

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Pós-graduação em Biologia Vegetal**

**Detecção de zona híbrida entre *Cattleya  
coccinea* e *C. brevipedunculata* (Orchidaceae)  
no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas  
Gerais, utilizando microssatélites e análise  
morfométrica**

**BÁRBARA SIMÕES SANTOS LEAL**

**Belo Horizonte**

**2013**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Pós-graduação em Biologia Vegetal**

**Detecção de zona híbrida entre *Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata* (Orchidaceae) no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, utilizando microssatélites e análise morfométrica**

**BÁRBARA SIMÕES SANTOS LEAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica.

**ORIENTADOR: Dr. Eduardo Leite Borba**

**CO-ORIENTADORA: Dra. Samantha Koehler**

**Belo Horizonte**

**2013**

*“There is grandeur in this view of life.”*

Charles Darwin

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à UFMG por ter sido meu segundo lar durante os últimos sete anos e ao CNPq pelo financiamento das pesquisas e pela bolsa de mestrado concedida.

Ao meu orientador, Eduardo Borba, pelo entusiasmo, participação ativa e cuidadosa revisão dos manuscritos. Agradeço também pela confiança e pelas conversas objetivas e norteadoras a respeito dos resultados. Deixo registrada a minha admiração pela forma como foi conduzida a orientação, que tornaram esta experiência acadêmica tão válida e construtiva.

À minha co-orientadora, Samantha Koehler, pela apresentação da população do Parque Estadual do Ibitipoca e pelas diversas contribuições durante o andamento e na finalização da dissertação. Agradeço imensamente a atenção e prontidão em me ajudar nos momentos em que precisei. Meus agradecimentos também às suas alunas, Jucelene e Mariana, por todas as informações prestadas e pelas trocas de experiência a respeito da utilização dos microssatélites.

Ao Cleber, pela ajuda mais que essencial em diversas etapas da execução desse trabalho, desde a coleta das plantas à análise dos dados. Muito obrigada por ter segurado a barra nos meus momentos de ansiedade e nervosismo e por ter compartilhado os momentos de alegria e a admiração com as plantas. Sua presença me completa e, sem dúvidas, tornou esses últimos dois anos ainda mais especiais.

À coordenação da Pós-Graduação, na pessoa da professora Denise e do professor João Renato, e a todos os professores e funcionários do Departamento de Botânica.

A todos os colegas do Departamento de Botânica, em especial ao Laboratório de Sistemática, pela alegria, amizade e agradável convivência. Aos colegas e amigos com quem convivi durante os anos de iniciação e mestrado no Laboratório de Biosistemática e Sistemática Vegetal: Aline Joseph, Aline Vale, Ana Cláudia, Ana Paula, Antônio, Ariane, Bruna, Bruno Carvalho, Bruno Leles, Caetano, Carol, Cecília, Daniel, Eric, Fred, Giovanna, Josafá, Karina Proite, Karina Schulz, Lele, Ludmila, Lu Kamino, Marcella, Maria, Marina, Luíza, Nara, Rafaela, Samuel, Thais, Thalita e

Tharso. A companhia de vocês tornou a rotina do laboratório consideravelmente mais amena e interessante! Agradeço também ao professor João Batista pela confiança e pelo suporte nas diversas questões práticas do laboratório.

À Rose e demais funcionários do Parque Estadual do Ibitipoca pela disponibilização da infra-estrutura e pelo suporte às atividades de coleta na área estudada. À Maria Rita Cabral e família pela hospedagem, receptividade e suporte no Rio de Janeiro e em Petrópolis.

À Aline Vale, Ana Claudia, Bira, Lu Kamino, Maria, Marina e Vina pela descontraída companhia e ajuda nas coletas de Ouro Branco e Itabira. E à Ana Paula, Bárbara Chaves e Fred por terem compartilhado suas experiências e me ajudado nas análises dos dados.

Por fim, à minha amada família (mãe, pai e irmão), por serem a base de toda a minha trajetória. Diante do carinho e amor de uma vida, nenhuma forma de agradecimento seria suficiente. Agradeço também à Eliana, aos meus parentes, à família do Cleber e aos meus sempre presentes amigos da Biologia, do Sesi e do CVM pelos inúmeros momentos de alegria.

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	6
GENERAL ABSTRACT .....	8
INTRODUÇÃO GERAL .....	9
CAPÍTULO 1 .....	
RELAÇÕES ENTRE MORFOLOGIA INTERMEDIÁRIA E HIBRIDAÇÃO NATURAL EM PLANTAS: DESVENDANDO UMA POSSÍVEL ZONA HÍBRIDA ENTRE <i>Cattleya coccinea</i> E <i>C. brevipedunculata</i> (ORCHIDACEAE).....	17
Resumo .....	18
Introdução .....	19
Material e Métodos.....	22
Resultados .....	30
Discussão .....	56
Referencias Bibliográficas .....	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS .....	72
APÊNDICE 1. ....	80

## RESUMO GERAL

Embora a expressão de caracteres morfológicos em híbridos seja imprevisível, resultando muitas vezes em um mosaico de caracteres parentais, caracteres intermediários e novos caracteres, muitos híbridos naturais de Orchidaceae têm sido descritos somente a partir da observação de fenótipos intermediários a de dois táxons aceitos. Marcadores moleculares têm se mostrado uma boa ferramenta para checar tais previsões feitas a partir da morfologia e para caracterizar a arquitetura de zonas híbridas naturais em plantas, inclusive na família Orchidaceae. Neste trabalho, utilizamos análises morfométricas multivariadas com 24 caracteres florais e vegetativos e análises genéticas moleculares, a partir de sete *loci* microssatélites, para investigar uma possível zona híbrida entre *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. brevipedunculata* (Cogn.) Van den Berg (Epidendreae: Laeliinae), localizada no Parque Estadual do Ibitipoca (PEI), Minas Gerais, Brasil. Ambas espécies são distinguidas principalmente a partir do formato de folha e pseudobulbo e do comprimento do pedúnculo floral, além da distribuição geográfica e período de floração. Análises morfométricas sustentam as diferenças entre a *C. coccinea* e *C. brevipedunculata* e indicam um contínuo de variação no PEI, sendo que os extremos desse contínuo se sobrepõem às populações alopátricas utilizadas como referência. Os dados de variabilidade e estrutura genética, porém, não confirmam a hipótese de hibridação e/ou introgressão no PEI, sendo que evidências acumuladas a partir da análise bayesiana da estrutura genética, análise de agrupamento e distribuição das frequências alélicas brutas apontam que essa seja uma população pura de *C. brevipedunculata*. Diferentemente de outras populações conhecidas dessa espécie, onde os indivíduos ocorrem em ambiente aberto, parte dos indivíduos da população do PEI ocorrem na mata, sob condições de sombreamento. A variação morfológica observada no PEI pode, assim, estar relacionada à plasticidade fenotípica de características vegetativas em resposta às variações na incidência de luz, como foi indicado pelas diferenças significativas em variáveis de folha e pseudobulbo entre indivíduos localizados em campo rupestre e mata. Esses resultados têm importantes implicações, pois evidenciam a baixa confiabilidade da morfologia para detecção de híbridos naturais e o potencial de caracteres vegetativos como fator de confusão na distinção de táxons proximamente relacionados. A variação morfológica associada à plasticidade sugerida

neste trabalho pode ser futuramente investigada, inclusive quanto a ser ou não adaptativa, por meio de experimentos controlados.



## GENERAL ABSTRACT

Although the expression of morphological traits in hybrid is unpredictable, often resulting in a mosaic of parental, intermediate, and new characters, many natural hybrids of Orchidaceae have been reported only through the observation of intermediate phenotypes to its putative parental. Molecular markers have been shown to be a good tool to test such morphological hypotheses and to characterize the architecture of natural hybrid zones in plants, including in Orchidaceae. In this study, we used multivariate morphometric analyses of 24 floral and vegetative characters and molecular genetic analysis, based in seven microsatellite loci, to investigate a supposed hybrid zone between *Cattleya coccinea* Lindl. and *C. brevipedunculata* (Cogn.) Van den Berg (Epidendreae: Laeliinae), located at Parque Estadual do Ibitipoca (PEI), Minas Gerais state, Brazil. Both species are mainly distinguished by leaf and pseudobulb size and form and peduncle length, and also by geographical distribution. Morphometric analyses support differences between *C. coccinea* and *C. brevipedunculata* and indicate a continuum of variation at PEI, with the extremes of this continuum overlapping the morphology of allopatric populations used as reference. The variability and genetic structure data, however, do not confirm the hypothesis of hybridization nor introgression at PEI, and accumulated evidences from bayesian analysis of genetic structure, cluster analysis and distribution of allelic frequencies indicate that it is a pure population of *C. brevipedunculata*. Unlike other known populations of this species, where individuals occur in open sunny sites, the individuals of PEI's population also occur in the woods, under shaded conditions. The morphological variation observed may thus be related to phenotypic plasticity of vegetative traits in response to changes of light incidence, as indicated by significant differences in leaf and pseudobulb characters between individuals located at rock outcrops and woods. These results demonstrate the unreliability of morphology for detecting natural hybrids and the potential of vegetative characters as a confounding factor in distinguishing closely related taxa.

## INTRODUÇÃO GERAL

### A FAMÍLIA ORCHIDACEAE E O GÊNERO *CATTLEYA*

A família Orchidaceae possui cerca de 24.500 espécies distribuídas por todo o planeta, exceto Antártida, e apresenta alta diversidade na região Neotropical, onde são particularmente numerosas como epífitas (Dressler, 2005). Esse representativo grupo de plantas tem fascinado biólogos há tempos devido a notável variedade de estratégias de vida, características florais e vegetativas e síndromes de polinização (Fay & Chase, 2009). Ainda que a enorme diversidade de orquídeas possa oferecer muitas oportunidades de explorar questões evolutivas, a família está, surpreendentemente, sub-representada em estudos de especiação, evolução e isolamento reprodutivo, assim como no desenvolvimento de marcadores moleculares, quando comparadas a famílias com riqueza comparável (Peakall, 2007). Por muitos anos, essa escassez de estudos esteve relacionada às incertezas de parentesco filogenético, que inibia projetos de pesquisa em diversas áreas da biologia de orquídeas devido à dificuldade em formular hipóteses evolutivas (Fay & Chase, 2009). A partir dos anos 90, porém, houve um crescente número de estudos filogenéticos, o que tem possibilitado o desenvolvimento de outras áreas de estudo relacionadas (Fay & Chase, 2009).

As orquídeas subdividem-se em cinco subfamílias (Apostasioideae, Cypridioideae, Vanilloideae, Orchidoideae e Epidendroideae), sendo Epidendroideae a mais diversa, com cerca de 650 gêneros e 18.000 espécies (Pridgeon *et al.*, 2005). Laeliinae (Epidendreae; Epidendroideae) é a terceira maior subtribo de Orchidaceae, possuindo aproximadamente 40 gêneros e 2080 espécies distribuídas exclusivamente no Neotrópico (Pridgeon *et al.*, 2005). Essa subtribo inclui alguns dos mais importantes gêneros de plantas ornamentais, como *Laelia* e *Cattleya*, e gêneros representativos na flora de orquídeas neotropicais, como *Epidendrum*, *Encyclia* e *Prostachea* (van den Berg *et al.*, 2000). Devido à grande variação das características morfológicas e do grande número de espécies e grupos genéricos e infragenéricos, essa subtribo constitui um grupo de interesse em relação aos padrões de diversificação (van den Berg *et al.*, 2009).

O gênero *Sophranitis* (Laeliinae) incluía apenas nove espécies brasileiras de orquídeas de pequeno porte com flores laranja-avermelhadas a vermelhas,

caracterizadas por possuírem pseudobulbos agrupados, labelo séssil na base da coluna, pequenas asas nas laterais da cavidade estigmática, coluna curta e espessa e oito políneas (Withner, 1990). A partir dos resultados de estudos filogenéticos com dados moleculares, o gênero foi recircunscrito e passou a englobar também todas as espécies brasileiras anteriormente incluídas em *Laelia* Lindl. (van den Berg & Chase, 2000). Mais tarde, baseando-se em caracteres morfológicos, Chiron & Castro (2002) propuseram uma nova circunscrição de *Sophronitis*, dividindo-o em cinco gêneros: *Hadrolaelia*, *Hoffmannseggella*, *Microlaelia* e *Dungsia*, além de *Sophronitis*. Recentemente, porém, todas as espécies de *Sophronitis* (sensu van den Berg & Chase, 2000) foram transferidas para o gênero *Cattleya*, de forma a manter a monofilia deste e de evitar a criação de vários gêneros menores que incluíssem as espécies de *Cattleya* (van den Berg *et al.*, 2009). Atualmente, o gênero *Cattleya* Lindl. compreende cerca de 100 espécies, distribuídas na América Central (Costa Rica e Panamá) e América do Sul (Govaerts *et al.*, 2011), usualmente como epífitas. Grande parte dessas espécies ocorre no Planalto Brasileiro, região geográfica que cobre a maior parte das porções leste, sul e central do Brasil (Pridgeon *et al.*, 2005).

Em análises filogenéticas recentes, van den Berg *et al.* (2000), van den Berg *et al.* (2009) e Rodrigues (2010) observaram que o antigo gênero *Sophronitis* (*stricto sensu*) era parafilético ou polifilético, uma vez que *C. cernua*, espécie formalmente colocada nesse gênero, forma uma linhagem distinta, estando agrupada com espécies antes circunscritas como *Laelia*. Outra espécie desse grupo, *C. pterocarpa*, foi recentemente sinonimizada (van den Berg, 2008). As sete espécies restantes reconhecidas como *Sophronitis* (*stricto sensu*) compreendem um grupo monofilético (van den Berg *et al.*, 2009) denominado por Rodrigues (2010) como “clado *Cattleya coccinea*”, que é definido pela presença de flores grandes e solitárias com pétalas muito maiores que as sépalas (Fowlie, 1987). Algumas dessas espécies foram inicialmente descritas em categorias infraespecíficas, depois, elevadas ao nível de espécie por Fowlie (e.g., 1972). Três das espécies desse clado, *C. acuensis*, *C. bicolor* e *C. pygmaea*, são raras, sendo as duas primeiras duvidosas e conhecidas somente pelo material tipo (Rodrigues, 2010). A morfologia das espécies do “clado *Cattleya coccinea*” é bastante homogênea e pode-se considerar que elas formam um complexo cuja delimitação ainda é imprecisa. Pelo fato das flores serem tão similares entre essas espécies, características relacionadas ao habitat, floração e morfologia vegetativa são requeridas para diferenciá-las (Withner, 1990).

## HIBRIDAÇÃO NATURAL EM PLANTAS

A ocorrência de hibridação natural é um evento comum em Orchidaceae (Dressler, 1993) e alguns híbridos naturais já foram descritos para espécies da subtribo Laeliinae, inclusive do gênero *Cattleya* (e.g. Pabst & Dungs 1975; 1977; Silva, 2008). Barreiras genéticas não são bem desenvolvidas nessa família, e especialmente nesse gênero (Silva-Pereira *et al.*, 2007), onde híbridos artificiais são frequentemente obtidos. As topologias contrastantes entre ITS e marcadores plastidiais, obtidas em análises filogenéticas recentes, sugerem que hibridação seja um processo importante na evolução da “aliança *Cattleya*”, que inclui os gêneros *Cattleya*, *Brassavola*, *Guarianthe* e *Rhyncholaelia*, e enfatizam a necessidade de estudos detalhados desse processo (van den Berg *et al.*, 2009). Além disso, a hibridação natural já foi detectada através do uso de marcadores moleculares em *Cattleya* (Silva, 2008), e é tida como uma das possíveis fontes de diversidade morfológica do complexo *C. coccinea*, tendo sido evidenciada a origem híbrida de uma população localizada no Alto Caparaó (MG) em um estudo recente empregando marcadores ISSR (Rodrigues, dados não publicados).

De um ponto de vista conservador, que atribui um pequeno papel evolutivo à hibridação, esse processo pode influenciar a especiação somente pelo reforço de barreiras reprodutivas desenvolvidas a partir da seleção contra híbridos inaptos (Dobzhansky, 1940; Mayr, 1992; Schemske, 2000). Outras posições, porém, reconhecem a hibridação natural como uma potente força evolutiva, relacionada aos fenômenos de especiação e adaptação, em particular no reino vegetal (Anderson, 1949; Stebbins, 1959). A especiação por hibridação através da aloploidia é tida, por exemplo, como o mecanismo mais comum de especiação rápida em plantas (Soltis & Soltis, 1999). Nesse caso, aloploidios são, em geral, reprodutivamente isolados dos parentais pelas diferenças nos níveis de ploidia, que geram uma elevada proporção de prole triploide inviável ou estéril (mas ver e.g. Aagaard *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2010). Apesar de ser mais difícil de ser identificada e investigada, a hibridação sem alteração de ploidia (homoploidia) também pode levar à especiação (Arnold, 1997; Hegarty & Hiscock, 2005). Entretanto, para que a especiação por homoploidia ocorra, os híbridos devem estar isolados dos parentais pela seleção de um novo ambiente, pois o sucesso da hibridação em si depende dos híbridos gerados serem parcialmente férteis ou

viáveis e, como consequência disso, retrocruzamentos com parentais são frequentemente possíveis (Rieseberg & Carney, 1998).

A introgressão, ou fluxo gênico interespecífico, pode resultar no aumento da diversidade genética, na origem e transferência de características adaptativas, na origem de ecótipos ou espécies e na ruptura ou reforço das barreiras de isolamento reprodutivo entre as espécies (Abbott, 1992; Rieseberg & Wendel, 1993). Embora muitos genótipos híbridos tenham menor *fitness*, é possível que em alguns deles ocorra o inverso, e consequentemente, contribuam para a adaptação através da introgressão de alelos ou do estabelecimento de um genótipo recombinante (Barton, 2001). Vários exemplos de introgressão de características adaptativas tem sido hipotetizados em plantas (e.g. Martinsen *et al.*, 2001; Bradshaw Jr & Schemske, 2003), mas em muitos desses o valor adaptativo dessas características não são claros, sendo difícil a distinção entre os efeitos da introgressão e aqueles provenientes da retenção de estados de caractere ancestrais e/ou da convergência (Martin *et al.*, 2006). Trabalhos recentes, porém, fornecem evidências de que o aumento da diversidade genética e as novas combinações gênicas resultantes da hibridação promovem o desenvolvimento e aquisição de adaptações (Arnold *et al.*, 2003, Rieseberg *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2006). Para que a hibridação contribua na adaptação, genótipos híbridos aptos devem escapar da “massa de recombinantes não-aptos” de uma população híbrida por mecanismos como reprodução assexuada, especiação por homoploidia e introgressão de alelos vantajosos (Barton, 2001; Rieseberg *et al.*, 2003).

A importância da hibridação como fenômeno evolutivo contrasta com a visão geral do impacto que esse processo possa ter sobre a conservação (Wolf *et al.* 2001; Cozzolino *et al.*, 2006). Processos de hibridação e introgressão têm sido associados à promoção da invasão de plantas (Ellstrand & Schierenbeck, 2000; Schierenbeck & Ellstrand, 2009) e a extinção de táxons raros devido à assimilação genética por uma espécie comum (Levin *et al.*, 1996; Rhymer & Simberloff, 1996; Arnold, 1997; Allendorf *et al.*, 2001). A hibridação entre espécies introduzidas e nativas também são consideradas um problema para a conservação (Abbott, 1992; Rhymer & Simberloff, 1996; Allendorf *et al.*, 2001) e se tornou um importante tópico em debate após o desenvolvimento dos transgênicos (Hails & Morley, 2005).

A hibridação também é de interesse devido ao seu impacto em reconstruções filogenéticas, tanto no reconhecimento dos taxa de origem híbrida, quanto em termos da disrupção topológica entre taxas não-híbridos (Funk, 1985; Rieseberg & Wendel, 1993).

A especiação de origem híbrida é tida como uma das causas de incongruências topológicas entre árvores de genes (Rieseberg, 1991), e essas incongruências podem ter utilidade para a detecção de híbridos. Para isso, porém, é necessário que seja feita a devida distinção entre o impacto da hibridação na topologia e o impacto advindo de outros processos biológicos – tais como ordenação aleatória de polimorfismo ancestral (*lineage sorting*), paralogia e transferência lateral de genes (Sang & Zhong, 2000).

Embora a introgressão possa resultar na transferência de adaptações, barreiras ao fluxo gênico podem prevenir que esse processo ocorra, mantendo as zonas híbridas estáveis (Barton, 2001; Martin *et al.*, 2006). Pares de espécies desenvolvem frequentemente inúmeros mecanismos de isolamento que reduzem, em muitos casos, a chance de formação de híbridos (Martin *et al.*, 2006). Em orquídeas, barreiras pré-polinização, relacionadas à especialização floral em resposta às características do polinizador, têm sido historicamente associadas à manutenção da integridade das espécies (Van der Pijl & Dodson, 1966; Steiner *et al.*, 1994; Ellis & Johnson, 1999; Borba *et al.*, 1999, 2001; Tremblay *et al.*, 2005). Estudos recentes, porém, têm chamado atenção para a prevalência de barreiras pós-polinização em orquídeas com menor nível de especialização do polinizador, como naquelas que exibem mecanismos de polinização por engodo (e.g. Moccia *et al.*, 2007; Scopece *et al.*, 2008; Cortis *et al.*, 2009). A adaptação de espécies parentais a habitats especializados pode ser, em alguns casos, a única barreira reprodutiva entre pares de espécies de orquídeas (Smidt *et al.*, 2006). Em muitos casos, porém, a não ocorrência ou escassez de híbridos e/ou de retrocruzamentos está associada a uma combinação de mecanismos pré- e pós-polinização (e.g. Borba & Semir, 1998; Borba *et al.*, 1999; Silva-Pereira *et al.*, 2007).

Muito do entendimento atual a respeito da biologia das diferentes classes de híbridos provem de estudos de híbridos experimentais e da manipulação experimental de zonas híbridas já descritas. Mas, a utilização de zonas híbridas naturais como modelo de estudo de processos evolutivos tem somado muito ao conhecido acerca do potencial evolutivo de híbridos (Rieseberg & Carney, 1998). Esses sistemas naturais funcionam como laboratórios onde processos fundamentais como isolamento reprodutivo e manutenção ou ruptura de barreiras entre espécies podem ser investigados, fornecendo ideias a respeito de processos evolutivos que influenciam as interações genéticas e ecológicas entre populações divergentes (Barton & Hewitt, 1989; Minder *et al.*, 2007; Moccia *et al.*, 2007). Com a utilização de marcadores moleculares, a ocorrência de hibridação e/ou introgressão vêm sendo evidenciada e caracterizada em vários trabalhos

recentes com orquídeas do Velho Mundo (e.g. Soliva & Widmer, 2003; Moccia *et al.*, 2007; Pellegrino *et al.*, 2009). Nos neotrópicos, porém, ainda são escassos os estudos que utilizam essa abordagem para a investigação de zonas híbridas naturais (ver Pinheiro *et al.*, 2010).

Marcadores moleculares co-dominantes fornecem ferramentas valiosas para o estudo da hibridação porque permitem a caracterização de indivíduos como puros e híbridos, o que é essencial para a documentação de fluxo gênico entre espécies (Anderson & Thompson, 2002). A preponderância de híbridos F1, por exemplo, pode indicar hibridação restrita e baixo potencial de fluxo gênico entre os parentais, enquanto a elevada frequência de retrocruzamentos e a detecção de introgressão pode indicar alto potencial de fluxo gênico. As vantagens da utilização de marcadores moleculares em estudos de hibridação são reconhecidas há algumas décadas e estão relacionadas ao fato de esses serem presumivelmente neutros e independentes, estarem disponíveis em grande quantidade e apresentarem apenas pequenos níveis de variação não-herdada (Rieseberg & Wendel, 1993). Em contraste com os caracteres morfológicos, a expressão de caracteres moleculares é elaborada e previsível e, quando usados corretamente, os marcadores moleculares podem fornecer informações detalhadas sobre os híbridos, verificando as previsões feitas a partir da morfologia (Rieseberg & Ellstrand, 1993). Atualmente, a disponibilidade de marcadores hipervariáveis, como os microssatélites, e de procedimentos estatísticos mais poderosos, como a análise bayesiana (Pritchard *et al.*, 2000; Anderson & Thompson, 2002), tem facilitado a detecção de híbridos e introgressantes (Vähä & Primmer, 2006; Burgarella *et al.*, 2009; Marie *et al.*, 2011). Microssatélites são marcadores co-dominantes altamente polimórficos e abundantes no genoma, estando uniformemente distribuídos na eucromatina (Schlötterer, 2004). Esses marcadores têm se tornado mais populares em estudos com abordagem populacional devido à possibilidade de combinação eficiente de muitos *loci* no processo de genotipagem, fornecendo uma rápida e barata amostragem do genoma (Selkoe & Toonen, 2006).

A utilização de marcadores genéticos moleculares tem contornado algumas limitações relacionadas à baixa acurácia na distinção de indivíduos puros e híbridos a partir de características morfológicas e fisiológicas (Cattell & Karl, 2004). Em uma revisão de 46 estudos de morfologia de híbridos, na maioria artificiais, Rieseberg & Wendel (1993) concluíram que indivíduos de origem híbrida não são mais propensos a ter caracteres intermediários e que boa parte dos caracteres encontrados nesses são, na

verdade, novos ou extremos em relação ao dos parentais. Essa pouca relação entre hibridação e morfologia intermediária se acentua quando a introgressão é extensiva e/ou quando a hibridação é histórica. Reed & Frankham (2001) também mostraram que há pouca correlação entre os resultados de análises moleculares, que utilizam marcadores seletivamente neutros, e medidas quantitativas, que são influenciadas pelo ambiente (ou submetidos à seleção) e estão supostamente sob controle poligênico. Apesar disso, caracteres morfológicos intermediários, assim como incongruências nas topologias de árvores filogenéticas, são úteis para levantar hipóteses a respeito da hibridação entre táxons e, quando associados aos dados moleculares, podem fornecer um quadro mais informativo da natureza e história evolutiva das populações envolvidas nesse processo (Blackstock & Ashton, 2010).

Ferramentas estatísticas multivariadas têm sido usadas para examinar conjuntos de dados morfológicos (em geral, caracteres de distâncias e ângulos) e, assim, investigar variações a nível populacional em um contexto evolutivo (Stuessy, 2009). Em plantas, técnicas morfométricas tradicionais (e.g. análise de agrupamento, análise de componentes principais, análises de discriminantes) são as mais empregadas em estudos que lidam com variações entre populações ou entre táxons relacionados, incluindo os realizados com espécies de Orchidaceae. Essas análises permitem interpretar um conjunto extenso de informações, sendo úteis para investigar padrões morfológicos intraespecíficos (e.g., Pinheiro & Barros, 2007; Warghat *et al.*, 2012), delimitar espécies pertencentes a um complexo (e.g., Romero & Real, 2005; Ribeiro *et al.*, 2008; Pinheiro & Barros, 2009; Kaplan & Marhold, 2012) e identificar indícios de hibridação (e.g., Ellis & Johnson, 1999; Knyasev *et al.*, 2000; Lambert *et al.*, 2006). Nesse último caso, os dados morfológicos podem ajudar a esclarecer as causas da variação, distinguindo o quanto da variação morfológica é próprio da espécie e o quanto pode ser devido à hibridação e/ou introgressão (Ellis & Johnson, 1999; Lambert *et al.*, 2006). Dados morfológicos têm sido combinados aos dados fornecidos por marcadores moleculares em diversas investigações de hibridação em orquídeas (e.g. Peakall *et al.*, 1997; Nielsen, 2000; Bateman *et al.*, 2008; Ståhlberg, 2009; De Hert *et al.*, 2012).

O presente estudo utiliza uma abordagem combinada de análises morfométricas e genética molecular para identificar e caracterizar a provável ocorrência de hibridação e introgressão entre duas espécies de orquídeas proximamente relacionadas e ocorrentes em fisionomias vegetacionais distintas, *Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata* (Laellinae), em uma área localizada no Parque Estadual do Ibitipoca (PEI), Minas



Gerais. Apesar de ser reconhecida por alguns autores como uma população de *C. coccinea* (Neto *et al.*, 2007), observações acerca da morfologia e ecologia dos indivíduos e da localização intermediária do PEI em relação à distribuição de *C. coccinea* e *C. brevipedunculata* sugerem que ambas as espécies ocorrem nesse local e que há hibridação e/ou introgressão entre as mesmas. Tal hipótese é também sugerida por Rodrigues (2010) a partir dos resultados de análises filogenéticas que posicionaram essa população como grupo irmão do clado formado por *C. brevipedunculata* e *C. wittigiana*. Neste trabalho, dados morfométricos e genéticos são discutidos a luz de observações ecológicas, relacionadas às diferenças de habitat entre as espécies, na tentativa de obter uma melhor compreensão dos mecanismos que geram a ampla variação morfológica observada nos indivíduos do Parque Estadual do Ibitipoca.

## **CAPÍTULO 1**

**Relações entre morfologia intermediária e hibridação natural em plantas: desvendando uma possível zona híbrida entre *Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata* (Orchidaceae)**

## RESUMO

*Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata* (Orchidaceae) são espécies proximamente relacionadas distinguidas, principalmente, pela distribuição geográfica, morfologia vegetativa e períodos de floração. Ambas as espécies habitam regiões de elevada altitude no sudeste e sul do Brasil, e estão associadas a habitats distintos, localizados em florestas de altitude e campos rupestres, respectivamente. Neste trabalho, utilizamos análises morfométricas multivariadas e análises genéticas moleculares, empregando marcadores microssatélites, para testar a ocorrência de uma zona híbrida entre as duas espécies, localizada no Parque Estadual do Ibitipoca, Brasil. Apesar da morfometria indicar um contínuo de variação morfológica, intermediário a dos dois táxons e influenciado principalmente por caracteres de folha, pseudobulbo e pedúnculo floral, os dados de variabilidade e estrutura genética não suportam a ocorrência de hibridação e/ou introgressão, evidenciando que se trata de uma população pura de *C. brevipedunculata* e não de uma zona híbrida. As diferenças quanto aos caracteres vegetativos entre indivíduos localizados em campo rupestre e mata indicam que a variação morfológica observada pode estar relacionada à plasticidade fenotípica em resposta às variações de luz do ambiente, uma situação desconhecida para a espécie. Nossos resultados enfatizam, assim, a possibilidade de inconsistência da morfologia para determinação de híbridos e chamam atenção para o papel dos caracteres vegetativos como um possível complicador na taxonomia dessas espécies, por serem passíveis de influência ambiental.

**Palavras-chave:** Morfometria, Microssatélites, Orchidaceae, Plasticidade fenotípica, Variação morfológica, Zonas híbridas naturais.

## INTRODUÇÃO

Hibridação natural é um processo largamente difundido em plantas e de crescente interesse devido a sua importância na evolução (Stebbins, 1959; Arnold, 1992; Rieseberg, 1995). Eventos de hibridação natural são frequentes em Orchidaceae, sendo grande parte desses interespecíficos, mas não raramente intergenéricos (Adams & Anderson, 1958); van der Pijl & Dodson, 1966; Dressler, 1981). Embora a expressão de caracteres morfológicos em híbridos seja imprevisível, resultando muitas vezes em um mosaico de caracteres parentais, caracteres intermediários e novos caracteres (Rieseberg & Ellstrand, 1993), muitos híbridos naturais dessa família vêm sendo descritos somente a partir da observação de fenótipos intermediários a de dois táxons aceitos (e.g., Pabst & Dungs, 1975; 1977). Apenas algumas vezes a origem híbrida de tal variação morfológica tem sido testada e os padrões investigados através de técnicas de citogenética, morfometria, cromatografia (e.g., Kallunki, 1976; Nilsson, 1983; Ellis & Johnson, 1999) e, mais recentemente, através de marcadores genéticos moleculares, tais como alozimas, AFLP e microssatélites (e.g., Hedrén, 1996; Peakall *et al.*, 1997; Nielsen, 2000; Soliva & Widmer, 2003; Aagaard *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2006; Moccia *et al.*, 2007; Bateman *et al.*, 2008; De Hert *et al.*, 2011).

Marcadores moleculares tem se mostrado uma boa ferramenta para caracterizar a arquitetura de zonas híbridas naturais. O desenvolvimento e a disponibilidade crescente desses têm facilitado os estudos sobre hibridação natural e introgressão devido ao poder em detectar até mesmo pequenos níveis de introgressão (Rieseberg & Ellstrand, 1993; Martinsen *et al.*, 2001, Moccia *et al.*, 2007). A caracterização da composição de zonas híbridas em diferentes classes (F1, F2, híbridos de gerações posteriores e retrocruzamentos) fornece informações acerca do fluxo gênico potencial, podendo ajudar a esclarecer os processos que mantêm ou dissolvem as barreiras reprodutivas entre as espécies (Lexer *et al.*, 2005, Minder *et al.*, 2007; Moccia *et al.*, 2007). Embora dados morfológicos, quando analisados sozinhos, não pareçam ser suficientes para reconhecer híbridos acuradamente, em adição aos dados genéticos, eles podem oferecer informações a respeito de fenômenos evolutivos e ecológicos relacionados à hibridação (Minder *et al.*, 2007), especialmente quando espécies ecologicamente divergentes estão envolvidas nesse processo.

Zonas híbridas naturais bem documentadas envolvendo orquídeas existem e outras são sugeridas (e.g., Cozzolino *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2010), mas nem toda a variação morfológica pode ser atribuída à hibridação entre táxons, podendo, alternativamente, estar relacionada à deriva genética ou à seleção disruptiva (Ackerman *et al.*, 2011). Outra possível fonte de variação morfológica a nível populacional é a plasticidade fenotípica, definida como a habilidade de um indivíduo alterar sua fisiologia/morfologia em resposta às condições ambientais. Esta habilidade é particularmente importante em plantas, devido a forma de vida sésil (Bradshaw, 1965; Schlichting, 1986; Sultan, 2000), representando uma importante estratégia para lidar com a heterogeneidade ambiental (van Kleunen & Fischer, 2005). Ainda que nem toda plasticidade seja adaptativa, algumas mudanças na morfologia e fisiologia podem aumentar o sucesso individual (Bradshaw, 1965; Schlichting, 1986). A heterogeneidade espacial pode resultar na seleção da plasticidade dependendo da escala da heterogeneidade em relação ao tamanho da unidade de resposta, do tamanho do indivíduo genético e do alcance da dispersão da prole (Alpert & Simms, 2002). Embora a hibridação seja uma das principais fontes de variação morfológica em Orchidaceae (Nazzaro *et al.*, 1999), variações fenotípicas não usuais em uma espécie podem estar relacionadas a outros processos. A análise direta da morfologia, acoplada a observação das condições ambientais na mesma escala em que ocorrem essas variações, pode ajudar a reconhecer tais processos.

Neste trabalho, investigamos uma possível zona híbrida entre *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. brevipedunculata* (Cogn.) Van den Berg (Epidendreae: Laeliinae), espécies associadas usualmente a habitats divergentes. Uma ampla variação morfológica foi observada em uma população reconhecida por Neto *et al.* (2007) como de *C. coccinea*, localizada no Parque Estadual do Ibitipoca, estado de Minas Gerais, Brasil. Nesse local, a maior parte dos indivíduos que ocorrem no interior de matas possui fenótipo similar ao de *C. coccinea*, enquanto indivíduos que estão em afloramentos rochosos são similares morfológicamente a outra espécie relacionada, *C. brevipedunculata*. Geograficamente, a população do Parque Estadual do Ibitipoca ocorre em posição intermediária à Serra do Espinhaço, área de ocorrência de *C. brevipedunculata*, e a Serra da Mantiqueira e Serra do Mar, áreas de ocorrência de *C. coccinea*, podendo ser um sítio de extremo de distribuição e contato das duas espécies. Tais observações sugerem que *C. coccinea* e *C. brevipedunculata* poderiam ocorrer no local e a ampla variação intermediária a dos dois táxons seria, então, um indicativo de hibridação e

introgressão entre os mesmos. Essa hipótese foi também levantada por Rodrigues (2010) a partir de análises filogenéticas recentes que posicionaram essa população como grupo irmão do clado formado por *C. brevipedunculata* e *C. wittigiana*. A ocorrência de diversos híbridos naturais (Pabst & Dungs, 1975) e artificiais obtidos a partir de cruzamentos entre espécies de *Cattleya* sugere que a compatibilidade genética interespecífica é extremamente comum no gênero.

Nos Neotrópicos, trabalhos que investigam possíveis zonas híbridas envolvendo orquídeas ainda são escassos (e.g. Pinheiro *et al.*, 2010), embora esse processo possa ter um papel significativo na evolução de grupos exclusivamente neotropicais, como na “aliança *Cattleya*” (Laeliinae), da qual *C. coccinea* e *C. brevipedunculata* fazem parte (van den Berg *et al.*, 2009). Neste trabalho, objetivamos (a) verificar se *Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata* ocorrem em simpatria na área localizada dentro do Parque Estadual do Ibitipoca, (b) investigar a ocorrência de hibridação natural e/ou introgressão entre as espécies, descrevendo a intensidade e direção em que se dá o fluxo gênico e (c) correlacionar os dados morfológicos e genéticos com a ecologia dos possíveis parentais e híbridos. Para isso, utilizamos análises morfométricas multivariadas e análises moleculares, empregando marcadores microssatélites.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ESPÉCIES ESTUDADAS

*Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata* são orquídeas epífitas encontradas em regiões de elevada altitude (acima de 800m) no sudeste e sul do Brasil. Enquanto *C. coccinea* cresce em florestas de altitude da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira, *C. brevipedunculata* ocorre nos campos rupestres da Serra do Espinhaço, sendo uma epífito especializada em *Vellozia* (Fowlie, 1987; van den Berg, 2005). As populações de *C. coccinea* da Serra da Mantiqueira têm sido tratadas como uma espécie distinta, *C. mantiqueirae* (Fowlie, 1972, 1987), porém esta segregação não é corroborada por estudos filogenéticos, sendo sugerida a sua sinonimização (Rodrigues, 2010). Desta forma, neste trabalho estamos adotando a inclusão de todas estas populações em *C. coccinea*.

Além da distribuição geográfica disjunta e do habitat diverso, características morfológicas e período de floração têm sido usados na distinção de *C. coccinea* e *C. brevipedunculata*. Enquanto *C. coccinea* apresenta pseudobulbos mais cilíndricos sem arranjo definido e folhas mais estreitas, eretas ou curvadas, com ou sem nervura central vermelha e pigmentação vermelha marginal (figura 1A), *C. brevipedunculata* apresenta pseudobulbos globosos, dispostos em fila dupla, folhas ovaladas, paralelas ao substrato e pedúnculo curto (figura 1B) (Fowlie, 1987). Características florais tem se mostrado pouco consistentes para a distinção destas espécies (Withner, 1990), sendo observada grande variação dentro das populações. *Cattleya coccinea* tem picos de floração em janeiro-fevereiro, abril-maio e agosto-outubro (variável entre populações da Serra da Mantiqueira e Serra do Mar) e *C. brevipedunculata* tem um pico de floração em abril-maio (Fowlie, 1987).

No Parque Estadual do Ibitipoca (PEI), foram observados indivíduos habitando os dois ambientes típicos das espécies: mata e campo rupestre, sendo os fenótipos compatíveis com o descrito para as duas espécies (*C. coccinea* e *C. brevipedunculata*, respectivamente). São encontrados, porém, vários indivíduos intermediários em relação à combinação de caracteres relacionados ao formato de folha e pseudobulbo e ao arranjo do pseudobulbo. A existência de um contínuo entre indivíduos de mata e campo rupestre sugere a existência de uma zona híbrida, com ocorrência de hibridação e

introgressão por retrocruzamento dos híbridos com ambos os parentais. Por esse motivo, todos indivíduos amostrados nessa área foram previamente classificados em três subgrupos, com base nas características de folha e pseudobulbo, em: morfo *C. coccinea* e supostos introgressantes (Cib), morfo *C. brevipedunculata* e supostos introgressantes (Bib), e possíveis híbridos (Hib) (figura 1C-G).

### ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

O Parque Estadual do Ibitipoca (PEI) está localizado nos municípios de Santa Rita de Ibitipoca e Lima Duarte, Minas Gerais, ocupando uma área total de 1923,5 ha da Serra do Ibitipoca. O Parque faz parte do Complexo da Mantiqueira, uma cadeia montanhosa inserida no domínio da Mata Atlântica próxima ao limite com o Cerrado, e apresenta um mosaico de formações vegetais composto por matas ombrófilas, matas ciliares, capões de mata, campos de altitude e, predominantemente, campos rupestres (Rodela, 1998; Dias *et al.*, 2002). A área do PEI amostrada neste estudo (ca. 40m x 200m) é caracterizada por apresentar um gradiente de luminosidade e umidade, que varia da porção de campo rupestre a sudeste, onde há maior disponibilidade de luz e menor umidade, em direção a porção de mata a noroeste, onde o contrário prevalece (figura 2).

Todos os indivíduos floridos da possível zona híbrida entre *Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata*, localizada no PEI, foram amostrados por varredura de abril a maio de 2011, abrangendo a variação morfológica encontrada na área (46 indivíduos do morfo *C. coccinea* e supostos introgressantes, 87 supostos híbridos e 47 indivíduos do morfo *C. brevipedunculata* e supostos introgressantes) (tabela 1, figura 2). Os indivíduos foram marcados, fotografados e mapeados com auxílio do GPS MobileMapper 6 (Ashtech) (figura 2) e anotações acerca do microambiente foram feitas em campo, de modo a facilitar as associações entre os dados morfológicos, genéticos e ambientais. A fenologia dos indivíduos foi acompanhada de janeiro a setembro do mesmo ano, cobrindo o período de floração de ambas as espécies em suas áreas de ocorrência.

Duas populações de cada uma das espécies ocorrendo em alopatria foram amostradas para servir como referência nas análises morfométricas e genéticas (tabela 1, figura 2). Sempre que possível, foram amostrados em campo ao menos 30 indivíduos, localizados em forófitos distintos, de modo a evitar a coleta de clones. Os indivíduos da



população de Petrópolis-RJ (Cpe) foram amostrados a partir de plantas cultivadas que haviam sido coletadas na mesma localidade e em uma única população.

### ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

Foram medidos 24 caracteres contínuos florais e vegetativos dos indivíduos amostrados (tabela 2, figura 3). Para isso, uma flor e um pseudobulbo com folha de cada indivíduo foram coletados e conservados em etanol 50%. Foi padronizada a utilização do pseudobulbo anterior ao pseudobulbo terminal, que já apresenta desenvolvimento completo, tendo sido usualmente formado no ano anterior. Todos os caracteres vegetativos e parte dos caracteres florais (comprimentos do pedúnculo, da coluna e do cunículo) foram medidos com auxílio de paquímetro e estereomicroscópio. Para a medição dos demais caracteres florais, as partes florais distendidas foram digitalizadas com escala fixa e medidas com o auxílio do programa AxioVision 4.7.2.0 (Zeiss).

Uma análise de componentes principais (PCA) empregando a matriz de correlação foi conduzida para examinar a estrutura geral dos dados obtidos e detectar indivíduos *outliers* e correlação entre as variáveis. O número de eixos interpretados foi determinado pelo critério de Kaiser (autovalor > 1). Em seguida, foi feita uma análise de variáveis canônicas (CVA) utilizando como variável de grupo os grupos definidos *a priori* pelas populações alopátricas de *C. coccinea* (Ccj e Cpe) e *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e pelos três subgrupos do PEI classificados com base na morfologia vegetativa (Cib, Hib e Bib). Na CVA, foram usadas 17 variáveis florais e vegetativas, sendo excluídas aquelas que apresentaram correlação entre variáveis superior a 0,8. Tal análise foi utilizada com a finalidade de explorar a partição dos subgrupos do PEI (Cib, Hib e Bib) em relação às populações utilizadas como referência de ambas espécies, observando se os subgrupos Cib e Bib se enquadram nos padrões de cada espécie e se os supostos híbridos (Hib) ocupam posição intermediária ou mais próxima a alguma das espécies. Além disso, a análise também foi usada para identificar, a partir dos coeficientes padronizados para as variáveis canônicas, os caracteres que mais contribuem para a discriminação das espécies. Para evitar um viés interpretativo, causado pela utilização dos mesmos caracteres morfológicos que foram usados previamente para classificar os subgrupos do PEI, a CVA também foi feita excluindo-se os caracteres vegetativos # 1, 2, 5 e 6, para verificar demais caracteres sustentam as

diferenças observadas. As análises de PCA e CVA foram realizadas no pacote Statistica 6.0 (StatSoft, 2003).

Foram feitas análises de agrupamento utilizando *neighbor-joining* (NJ) como algoritmo de agrupamento e matrizes de distância generalizada de *Mahalanobis* (D2) entre os centroides dos grupos como coeficiente de distância, que foram obtidas a partir das Análises de Discriminantes das CVAs feitas com a matriz completa e com a matriz de caracteres florais. A análise de agrupamento foi realizada no programa Mega 5.1 (Tamura *et al.*, 2011). Uma Análise de Variância (ANOVA um critério) foi conduzida para comparar as médias das variáveis que foram apontadas como discriminantes a partir da CVA (ver Resultados) entre as populações alopátricas de ambas as espécies. O contraste entre as médias par a par foi testado através do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) no pacote estatístico R 2.15.2 (Ihaka & Gentleman, 1996).

## ANÁLISES MOLECULARES

### ***Extração de DNA e detecção da variabilidade genética***

A extração do DNA total dos indivíduos foi feita a partir de folhas frescas, utilizando o método do brometo de cetilmetilamônio (CTAB), de acordo com Doyle & Doyle (1987). Cinco dos sete marcadores microssatélites selecionados para este estudo foram desenvolvidos anteriormente a partir de uma biblioteca genômica enriquecida de *Cattleya coccinea* (Novello *et al.*, no prelo) (tabela 3). Outros dois marcadores adicionais foram desenhados a partir de sequências dessa biblioteca que não foram utilizadas previamente para desenho de pares de iniciadores (tabela 3). Para isto, foram identificadas e descartadas sequências de nucleotídeos pertencentes ao vetor de clonagem utilizando a opção *Vecscreen* do Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e, posteriormente, foi verificada a existência de repetições microssatélites nas sequências clonadas utilizando o programa WebSat (Martins *et al.*, 2009). Os iniciadores para as regiões adicionais foram desenhados com o auxílio do programa Primer 3 (Rozen & Skaletsky, 2000).

A detecção da variabilidade dos *loci* microssatélites foi feita por meio da análise de fragmentos em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems) utilizando 400HD ROX<sup>TM</sup> (Applied Biosystems) como padrão de tamanho em pares de base (pb). As reações para genotipagem dos sete *loci* microssatélites foram feitas de acordo com o protocolo desenvolvido por Schuelke (2000) modificado, utilizando pares

de iniciadores específicos não marcados com fluorescência, sendo o *forward* com cauda M13 na extremidade 5', e um terceiro iniciador universal M13 marcado com fluorescência 6-FAM ou HEX. As amplificações por PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo 1-10 ng de DNA, tampão IB Proneutria 1X, 0,2 mM de dNTP, 0,04 µM do iniciador *forward*, 0,16 µM do iniciador *reverse* e do iniciador M13 marcado com fluorescência, 1 u de Taq DNA polimerase Proneutria e 0,2 mg/mL de *albumina sérica bovina* (BSA). Os produtos obtidos foram verificados em eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% e corados com GelRed™ (Biotium). Para visualização dos picos correspondentes aos alelos, foi utilizado o software Peak Scanner™ (Applied Biosystems). Todos os indivíduos que não apresentaram picos consistentes ou apresentaram picos de difícil interpretação para algum *locus* foram reamplificados. Indivíduos com dados faltantes para três ou mais *locus*, bem como indivíduos com dados faltantes para dois *locus* e homocigotos para dois ou mais *locus*, foram excluídos das análises.

Para a nomeação e verificação de erros de anotação de tamanhos dos alelos, foram utilizados as macros para Excel Flexibin (<http://www.zoo.cam.ac.uk/zoostaff/meg/amos.htm>) (Amos *et al.*, 2007) e Autobin (<http://www4.bordeaux-aquitaine.inra.fr/biogeco/Ressources/Logiciels/Autobin>) (Ghichoux *et al.*, 2011). Os resultados da nomeação de alelos fornecidos por ambos as macros foram confrontados a fim de resolver problemas específicos de nomeação. O programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Oosterhout *et al.*, 2004) foi utilizado para verificar a existência de erros de análise das amplificações, por *locus* e população, devido à presença de alelos nulos, *stuttering* ou eliminação do maior alelo e o macro Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001) foi utilizado para verificar a existência de genótipos idênticos (Dewoody *et al.*, 2006).

### ***Análise da mistura nuclear***

O número de agrupamentos genéticos e a mistura nuclear foram estimados a partir do método de atribuição bayesiana implementado no programa Structure 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000), sob o critério de *admixture model* para frequências alélicas correlatas (*correlated model*) (Falush *et al.*, 2003). Diferentes modelos e combinações de número de interações da Cadeia de Markov Monte Carlo e de *burn-in* foram anteriormente testados, como indicado no manual, sendo selecionados os valores de 500.000 iterações com *burn-in* de 100.000 iterações como suficientes para convergência

da cadeia. O número de agrupamentos presumidos ( $K$ ) foi extraído de  $K=1$  a  $K=7$ , em 10 corridas independentes por valor  $K$ , e o número de agrupamentos ótimo foi inferido a partir do método de Evanno *et al.* (2005), que emprega a estatística  $\Delta K$  baseada na taxa de mudanças de  $\Pr(X|K)$  entre sucessivos valores de  $K$ , implementado no programa HARVESTER (Earl & vonHoldt, 2011).

### ***Análise da variabilidade genética***

Para a caracterização da variabilidade genética, foram utilizados os seguintes estimadores: número de alelos observados ( $A$ ), variação do tamanho do alelo ( $var$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) (Nei, 1987), que foram fornecidos pelo programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995). Este programa também foi utilizado para testar o desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci*. A frequência média de alelos nulos ( $r$ ) por *locus* foi estimada pelos métodos de Brookfield 1 (Brookfield, 1996) implementado no MICRO-CHECKER 2.2.3 (Oosterhout *et al.*, 2004). Tal estimador foi utilizado por ser mais adequado para *locus* em que bandas visíveis são detectadas em todos os indivíduos ou para *locus* em que a não-amplificação não pode ser atribuída somente à presença de alelos nulos, mas também à ocorrência de erros técnicos (Brookfield, 1996). Desvios nas proporções genotípicas em relação ao esperado em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em cada *locus* foram testados através de teste exato (Guo & Thompson, 1992) no programa GENEPOP on the web, versão 4.0.10 (Raymond & Rousset, 1995) e a combinação das probabilidades de todas as populações em cada *locus* foi realizada pelo método de Fisher. A variabilidade genética das populações alopátricas, da suposta zona híbrida do PEI, com seus subgrupos morfológicos definidos *a priori*, bem como das espécies foi estimada a partir dos seguintes parâmetros: número médio de indivíduos genotipados ( $N$ ), número de alelos observados ( $A$ ), número de alelos exclusivos ( $PA$ ), Riqueza alélica ( $RA$ ), heterozigosidades média observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ) (Nei, 1987) e índice de fixação ( $F$ ). O programa GENALEX 6.4 (Peakall & Smouse, 2006) foi utilizado para calcular os valores de  $N$ ,  $A$ ,  $PA$ ,  $H_O$ ,  $H_E$  e  $F$  (Weir & Cockerham, 1984), enquanto o programa MSA (Dieringer & Schlötterer, 2003) foi utilizado para estimar a  $RA$  baseada em 22 indivíduos. Desvios nas proporções genotípicas em relação ao esperado EHW em cada população e nos subgrupos do PEI também foram testados através de teste exato (Guo & Thompson, 1992) no programa GENEPOP on the web, 4.0.10.

### **Análise da estrutura genética**

A partição da variabilidade genética entre as espécies, entre as populações dentro das espécies e dentro das populações foi investigada através de Análise de Variância Molecular (AMOVA) *locus por locus* no programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005). Duas AMOVAs foram feitas separadamente sob o modelo IAM (*infinite alleles model*), que utiliza  $F_{st}$ , uma medida mais conservadora e com menos suposições relativas a evolução da variação dos *loci*, para estimar a diferenciação genética. Para a primeira AMOVA considerou-se os três grupos morfológicos: morfo *C. coccinea* (Ccj, Cpe e Cib), possíveis híbridos (Hib) e morfo *C. brevipedunculata* (Bib, Bob e Bsc). Para a segunda AMOVA considerou-se os dois agrupamentos genéticos resultantes da análise bayesiana (considerando todos os indivíduos do PE Ibitipoca como uma população de *C. brevipedunculata*; ver Resultados). A significância dos componentes da variância foi calculada utilizando 10.000 permutações dos dados. Além disso, um teste de diferenciação populacional, com base nas frequências genotípicas e não assumindo acasalamento aleatório dentro das amostras, foi conduzido no programa FSTAT.

Para representar graficamente as relações genéticas entre as populações alopátricas e os subgrupos do PEI, foram utilizadas as distâncias genéticas de Nei (1978) ( $D_N$ , *unbiased genetic distance*) e de Cavalli-Sforza & Edwards (1967) ( $D_C$ ), com e sem correção para alelos nulos (INA), e o algoritmo *neighbor-joining* (NJ) em análises de agrupamento distintas. A matriz de  $D_N$  foi fornecida pelo programa Genealex, enquanto as matrizes de  $D_C$  com e sem correção INA foram fornecidas pelo FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007). O programa MSA (Dieringer & Schlötterer, 2003) foi utilizado para obtenção de 1000 replicatas de *bootstrap* da matriz de distância  $D_C$  sem correção para alelos nulos. Essas replicatas foram utilizadas no pacote Phylip (Felsenstein, 1989) para gerar árvores de NJ (programa NEIGHBOR) e, posteriormente, para criar árvores de consenso de maioria (programa CONSENSE). O suporte dos ramos foi, então, acrescido às árvores não-enraizadas construídas no programa Mega 5.1 (Tamura *et al.*, 2011).

### **RELAÇÕES ENTRE MORFOLOGIA E AMBIENTE**

Todos os indivíduos do PEI foram classificados, com base em anotações de campo tomadas individualmente, em quatro grupos com incidência decrescente de

luminosidade, inversamente proporcional à cobertura vegetal presente, denominados: campo rupestre (CR), campo rupestre arborizado (CRA), borda da mata (BM) e mata (M). Uma ANOVA um critério, seguido de um teste de comparações de média par a par (Tukey,  $p < 0,05$ ), foi conduzido no pacote estatístico R 2.15.2 (Ihaka & Gentleman, 1996) para testar a possível influência do ambiente sobre as variáveis morfológicas vegetativas (# 1, 2, 5, 6, tabela 2) e sobre o comprimento do pedúnculo (#7, tabela 2). Tais caracteres foram os mais associados ao eixo 2 das CVAs, que está mais envolvido na discriminação das espécies (ver Resultados).

## RESULTADOS

### MORFOMETRIA MULTIVARIADA

Os cinco primeiros eixos da Análise de Componentes Principais (PCA) foram significativos (autovalor >1), mas apenas os eixos 1 e 2 da PCA foram informativos quanto aos padrões morfológicos associados às espécies envolvidas. De uma maneira geral, pode ser observado um gradiente ao longo do eixo 2 (16,19% da variância), com as populações de *C. brevipedunculata* se localizando principalmente no extremo positivo do eixo e os de *C. coccinea* no extremo negativo, e os indivíduos intermediários do PEI situados entre estes (figura 4). Não foram observados *outliers*. A tabela 4 mostra a correlação das variáveis com os eixos significativos da PCA. As variáveis de perianto (tais como, comprimento e largura da sépala dorsal, da sépala lateral, da pétala e do labelo; #8, 9, 11, 12, 14; 15, 17 e 18) são as mais correlacionadas ao primeiro eixo, enquanto as variáveis vegetativas (tais como, comprimento e larguras medial, apical e basal de folha e comprimento de pseudobulbo; # 1-5) são as mais correlacionadas ao eixo 2.

Foi encontrada elevada correlação (>0,8) entre as larguras da folha, bem como entre alguns caracteres das partes florais, o que justificou a remoção das variáveis #3, 4, 8, 9, 12, 14 e 17 (tabela 2) da análise de variáveis canônicas (CVA). Na CVA utilizando os caracteres florais e vegetativos, apenas os dois primeiros eixos apresentaram autovalor superior a 1. O eixo 1 explica cerca de 48,60% da variância, discriminando a população Ccj das demais de *C. coccinea*, e mostrando um gradiente de sobreposição parcial das populações Bsc, Bob e Bib de *C. brevipedunculata* (figura 5A). Neste mesmo eixo, ocorre sobreposição completa entre os três morfos do PEI (Cib, Hib e Bib). As populações alopátricas de *C. coccinea* são discriminadas das populações alopátricas de *C. brevipedunculata* especialmente no eixo 2 (33,82% da variância) da CVA, que está mais associado ao comprimento e largura medial da folha (#1 e 2) e ao comprimento do pedúnculo (#7). Dessas três variáveis, apenas o comprimento da folha (#1) se mostrou significativamente diferente entre todas populações alopátricas amostradas (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ), sendo que os valores das médias de Ccj e Cpe são mais elevados do que os valores das médias de Bob e Bsc (figura 6A). Comprimento do pedúnculo, por sua vez, foi diferente entre as populações conspecíficas de *C. coccinea* e as conspecíficas de *C. brevipedunculata* (figura 6C). A CVA também indicou um

contínuo de variação entre os morfos Cib, Hib e Bib no PEI, sendo que os extremos desse gradiente se sobrepõem às populações alopátricas das duas espécies (figura 5A). Desta forma, a dispersão ao longo dos dois primeiros eixos mostra um gradiente em arco das populações Bsc>Bob>Bib>Hib>Cib>Cpe>Ccj. Quando excluídas as variáveis vegetativas, um padrão semelhante é encontrado, em que as populações alopátricas das duas espécies continuam sendo discriminadas pelo eixo 2 da CVA (34,75% da variância), que está fortemente associado ao comprimento do pedúnculo (#7). O gradiente de variação entre *C. coccinea*, subgrupos morfológicos do PEI e *C. brevipedunculata*, apesar de maior sobreposição, ainda pode ser observado (figura 5B).

A distância de Mahalanobis, obtida a partir da análise de discriminantes da CVA utilizando 17 caracteres florais e vegetativos, foi maior entre os centroides das populações Bob e Cpe ( $D^2=41,14$ ) e menor entre os centroides dos subgrupos do PEI ( $D^2=6,59$  entre Bib e Cib;  $D^2=2,28$  entre Cib e Hib e  $D^2=1,53$  entre Bib e Hib). Essa análise sustenta diferenças significativas entre todos os grupos, exceto entre Bib e Hib ( $p>0,001$ ). O percentual de classificações corretas dentro dos grupos variou de 75% (Cpe) a 100% (Ccj) nas populações alopátricas de *C. coccinea* e *C. brevipedunculata*. Indivíduos dessas populações só foram classificados erroneamente entre populações conspecíficas ou em relação a um dos subgrupos do PEI (tabela 5). O percentual de classificações corretas nos subgrupos do PEI foi menor, variando de 48,9% (Bib) a 74,7% (Hib). A maior parte das classificações errôneas ocorre entre os subgrupos do próprio PEI (tabela 5).

A análise de discriminantes da CVA utilizando 13 caracteres florais apresenta valores mais baixos de distâncias de Mahalanobis ( $D^2$ ) entre todos os grupos, sendo maior entre os centroides de Cpe e Bsc (27,58) e menor entre os centroides dos subgrupos do PEI (0,54-1,50). A distância foi significativa entre todos os pares de populações ( $p<0,001$ ), exceto entre os subgrupos do PEI. O percentual de classificações corretas foi, em geral, menor, variando de 20,51% (Cib) a 100% (Ccj) (tabela 6). Assim como na análise de discriminantes com a matriz completa, não há classificações incorretas entre uma população alopátrica de *C. coccinea* com uma população alopátrica de *C. brevipedunculata*, e a muitas classificações incorretas ocorrem entre os subgrupos do PEI (tabela 6).

Na análise de agrupamento, foram observados três grupos: o primeiro formado pelas três subpopulações da suposta zona híbrida do PEI (Cib, Hib e Bib), o segundo formado pelas populações alopátricas de *C. coccinea* (Ccj e Cpe) e o terceiro formado



pelas populações alopátricas de *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) (figura 7A). Os mesmos grupos são observados quando utiliza-se a matriz de apenas caracteres florais (figura 7B).

### VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA

A estrutura populacional inferida pela análise bayesiana foi bastante estável, não alterando conforme os modelos escolhidos ou conforme o número de iterações da Cadeia de Markov Monte Carlo e de *burn-in*. Os valores de  $L(K)$  e  $\Delta K$  obtidos para o modelo implementado indicam  $K=2$  como o número ótimo de agrupamentos genéticos (figura 8A-B). Um dos agrupamentos genéticos inferidos pela análise bayesiana inclui as duas populações conspecíficas de *C. coccinea* (Ccj e Cpe), enquanto o outro agrupamento contém as populações alopátricas conspecíficas de *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e os 3 subgrupos morfológicos do PEI definidos *a priori* (Cib, Hib e Bib) (figura 8C). Todos os 180 indivíduos do PEI (Cib, Hib e Bib) apresentam probabilidade posterior alta ( $>0,9$ ) de pertencerem ao agrupamento genético de *C. brevipedunculata*, não sendo evidenciados indivíduos com probabilidade posterior de pertencer ao agrupamento de *C. coccinea* ou indivíduos com mistura nuclear característica de hibridação entre os táxons. Por este motivo, a quantificação da variabilidade genética por *locus* para *C. brevipedunculata* está descrita abaixo com todos os indivíduos do PEI incluídos na espécie. Apenas um indivíduo da população Cpe (*C. coccinea*) tem probabilidade posterior maior que 0,3 de pertencer ao agrupamento de *C. brevipedunculata*, o que pode ser devido a este indivíduo ter sido coletado a partir de cultivo. Dentre as populações do grupo *C. brevipedunculata*, a população Bob foi a que apresentou maior número de indivíduos com probabilidades posteriores menores que 0,9 de pertencer ao agrupamento, mas nenhum deles apresenta probabilidade posterior maior que 0,5 de pertencer ao outro agrupamento genético (figura 8C).

Desvios significativos do EHW foram evidenciados para a maior parte dos *loci* em ambas as espécies, o que pode estar diretamente relacionado a ocorrência de alelos nulos em uma ou mais populações em cada um desses, conforme indicado pelo Microchecker. A frequência média de alelos nulos ( $r_{MÉDIA}$ ) por *locus* variou de -0,015 (Cac27) a 0,202 (Cac18), para *C. coccinea*, e de 0,009 (Cac26) a 0,096 (Cac11), para *C. brevipedunculata* (tabela 7). Evidências de erros devido a *stuttering* só ocorreram na região SC11 para a população Bob e para a população Cib/Hib/Bib e na região SC18

para a população Cpe. Todos os sete *loci* apresentaram-se polimórficos e o número de alelos observados (*A*) por *locus* variou de 9 a 24 em *C. coccinea* e de 4 a 23 em *C. brevipedunculata* (tabela 7). A heterozigosidade observada em cada *locus* variou de 0,519 a 0,860 em *C. coccinea* e 0,380 a 0,782 em *C. brevipedunculata*, enquanto a heterozigosidade esperada variou de 0,664 a 0,929 em *C. coccinea* e 0,450 a 0,869 em *C. brevipedunculata* (tabela 7). Não foi constatado desequilíbrio de ligação entre os *loci* (*p* valor ajustado a  $\alpha=0,05$ , baseado em 420 permutações).

A tabela 8 mostra a caracterização genética das quatro populações amostradas neste trabalho e da suposta zona híbrida do PEI, com seus subgrupos morfológicos. O número de alelos observados (*A*) variou de 61 (Bsc) a 83 (Cpe) e o número de alelos exclusivos (*PA*) foi maior para as populações de *C. coccinea* (Ccj e Cpe), intermediário no PEI e menor nas populações de *C. brevipedunculata* (Bsc e Bob). Nota-se que apenas dois dos 13 alelos exclusivos da suposta zona híbrida são exclusivos de algum dos subgrupos pré-definidos a partir da morfologia e que o número de alelos exclusivos das espécies é alto (*PA*=52 em *C. coccinea* e *PA*=40 em *C. brevipedunculata*). A riqueza alélica (*RA*), calculada para 22 indivíduos, variou pouco entre as amostras, sendo a média para *C. coccinea* (10,5) maior que para *C. brevipedunculata* (8,8). No PEI, *RA* é ligeiramente maior para os indivíduos definidos *a priori* como supostos híbridos. A heterozigosidade observada (*H<sub>O</sub>*) foi muito similar entre as populações [médias entre *loci* e populações de 0,658 (*C. coccinea*) e 0,629 (*C. brevipedunculata*)], enquanto a heterozigosidade esperada (*H<sub>E</sub>*) foi menor em Bsc (0,684) e maior em Ccj (0,805). Ambos os parâmetros (*H<sub>O</sub>* e *H<sub>E</sub>*) são bastante similares entre os subgrupos da suposta zona híbrida. O índice de fixação (*F*) variou, por sua vez, de 0,089 a 0,202 nas amostras. Nenhuma população encontra-se em EHW para os sete *loci* combinados (*p*<0,05). Esses desvios foram causados pelo excesso de homozigotos em dois (Ibitipoca e Bob) ou mais *loci* (Ccj=3, Bsc=4 e Cpe=6) em cada população.

As AMOVAs revelam que a maior parte da variância (91,74 e 85,54%) está dentro das populações e que a variação entre os grupos é ligeiramente menor do que entre as populações dentro dos grupos (tabela 9). Não há diferenciação significativa entre os três grupos morfológicos definidos *a priori*, porém esta é significativa quando são considerados os dois agrupamentos genéticos definidos pela análise bayesiana (6,68% da variação, *p*<0,001; tabela 9). Todos os pares de populações diferiram significativamente entre si no teste de diferenciação populacional, mas o mesmo não ocorreu para nenhum dos pares formados pelos subgrupos do PEI definidos *a priori* (*p*

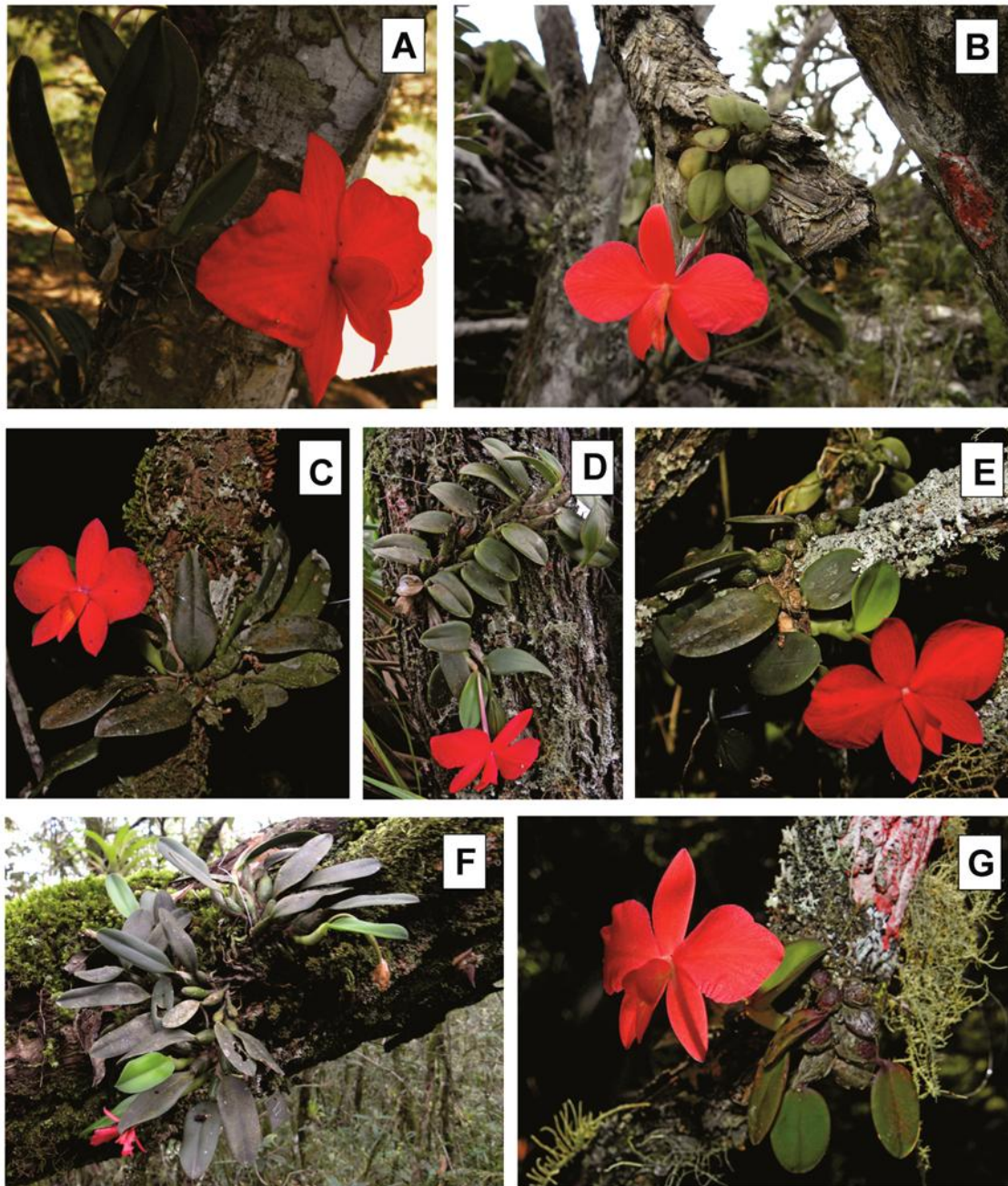
valor ajustado a  $\alpha=0,05$ , baseado em 420 permutações). Em todas as Análises de Agrupamento utilizando NJ como algoritmo de agrupamento, os subgrupos Cib, Hib e Bib estão agrupados com as populações de *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc). A topologia dos dendrogramas gerados com matrizes de distância  $D_C$  com e sem correção INA é idêntica, com poucas alterações nos comprimentos dos ramos. Apenas o resultado gerado com a matriz  $D_C$  sem correção é mostrado no dendrograma não-enraizado com suporte *bootstrap* (figura 9). O dendrograma construído mostra que todos os subgrupos morfológicos do PEI se agrupam com alto suporte (100) e que esses estão agrupados com o grupo formado pelas populações conspecíficas de *C. brevipedunculata* com alto suporte (99,7).

Uma tabela com as frequências alélicas calculadas por *locus* e população (considerando os subgrupos da suposta zona híbrida) é mostrada no Apêndice 1. As frequências de diversos alelos marcam a estreita relação existente entre a população do PEI e as populações de *C. brevipedunculata* amostradas neste trabalho. Este é o caso dos alelos 203 (*locus* Cac11), 231 (*locus* Cac16), 180 (*locus* Cac26) e 213, 215 e 233 (*locus* Cac27), que são frequentes nas populações de *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e do PEI (Cib/Hib/Bib) e poucos frequentes, raros ou ausentes nas populações de *C. coccinea* (Ccj e Cpe).

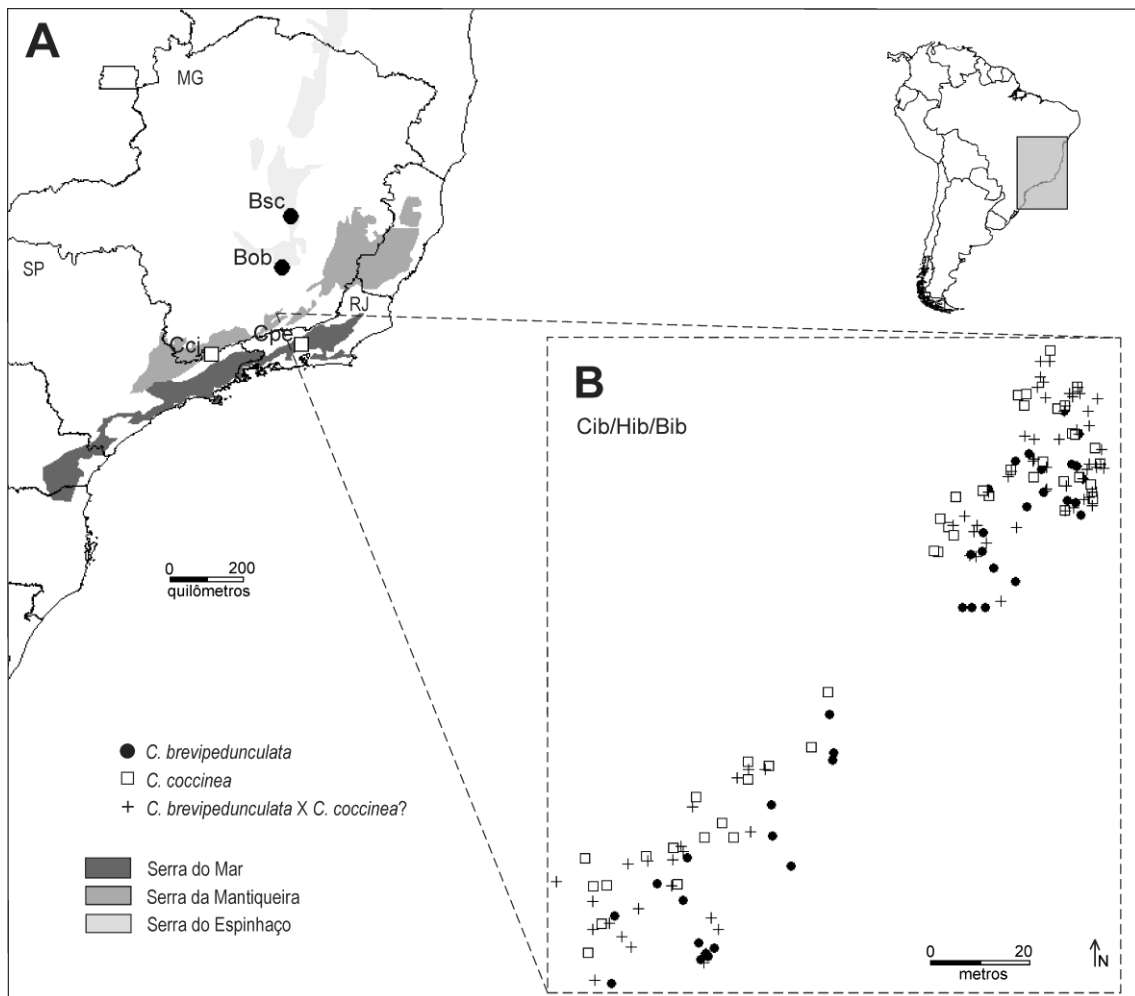
## MORFOLOGIA E AMBIENTE

Das variáveis testadas, apenas a largura do pseudobulbo (#6) e o comprimento do pedúnculo (#7) não foram significativamente diferentes entre os microambientes do PEI (ANOVA,  $p<0,01$ ). As médias das variáveis comprimento e largura da folha (# 1 e 2) e comprimento do pseudobulbo (#5) são, por sua vez, significativamente diferentes entre os grupos formados por indivíduos do PEI amostrados em campo rupestre (CR) e mata (M), os extremos do gradiente ambiental observado na área, sendo as médias de todas variáveis maiores para indivíduos localizados na mata ( $p<0,05$ ; teste de Tukey) (figura 10). Indivíduos classificados como morfo *C. coccinea* representam apenas 9% dos localizados em campo rupestre, enquanto indivíduos classificados como morfo *C. brevipedunculata* representam aproximadamente 5% dos localizados na mata. Aqueles identificados a priori como possíveis híbridos foram representativos em todos os microambientes (figura 10). A maior parte dos indivíduos da área encontram-se na faixa

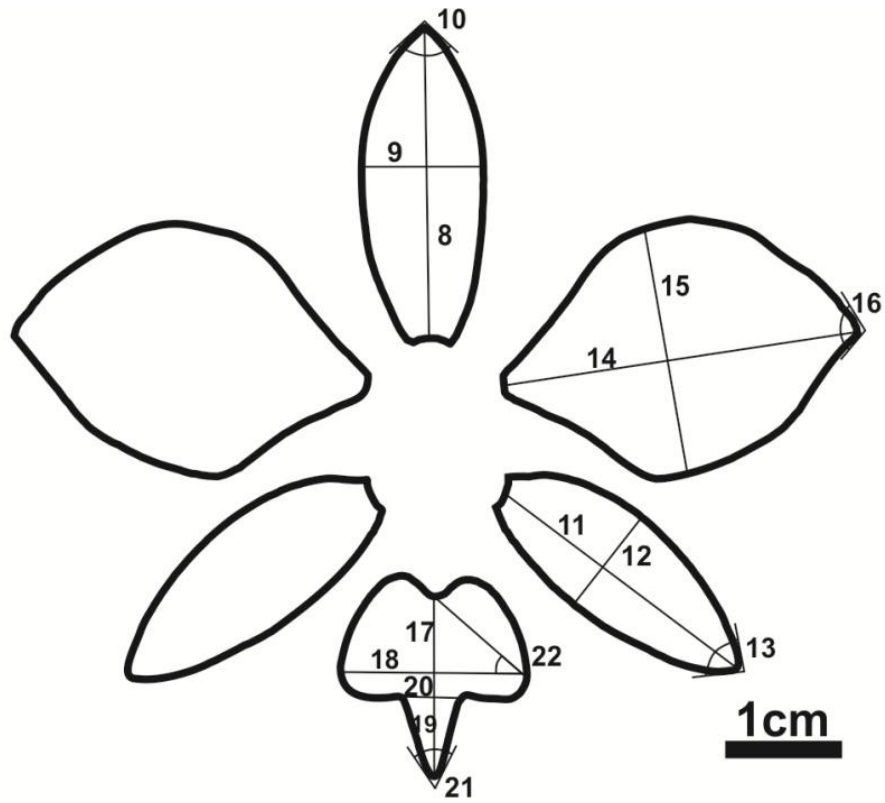
entre a mata (M) e o campo rupestre (CR), onde a disponibilidade de luz e a umidade são intermediárias.



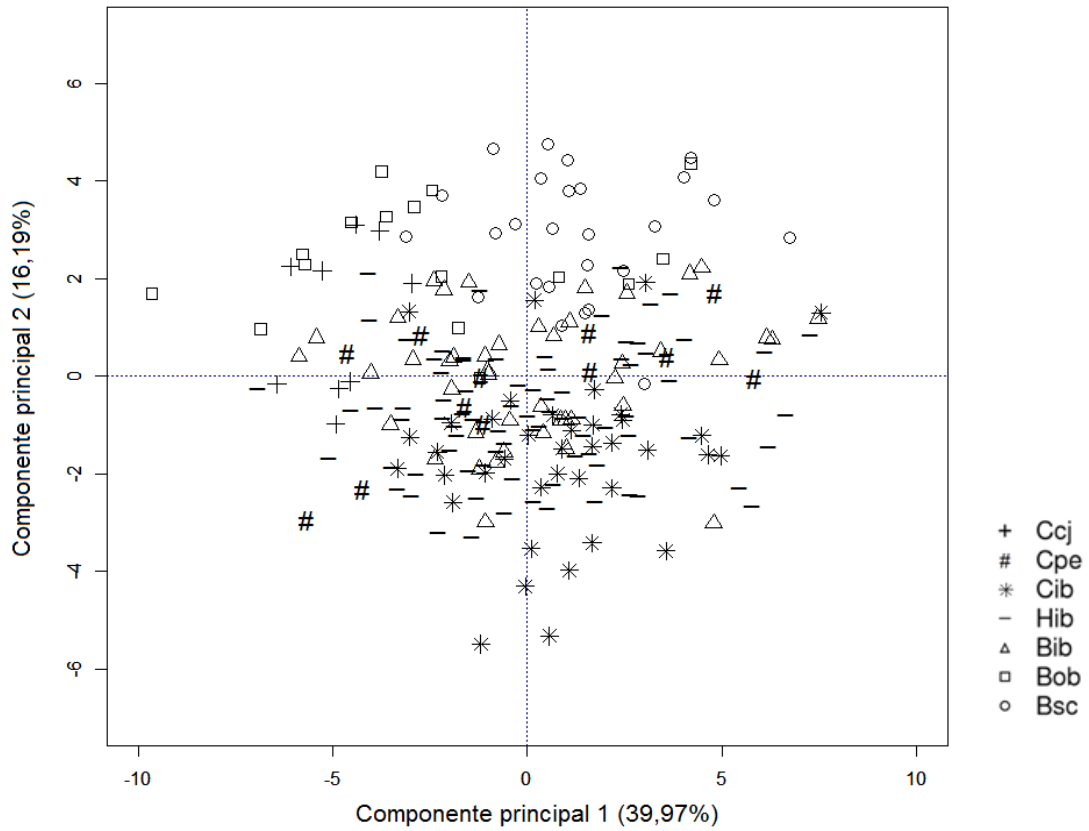
**Figura 1.** Aspectos gerais da morfologia de *Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata*. **A.** *C. coccinea* de Petrópolis, RJ. **B.** *C. brevipedunculata* de Morro do Pilar, MG. **C-G.** Variação morfológica na suposta zona híbrida do Parque Estadual do Ibitipoca: indivíduos identificados como morfo *C. coccinea* com introgressão (**C**) e puro (**F**), indivíduo identificado como possível híbrido (**D**), indivíduos identificados como morfo *C. brevipedunculata* com introgressão (**E**) e puro (**G**).



**Figura 2.** **A.** Localização das populações de *Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata* amostradas. **B.** Ampliação da área amostrada no PEI, mostrando a distribuição dos indivíduos pertencentes aos subgrupos definidos conforme a morfologia vegetativa. Para nomes das populações, ver tabela 1. Acrônimos para os estados brasileiros: MG = Minas Gerais, RJ = Rio de Janeiro, SP = São Paulo.

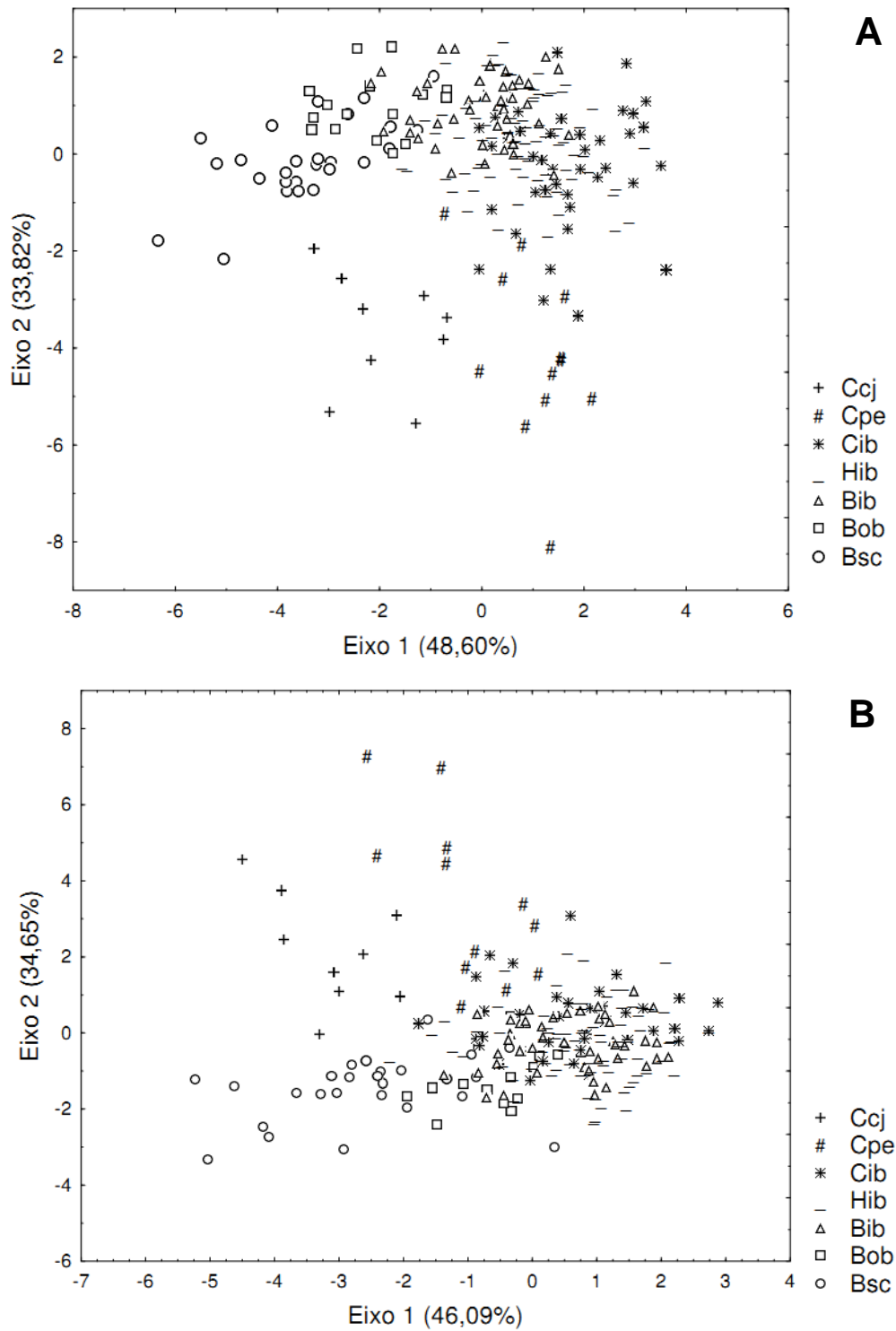


**Figura 3.** Partes do perianto, indicando as variáveis utilizadas nas análises morfométricas de populações de *Cattleya coccinea*, *C. brevipedunculata* e de subgrupos da suposta zona híbrida de ambas as espécies no Parque Estadual do Ibitipoca. Para nomes das variáveis, ver tabela 2.

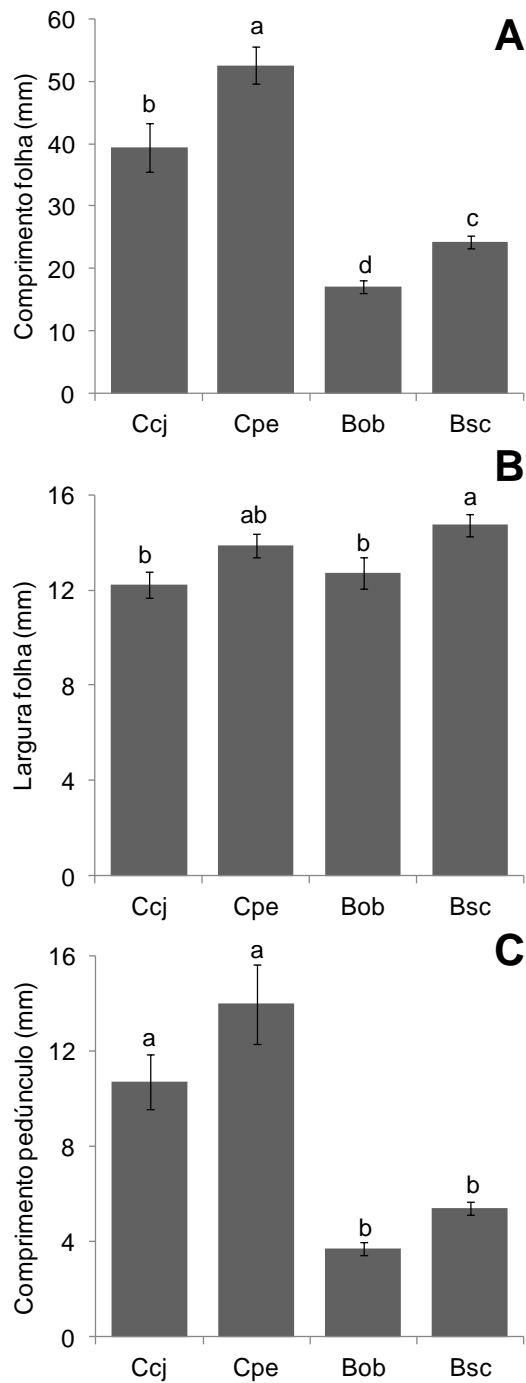


**Figura 4.** Representações dos escores nos eixos 1 e 2 da PCA de 24 caracteres florais e vegetativos de populações de *Cattleya coccinea* (Ccj e Cpe) e *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e de subgrupos de uma suposta zona híbrida entre ambas as espécies (Cib/Hib/Bib). Para nome das populações, ver tabela 1.

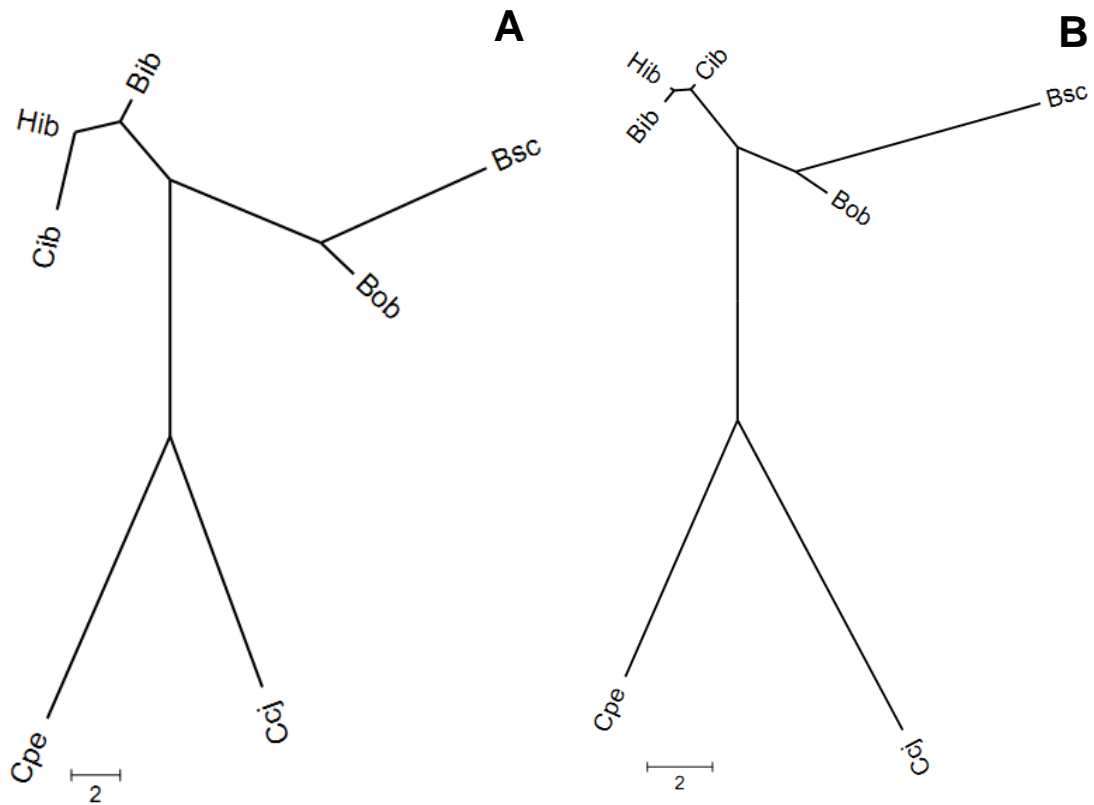




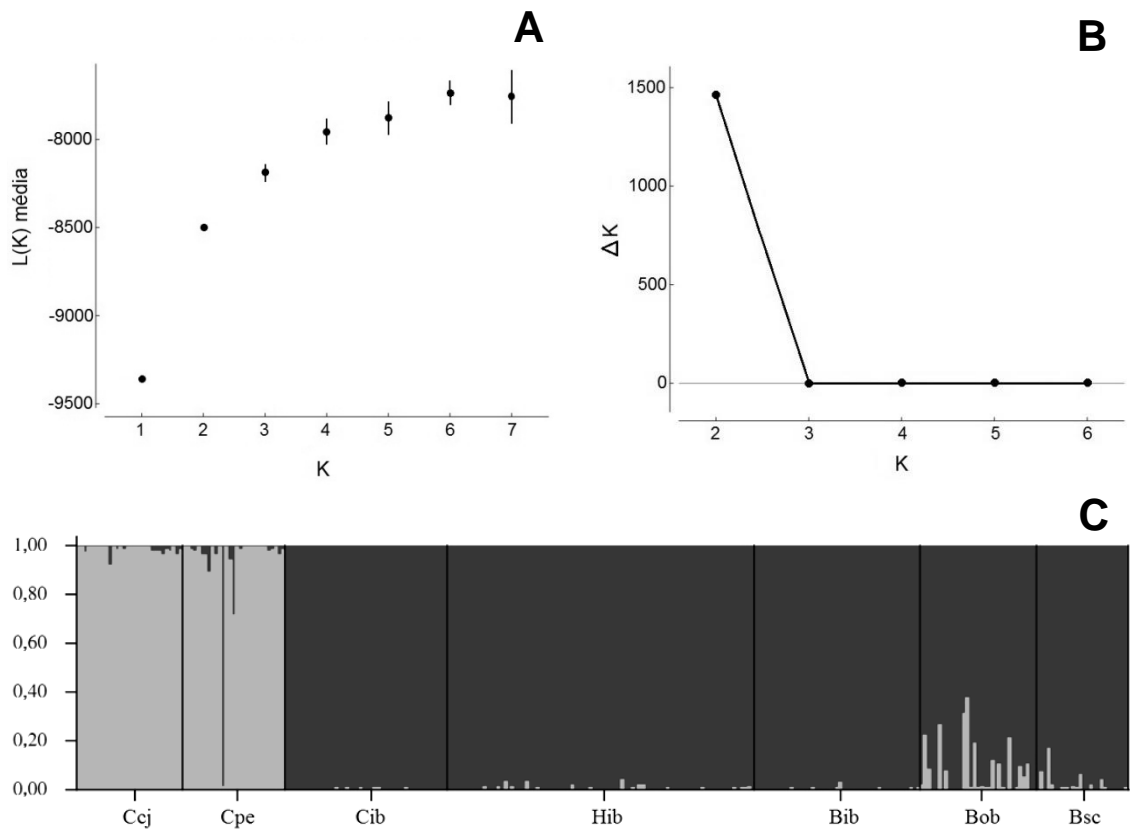
**Figura 5.** Representação dos escores nos eixos 1 e 2 da CVA de 17 caracteres florais e vegetativos (**A**) e de 13 caracteres vegetativos (**B**) de populações de *Cattleya coccinea* (Ccj e Cpe) e *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e de subgrupos de uma suposta zona híbrida entre ambas as espécies (Cib/Hib/Bib). Para nomes das populações, ver tabela 1.



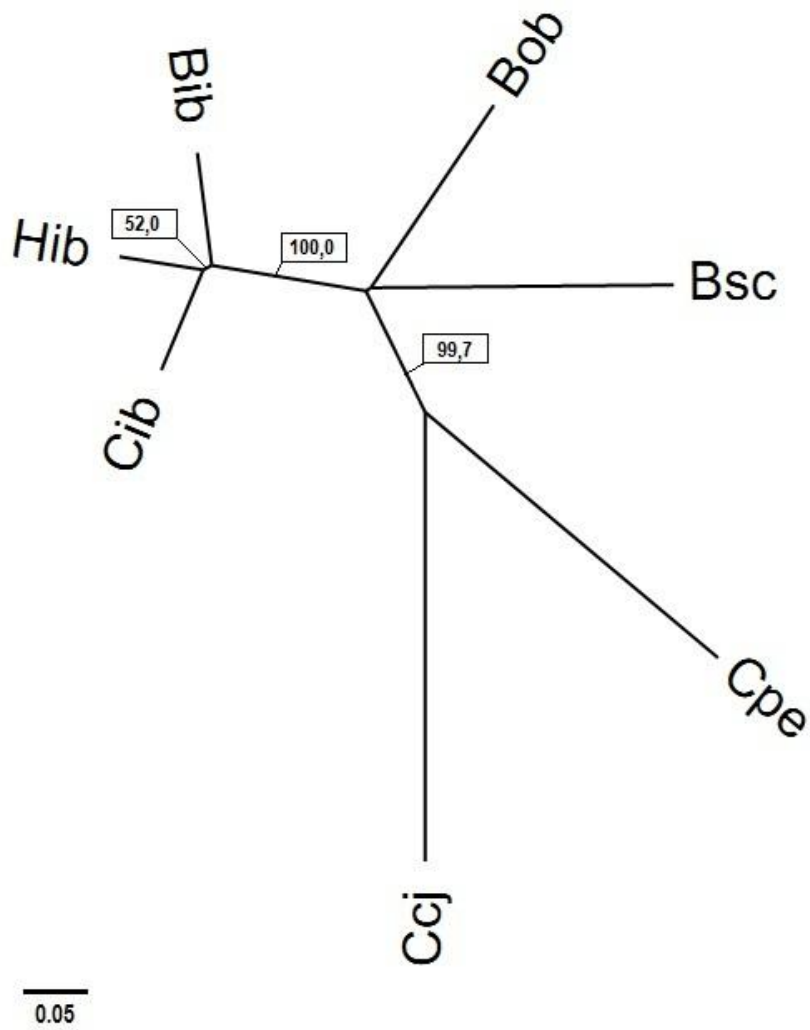
**Figura 6.** Comparação das médias de comprimento da folha (A), largura da folha (B) e comprimento do pedúnculo (C) nas populações alopátricas de *Cattleya coccinea* (Ccj e Cpe) e *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc), com os respectivos erros-padrão. Letras minúsculas distintas indicam médias estatisticamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Para nome das populações, ver tabela 1.



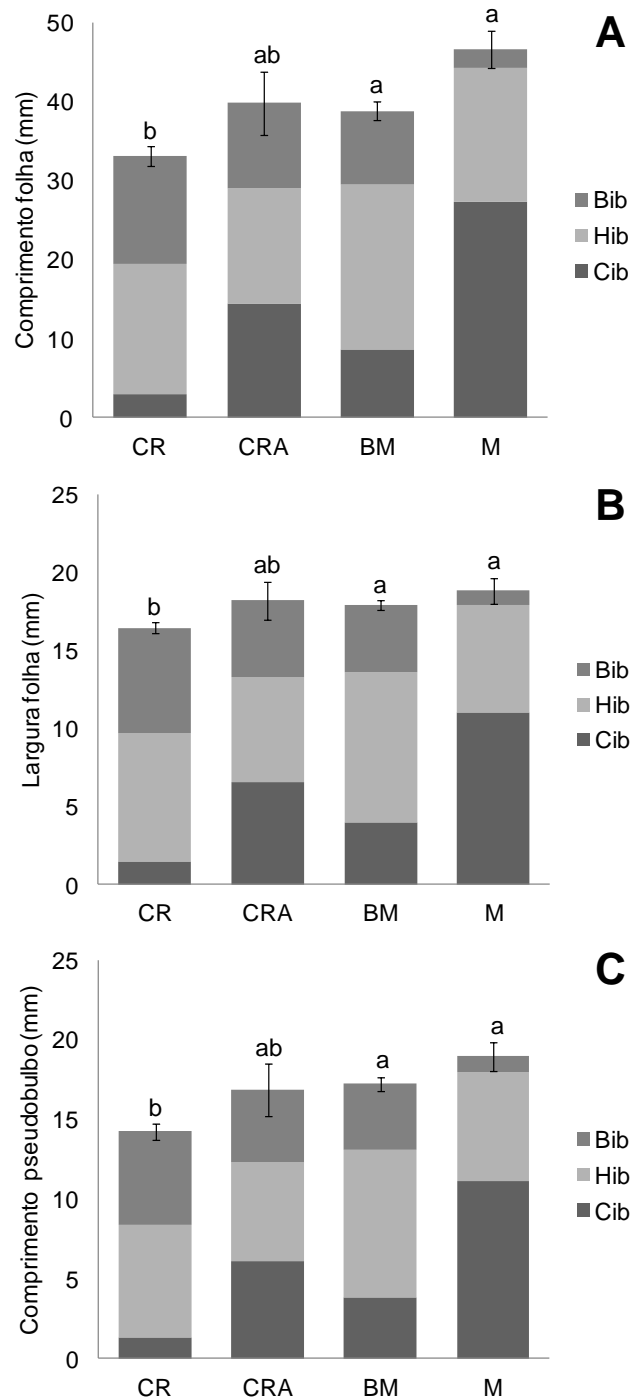
**Figura 7.** Dendrogramas não-enraizados mostrando as relações fenéticas entre populações de *Cattleya coccinea* (Ccj e Cpe), *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e subgrupos morfológicos de uma suposta zona híbrida entre ambas as espécies (Cib/Hib/Bib). Os dendrogramas foram construídos a partir de uma matriz de distância generalizada de Mahalanobis (D2) da CVA utilizando 17 caracteres florais e vegetativos (A) e da CVA utilizando 13 caracteres florais (B), com *neighbour-joining* como algoritmo de agrupamento. Para nome das populações, ver tabela 1.



**Figura 8.** Análise Bayesiana de sete *loci* microsatélites em 298 indivíduos de populações de *C. coccinea* (Ccj e Cpe), *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e subgrupos de uma suposta zona híbrida entre ambas as espécies (Cib/Hib/Bib). **A.** Gráfico da média  $\pm$  desvio padrão de  $\text{LnP}(D)$  para sete corridas independentes. **B.** Gráfico de  $\Delta K$  para sete corridas independentes. **C.** Representação gráfica da estruturação genética para  $K=2$  com a probabilidade posterior de cada indivíduo pertencer a cada um dos agrupamentos, utilizando o programa Structure 2.3. Para nome das populações, ver tabela 1.



**Figura 9.** Dendrograma não-enraizado mostrando as relações fenéticas entre as populações de *C. coccinea* (Ccj e Cpe), *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e subgrupos da suposta zona híbrida localizada no PEI (Cib/Hib/Bib), baseada em sete loci microssatélites e construída a partir da matriz de distância genética de Cavalli-Sforza (1967) utilizando *neighbour-joining* como algoritmo de agrupamento. As caixas mostram os resultados de *bootstrap* maiores que 50. Para nomes das populações, ver tabela 1.



**Figura 10.** Comparação das médias de comprimento da folha (**A**), largura da folha (**B**) e comprimento do pseudobulbo (**C**) entre os grupos formados por indivíduos do PEI localizadas no campo rupestre (CR), campo rupestre arborizado (CRA), borda da mata (BM) e mata (M), com os respectivos erros-padrão. A área das barras está subdividida conforme a proporção dos morfos Bib, Hib e Cib amostrados em cada microambiente. Letras minúsculas distintas indicam médias estatisticamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,01$ ). Para nomes dos morfos, ver tabela 1.

**Tabela 1.** Localização geográfica e número de indivíduos utilizados nas análises morfométricas e moleculares das populações alopátricas de *Cattleya coccinea* (Ccj e Cpe), *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e da suposta zona híbrida localizada no Parque Estadual do Ibitipoca, subdivida em três grupos morfológicos: morfo *C. coccinea* (Cib), morfo *C. brevipedunculata* (Bib) e possíveis híbridos (Hib). O material testemunho de cada população foi depositado no herbário BHCB<sup>1</sup>, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), ou no herbário ESA<sup>2</sup>, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ).

População	Município	Localidade	Localização	Nº indivíduos		Voucher
				Análise morfológica	Análise molecular	
<i>C. coccinea</i>						
Ccj	Campos do Jordão (SP)	PE de Campos do Jordão	S 22°42'27", W 45°28'04"	12	30	S Koehler s/n <sup>2</sup>
Cpe	Petrópolis (RJ)	Fazenda do Facão	S 22°26'39", W 43°13'41"	9	29	JF Rodrigues 761 <sup>2</sup>
<i>C. brevipedunculata</i>						
Bsc	Morro do Pilar (MG)	PN da Serra do Cipó	S 19°14'52", W 43°30'37"	26	26	BSS Leal 011 <sup>1</sup>
Bob	Ouro Branco (MG)	Serra de Ouro Branco	S 20°30'42", W 43°42'35"	16	33	BSS Leal 013 <sup>1</sup>
Suposta Zona Híbrida* Cib/Hib/Bib	Lima Duarte (MG)	PE do Ibitipoca	S 21°42'50", W 43°53'50"	167	180	BSS Leal 007 <sup>1</sup> BSS Leal 008 <sup>1</sup>
Total				230	298	

\* Cib = morfo *C. coccinea* e supostos introgressantes, Hib = possíveis híbridos (Hib), Bib = morfo *C. brevipedunculata* e supostos introgressantes

**Tabela 2.** Lista dos caracteres florais e vegetativos utilizados nas análises morfométricas multivariadas das populações de *Cattleya coccinea* (Ccj e Cpe), *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e da suposta zona híbrida localizada no Parque Estadual do Ibitipoca, subdivida em três grupos morfológicos: morfo *C. coccinea* (Cib), morfo *C. brevipedunculata* (Bib) e possíveis híbridos (Hib). Para nomes das populações, ver tabela 1. Medidas em milímetros (mm), exceto ângulos (em graus). Dados mostrados como média  $\pm$  desvio-padrão (mínimo–máximo).

Caractere	Ccj	Cpe	Cib	Hib	Bib	Bob	Bsc
Folha							
1. Comprimento	39 $\pm$ 12 (26-56)	53 $\pm$ 10 (35-76)	48 $\pm$ 11 (22-73)	38 $\pm$ 9 (19-67)	31 $\pm$ 7 (20-49)	17 $\pm$ 4 (12-29)	24 $\pm$ 5 (16-36)
2. Larg. 1/2*	12 $\pm$ 2 (10-15)	14 $\pm$ 2 (12-17)	19 $\pm$ 4 (11-27)	17 $\pm$ 3 (11-24)	17 $\pm$ 3 (11-25)	13 $\pm$ 3 (10-18)	15 $\pm$ 2 (12-20)
3. Larg. 1/3*	11 $\pm$ 2 (9-14)	13 $\pm$ 2 (10-16)	18 $\pm$ 3 (11-24)	16 $\pm$ 2 (10-22)	15 $\pm$ 3 (10-22)	11 $\pm$ 2 (8-16)	13 $\pm$ 2 (10-19)
4. Larg. 2/3*	11 $\pm$ 2 (9-15)	13 $\pm$ 2 (11-17)	18 $\pm$ 4 (10-26)	16 $\pm$ 3 (10-22)	16 $\pm$ 3 (10-23)	12 $\pm$ 3 (9-18)	14 $\pm$ 2 (10-20)
Pseudobulbo							
5. Comprimento	14 $\pm$ 2 (10-18)	21 $\pm$ 5 (10-29)	20 $\pm$ 4 (13-30)	17 $\pm$ 4 (8-25)	14 $\pm$ 3 (7-21)	8 $\pm$ 2 (6-12)	11 $\pm$ 2 (7-16)
6. Largura	6 $\pm$ 1 (5-8)	6 $\pm$ 1 (4-8)	7 $\pm$ 1 (5-10)	7 $\pm$ 1 (4-11)	8 $\pm$ 1 (5-11)	7 $\pm$ 2 (4-9)	8 $\pm$ 2 (5-11)
Pedúnculo							
7. Comprimento	11 $\pm$ 3 (6-16)	14 $\pm$ 6 (5-24)	7 $\pm$ 2 (3-14)	6 $\pm$ 2 (2-12)	5 $\pm$ 1 (3-9)	4 $\pm$ 1 (2-6)	5 $\pm$ 1 (2-9)
Sépala dorsal							
8. Comprimento	17 $\pm$ 2 (14-20)	22 $\pm$ 5 (15-31)	24 $\pm$ 4 (18-33)	23 $\pm$ 4 (17-35)	24 $\pm$ 4 (17-33)	20 $\pm$ 5 (13-29)	23 $\pm$ 2 (18-28)
9. Largura	8 $\pm$ 1 (7-10)	10 $\pm$ 2 (7-15)	11 $\pm$ 2 (8-15)	10 $\pm$ 2 (6-15)	11 $\pm$ 2 (7-15)	9 $\pm$ 2 (6-13)	11 $\pm$ 2 (8-15)
10. Ângulo ápice	92 $\pm$ 8 (80-109)	89 $\pm$ 18 (68-126)	92 $\pm$ 11 (71-117)	89 $\pm$ 10 (63-115)	91 $\pm$ 12 (67-118)	88 $\pm$ 11 (73-112)	97 $\pm$ 12 (72-117)
Sépala lateral							
11. Comprimento	15 $\pm$ 2 (12-18)	21 $\pm$ 5 (16-32)	21 $\pm$ 4 (15-31)	21 $\pm$ 3 (15-31)	21 $\pm$ 4 (16-32)	18 $\pm$ 4 (11-26)	20 $\pm$ 2 (17-24)
12. Largura	7 $\pm$ 1 (6-8)	9 $\pm$ 2 (6-12)	9 $\pm$ 1 (7-12)	9 $\pm$ 2 (6-13)	9 $\pm$ 2 (6-13)	8 $\pm$ 2 (4-12)	10 $\pm$ 1 (8-13)



13. Ângulo ápice	118±27 (83-163)	88±17 (63-130)	100±19 (62-140)	95±17 (62-139)	93±18 (66-134)	101±16 (69-126)	105±21 (64-154)
Pétala							
14. Comprimento	20±2 (15-22)	25±6 (18-37)	29±4 (23-40)	27±5 (19-39)	28±5 (19-41)	24±5 (15-34)	28±3 (22-34)
15. Largura	14±2 (12-17)	20±5 (12-29)	23±3 (17-32)	21±5 (12-37)	21±5 (10-34)	19±5 (9-30)	23±3 (18-31)
16. Ângulo ápice	134±17 (115-169)	128±24 (95-169)	128±17 (91-170)	128±18 (92-174)	127±19 (93-172)	140±21 (103-173)	150±19 (121-180)
Labelo							
17. Compr. total	14±1 (13-16)	19±4 (12-24)	17±2 (14-24)	17±2 (13-22)	17±2 (13-24)	16±3 (11-20)	18±1 (15-21)
18. Larg. total	14±1 (13-16)	18±3 (12-23)	18±2 (14-25)	18±2 (13-24)	18±2 (12-23)	17±3 (11-22)	20±2 (15-23)
19. Compr. lobo medial	5±1 (4-6)	8±2 (5-10)	7±1 (5-11)	7±1 (5-11)	7±1 (5-11)	6±1 (4-8)	7±1 (6-10)
20. Larg. lobo medial	5±0,4 (5-6)	5±0,9 (4-7)	5±0,9 (4-8)	5±0,8 (3-7)	5±0,9 (3-7)	5±1,0 (3-7)	7±1,2 (6-9)
21. Ângulo ápice do lobo medial	89±16 (47-101)	77±20 (57-133)	74±17 (40-112)	69±11 (43-103)	70±13 (48-102)	79±11 (56-100)	98±16 (55-122)
22. Ângulo entre ponto mediano basal e ponto lateral	36±3 (32-41)	36±3 (32-40)	38±3 (30-46)	38±4 (29-45)	38±4 (31-47)	36±3 (30-41)	32±4 (22-41)
Coluna							
23. Comprimento	6±0,3 (5-6)	7±0,5 (6-8)	7±0,5 (6-8)	7±0,7 (6-9)	7±0,6 (6-9)	7±0,7 (5-9)	7±0,9 (6-9)
24. Compr. cunículo	8±1 (7-10)	9±2 (5-11)	9±2 (5-14)	9±2 (6-14)	9±2 (6-13)	8±2 (6-11)	11±2 (5-13)

\* Larguras medidas a 1/3, 1/2 e 2/3 do comprimento, a partir da base da folha.

**Tabela 3.** Caracterização dos iniciadores para os sete *loci* microssatélites utilizados para a determinação da variabilidade genética de populações de *Cattleya brevipedunculata* e *C. coccinea*, incluindo os cinco pares de iniciadores desenvolvidos por Novello *et al* (no prelo) (Cac01 a Cac18) e dois iniciadores adicionais (Cac26 e Cac27) desenhados a partir da biblioteca enriquecida de *C. coccinea* desenvolvida por Novello *et al.* (no prelo).

<i>Locus</i>	Sequencia iniciadores (5'-3')	TA (°C)	Motivo	Tam. esperado (pb)
Cac01	F: M13-TACAACGCCCAATTTGAATG R: CCATCATTTGCCTTTTCACA	58	(GA) <sub>17</sub>	108
Cac02	F: M13-CAGGATTTCTCCTCGTGCTC R:GCAGAGCGGAACAAGGATAG	58	(AG) <sub>18</sub>	173
Cac11	F: M13-TCAAGGCCTGCACATAGAGA R: AAGAGGAAGGCTTCGTTGC	60	(AG) <sub>8</sub>	167
Cac16	F: M13-AACAGGCATTTGGAGCTTTT R: CCTCATTTCTCTCACCTCTTT	60	(AG) <sub>23</sub>	250
Cac18	F: M13-CTGGTGAGGGAGAAGAAAACA R: CCCTCTCCCTCTCTTTTCCA	60	(GA) <sub>11</sub> N(AG) <sub>26</sub>	224
Cac26	F: M13-TGGCTTGGTGTTGCATTTAT R: TGTGAGCCTCAATAAGCCAAT	60	(GA) <sub>6</sub> (GT) <sub>6</sub>	167
Cac27	F: M13-TGGATCTTACCTTGGGCTTCTA R: CCCTGCTCTCTTTCTCACTCAT	64	(GT) <sub>7</sub> GC(GT) <sub>4</sub> (GA) <sub>11</sub>	209
Cauda M13: TTTTCCCAGTCACGAC				

**Tabela 4.** Correlação entre variáveis e eixos significativos (autovalor >1) da análise de componentes principais (PCA) de 24 caracteres morfológicos florais e vegetativos de populações de *C. coccinea* e *C. brevipedunculata* e de subgrupos da suposta zona híbrida entre ambas as espécies. Para nome das variáveis, ver tabela 2.

Cód. Variável	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3	Eixo 4	Eixo 5
1	-0,194184	0,746726	-0,120196	-0,487870	0,152917
2	-0,500853	0,719652	-0,385521	0,212869	0,021379
3	-0,451350	0,736844	-0,390714	0,178245	0,026507
4	-0,517408	0,680692	-0,388527	0,235954	0,055919
5	-0,280782	0,766785	-0,110552	-0,410898	0,107447
6	-0,520178	0,039503	-0,280447	0,461993	0,127225
7	-0,112523	0,142354	0,155316	-0,830181	0,170175
8	-0,899171	0,049152	0,315036	0,021003	-0,133594
9	-0,918714	-0,184859	-0,014196	-0,008139	-0,136467
10	-0,300507	-0,251049	-0,616189	-0,177883	-0,325394
11	-0,885943	0,044555	0,345193	-0,048284	-0,104686
12	-0,924132	-0,215654	0,008485	-0,041355	-0,072978
13	-0,305790	-0,305778	-0,561980	-0,318412	-0,390332
14	-0,905412	0,029394	0,230321	-0,016527	-0,177471
15	-0,897271	-0,117462	0,046094	-0,025639	-0,138229
16	-0,236662	-0,434439	-0,575045	-0,133788	-0,114673
17	-0,871155	-0,138865	0,317834	-0,072713	0,103540
18	-0,866196	-0,291731	-0,018002	-0,019922	0,183323
19	-0,750300	-0,072770	0,401196	-0,056995	0,189545
20	-0,619513	-0,497424	-0,166351	-0,013082	0,270678
21	0,038200	-0,432639	-0,585883	-0,149106	0,304289
22	0,247807	0,436625	0,265296	0,016442	-0,618539
23	-0,684061	0,090032	-0,002633	0,260319	0,185729
24	-0,571607	-0,069218	-0,002649	-0,007233	-0,156953

**Tabela 5.** Matriz de classificação obtida a partir da Análise de Discriminantes da CVA de 17 caracteres florais e vegetativos de populações de *C. coccinea* (Ccj e Cpe) e *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e de subgrupos de uma suposta zona híbrida entre ambas as espécies (Cib/Hib/Bib). Para nome das populações, ver tabela 1.

População	Classificações Corretas (%)	<i>C. coccinea</i>		Suposta zona híbrida			<i>C. brevipedunculata</i>	
		Ccj	Cpe	Cib	Hib	Bib	Bsc	Bob
<i>C. coccinea</i>								
Ccj	100,00	9	-	-	-	-	-	-
Cpe	75,00	-	9	2	1	-	-	-
Suposta zona híbrida								
Cib	51,28	-	2	20	17	-	-	-
Hib	74,70	-	-	14	62	6	-	1
Bib	48,89	-	-	1	20	22	-	2
<i>C. brevipedunculata</i>								
Bsc	76,92	-	-	-	-	3	20	3
Bob	81,25	-	-	-	-	3	-	13
Total	67,39	9	11	37	100	34	20	19

\* Cib = morfo *C. coccinea* e supostos introgressantes, Hib = possíveis híbridos (Hib), Bib = morfo *C. brevipedunculata* e supostos introgressantes

**Tabela 6.** Matriz de classificação obtida a partir da Análise de Discriminantes da CVA de 13 caracteres florais de populações de *C. coccinea* (Ccj e Cpe) e *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e de subgrupos de uma suposta zona híbrida entre ambas as espécies (Cib/Hib/Bib). Para nome das populações, ver tabela 1.

População	Classificações Corretas (%)	<i>C. coccinea</i>		Suposta zona híbrida			<i>C. brevipedunculata</i>	
		Ccj	Cpe	Cib	Hib	Bib	Bsc	Bob
<i>C. coccinea</i>								
Ccj	100,00	9	-	-	-	-	-	-
Cpe	66,67	-	8	1	2	1	-	-
Suposta zona híbrida								
Cib	20,51	-	1	8	24	3	1	2
Hib	81,93	-	-	5	68	7	-	3
Bib	28,89	-	-	2	29	13	-	1
<i>C. brevipedunculata</i>								
Bsc	50,00	-	-	1	2	1	20	2
Bob	76,92	-	-	-	6	2	-	8
Total	58,26	9	9	17	131	27	21	16

\* Cib = morfo *C. coccinea* e supostos introgressantes, Hib = possíveis híbridos (Hib), Bib = morfo *C. brevipedunculata* e supostos introgressantes

**Tabela 7.** Variabilidade genética em sete *loci* microssatélites em populações de *C. coccinea* (Ccj e Cpe) e *C. brevipedunculata* (Bob, Bsc e Cib/Hib/Bib). Os subgrupos do PEI foram incluídos em *C. brevipedunculata* devido ao resultado obtido na análise bayesiana de estruturação genética a partir do programa Structure. *N* = número de indivíduos amostrados. *A* = número de alelos observados, *Var* = variação do tamanho de alelos, *H<sub>E</sub>* = heterozigosidade esperada, *H<sub>O</sub>* = heterozigosidade observada, *r* MÉDIA = frequência média de alelos nulos por *locus*.

<i>Locus</i>	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>Var</i>	<i>H<sub>E</sub></i>	<i>H<sub>O</sub></i>	<i>r</i> MÉDIA
<i>C. coccinea</i>						
Cac01	59	13	111-145	0,792	0,638*	0,077
Cac02	59	12	171-193	0,880	0,707*	0,084
Cac11	60	15	175-209	0,799	0,780	0,001
Cac16	60	24	207-277	0,836	0,648*	0,098
Cac18	46	24	185-277	0,929	0,519*	0,202
Cac26	54	9	180-202	0,664	0,453*	0,108
Cac27	56	19	197-237	0,846	0,860	-0,015
<i>C. brevipedunculata</i>						
Cac01	240	18	111-143	0,790	0,654*	0,070
Cac02	239	16	169-201	0,836	0,721*	0,056
Cac11	240	20	175-217	0,869	0,677*	0,096
Cac16	236	4	231-245	0,523	0,380*	0,090
Cac18	231	23	183-229	0,897	0,782*	0,054
Cac26	238	10	178-204	0,450	0,429	0,009
Cac27	227	15	199-233	0,832	0,758*	0,035

\*Desvios significativos em relação ao EHW ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 8.** Variabilidade genética das populações alopátricas de *C. coccinea* (Ccj e Cpe) e *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e da suposta zona híbrida localizada no PEI (Cib/Hib/Bib) a partir de sete *loci* microssatélites. Para nomes das populações, ver tabela 1,  $N$  = número médio de indivíduos genotipados por população,  $A$  = número de alelos observados,  $PA$  = número de alelos exclusivos,  $RA$  = riqueza alélica calculada sobre 22 indivíduos,  $H_E$  = heterozigosidade média esperada,  $H_O$  = heterozigosidade média observada e  $F$  = índice de fixação ( $F_{is}$  para populações e  $F_{st}$  para a espécie). O erro padrão está representado entre parênteses.

Populações	$N$	$A$	$PA$	$RA$	$H_E$	$H_O$	$F$
<i>C. coccinea</i>							
Ccj	27,6	73	18	9,85	0,805(0,027)	0,641(0,064)	0,202(0,080)
Cpe	27,7	83	23	11,07	0,800(0,060)	0,674(0,106)	0,150(0,112)
Média	27,6	78	-	10,5	0,803(0,032)	0,658(0,060)	0,176(0,066)
Espécie	55,3	116	52	-	0,874(0,020)	0,655(0,053)	0,086(0,018)
<i>C. brevipedunculata</i>							
Bsc	25,6	61	3	8,36	0,684(0,081)	0,615(0,083)	0,089(0,053)
Bob	32,3	76	5	9,73	0,757(0,071)	0,609(0,052)	0,187(0,028)
Suposta zona híbrida							
Cib	45,3	63	1	7,93	0,745(0,065)	0,670(0,087)	0,127(0,070)
Bib	46,4	65	1	7,98	0,751(0,064)	0,666(0,083)	0,127(0,062)
Hib	85,3	77	0	8,39	0,748(0,068)	0,655(0,084)	0,150(0,066)
agrupados	177,0	82	13	8,25	0,754(0,065)	0,662(0,083)	0,144(0,063)
Média	78,3	73	-	8,8	0,732(0,041)	0,629(0,041)	0,140(0,029)
Espécie	234,9	104	40	-	0,770(0,066)	0,650(0,072)	0,055(0,010)

\* Cib = morfo *C. coccinea* e supostos introgressantes, Hib = possíveis híbridos (Hib), Bib = morfo *C. brevipedunculata* e supostos introgressantes

**Tabela 9.** Análise da Variância Molecular (AMOVA) média para sete *loci* microssatélites em diferentes níveis hierárquicos, considerando-se os três grupos morfológicos (três pops. de *C. brevipedunculata*, três pops. de *C. coccinea* e uma pop. de supostos híbridos) e os dois grupos genéticos (três pops. de *C. brevipedunculata*, considerando todos os indivíduos do PE Ibitipoca como uma única população da espécie, e duas pops. de *C. coccinea*) resultantes da análise bayesiana de estruturação genética a partir do programa Structure.  $F_{CT}$  = diferenciação genética entre grupos em relação ao total,  $F_{SC}$  = diferenciação genética entre populações dentro dos grupos;  $F_{ST}$  = diferenciação genética entre populações em relação ao total.

Fonte de variação	Varição (%)	Estatística F	P
Grupos morfológicos			
Entre grupos	-2,76	$F_{CT} = -0,02758$	0,8699
Entre populações do mesmo grupo	11,02	$F_{SC} = 0,10726$	<0,001
Dentro das populações	91,74	$F_{ST} = 0,08263$	<0,001
Grupos genéticos			
Entre grupos	6,68	$F_{CT} = 0,06682$	<0,001
Entre populações do mesmo grupo	7,78	$F_{SC} = 0,08336$	<0,001
Dentro das populações	85,54	$F_{ST} = 0,14461$	<0,001



## DISCUSSÃO

### HIBRIDAÇÃO, DELIMITAÇÃO DAS ESPÉCIES E PLASTICIDADE FENOTÍPICA

Os dados de variabilidade e estrutura genética deste trabalho indicam que a população amostrada no Parque Estadual do Ibitipoca é exclusivamente composta por indivíduos de *C. brevipedunculata* e que não há hibridação e/ou introgressão com *C. coccinea*, embora essa população exiba ampla variação morfológica, com a maioria dos indivíduos apresentando morfologia intermediária a dos dois táxons. Uma análise filogenética utilizando marcadores ISSR já havia evidenciado a relação mais próxima dessa população com um clado formado por *C. brevipedunculata* e *C. wittigiana* do que com outras populações do complexo *C. coccinea* – *C. mantiqueirae* (Rodrigues, 2010). Este padrão filogenético foi hipoteticamente associado à retenção de polimorfismos ancestrais causada por eventos de especiação recente ou à ocorrência de eventos de hibridação (Rodrigues, 2010). Diferentemente do esperado para zonas híbridas, e observado em alguns trabalhos de hibridação e introgressão em plantas (e.g., Lexer *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2010), não foram constatados aumento dos níveis de diversidade genética da população do PEI em relação às populações utilizadas como referência e nem diferenças nas frequências alélicas marcantes entre os subgrupos do PEI classificados conforme a morfologia. Além disso, a análise de agrupamento e a frequência de diversos alelos diagnósticos são congruentes com os dois agrupamentos genéticos inferidos pela análise bayesiana de estruturação genética, confirmando a uniformidade genética dos três grupos definidos conforme a morfologia (Cib, Hib e Bib) e a relação próxima destes com as populações de *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc).

Caracteres morfológicos intermediários têm se mostrado úteis para o reconhecimento de híbridos, mesmo em famílias onde esse não é um fenômeno comum (e.g., Fabaceae: Conceição *et al.*, 2008). Ainda que a morfologia possa fornecer pistas sobre esse processo, a imprevisibilidade da expressão de caracteres morfológicos diminui, em muitos casos, a sua utilidade na identificação de híbridos (Rieseberg & Ellstrand, 1993). Em Orchidaceae, apesar de um grande número de trabalhos reportarem híbridos com características morfológicas intermediárias a dos parentais (e.g., Caputo *et al.*, 1997; Peakall *et al.*, 1997; Nielsen, 2000; Aagaard *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*,

2006, Cozzolino *et al.*, 2006; Moccia *et al.*, 2007), inclusive no gênero *Cattleya* (Silva, 2008), outros trabalhos demonstram a falta de consistência da morfologia na identificação de híbridos (e.g., Wallace, 2006; Bateman *et al.*, 2008; Stahlberg, 2009; De Hert *et al.*, 2011). A existência de espécimes com fenótipo intermediário em que a suposta hibridação não foi confirmada por dados moleculares, bem como de híbridos em número bastante inferior ao previsto a partir de observações morfológicas, também são relatadas na literatura (e.g. Nazzaro *et al.*, 1999; Wallace, 2006; De Hert *et al.* 2011). Como extremo da inconsistência da morfologia para determinação de híbridos, nossos dados mostram que a variação intermediária a *C. coccinea* e *C. brevipedunculata* encontrada no PEI não pode ser atribuída à ocorrência das duas espécies na área e à hibridação e/ou introgressão entre as mesmas. Ao contrário da hipótese inicial, outro processo deve ser o responsável por essa variação morfológica.

Diferentemente de outras populações conhecidas de *C. brevipedunculata*, onde os indivíduos ocorrem exclusivamente em ambiente aberto, parte dos indivíduos da população do PEI ocorrem na mata, sob condições de sombreamento. A ampla variação morfológica observada nessa população pode, assim, estar associada à plasticidade fenotípica em resposta às variações de luz. A plasticidade é favorável se o ambiente é heterogêneo, se estímulos ambientais são suficientes para que os indivíduos possam expressar o fenótipo apropriado em cada ambiente, e se há custos para fenótipos especializados inapropriados (Callaway *et al.*, 2003). Na área amostrada no PEI, tais condições parecem ser atendidas, e indivíduos de *C. brevipedunculata* localizados na mata, sob baixa disponibilidade de luz, apresentam fenótipo apropriado caracterizado pelo maior comprimento e largura da folha e maior comprimento do pseudobulbo em comparação às plantas de sol. Dos fatores que induzem respostas plásticas em plantas, a variação de luz é provavelmente o mais reconhecido (Morales *et al.*, 2010) e aumento da área foliar e alongamento de internós em resposta ao sombreamento são os dois mais bem documentados exemplos de plasticidade adaptativa (Alpert & Simms, 2002; van Kleunen & Fischer, 2005). Apesar da plasticidade não ter sido testada nesse trabalho, nossas comparações entre indivíduos localizados em campo rupestre e mata, fornecem uma indicação desse processo, que necessita ser futuramente investigado. As diferenças entre os indivíduos devido ao efeito ambiental não podem, porém, ser devidamente interpretadas, pois não foram isoladas das possíveis diferenças causadas pela influência do crescimento e desenvolvimento dos indivíduos sobre a plasticidade (Coleman *et al.*, 1994; Wright & McConnaughay, 2002; Valladares *et al.*, 2007).

Embora não exista na literatura relatos da variação morfológica infraespecífica ou intrapopulacional para *C. brevipedunculata*, alguns ecótipos de *C. coccinea* são reconhecidos. Segundo Fowlie (1987), variações morfológicas entre esses diferentes ecótipos estariam sob controle genético e não simplesmente sob controle fisiológico motivado pela disponibilidade de luz, uma vez que as características distintivas dos ecótipos são mantidas quando cultivados. Em cultivo sob sombreamento, observamos que indivíduos das populações de *C. brevipedunculata* da Serra do Espinhaço não apresentam notável aumento da área foliar e alongamento do pseudobulbo, como foi observado em indivíduos localizados na mata da área amostrada no PEI. Isso pode ser um indicativo de que a amplitude da plasticidade varia entre essas populações, sendo de maior magnitude em plantas cujo habitat é mais heterogêneo (Bradshaw & Hardwick, 1989; Alpert & Simms, 2002). Relações entre a incidência de luz e morfologia nunca foram, porém, testadas em condições artificiais em nenhuma dessas populações e, portanto, pouco se pode concluir a partir dessas observações.

Apesar de bem conhecidas em plantas, as respostas fenotípicas a microgradientes ambientais têm recebido escassa atenção em orquídeas (Ackerman *et al.*, 2011). A hipótese de plasticidade levantada neste trabalho pode ser futuramente testada por meio de experimentos controlados utilizando proles geneticamente homogêneas sob regimes de luz contrastantes (simulação de ambiente com sol pleno e sombreado) ou por meio de experimentos de transplantes recíprocos entre plantas de sol e sombra em ambiente natural (ver Morales *et al.*, 2010). Para testar se essa variação fenotípica apresentada é adaptativa, pode-se também utilizar a produção de frutos como estimativa do *fitness* dos indivíduos. Características envolvidas na aquisição de recursos, frequentemente mostram padrões de plasticidade que permitem que um dado indivíduo genético cresça e se reproduza com sucesso em ambientes contrastantes (Sultan, 2000, 2003). Mas, determinados caracteres plásticos podem, por outro lado, não ser adaptativos, se desenvolvendo devido à correlação genética com características sob seleção, à deriva genética ou como uma resposta passiva à escassez de recursos (van Kleunen & Fischer, 2005).

## VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA

Os níveis moderados a altos de variabilidade genética detectados em ambas espécies está em concordância com o descrito para plantas em que a alogamia é

predominante (Hamrick & Godt, 1996; Nybom, 2004). Ambas as espécies estudadas apresentam características florais associadas à ornitofilia, sendo que raras visitas por beija-flores, com ou sem remoções de políneas, foram observadas em diferentes populações (Sazima *et al.*, 1996; Singer & Sazima, 2000). Estudos sobre biologia floral dessas espécies ainda são escassos, mas sugere-se que *C. coccinea* e *C. brevipedunculata* apresentem um mecanismo de polinização por engodo, uma vez que as espécies têm flores vistosas com grande variação de tamanho e não oferecem recompensa (Buzato, 1995).

A deficiência de heterozigotos observada em todas as populações pode ser explicada pela ocorrência de alelos nulos em dois ou mais *loci* em cada população (Dewoody *et al.*, 2006). Porém, a redução da heterozigosidade observada não pode ser completamente distinguida da redução indicativa de endogamia, causada por eventos demográficos ou características reprodutivas na população Cpe, onde seis dos sete *loci* apresentam desvios significativos do EHW devido ao excesso de homozigotos (van Oosterhout *et al.*, 2006). A heterozigosidade esperada nas populações estudadas é próxima à média para trabalhos com plantas cuja as estimativas foram baseados em microsatélites (Nybom, 2004), sendo superior ou similar aos valores encontrados em outras espécies de orquídeas com esse marcador (e.g., Gustafsson, 2000; Pellegrino *et al.*, 2006; Swarts *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2010).

A baixa divergência genética entre as populações, mesmo entre populações de espécies distintas, com a maior parte da variação genética encontrada dentro das populações, foi também observada em espécies de *Ophrys* utilizando marcadores microsatélites (Soliva & Widmer, 2003; Mant *et al.*, 2005). Esse resultado, entretanto, contrasta com os resultados de um estudo recente de variabilidade e estrutura de seis populações de *C. coccinea* da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira, em que foram descritos altos níveis de variação entre populações e menores níveis dentro das populações, empregando marcadores ISSR (Rodrigues, 2010). Em comparação aos marcadores dominantes, microsatélites geralmente estimam menores níveis de variação entre populações, o que é consequência direta dos altos níveis de heterozigosidade comumente detectados com esses marcadores (Hedrick, 1999; Nybom, 2004).

Em geral, a estrutura genética dentro e entre populações é determinada pelo sistema de acasalamento e pelos mecanismos de polinização e dispersão. Plantas de vida longa, sistemas de acasalamento que favorecem o exocruzamento e com dispersão de sementes a longas distâncias expressam maior diversidade genética dentro do que entre

populações (Hamrick *et al.*, 1991). Evidências recentes indicam que as orquídeas, comparadas a plantas de outras famílias, são tipicamente caracterizadas por baixos níveis de diferenciação genética populacional (Phillips *et al.*, 2012).

### IMPLICAÇÕES TAXONÔMICAS

*Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata* fazem parte de um clado com morfologia muito homogênea, que pode ser considerado um complexo de espécies (Rodrigues, 2010). Os dados de estrutura genética obtidos a partir da análise bayesiana demonstram que há diferenciação entre as populações de *C. coccinea* e as populações de *C. brevipedunculata* estudadas, incluindo nesta a população localizada no PEI, ainda que a AMOVA indique uma separação incipiente, provavelmente resultante da recente divergência entre esses grupos ou da manutenção do fluxo gênico. Além disso, esses dados corroboram com os resultados obtidos por Rodrigues (2010) que não sustentam a distinção entre *C. coccinea* e *C. mantiqueirae*, como proposta por Fowlie (1972, 1987).

Alguns trabalhos tem evidenciado que, em orquídeas, certas características vegetativas são melhores indicadores das relações filogenéticas que caracteres florais, em diferentes níveis hierárquicos (e.g., Chase & Palmer, 1992; van den Berg *et al.*, 2000; Borba *et al.*, 2002; Cameron, 2005). Mas, a distinção a partir de caracteres vegetativos, passíveis de influência ambiental, pode ser um complicador para a taxonomia das espécies aqui estudadas. Formato de folha e pseudobulbo são alguns dos caracteres diagnósticos de *Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata* e, na prática, são os mais usados na distinção destas espécies, uma vez que caracteres florais, como os relativos ao formato da pétala e do labelo, variam amplamente dentro das populações. Porém, nossos dados mostram que tais características vegetativas são plásticas na população de *C. brevipedunculata* do PEI, o que faz com que indivíduos localizados na mata tenham morfologia similar à descrita para *C. coccinea*. A utilização da distribuição geográfica na distinção destas espécies é também dificultada pela constatação de que a população estudada, situada na Serra do Ibitipoca, trecho da Serra da Mantiqueira, é de *C. brevipedunculata*, pois Fowlie (1987) reconhece a Serra da Mantiqueira como habitat típico de *C. coccinea* (como *C. mantiqueirae*). A Serra do Ibitipoca pode, porém, ser considerada um ambiente peculiar da Mantiqueira por apresentar formações quartzíticas (e não predominantemente cristalinas) (Vasconcelos, 2011) e similaridades florísticas

entre essa região e áreas da Serra do Espinhaço já foram descritas (e.g., Abreu *et al.*, 2011). Diante da dificuldade em separar as espécies, considera-se que a delimitação atual deve ser testada com um maior número de populações e reavaliada quanto a sua aplicabilidade, uma vez que características apontadas como diagnósticas não são capazes de separar *C. coccinea* de *C. brevipedunculata* quando esta última se encontra em ambiente distinto aos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aagaard SMD, Sástad SM, Greilhuber J, Moen A, Sastad SM, Greilhuber J, Moen A. 2005.** A secondary hybrid zone between diploid *Dactylorhiza incarnata* ssp. *cruenta* and allotetraploid *D. lapponica* (Orchidaceae). *Heredity* **94**: 488–496.
- Abreu NL, Neto LM, Konno TUP. 2011.** Orchidaceae das Serras Negra e do Funil, Rio Preto, Minas Gerais, e similaridade florística entre formações campestres e florestais do Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **25**: 58–70.
- Ackerman JD, Morales M, Trembley R. 2011.** Darwin's orchids: their variation, plasticity, and natural selection. *Lankesteriana* **11**: 179–184.
- Adams H, Anderson E. 1958.** A conspectus of hybridization in the Orchidaceae. *Evolution* **12**: 512–518.
- Alpert P, Simms EL. 2002.** The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when is it good for a plant to adjust? *Evolutionary Ecology* **16**: 285–297.
- Amos W, Hoffman JI, Frodsham A, Zhang L, Best S, Hill AVS. 2007.** Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes* **7**: 10–14.
- Arnold ML. 1992.** Hybridization as an evolutionary process. *Annual Review of Ecology and Systematics* **23**: 237–261.
- Azevedo CO, Borba EL, van Den Berg C. 2006.** Evidence of natural hybridization and introgression in *Bulbophyllum involutum* Borba, Semir & F. Barros and *B. weddellii* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae) in the Chapada Diamantina, Brazil, by using allozyme markers. *Revista Brasileira de Botânica* **29**: 415–421.
- Bateman RM, Smith RJ, Fay MF. 2008.** Morphometric and population genetic analyses elucidate the origin, evolutionary significance and conservation implications of *Orchis* × *angusticruris* (*O. purpurea* × *O. simia*), a hybrid orchid new to Britain. *Botanical Journal of the Linnean Society* **157**: 687–711.
- Borba EL, Shepherd GJ, van den Berg C, Semir J. 2002.** Floral and vegetative morphometrics of five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. *Annals of Botany* **90**: 219–230.

- Bradshaw AD. 1965.** Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics* **13**: 115–155.
- Bradshaw AD, Hardwick K. 1989.** Evolution and stress-genotypic and phenotypic components. *Biological Journal of the Linnean Society* **37**: 137–155.
- Brookfield JFY. 1996.** A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* **5**: 453–455.
- Buzato S. 1995.** Estudo comparativo de flores polinizadas por beija-flores em três comunidades da Mata Atlântica no sudeste do Brasil. Tese, Universidade Estadual de Campinas.
- Callaway RM, Pennings SC, Richards CL. 2003.** Phenotypic plasticity and interactions among plants. *Ecology* **84**: 1115–1128.
- Cameron KM. 2005.** Leave it to the leaves: a molecular phylogenetic study of Malaxideae. *American Journal of Botany* **92**: 1025–1032.
- Caputo P, Aceto S, Cozzolino S, Nazzaro R. 1997.** Morphological and molecular characterization of a natural hybrid between *Orchis laxiflora* and *O. morio* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* **205**: 147–155.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. 1967.** Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* **21**: 550–570.
- Chapuis M-P, Estoup A. 2007.** Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 621–631.
- Chase MW, Palmer JD. 1992.** Floral morphology and chromosome number in subtribe Oncidiinae (Orchidaceae): Evolutionary insights from a phylogenetic analysis of chloroplast DNA restriction site variation. In: Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ, eds. *Molecular Systematics of Plants*. New York: Chapman and Hall, 324–339.
- Coleman JS, McConnaughay KDM, Ackerly DD. 1994.** Interpreting phenotypic variation in plants. *Trends in Ecology & Evolution* **9**: 187–191.
- Conceição AS, Queiroz LP, Borba EL. 2008.** Natural hybrids in *Chamaecrista* sect. *Absus* subsect. *Baseophyllum* (Leguminosae-Caesalpinioideae): genetic and morphological evidence. *Plant Systematics and Evolution* **271**: 19–27.
- Cozzolino S, Nardella A, Impagliazzo S, Widmer A, Lexer C. 2006.** Hybridization and conservation of mediterranean orchids: Should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biological Conservation* **129**: 14–23.
- Dewoody J, Nason JD, Hipkins VD. 2006.** Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Molecular Ecology Notes* **6**: 951–957.



- Dias HCT, Filho EIF, Schaefer CEGR, Fontes LEF, Venterim LB. 2002.** Geoambientes do Parque Estadual do Ibitipoca, município de Lima Duarte-MG. *Revista Árvore* **26**: 777–786.
- Dieringer D, Schlotterer C. 2003.** Microsatellite Analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* **3**: 167–169.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11–15.
- Dressler RL. 1981.** *The orchids: natural history and classification*. Cambridge: Harvard University Press.
- Earl DA, vonHoldt BM. 2012.** Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**: 359–361.
- Ellis AG, Johnson SD. 1999.** Do pollinators determine hybridization patterns in sympatric *Satyrium* (Orchidaceae) species? *Plant Systematics and Evolution* **219**: 137–150.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005.** Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**: 2611–2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005.** Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47–50.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003.** Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567–1587.
- Felsenstein J. 1989.** PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164–166.
- Fowlie JA. 1972.** A contribution to a further clarification of the genus *Sophronitis* Lindl., including the elevation to full specific status two previously described varieties. *Orchid Digest* **36**: 181–194.
- Fowlie JA. 1987.** A contribution to a monographic revision of the genus *Sophronitis* Lindl. *Orchid Digest* **51**: 15–32.

- Ghichoux E, Lagache L, Wagner S, Chameil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F, Petit RJ. 2011.** Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* **11**: 591–611.
- Goudet J. 1995.** FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* **86**: 485–486.
- Guo SW, Thompson EA. 1992.** Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* **48**: 361–372.
- Gustafsson S. 2000.** Patterns of genetic variation in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. *Molecular Ecology* **9**: 1863–1872.
- Hamrick JL, Godt MJW. 1996.** Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* **351**: 1291–1298.
- Hamrick JL, Godt MJW, Murawski DA, Loveless MD. 1991.** Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. In: Falk DA, Holsinger KE, eds. *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press, 75–86.
- Hedrick PW. 1999.** Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* **53**: 313–318.
- Hedrén M. 1996.** Genetic differentiation, polyploidization and hybridization in northern European *Dactylorhiza* (Orchidaceae): evidence from allozyme markers. *Plant Systematics and Evolution* **201**: 31–55.
- De Hert K, Jacquemyn H, van Glabeke S, Roldán-Ruiz I, Vandepitte K, Leus L, Honnay O. 2011.** Patterns of hybridization between diploid and derived allotetraploid species of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) co-occurring in Belgium. *American Journal of Botany* **98**: 946–55.
- Ihaka R, Gentleman R. 1996.** R: A language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**: 299–314.
- Kallunki JA. 1976.** Population studies in *Goodyera* (Orchidaceae) with emphasis on the hybrid origin of *G. tessellata*. *Brittonia* **28**: 53–75.
- Mant J, Peakall R, Schiestl FP. 2005.** Does selection on floral odor promote differentiation among populations and species of the sexually deceptive orchid genus *Ophrys*? *Evolution* **59**: 1449–1463.
- Martins WS, Lucas DCS, Neves KFS, Bertioli DJ. 2009.** WebSat - A web software for microsatellite marker development. *Bioinformatics* **3**: 282–283.

- Martinsen GD, Whitham TG, Turek RJ, Keim P. 2001.** Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution* **55**: 1325–1335..
- Minder AM, Rothenbuehler C, Widmer A. 2007.** Genetic structure of hybrid zones between *Silene latifolia* and *Silene dioica* (Caryophyllaceae): evidence for introgressive hybridization. *Molecular Ecology* **16**: 2504–2516.
- Moccia MD, Widmer A, Cozzolino S. 2007.** The strength of reproductive isolation in two hybridizing food-deceptive orchid species. *Molecular Ecology* **16**: 2855–2866.
- Morales M, Ackerman JD, Tremblay RL. 2010.** Morphological flexibility across an environmental gradient in the epiphytic orchid, *Tolumnia variegata*: complicating patterns of fitness. *Botanical Journal of the Linnean Society* **163**: 431–446.
- Nazzaro R, Aceto S, Menale B, Cozzolino S. 1999.** Intermediate features do not always imply hybrid nature: an example from Orchidaceae. *Journal Europäischer Orchideen* **31**: 652–662.
- Nei M. 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583–590.
- Nei M. 1987.** *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Neto LM, Alves RJV, Barros F, Forzza RC. 2007.** Orchidaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **21**: 687–696.
- Nielsen LR. 2000.** Natural hybridization between *Vanilla claviculata* (W.Wright) Sw. and *V. barbellata* Rchb.f. (Orchidaceae): genetic, morphological, and pollination experimental data. *Botanical Journal of the Linnean Society* **133**: 285–302.
- Nilsson LA. 1983.** Processes of isolation and introgressive interplay between *Platanthera bifolia* (L.) Rich and *P. chlorantha* (Custer) Reichb. (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **87**: 325–350.
- Novello M, Rodrigues JF, Pinheiro F, Oliveira GCX, Veasey EA, Koehler S. 2013.** Development of nine SSR markers of *Cattleya coccinea* (Orchidaceae), an endangered species of the Brazilian Atlantic Forest. *Genetics and Molecular Research*, no prelo.
- Nybom H. 2004.** Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* **13**: 1143–1155.
- Pabst GFJ, Dungs F. 1975.** *Orchidaceae Brasilienses. V. 1*. Hildesheim: Brucke-Verlag Kurt Schmiersow.

- Pabst GFJ, Dungs F. 1977.** *Orchidaceae Brasilienses*. V. 2. Hildesheim: Brucke-Verlag Kurt Schmersow.
- Park SDE. 2001.** Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Tese, University of Dublin.
- Peakall R, Bower CC, Logan AE, Nicol HI, Logan AE, Nicol HI. 1997.** Confirmation of the hybrid origin of *Chiloglottis*  $\times$  *pescottiana* (Orchidaceae:Diurideae). 1. Genetic and morphometric evidence. *Australian Journal of Botany* **45**: 839–855.
- Peakall R, Smouse PE. 2006.** Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288–295.
- Pellegrino G, Noce ME, Bellusci F, Musacchio A. 2006.** Reproductive biology and conservation genetics of *Serapias vomeracea* (Orchidaceae). *Folia Geobotanica* **41**: 21–32.
- Phillips RD, Dixon KW, Peakall R. 2012.** Low population genetic differentiation in the Orchidaceae: implications for the diversification of the family. *Molecular Ecology* **21**: 5208–5220.
- Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Meyer D, Fay MF, Suzuki RM, Lexer C, Cozzolino S. 2010.** Hybridization and introgression across different ploidy levels in the neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* **19**: 3981–3994.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–959.
- Raymond M, Rousset F. 1995.** GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**: 248–249.
- Rieseberg LH. 1995.** The role of hibridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* **82**: 944–953.
- Rieseberg LH, Ellstrand NC. 1993.** What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Sciences* **12**: 213–241.
- Rodela LG. 1998.** Cerrados de altitude e campos rupestres do Parque Estadual do Ibitipoca, sudeste de Minas Gerais: distribuição e florística por subfisionomias da vegetação. *Revista do Departamento de Geografia* **12**: 163–189.
- Rodrigues JF. 2010.** Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae)

baseada em marcadores moleculares ISSR. Dissertação, Universidade de São Paulo.

- Rozen S, Skaletsky H. 2000.** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S, Krawetz S, eds. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa: Humana Press, 365–386.
- Sazima I, Buzato S, Sazima M. 1996.** An assemblage of hummingbird-pollinated flowers in a montane forest in southeastern Brazil. *Botanical Acta* **109**: 149–160.
- Schlichting CD. 1986.** The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **17**: 667–693.
- Schuelke M. 2000.** An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments: a poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. *Nature Biotechnology* **18**: 233–234.
- Silva JRS. 2008.** Variabilidade genética e morfométrica de *Sophranitis pfisteri* (Pabst & Senghas) Van den Berg & M.W.Chase (Orchidaceae). Dissertação, Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Singer RB, Sazima M. 2000.** The pollination of *Stenorrhynchos lanceolatus* (Aublet) L. C. Rich. (Orchidaceae: Spiranthinae) by hummingbirds in southeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **223**: 221–227.
- Soliva M, Widmer A. 2003.** Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive *Ophrys* (Orchidaceae) species. *Evolution* **57**: 2252–2261.
- Stahlberg D. 2009.** Habitat differentiation, hybridization and gene flow patterns in mixed populations of diploid and autotetraploid *Datylorhiza maculata* s.l. (Orchidaceae). *Evolutionary Ecology* **23**: 295–328.
- Stebbins GL. 1959.** The role of hibridization in evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society* **103**: 231–251.
- Sultan SE. 2000.** Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* **5**: 537–542.
- Sultan SE. 2003.** Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. *Evolution & Development* **5**: 25–33.
- Swarts ND, Sinclair EA, Krauss SL, Dixon KW. 2009.** Genetic diversity in fragmented populations of the critically endangered spider orchid *Caladenia huegelii*: implications for conservation. *Conservation Genetics* **10**: 1199–1208.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011.** MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary

- distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.
- Valladares F, Gianoli E, Gómez JM. 2007.** Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *The New Phytologist* **176**: 749–763.
- van den Berg C, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Soto Arenas MA, Culham A, Chase MW. 2000.** A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96–114.
- van den Berg C, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Soto-Arenas MA, Chase MW. 2009.** A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. *Annals of Botany* **104**: 417–430.
- van der Pijl L, Dodson CH. 1966.** *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Coral Gables: University of Miami Press.
- van Kleunen M, Fischer M. 2005.** Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist* **166**: 49–60.
- van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004.** MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**: 535–538.
- van Oosterhout C, Weetman D, Hutchinson WF. 2006.** Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Molecular Ecology Notes* **6**: 255–256.
- Vasconcelos MF. 2011.** O que são campos rupestres e campos de altitude nos topos de montanha do Leste do Brasil? *Revista Brasileira de Botânica* **34**: 241–246.
- Wallace LE. 2006.** Spatial genetic structure and frequency of interspecific hybridization in *Platanthera aquilonis* and *P. dilatata* (Orchidaceae) occurring in sympatry. *American Journal of Botany* **93**: 1001–1009.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984.** Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358–1370.
- Withner CL. 1990.** *The cattleyas and their relatives, Vol. 3. Schomburgkia, Sophronitis, and other South American genera*. Portland: Timber Press.
- Wright SD, McConnaughay KDM. 2002.** Interpreting phenotypic plasticity: the importance of ontogeny. *Plant Species Biology* **17**: 119–131.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Marcadores moleculares são considerados grandes aliados na investigação de vários processos evolutivos que atuam em nível populacional. Devido ao fato de serem co-dominantes e apresentarem altos níveis de polimorfismos, microssatélites são muito informativos, sendo, por isso, escolhidos como ferramenta para as investigações propostas neste trabalho. De um total de nove marcadores microssatélites desenvolvidos por Novello *et al.* (no prelo) para *Cattleya coccinea*, cinco foram selecionados por apresentarem sucesso na amplificação, polimorfismos em todas as populações estudadas e por permitirem acurácia na interpretação de picos na análise de fragmentos. Esse baixo número de marcadores disponíveis tornou necessário o esgotamento da busca por regiões microssatélites nas sequências obtidas a partir da biblioteca enriquecida anteriormente desenvolvida por Novello *et al.* (no prelo). Um total de nove novos pares de iniciadores foram, então, desenhados e testados, mas apenas dois desses puderam ser empregados com sucesso neste trabalho. Essas regiões adicionais ampliam o número de microssatélites isolados a partir dessa biblioteca, elevando as chances de transferibilidade de um número suficiente de regiões polimórficas para estudos com outras espécies do gênero. A transferência de iniciadores entre espécies congênicas de plantas tem sido realizada com boa margem de sucesso e pode poupar esforço, tempo e recursos que seriam requeridos para isolamento de microssatélites (Squirrell *et al.*, 2003; Barbará *et al.* 2007).

Em conjunto, os marcadores microssatélites empregados se mostraram bastante úteis para descrever a variabilidade e estrutura genética das populações de *C. coccinea* e *C. brevipedunculata* estudadas, bem como para investigar a possível hibridação e introgressão entre essas espécies. Com a utilização dessa ferramenta, foi possível testar e rejeitar a hipótese de hibridação entre os táxons, que foi levantada a partir de observações relacionadas à variação morfológica encontrada no Parque Estadual do Ibitipoca (PEI). Apesar de a hibridação natural ser comum na família e ter sido evidenciada recentemente entre espécies do gênero *Cattleya* (Silva, 2008; Rodrigues, dados não publicados), esse fenômeno não explica a ampla variação fenotípica observada na população do PEI, que está provavelmente sob influência ambiental.

Indivíduos podem alterar sua morfologia em função do ambiente, principalmente em situações em que a heterogeneidade ambiental é imprevisível (Alpert & Simms,

2002). Apenas recentemente, porém, a plasticidade foi amplamente reconhecida como um modo significativo de diversidade fenotípica e, conseqüentemente, como um importante aspecto de como organismos se desenvolvem e evoluem em seus ambientes (Sultan, 2000). Embora a plasticidade fenotípica possa, em muitos casos, explicar ou complementar as explicações a respeito da variação morfológica encontrada em orquídeas, esse processo tem sido pouco estudado na família e seus efeitos sobre a morfologia raramente testados (ver Morales *et al.*, 2010).

Apesar da plasticidade não ter sido testada neste trabalho, as diferenças encontradas entre indivíduos localizados na mata e em campo rupestre no PEI sugerem o efeito do sombreamento sobre a morfologia vegetativa de *C. brevipedunculata*. Essas diferenças foram significativas para o comprimento e largura da folha e comprimento do pseudobulbo, que são plausíveis de serem influenciados pela luz por estarem associados à captação desse recurso. Essas características supostamente plásticas são, entretanto, importantes para o reconhecimento de *C. brevipedunculata* e *C. coccinea*, devido à dificuldade de distingui-las somente a partir de caracteres florais. E isso pode ser considerado um fator de confusão para o reconhecimento da população estudada, que tem sido frequentemente identificada como *C. coccinea* (e.g., Neto *et al.*, 2007; Rodrigues, 2010). Apesar da escassez de características distintivas entre essas espécies, os resultados deste trabalho, obtidos a partir de uma amostragem limitada de populações, indicam a existência de duas linhagens distintas correspondentes às espécies. Estudos de filogeografia e genética de populações do complexo *C. coccinea*, incluindo uma amostragem ampla de populações e táxons, estão em andamento por Rodrigues *et al.* (dados não publicados) e deverão auxiliar a delimitação das espécies desse clado.

A heterogeneidade ambiental, principalmente em relação à incidência de luz, é notável no PEI. No entanto, variações da luminosidade a curtas distâncias e flutuações temporais dessa variação podem dificultar a detecção de relações de causalidade entre o fator luz e a morfologia dos indivíduos em ambiente natural. Por isso, sugere-se que a hipótese de plasticidade fenotípica possa ser mais bem investigada através de experimentos onde a variável preditora possa ser controlada e seus efeitos isolados dos demais. Ademais, estudos comparativos entre populações de *C. brevipedunculata* que diferem quanto à heterogeneidade ambiental a que estão submetidas podem ajudar a esclarecer a base funcional da plasticidade fenotípica nessa espécie.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- Aagaard SMD, Sástad SM, Greilhuber J, Moen A, Sastad SM, Greilhuber J, Moen A. 2005.** A secondary hybrid zone between diploid *Dactylorhiza incarnata* ssp. *cruenta* and allotetraploid *D. lapponica* (Orchidaceae). *Heredity* **94**: 488–496.
- Abbott RJ. 1992.** Plant invasions, interspecific hybridization and the evolution of new plant taxa. *Trends in Ecology & Evolution* **7**: 401–405.
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK. 2001.** The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 613–622.
- Alpert P, Simms EL. 2002.** The relative advantages of plasticity and fixity in different environments: when is it good for a plant to adjust? *Evolutionary Ecology* **16**: 285–297.
- Anderson E. 1948.** Hybridization of the habitat. *Evolution* **2**: 1–9.
- Anderson EC, Thompson EA. 2002.** A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* **160**: 1217–1229.
- Arnold ML. 1997.** *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford: Oxford University Press.
- Arnold ML, Bouck AC, Cornman RS. 2003.** Verne Grant and Louisiana Irises: is there anything new under the sun? *New Phytologist* **161**: 143–149.
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C. 2007.** Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* **16**: 3759–3767.
- Barton NH. 2001.** The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* **10**: 551–568.
- Barton NH, Hewitt GM. 1989.** Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature* **341**: 497–503.
- Bateman RM, Smith RJ, Fay MF. 2008.** Morphometric and population genetic analyses elucidate the origin, evolutionary significance and conservation implications of *Orchis* × *angusticuris* (*O. purpurea* × *O. simia*), a hybrid orchid new to Britain. *Botanical Journal of the Linnean Society* **157**: 687–711.
- Blackstock N, Ashton PA. 2010.** Genetic markers and morphometric analysis reveal past hybridization and introgression in putative *Carex flava* L. s.str. (Cyperaceae) hybrid populations. *Plant Systematics and Evolution* **287**: 37–47.

- Borba EL, Semir J. 1998.** *Bulbophyllum xcipoense*, a new natural hybrid from the Brazilian “campos rupestres”: description and biology. *Lindleyana* **13**: 113–120.
- Borba EL, Semir J, Shepherd GJ. 2001.** Self-incompatibility, inbreeding depression and crossing potential in five Brazilian *Pleurothallis* (Orchidaceae) species. *Annals of Botany* **88**: 89–99.
- Borba EL, Shepherd GJ, Semir J. 1999.** Reproductive systems and crossing potential in three species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) occurring in Brazilian “campo rupestre” vegetation. *Plant Systematics and Evolution* **217**: 205–214.
- Bradshaw Jr HD, Schemske DW. 2003.** Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflower. *Nature* **426**: 176–178.
- Burgarella C, Lorenzo Z, Jabbour-Zahab R, Lumaret R, Guichoux E, Petit RJ, Soto A, Gil L. 2009.** Detection of hybrids in nature : application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Heredity* **102**: 442–452.
- Cattell MV, Karl SA. 2004.** Genetics and morphology in a *Borrchia frutescens* and *B. arborescens* (Asteraceae) hybrid zone. *American Journal of Botany* **91**: 1757–1766.
- Chiron G, Castro V. 2002.** Révision des espèces brésiliennes du genre *Laelia* Lindley. *Richardiana* **2**: 4–28.
- Cortis P, Vereecken NJ, Schiestl FP, Barone Lumaga MR, Scrugli A, Cozzolino S. 2009.** Pollinator convergence and the nature of species’ boundaries in sympatric sardinian *Ophrys* (Orchidaceae). *Annals of Botany* **104**: 497–506.
- Cozzolino S, Nardella A, Impagliazzo S, Widmer A, Lexer C. 2006.** Hybridization and conservation of Mediterranean orchids: Should we protect the orchid hybrids or the orchid hybrid zones? *Biological Conservation* **129**: 14–23.
- Dobzhansky TH. 1940.** Speciation as a stage in evolutionary divergence. *The American Naturalist* **74**: 312–321.
- Dressler RL. 2005.** How many orchids species? *Selbyana* **26**: 155–158.
- Ellis AG, Johnson SD. 1999.** Do pollinators determine hybridization patterns in sympatric *Satyrium* (Orchidaceae) species? *Plant Systematics and Evolution* **219**: 137–150.
- Ellstrand NC, Schierenbeck KA. 2000.** Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 7043–7050.

- Fay MF, Chase MW. 2009.** Orchid biology: from Linnaeus via Darwin to the 21st century. *Annals of Botany* **104**: 359–364.
- Fowlie JA. 1972.** A contribution to a further clarification of the genus *Sophranitis* Lindl., including the elevation to full specific status two previously described varieties. *Orchid Digest* **36**: 181–194.
- Fowlie JA. 1987.** A contribution to a monographic revision of the genus *Sophranitis* Lindl. *Orchid Digest* **51**: 15–32.
- Funk VA. 1985.** Phylogenetic patterns and hybridization. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **72**: 681–715.
- Hails RS, Morley K. 2005.** Genes invading new populations: a risk assessment perspective. *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 245–252.
- Hegarty MJ, Hiscock SJ. 2005.** Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *The New Phytologist* **165**: 411–423.
- Hert K, Jacquemyn H, Glabeke S Van, Roldán-Ruiz I, Vandepitte K, Leus L, Honnay O. 2012.** Reproductive isolation and hybridization in sympatric populations of three *Dactylorhiza* species (Orchidaceae) with different ploidy levels. *Annals of Botany* **109**: 709–720.
- Kaplan Z, Marhold K. 2012.** Multivariate morphometric analysis of the *Potamogeton compressus* group (Potamogetonaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **170**: 112–130.
- Knyasev MS, Kulikov PV, Knyaseva OI, Semerikov VL. 2000.** Interspecific hybridization in northern Eurasian *Cypripedium*: morphometric and genetic evidence of the hybrid origin of *C. ventricosum*. *Lindleyana* **15**: 10–20.
- Lambert SM, Borba EL, Machado MC, Andrade SCS. 2006.** Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, north-eastern Brazil. *Annals of Botany* **97**: 389–403.
- Levin DA, Francisco-Ortega J, Jansen RK. 1996.** Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology* **10**: 10–16.
- Lexer C, Fay MF, Joseph JA, Nica M-S, Heinze B. 2005.** Barrier to gene flow between two ecologically divergent *Populus* species, *P. alba* (white poplar) and *P. tremula* (European aspen): the role of ecology and life history in gene introgression. *Molecular Ecology* **14**: 1045–1057.

- Marie AD, Bernatchez L, Garant D. 2011.** Empirical assessment of software efficiency and accuracy to detect introgression under variable stocking scenarios in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Conservation Genetics* **12**: 1215–1227.
- Martin NH, Bouck AC, Arnold ML. 2006.** Detecting adaptive trait introgression between *Iris fulva* and *I. brevicaulis* in highly selective field conditions. *Genetics* **172**: 2481–2489.
- Martinsen GD, Whitham TG, Turek RJ, Keim P. 2001.** Hybrid populations selectively filter gene introgression between species. *Evolution* **55**: 1325–1335.
- Mayr E. 1992.** A local flora and the biological species concept. *American Journal of Botany* **72**: 222–238.
- Minder AM, Rothenbuehler C, Widmer A. 2007.** Genetic structure of hybrid zones between *Silene latifolia* and *Silene dioica* (Caryophyllaceae): evidence for introgressive hybridization. *Molecular Ecology* **16**: 2504–2516.
- Moccia MD, Widmer A, Cozzolino S. 2007.** The strength of reproductive isolation in two hybridizing food-deceptive orchid species. *Molecular Ecology* **16**: 2855–2866.
- Morales M, Ackerman JD, Tremblay RL. 2010.** Morphological flexibility across an environmental gradient in the epiphytic orchid, *Tolumnia variegata*: complicating patterns of fitness. *Botanical Journal of the Linnean Society* **163**: 431–446.
- Neto LM, Alves RJV, Barros F, Forzza RC. 2007.** Orchidaceae do Parque Estadual de Ibitipoca, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* **21**: 687–696.
- Nielsen LR. 2000.** Natural hybridization between *Vanilla claviculata* (W.Wright) Sw. and *V. barbellata* Rchb.f. (Orchidaceae): genetic, morphological, and pollination experimental data. *Botanical Journal of the Linnean Society* **133**: 285–302.
- Novello M, Rodrigues JF, Pinheiro F, Oliveira GCX, Veasey EA, Koehler S. 2013.** Development of nine SSR markers of *Cattleya coccinea* (Orchidaceae), an endangered species of the Brazilian Atlantic Forest. *Genetics and Molecular Research*, no prelo.
- Pabst GFJ, Dungs F. 1975.** *Orchidaceae Brasilienses. V. 1.* Hildesheim: Brucke-Verlag Kurt Schmersow.
- Pabst GFJ, Dungs F. 1977.** *Orchidaceae Brasilienses. V. 2.* Hildesheim: Brucke-Verlag Kurt Schmersow.
- Peakall R. 2007.** Speciation in the Orchidaceae: confronting the challenges. *Molecular Ecology* **16**: 2834–2837.

- Peakall R, Bower CC, Logan AE, Nicol HI, Logan AE, Nicol HI. 1997.** Confirmation of the hybrid origin of *Chiloglottis*  $\times$  *pescottiana* (Orchidaceae: Diurideae). 1. Genetic and morphometric evidence. *Australian Journal of Botany* **45**: 839–855.
- Pellegrino G, Bellusci F, Musacchio A. 2009.** Genetic integrity of sympatric hybridising plant species: the case of *Orchis italica* and *O. anthropophora*. *Plant Biology* **11**: 434–441.
- Pinheiro F, Barros F. 2007.** Morphometric analysis of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae) in southeastern Brazil. *Nordic Journal of Botany* **25**: 129–136.
- Pinheiro F, Barros F. 2009.** Morphometric analysis of the *Brasiliorchis picta* complex (Orchidaceae). *Revista Brasileira de Botânica* **32**: 11–21.
- Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Meyer D, Fay MF, Suzuki RM, Lexer C, Cozzolino S. 2010.** Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* **19**: 3981–3994.
- Pridgeon AM, Phillip C, Chase MW. 2005.** *Genera Orchidacearum: Epidendroideae (Part one)*. New York: Oxford University Press.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–959.
- Reed DH, Frankham R. 2001.** How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* **55**: 1095–1103.
- Rhymer JM, Simberloff D. 1996.** Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**: 83–109.
- Ribeiro PL, Borba EL, Smidt EC, Lambert SM, Schnadelbach AS, van den Berg C. 2008.** Genetic and morphological variation in the *Bulbophyllum exaltatum* (Orchidaceae) complex occurring in the Brazilian “campos rupestres”: implications for taxonomy and biogeography. *Plant Systematics and Evolution* **270**: 109–137.
- Rieseberg LH, Carney S. 1998.** Plant hybridization. *New Phytologist* **140**: 599–624.
- Rieseberg LH. 1991.** Homoploid reticulate evolution in *Helianthus* (Asteraceae): evidence from ribosomal genes. *American Journal of Botany* **78**: 1218–1237.
- Rieseberg LH, Ellstrand NC. 1993.** What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Sciences* **12**: 213–241.

- Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, Lai Z, Livingstone K, Nakazato T, Durphy JL, Schwarzbach AE, Donovan LA, Lexer C. 2003.** Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* **301**: 1211–1216.
- Rieseberg LH, Wendel JF. 1993.** Introgression and its consequences in plants. In: Harrison R, ed. *Hybrid zones and the evolutionary process*. New York: Oxford University Press.
- Rodrigues JF. 2010.** Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR. Dissertação, Universidade de São Paulo.
- Romero MI, Real C. 2005.** A morphometric study of three closely related taxa in the European *Isoetes velata* complex. *Botanical Journal of the Linnean Society* **148**: 459–464.
- Sang T, Zhong Y. 2000.** Testing hybridization hypotheses based on incongruent gene trees. *Systematic Biology* **49**: 422–434.
- Schemske DW. 2000.** Understanding the origin of species. *Evolution* **54**: 1069–1073.
- Schierenbeck KA, Ellstrand NC. 2009.** Hybridization and the evolution of invasiveness in plants and other organisms. *Biological Invasions* **11**: 1093–1105.
- Schlötterer C. 2004.** The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* **5**: 63–69.
- Scopece G, Widmer A, Cozzolino S. 2008.** Evolution of postzygotic reproductive isolation in a guild of deceptive orchids. *The American Naturalist* **171**: 315–326.
- Selkoe KA, Toonen RJ. 2006.** Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**: 615–629.
- Silva JRS. 2008.** Variabilidade genética e morfométrica de *Sophronitis pfisteri* (Pabst & Senghas) Van den Berg & M.W.Chase (Orchidaceae). Dissertação, Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Silva-Pereira V, Smidt EC, Borba EL. 2007.** Isolation mechanisms between two sympatric *Sophronitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **269**: 171–182.
- Smidt EC, Silva-Pereira V, Borba EL. 2006.** Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. *Plant Species Biology* **21**: 85–91.

- Soliva M, Widmer A. 2003.** Gene flow across species boundaries in sympatric, sexually deceptive *Ophrys* (Orchidaceae) species. *Evolution* **57**: 2252–2261.
- Soltis DE, Soltis PS. 1999.** Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution* **14**: 348–352.
- Squirrell J, Hollingsworth PM, Woodhead M, Russell J, Lowe AJ, Gibby M, Powell W. 2003.** How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology* **12**: 1339–1348.
- Ståhlberg D. 2009.** Habitat differentiation, hybridization and gene flow patterns in mixed populations of diploid and autotetraploid *Dactylorhiza maculata* s.l. (Orchidaceae). *Evolutionary Ecology* **23**: 295–328.
- Stebbins GJ. 1959.** The role of hybridization in evolution. *Proceedings of the American Philosophical Society* **103**: 231–251.
- Steiner KE, Whitehead VB, Johnson SD. 1994.** Floral and pollinator divergence in two sexually deceptive south african orchids. *American Journal of Botany* **81**: 185–194.
- Stuessy TF. 2009.** *Plant taxonomy: the systematic evaluation of comparative data*. New York: Columbia University Press.
- Sultan SE. 2000.** Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* **5**: 537–542.
- Tremblay RL, Ackerman JD, Zimmerman JK, Calvo RN. 2005.** Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* **84**: 1–54.
- Vähä J-P, Primmer CR. 2006.** Efficiency of model-based bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Molecular Ecology* **15**: 63–72.
- van den Berg C. 2008.** New combinations in the genus *Cattleya* Lindl. (Orchidaceae). *Neodiversity* **3**: 3–12.
- van den Berg C, Chase MW. 2000.** Nomenclatural notes on Laeliinae — I. *Lindleyana* **15**: 115–119.
- van den Berg C, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Soto Arenas MA, Culham A, Chase MW. 2000.** A phylogenetic analysis of Laeliinae (Orchidaceae) based on sequence data from internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Lindleyana* **15**: 96–114.

- van den Berg C, Higgins WE, Dressler RL, Whitten WM, Soto-Arenas MA, Chase MW. 2009.** A phylogenetic study of Laeliinae (Orchidaceae) based on combined nuclear and plastid DNA sequences. *Annals of Botany* **104**: 417–430.
- van der Pijl L, Dodson CH. 1966.** *Orchid flowers: their pollination and evolution*. Coral Gables: University of Miami Press.
- Warghat AR, Bajpai PK, Sood H, Chaurasia OP, Ravi B. 2012.** Morphometric analysis of *Dactylorhiza hatagirea* (D. Don), a critically endangered orchid in cold desert Ladakh region of India. *African Journal of Biotechnology* **11**: 11943–11951.
- Withner CL. 1990.** *The cattleyas and their relatives, Vol. 3. Schomburgkia, Sophronitis, and other South American genera*. Portland: Timber Press.
- Wolf DE, Takebayashi N, Rieseberg LH. 2001.** Predicting the risk of extinction through hybridization. *Conservation Biology* **15**: 1039–1053.



Apêndice 1. Frequências alélicas de sete *locus* microssatélites em populações de *C. coccinea* (Ccj e Cpe), *C. brevipedunculata* (Bob e Bsc) e na suposta zona híbrida do Parque Estadual do Ibitipoca, subdividida conforme a classificação morfológica (Cib, Hib e Bib). Para códigos das populações, ver tabela 1. *N*=número de indivíduos amostrados por *locus*.

<i>Locus</i>	Alelo	<i>C. coccinea</i>		Suposta zona híbrida			<i>C. brevipedunculata</i>	
		Ccj	Cpe	Cib	Hib	Bib	Bob	Bsc
	<i>N</i>	29	29	46	87	47	33	26
Cac01	111	-	0,362	-	-	-	-	0,019
	113	0,190	0,172	0,185	0,149	0,170	0,212	0,058
	115	-	0,052	0,207	0,207	0,170	0,167	-
	117	0,224	0,017	0,293	0,236	0,255	0,167	-
	119	0,034	0,345	0,130	0,115	0,064	0,045	0,019
	121	0,121	0,052	-	0,011	-	-	0,135
	123	0,086	-	-	-	-	0,167	0,577
	125	0,224	-	-	-	-	0,015	-
	127	-	-	0,011	0,023	0,043	0,015	0,038
	129	-	-	0,033	0,052	0,053	0,076	0,038
	131	0,017	-	0,043	0,103	0,096	0,015	0,038
	133	-	-	0,054	0,063	0,128	-	-
	135	-	-	0,011	0,011	0,021	-	-
	137	0,017	-	0,033	0,029	-	0,015	-
	139	0,017	-	-	-	-	0,076	0,038
	141	-	-	-	-	-	0,015	0,019
	143	0,034	-	-	-	-	0,015	0,019
145	0,034	-	-	-	-	-	-	
	<i>N</i>	29	29	46	86	47	33	26
Cac02	169	-	-	0,065	0,029	0,032	-	-
	171	0,086	0,034	-	0,006	-	0,030	-
	173	-	0,034	-	0,006	-	0,030	-
	175	-	0,052	-	0,041	0,021	0,015	0,115
	177	0,224	0,069	0,033	0,052	0,043	0,076	-
	179	0,190	0,017	0,022	0,058	0,032	0,121	-
	181	0,069	0,155	0,076	0,058	0,074	0,106	0,096
	183	-	0,172	0,163	0,180	0,128	0,061	0,038
	185	0,052	0,052	0,076	0,093	0,117	0,136	0,327
	187	0,121	0,172	0,359	0,291	0,319	0,197	0,327
	189	0,052	0,103	-	0,017	-	0,182	0,058
	191	0,190	0,121	0,109	0,076	0,096	0,015	0,019
	193	0,017	0,017	0,054	0,035	0,074	-	-
	197	-	-	0,033	0,035	0,032	0,030	0,019
	199	-	-	0,011	0,006	-	-	-

	201	-	-	-	0,017	0,032	-	-
	<i>N</i>	30	29	46	87	47	33	26
	175	0,150	-	-	0,023	0,011	-	-
	177	0,450	-	-	0,006	-	0,045	0,019
	179	0,250	0,017	0,109	0,040	0,138	0,030	-
	181	0,050	0,034	-	-	-	0,030	-
	183	-	0,121	-	-	-	-	-
	185	0,017	0,138	-	-	-	0,045	-
	187	-	0,207	-	0,006	-	0,015	-
	189	0,033	0,155	0,272	0,259	0,170	0,212	0,404
	191	-	0,121	0,054	0,069	0,085	-	0,096
	193	-	0,138	0,076	0,080	0,128	0,045	0,038
Cac11	195	-	-	0,054	0,109	0,043	0,091	0,077
	197	-	-	0,141	0,132	0,106	0,061	0,077
	199	0,017	-	0,011	0,006	0,011	0,061	0,019
	201	0,017	0,017	0,076	0,046	0,085	0,076	0,077
	203	-	-	0,043	0,052	0,128	0,152	0,058
	205	-	0,034	0,022	0,006	0,011	0,061	0,115
	207	-	0,017	0,098	0,121	0,053	0,030	-
	209	0,017	-	-	-	-	-	-
	211	-	-	0,011	0,040	0,011	-	-
	213	-	-	-	-	-	-	0,019
	215	-	-	0,022	0,006	0,021	-	-
	217	-	-	0,011	-	-	0,045	-
	<i>N</i>	30	29	44	86	47	33	25
	207	0,033	-	-	-	-	-	-
	211	0,167	-	-	-	-	-	-
	213	0,383	-	-	-	-	-	-
	215	0,017	0,034	-	-	-	-	-
	231	-	0,034	0,250	0,256	0,383	0,409	0,200
	235	0,283	0,069	0,739	0,727	0,596	0,591	0,480
	237	0,083	-	0,011	0,006	0,021	-	0,320
	239	0,033	-	-	-	-	-	-
	243	-	0,034	-	-	-	-	-
Cac16	245	-	0,034	-	0,012	-	-	-
	247	-	0,017	-	-	-	-	-
	249	-	0,017	-	-	-	-	-
	253	-	0,086	-	-	-	-	-
	255	-	0,103	-	-	-	-	-
	257	-	0,224	-	-	-	-	-
	259	-	0,103	-	-	-	-	-
	261	-	0,017	-	-	-	-	-
	263	-	0,034	-	-	-	-	-
	265	-	0,034	-	-	-	-	-
	267	-	0,052	-	-	-	-	-
	269	-	0,034	-	-	-	-	-

273	-	0,017	-	-	-	-	-
275	-	0,034	-	-	-	-	-
277	-	0,017	-	-	-	-	-
<i>N</i>	22	23	45	84	47	30	24
183	-	-	-	-	-	0,167	-
185	0,045	0,130	0,156	0,244	0,128	0,033	0,042
187	-	-	0,033	0,024	0,011	-	-
189	-	-	-	0,006	-	-	-
193	-	-	-	-	-	0,017	-
195	-	-	0,022	-	0,053	-	0,021
197	-	-	0,011	0,012	-	0,017	0,167
199	-	-	-	0,006	0,011	0,183	0,042
201	0,023	-	0,044	0,036	0,106	0,133	0,167
203	-	-	-	-	-	0,133	-
205	-	-	0,122	0,083	0,106	0,017	0,021
207	-	-	0,056	0,137	0,160	-	0,021
209	-	-	0,078	0,036	-	0,117	0,188
211	-	-	-	0,012	0,011	0,017	0,146
213	-	-	0,044	0,048	0,053	0,033	0,063
215	-	-	0,133	0,107	0,106	0,017	0,063
217	-	-	-	0,030	0,011	0,033	0,063
219	-	0,022	0,122	0,095	0,074	-	-
221	-	-	0,133	0,065	0,138	0,017	-
223	-	-	0,044	0,054	0,011	-	-
225	0,023	-	-	0,006	0,021	0,017	-
227	-	-	-	-	-	0,017	-
229	-	-	-	-	-	0,033	-
231	0,023	-	-	-	-	-	-
233	0,091	-	-	-	-	-	-
235	0,114	0,043	-	-	-	-	-
237	0,023	0,043	-	-	-	-	-
239	0,068	0,022	-	-	-	-	-
241	0,068	-	-	-	-	-	-
243	0,045	-	-	-	-	-	-
245	0,091	-	-	-	-	-	-
247	0,091	0,152	-	-	-	-	-
249	0,023	0,217	-	-	-	-	-
251	-	0,087	-	-	-	-	-
253	-	0,065	-	-	-	-	-
255	-	0,065	-	-	-	-	-
257	-	0,087	-	-	-	-	-
259	0,023	0,043	-	-	-	-	-
263	0,023	-	-	-	-	-	-
265	-	0,022	-	-	-	-	-
267	0,023	-	-	-	-	-	-

Cac18

	269	0,159	-	-	-	-	-	-	
	277	0,045	-	-	-	-	-	-	
	<i>N</i>	24	29	46	85	47	33	26	
Cac26	178	-	-	0,098	0,059	0,011	-	-	
	180	0,021	0,121	0,533	0,582	0,660	0,682	0,865	
	182	0,104	0,707	0,120	0,171	0,138	0,212	0,038	
	184	-	0,103	0,054	0,029	0,011	0,030	-	
	188	-	-	0,011	-	0,021	-	-	
	192	0,208	-	-	-	-	-	-	
	194	0,271	0,017	0,185	0,153	0,149	0,015	0,019	
	196	0,125	-	-	0,006	-	0,061	0,019	
	198	0,167	0,052	-	-	-	-	0,019	
	200	0,063	-	-	-	0,011	-	-	
	202	0,042	-	-	-	-	-	-	
	204	-	-	-	-	-	-	0,038	
		<i>N</i>	29	26	44	82	43	31	26
	Cac27	197	0,328	0,038	-	-	-	-	-
199		-	-	0,011	-	-	-	-	
201		-	-	-	-	-	-	0,038	
203		0,017	-	-	-	-	-	-	
205		0,310	0,038	-	-	-	0,016	-	
207		0,034	-	-	-	-	0,048	0,212	
209		0,017	0,038	-	-	-	-	-	
211		0,121	0,077	0,227	0,250	0,256	0,032	0,212	
213		-	0,019	0,227	0,287	0,221	0,161	0,154	
215		0,017	0,019	0,216	0,232	0,163	0,161	0,096	
217		0,052	0,019	-	0,006	-	0,032	0,077	
219		0,069	0,096	-	-	-	0,016	0,019	
221		-	0,115	-	-	-	0,032	-	
223		0,017	0,115	-	-	-	-	-	
225		0,017	0,077	-	-	-	-	-	
227		-	0,019	0,080	0,073	0,070	0,323	0,038	
229		-	0,231	-	0,006	-	0,032	-	
231		-	0,038	-	-	-	0,032	0,077	
233		-	0,019	0,239	0,146	0,291	0,113	0,077	
235	-	0,019	-	-	-	-	-		
237	-	0,019	-	-	-	-	-		

\* Cib = morfo *C. coccinea* e supostos introgressantes, Hib = possíveis híbridos (Hib),  
Bib = morfo *C. brevipedunculata* e supostos introgressantes