

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**SARAH BAYOD BIANCHESSI**

**OS PRIMEIROS PASSOS DA FORMAÇÃO  
DE NOVAS ESPÉCIES: DEPRESSÃO POR  
ALOGAMIA E SISTEMA DE CRUZAMENTO  
DE *Epidendrum secundum*  
(ORCHIDACEAE)**

# SARAH BAYOD BIANCHESSI

**OS PRIMEIROS PASSOS DA FORMAÇÃO DE  
NOVAS ESPÉCIES: DEPRESSÃO POR  
ALOGAMIA E SISTEMA DE CRUZAMENTO DE  
*Epidendrum secundum* (ORCHIDACEAE)**

*Orientador: Fabio Pinheiro*

Co-orientador: Clarisse Palma da  
Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biociências da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau  
de Bacharela e Licenciada em Ciências  
Biológicas.

Rio Claro  
2017



575

B577p

Bianchessi, Sarah Bayod

Os primeiros passos da formação de novas espécies: depressão por alogamia e sistema de cruzamento de *Epidendrum secundum* (orchidaceae) / Sarah Bayod Bianchessi. - Rio Claro, 2017

35 f. : il., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Fábio Pinheiro

Coorientador: Clarisse Palma da Silva

1. Evolução (Biologia). 2. Orchidaceae. 3. Depressão por alogamia. 4. Endogamia. I. Título.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, e todas as outras entidades de luz que me regem.

Agradeço à toda minha família que sempre me apoiou, respeitou e me deu suporte para que eu seguisse meus sonhos e vontades.

Agradeço também aos meus amigos que sempre me deram um estímulo adicional quando batia o desanimo.

Um obrigada especial ao meu orientador Fabio Pinheiro, que me mostrou o mundo mágico das orquídeas, e me guiou nessa caminhada acadêmica de uma maneira melhor impossível.

Agradeço aos meus professores, todos eles, que acredito que sempre foram a grande chave para todas minhas inspirações.

Agradeço à UNESP, por ter sido a instituição que fez um dos meus maiores sonhos virarem realidade.

Agraço à FAPESP pelo apoio financeiro.

### **Auto-Retrato Falado**

“Venho de um Cuiabá de garimpos e de ruelas entortadas.  
Meu pai teve uma venda no Beco da Marinha, onde nasci.  
Me criei no Pantanal de Corumbá entre bichos do chão,  
aves, pessoas humildes, árvores e rios.  
Aprecio viver em lugares decadentes por gosto de estar  
entre pedras e lagartos.  
Já publiquei 10 livros de poesia: ao publicá-los me sinto  
meio desonrado e fujo para o Pantanal onde sou  
abençoado a garças.  
Me procurei a vida inteira e não me achei — pelo que  
fui salvo.  
Não estou na sarjeta porque herdei uma fazenda de gado.  
Os bois me recriam.  
Agora eu sou tão ocaso!  
Estou na categoria de sofrer do moral porque só faço  
coisas inúteis.  
No meu morrer tem uma dor de árvore.”  
(BARROS, 1993)

## Resumo

Plantas possuem sistemas reprodutivos variados, e a evolução e surgimento de novas espécies depende diretamente das características reprodutivas de uma determinada população. Transições entre sistemas autocompatíveis e autoincompatíveis podem ser acompanhadas pela formação de barreiras reprodutivas entre as populações com características reprodutivas distintas. O surgimento de barreiras reprodutivas entre espécies de uma mesma população pode indicar os primeiros estágios de formação de novas espécies. O objetivo deste trabalho é testar a hipótese de que a depressão por alogamia ocorre entre diferentes populações de *Epidendrum secundum*, uma espécie amplamente distribuída nas regiões tropicais de altitude na América do Sul. Experimentos de biologia reprodutiva foram conduzidos em indivíduos mantidos em cultivo em casa de vegetação com o objetivo de caracterizar o sistema de cruzamento, fertilidade e compatibilidade reprodutiva entre indivíduos de *E. secundum* provenientes de diferentes populações. A produção de frutos variou dependendo da população e do tratamento realizado. Nos autocruzamentos, os resultados de produção de frutos variaram de 20% à 60%, e a viabilidade de sementes variou de 4,3% à 78%. Os valores baixos indicam depressão por endogamia, enquanto os outros valores maiores mostram que as populações possuem um sistema de cruzamento misto. Os cruzamentos intrapopulacionais seguiram o mesmo padrão, houveram valores baixos e altos tanto de produção de frutos quanto de viabilidade de sementes. Já os índices de isolamento populacional mostraram valores de isolamento total entre alguns pares de populações, sugerindo a formação de barreiras que podem desencadear processos de especiação.

Palavras chave: Orchidaceae; Depressão por alogamia; Endogamia.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>06</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>13</b>
<b>DISCUSSÃO</b>	<b>20</b>
<b>CONCLUSÃO</b>	<b>25</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>26</b>

## INTRODUÇÃO

Sistemas de cruzamento distintos possuem grande impacto na morfologia floral, e possuem implicações diretas na estrutura genética e biogeografia de espécies. Em geral, espécies autocompatíveis evoluem em cenários onde existe uma limitação de polinizadores e em populações disjuntas em regiões marginais da distribuição de espécies, em áreas de habitat contrastantes (BARRETT, 2013). Segundo Stebbins (1974), a transição para sistemas de reprodução autocompatíveis também facilitaria a colonização de novos habitats, uma vez que os agentes polinizadores não seriam necessários. Os níveis de diversidade genética também são contrastantes entre espécies com sistemas reprodutivos distintos, podendo-se observar níveis de diversidade maiores em espécies auto- incompatíveis, devido às taxas maiores de fecundação cruzada, em relação a espécies autocompatíveis (CHARLESWORTH, 2006).

O surgimento de barreiras reprodutivas pode estar associado a mudanças no sistema reprodutivo entre espécies próximas. Num estudo recente, Pinheiro et al. (2015) detectaram uma diminuição significativa na compatibilidade reprodutiva entre espécies que apresentavam sistemas de cruzamento distintos (autocompatíveis e autoincompatíveis). Este padrão já foi identificado para outros grupos de plantas (BRANDVAIN; HAIG, 2005), indicando que a transição entre sistemas de autocompatibilidade e autoincompatibilidade pode ser acompanhada pela formação de barreiras reprodutivas. Os primeiros estudos sobre as transições de sistemas reprodutivos apontavam para a existência de um padrão único, onde espécies autocompatíveis teriam como ancestrais espécies autoincompatíveis (STEBBINS,

1974). Porém, estudos recentes rejeitam esta hipótese, revelando que as transições entre sistemas reprodutivos distintos podem ocorrer em ambas as direções (BUSCH; DELPH, 2012). Portanto, segundo estes estudos recentes, espécies autoincompatíveis podem ter como ancestrais espécies autocompatíveis (PINHEIRO et al., 2015).

O conhecimento dos eventos que causam a especiação é um objetivo da biologia evolutiva e, em princípio, exigiria a investigação das barreiras reprodutivas que podem ter sido responsáveis pela redução do fluxo genético entre populações que se intercruzavam anteriormente (COYNE; ORR, 1989). Esse objetivo só poderia ser alcançado através da investigação de mecanismos de isolamento entre populações distintas pertencentes a uma mesma espécie (ETTERSON et al., 2007, SCOPECE et al., 2010, PINHEIRO et al., 2013), para que os estágios iniciais de diferenciação e acúmulo de incompatibilidades seja detectado. Nos estudos realizados com espécies bem estabelecidas é muito difícil saber quais barreiras contribuíram para os estágios iniciais de diferenciação e quais foram adquiridas após a formação das espécies, mudanças que potencialmente podem mascarar as contribuições de diferentes barreiras de isolamento (KAY, 2006).

A depressão por alogamia é uma limitação da compatibilidade reprodutiva entre populações de uma mesma espécie, diminuindo o fluxo gênico e acelerando a diferenciação genética (EDMANDS, 2002). Sua origem está ligada a presença de incompatibilidades genéticas em populações distribuídas em regiões geográficas distintas. A distribuição disjunta destas populações facilita o acúmulo destas incompatibilidades, principalmente em situações onde o fluxo gênico é baixo. O acúmulo destas incompatibilidades diminui a fertilidade dos cruzamentos entre indivíduos de populações distintas, isolando reprodutivamente populações de uma

mesma espécie (PINHEIRO et al., 2013). Eventos de depressão por alogamia são dificilmente detectados em estudos de campo, uma vez que este fenômeno pode estar presente em populações geograficamente distantes. Desta forma, estudos experimentais baseados em cruzamentos manuais realizados de forma recíproca, incluindo indivíduos em cultivo provenientes de diversas localidades, são um procedimento eficiente para a detecção da depressão por alogamia (SCOPECE et al., 2010).

Novas espécies evoluem a partir de desmembramentos de uma espécie ancestral. Porém, nesses desmembramentos pode haver uma grande variação entre diferentes populações, o que dificulta o reconhecimento das espécies totalmente separadas. (RIDLEY, 2006). De acordo com o conceito biológico de espécie (MAYR, 1942), o processo de especiação ocorre quando surgem barreiras de isolamento reprodutivo entre populações previamente intercruzantes e reprodutivamente compatíveis entre si. É importante ressaltar que as barreiras de isolamento reprodutivo observadas entre espécies distintas não correspondem diretamente aos mecanismos envolvidos nas primeiras etapas de diversificação, uma vez que o isolamento reprodutivo pode surgir após a especiação (COYNE; ORR, 2004, SCOPECE et al., 2010). O estudo de barreiras reprodutivas entre populações de uma mesma espécie oferece a oportunidade de conhecer os mecanismos evolutivos envolvidos nas primeiras etapas do processo de especiação, uma vez que nesta fase ele ainda não foi finalizado. Uma vez que as barreiras reprodutivas observadas entre populações de plantas correspondem aos estágios iniciais de diferenciação, o isolamento reprodutivo ainda é incompleto e os padrões observados podem ser bastante complexos e de difícil interpretação (LEXER; WIDMER, 2008).

As barreiras de isolamento reprodutivo podem atuar antes ou após o cruzamento, sendo classificados, respectivamente, como pré-cruzamento e pós-cruzamento (COYNE; ORR, 2004). Dentre as barreiras pós-cruzamento, pode-se destacar a distinção entre os isolamentos pré-zigótico e pós-zigótico. No isolamento pré-zigótico não há formação de zigoto, seja por isolamento geográfico, diferenças morfológicas e fisiológicas que impeçam a formação do zigoto. Competição polínica e interferências no crescimento do tubo polínico, impedindo a formação dos frutos é um exemplo de barreira pré-zigótica comum em plantas. Já no isolamento pós- zigótico, as barreiras atuam após a formação do zigoto, podendo se manifestar na prole híbrida, a qual poderá ser estéril ou inviável (RIDLEY, 2006).

Dentre as espécies de *Epidendrum* que possuem uma grande distribuição geográfica, *E. secundum* Jacq. pode ser destacada. Sua distribuição vai desde a América Central até o sul do Brasil, sempre em regiões montanhosas como a Cordilheira dos Andes, Planalto das Guianas, Planalto Central Brasileiro e Serra do Mar (PINHEIRO; COZZOLINO, 2013). *Epidendrum secundum* está compreendida na subfamília Epidendroideae, tribo Epidendreae, subtribo Laellinae (VAN DEN BERG et al., 2005, FREUDENSTEIN et al., 2004). É uma espécie de orquídea de hábito terrestre e/ou rupícola (PINHEIRO; BARROS, 2007). Apresenta floração durante todo o ano, o que, facilita sua identificação no campo (NOGUEIRA et al., 2005).

Apesar de sua ampla distribuição geográfica e populações abundantes, poucos estudos foram realizados diretamente com a espécie. A variação morfológica de espécimes distribuídos em populações distintas foi investigada por Pinheiro e Barros (2007), confirmando as diferenças morfológicas entre as populações: como tamanho das folhas, das inflorescências, do pedicelo, entre outras estruturas, e aspectos de biologia reprodutiva foram analisados em duas populações da espécie

por Pansarin e Amaral (2008), relatando há uma diferença de formação de frutos advindos de autopolinização e polinização cruzada, entre as populações. Todas as populações de *E. secundum* investigadas até o momento se revelaram autocompatíveis, não ocorrendo eventos de autopolinização espontânea, fato que indica que polinizadores são necessários para a transferência de pólen e formação de frutos. (PANSARIN; AMARAL, 2008).

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos de biologia reprodutiva foram conduzidos utilizando plantas de

*E. secundum* mantidas em cultivo há pelo menos cinco anos. Foram utilizados 22 indivíduos provenientes de sete populações naturais (Tabela 1), que apresentam características morfológicas e genéticas contrastantes (Pinheiro, dados não publicados), totalizando 253 flores manipuladas. O número de indivíduos usados por população variou de acordo com o número de indivíduos que efetivamente produziu inflorescências durante o período compreendido pelo relatório. Detalhes sobre a procedência dos indivíduos utilizados nos experimentos estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1- Populações de *Epidendrum secundum* que foram analisadas neste projeto.**

População	Procedência	Número de plantas
Pico do Desengano	Santa Maria Madalena - RJ	7
Cânion Pirituba	Bom Sucesso de Itararé - SP	2
Serra da Canastra	São Roque de Minas - MG	3
Cânion Fortaleza	Jacinto Machado - SC	4
Serra da Moeda	Brumadinho - MG	2
Tronqueira	Caparaó – MG	2
Mirante	Serra do Japi - SP	2

Fonte: Bianchessi, 2017.

Em cada inflorescência foram realizados um ou dois tratamentos: autopolinização manual, e polinização cruzada (intra e/ou interpopulacional). Os

cruzamentos foram realizados de forma bidirecional, ou seja, ambos os indivíduos atuaram como doadores e receptores de pólen recíprocos. Utilizando um estilete metálico, a polínia de uma flor foi removida e transferida para o estigma de uma flor de outro indivíduo, e as flores foram marcadas com cores diferentes para identificar os cruzamentos. Em cada tratamento foram utilizadas pelo menos duas flores de cada par de espécimes. As polinizações cruzadas foram realizadas entre indivíduos de uma mesma população e entre espécimes de populações distintas. Cruzamentos que não geraram frutos foram repetidos para uma confirmação deste resultado, excluindo a possibilidade de um possível erro de manipulação do pólen. Se na segunda tentativa ainda não houvesse formação de frutos, a taxa de produção seria considerada zero. Porém, se na segunda tentativa houvesse formação de frutos, o resultado da primeira tentativa seria ignorado, usando apenas o da segunda tentativa.

Considerando os experimentos que visam detectar variações no sistema de cruzamento entre diferentes populações de *E. secundum*, foram realizados 20 autocruzamentos (não considerando as repetições), em 20 indivíduos provenientes de 7 populações diferentes, totalizando 45 flores manipuladas (Tabela 2).

Considerando os experimentos que tem por objetivo detectar barreiras de isolamento reprodutivo entre populações de *E. secundum*, foram realizados 18 cruzamentos intrapopulacionais (descontando as repetições), totalizando 44 flores manipuladas de 6 populações diferentes. (Tabela 3). E 45 cruzamentos interpopulacionais (descontando as repetições), totalizando 102 flores manipuladas de 7 populações diferentes (Tabela 4). Nos cruzamentos interpopulacionais, cada população atuou como doadora e receptora de pólen com outras duas ou três populações diferentes.

Duas barreiras de isolamento reprodutivo foram analisadas, uma pré- zigótica,

inferida através da formação de frutos, e uma pós-zigótica inicial, examinada através da viabilidade de sementes. A formação de frutos foi acompanhada após a realização dos experimentos de cruzamentos recíprocos. A porcentagem de frutos formados em relação ao número de flores polinizadas foi contabilizada. As sementes foram colhidas a partir de cápsulas maduras e armazenadas a 4°C, por até uma semana, para seu posterior tratamento com tetrazólio. Taxas de viabilidade das sementes foram avaliadas por meio do teste de tetrazólio, seguindo o protocolo descrito por Pinheiro et al. (2010). Amostras de 200 sementes por fruto foram analisadas com um microscópio óptico. A porcentagem de sementes viáveis foi calculada dividindo o número de embriões viáveis ao número total de embriões marcados.

Os cálculos das intensidades das barreiras reprodutivas foram realizados utilizando as fórmulas usadas por Sobel e Chen (2014) e Pinheiro et al. (2016). O índice de isolamento pré-zigótico (I-pré) foi baseado na formação de frutos, e foi calculado através da equação RI4A usada por Sobel e Chen (2014). De modo semelhante foi calculado o índice de isolamento pós-zigótico inicial (I-pós), que foi baseado na formação de sementes viáveis, e calculado também através da equação RI4A. Foi calculado um índice de isolamento total, combinando os índices pré e pós-zigóticos iniciais obtidos, utilizando a equação RI4E proposta por Sobel e Chen (2014). Usando essa mesma equação, também foram calculadas as contribuições relativa e absoluta de cada barreira. Todos os índices de isolamento variam de zero (ausência de isolamento) a 1 (isolamento completo). Também foi feita uma análise das sementes provenientes de autocruzamentos para detectar depressão por endogamia ou incompatibilidade tardia. Essa análise consistiu em contabilizar a proporção de embriões viáveis nos frutos formados por autocruzamento, verificando se as sementes inviáveis se encontravam num mesmo estágio de inviabilidade (autoincompatibilidade)

ou se as sementes inviáveis se encontravam em diferentes estágios de inviabilidade, como sementes sem embrião, embriões pouco corados ou deformados de diversas formas (depressão por endogamia).

## RESULTADOS

A média de produção de frutos por população e por planta variou de acordo com o tipo de tratamento, assim como a viabilidade das sementes. A produção de frutos por planta, e a viabilidade das sementes provenientes dos cruzamentos de autopolinização, podem ser observadas na Tabela 2 (ver p. 8). Nos tratamentos de autopolinização, foi observada uma média de 43% na formação de frutos, considerando todas as populações analisadas. Valores elevados foram observados para as populações do Caparaó (75%) e Pico do Desengano (60%). Por outro lado, taxas de formação de frutos ao redor de 20% foram observadas nas populações de Bom Sucesso e São Roque de Minas. Quanto a viabilidade de sementes, a média dos valores variou de 4,3% à 78%, sendo o menor valor proveniente da população de São Roque, e o maior valor da população de Caparaó.

A produção de frutos por planta, e a viabilidade das sementes provenientes dos cruzamentos de polinização intrapopulacional, podem ser observadas na Tabela 3 (ver p. 9). Nos tratamentos de polinização intrapopulacional, a população de Bom Sucesso obteve a maior média de produção de frutos, 100%. A população de Jacinto Machado obteve a menor média, de 24,9% de produção de frutos. O valor das médias da viabilidade de sementes variou de 0%, encontrado na população de São Roque, até à 95%, encontrado na população do Caparaó.

A produção de frutos por planta, e a viabilidade das sementes provenientes dos cruzamentos de polinização interpopulacional, pode ser observada na Tabela 4 (ver p. 10). Nos tratamentos de polinização interpopulacional, a média dos valores de produção de frutos variou de 0% à 100%. Os cruzamentos da população de São

Roque (atuando como receptor de pólen) com as populações de Bom Sucesso (0%), do Pico do Desengano (0%), e da Serra do Japi (0%) obtiveram os menores valores, assim como os cruzamentos da população do Pico do Desengano (atuando como receptor de pólen) com as populações de Jacinto Machado (0%), Caparaó (0%), e Serra do Japi (0%). Os cruzamentos da população da Serra do Japi (atuando como receptor de pólen), com indivíduos provenientes da população do Pico do Desengano não produziram frutos, assim como a de Jacinto Machado (atuando como receptor de pólen) com a população do Caparaó. Já o cruzamento da população de Brumadinho com a população do Caparaó, e o da população do Caparaó com a população de Brumadinho, obtiveram as maiores médias de produção de frutos, de 100%. O restante das populações obteve uma média variada, que foi de 25% à 75% de produção de frutos.

Quanto à viabilidade de sementes, as médias variaram de 18% à 92,25%. Os menores valores são provenientes dos cruzamentos da população de Jacinto Machado (atuando como receptor de pólen), com a população do Pico do Desengano (18%), e da população de Brumadinho (atuando como receptor de pólen), com a população de Jacinto Machado (49,5%). O maior valor é proveniente dos cruzamentos da população do Caparaó (atuando como receptor de pólen), com a população de Brumadinho (92,5%). Na Tabela 5 é possível observar a média de cada população nos três tipos de cruzamentos (autocruzamentos, cruzamentos intrapopulacionais, e cruzamentos interpopulacionais).

**Tabela 2 – Produção de frutos e viabilidade de sementes de cruzamentos de autopolinização realizados em indivíduos de *E. secundum* provenientes de populações distintas.**

Tipo de cruzamento	Doador/receptor de pólen	Número de flores	Número de frutos	Razão n. frutos / n. flores	Viabilidade das sementes
Autopolinização	SR (323)	5	3	60%	4,3%
	SR (325)	2	0	0%	-
	SR (321)	2	0	0%	-
	JM (306)	3	2	66,6%	58
	JM (307)	2	1	50%	76,5%
	JM (308)	2	1	50%	26%
	JM (310)	4	2	50%	36%
	PD (365)	2	0	0%	-
	PD (372)	2	2	100%	73,5
	PD (370)	2	2	100%	68,5%
	PD (387)	2	1	50%	80,5%
	PD (388)	2	1	50%	79,5%
	SJ (348)	1	1	100%	39%
	SJ (346)	2	0	0%	-
	BRU (340)	2	0	0%	-
	BRU (336)	2	1	50%	38,5
	BS (298)	2	1	50%	63%
	BS (300)	2	0	0%	-
	CAP (358)	2	1	50%	66,5
	CAP (360)	2	2	100%	89,5%

**PD:** Pico do Desengano; **SR:** São Roque; **JM:** Jacinto Machado; **SJ:** Serra do Japi; **BRU:** Brumadinho; **BS:** Bom Sucesso de Itararé; **CAP:** Caparaó; entre parênteses: código individual atribuído a cada planta; traço (-): sem resultados.

Fonte: Produção da própria autora.

**Tabela 3 – Produção de frutos e viabilidade de sementes de cruzamentos de polinização intrapopulacional realizados em indivíduos de *E. secundum* provenientes de populações distintas.**

Tipo de cruzamento	Receptor de pólen	Doador de pólen	Número de flores	Número de frutos	Razão n. frutos / n. flores	Viabilidade das sementes
Intrapopulacional	PD (365)	PD (372)	3	1	33,3%	86%
	PD (375)	PD (387)	3	2	66,6%	90,75%
	PD (387)	PD (375)	3	0	0%	-
	PD (372)	PD (365)	3	1	33,3%	94,5%
	PD (370)	PD (390)	2	1	50%	98,5%
	PD (390)	PD (370)	2	2	100%	48,5%
	SR (323)	SR (321)	2	0	0%	-
	SR (321)	SR (323)	2	1	50%	0%
	SJ (348)	SJ (346)	2	0	0%	-
	SJ (346)	SJ (348)	2	1	50%	49,5%
	JM (307)	JM (310)	3	1	33,3%	84%
	JM (310)	JM (307)	3	2	66,6%	86%
	JM (308)	JM (310)	2	0	0%	-
	JM (310)	JM (308)	2	0	0%	-
	BS (298)	BS (300)	2	2	100%	89,25%
	BS (300)	BS (298)	2	2	100%	83,25%
	CAP (358)	CAP (360)	3	3	100%	95,1%
	CAP (360)	CAP (358)	3	0	0%	-

**PD:** Pico do Desengano; **SR:** São Roque; **JM:** Jacinto Machado; **SJ:** Serra do Japi; **BS:** Bom Sucesso de Itararé; **CAP:** Caparaó. O número entre parênteses corresponde ao código individual de cada planta em cultivo; traço (-): sem resultados.

Fonte: Produção da própria autora.

**Tabela 4 – Produção de frutos e viabilidade de sementes de cruzamentos de polinização interpopulacional realizados em indivíduos de *E. secundum* provenientes de populações distintas.**

Tipo de cruzamento	Receptor de pólen	Doador de pólen	Número de flores	Número de frutos	Razão n. frutos / n. flores	Viabilidade das sementes
	BRU (336)	JM (307)	2	0	0%	-
	BRU (340)	JM (310)	2	2	100%	49,5%
	BRU (336)	CAP (358)	2	2	100%	77%
	BRU (340)	BS (300)	2	0	0%	-
	BRU (340)	BS (298)	2	1	50%	96,5%
	BS (298)	BRU (340)	2	1	50%	95,5%
	BS (300)	BRU (340)	2	2	100%	75%
	BS (298)	SR (321)	3	3	100%	82,1%
	BS (300)	SR (321)	2	2	100%	89%
	BS (298)	SR (323)	3	1	33,3%	83%
	BS (300)	SR (323)	2	0	0%	-
	CAP (358)	PD (390)	2	2	100%	89,2%
	CAP (360)	PD (369)	2	0	0%	-
	CAP (360)	JM (310)	2	0	0%	-
	CAP (358)	BRU (336)	2	2	100%	92,25%
	JM (310)	SJ (346)	2	0	0%	-
	JM (307)	SJ (348)	2	1	50%	57,5%
	JM (307)	PD (372)	3	0	0%	-
	JM (310)	PD (365)	2	1	50%	0%
	JM (310)	PD (390)	1	1	100%	36%
	JM (307)	BRU (336)	2	1	50%	-
	JM (310)	BRU (340)	2	0	0%	-
	JM (310)	CAP (360)	2	0	0%	-
Interpopulacional	PD (375)	SR (321)	3	2	66,6%	-
	PD (370)	SR (325)	3	2	66,6%	77,5%
	PD (390)	SR (321)	3	2	66,6%	87,7%
	PD (365)	SR (323)	2	0	0%	92,5%
	PD (372)	JM (307)	3	0	0%	-
	PD (365)	JM (310)	2	0	0%	-
	PD (390)	CAP (358)	3	0	0%	-
	PD (369)	CAP (360)	2	0	0%	-
	PD (390)	SJ (348)	2	0	0%	-
	SJ (348)	JM (307)	3	3	100%	-
	SJ (346)	JM (310)	2	1	50%	88,1%
	SJ (348)	SR (323)	3	1	33,3%	64%
	SJ (348)	PD (390)	2	0	0%	53,5%
	SR (321)	PD (375)	3	0	0%	-
	SR (325)	PD (370)	3	0	0%	-
	SR (321)	PD (390)	2	0	0%	-
	SR (323)	PD (365)	2	0	0%	-
	SR (323)	BS (300)	2	0	0%	-
	SR (321)	BS (298)	2	0	0%	-
	SR (323)	BS (298)	2	0	0%	-
	SR (321)	BS (300)	2	0	0%	-
	SR (323)	SJ (348)	1	0	0%	-

**PD:** Pico do Desengano; **SR:** São Roque; **JM:** Jacinto Machado; **SJ:** Serra do Japi; **BRU:** Brumadinho; **BS:** Bom Sucesso de Itararé; **CAP:** Caparaó; entre parênteses: código individual atribuído a cada planta; traço (-): sem resultados.

Fonte: Produção da própria autora.

**Tabela 5 – Comparação entre as populações na média de produção de frutos, e na viabilidade das sementes nos três cruzamentos.**

População	Auto - PF/VS	Intrapop - PF/VS	Interpop – PF/VS
SR	20%/4,3%	25%/0%	0%/0%
BRU	25%/38,5%	-	50%/74,3%
BS	25%/63%	100%/86,25%	63,8%/84,9%
CAP	75%/78%	50%/95,1%	50%/90,7%
JM	54,1%/49,1%	24,9%/85%	31,2%/31,1%
SJ	50%/39%	25%/49,5%	45,8%/68,5%
PD	60%/75,5%	47,2%/83,65%	22,2%/85,9%

**PD:** Pico do Desengano; **SR:** São Roque; **JM:** Jacinto Machado; **SJ:** Serra do Japi; **BRU:** Brumadinho; **BS:** Bom Sucesso de Itararé; **CAP:** Caparaó; **Auto:** autocruzamentos; **Intrapop:** cruzamentos intrapopulacionais; **Interpop:** cruzamentos interpopulacionais; **VS:** viabilidade das sementes; **PF:** produção de frutos traço (-): sem cruzamentos realizados.

Fonte: Produção da própria autora.

Diversos índices de isolamento apresentaram valores negativos (Tabela 6). Estes valores são oriundos de experimentos onde a viabilidade de cruzamentos intrapopulacionais foi menor do que aquela observada em cruzamentos entre populações distintas. Estes resultados negativos indicam que cruzamentos entre diferentes populações são, em último caso, viáveis. Desta forma, todos os índices que apresentaram valores negativos foram considerados como sendo iguais a zero, seguindo a recomendação de Scopece et al. (2013). Os dados de isolamento reprodutivo podem ser observados na Tabela 6. Os valores de isolamento pré- zigótico variaram de -0,5 à 1. O valor de 0,5 é proveniente dos cruzamentos da população da Serra do Japi (atuando como receptor de pólen), com a de Jacinto Machado. Já o valor de 1 é proveniente de uma série de cruzamentos, como por exemplo os da população de São Roque (atuando como receptor de pólen), com a população do Pico do Desengano.

**Tabela 6 – Índices de isolamento pré-zigótico, pós-zigótico, e isolamento total entre populações.**

	I-pré		I-pós		I-total
	AC	RC	AC	RC	
(PD)xSJ	1	1	-	-	1
(PD)xSR	-0,027	0,675	-0,013	0,324	-0,04
(PD)xJM	1	1	-	-	1
(PD)xCAP	1	1	-	-	1
(SR)xPD	1	1	-	-	1
(SR)xBS	1	1	-	-	1
(SR)xSJ	1	1	-	-	1
(SJ)xJM	-0,5	0,777	-0,143	0,222	-0,643
(SJ)xSR	-0,14	0,827	-0,02	0,173	-0,169
(SJ)xPD	1	1	-	-	1
(JM)xSJ	-0,002	-0,01	0,192	1	0,190
(JM)xPD	-0,33	-0,81	0,737	1,8	0,407
(JM)xCAP	1	1	-	-	1
(BS)xSR	0,26	0,972	0,007	0,02	0,267
(CAP)xPD	0	0	0,03	1	0,03
(CAP)xJM	1	1	-	-	1

**PD:** Pico do Desengano; **SR:** São Roque; **JM:** Jacinto Machado; **SJ:** Serra do Japi; **BS:** Bom Sucesso de Itararé; **CAP:** Caparaó; **I-pré:** isolamento pré-zigótico; **I-pós:** isolamento pós zigótico; **I-total:** isolamento total; **AC:** contribuição absoluta; **RC:** contribuição relativa; **( ):** populações que atuaram como receptoras de pólen.

Fonte: Produção da própria autora.

Os valores do isolamento pós zigótico variaram menos do que os pré zigóticos, sendo seus valores de -0,211 a 0,650. O menor valor (-0,211) é proveniente dos cruzamentos da população de Serra do Japi (atuando como receptor de pólen), com a população de Jacinto Machado. Já o maior valor (0,650) é proveniente dos cruzamentos da população de Jacinto Machado (atuando como receptor de pólen), com a do Pico do Desengano.

Quanto aos valores de isolamento total, o menor valor foi de -0,643 e o maior foi 1. Os cruzamentos da população da Serra do Japi (atuando como receptor de

pólen), com a de Jacinto Machado obtiveram o menor valor. Já o maior valor foi obtido por vários cruzamentos, como por exemplo o da população de São Roque (atuando como receptor de pólen), com a população de Bom Sucesso.

Os embriões provenientes de autocruzamentos da população de Brumadinho foram abortados no mesmo estágio embrionário (Figura 1). Já os das populações de São Roque e Serra do Japi foram abortados em estágios diferentes, apresentando um gradiente de fases embrionárias (Figura 2). Um exemplo de sementes viáveis pode ser observado na Figura 3.

**Figura 1** - Sementes sem embrião. Os abortos aconteceram todos no mesmo estágio, representando sinais de autoincompatibilidade tardia.



Fonte: Produção da própria autora.

**Figura 2** - Sementes com embriões abortados em diferentes estágios, representando depressão por endogamia.



Fonte: Produção da própria autora.

**Figura 3** - Sementes de *Epidendrum secundum* mostrando coloração vermelha intensa devido à reação com o reagente tetrazólio, indicando elevada viabilidade.



Fonte: Produção da própria autora.

## DISCUSSÃO

Os resultados de autocruzamentos foram bastante variados. Nenhuma população obteve a produção de frutos baixa o suficiente para caracterizar uma auto-incompatibilidade clássica (Tabela 1, ver p. 6), o que faz com que até o momento, todas se encontrem em um sistema de cruzamento misto, onde podemos observar diferentes níveis de fertilidade (BORBA, 2001). A análise de viabilidade de sementes, mostrou que a baixa viabilidade de algumas populações, como a de São Roque, e a de Serra do Japi, é proveniente de uma provável depressão por endogamia, já que o aborto dos embriões ocorreu em um gradiente de fases, onde é possível notar embriões com diferentes graus de viabilidade (Figura 2, ver p. 18). Geralmente, acredita-se que a depressão por endogamia surge quando o grupo de genes de uma população ou espécie carrega uma carga genética e o acasalamento entre indivíduos aparentados aumenta a incidência de homozigose. Sob tais condições, a chance de que os alelos deletérios recessivos, ou parcialmente recessivos, sejam expressos pode aumentar (CHARLESWORTH; CHARLESWORTH, 1987, CHARLESWORTH; WILLIS, 2009). Essa endogamia pode ser fruto de uma diminuição no tamanho da população, assim como uma possível estratégia para evitar descendentes provenientes de autocruzamentos, evitando assim uma perda drástica da variação genética (LIPOW, 1999).

Dois temas de importância fundamental para muitas áreas da biologia evolutiva são as consequências da endogamia nas populações e do cruzamento entre as populações. Com quase nenhuma exceção, estudos empíricos indicam que a endogamia provoca uma mudança nos fenótipos causando uma redução no fitness

(WRIGHT, 1977, SHIELDS, 1982, CHARLESWORTH; CHARLESWORTH, 1987, RALLS et al., 1988, LYNCH, 1989). Além disso, o isolamento e o tamanho pequeno das populações, como resultado da destruição e fragmentação do habitat, por exemplo, podem afetar negativamente a fertilidade das plantas através da limitação do polinizador e aumento dos níveis de endogamia (FISCHER; MATTHIES, 1997). Em populações pequenas e isoladas, o número limitado de parceiros de acasalamento e os níveis reduzidos de variabilidade genética como resultado da deriva genética pode aumentar ainda mais a probabilidade de endogamia (LACY, 1987, ELLSTRAND; ELAM, 1993). Isso pode levar a uma redução do sucesso reprodutivo das plantas, a curto prazo devido à depressão da endogamia, que pode aumentar ainda mais pelo acúmulo de mutações prejudiciais (LANDE, 1994, LYNCH; CONER; BURGER, 1995) e, a longo prazo, porque a diminuição da variabilidade genética reduz o potencial de adaptação às mudanças das condições ambientais. Em *Gentianella. germânica* (Gentianaceae) houve redução do fitness por limitação do polinizador (FISCHER; MATTHIES, 1997). Porém uma meta-análise recente mostrou que, entre as espécies, a magnitude da depressão da endogamia aumenta com o tamanho da população da planta, conforme esperado se as espécies que ocorrem em pequenas populações compartilharem uma história de endogamia (ANGELONI et al., 2011).

De acordo com Becerra e Lloyd (1992), em algumas populações acontece um processo de competição, no qual as plantas “favorecem” a formação de frutos provenientes de fecundações cruzadas. Apenas a população de Brumadinho apresentou sinais de uma possível incompatibilidade tardia, pois seus embriões foram abortados no mesmo estágio embrionário, podendo indicar a presença de um sistema de cruzamento auto-incompatível (Figura 1, ver p. 17). Este padrão foi

observado por Santos (2007) na espécie *Acca sellowiana* (Myrtaceae), e por Borba (2001) através de um estudo realizado em espécies do gênero *Pleurothallis* (Orchidaceae). A autocompatibilidade e a auto-incompatibilidade são dois extremos de um gradiente contínuo, e são poucas as espécies que se localizam nesses extremos. Desta forma, a distinção entre essas duas condições pode ser arbitrária (BORBA, 2001). Variações na fertilidade em autocruzamentos podem variar entre populações de uma mesma espécie, e é comum ocorrer em populações naturais, como observado por Lipow (1999) e Schemske (1985).

Os resultados dos cruzamentos intrapopulacionais apresentaram diferenças entre as populações. Algumas populações como a do Caparaó, e a de Bom Sucesso apresentaram grande taxa de produção de frutos, assim como alta taxa de viabilidade de sementes (Figura 3, ver p. 19), o que gera a especulação de uma alta variabilidade genética, que poderia ser confirmada através de análises moleculares futuras. Já as da Serra do Japi, e as de São Roque, apresentaram as menores taxas, o que pode caracterizar depressão por endogamia nessas populações, no caso dos indivíduos serem muito parecidos, o que também explica a baixa taxa de produção de frutos provenientes de autopolinizações na população da Serra do Japi. Situações como esta já foram observadas em outro gênero de Orchidaceae (BORBA, 2001, BRYS; JACQUEMYN, 2015, SLETVOLD, 2012). Em geral, a depressão por endogamia também pode se manifestar em cruzamentos envolvendo indivíduos semelhantes geneticamente, com elevado grau de parentesco. Este alto grau de similaridade entre indivíduos de uma mesma população pode ter sido provocado por eventos históricos que resultaram numa drástica diminuição populacional, como incêndios ou períodos prolongados de seca. Nestes casos, as populações envolvidas

correm risco de extinção, uma vez que a persistência da endogamia ao longo das gerações pode comprometer os ciclos reprodutivos da espécie (SCHEMSKE, 1985).

Quanto aos cruzamentos interpopulacionais é possível observar resultados que indicam diferentes níveis de isolamento reprodutivo. A população de São Roque foi a que menos apresentou compatibilidade com o restante das populações, e isso pode apontar o início da formação de uma barreira de isolamento reprodutivo nessa população, como já observado em *E. denticulatum* (PINHEIRO, 2013). A população do Pico do Desengano também apresentou alto grau de isolamento reprodutivo com as outras populações. Como as populações de *Epidendrum secundum* ocorrem em regiões montanhosas, elas acumulam diferenças genéticas por um longo período de tempo, o que pode gerar barreiras reprodutivas entre elas, causando o isolamento reprodutivo. A fragmentação e o aumento do isolamento podem limitar o fluxo de genes entre as populações e promover a diferenciação genética entre populações. Essa diferenciação poderia evoluir tanto por deriva genética quanto por seleção divergente, devido à adaptação local (LINHART; GRANT, 1996). Se a divergência genética for substancial, os cruzamentos entre as populações podem sofrer depressão alogâmica (DUDASH; FENSTER, 2000). Não se espera que as espécies que se propaguem e dispersem suas sementes em grandes distâncias expressem depressão por alogamia após cruzamentos entre populações próximas em habitats similares, porém Sletvold (2012) obteve resultados contrários à essa ideia previa. Algumas populações podem acumular essas diferenças mais rapidamente do que as outras, o que explica os diferentes graus de isolamento entre essas populações. Resultados como esse foram observados por Frankham (2011), Ostevik (2016), Sletvold (2012) e Brys e Jacquemyn (2015). No entanto, existem apenas alguns estudos que relacionaram a magnitude da depressão por endogamia ou por

alogamia com a variedade dos sistemas de acasalamento nas orquídeas (JOHNSON et al., 2009, PETER; JOHNSON, 2009).

Entretanto, outras populações, como a da Serra do Japi, apresentaram baixo isolamento reprodutivo com outras populações, o que afirma que a compatibilidade entre elas ainda é alta. Em alguns resultados foi possível observar as barreiras pré zigóticas mais intensas do que as pós zigóticas, isso confirma a hipótese de que o isolamento pós zigótico evolui gradualmente, enquanto o pré zigótico ocorre mais rapidamente (PINHEIRO et al., 2015).

## CONCLUSÃO

É evidente que as populações de *Epidendrum secundum* estão passando por diferentes situações de mudanças em seus sistemas de cruzamento. Essas diferenças podem ser consequências dos diferentes estímulos e impactos ambientais que essas populações estão suscetíveis, o que faz com que elas acumulem diferenças enquanto se adaptam à diferentes condições do ambiente. O acúmulo dessas diferenças é responsável por gerar barreiras em algumas dessas populações, fazendo com que elas percam a capacidade de se intercruzarem, caracterizando os primeiros passos de um isolamento reprodutivo total, e da formação de novas espécies. O esperado é que com o tempo essas barreiras se tornem mais fortes, e as definições mais evidentes. Futuramente é interessante que se realize análises moleculares dessas populações, para confirmar as supostas variabilidades genéticas e compatibilidades entre elas. Além disso, análises dos tubos polínicos também seriam importantes para observar melhor os processos de aborto dos embriões, seja por endogamia ou por incompatibilidade tardia.

## REFERÊNCIAS

ANGELONI, F.; OUBORG, N.J.; LEIMU, R. Meta-analysis on the association of population size and life history with inbreeding depression in plants. **Biological Conservation**, n. 144, p. 35-43, 2011.

BARRETT, S.C. The evolution of plant reproductive systems: how often are transitions irreversible? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, n. 280, p. 1-9, 2013.

BECERRA, J.X.; LLOYD, D.G. Competition-dependent abscission of self-pollinated flowers of *Phormium tenax* (Agavaceae): A second action of self-incompatibility at the whole flower level? **Evolution**, v. 46, n. 2, p. 458-469, 1992.

BORBA, E.L.; SEMIR, J.; SHEPHERD, G.J. Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. **Annals of Botany**, n. 88, p. 89-99, 2001.

BRANDVAIN, Y.; HAIG, D. Divergent mating systems and parental conflict as a barrier to hybridization in flowering plants. **American Naturalist**, n. 166, p. 330–338, 2005.

BRYN, R.; JACQUEMYN, H. Severe outbreeding and inbreeding depression maintain mating system differentiation in *Epipactis* (Orchidaceae). **Journal of evolutionary biology**, n.29, p. 352-359, 2016.

BUSCH, J.W.; DELPH, L.F. The relative importance of reproductive assurance and automatic selection as hypotheses for the evolution of self-fertilization. **Annals of botany**, n.109, p. 553-562, 2012.

CHARLESWORTH, D. Evolution of plant breeding systems. **Current Biology**, n.16, p. 726-735, 2006.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. **Annual Review of Ecology Systematics**, n.18, p. 237–268, 1987.

CHARLESWORTH, D.; WILLIS, J.H. Fundamental concepts in genetics: the genetics of inbreeding depression. **Nature Review Genetics**, n.10, p. 783–796, 2009.

COYNE, J.A.; ORR, H.A. Patterns of speciation in *Drosophila*. **Evolution**, n. 43, p. 362-381, 1989.

COYNE, J.A.; ORR, A. **Speciation**. Sunderland: Sinauer Associates, 2004.

EDMANDS, S. Does parental divergence predict reproductive compatibility? **Trends in Ecology & Evolution**, n.17, p. 520-527, 2002.

DUDASH, M.R.; Fenster FENSTER, C.B. Inbreeding and outbreeding depression in fragmented populations. In: YOUNG, A.G.; CLARKE, G.M. (Ed.) **Genetics, demography and viability of fragmented populations**. Cambridge: Cambridge University Press, Cambridge, 2000. p 35–53.

ELLSTRAND, N. C.; ELAM, D. R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. **Annual Review of Ecology and Systematics**, n. 24, p. 217–242, 1993.

ETTERSON, J.R.; KELLER, S.R.; GALLOWAY, L.F. Epistatic and cytonuclear interactions govern outbreeding depression in the autotetraploid *Campanulastrum americanum*. **Evolution**, n. 61, p. 2671–2683, 2007.

FISCHER, M.; MATTHIES, D. Mating structure and inbreeding and outbreeding depression in the rare plant *Gentianella germanica* (Gentianaceae). **American Journal of Botany**, n. 84, p. 1685-1685, 1997.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; ELDRIDGE, M.D.; LACY, R.C.; RALLS, K.; DUDASH, M.R.; FENSTER, C.B. Predicting the probability of outbreeding depression. **Conservation Biology**, n.25, p. 465-475, 2011.

FREUDENSTEIN, J.V.; VAN DEN BERG, C.; GOLMAN, D.H.; KORES, P.J.; MOLVRAY, M.; CHASE, M.W. An expanded plastid DNA phylogeny of Orchidaceae and analysis of jackknife branch support strategy. **American Journal of Botany**, n. 91, p. 149-157, 2004.

JOHNSON, T.R.; STEWART, S.L.; KAUTHI, P.; KANE, M.E.; PHILMAN, N. Confronting assumptions about spontaneous autogamy in populations of *Eulophia alta* (Orchidaceae) in south Florida: assessing the effect of pollination treatments on seed formation, seed germination and seedling development. **Botanical Journal of Linnean Society**, n.161, p. 78-88, 2009.

KAY, K.M. Reproductive isolation between two closely related hummingbird-pollinated neotropical gingers. **Evolution**, n. 60, p. 538–552, 2006.

LACY, R.C. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. **Conservation Biology**, n. 1, p.143-158, 1987.

LANDE, R. Risk of population extinction from fixation of new deleterious mutations. **Evolution**, n. 48, p.1460–1469, 1994.

LEXER, C.; WIDMER, A. The genic view of plant speciation: recent progress and emerging questions. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, n. 363, p. 3023-3036, 2008.

LINHART, Y.B.; GRANT, M.C. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 27, p. 237–277, 1996.

LIPOW, S.R.; BROYLES, S.B.; WYATT, R. Population differences in self-fertility in the “self-incompatible” milkweed *Asclepias exaltata* (Asclepiadaceae). **American Journal of Botany**, n. 86, p. 1114-1120, 1999.

LYNCH, M. Design and analysis of experiments on random drift and inbreeding depression. **Genetics**, n. 120, p. 791-807, 1989.

LYNCH, M ; CONERY, J.; BURGER, R. Mutation accumulation and the extinction of small populations. **American Naturalist**, n. 146, p. 489 - 518, 1995.

MAYR, E. **Systematics and the Origin of Species**. New York: Columbia Univ. Press, 1942.

NOGUEIRA, R.E.; PEREIRA, O.L.; KASUYA, M.C.M.; LANNA, M.C.; MENDONÇA, M. Fungos micorrízicos associados e orquídeas em campos rupestres na Região do Quadrilátero Ferrífero, Minas Gerais, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, n. 3, p. 417-424, 2005.

OSTEVIK, K.L.; ANDREW, R.L.; OTTO, S.P.; RIESEBERG, L.H. Multiple reproductive barriers separate recently diverged sunflower ecotypes. **Evolution**, n. 70, p. 2322-2335, 2016.

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**, n.10, p. 211–219, 2008.

PETR, C.I.; JOHNSON, S.D. Reproductive biology of *Acrolophia cochlearis* (Orchidaceae): estimating rates of cross-pollination in epidendroid orchids. **Annals of Botany**, v. 104, p.573–581, 2009.

PINHEIRO, F.; BARROS, F. Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. **Nordic Journal of Botany**, n. 25, p. 129–136, 2007.

PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S. *Epidendrum* (Orchidaceae) as a model system in ecological and evolutionary studies in Neotropics. **Taxon**, n. 62, p. 77–88, 2013.

PINHEIRO, F. et al. Phylogeographic structure and outbreeding depression reveal early stages of reproductive isolation in the Neotropical orchid *Epidendrum denticulatum*. **Evolution**, n. 67, p. 2024- 2039, 2013.

PINHEIRO, F.; CAFASSO, D.; COZZOLINO, S.; SCOPECE, G. Transitions between self compatibility and self-incompatibility and the evolution of reproductive isolation in the large and diverse tropical genus *Dendrobium* (Orchidaceae). **Annals of botany**, n.116, p. 457 – 467, 2015.

PINHEIRO, F.; COZZOLINO, S.; CAFASSO, D.; CARDOSO-GUSTAVSON, P.; SUZUKI, R.M.; PALMA-SILVA, C. Strong but permeable barriers to gene exchange between sister species of *Epidendrum*. **American Journal of Botany**, n.103, p. 1472-1482, 2016.

RALLS, K.; BALLOU, J.D.; TEMPLETON, A. Estimates of lethal equivalents and cost of inbreeding in mammals. **Conservation Biology**, n. 2, p. 185-193, 1988.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2006. SANTOS,

K.L.; LENZI, M.; CAPRESTANO, C.A.; DANTAS, A.C.D.M.; DUCROQUET, J.P.H.J.; NODARI, R.O.; GUERRA, M. Evidência da atuação do sistema de auto-incompatibilidade tardia em *Acca sellowiana* (Berg) Burret.(Myrtaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, n. 29, 2007.

SCHEMSKE, D.W.; LANDE, R. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. **Evolution**, v. 39, n. 1, p. 41-52, 1985.

SCOPECE, G.; LEXER, C.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. Polymorphism of postmating reproductive isolation within plant species. **Taxon**, n. 59, p. 1367–1374, 2010.

SCOPECE, G.; CROCE, A.; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Components of reproductive isolation between *Orchis mascula* and *Orchis pauciflora*. **Evolution**, v. 67, p. 2083-2093, 2013.

SHIELDS, W.M. **Philopatry, Inbreeding, and the Evolution of Sex**. Albany: State Univ. of New York Press, 1982.

SLETVOLD, N.; GRINDELAND, J. M.; ZU, P.; ÅGREN, J. Strong inbreeding depression and local outbreeding depression in the rewarding orchid *Gymnadenia conopsea*. **Conservation Genetics**, v.13, n.5, p. 1305-1315, 2012.

SOBEL, J.M.; CHEN, G.F. Unification of methods for estimating the strength of reproductive isolation. **Evolution**, v. 68, n. 1511-1522, 2014.

STEBBINS, G. **Flowering plants: evolution above the species level**. Cambridge: Belknap Press, 1974.

VAN DEN BERG, C.; GOLDMAN, D.H.; FREUDENSTEIN, J.V.; PRIDGEON, A.M.; CAMERON, K.M.; CHASE, M.W. An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, n. 92, p. 613- 624, 2005.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 3. Experimental Results and Evolutionary Deductions**. Chicago: Univ. Chicago Press, 1977.







