

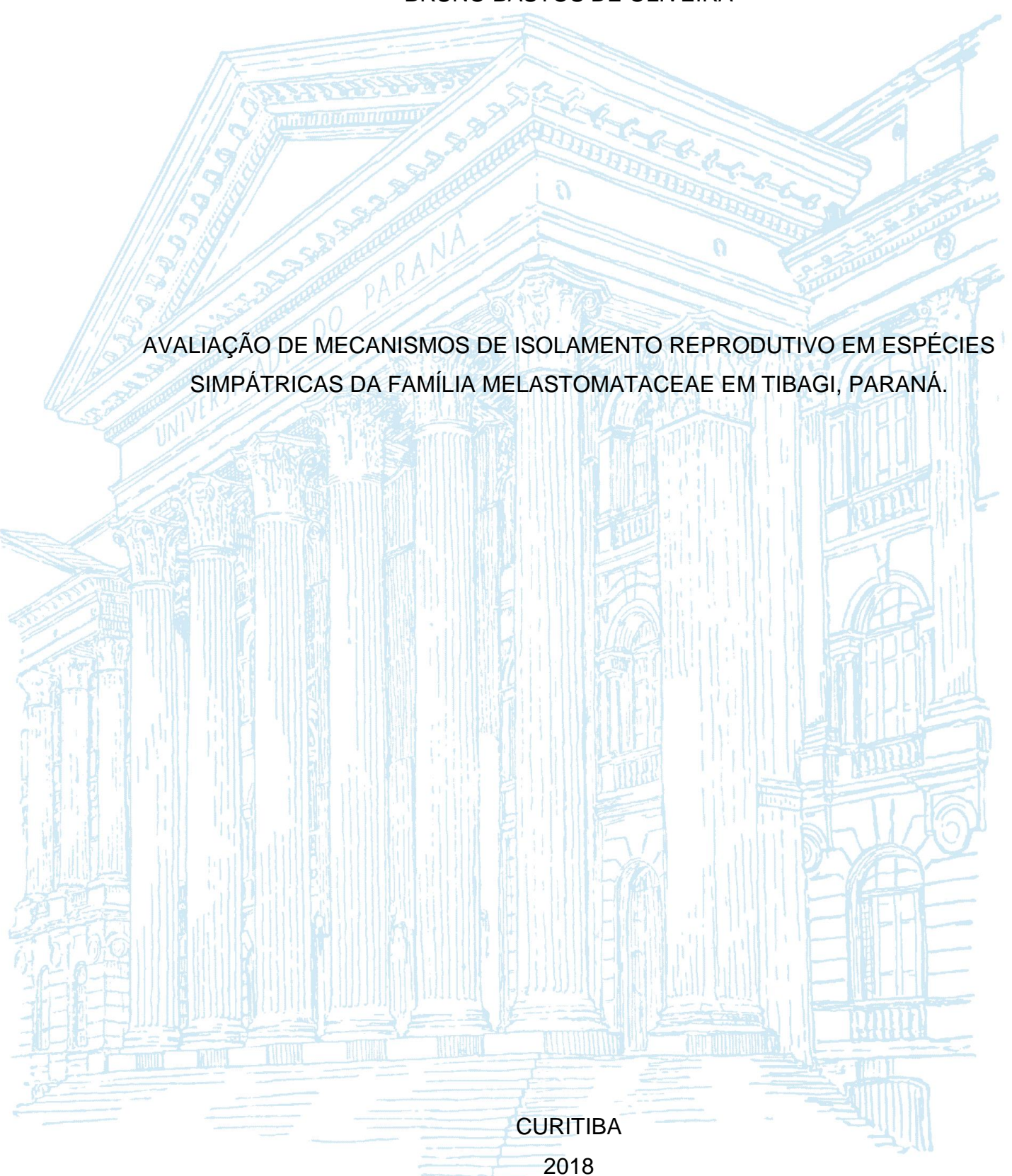
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO BASTOS DE OLIVEIRA

AValiação de Mecanismos de Isolamento Reprodutivo em Espécies
Simpátricas da Família Melastomataceae em Tibagi, Paraná.

CURITIBA

2018



BRUNO BASTOS DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE ISOLAMENTO REPRODUTIVO EM ESPÉCIES
SIMPÁTRICAS DA FAMÍLIA MELASTOMATACEAE EM TIBAGI, PARANÁ**

Monografia apresentada como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Renato
Goldenberg

Coorientador: Prof. Dr. Fabiano
Rodrigo Maia

CURITIBA

2018

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Nadia Terezinha Bastos, por todo apoio, por todo amor que recebo, pelos valores que conduzem minhas escolhas e por toda ajuda durante o período da graduação. Minha eterna gratidão a você.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Goldenberg, pela confiança depositada em mim, pelas correções no trabalho, pelas excelentes aulas durante a graduação, aprendi muito sobre Botânica e com certeza a minha curiosidade e vontade de saber mais nessa área é devido a você. Para mim um exemplo profissional.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Fabiano Rodrigo da Maia, por ter acreditado em mim, a partir de um simples convite para ajudar em uma saída de campo! A partir desse dia, minha vida tomou um rumo dentro da universidade, e percebi que trabalhar com o que se gosta realmente é muito gratificante! Agradeço imensamente pela orientação, paciência infinita e disposição em ensinar, discutir e ajudar.

À Prof. Dra. Isabela Galarda Varassin que gentilmente aceitou convite para participar da banca e avaliar meu trabalho, agradeço pelas correções e sugestões imprescindíveis.

Aos amigos e amigas, Daniela Imig, Jessica de Jesus, Luan Passos, Miguel Machnicki e Yuri Rodrigues, pela amizade, pela ajuda em campo, por me acompanharem nessa fase da graduação, enfim, estar com vocês é muito gratificante.

A todo o pessoal do Programa de Pós-graduação da Botânica da UFPR que pude trocar ideias e também às meninas do Laboratório de Ecologia Vegetal, que me receberam super bem.

Aos professores André Padial, Edson Tanhoffer, Emidyo Monteiro Filho, Erika Amano, José Milto Andriguetto, Marco Randi, Mauricio Moura, Paulo Labiak, por me motivarem a fazer ciência e pelo exemplo do que é ser professor. Sem dúvidas minha graduação valeu a pena por ter a oportunidade de ter tido aula com vocês.

Ao Instituto Ambiental do Paraná (IAP) pela licença de pesquisa e coleta, além da disponibilização da infraestrutura no Parque Estadual do Guartelá. E aos funcionários que pude conhecer no período que estive no local.

RESUMO

O isolamento reprodutivo mantém a integridade entre as espécies e desempenham um papel fundamental no processo de especiação, através de barreiras que podem surgir em diferentes etapas da reprodução. Neste estudo, foram avaliados mecanismos de isolamento reprodutivo entre duas espécies de Melastomataceae, *Tibouchina hatschbachii*, *Pleroma quartelaensis* e mais alguns indivíduos com morfologia intermediária entre elas, aqui tratados como *Pleroma* sp, que ocorrem simpatricamente no Parque Estadual do Guartelá (PEG). Foram realizados cruzamentos recíprocos com análises posteriores dos frutos e sementes, com o objetivo de quantificar a compatibilidade e o isolamento reprodutivo. A partir dos tratamentos de polinização cruzada bidirecional, houve a formação de frutos e sementes viáveis entre os três grupos estudados. A viabilidade dos frutos calculados mostrou que houve maior formação de frutos entre *T. hatschbachii* e *P. quartelaensis*. Quando *P. quartelaensis* doa pólen para *T. hatschbachii*, foram formados 42% de frutos, e quando *T. hatschbachii* atua doando pólen, foram formados 39% de frutos. Os cruzamentos interespecíficos envolvendo os indivíduos de *Pleroma* sp formaram menos frutos, tanto doando quanto recebendo pólen, com valores variando de 12% a 29%. A viabilidade das sementes calculadas foi maior quando o pólen de *P. quartelaensis* foi utilizado nas flores de *T. hatschbachii* e *Pleroma* sp, 16% e 14%, respectivamente. Já quando *P. quartelaensis* recebe pólen, verificou-se a menor proporção de sementes viáveis, 5% e 4%, respectivamente. O índice de isolamento reprodutivo combinado nos indica um forte isolamento reprodutivo entre as espécies. Os valores variaram de 0.93 a 0.99, muito próximos ao isolamento total (valor igual a 1), ou seja, a chance de se formar indivíduos férteis a partir dos cruzamentos recíprocos entre as espécies é muito baixa. Mesmo com o elevado isolamento detectado, ainda sim se formaram frutos e sementes viáveis em baixas proporções. Com isso, indicamos a possibilidade de produção de híbridos entre estas espécies. Reconhecemos ainda que possíveis barreiras pré- e pós-zigóticas que atuam em fases posteriores à formação de frutos e sementes devem ser avaliadas com outros estudos para melhor se compreender o estabelecimento e o sucesso reprodutivo dessas espécies no PEG.

Palavras-chave: hibridação; isolamento reprodutivo; *Pleroma*; polinização

ABSTRACT

Reproductive isolation maintains integrity among species and plays a key role in the process of speciation, and it acts through barriers that may arise at different stages of reproduction. In this study, reproductive isolation mechanisms were investigated between two species of Melastomataceae, *Tibouchina hatschbachii*, *Pleroma quartelaensis* and a few other individuals with intermediate morphology between them, here treated as *Pleroma* sp, all of them occurring sympatrically in the “Parque Estadual do Guartelá” (PEG). Reciprocal crosses were carried out with subsequent analyzes of fruits and seeds, in order to quantify compatibility and reproductive isolation. Viable fruits and seeds were formed among the three groups studied in the bi-directional cross-pollination treatments. Fruit formation was higher between *T. hatschbachii* and *P. quartelaensis*. When *P. quartelaensis* donates pollen to *T. hatschbachii*, it produced fruits in 42% of the flowers, and when *T. hatschbachii* acts donating pollen it produced 39%. Interspecific crosses involving individuals of *Pleroma* sp formed less fruits, both donating and receiving pollen, with values varying from 12% to 29%. The viability of the seeds was higher when *P. quartelaensis* pollen was used in flowers of *T. hatschbachii* and *Pleroma* sp, 16% and 14%, respectively. The lowest proportion of viable seeds occurred when *P. quartelaensis* receives pollen, 5% and 4%, respectively. The combined reproductive isolation index indicates a strong reproductive isolation between the species. Values ranged from 0.93 to 0.99, which are very close to total isolation (value equalling 1), that is, the chance of forming fertile individuals from the reciprocal crosses between species is very low. Even with the high isolation that was detected here, viable fruits and seeds were still formed in low proportions. With this, we indicate the possibility of production of hybrids among these species. We also recognize that pre-and post-zygotic barriers that may act in the later stages of fruit and seed formation should be evaluated with other studies, in order to better understand the establishment and reproductive success of these species in PEG.

Keywords: hybridization; reproductive isolation; *Pleroma*; pollination

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1. Área de estudo	9
2.2. Espécies estudadas	10
2.3. Cruzamentos recíprocos	13
2.3.1. Estudos das sementes	13
2.3.2. Cálculos dos índices de isolamento	15
3. RESULTADOS	16
3.1. Análise dos frutos e sementes	16
4. DISCUSSÃO	19
4.1. Isolamento reprodutivo entre populações simpátricas no PEG	19
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
6. REFERÊNCIAS.....	22

1. INTRODUÇÃO

A especiação pode ser descrita como sendo um processo evolutivo no qual se tem o surgimento de uma nova espécie. Teoricamente, se reconhece que uma nova espécie que venha a surgir se originou primeiramente de espécies já existentes. A especiação é um processo bastante complexo e provavelmente não depende de um único evento pontual, que determine sozinho o isolamento reprodutivo entre dois grupos que eram, até então, compatíveis para a reprodução (Coyne & Orr, 2004; Gouveia, 2015).

O isolamento reprodutivo pode facilitar o acúmulo de diferenças genéticas entre grupos de populações, aumentando assim os limites entre elas. O entendimento deste processo engloba o reconhecimento de barreiras reprodutivas que reduzem a migração de genes entre as populações, além das forças evolutivas responsáveis por isso (Rieseberg & Willis, 2007).

Os mecanismos que levam à especiação são comumente classificados como mecanismos de isolamento pré e pós-zigóticos (Gouveia & Pinheiro, 2015). Os mecanismos pré-zigóticos, no caso das plantas, impedem o cruzamento e a fecundação entre indivíduos de populações distintas, podendo incluir: barreiras espaciais (geográficas), temporais (diferentes épocas de floração), sistemas genéticos de incompatibilidade (pólen incompatível para a germinação no estigma), e competição gamética e modificações na estrutura floral que alteram o comportamento do polinizador (Rieseberg, 2007; Gouveia & Pinheiro, 2015). Os mecanismos pós-zigóticos são aqueles que envolvem, por exemplo, formação de frutos inviáveis e inviabilidade das sementes, além da diminuição do sucesso e a viabilidade do híbrido formado, que por sua vez podem incluir inviabilidade, esterilidade e degeneração do híbrido (Lexer et al., 2005; Johnson, 2010; Greiner et al., 2011).

Pode ser considerado como barreira reprodutiva qualquer fator que propicie a incompatibilidade entre os grupos de indivíduos que estão em contato (Scopece et al., 2010). Espécies que são filogeneticamente próximas e ocorrem em simpatria comumente podem trocar genes entre indivíduos via deposição interespecífica de pólen. Isso pode ocorrer quando não existem barreiras para a manutenção do isolamento reprodutivo, ou quando estas são

fracas, possibilitando a formação de zonas híbridas, introgressão, ou mesmo especiação por hibridação (Costa, 2007; Pinheiro et al., 2010).

A ampla variação morfológica que muitos grupos de espécies apresentam pode ter sido causada por processos de hibridação, sendo que indivíduos com morfologia intermediária são comumente observados em populações simpátricas e acabam compartilhando o mesmo habitat e os mesmos polinizadores (Gomes et al., 2008; Pansarin & Amaral, 2008; Pinheiro et al., 2010). Nesses sistemas naturais, os processos fundamentais como isolamento reprodutivo e manutenção ou ruptura de barreiras entre espécies podem ser avaliados, permitindo formular hipóteses sobre os prováveis mecanismos reprodutivos que atuam na divergência de populações (Leal, 2013).

A Família Melastomataceae constitui uma das mais importantes famílias da flora tropical, incluindo de 4500 a 5000 espécies classificadas em 185 gêneros e 11 tribos. A família é distribuída em ecossistemas tropicais e subtropicais das Américas, onde se estima conterem cerca de 3000 espécies (Renner 1993). No Brasil é a sexta maior família entre as angiospermas, com 1.326 espécies (Goldenberg et al., 2012). Esta é uma das famílias mais ricas dos Campos Rupestres e Cerrado, e cujas espécies são encontrados em todos os estados e em todos os domínios fitogeográficos, exceto na Caatinga e Pampas.

As espécies de Melastomataceae são reconhecidas por apresentar filotaxia oposta, folhas inteiras, sem estípula com nervação acródoma (curvinérvea), flores bissexuais, radialmente simétricas e com estames diplostêmones, livres, frequentemente possuindo conectivos ampliados ou anexos com as anteras de deiscência geralmente poricida, frutos do tipo baga ou cápsula (Clausing & Renner, 2001). Alguns gêneros ainda apresentam dimorfismo dos estames relacionados à cor e suas formas, e isso influencia sua a polinização como demonstrado para algumas espécies de Melastomataceae em (Luo, Zhang & Renner, 2008, Luo, Gu e Zhang, 2009; Velloso et al., 2018).

Dentro do gênero *Tibouchina* é possível encontrar espécies que vão desde o porte arbóreo ou arbustivo, até subarbustivo a herbáceo. Com cerca de 240 a 350 espécies, grande parte delas concentrada no Brasil, seus

representantes podem ser encontrados em várias formações vegetacionais brasileiras, desde restingas, floresta ombrófila densa, floresta ombrófila mista, matas ciliares, cerrados até campos de altitude (Wurdack, 1962; Meyer et al. 2010).

Um estudo filogenético mais recente realizado por Michengeli et al. (2013) demonstrou que *Tibouchina* é polifilética e que deve ser dividida em outros gêneros menores. Parte das espécies descritas como *Tibouchina* devem ser transferidas futuramente para *Pleroma* (ver Meyer & Goldenberg, 2014). O gênero *Pleroma* D. Don teria, então, cerca de 160-180 espécies, principalmente nas regiões central e leste do Brasil, na Mata Atlântica e no Cerrado (Meyer & Goldenberg, 2014; Oliveira et al., 2014; Michelangeli et al., 2013). Este gênero seria reconhecido pelas sépalas caducifólias, estames com conectivos geralmente prolongados, glandulares ou glabros e frutos capsulares com sementes cocleadas (Michelangeli et al., 2013; Oliveira et al., 2014).

A região subtropical brasileira é composta por uma variedade de formações vegetacionais (Labiak, 2014). Às vezes, essa variação é grande mesmo a curtas distâncias, tais como áreas campestres entremeadas em meio a áreas florestais, um padrão bastante comum na região (Labiak, 2014). A dinâmica climática responsável pela formação desses ambientes revela o contato entre espécies de diferentes formações. Durante períodos glaciais, espécies de ambientes secos podem ter expandido sua distribuição e ter entrado em contato com populações de outras espécies, facilitando a ocorrência simpátrica entre espécies e podendo desencadear evento de introgressão gênica (Maia et al., 2017; Gouveia, 2015; Palma-Silva et al., 2011; Pinheiro et al., 2013). Portanto, muitas espécies próximas filogeneticamente e que ocorrem de forma simpátrica podem ser modelos interessantes para avaliarmos a existência de barreiras reprodutivas que promovam eventualmente o isolamento reprodutivo entre elas.

Na porção norte da região subtropical, é possível observar muitas espécies filogeneticamente próximas ocorrendo em simpatria, apresentando espécimes com formas intermediárias entre dois táxons. Um exemplo disso seria o *continuum* morfológico visto em campo entre *Pleroma quartelaensis* e *Tibouchina hatschbachii* e alguns indivíduos com formas intermediárias,

tratados aqui neste estudo como *Pleroma* sp. A presença desses indivíduos na região nos leva a considerar a presença de possíveis híbridos. Contudo, isso ainda será testado experimentalmente em campo.

Neste trabalho avaliamos mecanismos de isolamento reprodutivo entre as espécies mencionadas acima por meio de cruzamentos recíprocos entre populações que ocorrem de forma simpátrica no Parque Estadual do Guartelá. Para isso realizamos experimentos de polinização cruzada (bidirecional) entre as duas espécies (*T. hatschbachii*, *Pleroma guartelaensis*) e um conjunto de indivíduos com morfologia intermediária entre elas (*Pleroma* sp). Além disso, registramos o sucesso reprodutivo por polinização aberta e autopolinização espontânea para as três espécies. Posteriormente analisamos a formação de frutos e sementes com o objetivo de quantificar a compatibilidade e o isolamento reprodutivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Área de estudo

O Parque Estadual do Guartelá (PEG) está localizado no município de Tibagi, no Segundo Planalto do Estado do Paraná. O PEG é uma das importantes Unidades de Conservação da região dos Campos Gerais, estando inserido na Área de Preservação Ambiental (APA) da Escarpa Devoniana (Figura 1).

O clima da região, segundo a classificação de Koeppen, é do tipo Cfa (subtropical úmido quente), com influência indireta do clima Cfb (temperado sempre úmido). O PEG é caracterizado por um mosaico de diferentes tipos vegetacionais que são classificados como estepe gramíneo-lenhosa, savana arborizada e floresta ombrófila mista (CARMO et al., 2006). A fisionomia predominante é constituída de Campos Rupestres (CARMO et al., 2006), porém há ocorrência de uma área muito restrita de Cerrado (savana arborizada) (CARMO, 2012). Esta cobertura campestre predominante está associada a florestas (floresta ombrófila mista) que ocupam posições distintas, localizando-se geralmente nas encostas, nos vales, acompanhando o rio Iapó

ou em formações denominadas capões.

Propriedades rurais com áreas de pastagens, antigo florestamento com *Pinus* sp. e presença de construções em meio a aberturas da floresta são alguns tipos de ambientes de ação antrópica encontrados dentro da área do PEG. Nesses locais ocorrem tanto espécies nativas, quanto espécies introduzidas ou invasoras (CARMO et al., 2006).



Figura 1. Área de estudo: localização do Parque Estadual do Guartelá em Tibagi, no Paraná, Brasil. (Fonte: adaptado *Google Earth*. Maia, 2013).

2.2. Espécies estudadas

Tibouchina hatschbachii é um arbusto endêmico de regiões campestres na porção norte da região subtropical da América do Sul (Meyer et al. 2009). Suas populações ocorrem separadas e restritas em manchas bem delimitadas em afloramentos rochosos de granito e arenito, na Mata Atlântica e no sul do Cerrado (Figura 2), respectivamente (Wurdack, 1963, 1984; Meyer et al., 2009;

Maia, 2017). Possui flores roxas, hermafroditas, autocompatíveis, e o único recurso que as flores oferecem aos polinizadores é o pólen (Maia et al., 2016). A polinização é realizada por grandes abelhas corbiculadas que retiram o pólen das anteras poricidas somente por vibração (“buzz pollination”, Buchmann, 1983). Seus frutos são capsulares e as suas sementes muito pequenas, autocóricas (Maia et al., 2016). O período reprodutivo de *T. hatschbachii* ocorre entre os meses de janeiro a março (Maia, 2017).

Pleroma quartelaensis também possui hábito arbustivo e é endêmica da região neotropical, ocorrendo em afloramentos rochosos de arenitos nos estados brasileiros do Paraná e São Paulo (Meyer & Goldenberg, 2014). Essa espécie é semelhante a *T. hatschbachii* no PEG; apresenta flores roxas, hermafroditas, e seu recurso exclusivo aos polinizadores é o pólen. O processo de polinização também ocorre por meio da vibração de suas anteras poricidas. Segundo Meyer & Goldenberg (2014), foram coletadas flores de *P. quartelaensis* entre novembro e dezembro e frutos foram visto de dezembro a junho. Contudo, aspectos mais detalhados sobre a polinização, fenologia e biologia reprodutiva da espécie ainda não foram estudados.

Pleroma sp é o nome dado neste estudo para se referir aos indivíduos com morfologia intermediária entre *T. hatschbachii* e *Pleroma quartelaensis*. De acordo com (Meyer, 2008) foram coletados espécimes somente em Tibagi, na região do PEG. O autor designa o nome de *Tibouchina* sp para essas coletas, devido à ausência de um táxon correspondente. Esses indivíduos também apresentam hábito arbustivo, flores com pétalas roxas e hermafroditas. E assim como *P. quartelaensis*, os indivíduos de *Pleroma* sp ainda demandam estudos que detalhem informações sobre sua polinização, fenologia e biologia reprodutiva.

Estudamos populações das duas espécies com ocorrência simpátrica na região do PEG, *Tibouchina hatschbachii*, *Pleroma quartelaensis* e mais um conjunto de possíveis híbridos entre as duas espécies (*Pleroma* sp). No total, utilizamos 33 indivíduos em polinizações manuais, todos distribuídos em dois afloramentos rochosos dentro do PEG. Dentre estes, 10 indivíduos são da espécie *T. hatschbachii*, 12 de *Pleroma quartelaensis* e 11 de *Pleroma* sp (Figura 3). Identificamos visualmente os indivíduos amostrados em campo

pelas características distintivas das espécies dentro gênero e comparadas com coletas depositadas em herbários (UPCB e MBM).



Figura 2. Individuo de *Tibouchina hatschbachii* em afloramento rochoso no Parque Estadual do Guartelá.



Figura 3. Da esquerda para direita, indivíduos de *T. hatsbachii* (com detalhe da flor sendo visitada por *Bombus brasiliensis*), possíveis híbridos (*Pleroma* sp) e *Pleroma quartelaensis*, com detalhe de suas flores.

2.3. Cruzamentos recíprocos

Os cruzamentos foram realizados de forma recíproca (bidirecional), ou seja, cada indivíduo de um par de espécies atuou como doador e como receptor de pólen do outro indivíduo. Os indivíduos de cada cruzamento foram selecionados de forma a compor todas as combinações: *T. hatsbachii* x *Pleroma quartelaensis*; *T. hatsbachii* x *Pleroma* sp; *Pleroma quartelaensis* x *Pleroma* sp. O número de flores usadas em cada tratamento encontra-se na Tabela 1. Em cada cruzamento a flor utilizada foi marcada e teve seu pólen removido e transferido para o estigma de uma flor da outra espécie (Gouveia & Pinheiro, 2015). As flores polinizadas tiveram seu desenvolvimento acompanhado nos meses subsequentes para que fosse verificada a formação dos frutos e sementes.

2.3.1. Estudos das sementes

Após a formação dos frutos, a coleta dos mesmos só foi realizada depois

de 60 dias, período em que passaram amadurecendo em campo (Figura 4). Assim que coletados, todos os frutos foram pesados e na sequência abertos para contagens das sementes. A viabilidade das sementes formadas foi avaliada pelo teste do tetrazólio (Piña-Rodrigues et al., 2004), onde as sementes são imersas em solução 1% de 2,3,5-trifenil tetrazólio e mantidas por 24 horas em temperatura de 28°C. O tetrazólio é reduzido nas células vivas e produz um sal colorido insolúvel, o formazana (Deswal e Chand, 1997), permitindo assim identificar os embriões viáveis, com uma forte coloração vermelha, e os embriões inviáveis (mortos), pela sua cor original ou apresentando a testa da semente sem conteúdo (Figura 5). Para frutos que continham 300 ou menos sementes, todas as sementes foram contadas. Para frutos que continham mais de 300 sementes, a contagem foi feita até a 300ª semente.



Figura 4. Fruto de *Tibouchina hatschbachii* no período de amadurecimento em campo após tratamento de polinização cruzada com *Pleroma guartelaensis*.

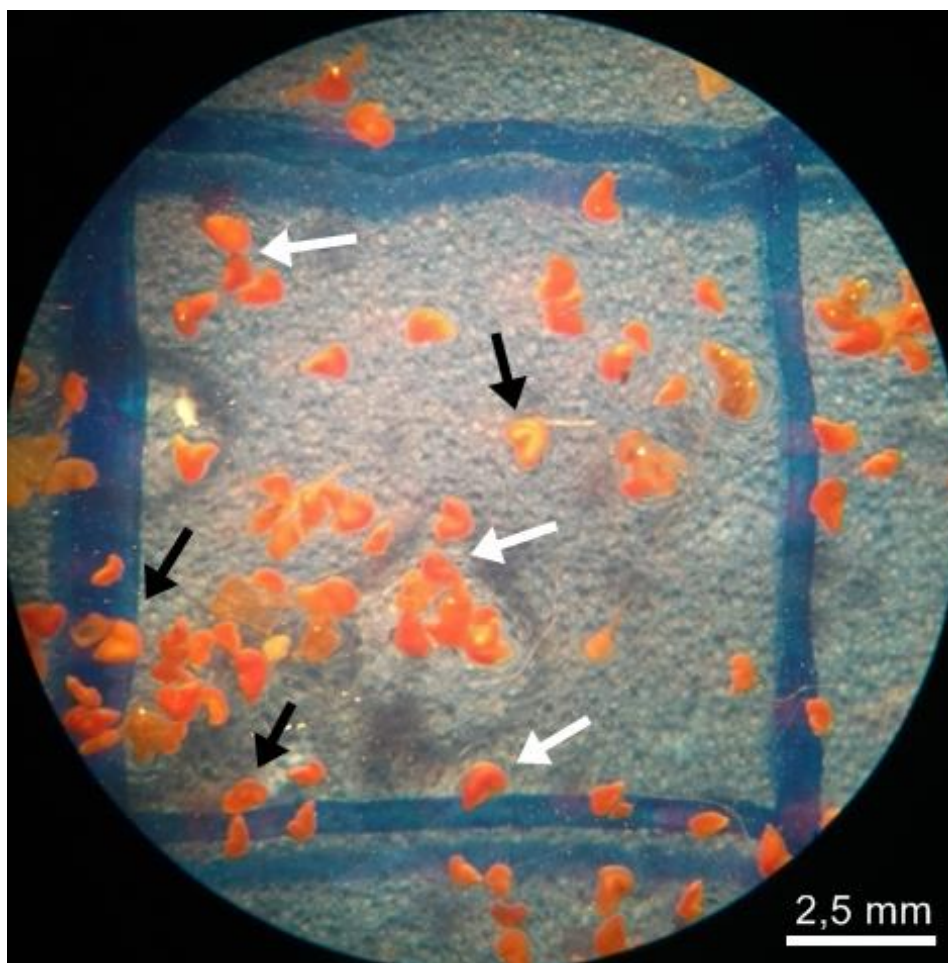


Figura 5. Sementes de *Pleroma guartelaensis* resultantes de polinização cruzada com *T. hatschbachii* submetidas ao teste do tetrazólio. As setas brancas indicam sementes contendo embriões viáveis. As setas pretas indicam sementes portadoras de embriões inviáveis ou sem conteúdo. Observação do material realizada em estereomicroscópio (aumento 2x).

2.3.2. Cálculos dos índices de isolamento

Para calcular a viabilidade dos frutos e das sementes, utilizamos dois índices, o IRF e o IRS, respectivamente. O índice de isolamento reprodutivo na etapa de formação de frutos (IRF) foi calculado como pela seguinte fórmula: $IRF = 1 - (\text{número frutos viáveis} \div \text{número de flores polinizadas})$. Essa fórmula foi aplicada em cada uma das categorias dos tratamentos de polinização cruzada realizados (Gouveia & Pinheiro, 2015).

Da mesma forma que nos frutos, a porcentagem de sementes viáveis foi

obtida a partir da razão entre o número de sementes viáveis e o número total de sementes computada em cada categoria de cruzamento. Índice de Isolamento Reprodutivo no estágio de formação de Semente ($IRS = 1 - [\text{número de sementes viáveis} \div \text{número total de sementes amostradas}]$).

Para se obter um único índice de isolamento correspondente às etapas de formação de frutos e semente viáveis, os índices de isolamento IRF e IRS foram combinados formando o IRFS (Índice de Isolamento Reprodutivo combinado nos estágios de formação de Fruto e Semente), com a seguinte fórmula: ($IRFS = IRF + [(1 - IRF) \times IRS]$). Essa fórmula leva em consideração que a formação de frutos atua primeiro na sequência de eventos na reprodução e que o IRS atua limitando apenas o número de descendentes formados a partir dos frutos viáveis ($1 - IRF$).

Deste modo, os índices de isolamento calculados podem ter valores que vão de 0 a 1. O valor igual a 0 indica que não há isolamento reprodutivo, isto é, a fertilidade é máxima nesta fase da reprodução e o maior número possível descendentes poderia ser formado entre os parentais. Já o índice com valor igual a 1 indica isolamento total, ou seja, este estágio da reprodução não é viável e representa por si próprio uma importante barreira reprodutiva agindo no isolamento reprodutivo dos grupos analisados (Scopece, Widmer & Cozzolino, 2008; Gouveia & Pinheiro, 2015).

3. RESULTADOS

3.1. Análise dos frutos e sementes

Em geral, houve formação de frutos em todos os tratamentos realizados. Considerando todos os tratamentos em conjunto, 30% acarretaram na formação de frutos. *Tibouchina hatsbachii* e *Pleroma quartelaensis* formaram mais frutos nos tratamentos controle que *Pleroma* sp. *Tibouchina hatschbachii* formou 58% de frutos e *Pleroma quartelaensis* 47%. Já *Pleroma* sp teve 40% de frutos formados pela polinização aberta. Nos tratamentos de autopolinização espontânea, observamos os menores percentuais de formação de frutos, *Tibouchina hatschbachii* e *Pleroma quartelaensis* com 14% e 19% de frutos

formados, respectivamente, e *Pleroma* sp com 7% apenas (Tabela 1).

A formação dos frutos nos tratamentos de polinização cruzada foram maiores entre *Pleroma guartelaensis* e *T. hatschbachii*. Quando o pólen de *P. guartelaensis* foi usado para polinizar flores de *T. hatschbachii*, a formação de frutos foi de 42%. O tratamento no sentido oposto (*T. hatschbachii* > *P. guartelaensis*) formou 39% de frutos. Já os cruzamentos que envolveram os indivíduos de *Pleroma* sp tiveram uma porcentagem menor de frutos formados, tanto atuando como doadores de pólen quanto receptores. Os cruzamentos recíprocos entre *Pleroma guartelaensis* e *Pleroma* sp formaram mais frutos (29% e 27%) quando comparados aos cruzamentos entre *T. hatschbachii* e *Pleroma* sp (11,5% e 15%). É curioso notar que quando *Pleroma* sp recebe pólen das outras duas espécies, formam-se mais frutos do que quando os indivíduos de *Pleroma* sp atuam doando pólen nos tratamentos (Tabela 2).

A viabilidade das sementes foi maior quando o pólen de *Pleroma guartelaensis* foi utilizado tanto nas flores de *T. hatschbachii* quanto nas flores de *Pleroma* sp, 16% e 14%, respectivamente. Já na direção oposta, quando flores de *P. guartelaensis* foram polinizadas com o pólen de *T. hatschbachii* e *Pleroma* sp, é possível observar as menores porcentagens de sementes viáveis 5% e 4%, nessa ordem. Considerando apenas os cruzamentos que envolveram *Pleroma* sp e as demais espécies, foi verificado que a formação de sementes contendo embriões viáveis é maior quando esses indivíduos recebem pólen de *P. guartelaensis* (14%) e *T. hatschbachii* (16%). No entanto, quando *Pleroma* sp doa pólen, a formação de sementes viáveis é menor, 4% e 11%, respectivamente (Tabela 3).

Os índices de isolamento calculados mostram um forte isolamento uma baixa viabilidade reprodutiva entre as três espécies. Nos cruzamentos em que *Pleroma* sp estão envolvidos, o IRFS chega a valores muito próximos a 1 (isolamento total), variando entre 0,96 e 0,99. No cruzamento entre *P. guartelaensis* e *T. hatschbachii*, foi observado o menor valor de IRFS (0,93) isso quando o pólen de *P. guartelaensis* foi usado em *T. hatschbachii*, contudo, no sentido oposto foi possível verificar, um alto índice de isolamento 0,98 (Tabela 4).

Espécies	% frutos formados por tratamento	
	Controle	AE
<i>T. hatschbachii</i>	29/50 (58%)	7/50 (14%)
<i>Pleroma quartelaensis</i>	9/19 (47%)	4/21 (19%)
<i>Pleroma sp</i>	10/25 (40%)	2/29 (7%)

Tabela 1. Porcentagem de frutos viáveis formados para controle e autopolinização espontânea. Os valores são apresentados como sendo a relação entre o nº de frutos formados/nº total de flores utilizadas nos tratamentos. Entre parêntesis esta a porcentagem de formação de frutos.

		Doador de pólen		
		<i>Pleroma quartelaensis</i>	<i>Pleroma sp</i>	<i>T. hatschbachii</i>
	<i>Pleroma quartelaensis</i>	-	9/33 (27%)	12/31 (39%)
Receptor de pólen	<i>Pleroma sp</i>	5/17 (29%)	-	2/13 (15%)
	<i>T. hatschbachii</i>	11/26 (42%)	3/26 (11,5%)	-

Tabela 2. Porcentagem de frutos viáveis formados após os cruzamentos recíprocos realizados. Os valores são apresentados como sendo a relação entre o nº de frutos formados/nº total de flores utilizadas nos tratamentos. Entre parêntesis esta a porcentagem de formação de frutos.

		Doador de pólen		
		<i>Pleroma quartelaensis</i>	<i>Pleroma sp</i>	<i>T. hatschbachii</i>
	<i>Pleroma quartelaensis</i>	-	4%	5%
Receptor de pólen	<i>Pleroma sp</i>	14%	-	16%
	<i>T. hatschbachii</i>	16%	11%	-

Tabela 3. Porcentagem de sementes contendo embriões viáveis para cada categoria de cruzamento realizado.

		Doador de pólen		
		<i>Pleroma quartelaensis</i>	<i>Pleroma</i> sp	<i>T. hatschbachii</i>
Receptor de pólen	<i>Pleroma quartelaensis</i>	-	0.99	0.98
	<i>Pleroma</i> sp	0.96	-	0.98
	<i>T. hatschbachii</i>	0.93	0.99	-

Tabela 4. Índice de Isolamento Reprodutivo combinado dos estágios formação de Fruto e viabilidade das Sementes (IRFS) para cada categoria de cruzamento realizado. O valor igual a 1 indica isolamento total e valor igual a 0 indica ausência de isolamento, ou seja, fertilidade total.

4. DISCUSSÃO

4.1. Isolamento reprodutivo entre populações simpátricas no PEG

Os mecanismos de isolamento reprodutivo entre *T. hatschbachii*, *Pleroma quartelaensis* e *Pleroma* sp são fortes, de acordo com o IRFS, demonstrando praticamente isolamento total, mas não o suficiente para manter estas espécies isoladas por completo no Parque Estadual do Guartelá. O isolamento reprodutivo incompleto com base nas barreiras pós-zigóticas aqui estudadas entre as espécies é apoiado essencialmente pela formação de frutos e sementes viáveis em todas as categorias de cruzamentos recíprocos, mesmo que em baixa proporção (Tabela 2 e 3), respectivamente. A partir dos dados obtidos dos tratamentos de polinização realizados entre as espécies, observamos que a formação de frutos e sementes viáveis ocorre de forma bidirecional, ou seja, ambas as espécies podem atuar como receptoras ou doadoras de pólen para a outra. O índice de isolamento combinado (IRFS) foi

menor quando *Pleroma quartelaensis* doou pólen para *T. hatschbachii* (0,93), indicando uma fertilidade maior. Já no sentido oposto (*T. hatschbachii* > *Pleroma quartelaensis*) esse índice foi maior, sendo semelhante ao encontrado nos cruzamentos envolvendo os indivíduos de *Pleroma* sp (Tabela 4). Isso pode estar relacionado com a baixa formação natural de frutos em *T. hatschbachii*, como visto por Maia, (2017). Estes resultados apoiam a ideia de que os mecanismos de isolamento reprodutivo baseado em barreiras pré-zigóticas podem ser fracas entre espécies de Melastomataceae compartilhando agentes polinizadores (Franco et al. 2011).

A partir do IRFS obtido nos cruzamentos que envolvem *Pleroma* sp, observamos valores muito próximos a 1, ou seja, o isolamento é praticamente completo e a chance de se formar descendentes viáveis quando *Pleroma* sp atua tanto doando quanto recebendo pólen é muito baixa (Tabela 4). Isso indica um forte isolamento reprodutivo entre as espécies, entretanto, não descartamos a formação de híbridos entre elas, devido à formação de frutos e sementes viáveis, mesmo que em baixas proporções. Não avaliamos aqui a atividade dos polinizadores, contudo, a consequência da hibridização deve ser examinada para melhor compreender os mecanismos de isolamento das espécies (Franco et al., 2011).

Neste trabalho, utilizamos os tratamentos de autopolinização manual como um modelo de deposição intraespecífica de pólen com intuito de verificar a autocompatibilidade dos indivíduos. Isso é válido para *T. hatschbachii*, onde estes dados foram obtidos a partir de Maia et al., (2018). Para *Pleroma quartelaensis* e *Pleroma* sp não foram realizados tratamentos de autopolinização manual (intraespecíficos), mas sim autopolinização espontânea, porém, neste caso, não foi possível controlar se a deposição intraespecífica não ocorreu ou se realmente ocorreu aborto em polinização intraespecífica nestas duas espécies. Entendemos que essa é uma limitação do nosso trabalho, mas, ainda assim, há um indicativo de uma baixa produção de frutos naturalmente tanto nos indivíduos de *Pleroma* sp, quanto em *Pleroma quartelaensis*. Todavia isso deve ser melhor avaliado com o tratamento de autopolinização manual, o que seria ideal como parâmetro para indicarmos a baixa produção natural de frutos intraespecífico. Mesmo com valores baixos,

houve a formação de frutos viáveis a partir de autopolinizações espontâneas (Tabela 1), indicando dessa forma a autocompatibilidade nos três espécies avaliados.

De acordo com Franco et al., 2011, é difícil separar a vantagem ecológica das restrições filogenéticas do gênero *Tibouchina*, assim como os demais gêneros da tribo Melastomeae (Goldenberg & Shepherd, 1998), visto que a autocompatibilidade é supostamente uma característica comum na tribo. Por fim, se a autocompatibilidade pode favorecer *T. hatschbachii* neste ambiente por meio de sua tolerância ecológica e ambiental (Maia et al., 2017), e se isso de fato for importante na colonização da região, então *Pleroma guartelaensis* e *Pleroma* sp também podem estar compartilhando esse sistema, em que é favorecido e otimizado no estabelecimento de suas populações neste ambiente.

Por fim, nossos resultados fornecem um forte indício de que, de fato, as barreiras reprodutivas que atuam mantendo a coesão entre as três espécies avaliadas são principalmente as que atuam em fases posteriores da reprodução (ou barreiras pós-zigóticas), provavelmente reduzindo a fertilidade da progênie gerada pelos cruzamentos interespecíficos entre *T. hatschbachii*, *P. guartelaensis* e *Pleroma* sp. Contudo, faz-se necessário avaliar as barreiras pré-zigóticas para melhor compreensão de barreiras pós-zigóticas e sucesso reprodutivo destas espécies.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A execução de cruzamentos manuais se mostra um procedimento experimental bastante simples e interessante para avaliar a natureza e intensidade do isolamento reprodutivo. Através dos resultados obtidos, demonstramos que há um forte isolamento reprodutivo entre as espécies estudadas, mas, ainda assim, indicamos a possibilidade de ocorrência de híbridos devido à produção e sementes viáveis entre elas. Entretanto, isso ainda deve ser avaliado por meio de outras abordagens.

Nenhuma das barreiras reprodutivas testadas aqui se mostrou suficiente para determinar, por si só, o isolamento reprodutivo completo entre *T.*

hatschbachii, *P. quartelaensis* e *Pleroma* sp no PEG. Tanto barreiras pré-zigóticas quanto pós-zigóticas atuando em outras fases da reprodução além das avaliadas neste estudo, devem estar impedindo o fluxo gênico, com isso representando fatores importantes que preservam o limite entre as espécies aqui estudadas.

Análises adicionais que utilizem marcadores moleculares poderiam esclarecer melhor tanto os limites intraespecíficos dos indivíduos de *Pleroma* sp identificados no campo quanto verificar a existência de introgressão entre as espécies, assim como esclarecer melhor questões ecológicas e evolutivas.

6. REFERÊNCIAS

CARMO, M. R. B.; ASSIS, M.A. **Caracterização fitossociométrica do Parque Estadual do Guartelá, município de Tibagi, estado do Paraná.** Tese Doutorado – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São Paulo. 2006.

CARMO, M. R. B.; ANDRADE, A. L. P.; SANTOS, G. A. S. D.; ASSIS, M. A. **Análise estrutural em relictos de Cerrado no Parque Estadual do Guartelá, município de Tibagi, estado do Paraná, Brasil.** Ciência Florestal, Santa Maria, Rio Grande do Sul, v. 22, p. 505-517, 2012.

CLAUSING, G.; RENNER, S. S. **Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution.** American Journal of Botany, v. 88, n. 3, p. 486-498, 2001.

COSTA, C. B. N. **Mecanismos de isolamento reprodutivo em espécies simpátricas: biologia reprodutiva de *Chamaecrista* (Leguminosae-Caesalpinioideae) em Mucugê, Bahia.** Tese de Doutorado, Universidade de Feira de Santana, 2007.

COYNE, J. A. & ORR, H. A. **Speciation.** Sunderland, MA, 2004.

DESWAL, D. P.; CHAND, U. **Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & ohashi) seeds.** Seed Science and Technology, v. 25, n. 3, p. 409-417, 1997.

FRANCO, A. M.; GOLDENBERG, R.; VARASSIN, I. G. **Pollinator guild organization and its consequences for reproduction in three synchronopatric species of *Tibouchina* (Melastomataceae).** Revista Brasileira de Entomologia, v. 55, n. 3, p. 381-388, 2011.

GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ J. F. A. & SOUZA M. L. D. R. **Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chave de**

identificação para os gêneros. Rodriguésia, v. 63, p. 145 – 161. 2012.

GOLDENBERG, R. & SHEPHERD, G. J. **Studies on the reproductive biology of Melastomataceae in "cerrado" vegetation.** Plant Systematics and Evolution, v. 211, p.13-29. 1998.

GOUVEIA, T. Z. M., & Pinheiro, F. **Experimentos de cruzamentos recíprocos como ferramenta para avaliar o isolamento reprodutivo numa zona de hibridação natural da família Orchidaceae Juss.** Revista da Biologia, v. 14, n. 1, p. 17-23, 2015

GREINER, S. et al. **The role of plastids in plant speciation.** Molecular ecology, v. 20, n. 4, p. 671-691, 2011.

HARDIG, T. M. et al. **Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (Salix) hybrid zone.** Molecular ecology, v. 9, n. 1, p. 9-24, 2000.

JOHNSON, N. A. **Hybrid incompatibility genes: remnants of a genomic battlefield?.** Trends in genetics, v. 26, n. 7, p. 317-325, 2010.

LABIAK, P.H. E. **Aspectos fitogeográficos do Paraná.** In: Kaehler M, ed. **Plantas vasculares do Paraná.** Curitiba: Departamento de Botânica/UFPR, 7-22. 2014.

LEAL, B. S. S. **Detecção de zona híbrida entre *Cattleya coccinea* e *C. brevipedunculata* (Orchidaceae) no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, utilizando microssatélites e análise morfométrica.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 83p. 2013.

LEXER, C. et al. **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, v. 14, n. 4, p. 1045-1057, 2005.

LUO, Z.; ZHANG, D.; RENNER, S. S. **Why two kinds of stamens in buzz-pollinated flowers? Experimental support for Darwin's division-of-labour hypothesis.** Functional Ecology, v. 22, n. 5, p. 794-800, 2008.

LUO, Z.; GU, L.; ZHANG, D. **Intrafloral differentiation of stamens in heterantherous flowers.** Journal of Systematics and Evolution, v. 47, n. 1, p. 43-56, 2009.

MAIA, F. R. **Sistemas reprodutivos e visitantes florais em Melastomataceae dos campos rupestres no limite Sul do cerrado, Tibagi, Paraná.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 103p. 2013.

MAIA, F. R. **O efeito do tempo e espaço na evolução de um táxon restrito aos campos subtropicais da América do Sul.** Tese de Doutorado.

Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, São Paulo. 2017.

MAIA F. R., VARASSIN I. G., GOLDENBERG, R. **Apomixis does not affect visitation to flowers of Melastomataceae, but pollen sterility does.** *Plant Biology* 18: 132–138. 2016.

MAIA F. R., ZWIENER V.P., MOROKAWA, R., SILVA-PEREIRA V., GOLDENBERG, R. **Phylogeography and ecological niche modeling uncover the evolutionary history of *Tibouchina hatschbachii* (Melastomataceae), a taxon restricted to the subtropical grasslands of South America.** *Botanical Journal of The Linnean Society* 183: 616–632. 2017.

MEYER, F. S. O gênero *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae) no estado do Paraná. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 114p. 2008.

MEYER, F. S., GUIMARÃES, Paulo J. F. & GOLDENBERG, R. *Tibouchina* (Melastomataceae) from Paraná state, Brazil. *Rodriguésia*, v. 61, n. 4, p. 615-638, 2010.

MEYER, F. S. & GOLDENBERG, R. **Two new species of *Pleroma* (Melastomataceae: Melastomeae) from Brazil.** *Kew Bulletin*, v. 69, n. 3, p. 9527, 2014.

MEYER, F. S.; GUIMARÃES, P. J. F. & GOLDENBERG, R. **Uma nova espécie de *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae) e notas taxonômicas sobre o gênero no Estado do Paraná, Brasil.** *Hoehnea*, v. 36, n. 1, p. 139-147, 2009.

MEYER, F.S.; GUIMARÃES, P.J.F. & KOZERA, C. **Uma nova espécie de *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae), endêmica do Paraná, Brasil.** *Revista Brasileira de Botânica* 33: 265-269. 2010.

MICHELANGELI, F. A. et al. **Phylogenetic relationships and distribution of new world Melastomeae (Melastomataceae).** *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 171, n. 1, p. 38-60, 2012.

PALMA-SILVA, C. et al. **Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species.** *Heredity*, v. 103, n. 6, p. 503, 2009.

PALMA-SILVA, C. et al. **Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs.** *Molecular Ecology*, v. 20, n. 15, p. 3185-3201, 2011.

PANSARIN, E. R. & AMARAL, M. D. C. E. D. **Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization?.** *Plant Biology*, v. 10, n. 2, p. 211-219, 2008.

PIÑA-RODRIGUES, F. C.M.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. **Testes de qualidade. Germinação: do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed, v. 1, p. 283-297, 2004.

PINHEIRO, F. et al. **Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae).** *Molecular Ecology*, v. 19, n. 18, p. 3981-3994, 2010.

RENNER, S. S. **A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae.** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, p. 496-518, 1989.

RENNER, S. S. **Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae.** *Nordic Journal of Botany*, v. 13, n. 5, p. 519-540, 1993.

RIESEBERG, L. H. & WILLIS, J. H. **Plant speciation.** *Science*, v. 317, n. 5840, p. 910-914, 2007.

SCOPECE, G.; MUSACCHIO, A.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. **Patterns of reproductive isolation in mediterranean deceptive orchids.** *Evolution*, v. 61, p. 2623-2642, 2007.

SCOPECE, G.; WIDMER, A.; COZZOLINO, S. **Evolution of postzygotic reproductive isolation in a guild of deceptive orchids.** *The American Naturalist* 171:315-326. 2008.

SCOPECE, G. et al. **Polymorphism of postmating reproductive isolation within plant species.** *Taxon*, v. 59, n. 5, p. 1367-1374, 2010.

VELLOSO, M. D. S. C., BRITO, V. L. G. D., CAETANO, A. P. S., & ROMERO, R. **Anther specializations related to the division of labor in *Microlicia cordata* (Spreng.) Cham. (Melastomataceae).** *Acta Botanica Brasilica*, n. AHEAD, p. 0-0, 2018.

WURDACK, J. J. **Melastomataceae of Santa Catarina.** *Sellowia, Itajaí*, v. 14, p. 109-217, 1962.

WURDACK, J.J. **Melastomatáceas novas do estado do Paraná.** *Papéis Avulsos Herbário Hatschbach* 4: 1-3. 1963.

Wurdack, J. J. **Certamen Melastomataceis XXXVII.** *Phytologia* 55: 131–147. 1984.