

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Diversidade genética do complexo *Sisyrinchium vaginatum*  
(Iridaceae): aspectos moleculares e citogenéticos**

**Dissertação de Mestrado**

**Lauís Brisolara Corrêa**

**Porto Alegre, março de 2011.**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**LAUÍS BRISOLARA CORRÊA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

**ORIENTADORA: Dra. TATIANA TEIXEIRA DE SOUZA-CHIES**

**COORIENTADORA: Dra. ELIANE KALTCHUK DOS SANTOS**

Porto Alegre, março de 2011.

**À toda minha família, os quais  
sempre estiveram à base de minhas  
realizações, e especialmente à minha  
mãe, ao meu pai, aos meus irmãos e à  
minha sobrinha.**

*"Se eu enxerguei mais longe foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes."*

Isaac Newton

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, que me possibilitou ser o dono dos meus pensamentos e o mestre das minhas ações e o qual me permitiu estar entre as pessoas que amo, me guiando nas provações de minha vida e dando-me forças para seguir minha jornada.

Aos meus pais, Luiz Carlos Martins Corrêa e Vera Maria Brisolara Corrêa, pelo apoio, carinho e todos os votos de confiança que têm depositado em mim durante todos estes anos, além do grande exemplo de força, dedicação e responsabilidade.

Aos meus irmãos, Aluísio e Ulisses, que próximos ou distantes de mim, sempre me amparavam nos momentos difíceis e vibravam com minhas conquistas.

Aos meus primos, que sempre foram presença constante durante toda a minha vida, especialmente às minhas primas Cibele Brisolara de Brisolara, Lisane Brisolara de Brisolara e Elisa Brisolara-Fabião, pelo companheirismo e pela forte influência e incentivo durante todos os momentos de minha vida.

Aos meus tio e tias, pelo carinho, incentivo, respeito, exemplo e dedicação, que representaram durante todo o percurso de minha vida, tanto durante a minha formação acadêmica e escolhas tomadas nesta jornada, quanto em meu desenvolvimento pessoal, como pessoa honesta, digna e afetuosa, que me tornei.

À minha orientadora, Dra. Tatiana Teixeira de Souza-Chies, pela incomensurável dedicação durante todas as etapas de meu Mestrado, pelo incentivo, representatividade e responsabilidade. Seu exemplo e suas palavras foram fonte inspiradora e formadora, sem as quais não teria me tornado quem sou hoje.

À minha querida co-orientadora, Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos, pela grande amizade, apoio e dedicação empregados durante estes dois anos, também, pelos práticos e valorosos ensinamentos em docência durante o estágio de prática de ensino.

À minha colega e grande amiga, Luana Olinda Tacuatiá, pelas discussões e fundamentações evolutivas de grande valia que foram resultantes destas, assim como, pela amizade e companheirismo durante todo este período.

Às minhas colegas de laboratório, Eudes Maria Stiehl Alves, Rogéria Beatriz Miz, Paula B. Picoli, Adriana Aita de Moraes, Alessandra Brochier Marasini, Juliana Lustoza de Alencar, Juliana Fachineto, Mariana Stucky, o meu sincero agradecimento pelo companheirismo e auxílio durante todos os percalços encontrados neste trajeto.

À minha grande amiga e colaboradora, Dra. Lilian Eggers, pelo entusiasmo e dedicação empenhados durante a determinação de todas as espécies trabalhadas.

À Dra. Mardiore Tanara Pinheiro dos Santos, pela imensa amizade compartilhada, aconselhamento, disponibilidade e colaboração nas análises reprodutivas e de interação planta-polinizador.

À Dra. Sonja Siljak-Yakovlev (Université Paris-sud XI) e Fatima Pustahija (University of Sarajevo), pela indescritível contribuição metodológica e teórica quanto às técnicas citogenéticas e suas aplicações.

Ao amigo Dr. Olivier Chauveau (Université Paris-sud XI), cujas discussões sobre Morfologia, Taxonomia e Evolução da família Iridaceae, certamente, influenciaram meu pensamento e minha pesquisa.

Às amigas e colegas do PPGBM, Marcia Goetz e Camila Martini Zanella, pelo imensurável auxílio quanto aos programas utilizados nas análises moleculares.

À técnica de laboratório, Silvia Nair Cordeiro Richter, pelo auxílio durante momentos de dificuldade encontrados neste caminho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (UFRGS), pelo auxílio em saídas de campo e pelos múltiplos cursos e possibilidades aperfeiçoamento disponibilizados durante a minha formação.

Ao auxiliares administrativos do PPGBM, Elmo J. Antunes Cardoso e Ellen, os quais sempre foram muito prestativos quando tive dúvidas administrativas e precisei de algo da Pós Graduação.

À CAPES e ao CNPq, pelo financiamento de minha pesquisa.

E finalmente, à todos os colegas e amigos do Grupo de Genética Vegetal do Departamento de Genética da UFRGS e do Laboratório de Morfologia de Angiospermas do

Departamento de Botânica da UFRGS, pela amizade e agradável convivência durante estes anos.

## RESUMO

O “complexo *Sisyrinchium vaginatum*” (Iridaceae) compreende as espécies pertencentes à seção *Viperella*, caracterizada por plantas apresentando folhas basais ausentes a muito reduzidas, com caule aéreo ancipitado, flores amarelas e folhas com bainha desenvolvida. Fazem parte deste complexo as espécies *Sisyrinchium ciliolatum* (Ravenna) Ravenna, *S. deflexum* R. C. Foster, *S. marchioides* Ravenna, *S. perpruinatum* (Ravenna) Ravenna, *S. reitzii* R. C. Foster, *S. scalarium* Ravenna, *S. sinuosum* Ravenna, *S. sulcatum* Gillies ex Hook., *S. tenuifolium* Humb. & Bonpl. ex Wild., *S. tereticaule* Ravenna *S. alatum* Hook., *S. alatum* var. *minor* Rusby, *S. balansae* Baker, *S. distantiflorum* Kränzlin, *S. glaziovii* Baker, *S. incurvatum* Gardner ex Hook., *S. mandonii* Baker, *S. marchio* (Vell.) Steud., *S. parvifolium* Baker, *S. restioides* Spreng., *S. sulcatum* Gillies ex Hook., *S. vaginatum* Spreng., *S. weirii* Baker. São plantas perenes com representantes distribuídos nas Américas do Sul, Central e México. No Sul do Brasil, observações de campo têm permitido verificar a existência de uma grande variação morfológica, principalmente vegetativa. Todas as espécies estudadas apresentaram número básico de cromossomos  $x = 9$ , sendo em sua maioria diplóides ( $2n = 18$ ). Os números cromossômicos descritos na literatura para espécies deste grupo eram restritos a *S. alatum* ( $2n = 4x = 36$ ), para o México e Peru. Não foram relatados anteriormente diplóides ou hexaplóides para estas espécies. Poucos estudos abordaram aspectos do sistema de cruzamento deste gênero e nenhum estudo acessou a diversidade genética encontrada neste grupo taxonômico. Em vista da escassez de estudos sobre a biologia e diversidade genética das espécies componentes do “complexo *S. vaginatum*” e sua importância como grupo de espécies nativas, além da categorização de *Sisyrinchium vaginatum* como espécie em perigo de extinção, este trabalho aliou métodos citogenéticos e moleculares, com o uso de marcadores dominantes do tipo ISSR-PCR para caracterizar as



espécies deste complexo que ocorrem no Sul do Brasil. As espécies apresentaram-se bem definidas com o uso das ferramentas utilizadas nesse estudo, sendo que a maior parte da variação existente encontrou-se em nível intrapopulacional. A maioria das espécies que ocorre nestes três estados é diplóide,  $2n = 2x = 18$ . Dentre as sete espécies ocorrentes no Rio Grande do Sul, seis (*S. balansae*, *S. parvifolium*, *S. restioides*, *S. vaginatum*, *Sisyrinchium* sp. nova 2 e *Sisyrinchium* sp. nova 3) são diplóides e apenas uma espécie é tetraplóide (*S. marchioides*),  $2n = 4x = 36$ . Enquanto que para o estado de Santa Catarina foram encontradas sete espécies diplóides (*S. alatum*, *S. balansae*, *S. parvifolium*, *S. restioides*, *S. vaginatum*, *S. vaginatum perpruinatum* e *Sisyrinchium* sp. nova 1) e duas espécies tetraplóides (*S. marchioides* e *S. marchio*). Contudo, para o estado do Paraná foi encontrada uma espécie hexaplóide (*S. weirii*),  $2n = 6x = 54$ , duas espécies tetraplóides (*S. marchioides* e *S. marchio*) e cinco espécies diplóides (*S. alatum*, *S. balansae*, *S. parvifolium*, *S. restioides*, *S. vaginatum*). A poliploidização possui maior relevância em maiores altitudes, onde as espécies poliplóides são encontradas. Com isso, o único acesso tetraplóide encontrado no Rio Grande do Sul foi coletado apenas em regiões serranas. Os marcadores ISSR foram utilizados para a construção de um dendrograma. Observa-se no dendrograma que as espécies poliplóides não estão agrupadas. Um agrupamento bem suportado (bootstrap de 96%) foi constituído pelas espécies *S. vaginatum* ( $2n = 18$ ), *S. marchioides* ( $2n = 36$ ) e *S. restioides* ( $2n = 18$ ). No extremo oposto a este grupo, encontrou-se a espécie *S. palmifolium*, na forma de um agrupamento externo, concordando com a morfologia, já que esta faz parte de um grupo de espécies próximas a este complexo. Os estudos reprodutivos mostraram que *S. vaginatum* é auto-incompatível, sendo sua polinização completamente dependente de vetores, principalmente abelhas coletoras de pólen e sirfídeos no Estado do Rio Grande do Sul. Estes resultados mostram que a complexidade encontrada neste grupo é devida a múltiplos mecanismos evolutivos,

confirmando a necessidade de que diferentes abordagens sejam utilizadas na caracterização desta diversidade e de suas consequências evolutivas.

## ABSTRACT

“*Sisyrinchium vaginatum* complex” belongs to the section *Viperella*, characterized by absent or extremely reduced basal leaves, ancipitated stem, yellow dish flowers, and leaves with large sheaths along the stem. The species *Sisyrinchium ciliolatum* (Ravenna) Ravenna, *S. deflexum* R. C. Foster, *S. marchioides* Ravenna, *S. perpruinatum* (Ravenna) Ravenna, *S. reitzii* R. C. Foster, *S. scalarium* Ravenna, *S. sinuosum* Ravenna, *S. sulcatum* Gillies ex Hook., *S. tenuifolium* Humb. & Bonpl. ex Wild., *S. tereticaule* Ravenna *S. alatum* Hook., *S. alatum* var. *minor* Rusby, *S. balansae* Baker, *S. distantiflorum* Kränzlin, *S. glaziovii* Baker, *S. incurvatum* Gardner ex Hook., *S. mandonii* Baker, *S. marchio* (Vell.) Steud., *S. parvifolium* Baker, *S. restioides* Spreng., *S. sulcatum* Gillies ex Hook., *S. vaginatum* Spreng., *S. weirii* Baker. belong to this species complex. They are perennial with representatives distributed in South and Central Americas and Mexico. In Southern Brazil, field observations allowed to verify the existence of a wide morphological variation, mainly vegetative. The chromosome numbers described in the literature for this group of species are restricted to *S. alatum* ( $2n = 4x = 36$ ), from Mexico and Peru. None diploid or hexaploid species were reported before for this group. Studies addressing mating system or molecular aspects relatives to this group are unknown. Taking account the scarcity of studies about the biology and genetic diversity of “*S. vaginatum* complex” species and its importance as a native group of species, besides that categorization of *Sisyrinchium vaginatum* as an endangered species. This study tried to bring together cytogenetic and molecular methods, using a dominant marker of the ISSR-PCR to characterize the species belonging to this complex that occurred in Southern Brazil. The species are quite structured, being the most part of the existing variation under intrapopulation level. All species studied presented basic chromosome number  $x=9$ , most of them being diploids ( $2n=2x=18$ ). Among the seven species occurring in Rio Grande do Sul six were diploid (*S. balansae*, *S. parvifolium*, *S. restioides*, *S. vaginatum*, *Sisyrinchium* sp. nova 2 e

*Sisyrinchium* sp. nova 3) and just one species was tetraploid, *S. marchioides* ( $2n = 2x = 36$ ). To the Santa Catarina state were found diploids (*S. alatum*, *S. balansae*, *S. parvifolium*, *S. restioides*, *S. vaginatum*, *S. vaginatum perpruinatum* e *Sisyrinchium* sp. nova 1) and tetraploids (*S. marchioides* e *S. marchio*), while for the Parana state was found one hexaploid species, *S. weirii* ( $2n = 2x = 54$ ), tetraploids (*S. marchioides* e *S. marchio*), and diploids (*S. alatum*, *S. balansae*, *S. parvifolium*, *S. restioides*, *S. vaginatum*). Polyploidization had more importance in higher grasslands, where the polyploid species are more commonly found. The polyploid species did not clustering on the dendrogram. A quite supported cluster (bootstrap of 96%) was formed for *S. vaginatum* ( $2n = 18$ ), *S. marchioides* ( $2n = 36$ ) e *S. restioides* ( $2n = 18$ ) species. On the opposite extreme of this cluster is the *S. palmifolium* species, used in this analysis as outgroup, it is in agreement with morphology, even so it belongs to a closely related group of this complex. The breeding system studies presented that *S. vaginatum* is auto-incompatible, being the pollination carried out by pollen collector bees or sirphids in Rio Grande do Sul. These results show that the complexity found in this group is due to multiple evolutionary mechanisms, confirming the needs to use different approaches for the characterization of this diversity and of its evolutionary consequences.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	10
A família Iridaceae.....	11
Aspectos morfológicos.....	11
Sistemática e filogenia da família Iridaceae.....	11
Biologia reprodutiva.....	14
Estudos de diversidade genética.....	16
O gênero <i>Sisyrinchium</i> L.....	18
Complexidade taxonômica.....	18
O “complexo <i>S. vaginatum</i> ”.....	19
Estudos citogenéticos.....	25
Citogenética do gênero <i>Sisyrinchium</i> .....	28
Justificativa.....	31
Objetivos.....	32
Objetivos específicos.....	32
CAPÍTULO II - Diversidade genética em espécies do complexo <i>Sisyrinchium vaginatum</i> (Iridaceae) no Sul do Brasil através de marcadores ISSR e determinação do sistema de cruzamento da espécie <i>S. vaginatum</i> Spreng.....	33
CAPÍTULO III - Poliploidia e evolução do tamanho do genoma em espécies do complexo <i>S.</i> <i>vaginatum</i> .....	70

CAPÍTULO IV - Considerações finais.....	92
REFERÊNCIAS (CAPÍTULOS I, IV).....	99

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

### A FAMÍLIA IRIDACEAE

#### ASPECTOS MORFOLÓGICOS

A família Iridaceae Juss. é constituída por ervas, raramente arbustivas, perenes ou anuais, podendo apresentar sistema caulinar subterrâneo do tipo bulbo, corno ou rizoma e caule aéreo presente ou não. As raízes são adventícias, típicas de monocotiledôneas. Apresentam folhas cilíndricas ou laminares, lineares ou ensiformes, planas ou plicadas, paralelinérvias, equitantes ou não, bi ou unifaciais. Inflorescências complexas tendo como unidade básica o ripídio, escapos eretos, cilíndricos ou achatados, áfilos ou bracteados. Flores bissexuadas, actinomorfas ou zigomorfas, trímeras, tépalas livres ou formando tubo, idênticas ou bem diferenciadas entre si. Três estames (dois em *Diplarrhena* Labill.), opostos às tépalas do verticilo externo, anteras extrorsas ou latrorsas, lineares ou sagitadas. Ovário ínfero (súpero em *Isophysis* Moore), sincárpico, tricarpelar, trilocular, placentação axilar, multiovulado. Possuem três estiletos, livres ou unidos parcialmente, estigmas inteiros a profundamente divididos. Fruto do tipo cápsula loculicida, mono a polispermico, sementes globosas, achatadas ou poliédricas. Em quase todos os gêneros, o fruto é seco, com pericarpo firme e cartilaginoso ou papiráceo a rígido e lenhoso. Sementes com abundante endosperma, tipicamente duras e relativamente grandes, mais ou menos globosas a angulosas por pressão dentro da cápsula durante o desenvolvimento, podendo ainda ser segmentadas por uma crista (Judd *et al.*, 2007; Goldblatt *et al.*, 2008).

#### SISTEMÁTICA E FILOGENIA DA FAMÍLIA IRIDACEAE

Iridaceae ou a família das íris é um grupo botânico complexo, constituído por 2030 espécies distribuídas em 65-75 gêneros, sendo uma das maiores famílias da ordem Asparagales (Goldblatt *et al.*, 2008; Stevens, 2008). Contudo, têm-se considerado um número maior de espécies e gêneros, principalmente, devido ao histórico de poucos estudos taxonômicos realizados para a América do



Sul. Essa família possui uma distribuição cosmopolita, porém, com sua maior diversidade concentrada, especialmente, no Hemisfério Sul, sendo a África o maior centro de diversidade e a América do Sul o segundo maior (Goldblatt, 1990).

A base para a classificação atual ao nível infra-familiar de Iridaceae derivou do estudo conduzido por Goldblatt (1990), que utilizou características morfológicas, fitoquímicas, citológicas e de estrutura do grão-de-pólen, em um total de 52 caracteres, para identificar os quatro maiores clados: Ixioideae - atualmente Crocoideae - (tribos Pillansieae, Watsonieae e Ixieae), Isophysidoideae, Nivenioideae e Iridoideae (tribos Trimezieae, Iridineae, Sisyrinchieae e Tigrideae). Pela dificuldade em se obter uma classificação de consenso entre algumas subfamílias de Iridaceae, alguns estudos posteriores foram realizados visando esclarecer essas dúvidas.

Estudos envolvendo caracteres moleculares evidenciaram que a tribo Sisyrinchieae (Reeves *et al.*, 2001), os gêneros *Iris* L. (Souza-Chies *et al.*, 1997) e *Moraea* Miller (Goldblatt *et al.*, 2002), e a subfamília Nivenioideae (Souza-Chies *et al.*, 1997; Reeves *et al.*, 2001) não são monofiléticos.

Em destaque, o trabalho realizado por Reeves *et al.* (2001), o qual utilizou quatro regiões do DNA plastidial (os genes codificadores *rbcL*, *rps4*, o íntron *trnL* e o espaçador intergênico *trnL-F*) e obteve resultados congruentes com aqueles observados no estudo anterior (Goldblatt, 1990), principalmente com relação à resolução em Isophysidoideae, Crocoideae (ou Ixioideae) e Iridoideae.

Posteriormente, um estudo filogenético multigênico utilizando o íntron *rps16*, a região *trnL-F* e os genes *rbcL*, *rps4* e *matK* (Goldblatt *et al.*, 2008) foi realizado, no qual um dos objetivos foi a resolução do relacionamento na tribo Tigridiae, uma vez que os limites genéricos nessa tribo ainda não se encontram resolvidos. Um dos motivos para isso é a ampla diversidade de variantes florais observadas, que tem favorecido a criação de um grande número de gêneros com poucas espécies, criando confusão na resolução dos limites genéricos da tribo. No caso do clado correspondente a *Tigridia*, foi sugerido pelos autores que os hoje reconhecidos gêneros *Ainea* Ravenna, *Cardiostigma* Baker, *Colima* (Ravenna) Rodriguez & Ortiz-Catedral (sistema de polinização adaptado para uma

ampla diversidade de polinizadores), *Rigidella* (polinização por beija-flores), *Fosteria* Molseed, *Sessilanthera* Molseed & Cruden sejam reduzidos à sinonímia de *Tigridia* Jussieu, para que esse gênero seja considerado monofilético. Embora esses gêneros tenham variações significativas na morfologia floral, estas resultam de radiações adaptativas recentes impulsionadas pela adaptação a diferentes tipos de polinizadores. Segundo Goldblatt *et al.* (2008), estas mudanças foram demasiadamente rápidas para a diferenciação genética destas espécies em gêneros distintos, considerando os caracteres vegetativos como de maior relevância para a sustentação de gêneros, por derivarem de adaptações ecológicas mais amplas. Também foi proposto por Goldblatt *et al.* (2008) a subdivisão da família em sete subfamílias com base na filogenia molecular, sendo essas: Isophysioideae, Patersonioideae, Geosiridoideae, Aristeoideae, Nivenioideae, Crocoideae e Iridoideae. Iridoideae compreende as tribos Trimezieae, Tigridieae, Irideae, Diplarrheneae e Sisyrinchieae.

As tribos do Novo Mundo, Sisyrinchieae, Trimezieae e Tigridieae, provavelmente partilham o mesmo ancestral. A separação das primitivas Sisyrinchieae do ancestral comum a Trimezieae e Tigridieae provavelmente ocorreu há cerca de 45 milhões de anos, coincidindo com a separação do gênero *Iris* das linhagens africanas de *Dietes* Salisbury, *Bobartia* L., *Ferraria* L. e *Moraea* (tribo Irideae). Já Trimezieae (espécies com rizomas ou cormos) e Tigridieae (bulbos) divergiram há cerca de 35 milhões de anos. Cabe ressaltar que a tribo Sisyrinchieae manteve representantes no Velho Mundo, pois a divergência se deu antes do início da migração para o Novo Mundo (Goldblatt *et al.*, 2008).

No Brasil, encontram-se espécies nativas e exóticas da família Iridaceae. De forma geral, a família está representada por 14 gêneros e 110 espécies (Innes, 1985). Enquanto que o número de espécies de Iridaceae citadas para o Estado do Rio Grande do Sul é 43 (Eggers, comunicação pessoal). Destas, cinco espécies são de *Calydorea* Herb., cinco de *Cypella* Herb., duas de *Gelasine* Herbert, cinco de *Herbertia* Sweet, uma de *Kelissa* Ravenna, duas de *Neomarica*, uma de *Onira* Ravenna, até 20 espécies de *Sisyrinchium* L., uma de *Sympa* Ravenna e uma de *Trimezia* Salisb. ex

Herb. Os gêneros *Kelissa*, *Onira* e *Sympa* são monoespecíficos e foram criados por Ravenna (1981a; 1983).

## **BIOLOGIA REPRODUTIVA**

Tanto o sistema reprodutivo quanto o sistema de cruzamento estão diretamente relacionados com a composição genética das populações vegetais, pois o primeiro define se há ou não a formação de indivíduos pela união de gametas e de que forma estes são produzidos, enquanto que o segundo determina de que forma os gametas se reúnem na formação do zigoto (Charlesworth, 2006).

Mudanças evolutivas no sentido alogamia para autogamia têm sido mediadas pela redução do tamanho da flor e alterações na morfologia floral (Ornduff, 1969) que reduzem o custo energético por flor e facilitam a auto-polinização. Contudo, em contraste à redução do tamanho das anteras e do número de grãos-de-pólen encontrados entre as espécies autógamas quando comparadas às espécies alógamas mais próximas, não parece haver uma redução no número de óvulos (Cruden, 1977). Dessa forma, a transição evolutiva de fecundação cruzada para autofecundação tem ocorrido em muitos grupos vegetais, de forma que diferentes sistemas reprodutivos têm sido observados tanto entre espécies relacionadas, quanto entre populações distintas da mesma espécie (Jain, 1976). Esta mudança está, geralmente, associada com alterações na morfologia floral, forma de vida e adaptações ambientais (Barret *et al.*, 1996; Ornduff, 1969).

Muitas vezes, as espécies alógamas apresentam um sistema genético de auto-incompatibilidade (AI), este por conseguinte só permite a alogamia, promovendo a manutenção da variabilidade genética. Isso é de considerável importância, já que a maior parte das angiospermas apresenta flores andróginas, de modo que espacialmente favorecem a auto-fecundação pela proximidade dos gametas masculino e feminino. Em consequência disto, a AI é considerada um dos fatores mais importantes para o sucesso evolutivo das angiospermas (Brewbaker, 1957; Heslop-Harrison, 1983). Por outro lado, em alguns casos, a AI pode levar a uma certa ineficiência

reprodutiva pela redução significativa dos frutos e sementes gerados (Schiffino-Wittmann & Dall'Agnol, 2002).

Todas estas variações que incorrem em mudanças nas estratégias reprodutivas descritas acima, dependem, na maioria das vezes, de relações ecológicas agonísticas entre as plantas e seus potenciais polinizadores, sendo essa interação um dos mecanismos mais eficientes envolvidos com processos de radiação adaptativa e especiação em plantas (Stebbins, 1970).

Flores que oferecem óleos como recompensa aos insetos polinizadores foram registradas, até o momento, em apenas oito famílias de plantas (Machado, 2004), estando a família Iridaceae entre as mais importantes. Essas espécies apresentam estruturas especializadas na produção de ácido graxos chamadas elaióforos. Essas glândulas podem secretar ou não os óleos produzidos em seus tricomas florais, além disso, em geral são localizados em pontos estratégicos da flor como tubo estaminífero (*Sisyrinchium*) e base das tépalas (*Herbertia*). Na região Neotropical, flores produtoras de óleo são visitadas, principalmente, por grupos de abelhas especializadas pertencentes às tribos Centridini, Tapinotaspidini e Tetrapediini (Apidae, Apinae) (Buchmann, 1987). Em relação às espécies de *Sisyrinchium* com flores produtoras de óleo, Cocucci & Vogel (2001) mencionam a existência de especializações e adaptações mútuas antes não conhecidas, relatando a ocorrência de oligolectia, ou seja a existência de estreitas associações entre flores destas espécies e espécies de abelhas dos gêneros de *Tapinotaspidini*.

A origem da produção de óleos florais parece ter ocorrido entre 12 milhões e 1 milhão de anos atrás em Iridaceae, sendo uma das últimas famílias de plantas que desenvolveram essa adaptação (Renner & Schaefer, 2010). Contudo, essa adaptação teve origem recorrente em Iridaceae e Orchidaceae, embora as outras famílias tenham apresentado uma única origem. Em Iridaceae, as tribos Trimezieae e Tigrideae são taxa irmãos e com base na topologia da filogenia, a explicação mais parcimoniosa para a distribuição de elaióforos parece ser que eles evoluíram uma única vez a partir de um ancestral comum destas duas tribos, 15 milhões de anos atrás, e que a secreção de óleo foi perdida ao menos seis vezes (Renner & Schaefer, 2010). Contudo, de acordo com a estimativa

de datação molecular realizada por Goldblatt *et al.* (2008) essas duas tribos se divergiram anteriormente, aproximadamente 37 milhões de anos atrás. Esse mutualismo entre flores de óleo e abelhas envolve espécies altamente especializadas da família Apidae (Michener, 2007).

Nectários florais secretores de compostos sacarídicos são pouco comuns entre as espécies Sul-americanas, mas muito frequentes na subfamília Crocoideae ocorrente nos continentes da África e Eurásia (Goldblatt, 2008).

No estudo filogenético do gênero *Sisyrinchium* realizado por Chauveau *et al.* (2011), os autores mostram que o surgimento de tricomas glandulares produtores de óleo (tipo encontrado em elaióforos) teria ocorrido pelo menos duas vezes, mas provavelmente três vezes, independentemente, durante a história evolutiva do gênero, sendo que a perda subsequente desta capacidade de recompensa lipídica ao polinizador ocorreu em outras espécies, indicando que as espécies da América do Norte podem ter desempenhado um papel chave nos padrões de especiação encontrados no gênero *Sisyrinchium*.

## **ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA**

A variabilidade genética, representada nos níveis inter e/ou intrapopulacionais, é de extrema relevância em estudos que visam a compreensão do estado de conservação de uma espécie, assim como de sua Biologia reprodutiva. Além disso, permite relacionar sua condição atual à sua história evolutiva, possibilitando delinear propostas de manejo e de conservação natural da espécie, esteja ela em risco de extinção ou não.

O uso de marcadores moleculares, tais como RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), SSR (“Simple Sequence Repeats”), AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) e ISSR (“Inter Simple Sequence Repeats”), é amplamente difundido na caracterização da variabilidade genética em espécies vegetais. Dentre estas, a técnica de ISSR combina os benefícios das análises por AFLP e SSR com a universalidade do RAPD. Além disto, possui alta reprodutibilidade e segrega, principalmente, como marcador dominante (Nybom *et al.*, 2002).

A técnica de ISSR é baseada no método de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) e envolve a amplificação de um segmento de DNA presente a uma distância passível de amplificação entre duas regiões de microssatélites idênticas e inversamente orientadas. São utilizados *primers* de 16 a 25 pb, constituídos de seqüências di, tri, tetra ou penta-nucleotídicas. Não é necessário nenhum conhecimento prévio das seqüências alvo, ao contrário da técnica de SSR, onde as seqüências flangeadoras da região de microssatélites devem ser conhecidas para a confecção dos pares de *primers*. Os produtos amplificados possuem entre 200 – 2000 pb e podem ser detectados em gel de agarose ou de poliacrilamida. Esta técnica possui alto potencial de detecção de polimorfismo devido ao fato das taxas evolutivas em regiões de microssatélites serem muito elevadas (Reddy *et al.*, 2002).

A aplicabilidade da técnica de ISSR é ampla: “*fingerprinting*” genômico, mapeamento do genoma, determinação da freqüência de motivos SSR, seleção assistida, biologia evolutiva e análise da diversidade genética (Reddy *et al.*, 2002). Considerando a análise da diversidade genética, a técnica ISSR-PCR vem sendo empregada em várias espécies de monocotiledôneas, tais como *Asparagus acutifolius* L. (Asparagaceae) (Sica *et al.*, 2005), *Psammochloa villosa* (Trin.) Bor. (Poaceae) (Li & Ge, 2001), *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter (Poaceae) (Assefa *et al.*, 2003).

Caiola *et al.* (2004) utilizou a técnica de RAPD para investigar a variabilidade genética em açafração (*Crocus sativus* L., Iridaceae) de diferentes países, e sua relação com outras espécies do mesmo gênero, em busca de sua ancestralidade e processos de especiação. Meerow *et al.* (2005) num estudo com *Iris hexagona* Walter, que apresenta uma ampla variação morfológica nas populações da Flórida, isolou e caracterizou dez *loci* de microssatélites nesta espécie. Wróblewska *et al.* (2003) aplicou o método RAPD-PCR para acessar a variabilidade intrapopulacional de *Iris aphylla* L, espécie perene e rizomatosa, considerada rara e em risco de extinção, o que permitiu a diferenciação de suas populações na Polônia, além de investigar o fluxo gênico existente.

No âmbito da ordem Asparagales, poucos estudos que acessam a diversidade genética empregando marcadores moleculares de DNA foram realizados. A grande maioria refere-se a

estudos filogenéticos e taxonômicos. Apesar da ampla aplicabilidade da análise de polimorfismos moleculares em espécies vegetais, percebe-se que a maioria dos estudos realizados focaram-se em plantas cultivadas, ou de elevado valor econômico, enquanto que espécies nativas com potencial pouco conhecido, como as do gênero *Sisyrinchium* permaneceram em segundo plano. Com isso, pouco conhecimento tem sido acumulado no sentido de se desvendar o potencial econômico de espécies nativas de biomas campestres brasileiros, as quais só serão bem compreendidas após a prospecção de estudos biológicos mais aprofundados, gerando conhecimento a cerca da sua reprodução, diversidade, distribuição, ecologia e conservação.

## **O GÊNERO *Sisyrinchium* L.**

### **COMPLEXIDADE TAXONÔMICA**

*Sisyrinchium* pertence à subfamília Iridoideae, tribo Sisyrinchieae (Presl, 1846). É um gênero com cerca de 200 espécies situadas, principalmente, nas Américas, sendo que algumas têm sido introduzidas ou dispersas em outras partes do mundo (Rudall *et al.*, 1986). Bentham & Hooker (1883) definiram quatro seções para o gênero: *Bermudiana*, *Echthronema*, *Eriphilema* e *Nuno*. Porém, Chauveau *et al.* (2011), com base na filogenia molecular do gênero, propuseram sete clados para o gênero.

Johnston (1938) enfatizou a América do Sul como o centro de origem e distribuição de *Sisyrinchium*. Este gênero tem sido enfoque de uma série de trabalhos de Ravenna (1968, 1981b, 2001, 2002a, 2002b), no entanto, tais estudos foram pouco esclarecedores, tendo em vista a falta de ilustrações e/ou chaves dicotômicas que contribuam para a determinação das espécies.

Embora a origem Sul-americana para *Sisyrinchium* seja sugerida com base na localização dos centros de diversidade do gênero (Cocucci & Vogel, 2001) e em estudos filogenéticos da família Iridaceae e da tribo Sisyrinchieae (Goldblatt *et al.*, 2008), a filogenia do gênero parece demonstrar um outro contexto, sugerindo que o gênero surgiu geograficamente entre a Bolívia e o Sudoeste dos Estados Unidos e teve dois grandes eventos de dispersão (Chauveau *et al.*, 2011).

A taxonomia de *Sisyrinchium* é notoriamente confusa (Cholewa & Henderson, 1984; Kenton *et al.*, 1986). Isto se deve especialmente à natureza herbácea e possivelmente autofértil da maioria de suas espécies, o que causa considerável variação entre, e uniformidade dentro das populações (Rudall *et al.*, 1986). Estudos realizados com este gênero reconhecem que o mesmo é constituído de membros com ampla variabilidade (Henderson, 1976). Alguns dos principais caracteres usados pelos taxonomistas para a determinação das espécies em *Sisyrinchium* são extremamente variáveis e geralmente de natureza quantitativa (ex. altura da planta), enquanto outros são praticamente invariáveis (textura da superfície do pólen) (Cholewa & Henderson, 1984).

Segundo Henderson (1976), os caracteres taxonômicos mais seguros são encontrados nas flores e na forma da haste, podendo estes ser associados ao número cromossômico e sistema de cruzamento. Nosso grupo de pesquisa tem verificado que o formato da espata, tamanho da flor, comprimento do pedúnculo e forma do fruto também são caracteres taxonômicos relevantes.

### **O “COMPLEXO *Sisyrinchium vaginatum*”**

*Sisyrinchium vaginatum* Spreng. caracteriza-se por ser uma planta herbácea, folhas caulinares e flores amarelas com tubo estaminal curto. Assim como *S. palmifolium* L., esta não apresenta glândulas ou tricomas no tubo estaminal, e seus polinizadores recebem como recompensa apenas pólen (Freitas & Sazima, 2003). Sua beleza incontestável está no conjunto das formas delicadas de sua estrutura vegetativa e de suas flores. *S. vaginatum* é a espécie do gênero com a maior distribuição geográfica dentro do Brasil, ocorrendo em praticamente todos os estados brasileiros. Sua ocorrência na América do Sul inclui países como Argentina, Bolívia, Equador, Guiana, Paraguai, Peru, Uruguai, Venezuela e Brasil (Chukr & Capellari Jr, 2003), embora espécies deste complexo sejam encontradas até o México.

Além do potencial ornamental de *S. vaginatum*, comum dentre a maioria das espécies deste gênero, muitas das espécies do gênero *Sisyrinchium* também são usadas popularmente como ervas medicinais. Outras espécies são citadas como fonte de alimento, ou também na medicina popular



por povos ameríndios, tal como *Sisyrinchium bellum* S. Watson (McClendon, 1921), ou são utilizadas na indução de aborto, para o controle de natalidade em algumas tribos indígenas da Califórnia (Strike, 1994 *apud* Adams & Garcia, 2006).

Em trabalhos sobre etnofarmacologia realizados por Mentz *et al.* (1997) e Dickel *et al.* (2007) *S. vaginatum* consta como erva de uso tradicional em Porto Alegre, sendo o decocto de seus rizomas utilizado como depurativo e diaforético (sudorífico). No entanto, não foram encontrados pelos autores, dados químicos e biológicos na literatura que corroborassem esses dados. No município de Alto Paraíso, Goiás, *S. vaginatum* é conhecida como capim-reis e é utilizada popularmente para o tratamento de febre, resfriados e disfunções intestinais (Souza & Felfili, 2006).

O escasso conhecimento, o potencial ornamental e farmacológico, além da importância ecológica da espécie são aspectos que devem ser levados em conta no incentivo deste estudo. A escassez de estudos genéticos e citogenéticos, também é evidenciada para esta espécie, apesar da importância destes na contribuição para o conhecimento taxonômico e evolutivo deste táxon.

A circunscrição de *S. vaginatum* é complicada e esta espécie é facilmente confundida com outras morfologicamente semelhantes, de tal forma que muitas exsicatas em herbários identificadas como “complexo *S. vaginatum*”. Em virtude deste polimorfismo morfológico encontrado nas análises deste táxon, preferiu-se utilizar a denominação de Johnston (1938). Apesar deste autor não ter revisado as espécies relacionadas a este complexo, pois considerou que um trabalho em separado seria necessário para as espécies do “complexo *S. vaginatum*”, esta foi certamente a revisão taxonômica mais relevante na circunscrição das espécies Sul-americanas do gênero.

Johnston (1938) propôs o agrupamento de 13 táxons, listados abaixo, na forma de um complexo taxonômico de espécies sob a denominação de “*Sisyrinchium vaginatum* and allies”:

*S. alatum* Hook.

*S. alatum* var. *minor* Rusby

*S. balansae* Baker

*S. distantiflorum* Kränzlin

*S. glaziovii* Baker

*S. incurvatum* Gardner ex Hook.

*S. mandonii* Baker

*S. marchio* (Vell.) Steud.

*S. parvifolium* Baker

*S. restioides* Spreng.

*S. sulcatum* Gillies ex Hook.

*S. vaginatum* Spreng.

*S. weirii* Baker

No entanto, Johnston (1938) certamente se equivocou ao colocar as espécies *S. mandonii* e *S. glaziovii*, pois estas não são relacionadas ao “complexo *S. vaginatum*”. Outros autores (Standley & Steyermark, 1952; Molina, 1975), também cometeram esse equivoco, indicando *S. convolutum* como pertencente ao complexo. Na realidade, duas destas espécies pertencem a um grupo taxonômico no qual comumente as espécies apresentam raízes tuberosas (Henrich & Goldblatt, 1987), como é o caso de *S. convolutum* e *S. mandonii*, sendo esta característica ausente entre os representantes do “complexo *S. vaginatum*”. Além disso, essas espécies apresentam-se como um grupo natural com ocorrência mais setentrional e compõem um clado basal distinto a *S. vaginatum* na filogenia do gênero (Chauveau *et al.*, 2011). Contudo, *S. glaziovii*, uma espécie sem raízes tuberosas, ainda permanece incerta quanto ao seu posicionamento filogenético, apesar disso, provavelmente não é relacionada ao clado onde encontram-se as espécies do “complexo *S. vaginatum*”.

Após a proposição do complexo, outras espécies foram descritas ou relacionadas a este complexo, sendo estas pertencentes a este grupo natural:

*Sisyrinchium ciliolatum* (Ravenna) Ravenna

*S. deflexum* R. C. Foster

*S. marchioides* Ravenna

*S. vaginatum* ssp. *perpruinatum* (Ravenna) Ravenna

*S. reitzii* R. C. Foster

*S. scalarium* Ravenna

*S. sinuosum* Ravenna

*S. sulcatum* Gillies ex Hook.

*S. tenuifolium* Humb. & Bonpl. ex Wild.

*S. tereticaule* Ravenna

Sprengel (1825) descreveu as espécies *S. vaginatum* e *S. restioides* em um único trabalho, depois disso, Beauverd (1905) propôs a inclusão da espécie *S. restioides* como uma subespécie de *S. vaginatum*, considerando que haviam muitas semelhanças florais e vegetativas entre os dois táxons. Vieira *et al.* (2003) propôs a emergência de *S. restioides* ao nível de espécie novamente, contudo, algumas das características descritas pelos autores como de maior relevância na diferenciação destas duas espécies não são compatíveis com as descrições originais nem com os holótipos originais para estas espécies (dados não apresentados). A presença de folhas basais nesta espécie, por exemplo, nem sempre é vista em condição natural, pois é uma característica muito plástica, assim como em outras espécies deste grupo onde isto também pode ocorrer. Como exemplo, em *S. balansae*, onde são encontradas plantas com e sem folhas basais numa mesma população.

Outra característica distintiva muito plástica e certamente artificial é a presença de nervura central ondulada nas tépalas de *S. vaginatum*. Isso se deve ao processo de herborização, não sendo visto em flores fixadas para a análise morfológica e nem em flores *in natura*, além disso, não houve reprodutibilidade desta característica em todas as exsicatas da mesma espécie. Contudo, a base do escapo de *S. restioides*, em geral é cilíndrica, contrastando com a base achatada encontrada em *S. vaginatum*. A posição do início da ramificação do escapo também é uma outra característica distintiva, geralmente, sendo no terço inferior em *S. vaginatum* e no terço superior em *S. restioides*.

As comparações morfológicas encontradas abaixo são baseadas na comparação entre as descrições originais (protólogos), holótipos, exsicatas das populações coletadas e consultas a herbários, realizada pelo grupo de pesquisa no qual insere-se este estudo.

As espécies *S. marchio* e *S. alatum* são igualmente muito semelhantes, porém a primeira possui os entrenós mais longos em comparação com a segunda. Além disso, a segunda apresenta as brácteas da espata de aspecto foliáceo, podendo ser facilmente confundidas com as folhas da planta, enquanto que a primeira apresenta brácteas espatáceas de textura coriácea, amplamente carenadas e sem prolongamento foliáceo.

Também há um grupo caracterizado por espécies que possuem inflorescências axilares, não apenas terminais como nos outros táxons deste complexo. Este é o caso de *S. balansae* e *S. parvifolium* Baker, os quais são muito similares, diferenciando-se pelo primeiro apresentar as folhas do escapo maiores, principalmente no terço inferior, e o escapo geralmente sinuoso. O segundo parece ser mais ereto que o primeiro.

A subespécie *S. vaginatum* ssp. *perpruinatum* apresenta seu hábito como principal característica na diferenciação destas duas subespécies, além de ser de menor porte, não possui a sinuosidade evidente nos ramos de *S. vaginatum* ssp. *vaginatum*.

*S. weirii* é caracterizado pelo seu porte compacto em relação às suas espécies mais similares (*S. marchio*, *S. alatum*, *S. marchioides*), dificilmente sendo confundido com outras espécies, possui ramos relativamente curtos encimados por espatas e flores grandes, raízes crassas e entrenós muito curtos.

A espécie *S. marchioides* é morfológicamente muito similar a *S. alatum*, *S. marchio* e *S. weirii*. Basicamente se diferencia destas pela presença de espatas menores que as de *S. alatum* e *S. marchio* e pelo porte maior e com ramos mais divididos que em *S. weirii*.

A espécie *Sisyrinchium palmifolium* é inclusa no “complexo *S. palmifolium*”, cujas espécies são relacionadas ao “complexo *S. vaginatum*” (Chauveau et al., 2011), contudo estes dois grupos não compartilham diversas características morfológicas, sendo facilmente distinguidos pela

presença de folhas basais desenvolvidas e em abundância, escapo áfilo e caule rizomatoso, características presentes no “complexo *S. palmifolium*”, que juntamente com várias outras espécies representam um outro grupo taxonômico, formado por um grande número de espécies taxonomicamente complicadas, tal qual no “complexo *S. vaginatum*”. Estes dois complexos formaram um clado monofilético na filogenia molecular do gênero, embora não tenha havido mistura entre as espécies dos dois complexos, não houve resolução para a separação em duas unidades taxonômicas distintas (Chauveau *et al.*, 2011). Isto provavelmente se deve ao baixo polimorfismo das sequências de DNA utilizadas, já que este parece ser um grupo de evolução muito recente.

Aparentemente, esta evolução recente pode ter coincido com as últimas glaciações pleistocênicas, ainda não bem avaliadas no hemisfério Sul, mas que representam uma escala de tempo relativamente recente e têm sido citadas como um dos mais importantes mecanismos de diversificação recente pelo isolamento seguido de especiação, teoria dos refúgios, principalmente na vegetação ao longo da costa Atlântica. A extensão e os efeitos dessa glaciação parecem não ter sido grandes em função da distribuição das terras e águas no hemisfério Sul, ou seja, por razões geográficas, contudo, desempenharam papel relevante no estabelecimento e distribuição fitogeográfica de populações vegetais no Sul do Brasil (Vieira & Rangel 1988).

Esses períodos glaciais provavelmente devem ter sido fundamentais na evolução desta seção, pois a ausência de folhas basais e o desenvolvimento de um caule aéreo na seção *Viperella* devem ter conferido alguma vantagem adaptativa com relação a uma maior eficiência energética na captação de energia luminosa. É importante salientar que essa é uma característica apomórfica no gênero e provavelmente seja uma sinapomorfia morfológica do “complexo *S. vaginatum*”.

Apesar do grande apelo ornamental de muitas das espécies que compõem o gênero *Sisyrinchium*, e da forte pressão antrópica que as mesmas vêm sofrendo, devido à destruição de seus habitats naturais, estudos sobre aspectos relevantes deste táxon praticamente se limitam às espécies

Norte-Americanas. Informações sobre estrutura populacional, modo de reprodução e, até mesmo número cromossômico, inexistem para grande parte das espécies nativas do Sul do Brasil.

## ESTUDOS CITOGENÉTICOS

O número cromossômico é o parâmetro mais utilizado na aplicação de informações citogenéticas em nível taxonômico, pois, com base no conjunto de dados das espécies e seus respectivos números em um determinado grupo, se pode deduzir o número cromossômico básico do táxon estudado (Raven, 1975), podendo ainda ser usado na construção de filogenias, embora, na maioria das vezes, estas não possam ser exclusivamente baseadas no número cromossômico (Guerra, 2008).

A comparação do número cromossômico de diferentes espécies de um determinado táxon possibilita a inferência de seu número cromossômico ancestral, definindo as possíveis linhagens cromossômicas derivadas durante a história evolutiva do grupo e ainda correlacionar essas diferentes linhagens com determinados grupos taxonômicos (Sybenga, 1992).

Informações citológicas quanto às espécies de Iridaceae ocorrentes na América do Sul são realmente escassas, principalmente para a tribo Sisyrinchieae (subfamília Iridoideae) (Goldblatt, 1982; Kenton *et al.*, 1986). Para a família, existe registro de números cromossômicos para cerca de 1330 espécies, o que corresponde a 65,5% do total de espécies, sendo estas, em sua maioria, espécies do Hemisfério Norte e África (Goldblatt & Takei, 1997). Entretanto, o número básico é incerto, e não há contagem cromossômica para *Isophysis*, o único gênero da subfamília Isophysioideae (Goldblatt, 1990; Kenton & Heywood, 1984). Nivenioideae apresenta número básico  $x=16$ , em *Aristea* e *Nivenia*, *Klattia* e *Witsenia*,  $x = 10$  para alguns dos gêneros de Ixioideae, e entre os gêneros de Iridoideae está *Moraea* com  $x = 10$  e  $x = 6$  como secundário,  $x = 19$  para *Libertia*,  $x = 27$  para *Orthrosanthus* (Goldblatt *et al.*, 1998; Goldblatt, 1982) e  $x = 9$  para *Olsynium*, este último foi descrito por Goldblatt (1982), como *Phaiophleps* Foster.

O gênero *Iris* apresenta um grande número tanto de poliplóides como de aneuplóides e displóides, e os números monoplóides mais comuns são  $x=12$  e 10. O número cromossômico básico em *Iris* é  $x = 12$ , sendo 10, 9 e 8 números básicos secundários (Goldblatt, 1990; Goldblatt *et al.*,1998).

O número cromossômico básico para a família Iridaceae não foi proposto no clássico trabalho de Raven (1975), por não haverem evidências suficientes para propor uma hipótese concreta para este grupo. A maioria dos números cromossômicos básicos em Iridaceae são relativamente altos, o que sugere um evento ancestral de poliploidia na evolução da família ou uma origem paleopoliplóide para a família (Goldblatt & Takei, 1997). A partir do resultado dos estudos citológicos realizados por Goldblatt (1982) foi proposto, para tribo Tigridieae (subfamília Iridioideae) a subdivisão em duas subtribos, Cipurinae e Tigriniieae, ambas exclusivas do Novo mundo (Goldblatt & Takei, 1997).

A poliploidia é a alteração cromossômica numérica mais importante na especiação e evolução vegetal (Stebbins, 1971), ocorrendo em 31% das pteridófitas, muito rara entre as gimnospermas, ocorrendo em 15% das angiospermas, embora altamente variável, onde 37% das eudicotiledôneas basais, 29% das monocotiledôneas basais e 46% das monocotiledôneas superiores apresentam especiação poliplóide (Wood *et al.*, 2009).

A determinação do conteúdo de DNA para espécies de plantas tem sido uma metodologia importante para a caracterização de genomas poliplóides, assim como, para inferências evolutivas em diversos grupos taxonômicos. Dessa forma, a Taxonomia é uma ciência que tem sido grandemente beneficiada pela utilização da citometria de fluxo na análise de níveis de ploidia e na evolução de genomas. Uma vez que a contagem cromossômica é uma metodologia muito laboriosa, apenas pode se analisar um número limitado de indivíduos, de tal forma que populações similares fenotipicamente, mas que diferem no nível de ploidia podem passar despercebidas (Misset & Gourret, 1996; Lysák & Doležel, 1998). Assim, a citometria de fluxo representa uma potencial ferramenta no estudo de estrutura e dinâmica em populações vegetais que apresentam indivíduos

com sistemas reprodutivos não-convencionais, como a agamospermia. Estas populações podem ser caracterizadas por várias micro-espécies que diferem em nível de ploidia (Renno *et al.* 1995). Contudo, variações citométricas, principalmente em hierarquias taxonômicas superiores, podem ser devido a uma real diferença em conteúdo e não em nível de ploidia, haja visto, que em muitas espécies ocorre redução do valor C sem variação numérica do complemento cromossômico diplóide. Apesar disso, a comparação entre a evolução do tamanho de genomas e formas de vida tem sido a resposta mais plausível a este fenômeno, como em *Allium* L., onde as espécies mais derivadas, mesmo quando poliplóides, apresentam valor C inferior às diplóides (Ricroch *et al.*, 2005).

Em complexos poliplóides, diferenças no número cromossômico, por serem características distintivas de natureza discreta, podem ser um fator relevante para se determinar novas espécies ou para se distinguir diferentes espécies (Guerra, 2008). Isso se deve ao fato de um poliplóide recente produzir um isolamento reprodutivamente perfeito para espécies simpátricas, de modo que o nível de ploidia seja frequentemente usado como um caráter discriminatório na delimitação taxonômica de espécies (Soltis *et al.*, 2003).

Em Iridaceae, número básico, nível de ploidia, comprimento e razão dos braços cromossômicos e quantidade de heterocromatina são características importantes para considerações sistemáticas e evolutivas. Os gêneros *Homeria* (Goldblatt, 1980), *Gelasine* (Kenton & Rudal, 1987) e *Eleutherine* (Guerra, 1988), por exemplo, têm sido caracterizados com base nesses parâmetros. A freqüente ocorrência em alguns grupos de cariótipos assimétricos do tipo bimodal é discutida por alguns autores como sendo um tipo de cariótipo mais recente e com origem a partir de cromossomos menores através de fusões cêntricas entre cromossomos do provável genoma ancestral (Goldblatt & Takei, 1993). Porém, dados filogenéticos recentes indicam que o aumento da bimodalidade ocorreu diversas vezes em diferentes linhagens (Goldblat *et al.*, 2008). A morfologia cromossômica variável de telocêntricos a acrocêntricos e metacêntricos e cariótipo bimodal é comum em representantes de Tigridieae, e tem sido utilizada na delimitação desse grupo (Kenton *et*



*al.*, 1990; Goldblatt & Takey, 1997; Reeves *et al.*, 2001). Nos neotrópicos, essa assimetria é observada especialmente nos gêneros *Eleutherine*, *Gelasine*, *Cipura* e *Alophia*.

Estudo realizado por Bocher (1966) em espécies neotropicais de Iridaceae revelou uma grande variação infragenérica em número e comprimento cromossômicos, posteriormente confirmados por Kenton & Heywood (1984). Nesse grupo, parece ser comum o aumento e redução do genoma durante a evolução da família (Goldblatt *et al.*, 1984). Em espécies de *Sisyrinchium*, muitos cariótipos apresentam cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos, enquanto poucos são metacêntricos, sendo que estes possuem maior conteúdo de DNA (Kenton *et al.*, 1986). Contudo, isso não se enquadra na regra de evolução cariotípica de Stebbins (1950), na qual espécies com cariótipo mais assimétrico são mais derivadas, pois para tanto é necessário que haja disploidia decrescente, em que o genoma disploide apresentará maior simetria devido a fusões entre cromossomos acrocêntricos a telocêntricos. Estes dados corroboram a hipótese de Narayan & Durrant (1983) de que genomas maiores estão relacionados a cariótipos mais simétricos. Neste caso, o cariótipo de *Sisyrinchium patagonicum* com  $2n=6x=64$  e cromossomos metacêntricos, além da poliploidia, também estaria relacionado a fusões cromossômicas.

### **CITOGENÉTICA DE *Sisyrinchium***

De acordo com Kenton *et al.* (1986), diferenças no tamanho do genoma podem ocorrer entre plantas anuais e perenes dentro de uma família. Com base nas escassas informações disponíveis de conteúdos de DNA em espécies anuais e perenes de *Sisyrinchium*, os autores sugerem que as espécies anuais tenderiam a apresentar genomas menores. Em espécies de outras famílias há relatos neste sentido e que sugerem que o genoma pequeno estaria relacionado com a velocidade requerida pelas plantas para completarem seu ciclo de vida (Bennett, 1972).

Kenton *et al.* (1986) descreveu uma forte relação entre peso das sementes e a quantidade de DNA nas espécies de *Sisyrinchium* do Hemisfério Sul, o que pode refletir diferenças no ciclo de vida. As espécies com menor conteúdo de DNA são plantas cujo crescimento ativo se dá no verão,

sendo estas sementes pequenas. Como consequência, esses mesmos autores reportaram que espécies com grandes órgãos de armazenamento tinham crescimento no outono ou no início da primavera, portanto sob condições de frio, com isso, tenderiam a apresentar maior quantidade de DNA e sementes maiores.

Apesar de *Sisyrinchium* ser o maior gênero desta tribo, muitas espécies ainda apresentam número cromossômico desconhecido, além disso, a maioria das espécies onde este caráter foi descrito são naturais da América do Norte. A partir dos estudos de Kenton *et al.* (1986) e Ruddal *et al.* (1986), o gênero é descrito como tendo cromossomos pequenos, números cromossômicos elevados e variáveis devido à poliploidia e à hibridação. Informações citológicas sobre a maioria das espécies deste gênero são geralmente restritas a números cromossômicos, sendo que apenas alguns kariogramas foram descritos até o momento (Kenton *et al.*, 1986), provavelmente, devido ao tamanho diminuto dos cromossomos da maioria de suas espécies. Goldblatt (1982) fez um estudo citológico das iridáceas neotropicais, embora não tenha analisado espécies de *Sisyrinchium*, compilou os dados que já haviam sido publicados até o momento e fez a primeira proposição do número cromossômico básico para este gênero, contribuindo muito para o conhecimento do número cromossômico em iridáceas neotropicais. Além disso, em seu trabalho ressaltou que em alguns casos de contagens prévias ao seu trabalho, a diversidade citológica seja provavelmente em função de contagens equivocadas, principalmente, devido a erros na determinação das espécies. No entanto, pela ausência de exsicatas representativas dos espécimes analisados em trabalhos anteriores, não se pode averiguar a veracidade das determinações.

Rudall *et al.* (1986), reportam que dentro da seção *Echthronema* as espécies são variáveis quanto ao número básico, nível de ploidia e tamanho cromossômico, sendo separadas em dois grupos com base no número básico ( $x = 8$  e  $x = 9$ ) e tamanho dos cromossomos (pequenos e variáveis). A variação no tamanho cromossômico é mais pronunciada entre os diplóides. Não se sabe se as diferenças citológicas estão relacionadas a mudanças morfológicas externas. Contudo, a

distinção citogenética pode ser correlacionada com o ciclo de vida e habitat preferencial em algumas espécies.

Segundo Goldblatt (1982) e Rudall *et al.* (1986), o nível de ploidia aumenta com a latitude: diplóides no México e Sul dos EUA, tetraplóides no Norte dos EUA, e aqueles com maiores níveis de ploidia (octa e dodecaplóides) no Canadá. Os altos níveis de ploidia em zonas temperadas do Hemisfério Norte podem indicar uma necessidade de aumento da heterozigosidade nas espécies colonizadoras.

O gênero *Sisyrinchium* apresenta extensa variação cromossômica numérica intragenérica, com  $x = 9$  como o número cromossômico básico e  $x = 8$  como um número monoplóide derivado (Goldblatt, 1982). No entanto, em vista da possível incorporação de *Olsynium* no gênero *Sisyrinchium* (Chauveau *et al.*, 2011), um novo panorama de evolução cariológica teria de ser analisado, já que este grupo forma um clado basal às espécies do gênero *Sisyrinchium* e possui um número cromossômico básico mais primitivo ( $x = 10$ ).

## JUSTIFICATIVA

Considerando a escassez de informações relativas à reprodução e diversidade genética das espécies do “complexo *Sisyrinchium vaginatum*”, principalmente quanto a aspectos morfológicos, citogenéticos, reprodutivos e moleculares, além da complexidade taxonômica associada a muitos dos grupos morfológicos encontrados entre as espécies do gênero *Sisyrinchium*, os estudos apresentados na presente dissertação poderão contribuir para uma melhor compreensão da taxonomia e divergência genética destas espécies.

Este projeto de pesquisa faz parte de um projeto mais amplo onde estão sendo investigados aspectos relacionados à filogenia, variabilidade genética, citogenética, biogeografia, biologia reprodutiva, interação com polinizadores, estudos morfo-anatômicos deste e de outros gêneros da família Iridaceae ocorrentes na América do Sul. Tais informações são fundamentais para a utilização e conservação destes recursos genéticos naturais.

O “complexo *Sisyrinchium vaginatum*” foi escolhido em função de ser um grupo de espécies pobremente estudado, embora seja comumente encontrado no Sul do Brasil e apresente uma grande diversidade de espécies nesta região. De forma que, este é um grupo taxonomicamente pouco resolvido, em função do padrão complexo de variação morfológica reportado por diversos autores (Chukr, 1992; Takeuchi *et al.*, 2008), no qual a sobreposição de medidas de estruturas vegetativas e reprodutivas tem dificultando a delimitação das suas espécies. Com isso, estudos moleculares e citogenéticos podem contribuir para uma maior delimitação taxonômica das espécies inseridas neste complexo.

## OBJETIVOS

Este trabalho tem como principal objetivo caracterizar as espécies componentes do “complexo *Sisyrinchium vaginatum*” ocorrentes no Sul do Brasil, aliando determinação do sistema de cruzamento com estudos moleculares e citogenéticos. A partir de tais investigações espera-se contribuir para uma melhor compreensão do enquadramento taxonômico destas espécies, assim como da biologia reprodutiva e evolução destas espécies.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar o número cromossômico de espécies do “complexo *Sisyrinchium vaginatum*” ocorrentes no Sul do Brasil;
- Determinar o conteúdo de DNA (valor C) através de citometria de fluxo de amostras das espécies do “complexo *Sisyrinchium vaginatum*”;
- Determinar o sistema reprodutivo da espécie *Sisyrinchium vaginatum* e relacioná-lo com aspectos morfológicos, moleculares e citogenéticos;
- Avaliar comparativamente a diversidade genética encontrada para os táxons pertencentes ao “complexo *Sisyrinchium vaginatum*” ocorrentes no Sul do Brasil inferida através de marcadores moleculares ISSR-PCR.

# CAPÍTULO II

**Diversidade genética em espécies do complexo *Sisyrinchium vaginatum* no Sul do Brasil (Iridaceae) através de marcadores ISSR e determinação do sistema reprodutivo em *S. vaginatum* Spreng.**

**Artigo a ser convertido para o Inglês, para sua submissão ao periódico *Plant Systematics and Evolution*.**

**Diversidade genética em espécies do complexo *Sisyrinchium vaginatum* no Sul do Brasil  
(Iridaceae) através de marcadores ISSR e determinação do sistema reprodutivo em *S.  
vaginatum* Spreng.**

Luis Brisolará-Corrêa, Lilian Eggers, Mardiore Pinheiro dos Santos, Eliane Kaltchuk-Santos,  
Tatiana Teixeira de Souza-Chies

**RESUMO** – O complexo *Sisyrinchium vaginatum* corresponde a um grupo de táxons morfológicamente heterogêneo, classificados na seção *Viperella* do gênero *Sisyrinchium*. Este trabalho teve como objetivos analisar a diversidade genética dos táxons que compõem o complexo *Sisyrinchium vaginatum* coletados no Sul do Brasil e determinar o sistema de cruzamento da espécie *S. vaginatum*. Foram analisados 103 indivíduos pertencentes a 13 espécies com relação à variabilidade genética intra e interespecífica. Para tanto, foram utilizados oito *primers* de ISSR que geraram um total de 156 fragmentos de DNA amplificados (280-2080 pb). Uma análise de agrupamento com base em dados de ISSR foi realizada pelo método de UPGMA. O dendrograma resultante mostrou um agrupamento formado pelas espécies *S. vaginatum*, *S. marchioides* e *S. restioides* que se separou distintamente das outras espécies analisadas. Além disso, este agrupamento apresentou os valores mais elevados de similaridade quando comparadas entre si, *S. vaginatum/S. marchioides* (0,93), *S. restioides/S. vaginatum* (0,92) e *S. restioides/S. marchioides* (0,907). Como esperado, o menor valor de similaridade foi obtido entre *S. marchio/S. palmifolium* (0,574), sendo o nó que separa *S. palmifolium* do grupo interno foi suportado pelo valor 100% de *bootstrap*. Os experimentos de determinação do sistema de cruzamento mostraram que *S. vaginatum* é auto-incompatível, já que suas flores não produziram frutos após autopolinização espontânea e induzida, enquanto que a média de frutos formados nas flores submetidas à polinização cruzada foi de 87%. Estes resultados demonstraram que existe uma grande diversidade

genética entre as espécies deste complexo, contudo, não houve uma diferenciação genética capaz de distinguir estas espécies em nível molecular.

**Palavras-chave:** Inter Simple Sequence Repeats; sistema reprodutivo; *Sisyrinchium* spp.; seção *Viperella*



**Genetic diversity among species of the *Sisyrinchium vaginatum* complex (Iridaceae) based on ISSR markers and mating system in *S. vaginatum* Spreng.**

**ABSTRACT** – *Sisyrinchium vaginatum* complex is a heterogeneous morphological group, represented by the section *Viperella* of the genus *Sisyrinchium*. The goal of this work was to analyze the genetic diversity among different taxa belonging to “*Sisyrinchium vaginatum* complex” collected in Southern Brazil and determine the mating system of *Sisyrinchium vaginatum*. Samples of 103 individuals belonging to 13 species were assessed to examine intra and interspecific diversity using eight ISSR primers that generated a total of 156 amplified fragments (280-2080 pb). A dendrogram constructed by UPGMA method based on ISSR data was used to obtain groupments among the studied taxa. A cluster with 98% of bootstrap distinguished *S. vaginatum*, *S. marchioides* and *S. restioides* from the remainder species. The highest similarity values among species were obtained for the comparison between *S. vaginatum*/*S. marchioides* (0.93), *S. restioides*/*S. vaginatum* (0.92), *S. restioides*/*S. marchioides* (0.907). As expected, the lowest similarity value was obtained between *S. marchio*/*S. palmifolium* (0.574), being the node that separate *S. palmifolium* of the “ingroup” supported by 100% of bootstrap. Results of the mating system experiments showed that *S. vaginatum* is self -incompatible, since its flowers did not set fruits after spontaneous and induced self-pollination, while the percentage of the average setting on cross-pollinated flowers was 87%. These results showed there is a great diversity among species of this complex, but there were not genetic differences able to discriminate these species on molecular level.

**Key-words:** Inter Simple Sequence Repeats; breeding system; *Sisyrinchium* spp.; section *Viperella*

## INTRODUÇÃO

O gênero *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) pertence à subfamília Iridoideae, inserida na tribo Sisyrinchieae e apresenta cerca de 200 espécies distribuídas, principalmente, nas Américas, sendo que algumas foram introduzidas ou se dispersaram por outras partes do mundo (Rudall et al. 1986). *Sisyrinchium* apresenta uma taxonomia infragenérica complicada (Cholewa e Henderson 1984), historicamente conturbada por diversas mudanças taxonômicas ocorridas e pela dificuldade na delimitação de espécies pertencentes a grupos taxonômicos complexos. Os motivos para esta complexidade taxonômica são diversos, contudo, processos de especiação recente e evolução reticulada são, provavelmente, os mais associados a este fenômeno (Stebbins 1970).

Segundo Henderson (1976), os caracteres morfológicos com maior valor taxonômico são encontrados em flores e no escapo floral, pois estas características são passíveis de associação a diferenças no nível de ploidia e sistema de cruzamento. Além disso, espécies autógamas apresentam alterações florais, tais quais como a perda da herco- dicogamia e redução perigonal. Observações comparativas realizadas com a espécie *Sisyrinchium vaginatum* e outras espécies que compõem o “complexo *S. vaginatum*” demonstraram que a espata, flor, pedúnculo e cápsula são os caracteres taxonômicos mais relevantes na diferenciação das espécies deste grupo taxonômico. No “complexo *S. vaginatum*” observa-se uma relativa estabilidade na morfologia floral, enquanto que características vegetativas sofreram uma diferenciação mais significativa durante a evolução do grupo.

Apesar da complexidade taxonômica encontrada neste grupo, *S. vaginatum* consta como uma espécie em perigo de extinção (World Conservation Monitoring Centre 2000), conforme critérios de categorização descritos pelo IUCN (International Union for Conservation of Nature). Contudo, a confusão devida aos problemas taxonômicos quanto à circunscrição da maioria das espécies que fazem parte do complexo *Sisyrinchium vaginatum* impede a determinação da categorização correta em que tais espécies se enquadram.

Tacuatiá (2008) analisando a diversidade genética em espécies do “complexo *Sisyrinchium micranthum*” encontrou uma variação molecular intrapopulacional superior à interpopulacional comparando populações de espécies simpátricas, sugerindo que estas evoluíram recentemente. Além disso, outros estudos realizados com este gênero demonstraram que o mesmo é constituído de populações com ampla variabilidade genética (Henderson 1976).

Poucos trabalhos têm sido realizados no sentido de acumular dados relativos à biologia reprodutiva de espécies sul-americanas deste gênero. Neste sentido, Freitas e Sazima (2003) analisaram o comportamento de polinizadores em uma população de *S. vaginatum* num campo de altitude localizado na Serra da Bocaina (entre os estados do Rio de Janeiro e São Paulo).

Com vista ao esclarecimento da natureza reprodutiva deste grupo, a determinação do sistema de cruzamento parece necessária para o entendimento de sua biologia e evolução, já que diversas espécies da América do Norte são caracterizadas como autógamias, enquanto que outras são alógamas (Mosquin 1970).

A evolução fenotípica deste grupo de espécies parece ter transcorrido de forma complexa, já que não foi acompanhada de significativa diferenciação genética. Isso foi demonstrado pela filogenia do gênero *Sisyrinchium* onde pouca resolução foi observada no clado contendo o “complexo *Sisyrinchium vaginatum*” e outras espécies do gênero (Chauveau et al. 2011) em função de um conteúdo informativo reduzido nas regiões analisadas.

Considerando os problemas no reconhecimento taxonômico das espécies componentes do complexo *Sisyrinchium vaginatum*, o desconhecimento das relações genéticas e evolutivas entre estes táxons e das descrições de plasticidade fenotípica que nortearam a proposição deste complexo de espécies, o presente trabalho teve como objetivos (1) desenvolver marcadores moleculares ISSR para diferenciação genética das diferentes espécies pertencentes ao “complexo *Sisyrinchium vaginatum*” encontradas no Sul do Brasil, (2) comparar geneticamente as espécies do complexo com uma espécie inter-relacionada (*S. palmifolium*) e (3) determinar o sistema reprodutivo para a espécie *S. vaginatum*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Para facilitar a compreensão dos resultados, características distintivas entre as espécies analisadas do complexo neste estudo estão apresentadas de forma comparativa (Tabela 1).

Amostras de 103 indivíduos, ao menos cinco indivíduos por espécie (Tabela 2), pertencentes ao complexo *Sisyrinchium vaginatum* foram coletadas durante as viagens a campo entre os anos de 2007 e 2010, em populações naturais nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (Brasil). Para cada ponto de coleta e cada espécie foi dado um número de coletor e coletada uma exsicata do espécime a ser analisado, a qual foi depositada no herbário ICN da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Além disso, também foram determinadas as coordenadas geográficas correspondentes à localização das populações pelo Sistema de Posicionamento Global, com auxílio de um aparelho GPS - Global Positioning System (Fig. 1). Amostras de tecido vegetal (ramos com folhas) foram coletadas, preparadas e acondicionadas em sacos plásticos contendo sílica gel, devidamente identificados com o número do coletor.

### Extração de DNA

Amostras de 10-50 mg de tecido vegetal foram preparadas e secas com sílica-gel, colocadas em almofariz, congeladas com nitrogênio líquido e maceradas até que se tornassem um pó fino. DNA genômico total foi extraído usando o protocolo de CTAB (hexadecyltrimethyl-ammonium bromide) de acordo com Doyle e Doyle (1987) modificado. Para determinação qualitativa do DNA, foi adicionado o corante intercalante de DNA Gel red para visualização do DNA por eletroforese em gel de agarose (1%), padrões de DNA lambda de concentração conhecida foram incluídos no gel para quantificação de DNA e comparação com os resultados obtidos por espectrofotometria. As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop) no comprimento de onda de 260 nm. A leitura  $A_{260/280}$  para cada amostra de DNA variou de OD 1,6 a 2,0.

## Seleção de *primers* e amplificação de DNA por PCR

Para os testes de seleção de *primers*, foram utilizados cinco indivíduos da espécie *S. vaginatum*. Os oito *primers* utilizados (Tabela 3) foram selecionados a partir de um conjunto de 26 *primers* de ISSR, com base no número de produtos amplificados, qualidade dos perfis eletroforéticos e reprodutibilidade dos produtos obtidos. Destes, seis *primers* foram de oligonucleotídeos ancorados na posição 3', (AG)<sub>8</sub>C, (CT)<sub>8</sub>G, (AC)<sub>8</sub>A, (TG)<sub>8</sub>A, (CA)<sub>8</sub>G, (GA)<sub>8</sub>T, e dois *primers* foram de oligonucleotídeos ancorados na posição 5', T(CA)<sub>8</sub> e A(TG)<sub>8</sub>, estes oito *primers* selecionados foram usados para a amplificação de todas as amostras. Também foram testadas as condições ótimas de amplificação do DNA, as quais foram determinadas testando-se diferentes concentrações de DNA (10 a 50 ng), cloreto de magnésio (1,5 a 5 mM) e *primers* (0,32 a 0,8 µM). A temperatura de anelamento variou de acordo com a composição dos *primers*, contudo foram realizados testes com temperaturas mais elevadas conforme a necessidade de aumento da estringência da reação para otimização do perfil eletroforético, estabelecendo-se essa temperatura de anelamento nas reações (Tabela 3). As reações de amplificação de PCR foram realizadas em um volume total de 25µL. As condições de reação otimizadas para cada *primer* variaram basicamente na concentração de cada *primer* (0,4 -0,8 µM), de cloreto de magnésio (2,4 -5mM), dNTP invitrogen<sup>TM</sup> Brasil (1,28 - 1,6 mM), tampão 1X, 1U de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec/Brasil) e 20 a 40 ng de DNA genômico.

As amplificações foram realizadas usando um termociclador (Applied Biosystems, AB-Veriti 96 Well Thermal Cycler) com uma desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguida por 40 ciclos. Cada ciclo foi constituído por uma desnaturação de 1 minuto a 94°C, seguida pela temperatura de anelamento, sendo que para as três temperaturas de anelamento utilizadas foram usados dois diferentes tempos (1minuto a 45°C ou 45 segundos para 48°C e 50°C), concluindo o ciclo por 2 minutos de extensão a 72°C. Uma extensão final por 5 minutos a 72°C foi incluída. Condições ótimas foram determinadas com base na resolução dos produtos de PCR gerados para cada *primer*. Um controle negativo que continha todos os componentes da reação de PCR com

exceção do DNA foi incluído em todos os experimentos. Os produtos de amplificação de PCR-ISSR foram corados com GelRed™ (0,5 mg/mL) e separados por eletroforese horizontal em gel de agarose (1,5%) dissolvido em tampão TBE (Tris/ácido bórico/EDTA) 1X (50mM Tris; 50 mM ácido bórico; 2,5 mM EDTA; pH8,3) sob uma corrente de 70 mA. Os géis de eletroforese foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta utilizando um fotodocumentador. O tamanho dos produtos amplificados foi determinado pela comparação com um marcador *ladder* de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec/Brasil).

### **Análise de dados**

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados como variáveis binárias, categorizadas em presença (1) ou ausência (0) para cada tamanho de fragmento amplificado. A matriz binária (1/0) foi usada para calcular a o coeficiente de identidade genética de Nei (1972, 1978) entre cada par de amostras e a estatística F com o programa TFPGA v. 1.3 (Tools for population Genetic Analyses) (Miller 1997). O número e a porcentagem de locos polimórficos, a identidade genética de Nei (1972), o índice de diversidade fenotípica de Shannon (Shannon e Weaver, 1949), a variação genética interespecífica (*Gst*) e a estimativa do número de migrantes (*Nm*) foram computados com o programa POPGENE v.1.32 (Yeh et al. 2000). Análises de variação molecular (AMOVA) e de componentes principais da variação foram realizadas no programa GenAlex v. 6.41 (Peakal e Smouse 2006). Todos os dados para as amostras de mesma espécie foram combinados para calcular a identidade genética ilustrada na Tabela 4. Um dendrograma foi construído utilizando o algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method arithmetic average) no programa NTSYS package (Rohlf 2001) O índice de diferenciação fenotípica de Shannon e a identidade genética de Nei foram selecionados para determinar a capacidade potencial de diferenciação genética entre os locos analisados. A discriminação potencial de cada *primer* foi expressa pelo coeficiente de Simpson  $h_j = \sum(1-p_i^2)/n$ , onde  $p_i$  é a frequência do alelo  $i$  e  $n$  corresponde ao número de locos detectados para cada *primer* (Hunter e Gaston 1988; Valk et al.

2005). O valor 1,0 indica que o *primer* é discriminante entre todas as amostras, e os valores 0,0 indicam que todas as amostras são idênticas.

A relação de similaridade entre as espécies foi estimada pela construção de um dendrograma usando o método UPGMA. Esta análise foi realizada utilizando o programa POPGENE, assumindo que todos os locos eram dominantes e estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O programa TFGA também foi utilizado na construção de um dendrograma pelo método UPGMA, este programa utilizou a correção de Linch-Milligan (1994) para calcular as frequências gênicas dos alelos recessivos, previamente ao cálculo das distâncias genéticas (Nei 1978), o teste de bootstrap com 1000 replicações foi realizado para determinar a consistência dos agrupamentos formados.

### **Experimentos de Biologia Reprodutiva**

Experimentos para verificação do sistema reprodutivo em *Sisyrinchium vaginatum* foram realizados com flores de 15 plantas provenientes de uma população natural localizada no Distrito de Monte Bonito, Pelotas, RS. As plantas coletadas foram cultivadas em vasos mantidos no telado do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

A definição de antese seguiu-se de acordo com Faegri e Pijl (1979), sendo esta correspondente ao período entre a abertura das tépalas e o início da senescência de estames e pistilos. A antese em *Sisyrinchium vaginatum* foi observada em 25 botões marcados individualmente. A receptividade dos estigmas florais foi analisada pela adição de uma gota de água oxigenada 10 volumes ( $H_2O_2$ ) sobre a superfície estigmática não injuriada, sob um microscópio estereoscópico; foi verificada a formação de bolhas na superfície estigmática quando esta apresentava-se receptiva a germinação dos grãos de pólen (Dafni 1992). As análises foram realizadas em botões florais (antes da antese), logo em seguida à antese, em flores de primeiro e segundo dias, assim como em flores colapsadas.

Os cruzamentos foram realizados em flores de plantas totalmente protegidas sob sacos de tule para impedir o acesso de visitantes, não sendo possível o isolamento de flores individuais devido à sensibilidade destas ao manuseio. Em cada experimento, pelo menos 30 flores foram

identificadas na fase de botão e utilizadas nos testes (Radford et al. 1974): (1) autopolinização espontânea, flores marcadas em pré-antese foram mantidas sem nenhum tratamento até a realização dos experimentos; (2) autopolinização induzida, flores marcadas em pré-antese foram polinizadas manualmente com seu próprio pólen; (3) polinização cruzada, flores marcadas em pré-antese foram polinizadas manualmente com pólen de outras plantas. Devido ao tamanho muito reduzido dos estames e à parcial fusão dos filetes (antera) com os estiletes (estigma) formando o tubo estaminífero, não foi possível a emasculação das flores, já que isso poderia acarretar na perda de estigmas florais, gerando falsos negativos no experimento de fecundação cruzada. Durante três dias (4, 5 e 6 de Janeiro de 2009), dez indivíduos foram marcados no campo e a cada 30 minutos foram realizadas observações sobre o padrão de antese floral, durante o intervalo das 10:00 às 19:00, totalizando 27 horas de observação. Estes experimentos foram realizados na Região serrana do município de Pelotas, RS (31°68'17,62"S/52°56'22,15"W).

## RESULTADOS

### Diversidade genética inferida por ISSR

As 103 amostras das espécies analisadas com os oito *primers* geraram um total de 156 fragmentos amplificados e a porcentagem de locos polimórficos variou de 95 a 100% com um polimorfismo global de 96,36%. Os fragmentos amplificados por ISSR geraram uma média de 19,5 produtos por *primer*, e o número de produtos amplificados por *primer* variou de 15 [(GA)<sub>8</sub>T] a 23 [(AG)<sub>8</sub>C e (TG)<sub>8</sub>A]. O tamanho dos produtos amplificados variou de 280 a 2080 pares de base (Tabela 3, Fig. 2). Os oito *primers* de ISSR utilizados apresentaram perfil altamente polimórfico, com fragmentos de DNA sendo amplificados em todas as espécies analisadas do “complexo *Sisyrinchium vaginatum*”. Todos os *primers* apresentaram habilidade discriminatória significativa, sustentada pelo coeficiente de Simpson variando de 0,6 [A(TG)<sub>8</sub>] a 0,81[(AC)<sub>8</sub>A] (média de 0,67) (Tabela 3). A proximidade genética inferida pelo índice de identidade genética de Nei para todas as



espécies par-a-par variou de 0,57 (*S. marchio/S. palmifolium*) a 0,93 (*S. vaginatum/S. marchioides*) (Tabela 4).

O número de locos polimórficos variou de 11 (ESC140, sp. nova 2) a 78 (*S. vaginatum*) e a porcentagem de polimorfismo para cada população variou de 8,03% (ESC140, sp. nova 2) a 50% (ESC546, *S. vaginatum*) (Tabela 5). A identidade genética de Nei variou de 0,1084 (ESC140, sp. nova 2) a 0,2117 (*S. palmifolium*), enquanto que, o índice de Shannon apresentou valores entre 0,15 (ESC140, sp. nova 2) e 0,3019 (*S. palmifolium*), mostrando uma alta correspondência entre os valores estimados pelos dois métodos.

Os maiores valores de similaridade foram obtidos das comparações entre as espécies *S. vaginatum/S. marchioides* (0,93), *S. restioides/S. vaginatum* (0,92), *S. restioides/S. marchioides* (0,907). Como esperado, o menor valor de similaridade foi obtido entre *S. marchio/S. palmifolium* (0,574), concordando com a taxonomia destes grupos, pois *S. palmifolium* não pertence ao complexo *S. vaginatum* e foi utilizado como “grupo externo” na análise. *S. palmifolium* compartilha muitas similaridades morfológicas, ecológicas e biogeográficas com a seção *Viperella* e encontra-se no mesmo clado que todos os táxons pertencentes ao complexo *S. vaginatum* (Chauveau et al. 2011).

Um dendrograma mostrando a diversidade entre as espécies foi construído (Fig. 3), o qual distintamente separou um agrupamento formado pelas espécies *S. vaginatum*, *S. marchioides* e *S. restioides*. A espécie *S. marchioides* é um tetraplóide ( $2n = 4x = 36$ , veja Fig. 3) que apresenta alta variabilidade genética e, aparentemente, compartilha grande parte de sua diversidade com as espécies *S. vaginatum* e *S. restioides*, a julgar pelo elevado valor de *bootstrap* (98%) que suporta este grupo e os altos índices de similaridade genética com estas espécies. Os maiores níveis de polimorfismo intrapopulacional foram encontrados para os acessos de *S. vaginatum* (50%), enquanto que o menor índice foi encontrado em uma população da espécie nova 2 (9,08%). As duas populações analisadas da espécie *S. alatum* foram muito similares em todos os perfis analisados e

apresentaram um polimorfismo muito baixo (19,87 e 14,74%) em relação a todas as outras espécies analisadas.

A análise de componentes principais da variação evidenciou três dos componentes [1 (40,62%), 2 (14,77%) e 3 (13,74%)] sendo responsáveis por 69,13% de toda a variação encontrada, o componente principal 1 separa todas as populações de Santa Catarina e do Paraná, enquanto que a combinação do componente principal 1 e 2 separam um quadrante, praticamente, restrito às populações de Santa Catarina e Paraná (Fig. 4). A análise de variação molecular implementada no GenAlex obteve um valor de  $\Phi_{st}$  igual a 0,4846 ( $P < 0,001$ ), o que significa que aproximadamente 48% de toda a diversidade genética está contida entre as populações, enquanto que o restante (52%) é mantido em nível intrapopulacional. A análise de variação molecular realizada no programa TFPGA mostrou uma porcentagem similar àquela calculada pelo GenAlex, com a variação genética entre as espécies igual a 0,4934, considerada uma diferenciação genética moderada e significando que em média 51% da variação existiu dentro das populações. Apesar disso, com o uso de outra análise de variação interpopulacional, baseada na análise da diversidade genética de Nei em populações subdivididas, mensurada pela diferenciação entre as populações ( $G_{st}$ ) foi gerada pelo programa POPGENE e revelou que 0,5920 ( $P < 0,001$ ) da variação reside dentro das populações, ou seja, apenas 41% da variação foi interpopulacional. Embora este valor mais elevado, estes diferentes testes tem demonstrado que a variação intrapopulacional é realmente superior àquela encontrada entre as populações. Foi estimado também o número de migrantes ( $N_m$ ), calculado com base no valor de  $G_{st}$  pelo programa POPGENE, como uma forma de estimar o fluxo gênico entre estas populações, estimando como 0,3447 indivíduos migrantes entre as populações por geração.

A análise do dendrograma, gerado pelo programa NTSYS, mostra as relações individuais dentro e entre as populações analisadas, evidenciando que indivíduos da mesma população agruparam-se em conjunto (Fig. 5). Contudo, acessos da mesma espécie, algumas vezes, não se agruparam.

## **Biologia Reprodutiva**

*Sisyrinchium vaginatum* é uma espécie com flores hermafroditas, amarelas, de 1 - 1,5 cm de diâmetro, com aspecto radial, possui tubo estaminífero glabro e anteras inseridas abaixo da ramificação do estilete. Caracterizada pela ausência de folhas basais e pelo escapo floral com pelo menos cinco folhas invaginantes ao longo de seu eixo e apresentando apenas inflorescências terminais.

A espécie *S. vaginatum* floresce praticamente o ano todo na população natural analisada, excetuando-se os meses de junho e julho quando se encontra em período vegetativo, com uma maior densidade de floração nos meses de setembro a dezembro. A antese floral teve duração de até três dias, com cada flor abrindo-se e fechando-se dia após dia, até a sua polinização ou senescência no terceiro dia. No primeiro dia, as flores iniciaram a abertura a partir das 11 horas (horário do sol), sendo que entre 11 e 13h, todas as flores estavam completamente abertas. Às 13h todas as flores apresentavam anteras já deiscentes. Além disso, são protogínicas, apresentando maturação do estigma antes à deiscência das anteras, contudo a reação de receptividade estigmática foi mais evidente após algumas horas de abertura e nos dias consecutivos. As flores começaram a se fechar às 16 horas (com uma variação das 15 às 18 horas). Os estigmas permanecem receptivos após o fechamento das flores. As flores de segundo e terceiro dias também iniciaram sua abertura entre 11 e 12h e o fechamento a partir das 16 horas em média, sendo que após às 18h não foram observadas flores abertas. A deiscência das anteras foi do tipo rimosa longitudinal, iniciando a deiscência do ápice em direção à base da antera. A deiscência ocorreu logo após a antese floral, com exceção de dias chuvosos, quando não houve liberação do pólen.

Os experimentos de autofecundação espontânea e induzida não produziram frutos (Tabela 6). O experimento de fecundação cruzada apresentou uma taxa de formação de frutos elevada (89,58%). A maturação dos frutos (cápsulas) foi observada de três a quatro semanas após as polinizações realizadas para a determinação do sistema de cruzamento, quando estes apresentaram coloração alvo-esverdeada e superfície lisa, com exceção da região delimitada pela constrição do

hipanto, onde ocorre o início da deiscência do fruto, esta se apresenta levemente corrugada, com isso, a deiscência das cápsulas é apical em *S. vaginatum*, com dispersão autocórica das sementes.

## DISCUSSÃO

Os resultados relativos à diversidade genética no “complexo *Sisyrinchium vaginatum*” sugerem que há uma diferenciação em *Sisyrinchium alatum* com relação às outras espécies, apresentando uma menor porcentagem de polimorfismo intrapopulacional (Tabela 5), isso pode ser devido ao seu sistema reprodutivo. Reduções na variabilidade genética também são encontradas em outras espécies devido a mudanças no sistema reprodutivo, como em populações de *Clarkia tembloriensis* Vasek. (Onagraceae), analisadas por Holtsford e Ellstrand (1989), que utilizando isoenzimas, observou que havia uma forte influência do sistema reprodutivo sobre a distribuição da variação genética entre e dentro de suas populações. Neste caso, as populações de polinização aberta apresentavam maior variação genética e uma menor diferenciação entre as populações do que as populações autógamas. Isso parece ser compatível com a estratégia encontrada em *Sisyrinchium*, pois o padrão de variação encontrado para o “complexo *S. vaginatum*” sugere uma alta variabilidade genética intrapopulacional associada a uma baixa diferenciação genética interpopulacional. Tacuatiá (2008) reporta um padrão semelhante para *Sisyrinchium micranthum* Cav. utilizando marcadores ISSR, onde apenas 30% da variação foi encontrada entre as populações analisadas, apesar de serem populações simpátricas. Além disso, Marco et al. (2009) usando marcadores ISSR evidenciaram que existe uma alta estruturação genética entre duas populações de *Cypella fucata* Ravenna encontrando apenas 8,51% da variação entre duas populações alopátricas.

A não formação de frutos nos autocruzamentos indica a existência de um mecanismo genético de auto-incompatibilidade, provavelmente gametofítico, já que a auto-incompatibilidade esporofítica está, em geral, associada com pólen trinucleado, que não ocorre em *Sisyrinchium*.

Com isso, as duas populações de *S. alatum* com uma distância geográfica de pelo menos 120 Km, apresentavam polimorfismo e variação muito similar, além dos perfis eletroforéticos, que para dois *primers* foram praticamente idênticos.

O número estimado de migrantes ( $Nm$ ) foi muito similar aquele encontrado por Zhang et al. (2006) para uma espécie autógama da China, a qual é descrita pelos autores como apresentando isolamento reprodutivo entre as populações analisadas. Da mesma forma, a maioria das espécies do “complexo *S. vaginatum*” foram amostradas de diferentes regiões do Sul do Brasil, sendo o isolamento reprodutivo esperado neste caso.

*Sisyrinchium weirii* ( $2n = 6x = 54$ ) apresentou um dos mais elevados números de locos polimórficos, isso pode ser devido ao seu alto nível de ploidia e heterozigosidade fixada. As espécies diplóides e poliplóides deste complexo que ocorrem no estado do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná não formaram nenhum agrupamento específico contendo apenas um nível de ploidia, estando os três poliplóides distribuídos pelo dendrograma, *S. marchio* ( $2n = 4x = 36$ ) na base, *S. weirii* ( $2n = 6x = 54$ ) no centro e *S. marchioides* ( $2n = 4x = 36$ ) no topo. Apesar disso, a filogenia do gênero *Sisyrinchium* publicada recentemente, (Chauveau et al. 2011) apresentou um clado agrupando estas três espécies poliplóides, embora todo o clado que envolvia os complexos *S. vaginatum* e *S. palmifolium* tenha apresentado uma resolução muito baixa, sendo o grupo com a menos resolvido em toda a filogenia.

As espécies *S. parvifolium* e *S. balansae* se mantiveram associadas, algo esperado, já que ambas compartilham um caráter morfológico bem definido neste grupo que são as flores axilares, assim, poucas espécies apresentam esta característica, no entanto a similaridade estimada não foi muito alta (0,786).

Segundo Wong et al. (2001) a altitude pode desempenhar um importante fator evolutivo na seleção natural em subespécies de bananeira na Malásia, demonstrando que a diferenciação genética de algumas subespécies de banana foi evidenciada através de dados moleculares obtidos por marcadores AFLP. Da mesma forma, em espécies de *Sisyrinchium*, a altitude parece ser um fator

que favorece a especiação, concentrando os maiores níveis de ploidia encontrados no “complexo *S. vaginatum*” e muitas espécies que não ocorrem em regiões de menor altitude.

As análises de componentes principais da variação mostraram que considerando o componente principal 1, existe uma separação em que todos os poliplóides e alguns diplóides estão num conjunto e um outro conjunto que apresenta apenas diplóides do Rio Grande do Sul.

Em espécies perenes, a variabilidade dentro das populações tende a ser maior que a variação entre as populações, contudo outros fatores podem alterar esse padrão. A estrutura genética de populações naturais é fortemente afetada por fatores intrínsecos, assim como, capacidade migratória, sistema de cruzamento e fatores extrínsecos incluindo características ecológicas de seus habitats e eventos históricos (Xiao et al. 2004). Esse parece ser o caso da espécie nova 2 (LBC01/ESC140), a qual é de ocorrência, até o momento, endêmica pois foi encontrada apenas no Morro Santana, cujas amostras das duas coletas analisadas apresentaram uma diversidade genética menor que a maioria das outras espécies. Por evidência morfológica se estima que esta espécie seja alógama, com isso, essa variabilidade genética reduzida, provavelmente, pode ser devido a um evento de efeito do fundador, já que as populações desta espécie estão restritas a uma pequena área (Morro Santana, Porto Alegre) e sofrem forte pressão antrópica, em função dos incêndios criminosos que anualmente atingem estas populações durante seu período reprodutivo.

As espécies que apresentaram menor diversidade intrapopulacional foram coletadas em campos de regiões com maior altitude. Em altitudes elevadas há uma tendência de decréscimo na diversidade de abelhas polinizadoras (Vogel 1978), esse pode ser um dos motivos para a baixa variabilidade evidenciada. Freitas e Sazima (2003) descrevem uma dominância de polinizadores sirfídeos tendo sido visualizada apenas uma abelha durante as análises de observação focal. Isso é compatível com o conhecimento existente quanto à redução altitudinal nas assembléias de abelhas polinizadoras.

Embora Freitas e Sazima (2003) tenham descrito aspectos relacionados à biologia da polinização em *S. vaginatum*, aparentemente, a população analisada não parece ser de *Sisyrinchium*

*vaginatum sensu* Sprenger, já que o tamanho das flores descritas em seu estudo era muito maior que o característico para a espécie, sendo provavelmente outra espécie do complexo. No presente trabalho as flores apresentaram um diâmetro entre 1,0 e 1,5 cm quando as tépalas estavam completamente expandidas, concordando com a descrição do protólogo, além de outras características vegetativas também concordantes. *S. vaginatum* foi constatada ser uma espécie auto-incompatível, sendo a fertilização desta espécie, conseqüentemente, dependente de visitas de polinizadores. Além disso, *Sisyrinchium vaginatum* apresenta como único recurso ao polinizador, o pólen, observações a campo evidenciaram que a espécie parece ser visitada tanto por sirfídeos como por pequenas abelhas coletoras de pólen (Fig. 6) (Brisolara-Corrêa e Pinheiro, dados não publicados), sendo ambos potenciais polinizadores, embora as abelhas sejam mais eficientes. Provavelmente, as abelhas serão mais efetivas na polinização que os sirfídeos, e contribuirão com uma maior taxa de cruzamento entre indivíduos diferentes e não aparentados, favorecendo o incremento de variabilidade intrapopulacional. Tal fato se deve ao comportamento e morfologia das abelhas, por fazerem vôos cíclicos e carregarem uma grande carga polínica em suas cerdas, enquanto que os sirfídeos não têm comportamento associado a vôos cíclicos e apenas carregam pólen na sua probóscide. Tais dados são preliminares e resta ainda muito a se descrever sobre interações entre as assembléias de polinizadores e as diferentes espécies de *Sisyrinchium*, suas variações sazonais e regionais em vista da ampla distribuição geográfica e longo período de floração destas espécies. Para as espécies de *Sisyrinchium* da América do Norte, já foram observadas abelhas solitárias da família Megachilidae (Henderson 1976) e Halictidae (Cholewa e Henderson 1984) como polinizadores, assim como para *Sisyrinchium palmifolium* na Argentina (Cocucci e Vogel 2001). Além disso, polinização via pequenas abelhas coletoras de pólen foi registrada para *S. vaginatum* durante o verão em uma região de cerrado de Minas Gerais (Barbosa 1997), enquanto Freitas e Sazima (2003) observaram durante o inverno na Serra da Bocaina que os sirfídeos, ao invés de abelhas, foram os principais polinizadores, devido a sua alta freqüência na assembleia de polinizadores. Isto pode estar relacionado ao fato de que durante o inverno há um

decréscimo na diversidade e número de abelhas, no entanto, o pico de florescimento na área estudada foi durante o inverno, ao contrário de outras regiões, onde o pico de florescimento ocorre na primavera e verão. Quanto ao padrão de antese floral, há uma concordância com trabalhos anteriores, que mostram que as espécies que apresentam flores de pólen, tendem a uma antese vespertina (tarde), como citado para *S. vaginatum*, entre 13 e 15h na Serra da Bocaína (Freitas e Sazima 2003) e 15:30h para *S. palmifolium* na Argentina (Cocucci e Vogel 2001). Apesar disso, espécies de *Sisyrinchium* com elaióforos (tricomos com produção de lipídeos que servem como recompensa aos polinizadores) tendem a uma antese matutina (manhã) como o que ocorre em *S. micranthum* (Truylio et al. 2002).

Sobre a pouca diferenciação floral encontrada entre as espécies do “complexo *S. vaginatum*”, estima-se que sua síndrome de polinização caracterizada pela baixa especificidade por polinizadores, tanto sirfídeos como espécies de abelhas coletoras de pólen, pode ser o motivo desta característica. De acordo com Stebbins (1970) a especiação é conseqüentemente seguida por divergência morfológica, seja devido à seleção natural ou deriva genética, nesse caso, há uma pressão seletiva para a manutenção desta síndrome de polinização e contrária a fixação de mudanças morfológicas em função da deriva genética, já que mudanças florais são associadas com novas estratégias reprodutivas. Se o principal mecanismo de diversificação morfológica, a deriva genética, estivesse atuando, as mudanças florais, provavelmente trariam menos benefícios que a manutenção do modelo de estratégia reprodutiva vigente.

Aparentemente, a única barreira de especificidade é o tamanho de abelha passível de realizar a polinização, pois a flor não suportaria o peso de insetos maiores, de forma que quando pousassem, não conseguiriam acessar seu recurso floral.

Apesar da pouca diferenciação floral encontrada neste complexo, diferenças vegetativas são marcantes, contribuindo com uma ampla diversidade morfológica que caracteriza a maioria das espécies deste complexo.



Os resultados obtidos permitiram um melhor conhecimento da diversidade genética entre algumas espécies do gênero *Sisyrinchium* ocorrentes no Sul do Brasil e contribuíram para o reconhecimento da existência de duas novas espécies pertencentes ao “complexo *S. vaginatum*”. Outros estudos devem ser realizados, principalmente na determinação das espécies de sirfídeos e abelhas que polinizam estas espécies, assim como a variação espacial temporal encontrada nestas assembléias de polinizadores.

## REFERÊNCIAS

- Barbosa A (1997) Biologia reprodutiva de uma comunidade de campo sujo, Uberlândia, MG. D. Sc. Dissertation, Universidade Estadual de Campinas
- Brisolara-Corrêa L (2011) Diversidade genética do complexo *Sisyrinchium vaginatum* (Iridaceae): aspectos moleculares e citogenéticos. M. Sc. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- Chauveau O, Eggers L, Raquin C, Silvério A, Brown S, Couloux A, Cruaud C, Kaltchuk-Santos E, Yockteng R, Souza-Chies TT, Nadot S (2011) Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogeny of the genus. *Ann Bot* 107:1287-1312
- Cholewa AF, Henderson DM (1984) Biosystematics of *Sisyrinchium* section *Bermudiana* (Iridaceae) of the Rocky Mountains. *Brittonia* 36(4):342-363
- Cocucci AR, Vogel S (2001) Oil-producing of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. *Flora* 196:26-46
- Dafni A (1992) *Pollination ecology: a practical approach*. IRL, New York
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15
- Faegri K, Pijl L (1979) *The principles of pollination ecology*. 3rd edn. Pergamon Press, Oxford
- Freitas L, Sazima M (2003) Daily blooming pattern and pollination by syrphids in *Sisyrinchium vaginatum* (Iridaceae) in southeastern Brazil. *J Torrey Bot Soc* 130(2):55-61
- Goldblatt, P. 1990. Phylogeny and classification of Iridaceae. *Ann MO Bot Gard* 77:607-627.

- Henderson DM (1976) A biosystematic study of Pacific Northwestern blue-eyed grasses (*Sisyrinchium*, Iridaceae). *Brittonia* 28:149-176
- Holtsford TP, Ellstrand NC (1989) Variation in outcrossing rate and population genetic structure of *Clarkia tembloriensis* (Onagraceae). *Theor Appl Genet* 78:480-488
- Hunter PR, Gaston MA (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26:2465-2466
- Kenton AY, Rudall PJ, Johnson AR (1986) Genome size variation in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) and its relationship to phenotype and habitat. *Bot Gaz* 147:342-354
- Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3:91-99
- Marco EG, Tacuatiá LO, Eggers L, Kaltchuck-Santos E, Souza-Chies TT (2009) Genetic variability within *Cypella fucata* Ravenna in Southern Brazil. In: Mahoney CL, Springer DA (ed) *Genetic Diversity*, 1st edn. Nova Publishers, New York, pp 1-17
- Miller MP (1997) TFPGA- Tools for populations genetics analyses, version 1.3. A Window program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. <http://www.marksgeneticsoftware.net/> Accessed 30 January 2011.
- Mosquin T (1970) Chromosome number and a proposal for classification in *Sisyrinchium* (Iridaceae). *Madroño* 20:269-275
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106:283-292
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590

- Peakall R, Smouse PE (2006) Genalex 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288–295
- Radford AE, Dickinson WC, Massey JR, Bell CR (1974) *Vascular plant systematic*. Harper & Row Publishers, New York
- Ravenna P (2002a) Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* – VIII. *Onira, Botanical Leaflets*, 6(7):48-58
- Ravenna P (2002b) Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* – IX. *Onira, Botanical Leaflets* 7(6):20-29
- Ravenna P (2003) Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* – IV. *Onira, Botanical Leaflets* 8(13):48-54
- Rohlf FJ (2001) *NTSYS-pc: Numeral Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1*. Exeter Software, New York, USA
- Rudall P, Kenton AY, Lawrence TJ (1986) An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied genera. *Bot Gaz* 147(4):466-477
- Shannon CE, Weaver W (1949) *The Mathematical Theory of Communication*. Urbana, University of Illinois Press
- Stebbins GL (1970) Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annu Rev Ecol Syst* 1: 307-326.
- Tacuatiá LO (2008) Variabilidade Genética e Biologia de *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae). M. Sc. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

- Truylio B, Harter-Marques B, Engels W (2002) Biologia floral e polinização de *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) na região do planalto das araucárias do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* 10:11-24
- Valk HA, Meis JFGM, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CHW (2005) Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 43:4112-4120
- Vogel S (1978) Evolutionary shifts from reward to deception in pollen flowers. In: *The pollination of flowers by insects* (A.J. Richards, ed.). Academic Press, London
- Wong C, Kiew R, Loh JP, Gan LH, Set O, Lee SK, Lum, S., Gan YY (2001) Genetic diversity of the wild banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as evidenced by AFLP. *Ann Bot* 88:1017-1025
- World Conservation Monitoring Centre (WCMC) (2001) A preliminary list of Rare or endangered Iridaceae species. *Annali di Botanica* 1(2):184-209
- Xiao LQ, Xuejun G, Gong X, Hao G, Zheng SX (2004) ISSR variation in the Endemic and Endangered Plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Ann Bot* 94:133-138
- Yeh FC, Yang R-C, Timothy BJ, Boyle Z-H, Ye Z, Xiyang JM (2000) POPGENE version 1.32, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada
- Zhang L, Li GJ, Li HT, Chen J, Li DZ (2006) Genetic diversity and geographic differentiation in *Tacca chantrieri* (Taccaceae): an autonomous selfing plant with showy floral display. *Ann Bot* 98:449-457

**Tabela 1** Principais características morfológicas de valor diagnóstico na determinação das espécies do “complexo *Sisyrinchium vaginatum*”, de acordo com as análises morfológicas realizadas por nosso grupo de pesquisa.

<b>Espécie</b>	<b>Folha</b>	<b>Espata</b>	<b>Pedúnculo</b>	<b>Pedicelo</b>
<i>Sisyrinchium marchio</i> (Vell.) Steud.	desenvolvidas, com ápice agudo e encurvado	grande com ápices justapostos	alongado e amplamente alargado	ereto e curto
<i>S. balansae</i> Baker	ensiformes a escamiformes	pequena com ápices desencontrados	curto e medianamente alargado	ereto e curto
<i>S. vaginatum vaginatum perpruinatum</i> Ravenna	escamiformes	pequena com ápices desencontrados	alongado e levemente alargado	ereto
<i>S. vaginatum vaginatum</i> Spreng.	pequenas a escamiformes	pequena com ápices desencontrados	alongado e levemente alargado	curvo e desenvolvido
<i>S. parvifolium</i> Baker	escamiformes	pequena com ápices desencontrados	alongado e medianamente alargado	ereto e desenvolvido
<i>S. restioides</i> Spreng.	escamiformes ou muito reduzidas	pequena com ápices desencontrados	alongado e delicado	curto
sp. nova1 (ESC383)	desenvolvidas, pequenas e com ápice encurvado	pequena com ápices convergentes	curto e levemente alargado	curto
sp. nova2 (ESC140)	desenvolvidas, com ápices agudos e encurvados	mediana, de aspecto foliáceo e com ápices altamente desencontrados	alongado e medianamente alargado	curvo e curto
<i>S. marchioides</i> Ravenna	desenvolvidas, com ápice agudo e encurvado	mediana com ápices justapostos	alongado e medianamente alargado	ereto e longo
<i>S. weirii</i> Baker	desenvolvidas, com ápice agudo e encurvado	grande com ápices justapostos	curto e medianamente alargado	ereto e curto
<i>S. alatum</i> Hook.	desenvolvidas, com ápice arredondado e encurvado	grande, de aspecto foliáceo e ápices divergentes	muito curto e altamente alargado	curto
sp. nova 3 (LBC06)	pequenas a escamiformes	pequena com ápices convergentes	alongado e levemente alargado	curvo e curto

**Tabela 1** Continuação... Principais características morfológicas de valor diagnóstico na determinação das espécies do “complexo *Sisyrinchium vaginatum*”, de acordo com as análises morfológicas realizadas por nosso grupo de pesquisa.

<b>Espécie</b>	<b>Hábito</b>	<b>Porte/ ramificação</b>	<b>Flor</b>	<b>Cápsula</b>
<i>Sisyrinchium marchio</i> (Vell.) Steud.	ereto	grande/pouco ramificado	terminais e grandes	globosa grande
<i>S. balansae</i> Baker	ereto a decumbente	grande/ramificado	terminais e axilares de tamanho médio	subglobosa pequena
<i>S. vaginatum vaginatum perpruinatum</i> Ravenna	ereto	pequeno/pouco ramificado	terminais e pequenas	subglobosa pequena
<i>S. vaginatum vaginatum</i> Spreng.	decumbente	médio/muito ramificado	terminais e pequenas, nunca com centro castanho	subglobosa pequena
<i>S. parvifolium</i> Baker	ereto a decumbente	grande/ramificado	terminais e axilares de tamanho médio	subglobosa pequena
<i>S. restioides</i> Spreng.	decumbente	grande/muito ramificado	terminais e pequenas	subglobosa pequena
sp. nova1 (ESC383)	decumbente	pequeno/ramificado	terminais e pequenas	subglobosa pequena
sp. nova2 (ESC140)	decumbente	grande/muito ramificado	terminais e pequenas	subglobosa pequena
<i>S. marchioides</i> Ravenna	ereto	médio/ramificado	terminais e grandes	subglobosa média
<i>S. weirii</i> Baker	ereto	pequeno a médio/ramificado	terminais e grandes	subglobosa grande
<i>S. alatum</i> Hook.	ereto	médio/raramente ramificado	terminais e grandes	elíptica grande
sp. nova 3 (LBC06)	ereto	pequeno/pouco ramificado	terminais e pequenas	subglobosa pequena

**Tabela 2** Dados sobre as espécies coletadas do complexo *Sisyrinchium vaginatum*.

Espécie	População (voucher)*	N	Altitude	Latitude	Longitude	Localidade
<i>Sisyrinchium marchio</i> (Vell.) Steud.	ESC318	5	975	26° 10' 15,2"	49° 14' 4,6"	Campo Alegre, SC
<i>S. balansae</i> Baker	ESC464	5	895	29° 29' 11,9"	50° 13' 15,6"	São Francisco de Paula, RS
<i>S. vaginatum vaginatum</i> <i>perpruinatum</i> Ravenna	ESC228	5	---	27° 43' 35,2"	50° 20' 07,6"	Lages, SC
<i>S. vaginatum vaginatum</i> Spreng.	ESC555	5	355	29° 02' 56,9"	55° 06' 17,3"	Unistalda, RS
	ESC546	5	112	28° 35' 39,4"	55° 38' 49,3"	Santo Antônio das Missões, RS
	ESC476	5	72	31° 48' 58,0"	52° 36' 53,4"	Capão do Leão, RS
	LBC04	5	---	---	---	Pelotas, RS
<i>S. parvifolium</i> Baker	ESC560	5	140	29° 38' 05,8"	54° 16' 05,5"	Unistalda, RS
<i>S. restioides</i> Spreng.	ESC120	3	880	29° 25' 18,2"	50° 30' 34,4"	São Francisco de Paula
	ESC252	5	---	27° 37' 07,3"	50° 20' 43,1"	Correia Pinto, SC
sp. nova 1	ESC383	5	839	26° 22' 00,5"	52° 31' 57,9"	Mariópolis, PR
sp. nova 2	LBC01	5	---	30° 02' 51,6"	51° 07' 01"	Porto Alegre, RS
	ESC140	3	---	30° 03' 35,18"	51° 07' 29,30"	Porto Alegre, RS
<i>S. marchioides</i> Ravenna	LBC 05A	5	121	26° 10' 13,9"	49° 13' 59,6"	Pelotas, RS
	LBC5B	5	135	29° 04' 00,4"	50° 58' 31,5"	Pelotas, RS
	ESC562	5	---	---	---	Caxias do Sul, RS
<i>S. weirii</i> Baker	ESC248	5	---	25° 26' 05,4"	49° 50' 54,5"	Palmeira, PR
<i>S. alatum</i> Hook.	ESC239	5	---	26° 05' 10,2"	51° 39' 42,9"	Bituruna, PR
	ESC232	5	---	27° 00' 21,4"	51° 52' 25,2"	Irani, SC
sp. nova 3	LBC06	5	---	---	---	Capão do Leão, RS
<i>S. palmifolium</i> L.	LBCs/n	7	---	30° 02' 51,6"	51° 07' 01"	Porto Alegre, RS

\*Código do coletor - ESC: Eggers e Souza-Chies; LBC:Lauis Brisolará Corrêa.



**Tabela 3** Temperatura de anelamento das ampliações de PCR, tamanho dos fragmentos amplificados, coeficiente de Simpson, número total de locos encontrados e porcentagem de locos polimórficos para cada primer ISSR utilizado nas análises do “complexo *S.vaginatum*”.

<b>Primer</b>	<b>Temperatura de anelamento</b>	<b>Tamanho de fragmento</b>	<b>Simpson</b>	<b>Nº de locos</b>	<b>Porcentagem de polimorfismo</b>
(AG) <sub>8</sub> C	48°C	280 - 2000	0,63	23	100
(CT) <sub>8</sub> G	50°C	500 - 2000	0,72	20	95
T(CA) <sub>8</sub>	48°C	700 - 2080	0,65	21	100
(AC) <sub>8</sub> <sup>a</sup>	48°C	600 - 1800	0,81	19	100
A(TG) <sub>8</sub>	48°C	400 - 1700	0,6	19	100
(TG) <sub>8</sub> A	45°C	350 - 2080	0,74	23	100
(CA) <sub>8</sub> G	48°C	450 - 2080	0,61	16	100
(GA) <sub>8</sub> T	45°C	300 - 1700	0,63	15	100
Média		280 - 2080	0,67	156	99,36

**Tabela 4** Similaridade genética (Nei 1972) entre espécies do “complexo *Sisyrinchium vaginatum*” calculadas a partir da matriz binária dos fragmentos ISSR amplificados.

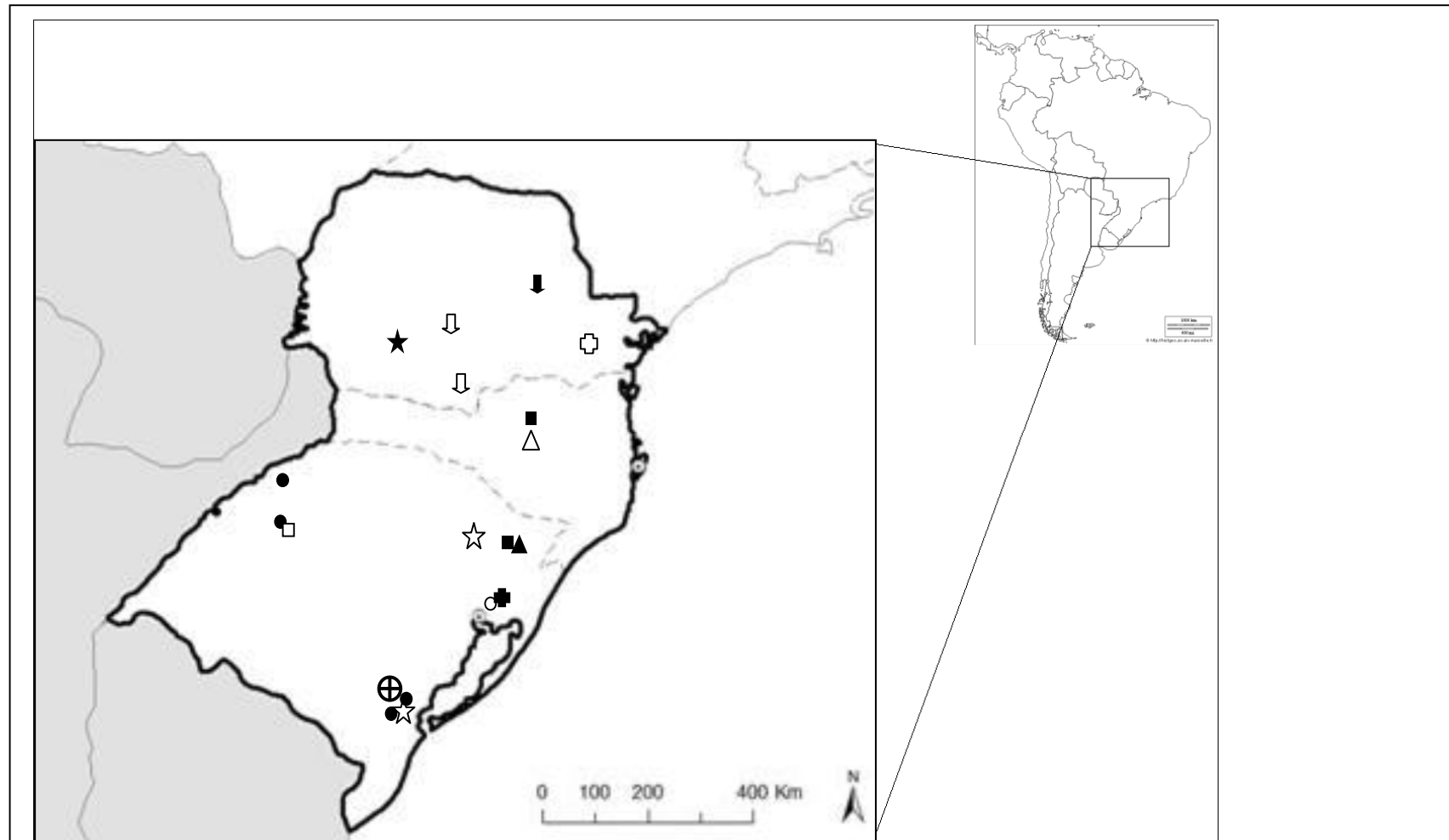
<b>Espécie</b>	<i>S. vaginatum</i>	<i>S. marchioides</i>	sp.nova2	<i>S. vaginatum perpruinsum</i>	<i>S. alatum</i>	<i>S. weirii</i>	<i>S. parvifolium</i>	sp.nova1	<i>S. marchio</i>	<i>S. balansae</i>	<i>S. restioides</i>	<i>S. palmifolium</i>
<i>S.vaginatum</i>	****	0.9346	0.8929	0.8648	0.8592	0.8673	0.8354	0.8262	0.7539	0.8474	0.9224	0.7314
<i>S.marchioides</i>		****	0.8492	0.8497	0.8643	0.8454	0.8275	0.8388	0.7343	0.8351	0.9074	0.6992
sp.nova2			****	0.8238	0.7877	0.7744	0.7756	0.7642	0.7368	0.8007	0.8455	0.6880
<i>S. vaginatum perpruinsum</i>				****	0.7527	0.8176	0.7978	0.8141	0.7838	0.7650	0.8493	0.6739
<i>S.alatum</i>					****	0.8074	0.7929	0.7826	0.7231	0.8073	0.8489	0.6137
<i>S.weirii</i>						****	0.7334	0.7613	0.7166	0.7643	0.8391	0.6774
<i>S.parvifolium</i>							****	0.7596	0.6985	0.7856	0.8180	0.6305
sp.nova1								****	0.7319	0.7681	0.8138	0.6651
<i>S.marchio</i>									****	0.7348	0.7485	0.5744
<i>S.balansae</i>										****	0.8410	0.6393
<i>S.restioides</i>											****	0.7009
<i>S.palmifolium</i>												****

**Tabela 5** Número de locos polimórficos, porcentagem de polimorfismo encontrada em cada população, índice de diferenciação fenotípica de Shannon e identidade genética de Nei para cada população, considerando todos os locos analisados.

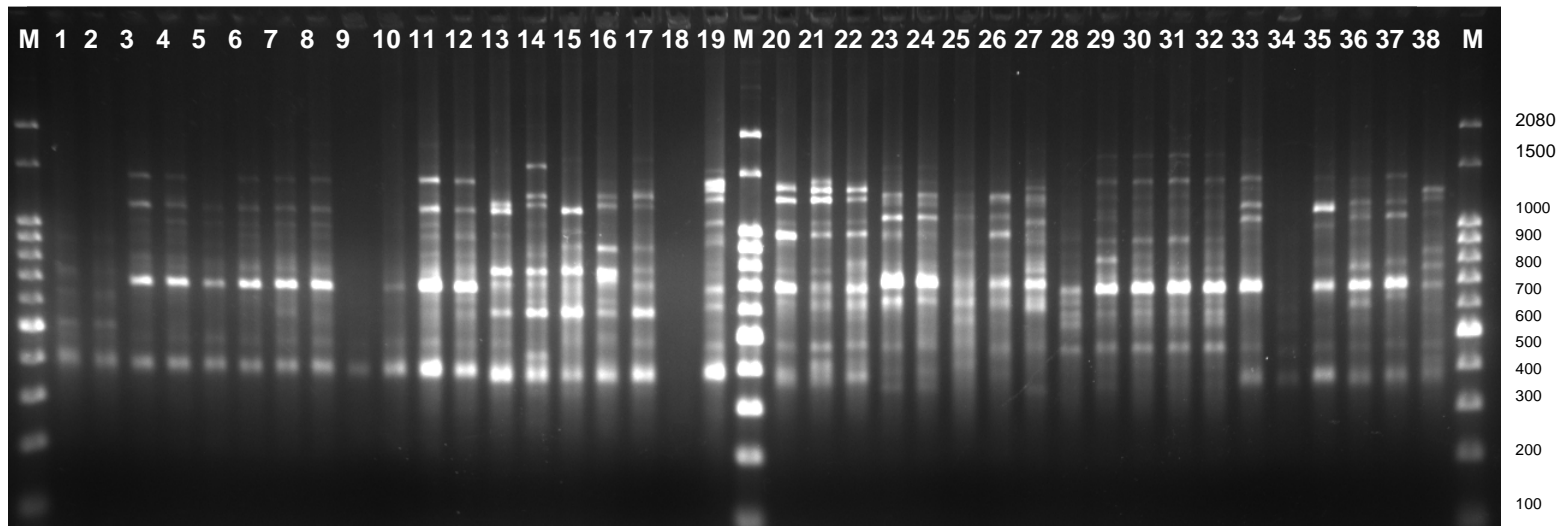
População	Nº locos polimórficos	Porcentagem de polimorfismo	Shannon	Nei
ESC555	54	38,46	0,2596	0,1777
LBC5A	65	41,66	0,2802	0,1937
LBC5B	62	39,74	0,2712	0,1882
ESC546	78	50	0,2774	0,1915
ESC476	75	48,08	0,2920	0,2038
LBC01	38	24,36	0,2521	0,1762
ESC228	71	45,51	0,2880	0,2003
ESC562	73	46,79	0,2853	0,1978
ESC232	31	19,87	0,2275	0,1570
ESC239	23	14,74	0,2244	0,1588
ESC248	69	44,23	0,2791	0,1925
ESC560	57	36,54	0,2687	0,1845
ESC383	59	37,82	0,2717	0,1889
ESC318	34	21,79	0,2393	0,1652
ESC464	58	32,69	0,2701	0,1853
ESC252	59	37,82	0,2785	0,1924
LBC04	67	48,9	0,2981	0,2097
LBC06	43	31,39	0,2604	0,18
ESC120	37	27	0,2548	0,1744
ESC140	11	8,03	0,1580	0,1084
<i>S. palmifolium</i>	65	47,44	0,3019	0,2117
Média				

**Tabela 6** Resultados dos experimentos de polinização em *S. vaginatum*.

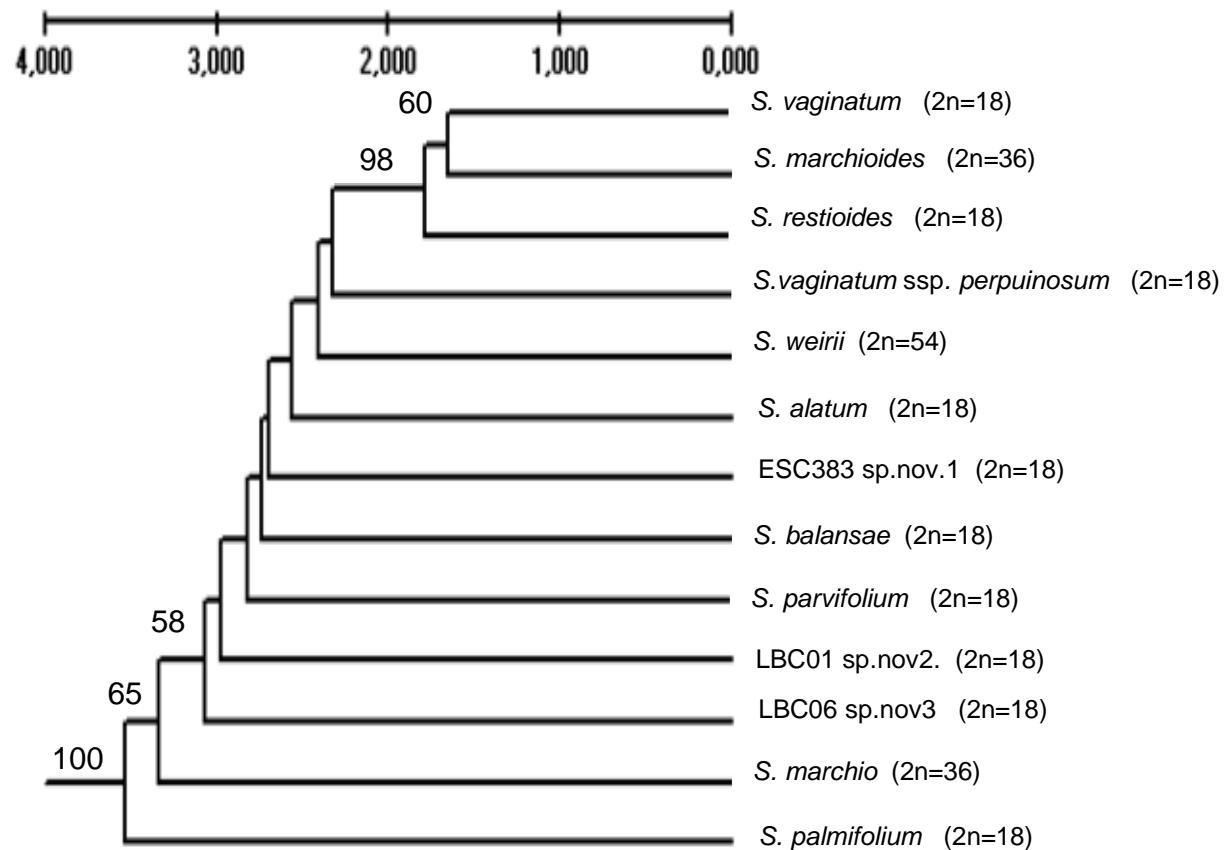
Tipo de tratamento	Nº. de flores	Nº. de frutos	% de frutificação
Autopolinização induzida	34	0	0
Autopolinização espontânea	80	0	0
Polinização cruzada	48	43	89,58



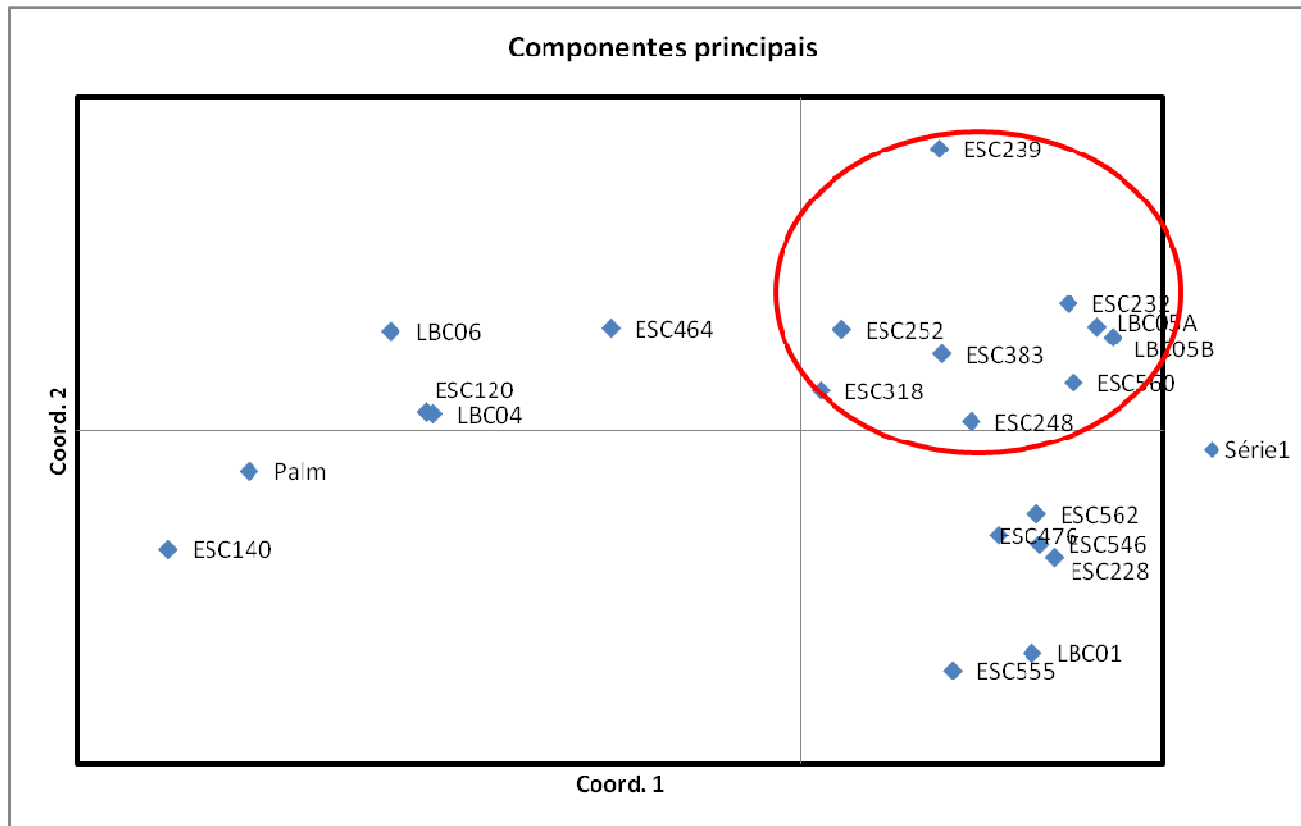
**Fig. 1** Mapa da localização dos pontos de coleta para as espécies do “complexo *Sisyrinchium vaginatum*”. Símbolos indicam a localização das populações para as espécies analisadas. *S. marchioides* (★), *S. palmifolium* (○), *S. vaginatum* (●), *S. vaginatum* ssp. *perpruinatum* (△), *S. balansae* (▲), *S. parvifolium* (□), *S. restioides* (■), *S. marchio* (⊕), *Sisyrinchium* sp. nova 2 (■), *Sisyrinchium* sp. nova 1 (★), *S. alatum* (↯), *S. weirii* (↯) e *Sisyrinchium* sp. nova 3 (⊕).



**Fig. 2** Polimorfismo de ISSR visualizado em usando o *primer* (AG)<sub>8</sub>YC; M marcador *ladder* 100pb; 1 e 2 (*S. marchioides* ESC562); 3 ao 7 (*S. alatum* ESC232); 8 ao 12 (*S. alatum* ESC239); 13 ao 17 (*S. weirii* ESC248); 18 ao 22 (*S. parvifolium* ESC560); 23 ao 27 (*Sisyrrinchium* sp. nova1 ESC383); 28 ao 32 (*S. marchio* ESC318); 33 ao 37 (*S. balansae* ESC464); 38 (*S. restioides* ESC252).

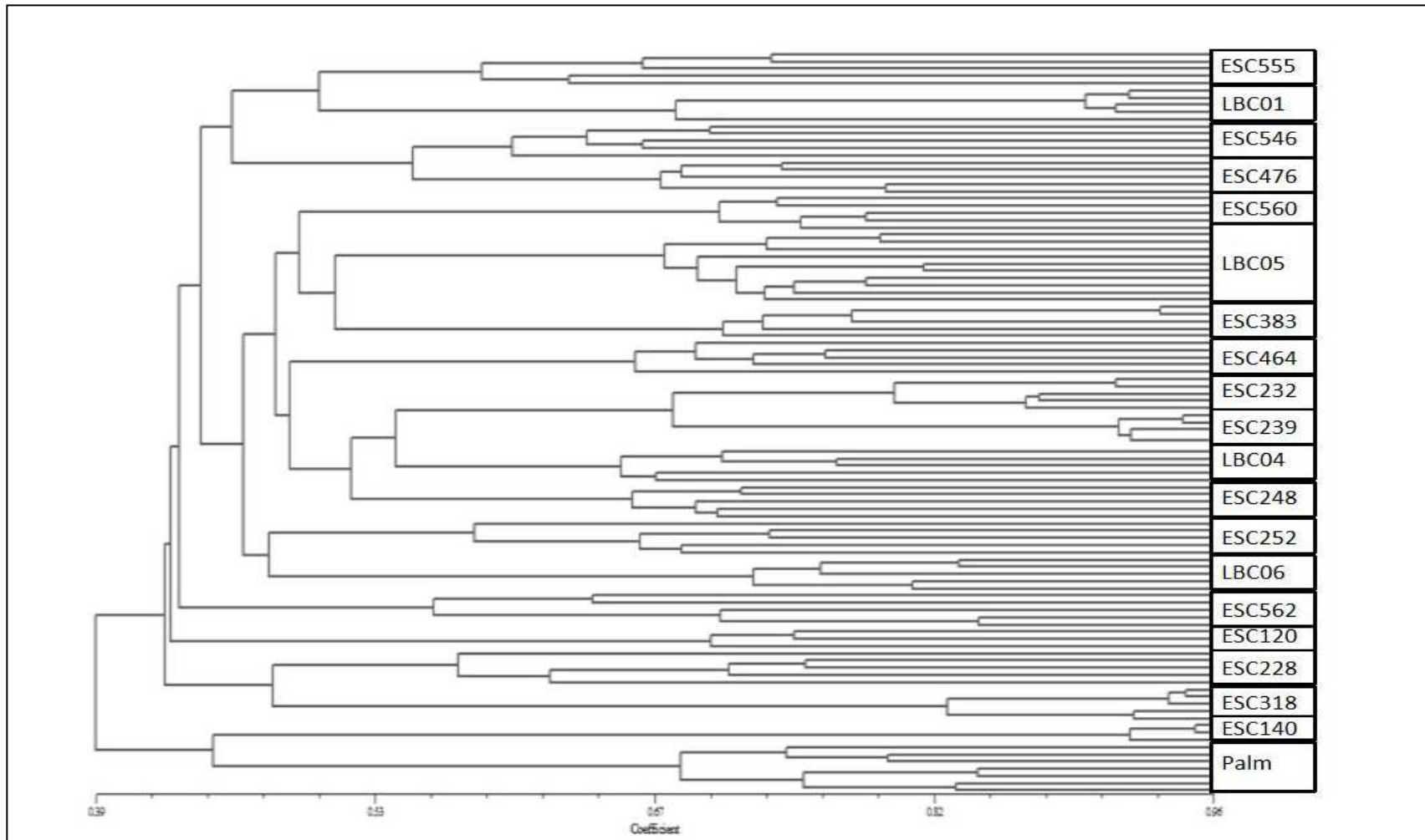


**Fig. 3** Dendrograma gerado pelo algoritmo UPGMA a partir de uma matriz de distâncias (coeficiente de identidade genética de Nei, 1972) entre as espécies do “complexo *S. vaginatum*”, construído com base nos marcadores ISSR. Valores de bootstrap são mostrados sobre os ramos.



**Fig. 4** Análise de componentes principais da variação. Os componentes 1 (40,62%), 2 (14,77%) e 3 (13,74%) contribuem com 69,13% de toda a variação encontrada na análise das espécies *Sisyrrinchium* sp. nova1 (ESC383), *Sisyrrinchium* sp. nova2 (ESC140 e LBC01), *Sisyrrinchium* sp. nova3 (LBC06), *S. alatum* (ESC232 e ESC239), *S. balansae* (ESC464), *S. marchio* (ESC318), *S. marchioides* (ESC562 e LBC05), *S. palmifolium* (Palm), *S. parvifolium* (ESC560), *S. restioides* (ESC120 e ESC252), *S. vaginatum* ssp. *perpruinsum* (ESC228), *S. vaginatum* ssp. *vaginatum* (ESC476, ESC546, ESC555 e LBC04) e *S. weirii* (ESC248).





**Fig. 5** Dendrograma demonstrando a similaridade genética pelo coeficiente de Dice, gerado pelo algoritmo de agrupamento UPGMA.



**Fig. 6** Flor de *Sisyrrinchium vaginatum* sendo polinizada por uma abelha Halictidae.

# CAPÍTULO III

**Poliploidia e evolução no tamanho do genoma em espécies do complexo *Sisyrinchium*  
*vaginatum* (Iridaceae)**

**Artigo a ser convertido para o Inglês, para sua submissão ao periódico  
*Plant Systematics and Evolution*.**

**Poliploidia e evolução no tamanho do genoma em espécies do complexo *Sisyrinchium*  
*vaginatum* (Iridaceae)**

Luis Brisolara-Corrêa, Sonja Siljak-Yakovlev, Lilian Eggers, Paula B. Picoli, Tatiana Teixeira de  
Souza-Chies, Eliane Kaltchuk-Santos

**RESUMO** - A taxonomia de *Sisyrinchium* é notoriamente confusa, com um grande número de espécies descritas que não apresentam um enquadramento taxonômico aceitável. Informações citotaxonômicas inexistem para as espécies do “complexo *Sisyrinchium vaginatum*”. Números cromossômicos para 11 espécies (*S. marchio*, *S. balansae*, *S. vaginatum* ssp. *perpruinatum*, *S. vaginatum* ssp. *vaginatum*, *S. parvifolium*, *S. restioides*, *S. marchioides*, *S. weirii*, *S. alatum*, *Sisyrinchium* sp. nova 1, *Sisyrinchium* sp. nova 2) deste complexo são descritos no presente trabalho. Todas as espécies estudadas apresentaram o mesmo número cromossômico básico,  $x = 9$ , ocorrendo três níveis de ploidia entre as espécies analisadas: diplóide ( $2n = 2x = 18$ ), tetraplóide ( $2n = 4x = 36$ ) e hexaplóide ( $2n = 6x = 54$ ). Neste estudo são apresentados resultados relativos ao valor Cx para sete espécies (*S. balansae*, *S. vaginatum*, *Sisyrinchium* sp. nova 1, *Sisyrinchium* sp. nova 2, *S. marchioides*, *S. weirii*, *S. parvifolium*), havendo pouca variação entre as espécies analisadas. As espécies diplóides apresentaram valores de 1,4 – 1,55 pg, a tetraplóide *S. marchioides* de 1,38 – 1,56 pg e o hexaplóide *S. weirii* apresentou 1,16 pg. O hexaplóide *S. weirii* apresentou um dos menores valores de Cx, decréscimo este que pode ser devido ao fenômeno de “downsizing”. A altitude tem se demonstrado como o principal fator responsável pelo aumento em níveis de ploidia para as espécies deste complexo. Futuros estudos com análise da morfologia cromossômica comparada e comportamento meiótico nos poliplóides são cruciais para a compreensão destes mecanismos evolutivos.

**Palavras-chave:** número cromossômico, conteúdo de DNA nuclear, evolução do tamanho de genoma, citometria de fluxo, *Sisyrinchium* spp., seção *Viperella*

## Poliploidy and genome size evolution in species of the *Sisyrinchium vaginatum* complex

(Iridaceae)

**ABSTRACT** – The taxonomy of *Sisyrinchium* is markedly confused, with a big part of the described species do not presenting an acceptable taxonomic outline. Cytotaxonomic data are not available for the species of “*Sisyrinchium vaginatum* complex” Chromosome numbers of 11 (*S. marchio*, *S. balansae*, *S. vaginatum* ssp. *perpruinatum*, *S. vaginatum* ssp. *vaginatum*, *S. parvifolium*, *S. restioides*, *S. marchioides*, *S. weirii*, *S. alatum*, *Sisyrinchium* sp. nova 1, *Sisyrinchium* sp. nova 2) species of such complex are described in this study. All the studied species showed the same basic chromosome number,  $x = 9$ , occurring three ploidy levels: diploid ( $2n = 2x = 18$ ), tetraploid ( $2n = 4x = 36$ ), and hexaploid ( $2n = 6x = 54$ ). This paper presents the results of Cx value relative to seven species (*S. balansae*, *S. vaginatum*, *Sisyrinchium* sp. nova 1, *Sisyrinchium* sp. nova 2, *S. marchioides*, *S. weirii*, *S. parvifolium*), showing a small variation among the species analyzed. The genome sizes presented little variation among the species and showed significant variation among different populations of the same species some times. In this study are presented the results of Cx value to seven species. The diploid species show values from 1.14 pg – 1.55 pg, the tetraploid *S. marchioides* species from 1.38 pg-1.56 pg, and the hexaploid *S. weirii* species show 1,16 pg. The Cx value found in the hexaploid *S. weirii* was one of the smaller genomes, this reduction may be due to a “downsizing” phenomenon. The altitude seems to be the most important environmental factor for increasing of ploidy levels for the species of this complex. Future studies on morphological analyses of the chromosomes and meiotic behavior of the polyploids will be crucial to understanding these evolving mechanisms.

**Key-words:** chromosome number, nuclear DNA amount, genome size evolution, flow cytometry, *Sisyrinchium* spp., section *Viperella*

## INTRODUÇÃO

O gênero *Sisyrinchium* é um dos mais abundantes e diversificados entre os gêneros da família Iridaceae, sendo o maior gênero neotropical da família. Esse gênero pertence à subfamília Iridoideae, tribo Sisyrinchieae e apresenta cerca de 140 espécies nativas das Américas (Goldblatt 2008), com algumas introduzidas em outras partes do mundo (Innes 1985). Diversas espécies deste gênero são cultivadas como plantas ornamentais, sendo que algumas fugiram ao cultivo (Rudall et al. 1986).

A taxonomia de *Sisyrinchium* é notoriamente confusa (Cholewa e Henderson 1984; Kenton et al. 1986; Rudall et al. 1986), com um grande número de espécies descritas que não apresentam um enquadramento taxonômico aceitável (Goldblatt 1990). Estudos realizados com este gênero reconhecem que o mesmo é constituído de membros com ampla variabilidade morfológica (Henderson 1976; Mosquin 1970). Johnston (1938), ao estudar as espécies de *Sisyrinchium* ocorrentes no Uruguai, Paraguai e Brasil, considerou os tratamentos taxonômicos anteriores como insatisfatórios e preferiu propor o “complexo *S. vaginatum*” quando se referiu a estas espécies, indicando a necessidade de maiores estudos para a delimitação taxonômica destas. Todas as espécies pertencentes a este complexo são agrupadas na seção *Viperella*, contudo algumas espécies já foram erroneamente inseridas no “complexo *S. vaginatum*”, sendo que estas não compartilham a mesma seção nem são proximamente relacionadas a este grupo.

Informações cariológicas sobre a maioria das espécies do gênero *Sisyrinchium* são escassas e geralmente restritas a números cromossômicos (Goldblatt 1982; Kenton et al. 1986), provavelmente, devido ao tamanho diminuto dos cromossomos da maioria de suas espécies. Das 140 espécies que ocorrem no gênero, cerca de 68 espécies (Alves 2008) já foram analisadas para determinação do número cromossômico e 39 para descrição do tamanho de genoma (Kenton et al. 1986). No entanto, mesmo os dados já publicados ainda são pouco conclusivos quanto às relações evolutivas entre espécies relacionadas, evolução recente com complexo poliplóide, e relações ecológicas e geográficas associadas com estas adaptações do genoma.

Em relação às espécies de Iridaceae raras, endêmicas e em risco de extinção, apenas uma listagem foi desenvolvida pelo World Conservation Monitoring Centre (WCMC 2001), onde *Sisyrinchium vaginatum* consta como uma das espécies em perigo de extinção. Contudo, a confusão devida a problemas taxonômicos não resolvidos dificulta a determinação de uma correta categorização para estas espécies, pois há um desconhecimento da distribuição geográfica associada a cada uma destas espécies, assim como de dados genéticos e ecológicos, os quais são imperativos para a definição da abrangência necessária a conservação (Armstrong e Lange 2005).

Diante da existência de poucos estudos citogenéticos para a maioria das espécies de *Sisyrinchium* e do desconhecimento do número cromossômico para as espécies do complexo *S. vaginatum*, este trabalho teve como objetivos (1) analisar o número cromossômico das espécies deste complexo encontradas no Sul do Brasil e (2) estimar o tamanho dos seus respectivos genomas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Foram coletados botões florais, plantas e sementes durante as viagens a campo entre os anos de 2007 e 2010, em populações naturais nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Para cada ponto de coleta e cada espécie foi dado um número de coletor e coletada uma exsicata do espécime a ser analisado, a qual foi depositada no herbário ICN da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As coordenadas geográficas correspondentes à localização das populações foram determinadas por GPS - Global Positioning System (Tabela 1, Fig. 1).

### Determinação do número cromossômico

Botões florais jovens foram coletados e fixados em álcool etílico absoluto: ácido acético glacial (3:1) por 12 a 24 h em temperatura ambiente e após foram mantidos a -20°C. A contagem do número cromossômico foi realizada em meiócitos. O comprimento do eixo longitudinal das anteras (mm) em que foram encontrados meiócitos em fase adequada para a contagem do número cromossômico são encontrados na Tabela 2. As lâminas foram preparadas pelo esmagamento das

anteras em carmim propiônico 1%, sendo usadas todas as anteras de uma flor para a confecção de cada lâmina. A análise do material foi realizada em fotomicroscópio de contraste de fase Axioscope Zeiss. Para a contagem dos cromossomos, aproximadamente 20 células com bom espalhamento cromossômico foram analisadas em meiose, nas fases de diacinese, metáfase I e anáfase I.

### **Estimativa do tamanho dos genomas**

O conteúdo do DNA total foi acessado por citometria de fluxo de acordo com Marie e Brown (1993). As análises de citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Citometria de Fluxo do Institut des Sciences du Végétal, CNRS UPR2355 (France). Folhas jovens e saudáveis foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos estéreis e secos e enviadas para a determinação do DNA nuclear em um prazo máximo de uma semana, para que não houvesse deterioração e conseqüentemente a contaminação do material por fungos e bactérias, causando interferências na análise. Os padrões internos foram utilizados de acordo com Marie e Brown (1993), *Pisum sativum* cv. “Long Express” ( $2C = 2x = 8,37$  pg; 40,5% GC), *Petunia hybrida* PxPc6 ( $2C = 2x = 2,85$  pg; 41% GC) e *Lycopersicon esculentum* cv. “Roma” ( $2C = 2x = 1,99$  pg), conforme o tamanho do genoma da amostra analisada. Uma amostra de 100 mg de folhas das espécies estudadas e dos padrões internos foram cortadas com uma lâmina de barbear em uma placa de Petri contendo aproximadamente 1mL do tampão de lise (tampão Galbraith 0,1% Triton; 100µg/mL RNaseA), uma solução hipotônica com um detergente não-iônico e RNase. Após o isolamento dos núcleos, estes foram filtrados por uma rede de nylon com cerca de 50 µm, de forma a eliminar a maior parte dos resíduos obtidos. Em seguida os núcleos foram corados com um fluorocromo que se liga especificamente e estequiometricamente ao DNA, neste caso foi usado o iodeto de propídio (50 – 100 µg/mL).

Análises de citometria de fluxo de 2000-5000 núcleos foram realizadas em um citômetro Epics V (Beckman-Coulter, Roissy, France) configurado com lasers de espectro físico usando uma configuração de 514 nm para excitação e emissão >590 nm. As intensidades de fluorescência emitidas pelos núcleos foram registradas e analisadas em gráficos numa tela e computador Coulter



MDADS. Os conteúdos de DNA total (2C) foram calculados com base nas leituras espectrofotométricas dos núcleos das amostras e de seus padrões internos. Foram calculados também os coeficientes de variação e os desvios padrão entre as leituras. O conteúdo Cx foi calculado levando-se em consideração o nível de ploidia da espécie para se obter o valor C, respectivo ao genoma haplóide ancestral (x). O conteúdo de DNA foi convertido em tamanho de genoma expresso em Mbp (megabase pairs) de nucleotídeos de acordo com Bennett et al. (2000), o qual reporta 1 pg ser equivalente a 980 Mbp.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Onze espécies do “complexo *Sisyrinchium vaginatum*” foram analisadas quanto ao número cromossômico, sendo esta a primeira determinação para 10 delas (Tabela 2). Para algumas espécies não foi possível a determinação do conteúdo de DNA devido à ausência de plantas sob cultivo, necessárias para as análises com citometria de fluxo. Duas populações coletadas apresentaram aspectos morfológicos que sugerem que sejam espécies novas. Também, estas tiveram o seu número cromossômico determinado. Todas as espécies estudadas apresentaram o mesmo número básico,  $x = 9$  (Fig. 2A-E), ocorrendo três níveis de ploidia entre as espécies analisadas: diplóide ( $2n = 2x = 18$ ), tetraplóide ( $2n = 4x = 36$ ) e hexaplóide ( $2n = 6x = 54$ ). As espécies diplóides foram as mais abundantes no Sul do Brasil, havendo apenas duas espécies tetraplóides e uma única espécie hexaplóide ocorrentes nesta região.

O número cromossômico básico observado nas espécies analisadas indica que mudanças numéricas têm sido importantes na evolução das espécies deste complexo, concordando com o que ocorre na maioria das espécies de Iridaceae (Goldblatt e Takei 1997). Além disso, concorda com o número cromossômico básico descrito para as espécies mais relacionadas à *Sisyrinchium vaginatum*, provavelmente sendo uma sinapomorfia deste clado (Chauveau et al. 2011). Tal evidência foi observada igualmente para o “complexo *Sisyrinchium micranthum*”, grupo de ampla ocorrência no Sul do Brasil, que possui número básico  $x = 8$  e populações di, tetra e hexaplóides

(Tacuatiá, 2008). Com isso, em uma mesma população, tal como em populações simpátricas de diferentes morfotipos do “complexo *S. micranthum*”, dois ou mais citótipos puderam ser encontrados (Tacuatiá 2008), embora, na maioria das vezes, plantas de diferentes citótipos apresentassem um mesmo padrão morfológico. No complexo *vaginatum*, nenhuma variação intra-específica foi detectada.

Do ponto de vista citogenético, o complexo *S. vaginatum* mostrou ser um grupo heterogêneo, o que provavelmente contribuiu para a grande variação morfológica e, conseqüentemente, para a dificuldade taxonômica encontrada no grupo. Chukr e Capellari Jr (2003) consideraram *S. restioides* como uma espécie em separado de *S. vaginatum*, contudo, propôs a sinonimização das espécies *S. parvifolium*, *S. balansae* e *S. weirii* sob o táxon *S. vaginatum*, considerando as quatro como sendo uma única espécie, em virtude da plasticidade morfológica encontrada entre as populações. Os dados citogenéticos apresentados neste estudo mostram que *S. parvifolium*, *S. balansae* e *S. vaginatum* são diplóides enquanto que *S. weirii* é hexaplóide. Embora populações destas espécies ocorram em simpatria e tenham padrões de distribuição geográfica sobrepostos, não foi observada a formação de híbridos putativos. Além disso, o cruzamento entre hexaplóides e diplóides é pouco provável, mas se ocorresse teria uma progênie tetraplóide (Husband 2004).

A variação numérica no genoma dessas espécies devido à poliploidia levanta questões sobre a provável origem destes poliplóides. Embora ainda seja difícil determinar sua origem, há indícios de que ao menos a espécie tetraplóide *S. marchioides* tenha origem alopoliplóide, tendo em vista sua ocorrência simultânea com as outras cinco espécies diplóides no Rio Grande do Sul, onde esta é a única espécie poliplóide ocorrente. Ela também é encontrada nos estados do Paraná e Santa Catarina concomitantemente com as outras espécies diplóides e poliplóides. Mas a principal evidência é a condição morfológica intermediária entre os diplóides encontrados no Sul (com ramos finos) e os que não ocorrem no Sul (com caule alado ancipitado). Atualmente, é reconhecido que espécies poliplóides possuem múltiplas origens, ou seja, têm formação recorrente, introduzindo

nova variabilidade genética a cada origem (Soltis e Soltis 1999). Isso pode explicar a variação morfológica encontrada entre as populações do tetraplóide *S. marchioides*. Assim, a formação recorrente dos poliplóides, amplamente aceita na atualidade, pode ter contribuído para esta diversidade morfológica encontrada entre as populações desta espécie (Soltis e Soltis 1999; Adams e Wendel 2005).

Os únicos números cromossômicos relacionados à seção *Viperella* prévios a este trabalho foram reportados por Kenton et al. (1986) e por Rudall et al. (1986), onde no primeiro trabalho descreveram  $2n = 4x = 36$  cromossomos e o valor  $Cx = 2,1$  pg de DNA, para *S. alatum* do Peru, enquanto que no segundo trabalho foram reportadas três contagens também tetraplóides para esta espécie, sendo duas do Peru e uma do México. Portanto, nenhum diplóide ou hexaplóide havia sido reportado anteriormente para este complexo.

Nas espécies de *Viperella*, nem sempre os poliplóides têm seus órgãos mais desenvolvidos em função de efeito *giga*. No caso de *S. alatum* ( $2n = 2x = 18$ ) o tamanho dos órgãos é nitidamente maior que em *S. marchioides* ( $2n = 4x = 36$ ), e tanto a primeira como a segunda apresentam estrutura vegetativa mais robusta que as espécies diplóides ocorrentes no estado do Rio Grande do Sul.

As análises realizadas para a espécie *S. alatum* evidenciaram pela primeira vez a ocorrência de diplóides ( $2n = 2x = 18$ ), indicando a existência de citótipos para esta espécie, ou talvez, que se trate de espécies distintas, o que é prematuro para ser afirmado sem um estudo morfológico comparativo.

A taxonomia é uma área que tem sido beneficiada grandemente com o uso da citometria de fluxo na análise de genomas. Uma vez que a contagem cromossômica é laboriosa, um número limitado de indivíduos pode ser analisado, de tal modo que populações similares fenotipicamente, mas que diferem no nível de ploidia, podem passar despercebidas (Misset e Gourret 1996; Lysák e Doležel 1998). Na Tabela 2 são apresentados os resultados relativos ao valor  $Cx$  e quantificação de DNA para sete espécies (incluindo as possíveis espécies novas). O valor  $Cx$  variou de 1,16 – 1,56

pg. As espécies diplóides apresentaram valores de 1,25 – 1,55 pg; a tetraplóide *S. marchioides* de 1,38 – 1,56 pg e o hexaplóide *S. weirii* apresentou 1,16 pg.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre as replicatas e todos os coeficientes de variação apresentaram valores abaixo de 3 (dados não apresentados). Em geral o coeficiente de variação (CV) obtido em análises de quantificação de DNA nuclear varia entre 1 e 10% em plantas, contudo, na maioria dos casos os valores de CV estão abaixo de 3%, estes valores representam o índice de confiabilidade da metodologia utilizada na determinação do conteúdo de DNA nuclear (Marie e Brown 1993).

Um dos genomas com menor valor Cx foi encontrado no hexaplóide *S. weirii* (1,16 pg), sendo, portanto, menor que o do tetraplóide *S. marchioides* (1,38 – 1,56 pg) e dos diplóides (1,14 – 1,55 pg). É amplamente relatada na literatura a reestruturação do genoma após o processo de poliploidização, além da ocorrência do fenômeno de “downsizing”, ou seja, existe uma redução no valor C em relação às espécies progenitoras (Leitch & Bennett 2004). Bennett et al. (2000) também reportam a diminuição na quantidade de DNA com o aumento do nível de ploidia em diversas angiospermas, especialmente monocotiledôneas. Já Chen (2007) descreve esse fenômeno como uma forma de reorganização do genoma para o estabelecimento de uma função normal do organismo após o estresse decorrente do desequilíbrio celular originado pelo excesso de genes funcionais. Cabe observar que *S. marchioides* (tetraplóide) não apresentou este fenômeno, possivelmente por ser um poliplóide de nível mais baixo ou por ter sido gerado recentemente na evolução do gênero, não havendo o tempo necessário para uma reorganização reducional do genoma.

Kenton et al. (1986) determinaram o valor Cx para muitas espécies de *Sisyrinchium*, o qual variou de 0,25 pg em *S. tinctorium* até 2,1 pg em *S. alatum*. Dessa forma, o conteúdo de DNA (8,4 pg) descrito para esta espécie tetraplóide é ainda maior que o descrito aqui para uma espécie hexaplóide (*S. weirii*, 6,96 pg) do mesmo complexo. Apesar disto, o esperado seria que apresentassem o mesmo valor Cx ou similar já que compartilham o mesmo ancestral comum, no

entanto apresentam um genoma significativamente distinto. Siljak-Yakovlev et al. (2008), descreveram um fenômeno parecido ocorrendo no gênero *Ramonda*, onde uma das três espécies que hibridizava possuía um genoma significativamente diferente, propondo então que o valor do genoma monoplóide fosse diferente em função de uma ancestralidade recente distinta, ou seja, que as espécies evoluíram de um ancestral diplóide de tamanho de genoma distinto, já que um incremento do valor C após o evento de poliploidização é considerado improvável e em direção contrária aos fenômenos subsequentes de redução e reorganização genômica que ocorrem no genoma poliplóide.

Um fato interessante a ser mencionado é a ocorrência das três espécies poliplóides em locais de altitudes elevadas. A espécie hexaplóide *S. weirii* foi coletada nas maiores altitudes, acima de 1000 m do nível do mar (Fig. 1). Apesar disso, nenhuma relação com a latitude de ocorrência das espécies diplóides e poliplóides foi encontrada, embora a latitude seja citada como importante na determinação dos padrões de distribuição geográfica de espécies Norte-Americanas do gênero *Sisyrinchium* (Kenton et al. 1986). As espécies diplóides ocorrem no México e Sul dos EUA, as tetraplóides no Norte dos EUA e aquelas com maior nível de ploidia (octa e dodecaplóides) ocorrem no Canadá (Goldblatt 1982; Rudall et al 1986). Isto está amplamente de acordo com o que foi descrito para outras angiospermas, que aparentemente é uma regra, de forma que para altas latitudes e altitudes são esperadas frequências superiores de eventos e processos de especiação poliplóide, sendo citados como os fatores de maior influência na distribuição, formação e especiação em populações poliplóides (Soltis et al. 2003; Stebbins 1984, 1985; Ehrendorfer 1980; Grant 1981).

Dessa forma, a distribuição geográfica de poliplóides pode ser distinta para cada complexo poliplóide encontrado em um gênero, dependendo principalmente da relação das espécies com a estrutura edafo climática na qual estes grupos se distribuem. No hemisfério Norte, a distribuição dos níveis de ploidia em espécies de *Sisyrinchium* apresenta uma correlação positiva com a latitude, enquanto que as espécies do gênero *Sisyrinchium* da América do Sul parecem não apresentar

nenhuma associação latitudinal ou longitudinal com relação ao aumento dos níveis de ploidia. Apesar disto, a altitude tem demonstrado ser o principal fator responsável pelo aumento em níveis de ploidia para as espécies deste complexo. O aumento no valor C também tem sido citado como um fenômeno favorecido pelo aumento altitudinal por Rudall et al. (1986), os quais descreveram que para algumas espécies do Hemisfério Sul há uma tendência de incremento no valor Cx e aumento de tamanho dos cromossomos dos diplóides de algumas espécies que ocorrem em maiores altitudes. Estes autores também reportaram um aumento no valor Cx entre alguns grupos de espécies. Essa informação é reproduzida fielmente por alguns clados formados na filogenia do gênero *Sisyrinchium* (Chauveau et al. 2011), na qual os dois clados mais basais encontrados na árvore (*S. acre* até *S. tinctorium*; *S. angustissimum* até *S. jamesonii*) foram constituídos por espécies que apresentavam menor valor Cx (inferior a 1) em relação aos dois clados superiores (parte da seção *Spathirachis*, seções *Hydastylus* e *Viperella*) com um valor Cx mais elevado (acima de 1). Rudall et al. (1986) descreveram isso em função do nível de ploidia que, fazendo um paralelo, nos clados mais basais era alto, com as espécies ocorrendo entre 2000 e 3000 m de altitude enquanto que os outros dois clados superiores (maior valor Cx) eram de espécies do Hemisfério Sul, na maioria diplóides. Esses dados evidenciam que mesmo na definição de seções o conteúdo de DNA tem se mostrado de grande valia taxonômica. Além disso, demonstram que durante a evolução do gênero *Sisyrinchium*, a poliploidização e outras mudanças cromossômicas, como a disploidia, tem certamente ocorrido e são cruciais para um processo de especiação simpátrica rápida e eficiente. Para a maioria das angiospermas, a duplicação cromossômica é seguida pela divergência de genoma e também pela diploidização, dando origem à diversidade em número cromossômico e conteúdo de DNA (Wendel 2000).

Goldblatt (1982) fez um estudo citológico das iridáceas neotropicais, embora não tenha analisado espécies de *Sisyrinchium*, onde compilou dados que já haviam sido publicados até aquele momento e propôs que o número cromossômico básico para este gênero seria  $x = 9$ , com  $x = 8$  sendo um número básico secundário, derivado por disploidia decrescente de  $x = 9$ . De acordo com

Rudall et al. (1986) a seção *Echthronema* possui dois grupos bem definidos por seus números cromossômicos básicos ( $x = 8$  ou  $x = 9$ ) e tamanho do cromossomo (pequeno ou variável), contudo este parece ser um grupo artificial na filogenia molecular publicada por Chauveau et al. (2011). Esse grupo apresenta-se artificial por considerar o grau de fusão das anteras como caráter de diferenciação das outras seções do gênero; contudo esta característica apresenta-se muito distribuída na filogenia não sendo suportada como uma sinapomorfia morfológica, provavelmente em função de múltiplas origens dispersas durante a história evolutiva do gênero, sendo, portanto uma convergência adaptativa. Além disso, o número cromossômico básico se mantém bem preservado dentro dos clados da filogenia, com exceção na base da filogenia, onde existem alguns números ainda não bem compreendidos (Chauveau et al. 2011).

Os números cromossômicos e o conteúdo de DNA das espécies de *Sisyrinchium* analisadas neste trabalho, em geral, seguem o padrão citogenético descrito para a maioria dos grupos taxonômicos da família Iridaceae. Aparentemente, as espécies diplóides derivam de um ancestral comum com tamanho de genoma similar às espécies atuais, já que o valor  $Cx$  foi essencialmente o mesmo para as espécies deste complexo. Contudo, visto que muitas das espécies do “complexo *S. vaginatum*” apresentaram o mesmo número cromossômico, sendo o número cromossômico básico  $x = 9$ , futuros estudos com análise morfológica, estrutura cromossômica e comportamento meiótico nos poliplóides e diplóides são cruciais para a sua diferenciação cariológica, contribuindo para um suporte citotaxonômico dessas espécies. Avaliações quanto ao posicionamento de blocos heterocromáticos pelo uso de bandeamento cromossômico (bandas C, NOR, CMA3, DAPI) e estudos de hibridização *in situ* permitirão inferências quanto à evolução cariotípica e, conseqüentemente, contribuirão no entendimento das relações filogenéticas dentro do gênero.

## REFERÊNCIAS

- Adams KL, Wendel JF (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8:135-141
- Alves LIF (2008) Citogenética de espécies de Iridaceae ocorrentes no Nordeste do Brasil. M. Sc. Dissertation, Universidade Federal da Paraíba
- Armstrong TTJ, Lange DPJ (2005) Conservation genetics of *Hebe speciosa* (Plantaginaceae), an endangered New Zealand shrub. *Bot J Linn Soc* 149:229-239
- Bennett MD, Bhandol P, Leitch IJ (2000) Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. *Ann Bot* 86:859-909
- Chauveau O, Eggers L, Raquin C, Silvério A, Brown S, Couloux A, Cruaud C, Kaltchuk-Santos E, Yockteng R, Souza-Chies TT, Nadot S (2011) Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogeny of the genus. *Ann Bot* 107:1287-1312
- Chen ZJ (2007) Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annu Rev Plant Biol* 58:377-406
- Cholewa AF, Henderson DM (1984) Biosystematics of *Sisyrinchium* section *Bermudiana* (Iridaceae) of the Rocky Mountains. *Brittonia* 36(4):342-363
- Chukr NS, Capellari LJR (2003) Iridaceae. In: Wanderley MGL, Sheperd GJ, Giulietti AM, Melhem TS (ed) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. FAPESP: RIMA, São Paulo, pp 127-147
- Ehrendorfer F (1980) Polyploidy and distribution. In: Lewis WH (ed) *Polyploidy: Biological Relevance*. Plenum Press, New York pp 45-60



- Goldblatt P (1982) Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of Neotropical Iridaceae. *Syst Bot* 7(2):186-198
- Goldblatt P (1990) Phylogeny and classification of Iridaceae. *Ann MO Bot Gard* 77:607-627
- Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, Davies TJ, Manning JC, Bank MVD, Savolainen V (2008) Iridaceae “out of Australasia”? Phylogeny, Biogeography, and Divergence time based on plastid DNA sequences. *Syst Bot* 33(3):495-508
- Goldblatt P, Takei M (1997) Chromosome cytology of Iridaceae – patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. *Ann MO Bot Gard* 84:285-304
- Grant V (1981) *Plant speciation*. New York: Columbia University Press
- Greilhuber J, Dolezel J, Lyzak MA, Bennett MD (2005) The origin, evolution and proposed stabilization of the term ‘genome size’ and ‘C value’ to describe nuclear DNA contents. *Ann Bot* 95:255-260
- Henderson DM (1976) A biosystematic study of Pacific Northwestern blue-eyed grasses (*Sisyrinchium*, Iridaceae). *Brittonia* 28:149-176
- Husband BC (2004) The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-ploidy populations. *Biol J Linn Soc* 82:537–546
- Innes C (1985) *The world of Iridaceae - a comprehensive record*. Holly Gate Internacional Ltd., Ashington, England
- Johnston IM (1938) The species of *Sisyrinchium* in Uruguay, Paraguay and Brazil. *J Arnold Arboretum* 19:376-401

- Kenton AY, Rudall PJ, Johnson AR (1986) Genome size variation in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) and its relationship to phenotype and habitat. *Bot Gaz* 147:342-354
- Leitch LJ, Bennett MD (2004) Genome downsizing in polyploid plants. *Biol J Linn Soc* 82:651-663
- Lysák M, Doležel J (1998) Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia* 52(2):123-132
- Marie D, Brown SC (1993) A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for seventy species. *Biol Cell* 78:41-51
- Misset MT, Gourret JP (1996) Flow cytometric analysis of the different ploidy levels observed in the genus *Ulex* L. Faboideae-Genisteae in Brittany (France). *Bot Acta* 109(1):72-79
- Mosquin T (1970) Chromosomal repatterning in *Clarkia rhomboidea* as evidence for post-Pleistocene changes in distribution. *Evolution* 18:12-25
- Rudall P, Kenton AY, Lawrence TJ (1986) An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied genera. *Bot Gaz* 147(4):466-477
- Siljak-Yakovlev S, Stevanovic V, Tomasevic M, Brown SC, Stevanovic B (2008) Genome size variation and polyploidy in the resurrection plant genus *Ramonda*: Cytogeography of living fossils. *Env Exp Bot* 62:101-112
- Soltis DE, Soltis PS (1999) Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Tree* 14:348-352
- Soltis DE, Soltis PS, Bennett MD, Leitch LJ (2003) Evolution of genome size in the angiosperms. *Am J Bot* 90:1596-1603
- Stebbins GL (1984) Polyploidy in the distribution of the arctic alpine flora: new evidence and a new approach. *Bot Helv* 94(1):1-13

Stebbins GL (1985) Polyploidy, hybridization, and the invasion of new habitats. *Ann MO Bot Gard* 72:824-832

Tacuatiá LO (2008) Variabilidade Genética e Biologia de *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae). M. Sc. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Wendel JF (2000) Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol* 42:225-249

World Conservation Monitoring Centre (WCMC) (2001) A preliminary list of Rare or endangered Iridaceae species. *Annali di Botanica* 1(2):184-209

**Tabela 1** Localização geográfica das espécies analisadas do complexo *Sisyrinchium vaginatum*,

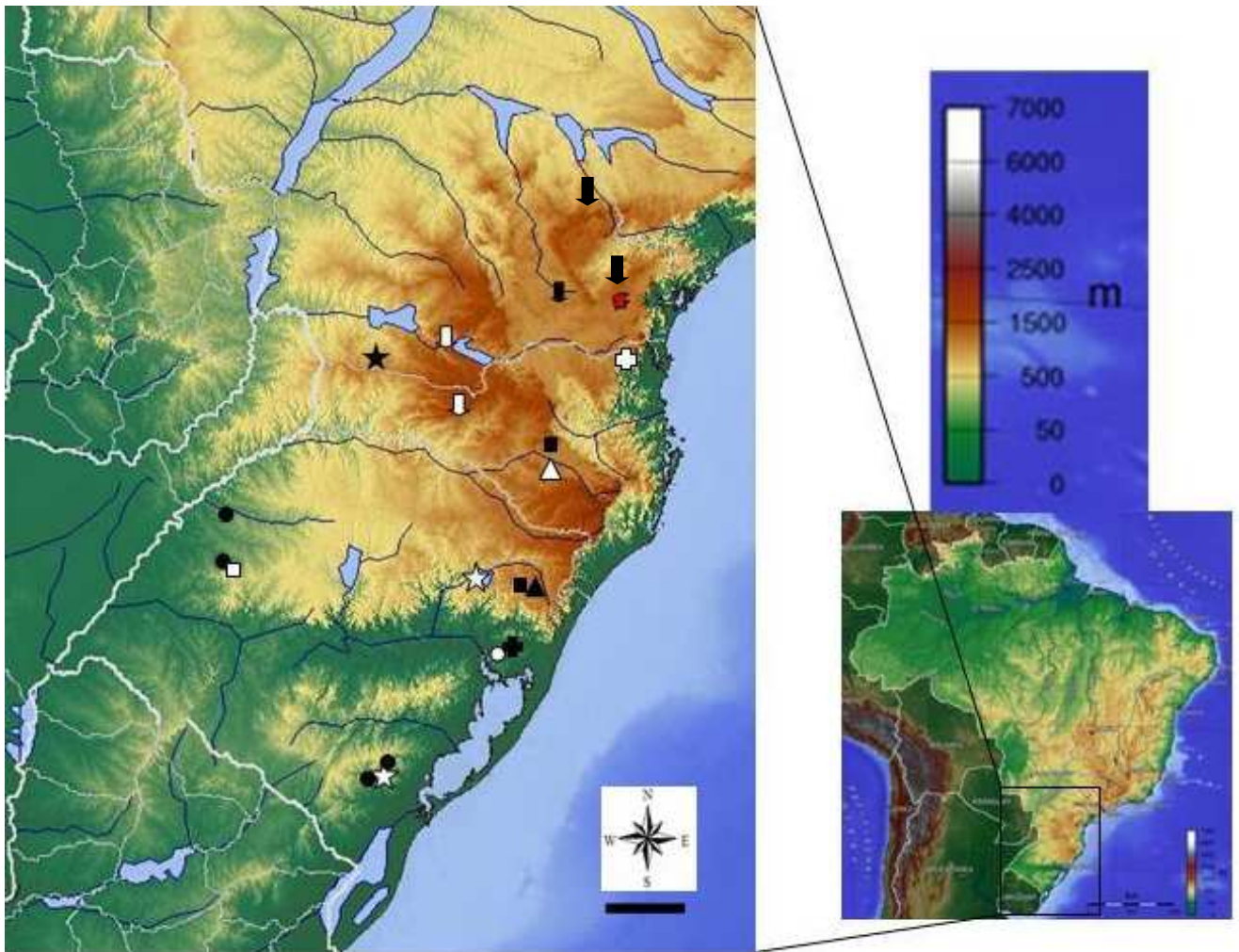
Espécie	Código (voucher)*	Altitude	Latitude	Longitude	Localidade
<i>Sisyrinchium marchio</i> (Vell.) Steud.	ESC318	975	26° 10' 15,2"	49° 14' 4,6"	Campo Alegre, SC
<i>S. balansae</i> Baker	ESC464	895	29° 29' 11,9"	50° 13' 15,6"	São Francisco de Paula, RS
<i>S. vaginatum</i> ssp. <i>perpruinatum</i> Ravenna	ESC228	---	27° 43' 35,2"	50° 20' 07,6"	Lages, SC
<i>S. vaginatum</i> ssp. <i>vaginatum</i> Spreng.	ESC463	---	---	---	Pelotas, RS
	ESC546	112	28° 35' 39,4"	55° 38' 49,3"	Santo Antônio das Missões, RS
	ESC476	72	31° 48' 58,0"	52° 36' 53,4"	Capão do Leão, RS
	LBC02	122	30° 02' 51,6"	51° 07' 01"	Porto Alegre, RS
	ESC471	394	31° 31' 20,0"	53° 30' 40,1"	Candiota, RS
	ESC563	835	29° 04' 00,4"	50° 58' 31,5"	Caxias do Sul, RS
<i>S. parvifolium</i> Baker	ESC560	140	29° 38' 05,8"	54° 16' 05,5"	Unistalda, RS
<i>S. restioides</i> Spreng.	ESC217	---	29° 23' 06"	50° 26' 09"	São Francisco de Paula, RS
	ESC252	---	27° 37' 07,3"	50° 20' 43,1"	Correia Pinto, SC
<i>sp nova1</i>	ESC383	839	26° 22' 00,5"	52° 31' 57,9"	Mariópolis, PR
<i>sp nova2</i>	LBC01	---	30° 02' 51,6"	51° 07' 01"	Porto Alegre, RS
	ESC140	---	30° 03' 35,18"	51° 07' 29,30"	Porto Alegre, RS
<i>S. marchioides</i> Ravenna	ESC319	971	26° 10' 13,9"	49° 13' 59,6"	Campo Alegre, SC
	ESC562	835	29° 04' 00,4"	50° 58' 31,5"	Caxias do Sul, RS
	ESC580	---	---	---	Cambará do Sul, RS
<i>S. weirii</i> Baker	ESC359	1048	25° 27' 55,8"	49° 44' 54,1"	Balsa Nova, PR
	ESC248	---	25° 26' 05,4"	49° 50' 54,5"	Palmeira, PR
	ESC340	1127	24° 21' 17,4"	49° 48' 22,1"	Jaguariaíva, PR
<i>S. alatum</i> Hook.	ESC239	---	26° 05' 10,2"	51° 39' 42,9"	Bituruna, PR
	ESC232	---	27° 00' 21,4"	51° 52' 25,2"	Irani, SC

\*Código do coletor - ESC: Eggers e Souza-Chies; LBC:Lauis Brisolará Corrêa.

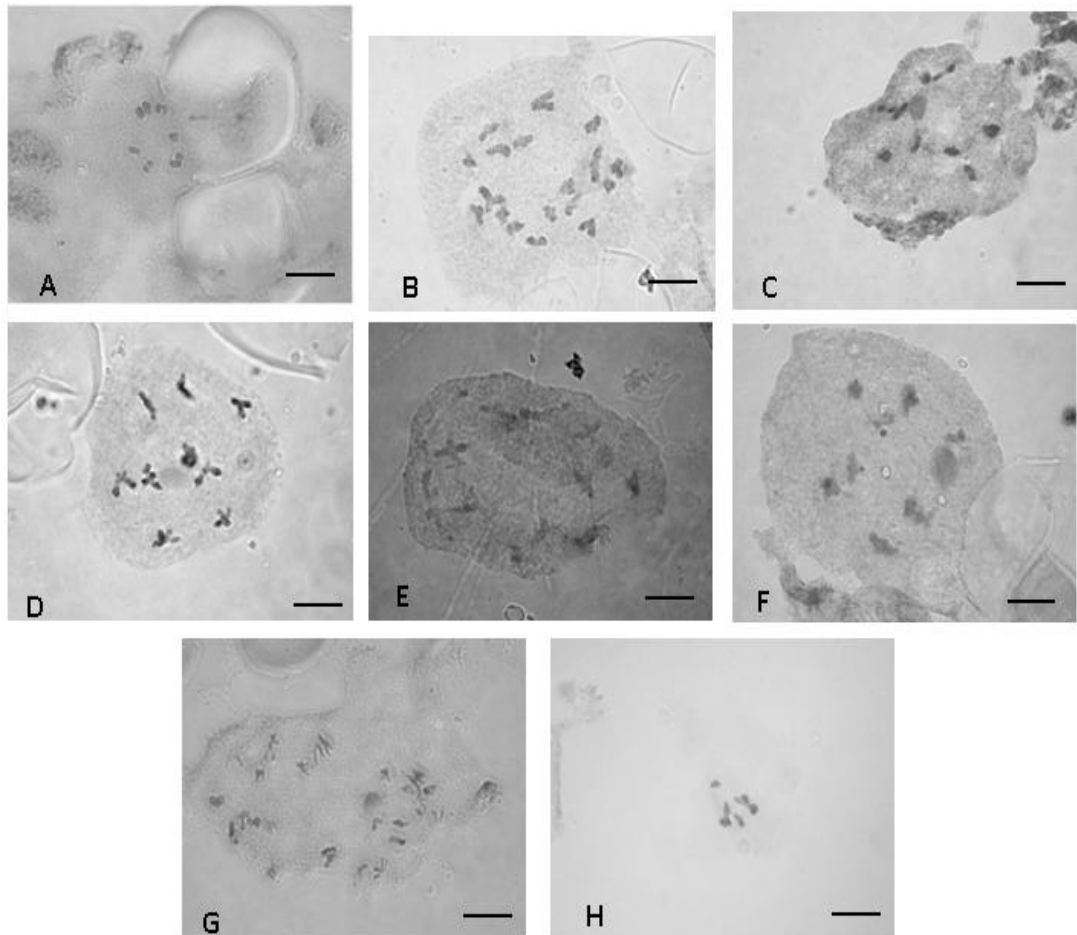
**Tabela 2** Número cromossômico e conteúdo de DNA em espécies do “complexo *Sisyrinchium vaginatum*”.

<b>Espécie</b>	<b>Código (voucher)</b>	<b>N</b>	<b>2C (pg)</b>	<b>n</b>	<b>Antera (mm)</b>	<b>Cx (pg)</b>	<b>Cx (Mbp)</b>
<i>S. marchio</i>	ESC318	---	---	18	1,70	---	---
<i>S. balansae</i>	ESC464	6	2,54±0,06	9	---	1,27	1.244,6
<i>S. vaginatum perpruinatum</i>	ESC228	---	---	9	1,30	---	---
<i>S. vaginatum vaginatum</i>	ESC463	5	2,68±0,08	9	1,20	1,34	1.313,2
	ESC546	4	2,64±0,07	9	1,40	1,32	1.293,6
	ESC476	---	---	9	1,20	---	---
	LBC02	1	2,51	9	1,20	1,25	1.225,0
	ESC471	5	2,60±0,07	---	---	1,30	1.274,0
	ESC563	1	2,28	---	---	1,14	1.117,2
<i>S. parvifolium</i>	ESC560	9	3,11±0,06	9	---	1,55	1.519,0
<i>S. restioides</i>	ESC217	---	---	9	1,00	---	---
	ESC252	---	---	9	1,10	---	---
<i>sp nova1</i>	ESC383	1	2,94	9	1,50	1,47	1.440,6
<i>sp nova2</i>	LBC01	9	2,65±0,04	9	1,30	1,32	1.298,5
	ESC140	---	---	9	1,40	---	---
<i>S. marchioides</i>	ESC319	1	6,26	18	1,90	1,56	1.528,8
	ESC562	5	5,86±0,10	18	2,68	1,46	1.430,8
	ESC580	6	5,54±0,11	18	2,56	1,38	1.352,4
<i>S. weirii</i>	ESC359	---	---	27	2,40	---	---
	ESC248	---	---	27	2,00	---	---
	ESC340	1	6,96	27	2,10	1,16	1.136,8
<i>S. alatum</i>	ESC239	---	---	9	---	---	---
	ESC232	---	---	9	---	---	---

N = número de plantas analisadas para citometria de fluxo; 2C = conteúdo de DNA somático e desvio padrão; n= número cromossômico haplóide; Cx = conteúdo por genoma monoplóide; pg = quantidade de DNA em picogramas; Mbp = quantidade de DNA em Mega pares de base.



**Fig. 1** Mapa em relevo e localização dos pontos de coleta para as espécies do “complexo *Sisyrrinchium vaginatum*”. Símbolos indicam a localização das populações para as espécies analisadas. *S. marchioides* (★), *S. palmifolium* (○), *S. vaginatum* (●), *S. vaginatum* ssp. *perpruinatum* (△), *S. balansae* (▲), *S. parvifolium* (□), *S. restioides* (■), *S. marchio* (⊕), *Sisyrrinchium* sp. nova 1 (★), *Sisyrrinchium* sp. nova 2 (⊕), *S. alatum* (⤵), *S. weirii* (⤵). Barra equivale a 100 Km.



**Fig. 2** Complemento cromossômico haplóide em CMPs (célula-mãe-de-pólen) das espécies do complexo *Sisyinchium vaginatum*, em Diacinese. **A.** *S. vaginatum perpruinatum* (n = 9); **B.** *S. marchioides* (n = 18); **C.** ESC140 (sp. nova, n = 9); **D.** *S. restioides* (n = 9); **E.** *S. parvifolium* (n = 9); **F.** *S. alatum* (n = 9); **G.** *S. weirii* (n = 27); **H.** *S. vaginatum* (n = 9). Escalas correspondem a 10 µm.

# **CAPÍTULO IV**

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados moleculares e citológicos obtidos neste trabalho constituem dados inéditos e levantam uma série de questões a respeito da diversificação de *Sisyrrinchium vaginatum*.

A extensa diversidade morfológica encontrada entre as espécies deste grupo é marcante e está, aparentemente, associada a um polimorfismo fenotípico real entre estas espécies e não a uma plasticidade morfológica transitória, como o que ocorre em ecótipos ao longo de um gradiente geográfico. Durante as coletas, quando houveram espécies ocorrendo em simpatria, muitas vezes com poucos centímetros entre indivíduos de espécies distintas, não havia nenhum indício da formação de híbridos putativos.

As análises relativas à diversidade genética e ao número cromossômico realizadas para as diferentes espécies e populações do “complexo *Sisyrrinchium vaginatum*” no Sul do Brasil sugerem uma alta variabilidade intra-populacional na maioria dessas espécies. Também mostraram que os diferentes fenótipos respectivos a cada uma das espécies analisadas foram devidamente associados com seu nível de ploidia em todas as populações. Ou seja, não parece haver variação do número cromossômico dentro de cada uma das populações e nem entre as diferentes populações da mesma espécie.

As análises de agupamento por indivíduos evidenciaram que os indivíduos de cada local de origem aguparam-se entre si, sem que houvesse mistura de indivíduos de diferentes populações. Contudo, as duas populações de *S. alatum*, embora com significativa separação geográfica, apresentaram baixa taxa de variação intra e inter-populacional.

Os números cromossômicos e conteúdos de DNA descritos na literatura para este grupo se restringem a uma única espécie, *Sisyrrinchium alatum*, com  $2n = 4x = 36$  e  $Cx = 2,1$  pg de DNA. Contudo, as três amostras anteriormente analisadas para esta espécie, eram originais do México (1) e do Peru (2) (Kenton *et al.*, 1986; Ruddal *et al.*, 1986). Após a

comparação com os valores de conteúdo de DNA encontrados em nossas amostras pode-se inferir que aquela deve ser uma outra espécie, pois seu genoma (valor Cx) foi praticamente o dobro do encontrado entre as espécies estudadas, representando um citótipo distinto ( $2n = 2x = 18$ ) daqueles tetraplóides ( $2n = 4x = 36$ ) citados por Kenton *et al.* (1986) e Ruddal *et al.* (1986).

As análises de determinação do número cromossômico permitiram verificar a ocorrência de dois níveis de ploidia nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (diplóides com  $2n = 2x = 18$  e tetraplóides com  $2n = 4x = 36$ ) e três níveis de ploidia no estado do Paraná (diplóides, tetraplóides e hexaplóides com  $2n = 6x = 54$ ). Os diplóides foram descritos pela primeira vez para a seção *Viperella*, sendo o nível de ploidia mais frequente entre as espécies do Sul do Brasil. Com relação à morfologia, era esperada uma relação entre o nível de ploidia dos indivíduos e o tamanho relativo dos órgãos da planta, tal como ocorre para a maioria das espécies poliplóides descritas, onde o efeito “*giga*” é responsável por um aumento no tamanho geral da planta ou de estruturas reprodutivas e vegetativas, tais como flores, frutos, folhas, grãos de pólen e sementes (Ramsey & Schemske, 2002; Adams & Wendel, 2005; Chen, 2007). Embora não tenha sido encontrada nenhuma associação quanto ao tamanho geral das plantas (altura, porte, comprimento de ramos), a maioria das espécies diplóides apresentavam espatas, flores, cápsulas e sementes menores que as de poliplóides. Apesar disso, uma exceção foi encontrada neste estudo, *S. alatum* ( $2n = 2x = 18$ ) não apresentou um fenótipo reduzido em relação aos poliplóides. Esta espécie apresentou cápsulas e folhas ainda maiores que todos os poliplóides estudados, evidenciando que a morfologia característica para esta espécie não é em função de poliploidização, mas sim de sua história evolutiva.

Todos estes resultados têm evidenciado que a poliploidia tem sido um fator de extrema relevância na diversificação deste grupo. Uma hipótese sobre a possível origem híbrida destes

poliplóides não pôde ser sugerida no momento, contudo parece plausível se pensar em alopoliploidia, já que existem muitas espécies diplóides que partilham uma mesma distribuição geográfica, e uma vez que a alopoliploidia gera novas combinações genômicas e uma ampla reestruturação do genoma como um todo, constituindo uma fonte adicional de diversidade genética, com implicações evolutivas importantes no processo de especiação (Soltis & Soltis, 1999). Apesar disso, no trabalho de Kenton *et al.* (1986), os autores apresentam um cariógrama da espécie *S.alatum*, que possui um cariótipo compatível com uma autopoliploidia, apresentando nove grupos morfológicos, com quatro cromossomos em cada um.

A maioria dos grupos taxonômicos em Iridaceae também apresentam poliploidia, sendo estimado que 60% das espécies do Hemisfério Norte são poliplóides e que nas Américas do Sul e Central, são reportados poliplóides (tetra e hexaplóides) para, praticamente, todas as espécies da tribo Tigrideae, constituindo um fator de peculiar relevância na evolução e diversificação das espécies desta família (Goldblatt & Takei, 1997; Goldblatt, 1982).

Pouco se sabe a respeito da biologia reprodutiva do gênero *Sisyrinchium*, e como a poliploidia tem atuado modificando a fenologia e as estruturas reprodutivas nas várias espécies que compõem o gênero *Sisyrinchium*. Da mesma forma, são desconhecidas alterações associadas ao comportamento dos polinizadores. Para algumas espécies de *Sisyrinchium* da América do Norte, já foram descritas modificações na maturação dos órgãos reprodutivos florais associadas com o nível de ploidia das plantas. De forma que espécies protândricas apresentaram redução no intervalo de amadurecimento das partes reprodutivas conforme aumentava o nível de ploidia das espécies estudadas, favorecendo a auto-fertilização nas espécies auto-compatíveis (Henderson, 1976). Além disso, neste mesmo estudo, a auto-compatibilidade foi mais comum nas espécies com altos níveis de ploidia.

Geralmente, espera-se que as plantas poliplóides apresentem taxas mais elevadas de auto-fecundação do que seus progenitores diplóides (Stebins, 1950). Nas espécies com mecanismos genéticos que controlam a auto-incompatibilidade, impedindo a auto-fecundação, a poliploidia poderia ser favorecida pela quebra desse sistema de incompatibilidade genética. No entanto, Mable (2004) acessando uma ampla base de dados a respeito dos números cromossômicos, níveis de ploidia e sistema de compatibilidade em angiospermas, verificou que existem evidências de associação entre poliploidia e autocompatibilidade.

Dentre as espécies brasileiras do gênero, *Sisyrinchium micranthum* (uma espécie com elaióforos) foi estudada por Truylío *et al.* (2002), sendo descrita como uma espécie de fecundação cruzada, auto-incompatível com diferenças no período de amadurecimento das partes reprodutivas (protoginia). Da mesma forma Freitas & Sazima (2003), descreveram aspectos relacionados à biologia reprodutiva de *Sisyrinchium vaginatum*, contudo esta espécie provavelmente é um poliplóide e teve uma determinação equivocada, diferindo da espécie *S. vaginatum*, na qual os estudos de biologia reprodutiva transcorreram no presente trabalho. *S. vaginatum* apresentou padrão similar de antese floral àquele descrito por Freitas & Sazima (2003), no entanto, a fenologia foi distinta, não apresentando pico de floração durante o inverno (maio a agosto), mas durante a primavera (setembro a dezembro). É esperado que em espécies polinizadas por sirfídeos, como aquelas descritas por Freitas & Sazima (2003) haja uma variabilidade genética intra-populacional inferior àquela das espécies polinizadas por abelhas, isso se deve ao comportamento do polinizador, que pode proporcionar um favorecimento do fluxo gênico entre indivíduos com menor grau de parentesco.

Diversos fenômenos podem explicar um cenário de baixa diversidade genética, como autofecundação, alterações entre as interações planta-polinizador, eventos estocásticos, efeito fundador, redução no tamanho efetivo de população (*bottleneck*), entre outros. Com isso, quanto à espécie *Sisyrinchium alatum* ( $2n = 2x = 18$ ) analisada no presente trabalho, há uma

baixa probabilidade de que a pequena porcentagem de polimorfismo encontrada em suas populações seja devida a efeito fundador, já que um padrão polimórfico muito similar foi encontrado nas duas populações, as quais foram coletadas em diferentes estados (SC e PR), com uma distância de pelo menos 120 quilômetros entre as duas populações. Além disso, a reprodução assexuada é improvável em virtude da ausência de características morfológicas relacionadas a esta adaptação, como estolões, ramos com raízes adventícias, rizoma estolonífero, etc. No entanto, devido à observação de uma planta isolada (ESC232), que sob cultivo formou frutos sem uma planta doadora de pólen, provavelmente, sendo de autofecundação espontânea, cujas sementes foram viáveis, isso explica a menor variabilidade genética encontrada nesta espécie em relação a outras auto-incompatíveis, como *S. vaginatum*.

A poliploidia constitui um mecanismo relevante de especiação das plantas e no caso de *Sisyrinchium vaginatum* é evidente seu papel na diversificação das espécies pertencentes a este complexo e ocorrentes no Sul do Brasil.

A integração de diferentes ferramentas para avaliar e caracterizar a variação ocorrente neste complexo foi de extrema importância e revelou a necessidade de se utilizar diferentes ferramentas com novas abordagens para a compreensão dos processos evolutivos envolvidos como um todo.

Em vista de tantas questões a serem esclarecidas, as perspectivas futuras são de amostrar uma área maior de distribuição geográfica no Brasil e na América Latina e manter as abordagens citogenéticas e moleculares. Contudo, o emprego de novas tecnologias de citogenética molecular devem ser pensadas, pois métodos de FISH e GISH, assim como, marcadores moleculares de herança co-dominante, como microssatélites, são imperativos para se estimar a diferenciação cariológica e a possibilidade de se fazer estimativas de fluxo gênico e taxas de cruzamento entre estas espécies, respectivamente. Além disso, são necessários

estudos de diversidade populacional, com um número maior de indivíduos por população, que associados com a determinação do sistema reprodutivo destas, serão determinantes para a formação de modelos de conservação e manejo destas espécies.

# **REFERÊNCIAS**

## **(CAPÍTULOS I, IV)**

## REFERÊNCIAS

- Adams KL, Wendel JF. (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 135–141.
- Assefa K, Merker A, Tefera H (2003) Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic diversity in tef [*Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter]. *Hereditas* 139: 174–183.
- Barret SCH, Harder LD, Worley AC (1996) The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 351:1271-1280.
- Beauverd G (1905) *Plantae damazianae brasiliensis*. Determinées par différents botanistes. *Bull. Herb. Boissier, ser. 2* (5):1077-96.
- Bennett MD (1972) Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proceedings of the Royal Society of London* 181:109-135
- Bentham G, Hooker JD (1883) *Iridaceae, Genera Plantarum* Lovell, Reeve and Company, London, UK.
- Böcher TW (1966) Experimental and cytological studies on plant species. IX. Some Arctic and montane Crucifers. - *Biol. Skr. Danske Vidensk. Selsk.* 14(7):1-74.
- Brewbaker JL (1957) Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. *The Journal of Heredity*, v.48, p.271-277.
- Buchmann SL (1987) The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:343-369.



- Caiola MG, Caputo P, Zanier R (2004) RAPD analysis in *Crocus sativus* L. accessions and related *Crocus* species. *Biologia Plantarum* 48(3): 375-380.
- Charlesworth D (2006) Evolution of plant breeding systems. *Current Biology* 16:726-735.
- Chauveau O, Eggers L, Raquin C, Silvério A, Brown S, Couloux A, Cruaud C, Kaltchuk-Santos E, Yockteng R, Souza-Chies TT, Nadot S (2011) Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogeny of the genus. *Annals of Botany* 107:1287-1312.
- Chen ZJ (2007) Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual Review of Plant Biology* 58:377-406.
- Cholewa AF, Henderson DM (1984) Biosystematics of *Sisyrinchium* section *Bermudiana* (Iridaceae) of the Rocky Mountains. *Brittonia* 36(4):342-363.
- Chukr NS, Capellari JRL (2003) Iridaceae. In Wanderley, M.G.L.; Sheperd, G.J.; Giulietti, A.M.; Melhem, T.S. (Coords) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. São Paulo: FAPESP: Rima. p.127-147.
- Cocucci AR, Vogel S (2001) Oil-producing of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. *Flora* 196:26-46.
- Cruden RW (1977) Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31:32-46.
- Dickel ML, Rates SMK, Ritter MR (2007) Plants popularly used for loosing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *Journal of Ethno-farmacology* 109:60-71.

- Freitas L, Sazima M (2003) Daily blooming pattern and pollination by syrphids in *Sisyrinchium vaginatum* (Iridaceae) in southeastern Brazil. *Journal of the Torrey Botanical Society* 130(2):55-61.
- Goldblatt P (1980) Uneven diploid numbers and complex heterozygosity in *Homeria* (Iridaceae). *Syst. Bot.* 5: 337–340.
- Goldblatt P (1982) Chromosome Cytology in Relation to Suprageneric Systematics of Neotropical Iridaceae. *Systematic Botany* 7(2):186-198.
- Goldblatt P, Hen Rich JE, Rudall P (1984) Occurrence of crystals in iridaceae and allied families and their phylogenetic significance. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 71: 1013-1020.
- Goldblatt P (1990) Phylogeny and classification of Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 77:607-627.
- Goldblatt P, Takei M (1997) Chromosome cytology of Iridaceae – patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. *Ann. Missouri Bot. Gard* 84: 285-304.
- Goldblatt P, Mannig JC, Rudall P (1998) The families and Genera of Vascular Plant. In: Goldblatt P, Mannig JC, Rudall P (ed) *Iridaceae*. Springer, Verlag, Viena, p. 295-333.
- Goldblatt P, Savolainen V, Porteous O, Sostaric I, Powell M, Reeves G, Manning JC, Barraclough TG, Chase MW (2002) Radiation in the Cape and the phylogeny of peacock irises *Moraea* (Iridaceae) based on four plastid DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25:341-360.

Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, Davies TJ, Manning JC, Van der Bank M, Savolainen V (2008) Iridaceae 'out of Australasia'? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. *Systematic Botany*, 33: 495-508.

Guerra M (1988) *Introdução à Citogenética Geral*. 1ª ed, Rio de Janeiro: Editora Guanabara S/A.

Guerra M (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*. 120: 339 – 350.

Henderson DM (1976) A biosystematic study of Pacific Northwestern blue-eyed grasses (*Sisyrinchium*, Iridaceae). *Brittonia* 28:149-176.

Heslop-Harrison J (1983) Self-incompatibility: phenomenology and physiology. *Proceedings of the Royal Society of London B*, v.218, p.371-395.

Innes C (1985) *The world of Iridaceae - a comprehensive record*. Holly Gate Internacional Ltd., Ashington, Sussex RH20 3BA, England.

Jain SK (1976) The evolution of inbreeding in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 7:469-95.

Johnston IM (1938) The species of *Sisyrinchium* in Uruguai, Paraguai and Brasil. *Journal of the Arnold Arboretum* 19: 376-401.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ (2007) *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Massachusetts: Sinauer Associates, 464 p.

Kenton A, Dice JB, Langton DH, Bennett MD (1990) Nuclear DNA amount and karyotype symmetry in *Cypella* and *Hesperoxiphion*. *Evol.Trends Plants* 4: 59–69.

- Kenton A, Heywood CA (1984) Cytological studies in South American *Iridaceae*. *Plant Systematics and Evolution* 146:87-104.
- Kenton A, Rudall P (1987) An Unusual Case of Complex-heterozygosity in *Gelasine azurea* (Iridaceae), and ITS Implications for Reproductive Biology. *Evololutionary Trends in Plants* 1:95-103
- Kenton AY, Rudall PJ, Johnson AR (1986) Genome size variation in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) and its relationship to phenotype and habitat. *Botanical Gazette*, 147:342-354.
- Li A, Ge S (2001) Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa divillosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. *Ann Bot* 7: 585-590.
- Lysák M, Doležel J (1998) Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia* 52(2):123-132
- Mable BK (2004) Polyploidy and self-compatibility: is there an association?. *New Phytologist* 162: 803–811.
- Machado IC (2004) Oil-collecting bees and related plants: a review of the studies in the last twenty years and case histories of plants occurring in NE Brasil. *In* Freitas BM & Pereira JOP (eds) *Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination*. Fortaleza: Imprensa Universitária p.255-280.
- McClendon JF (1921) Some American plants considered as sources of vitamins and as parts of a diet favorable to the preservation of the teeth. *The journal of dental research* 3(2):279-295.
- Meerow AW, Gideon M, Kuhn DN, Schnell RJ (2005) Isolation and characterization of 10 microsatellite loci from *Iris hexagona* (Iridaceae). *Molecular Ecology Notes* 5:410-412.

- Mentz LA, Lutzemberger LC, Schenkel EP (1997) Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'Avila (1910). *Cadernos de Farmácia* 15: 25-47.
- Michener CD (2007) *The Bees of the World*, 2a ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 953 pp.
- Misset MT, Gourret JP (1996) Flow cytometric analysis of the different ploidy levels observed in the genus *Ulex* L. Faboideae-Genisteae in Brittany (France). *Botanica Acta* 109 (1): 72-79.
- Molina RA (1975) Enumeración de las plantas de Honduras. *Ceiba* 19(1): 1-118.
- Narayan RKJ, Durrant A (1983) DNA distribution in chromosomes of *Lathyrus* species. *Genetica* 61:47-53.
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol. Ecol.* 13:1143-1155.
- Ornduff R (1969) Reproductive biology in relation to systematics. *Taxon* 18: 121-133.
- Presl JS (1846) *Wšeobecný Rostlinopsis*, vol. 2. Prague, Czeck Republic: Kronberg.
- Ramsey J, Schemske DW (2002) Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:589 -639.
- Raven PH (1975) The bases of angiosperm phylogeny - Cytology. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 62: 724-764.
- Ravenna P (1968) Notas sobre Iridaceae III. *Bonplandia, Corrientes*, v.2, n.16.
- Ravenna P (1981a) *Kellissa*, a new genus of Iridaceae from South Brazil. *Bull. Mus. Nat., sér. B, Adansonia* 3:105-110.

- Ravenna P (1981b) Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* – I. *Wrightia* 7(1):1-9.
- Ravenna P (1983) *Catila* and *Onira*, two new genera of South American Iridaceae. *Nordic Journal of Botany* 3(2):197-205.
- Ravenna P (2001) *S. megapotamicum*. *Onira*, *Botanical Leaflets* 6(1):7-8.
- Ravenna P (2002a) Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* – VIII. *Onira*, *Botanical Leaflets* 6(7):48-58.
- Ravenna P (2002b) Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* – IX. *Onira*, *Botanical Leaflets* 7(6):20-29.
- Reddy MP, Sarla N & Siddiq E (2002) A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9–17.
- Reeves G, Chase MW, Goldblatt P, Rudall P, Fay MF, Cox AV, Lejeune B, Souza-Chies TT (2001) Molecular systematics of Iridaceae: evidence from four plastid DNA regions. *American Journal of Botany* 88(1):2074-2087.
- Renner SS, Schaefer H (2010) The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. *Phil. Trans. R. Soc.* 365:423-435.
- Renno JF, Schmelzer GH, de Jong JH (1995) Variation and geographical distribution of ploidy levels in *Pennisetum* section *Brevivalvula* (Poaceae) in Burkina Faso, Benin and southern Niger. *Plant Systematics and Evolution* 198 (1-2): 89-100.
- Ricroch A, Yockteng R, Brown SC, Nadot S (2005). Evolution of genome size across some cultivated *Allium* species. *Genome* 48: 511–520.

- Rudall P, Kenton AY, Lawrence TJ (1986) An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied genera. *Botanical Gazette* 147(4):466-477.
- Schifino-Wittmann MT, Dall' Agnol M (2002) Self-incompatibility in plants. *Ciência Rural*, Santa Maria 32(6):1083-1090.
- Sica M, Gambá G, Montieri S, Gáudio L, Aceto S (2005) ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. *BMC Genet* 6:1-7
- Soltis DE, Soltis PS (1999) Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, Oxford, v.14, p. 348-352.
- Soltis DE, Soltis PS, Tate JA (2003) Advances in the study of polyploidy since *Plant Speciation*. *New Phytologist* 161: 173–191.
- Souza CD, Felfili JM (2006) Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 20(1):135-142.
- Souza-Chies TT, Bittar G, Nadot S, Carter L, Besin E, Lejeune B (1997) Phylogenetic analysis of Iridaceae with parsimony and distance methods, using the plastid *rps4* gene. *Plant Systematics and Evolution* 204:109-123.
- Sprengel CPJ (1825) *Syst. Veg.* (ed. 16) 1: 166.
- Standley PC, Steyermark JA (1952) Iridaceae. *in: Flora of Guatemala - Part III*. *Fieldiana, Bot.* 24(3):159-178.
- Stebbins GL (1950) *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York, New York, USA.
- Stebbins GL (1970) Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1:307-326.

Stebbins GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. London: Edward Arnold Publishers, 216p.

Stevens PF (2001) Angiosperm phylogeny website. Capturado em 8 de dezembro de 2010. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>.

Strike SS (1994) Ethnobotany of the California indians: Aboriginal uses of California's indigenous plants. Champaign: Koeltz Scientific Books. v. 2, *apud* Adams JR, J.D., Garcia, C. 2006. Women's health among the Chumash. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine 3(1):125-131.

Sybenga J (1992) Cytogenetics in Plant Breeding. Berlin:Springer.

Tacuatiá LO (2008) Variabilidade Genética e Biologia de *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae). Dissertação de Mestrado apresentada para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 131 páginas.

Takeuchi C, Affonso P, Chukr NS (2008) Levantamento de Iridaceae Juss. no Núcleo Curucutu, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. Revista do Instituto Florestal 20(1):51-53.

Truylio B, Harter-Marques B, Engels W (2002) Biologia floral e polinização de *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) na região do planalto das araucárias do Rio Grande do Sul, Brasil. Biociências 10:11-24.

Vieira EF, Rangel SS (1988) Planície costeira do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: SAGRA.

Vieira ER, Santos EP, Tardivo RC (2003) Flórua do Morro dos perdidos, Serra de Araçtuba, Paraná, Brasil: Iridaceae. Estudos de Biologia 25(51):17-29.



Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon FB, Rieseberg LH (2009) The frequency of polyploidy speciation in vascular plants. PNAS 106(33): 13875-79

Wróblewska A, Brzosko E, Czarnecka BE, Nowosielski J (2003) High levels of genetic diversity in populations of *Iris aphylla* L. (Iridaceae), an endangered species in Poland. Botanical Journal of the Linnean Society 142:65–72.