Sistemas de cruzamento e isolamento reprodutivo entre populações de *Epidendrum orchidiflorum* (Orchidaceae)

Palavras-Chave: ISOLAMENTO REPRODUTIVO, *EPIDENDRUM ORCHIDIFLORUM*, ORCHIDACEAE, ESPECIaÇÃO, CRUZAMENTOS RECÍPROCOS, DEPRESSÃO POR ENDOGAMIA, ALOGAMIA.

Autores(as):
Thayná Silva Malavazi de Oliveira, IB - UNICAMP
Fábio Pinheiro, IB - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O fenômeno do isolamento reprodutivo dentro de uma linhagem tem sido intrinsecamente ligado ao delineamento de várias espécies desde as contribuições de Dobzhansky (1937) e Mayr (1942). Tem-se que, de acordo com Coyne & Orr (2004), espécies distintas são caracterizadas por um isolamento reprodutivo substancial mas não necessariamente completo, de modo a provar a importância desse fenômeno no acúmulo de diferenças - provenientes da diminuição ou até interrupção total do fluxo gênico entre populações - por meio de barreiras pré-zigóticas, que podem se dar devido ao isolamento geográfico ou diferentes polinizadores, levando a diminuição de frutos produzidos, e pós-zigóticas graças a divergências genéticas acumuladas o que diminui a viabilidade de sementes produzidas (Gouveia & Pinheiro, 2015). Desse modo, vê-se a importância do estudo do isolamento reprodutivo na delimitação de novas espécies assim como na análise de fenômenos de especiação em populações continentais e insulares, por exemplo.

Sendo um fenômeno importante, o isolamento reprodutivo tem como ser avaliado através de cruzamentos recíprocos entre populações (Gouveia & Pinheiro, 2015). Esses cruzamentos, para além da avaliação do isolamento, também são importantes para identificação de incompatibilidade dos sistemas reprodutivos entre os indivíduos participantes, que fazem parte das barreiras pré-zigóticas possíveis. Para além disso, a depressão por alogamia,definida pela redução na aptidão reprodutiva, capacidade de acasalar ou polinizar, fertilizar, produzir descendentes, sobreviver ou se reproduzir, na primeira ou nas últimas gerações após o cruzamento de populações diferentes (Ralls, Frankham, Ballou, 2013, p. 250) e a depressão por endogamia - fenômeno que se dá pelo aumento significativo de cruzamentos entre parentes e, portanto, mais comum em populações pequenas e isoladas, o que leva a uma menor viabilidade da prole no que diz respeito à sobrevivência e reprodução destes também podem ser identificadas e medidas através de experimentos que partem de autofecundações. Sua origem relaciona-se à presença de incompatibilidades genéticas em populações distribuídas em regiões geográficas distintas. A distribuição dispersa destas populações colabora para o acúmulo destas incompatibilidades,

sobretudo em situações onde o fluxo gênico é reduzido. O acúmulo destas divergências diminui a fertilidade dos cruzamentos entre indivíduos de populações distintas, isolando reprodutivamente populações de uma mesma espécie (Pinheiro et al., 2013), o que será observado no presente trabalho.

O gênero *Epidendrum* conta com cerca de 1500 espécies, sendo possível observar o efeito dos cruzamentos recíprocos, além de diversos mecanismos evolutivos entre populações. Dentre elas, *Epidendrum denticulatum* (Pinheiro & Cozzolino, 2013)é um exemplo de espécie utilizadas em estudos acerca da importância do isolamento reprodutivo para ocorrência de especiação. Nas pesquisas envolvendo *E. denticulatum* foram observadas barreiras de isolamento reprodutivo entre as populações analisadas, com uma assimetria significativa na viabilidade de sementes em cruzamentos entre determinadas populações, além de que, majoritariamente, nos cruzamentos interpopulacionais houveram padrões assimétricos de compatibilidade reprodutiva, indicando barreiras incompletas entre as populações (Pinheiro & Cozzolino, 2013).

Epidendrum orchidiflorum é uma espécie herbácea da família Orchidaceae, rupícola, com crescimento simpodial, caule tipo cauloma, folhas com nervação paralela, dísticas, ovadas, lanceoladas e coriáceas, inflorescência apical, e flores monoclinas, sépalas eretas, ovadas e glabras, e lanceoladas (Bastos; Van Den Berg, 2012). *E. orchidiflorum* possui flores de antese noturna, coloração verde, podendo apresentar manchas marrons, nectários nupcial (do tipo cunículo) e extranupcial, com labelo ressupinado, verticilos florais robustos e osmóforos. É uma espécie de polinização generalista que, quando cruzada, é realizada, principalmente, por insetos da ordem Lepidoptera e autocompatível, mas necessita dos polinizadores para a efetiva transferência de pólen. A espécie possui ampla distribuição de populações no território brasileiro - presente nas regiões Norte (Amazonas, Pará e Roraima), Nordeste (Alagoas, Bahia e Sergipe) e Sudeste (Rio de Janeiro) - as quais, de acordo com ROBLES, 2016, - após análises de variância molecular - possuem diferenciação genética significativa entre si, podendo indicar a existência de algum tipo de barreira reprodutiva. Dado seu padrão vasto de distribuição, estudos prevendo análise de desenvolvimento de barreiras pré e pós zigóticas são possíveis a partir das populações dessa espécie.

MATERIAL E MÉTODOS:

Serão conduzidos experimentos de biologia reprodutiva com indivíduos das diferentes populações da espécie, que se encontram em cultivo em casa de vegetação, sob condições controladas, no Jardim Experimental do campus da Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, para avaliar o sistema de cruzamento, a fertilidade e compatibilidade reprodutiva entre elas. Serão utilizados cerca de 15 indivíduos das populações advindas dos estados de Alagoas, Amazonas e Rio de Janeiro (Figura 1; Tabela 1). Serão realizados tratamentos de autopolinização e polinização cruzada entre indivíduos das diferentes populações, utilizando um alfinete para remoção da polínia da flor que atuará como doadora de pólen, e da sua introdução no estigma da

flor que atuará como receptora. Cada cruzamento será realizado de forma bidirecional, ou seja, ambos os indivíduos atuarão como doadores e receptores de pólen de forma recíproca. Duas barreiras de isolamento reprodutivo serão analisadas, uma pré-zigótica, inferida através da formação de frutos (a porcentagem de frutos formados será contabilizada e utilizada para mensurar a intensidade do isolamento) e uma pós-zigótica (examinada através da viabilidade de sementes, com uma amostra de duzentas sementes por fruto; a percentagem de sementes viáveis será calculada dividindo o número de embriões viáveis pelo número total de embriões marcados, e esta informação será utilizada para medir a intensidade do isolamento). A formação de frutos será acompanhada através de marcações nos pedicelos das flores polinizadas, e os frutos serão colhidos quando estiverem com cápsulas maduras e armazenados a 4◦C até a contagem das sementes. O teste de Kruskal–Wallis, através do software SPSS 11.0 (Pinheiro et al., 2015), será utilizado para realizar a análise de produção de frutos e a viabilidade de sementes resultante de experimentos de auto fecundação, fecundação cruzada intraespecífica e fecundação cruzada. O índice de isolamento reprodutivo entre as espécies será calculado utilizando a metodologia descrita por Pinheiro et al. (2016). Os valores de produção de frutos e viabilidade de sementes serão utilizados, respectivamente, para os cálculos do índice de isolamento pré-zigótico e índice de isolamento pós-zigótico. Os dois índices serão combinados para produzir um valor total de isolamento entre cada par de espécies, utilizando a fórmula RI4E descrita por Sobel & Chen (2014). Os resultados obtidos poderão variar entre 0 (indicando que não há isolamento) e 1 (indicando isolamento completo).

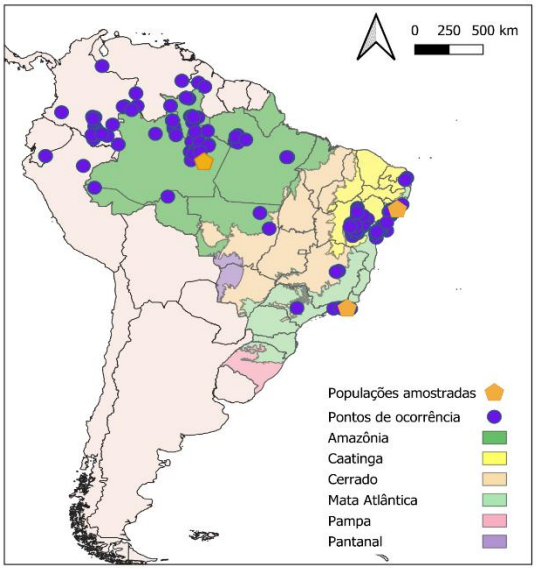

Figura 1: Mapa de distribuição de Epidendrum orchidiflorum indicando as populações que serão investigadas neste estudo.

População	Procedência
AL	Piaçabuçu
RJ	Restinga de Massambaba
AM	Borba

Tabela 1 Localidade de populações da espécie:

RESULTADOS:

O presente projeto visa investigar os sistemas de cruzamento e os mecanismos de isolamento reprodutivo entre populações geograficamente distintas de *Epidendrum orchidiflorum* (Orchidaceae). Espera-se identificar a ocorrência de barreiras pré-zigóticas, evidenciadas por diferenças na produção de frutos entre cruzamentos manuais intra e interpopulacionais, o que indicaria a presença de barreiras que impedem a fertilização e implicam isolamento reprodutivo inicial entre as populações estudadas. Além disso, pretende-se analisar barreiras pós-zigóticas por meio da viabilidade das sementes resultantes dos cruzamentos, avaliando possíveis limitações genéticas que comprometam a sobrevivência e o desenvolvimento dos descendentes, refletindo divergências genéticas acumuladas. Os cruzamentos recíprocos entre populações distintas devem permitir a detecção de depressão por alogamia, manifestada pela redução da aptidão reprodutiva devido a incompatibilidades genéticas que limitam a fertilidade e reforçam o isolamento reprodutivo, resultado da divergência e do fluxo gênico restrito entre essas populações. Também será investigada a ocorrência de variações no sistema de cruzamento, incluindo possíveis evidências de depressão por endogamia dentro das populações, o que contribuiria para o entendimento dos impactos do sistema reprodutivo na manutenção da diversidade genética. Ao caracterizar os níveis e mecanismos de isolamento reprodutivo, tanto pré quanto pós-zigóticos, os resultados obtidos deverão ampliar o conhecimento sobre os processos evolutivos que levam à especiação e à manutenção da diversidade genética em populações continentais de orquídeas. Dessa forma, o estudo fornecerá importantes subsídios para a compreensão dos fatores que restringem o fluxo gênico e promovem a divergência genética entre populações de *E. orchidiflorum*, contribuindo para a biologia evolutiva e a conservação da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BAYOD, Sarah. **Os primeiros passos da formação de novas espécies: depressão por alogamia e sistema de cruzamento de *Epidendrum secundum* (Orchidaceae)**. Unesp.br. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/9d4f6efb-b8b4-42b4-bce6-32d85937ef9c>. Acesso em: 3 maio 2025.

COYNE, Jerry A ; H ALLEN ORR. **Speciation**. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Oxford University Press, 2004.

EDMANDS, Suzanne. Does parental divergence predict reproductive compatibility? **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 11, p. 520–527, 2002.

ERNST MAYR. **Systematics and the origin of species**. New York: Columbia Univ. Press, Cop, 1942.

GOUVEIA, Tiago Manuel Zanfra de Melo e ; PINHEIRO, Fábio. Experimentos de cruzamentos recíprocos como ferramenta para avaliar o isolamento reprodutivo numa zona de hibridação natural da família Orchidaceae Juss. **Revista da Biologia**, v. 14, n. 1, p. 17–23, 2015.

PINHEIRO, Fábio; CARDOSO-GUSTAVSON, Poliana; SUZUKI, Rogério Mamoru; *et al*. Strong postzygotic isolation prevents introgression between two hybridizing Neotropical orchids,

Epidendrum denticulatum and *E. fulgens*. **Evolutionary Ecology**, v. 29, n. 2, p. 229–248, 2015.

PINHEIRO, Fábio; COZZOLINO, Salvatore; DE BARROS, Fábio; *et al*. PHYLOGEOGRAPHIC STRUCTURE AND OUTBREEDING DEPRESSION REVEAL EARLY STAGES OF REPRODUCTIVE ISOLATION IN THE NEOTROPICAL ORCHID *EPIDENDRUM DENTICULATUM*. **Evolution**, v. 67, n. 7, p. 2024–2039, 2013.

Pinheiro, F., Zanfra de Melo e Gouveia, T. M., Cozzolino, S., Cafasso, D., Cardoso-Gustavson, P., Suzuki, R. M., & Palma-Silva, C. 2016. Strong but permeable barriers to gene exchange between sister species of *Epidendrum*. American journal of botany, 103: 1472 – 1482.

RALLS, Katherine; BALLOU, Jonathan D ; FRANKHAM, R. Inbreeding and outbreeding. **Si.edu**, p. 427–435, 2015. Disponível em: <https://repository.si.edu/handle/10088/21036>. Acesso em: 3 maio 2025.

ROBLES PACHON, Adriana Marcela. Filogeografia a partir de DNA de cloroplasto da orquídea neotropical *Epidendrum orchidiflorum* (Orchidaceae: Laeliinae) no Brasil. 2016. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016. doi:10.11606/D.11.2017.tde-05012017-150613. Acesso em: 2025-05-02.

Sobel, J. M. , and G. F. Chen. 2014. Unification of methods for estimating the strength of reproductive isolation. Evolution, 68: 1511 – 1522.

THEODOSIUS DOBZHANSKY. **Genetics and the origin of species**. New York: Columbia University Press, 1937.