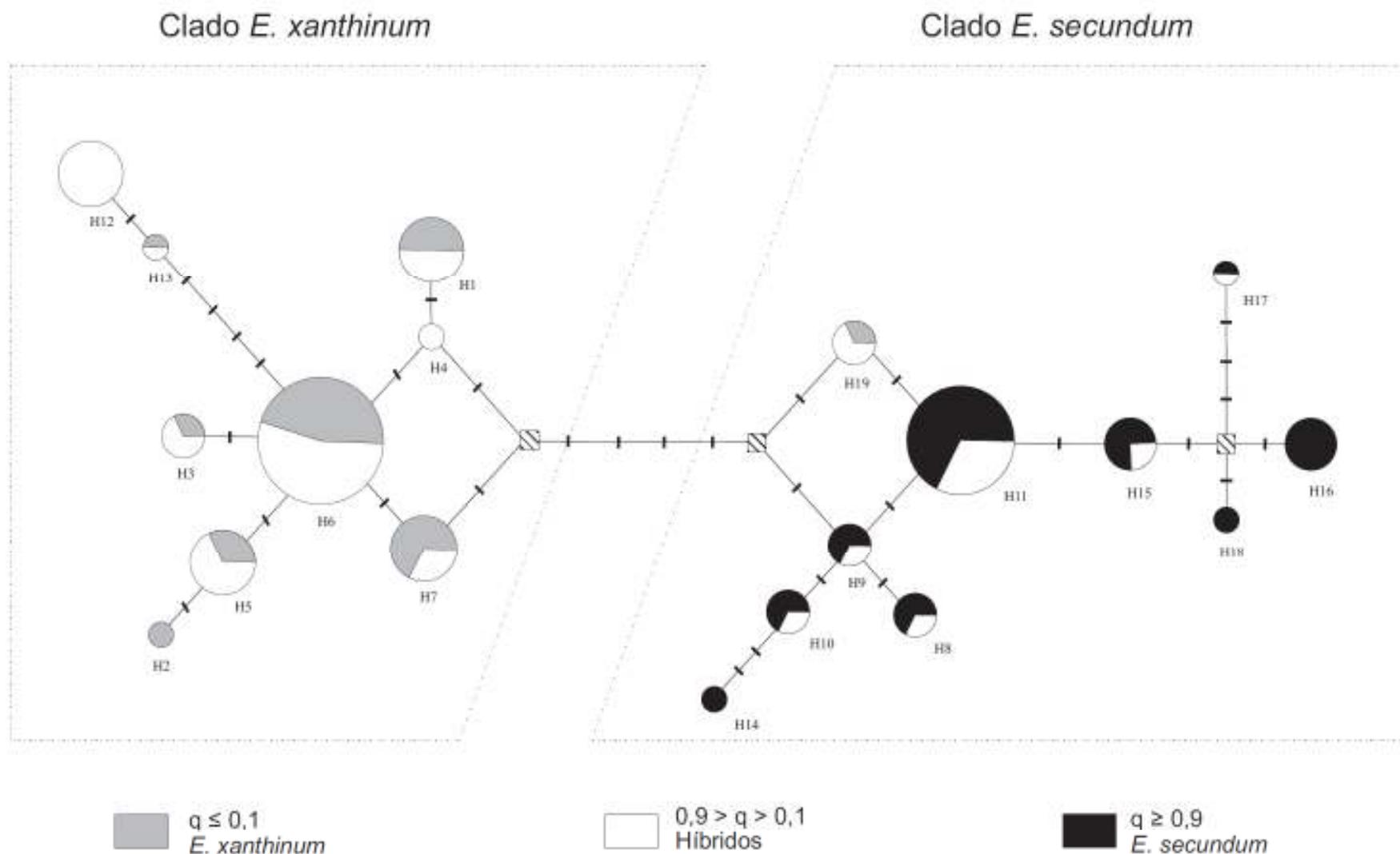


Figura 2: Rede de haplótipos do DNA plastidial das populações da Serra dos Órgãos. Cada haplótipo é representado por um círculo, o diâmetro de cada círculo indica a frequência relativa do haplótipo, o preenchimento em cores indica a proporção de indivíduos classificados de acordo com o programa STRUCTURE como parentais (preto para *E. secundum* e cinza para *E. xanthinum*) ou híbridos (branco). Cada traço negro ao longo da rede indica um passo mutacional na relação entre os haplótipos. Os quadrados listrados indicam haplótipos que não foram amostrados entre os indivíduos analisados.