

*Catherine Guzati*

O papel das variações citogenéticas na  
compreensão das mudanças fenológicas em  
espécies de *Cypella* Herb.



Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Botânica

O papel das variações citogenéticas na compreensão das mudanças fenológicas em espécies de *Cypella* Herb.

*Catherine Guzati*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos

Porto Alegre – 2023

“I am a woman.  
They think they own my freedom.  
So I let them,  
and I happen.”

– Joumana Haddad

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida e ao ProTax/CNPq/FAPERGS por grande parte do financiamento deste projeto.





# SUMÁRIO

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| Agradecimentos.....               | 3  |
| Organização.....                  | 6  |
| Resumo.....                       | 7  |
| Abstract.....                     | 8  |
| Capítulo I.....                   | 9  |
| Introdução Geral.....             | 10 |
| Referencial Teórico.....          | 11 |
| Fenologia da Floração.....        | 11 |
| Citogenética Vegetal.....         | 12 |
| A família Iridaceae Juss.....     | 13 |
| O gênero <i>Cypella</i> Herb..... | 16 |
| Perguntas norteadoras .....       | 22 |
| Objetivos.....                    | 23 |
| Objetivo Geral.....               | 23 |
| Objetivos Específicos.....        | 23 |
| Capítulo IV.....                  | 70 |
| Resultados Preliminares.....      | 71 |
| Considerações Finais.....         | 77 |
| Anexo I.....                      | 81 |
| Anexo II.....                     | 84 |

# ORGANIZAÇÃO

Esta dissertação está estruturada em quatro capítulos: uma introdução geral e referencial teórico, dois capítulos referentes a manuscritos submetidos ou a serem submetidos e um capítulo com resultados preliminares e considerações finais. Além disso, esta dissertação inclui dois apêndices finais contendo materiais complementares que foram elaborados pela pesquisadora durante o período de seu mestrado.

**Capítulo I:** Introdução Geral e Referencial Teórico

**Capítulo II:** Chromosome number and genome size of the Iridaceae Juss. family

– *Manuscrito submetido à TAXON - IAPT/IOPB Chromosome Number Data*

**Capítulo III:** Isolated but not alone: Phenological patterns in *Cypella pusilla* (Iridaceae)

– *O manuscrito será submetido para a revista Botanical Journal of the Linnean Society*

**Capítulo IV:** Resultados Preliminares e Considerações finais

**Anexo I:** Iridaceae Juss. from Morro São Pedro

– *Guia submetido ao The Field Museum Field Guides*

**Anexo II:** Chromosome number and genome size of the Hymenophyllaceae Mart. (Polypodiopsida) family

– *Manuscrito submetido à TAXON - IAPT/IOPB Chromosome Number Data*

## RESUMO

Diferenças fenológicas podem levar ao desenvolvimento de variações em caracteres florais. Entre elas, o isolamento fenológico pode atuar como uma das etapas iniciais na diversificação das linhagens. *Cypella pusilla* se destaca das outras espécies do gênero devido a suas peculiaridades em relação à fenologia, biologia reprodutiva e ecologia de polinização. Ao contrário de outras espécies próximas, *C. pusilla* apresenta dois picos de floração (primavera e outono), mas tem baixas taxas de visitação de polinizadores e produção de frutos em ambos os eventos de floração. *Cypella fucata* é outra espécie desse grupo que possui algumas singularidades. A espécie apresenta populações que florescem exclusivamente durante a manhã e outras apenas à tarde. Em Iridaceae, existe uma importante diversidade em relação ao número de cromossomos, tamanho do genoma e arquitetura cariotípica. Até o momento, apenas cinco das 36 espécies de *Cypella* têm números de cromossomos e tamanhos de genoma conhecidos. De acordo com a literatura, a poliploidização e a variação no tamanho do genoma podem afetar características fenológicas e reprodutivas. Assim, este trabalho tem como objetivo investigar se populações de *C. pusilla* e *C. fucata* em diferentes eventos fenológicos apresentam variações citogenéticas. Três populações de *C. pusilla* e quatro populações de *C. fucata* foram amostradas no Rio Grande do Sul. A coleta de dados foi realizada em 2022, nos meses de abril e novembro. Foram conduzidos estudos sobre fenologia, biologia reprodutiva, número de cromossomos, estimativa do tamanho do genoma e cariótipo. *Cypella fucata* não apresentou variação entre as quatro populações analisadas. Curiosamente, o estudo fenológico para *C. pusilla* mostrou que os indivíduos que florescem em cada pico de floração não são os mesmos. Todas as populações estudadas apresentaram o mesmo número de cromossomos  $2n = 14$ . No entanto, as populações de *C. pusilla* apresentaram diferenças estatisticamente significativa nos tamanhos de genoma entre as estações:  $2C = 3,43 \text{ pg} \pm 0,03$  (primavera),  $2C = 3,59 \text{ pg} \pm 0,02$  (outono) e  $2C = 3,67 \text{ pg} \pm 0,06$ . A partir da análise do pólen, observou-se que a população amostrada na primavera apresentou baixas taxas de viabilidade polínica (46%), o que contrastou com as populações analisadas no outono: 97% e 83%. O índice de autoincompatibilidade, com base nos resultados dos experimentos de biologia reprodutiva, indicou que a espécie é autoincompatível, pois apenas poucos frutos foram formados a partir de autopolinização. O índice de limitação polínica foi determinado para cada população. Esses dados evidenciaram que apenas a população da primavera apresenta limitação polínica. Uma vez que os indivíduos que florescem na primavera não são os mesmos que os do outono e que há uma diferença significativa nos valores de  $2C$  e na produção de frutos, e tais variações podem estar potencialmente relacionadas a uma segregação temporal entre indivíduos da mesma população. No entanto, é importante ressaltar que o tamanho do genoma é apenas um de muitos fatores que podem afetar a fenologia, e estudos adicionais são necessários para entender completamente essas relações.

**Palavras-chave:** biologia reprodutiva; cariótipo; vegetação campestre; espécies ameaçadas; fenologia; número cromossômico; tamanho de genoma, viabilidade polínica

## ABSTRACT

Floral phenological differences may lead to the development of unique floral traits. Among these variations, phenological isolation can act as one of the initial steps in lineage diversification. *Cypella pusilla* stands out from other species of the genus due to its peculiarities in relation to phenology, reproductive biology and pollination ecology. Unlike the other species closely related, *C. pusilla* has two flowering peaks (spring and autumn), yet presents low rates of pollinator visitation and fruit production in both flowering events. *Cypella fucata* is another species of this group that has some singularities. The species presents some populations that flower exclusively during the morning and others only in the afternoon. In Iridaceae, there is an important diversity in relation to chromosome number, genome size and karyotypic architecture. So far, only five out of 36 *Cypella* species have known chromosome numbers and genome sizes. According to literature, polyploidization and genome size variation can affect phenological and reproductive traits. Thereby, this work aims to investigate whether populations of *C. pusilla* and *C. fucata* in distinct phenological events present any cytogenetic variations. Three populations of *C. pusilla* and four populations of *C. fucata* were sampled in Rio Grande do Sul. Data collection was carried out in 2022 during the months of April and November. Studies on phenology, reproductive biology, chromosome number, genome size estimation, and karyotype were conducted. *Cypella fucata* did not present any variation between the four populations analyzed. Interestingly, the phenological study for *C. pusilla* showed that the individuals that bloom in each flowering peak are not the same. All populations studied presented the same chromosome number  $2n = 14$ . Despite that, *Cypella pusilla* populations showed a statistically significant variation in genome sizes between seasons:  $2C = 3.43\text{pg} \pm 0.03$  (Spring),  $2C = 3.59\text{pg} \pm 0.02$  (Autumn) and  $2C = 3.67\text{pg} \pm 0.06$ . From the pollen analysis, it was observed that the population sampled in spring had low pollen viability rates (46%), which contrasted with the populations analyzed in autumn: 97% and 83%. The self-incompatibility index, based on the results of reproductive biology experiments, indicated that the species is self-incompatible, as only few fruits were formed from self-pollination. The pollen limitation index was determined for each population. These data showed that only the spring population presents pollen limitation. Bearing in mind that the individuals that bloom in spring are not the same as those in autumn and that there is a significant difference in their  $2C$  values and their reproductive outputs, such variations could potentially be linked to a temporal segregation among conspecific individuals within the same population. However, it is important to keep in mind that genome size is just one of many factors that can impact phenology, and additional studies are needed to fully understand these relationships.

**Keywords:** genome size; grasslands; karyotype; phenology; pollen stainability; reproductive biology; threatened species

# *CAPÍTULO 1*

## **INTRODUÇÃO GERAL**

## Introdução Geral

A diversificação das angiospermas vem sendo alvo de muitos estudos em diferentes grupos taxonômicos, e para isso, diversas abordagens têm sido empregadas. A investigação de caracteres citogenéticos e da fenologia da floração têm se mostrado relevante para a compreensão dos mecanismos impulsionadores da diversificação (Olesen *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2011; Souza-Chies *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2015; Tacuatiá *et al.*, 2017; Ramos & Schiestl, 2019). A literatura traz diversos estudos, em diferentes famílias botânicas, que evidenciam como a poliploidia (duplicação do genoma completo) e variações no tamanho do genoma podem acarretar mudanças na fenologia reprodutiva de uma espécie, levando a alterações no período de floração ou no horário de antese floral (Tacuatiá *et al.*, 2012; Ramos & Schiestl, 2019). As variações da fenologia em uma mesma espécie podem funcionar como uma barreira que atua na segregação temporal dos indivíduos de uma população, dificultando intercruzamentos. Isso, por sua vez, pode resultar no isolamento reprodutivo de diferentes linhagens, potencialmente levando à formação de novas espécies (Osmolovsky *et al.*, 2023). A associação entre caracteres citogenéticos e a fenologia da floração pode desempenhar um papel importante na especiação e na adaptação das angiospermas, fornecendo um contexto abrangente para entender como fatores genéticos e ambientais moldam a biodiversidade vegetal ao longo do tempo. Portanto, a investigação de tais aspectos pode ampliar a visão dos processos subjacentes à diversificação das plantas com flores.

Na família Iridaceae Juss., variações citogenéticas desempenham um papel importante na evolução. A poliploidia, em especial, parece ter sido um mecanismo chave dentro da família, indicando uma origem paleopoliploide (Goldblatt & Takei, 1997). A neopoliploidia é amplamente reportada, sendo especialmente importante na tribo Tigridieae, onde há registros de séries poliploides tanto entre diferentes espécies do mesmo gênero como até mesmo dentro de uma mesma espécie (Goldblatt & Takei, 1997; Goldblatt e Manning, 2008; Moraes *et al.*, 2015). Mudanças no sistema de polinização, a presença de estruturas especializadas de atração e recompensa, alterações fenológicas e no modo de reprodução vem sendo amplamente investigadas em Iridaceae e à luz da filogenia, evidenciando que estes são aspectos cruciais para a compreensão e a reconstrução da história evolutiva dessa família (Chauveau *et al.*, 2011; Chauveau *et al.*, 2012; Oleques *et al.*, 2020; Pastori *et al.*, 2022). Levando em conta esse cenário, as espécies de *Cypella* Herb., alvo deste projeto, são modelos interessantes para investigar uma possível relação entre variações citogenéticas e variabilidade fenológica tendo em vista particularidades não apenas na fenologia, mas também na diversidade morfológica

entre populações e no sistema de polinização altamente especializado. Compreender essas relações é relevante para entender como essas espécies se adaptaram e diversificaram ao longo do tempo, e como fatores genéticos e ecológicos podem se relacionar e contribuir para a evolução do gênero.

## **Referencial Teórico**

### ***Fenologia da Floração***

O momento da floração desempenha um papel fundamental no ciclo de vida das plantas, afetando diretamente suas interações com o ambiente e com outras espécies vegetais (Kudo, 2006). A observação e análise das condições que desencadeiam o processo de floração, a duração da fase reprodutiva e a variação desses padrões entre diferentes espécies e populações são pontos importantes a serem caracterizados dentro de uma dada espécie, tendo, até mesmo, repercussões em decisões para sua conservação. Isto porque, a fenologia da floração possui implicações significativas na reprodução, na dispersão de pólen, na formação de sementes e até mesmo na diversificação das angiospermas. O cronograma reprodutivo das plantas com flores é um traço de extrema relevância para as espécies, uma vez que controla a disponibilidade de parceiros reprodutivos e a exposição a fatores bióticos e abióticos, exercendo influência direta sobre o sucesso reprodutivo (Rathcke, 1983; Kudo, 2006).

Distintos padrões de fenologia floral são essenciais para a evolução das angiospermas, uma vez que influenciam a dinâmica reprodutiva das plantas, afetando o fluxo gênico dentro e entre as populações (Franks, 2015; Chmura *et al.*, 2019). Entre diferentes espécies, é possível verificar distintas estratégias fenológicas, com algumas plantas florescendo apenas uma vez por ano e outras apresentando múltiplos picos de floração. Essas variações podem ser atribuídas a diversos fatores, como ecológicos, disponibilidade de polinizadores, competição por recursos e adaptação ao ambiente (Kudo, 2006; Caruso, 2006; Chmura *et al.*, 2019). As mudanças climáticas também têm impacto na fenologia reprodutiva das plantas. Por exemplo, algumas espécies podem ter sua floração alterada em resposta a períodos de estresse ambiental, como secas ou geadas, ou ainda ao aquecimento global (Root *et al.*, 2003; Parmesan, 2006). A fenologia da floração pode estar associada também a traços determinados geneticamente (Weis & Kossler, 2004).

Características relacionadas à reprodução, como as fenotípicas e fenológicas, estabelecem uma conexão direta entre a evolução das plantas dentro de uma mesma espécie e as taxas de diversificação de clados onde estas se inserem (Caruso, 2006; Segraves & Thompson, 1999; Segraves & Anneberg, 2016). Mudanças nesses atributos podem resultar em características florais distintas entre indivíduos de uma mesma população, contribuindo para a segregação de linhagens, isolamento reprodutivo e, eventualmente, à especiação. Nesse contexto, o isolamento fenológico – barreira pré-zigótica causada por diferenças no tempo de floração ou horário de antese floral – pode ser um dos primeiros passos na diversificação de linhagens (Kudo, 2006; Nuismer & Cunningham, 2005).

### *Citogenética Vegetal*

A citogenética é uma importante área do conhecimento que tem contribuído para a compreensão da evolução de diversas espécies vegetais. Por meio dessa abordagem, é possível não apenas identificar, mas também mapear variações sutis ou expressivas no número e estrutura de cromossomos e no tamanho do genoma (Guerra, 2004; Guerra, 2008; Guerra, 2012). Tais variações se fazem notar não somente entre distintos grupos taxonômicos, mas também entre diferentes populações pertencentes a uma mesma espécie. Modificações relacionadas ao número cromossômico, como eventos de poliploidia que envolvem a duplicação completa do genoma, são frequentemente encontradas em diversas linhagens de plantas e desempenham um papel importante na origem e evolução das angiospermas (Segraves & Anneberg, 2016).

Atualmente o tamanho de genoma vem sendo alvo de inúmeros estudos evolutivos e de diversidade, uma vez que alterações na quantidade de DNA de uma espécie podem acarretar mudanças significativas em diversas características das plantas, incluindo as reprodutivas e adaptativas (Simova & Herben, 2012; Dias *et al.*, 2018; Veselý *et al.*, 2020). O tamanho do genoma pode ser alterado em resposta a uma variedade de fatores e não necessariamente está relacionado ao aumento do nível de ploidia. Isso inclui, por exemplo, a amplificação de transposons e a eliminação repetida de pequenos fragmentos de DNA, causando respectivamente, aumentos e diminuições no valor do tamanho de genoma (Hawkings *et al.*, 2006; Woodhouse *et al.*, 2010; Devos *et al.*, 2002; Petrov, 1997)

A relação entre a especiação e a poliploidia é também um aspecto muito relevante, uma vez que pelo menos 15% dos eventos de especiação nas angiospermas são acompanhados

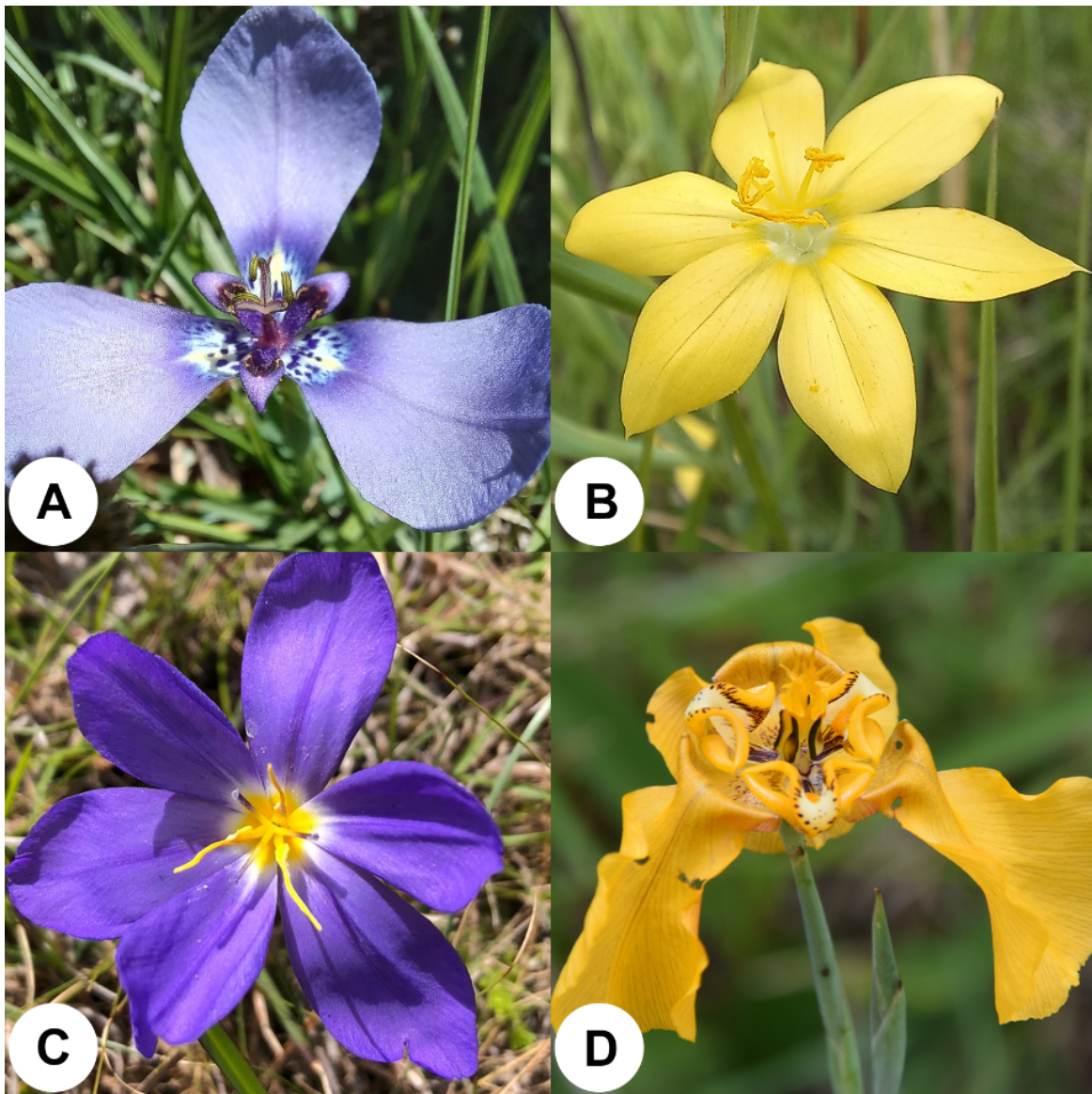


por um aumento no nível de ploidia (Soltis *et al.*, 2009; Wood *et al.*, 2009). A duplicação do genoma completo pode resultar em barreiras reprodutivas entre diferentes citótipos, sendo considerado um mecanismo de especiação instantâneo (Ramsey & Schemske, 2002; Rieseberg & Willis, 2007). O estabelecimento de linhagens poliploides geralmente requer alterações em atributos reprodutivos, tais como quebra de autoincompatibilidade com favorecimento à autogamia ou a transição para reprodução assexuada (Otto & Whitton, 2000; Ramsey & Schemske, 2002).

As variações nas características citogenéticas podem exercer influência sobre uma ampla gama de mudanças fenotípicas, estratégias de reprodução (níveis de autocompatibilidade) e interações bióticas e abióticas (Segraves & Annenberg, 2016; Yves Van De Peer *et al.*, 2020). A fenologia reprodutiva também pode estar relacionada à diversidade citogenética dentro de indivíduos da mesma espécie (Pegoraro *et al.*, 2019, Rezende *et al.*, 2020; Barringer, 2007). Ramos & Schiestl (2019) reportam que a diferenciação no período de floração ou no horário de abertura das flores entre diferentes citótipos pode resultar em uma segregação temporal entre indivíduos da mesma espécie, contribuindo para a diversificação de linhagens. Estudos anteriores também têm evidenciado uma correlação entre o tamanho do genoma e a época de floração de espécies, especialmente em geófitas (Veselý *et al.*, 2011). Tais variações resultantes de eventos de poliploidia ou alterações no tamanho de genoma, podem prejudicar as interações planta-polinizadores, podendo levar a espécie a uma limitação nas suas taxas reprodutivas, podendo causar alterações substanciais nos seus sistemas de polinização (Rezende *et al.*, 2019).

### *A família Iridaceae Juss.*

Iridaceae é uma família de monocotiledôneas pertencente à ordem Asparagales (APG IV, 2016), com mais de 2000 espécies distribuídas em aproximadamente 70 gêneros (Goldblatt *et al.*, 2008). As plantas dessa família são encontradas principalmente na África Subsaariana e na região Neotropical, considerados possíveis centros de diversidade (Goldblatt & Manning, 2008). Iridaceae é dividida em sete subfamílias, sendo Iridoideae uma das mais diversas, com cerca de 40% das espécies (Goldblatt & Manning, 2008; Chauveau *et al.*, 2012; Eggers *et al.*, 2020). No Brasil, as plantas desta subfamília estão bem representadas nas regiões de vegetação campestre, como os gêneros *Sisyrinchium* L., *Calydorea* Herb., *Cypella* Herb. e *Herbertia* Sweet (Figura 1) (Souza-Chies *et al.*, 2012).



**Fig. 1.** Representantes de Iridoideae: A = *Herbertia lahue* (Molina) Goldblatt, B = *Sisyrinchium palmifolium* L., C = *Calydorea crocroides* Ravenna., e D = *Cypella fucata* Ravenna. Fotos: Dani JG, Guzati C e Buneker H.

As plantas dessa família são especialmente conhecidas pela sua diversidade morfológica, incluindo variabilidade em características florais (Rudall, 1994, Goldblatt *et al.*, 1998; Goldblatt & Manning 2008). Iridaceae é uma das poucas famílias de angiospermas que apresentam três tipos de recursos florais: néctar, óleo e pólen (Pastori *et al.*, 2022). A disponibilidade dessas recompensas florais corrobora para tamanha diversificação da família, uma vez que essas características influenciam na seleção mediada por polinizadores (Johnson *et al.*, 2010; Van Der Niet & Johnson, 2012; Van Der Niet *et al.*, 2014). Essa extensa variação nos traços florais e a diversidade de recompensas observada nesse grupo indica uma relação

com distintos sistemas de polinização e são aspectos importantes a serem estudados para a compreensão da evolução da família.

Em Iridaceae, a poliploidia é um fenômeno frequente, desempenhando um papel fundamental na ampla variabilidade cariotípica observada entre as várias espécies do grupo (Goldblatt & Henrich, 1991; Guerra, 1991; Goldblatt & Takei, 1997). As pesquisas de Goldblatt e Takei (1997) apontaram ainda que a variação no número de cromossomos, em grande parte, resulta de disploidia descendente. As variações cromossômicas estruturais também são evidenciadas pela presença de heteromorfismos nos braços cromossômicos de algumas espécies, indicando a ocorrência de translocações recíprocas desiguais (Kenton & Rudall, 1987; Goldblatt & Takei, 1997; Alves *et al.*, 2011). Essas translocações se referem a rearranjos cromossômicos nos quais ocorre uma troca de material genético entre dois cromossomos de forma desequilibrada, resultando em ganho ou perda de material genético em pelo menos um dos cromossomos envolvidos (Goldblatt & Takei, 1997). Adicionalmente, Goldblatt *et al.* (1984) propuseram que a evolução do cariótipo em Iridaceae tem sido caracterizada por flutuações no tamanho do genoma.

Variações em traços florais como morfologia e fenologia, bem como diferenças nos níveis de autocompatibilidade já foram reportadas em distintos citótipos de espécies de Iridaceae como em *Herbertia lahue* (Molina) Goldblatt e *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Stiehl-Alves *et al.*, 2016; Tacuatiá *et al.*, 2012, 2017). Em *S. micranthum*, foi observada a presença de variabilidade intraespecífica em traços florais de indivíduos simpátricos que apresentam diferentes níveis de ploidia, no qual cada morfotipo possui um horário de antese floral distinto, evitando o intercruzamento entre eles (Tacuatiá *et al.*, 2012).

Dentro da subfamília Iridoideae, a tribo Tigridieae é dividida em dois clados bem sustentados: Clado A e Clado B (Chauveau *et al.*, 2012). Em relação às características morfológicas, os integrantes dessa tribo são plantas geófitas (i.e. apresentam bulbos) com folhas plicadas e seis tépalas que podem ser de tamanhos contrastantes ou iguais/semi iguais. Além disso, uma das sinapomorfias de Tigridieae é a presença de pólen monossulcado. Para o Clado A de Tigridieae, é sugerido como número básico de cromossomos  $x = 7$ , com presença de séries poliplóides para alguns gêneros como em *Herbertia* Sweet, mas sem eventos de disploidia (Moraes *et al.*, 2015). As espécies diplóides do clado apresentam caracteristicamente cariótipo bimodal, com dois pares cromossômicos distintamente maiores e cinco menores, sendo um par satelitado (Moraes *et al.*, 2015).

## O gênero *Cypella* Herb.

*Cypella* é um gênero do Clado A de Tigrídieae e representa um dos maiores da tribo, com aproximadamente 30 espécies descritas (Eggers *et al.*, 2020). O número exato de espécie ainda é desconhecido, indicado por tratamentos taxonômicos conflituosos e problemas de circunscrição no gênero (Eggers *et al.*, 2020). O gênero é considerado não monofilético segundo a filogenia publicada por Chauveau *et al.* (2012) e, mais recentemente, por Pastori *et al.* (2018) (Figura 2). Essas filogenias evidenciaram que *Cypella* se divide em dois grupos: a) grupo o que inclui *Kelissa* Ravenna, *Onira* Ravenna, *Herbertia* Sweet e *Cypella hautalli* (Kuntze) R.C.Foster e b) grupo formado pelas demais espécies de *Cypella* (Chauveau *et al.*, 2012). Apesar de Goldblatt & Manning (2008) considerarem as variações morfológicas entres os gêneros pouco diferenciáveis, ainda não há consenso entre os autores em relação à separação de *Kelissa*, *Onira* e *Cypella*. Isso mostra que os dados filogenéticos para Tigrídieae ainda precisam ser melhor investigados.

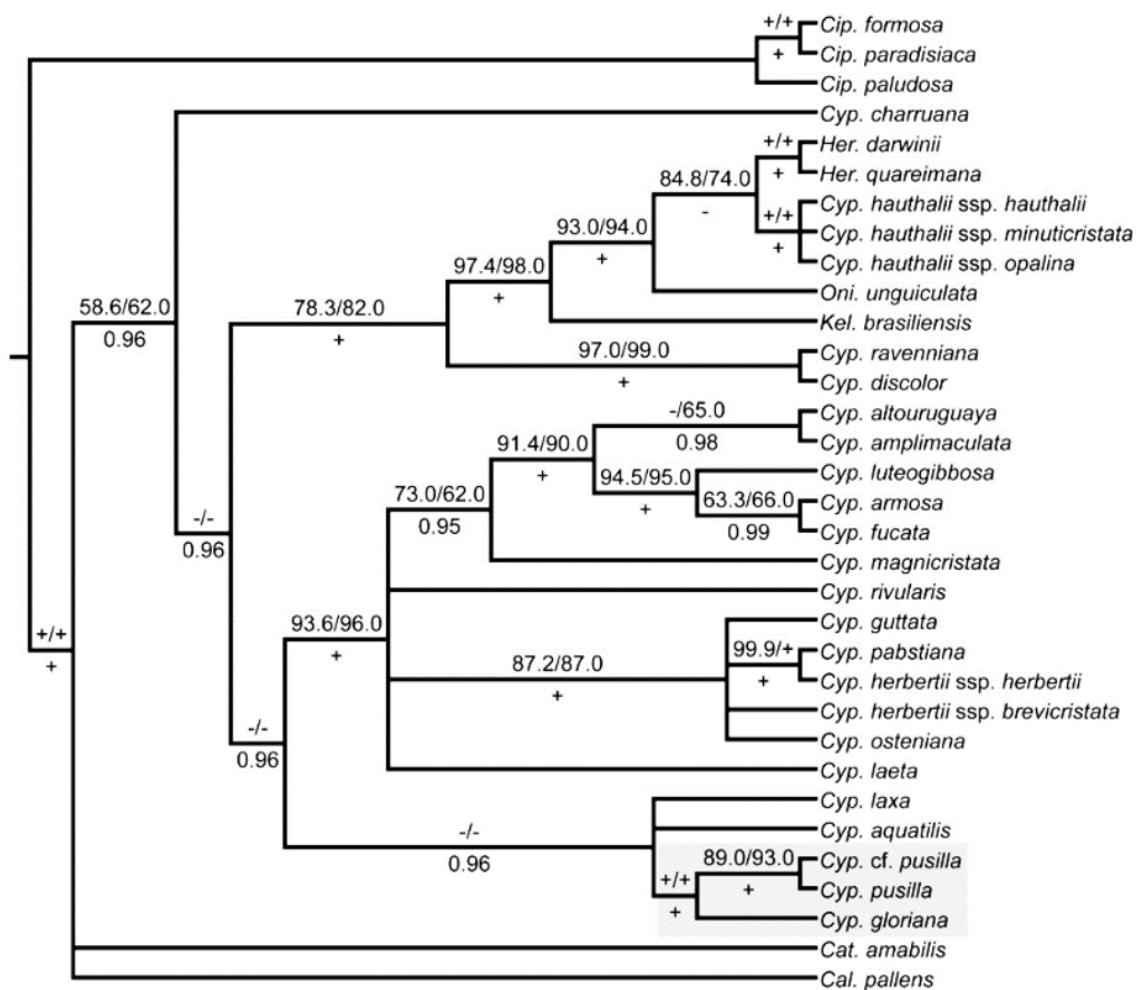


Fig. 2. Filogenia atual do gênero *Cypella*. Figura retirada de Pastori *et al.* (2018).

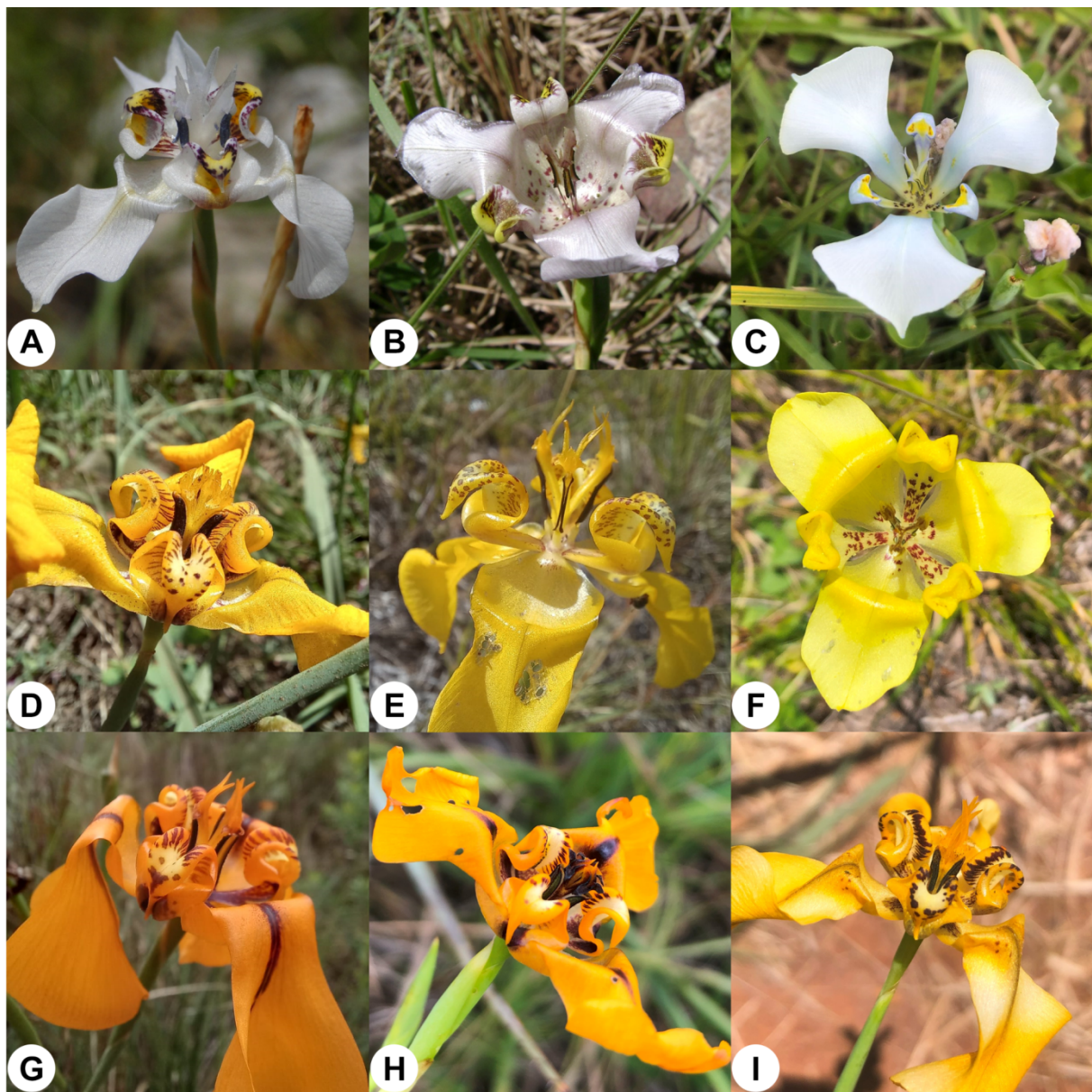
As plantas desse gênero são classificadas como ervas perenes, possuem folhas pouco numerosas e apresentam flores efêmeras que duram apenas um dia (Eggers *et al.*, 2019). Os integrantes desse táxon estão distribuídos pela América do Sul e são frequentemente encontrados na unidade biogeográfica do Río de la Plata (RPG), que se estende pelo sul do Brasil, Uruguai, nordeste da Argentina e sudeste do Paraguai (Chauveau *et al.*, 2014). RPG é dividida nas sub-regiões “Campos” e “Pampas” e é considerada a mais extensa e importante unidade biogeográfica constituída por área de campos (Medan *et al.*, 2011). Apesar de sua importância, a área é constantemente utilizada na agricultura, sendo considerada uma das regiões com maiores taxas de mudanças de usos da terra e de expansão agrícola no mundo (Baldi & Paruelo, 2008). No Brasil, o domínio fitogeográfico Pampa correspondente à porção norte da região RPG (Andrade *et al.*, 2018) sendo que 60% da vegetação campestre predominante já foi descaracterizada e não é mais formada pela vegetação original (Ribeiro *et al.*, 2021). A maioria das espécies de *Cypella* ocorrem na região RPG, sendo essa, inclusive, considerada como o centro de diversificação do gênero (Chauveau *et al.*, 2014).

Considerando o cenário brasileiro, ocorrem 16 espécies de *Cypella*, que se distribuem entre os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e São Paulo, abrangendo os domínios fitogeográficos do Pampa, Mata Atlântica e Cerrado (Eggers *et al.*, 2020). As espécies podem ser encontradas em uma variedade de habitats, desde locais campestres com solos muito secos até áreas com afloramentos rochosos ou em campos inundados (Eggers *et al.*, 2019).

As espécies de *Cypella* são reconhecidas principalmente por apresentarem variabilidade morfológica, especialmente em seus caracteres florais, dificultando a delimitação taxonômica de algumas espécies (Figura 3). Assim como alguns gêneros alocados em Tigridieae, *Cypella* apresenta tricomas glandulares do tipo elaióforos localizados nas tépalas internas os quais são responsáveis pela produção de óleos florais como recompensa ao polinizador (Pastori *et al.*, 2022). Além disso, o gênero se destaca dos demais, juntamente com *Onira*, por serem os únicos na América a apresentarem nectários estaminais (Pastori, 2014). Estudos anteriores demonstraram que espécies de *Cypella* apresentam um sistema de polinização classificado como altamente especializado por abelhas coletoras de óleo da tribo Tapinotaspidini (Oleques *et al.*, 2020). Em um sistema especializado, no qual ocorre a interação entre a espécie com flores que secretam óleo e abelhas que são especialistas na coleta desse recurso, mudanças em traços florais ou reprodutivos possivelmente estão associadas a pressões seletivas mediadas pelos agentes polinizadores (Fenster *et al.*, 2004; Jonhson, 2010).

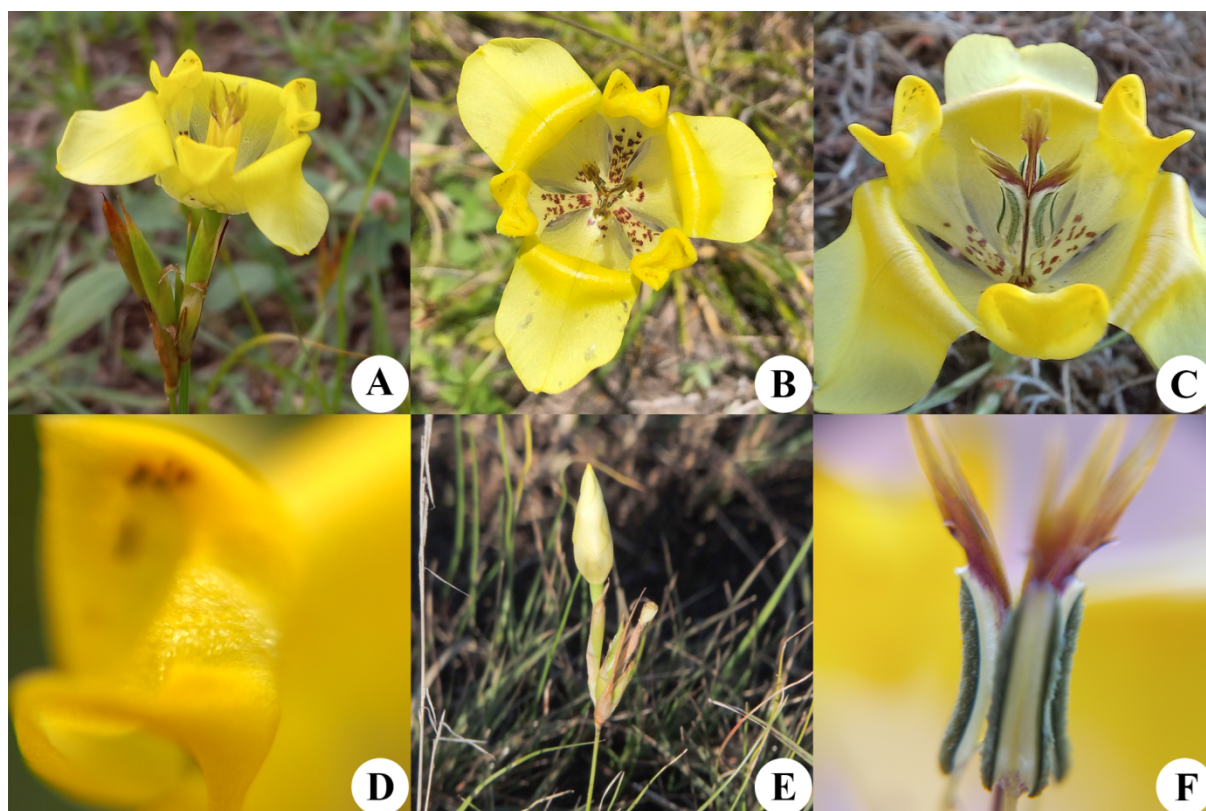


Espécies de *Cypella* têm mostrado padrões fenológicos distintos daqueles normalmente encontrados no gênero ou em gêneros próximos, como por exemplo, o florescimento duas vezes ao ano (primavera e outono) ou ainda, diferentes momentos de abertura floral (manhã e tarde). O padrão fenológico mais frequente para o gênero e para a tribo é o florescimento uma vez ao ano, geralmente contemplando todo o período da primavera e início do verão (de setembro a fevereiro). Nesse contexto, duas espécies de *Cypella* foram selecionadas como modelos para este estudo, especialmente por apresentarem padrões fenológicos atípicos: *Cypella pusilla* (Link & Otto) Benth. & Hook.f. ex B.D. Jacks. e *Cypella fucata* Ravenna.



**Fig. 3.** Variabilidade morfológica encontrada entre espécies de *Cypella*. A = *C. luteogibbosa*, B = *C. discolor*, C = *C. hauthalli* subsp. *minuticristata*, D = *C. herbertii* subsp. *brevicristata*, E = *C. altouruguaya*, F = *C. pusilla*, G = *C. amplimaculata*, H = *C. herbertii* subsp. *herbertii* e I = *C. fucata*. Fotos: Guzati C. Dani JG e Grings M.

*Cypella pusilla* (Figura 4) é endêmica do Rio Grande do Sul e está distribuída tanto na região do Pampa quanto na Mata Atlântica, sendo encontrada geralmente em locais de campos pedregosos e afloramentos rochosos (Figura 6A) (Pastori *et al.*, 2018). A espécie se destaca das outras espécies do gênero por apresentar peculiaridades relacionadas à sua fenologia floral, biologia reprodutiva e ecologia de polinização. Esta espécie em particular exibe dois picos distintos de floração ao longo do ano (novembro e abril), entretanto, tanto a produção de frutos quanto a visitação de polinizadores permanecem em níveis baixos durante ambos os períodos de floração (Oleques *et al.*, 2020). Adicionalmente, *Cypella pusilla* intriga por apresentar variabilidade morfológica intraespecífica em traços florais entre distintas populações (Pastori *et al.*, 2018). Outro ponto que reforça a importância de estudar esta espécie é seu *status* de conservação: *Cypella pusilla* é classificada como ameaçada de acordo com os critérios da IUCN (Pastori *et al.*, 2018) e consta na lista de flora ameaçada do Rio Grande do Sul, estando categorizada como Criticamente em Perigo pelo Decreto nº 52.109, de 1º de dezembro de 2014 (critério B2ab(iii)).

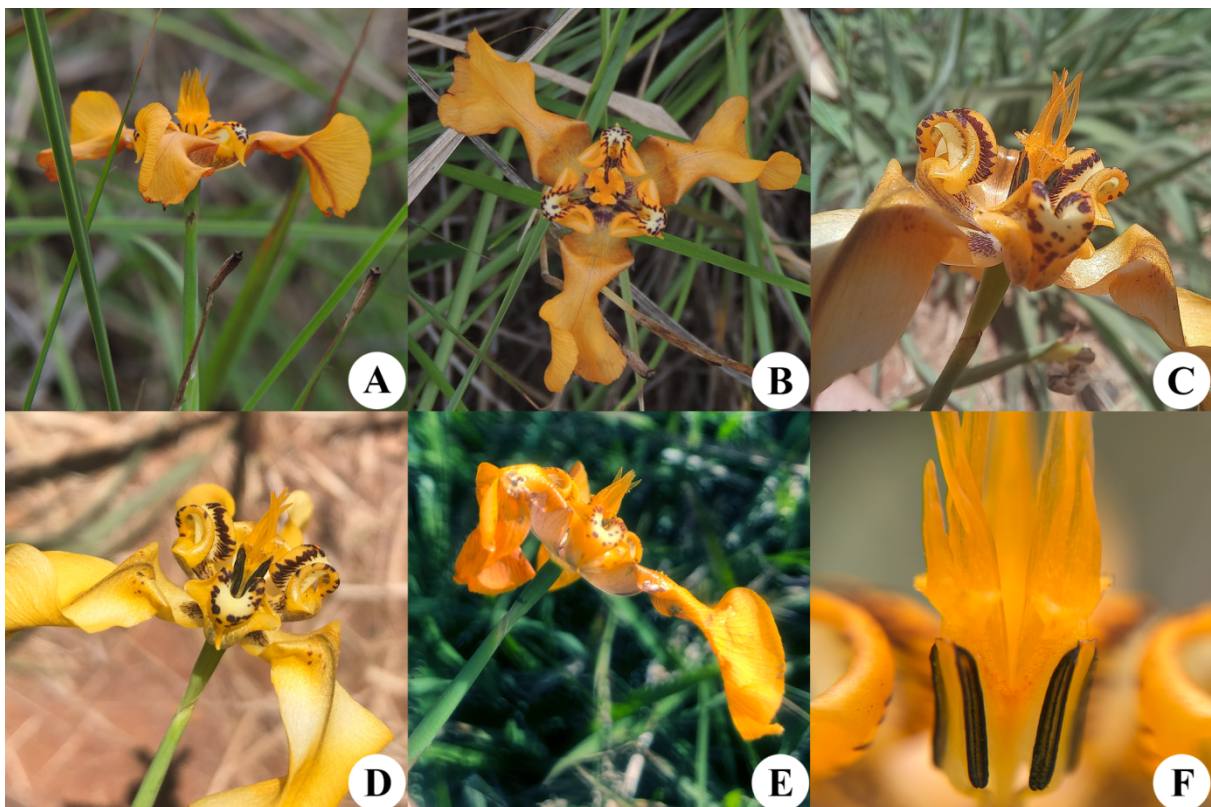




**Fig. 4.** Características morfológicas de *Cypella pusilla*. A = Vista lateral, B = Vista apical, C = Vista apical inclinada, D = Elaióforos nas tépalas internas, E = Indivíduo em estágio de pré-antese e F = Androginceu.

Fotos: Guzati C

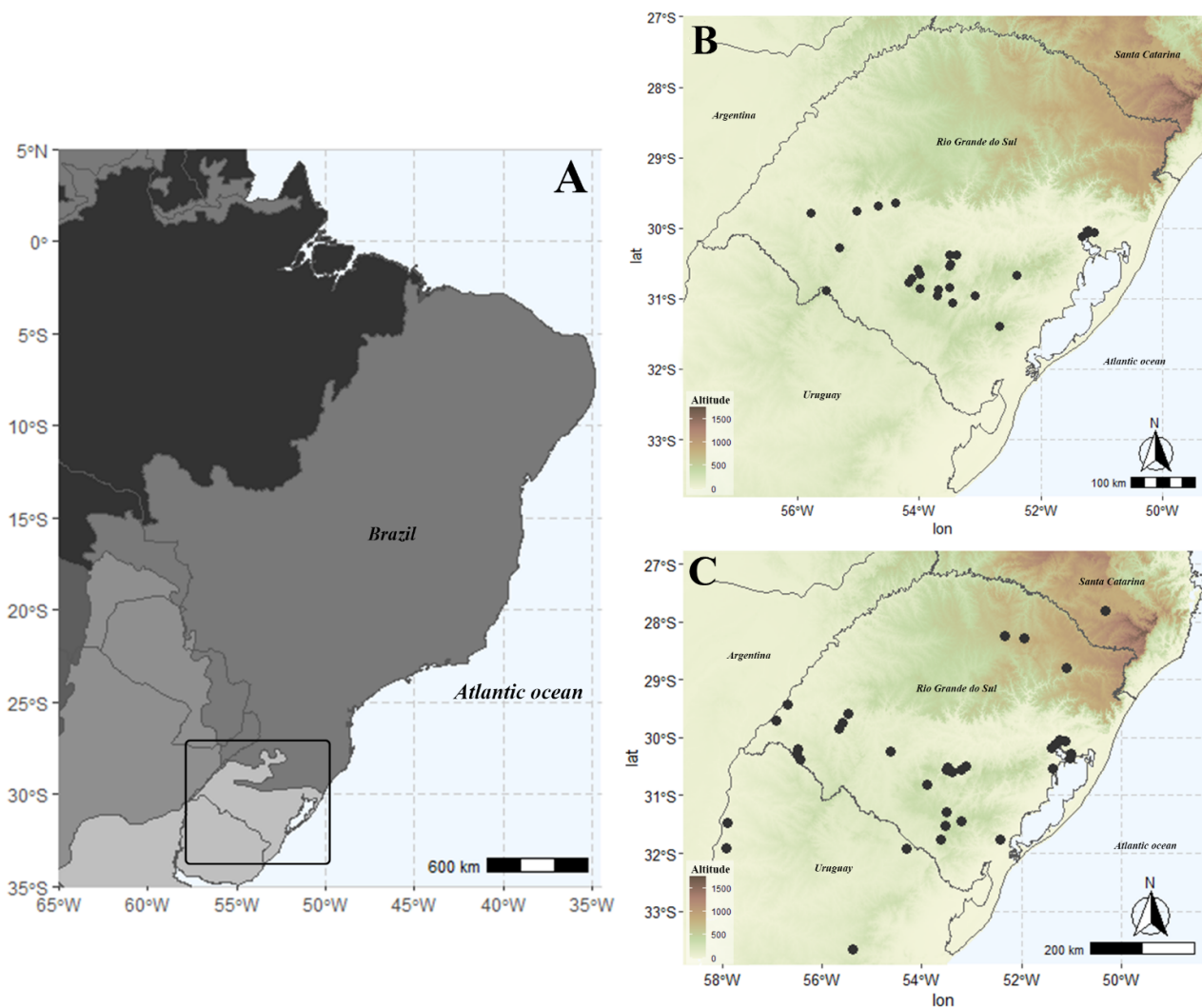
Outra espécie do gênero com variação peculiar na fenologia reprodutiva é *Cypella fucata* (Figura 5). *Cypella fucata* não é endêmica do Brasil. No país, a espécie ocorre nas regiões de campos nos domínios fitogeográficos do Pampa e da Mata Atlântica nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Figura 6) (Eggers *et al.*, 2019). A partir de observações em campo, foi constatado que essa espécie apresenta populações que se distinguem em termos do horário de abertura das flores, ou seja, algumas populações têm suas flores abertas durante a manhã, enquanto outras apresentam a antese floral no período da tarde. Atualmente, a espécie é considerada, segundo os critérios da IUCN, como Quase Ameaçada (Eggers *et al.*, 2019). No entanto, devido à expansão das áreas agrícolas no estado do Rio Grande do Sul, o habitat da espécie está sendo progressivamente perdido. Consequentemente, é plausível que o status de conservação da *Cypella fucata* possa ser revisto em um futuro próximo (Eggers *et al.*, 2019).



**Fig. 5.** Características morfológicas de *Cypella fucata*. A = Vista lateral, B = Vista apical, C e D = Vista lateral, evidenciando as cristas do estigma, E = Vista lateral e F = Androginceu. Fotos: Guzati C e Dani JG.



Como previamente mencionado, as regiões de vegetação campestre têm sido altamente afetadas pela ação antrópica, sendo frequentemente substituídas por áreas de agricultura em todo o mundo (Baldi & Paruelo, 2008). Essa transformação tem gerado impactos negativos na rica biodiversidade que esses ecossistemas abrigam. Esses dados enfatizam a necessidade de direcionar esforços de pesquisa com uma forte vertente de conservação para os Campos Sulinos. É crucial que esses estudos contribuam significativamente para a compreensão mais profunda das espécies que habitam essa região e ofereçam subsídios para a sua preservação.



**Fig. 6.** Mapa de distribuição das espécies de *Cypella* estudadas: (A) América do Sul, com foco no Rio Grande do Sul (Brasil), (B) *Cypella pusilla* e (C) *Cypella fucata*.

No que diz respeito aos aspectos citogenéticos do gênero, até o momento, apenas cinco das 30 espécies de *Cypella* tiveram seus números cromossômicos identificados e quatro com estimativas de tamanho de genoma (Moraes *et al.*, 2015; Leitch *et al.*, 2019), todas as espécies investigadas apresentaram  $2n = 2x = 14$  e um cariótipo bimodal composto por dois pares cromossômicos grandes e cinco pequenos (Moraes *et al.*, 2015). Até o momento, não há registros de eventos de poliploidia no gênero. No entanto, é importante mencionar que dentre as espécies examinadas, apenas algumas populações foram analisadas. Isso significa que não podemos afirmar com certeza a ausência de poliploidia tanto entre diferentes espécies quanto dentro de uma mesma espécie. Esses dados destacam a falta de estudos citogenéticos abrangentes para o gênero, ressaltando a importância de adquirir essas informações para uma compreensão mais profunda da evolução desse grupo.

### *Perguntas norteadoras*

Partindo do contexto exposto, este trabalho buscou investigar aspectos citogenéticos, fenológicos e reprodutivos das espécies *C. pusilla* e *C. fucata* para responder às seguintes perguntas:

- Os indivíduos que florescem nos dois picos de floração de *Cypella pusilla* são os mesmos?
- As diferentes populações de *C. pusilla* e de *C. fucata* podem apresentar variações quanto ao número cromossômico ou tamanho de genoma?
- Caso haja variações, essas diferenças poderiam estar relacionadas às discrepâncias fenológicas observadas?

## OBJETIVOS

### *Objetivo geral*

Investigar aspectos citogenéticos, reprodutivos e fenológicos em distintas populações de *Cypella*.

### *Objetivos específicos*

- Realizar análises citogenéticas (determinação de tamanho de genoma, de número cromossômico e caracterização cariotípica) de diferentes populações de *C. pusilla* e *C. fucata* para identificar e caracterizar possíveis citótipos.
- Caracterizar, quantificar e estimar a viabilidade polínica em *C. pusilla*.
- Avaliar características fenológicas das populações, incluindo a contagem do número de indivíduos em flor de *C. pusilla*.
- Investigar uma possível relação da diversidade fenológica com caracteres cariológicos.
- Estimar taxas de limitação polínica, frutificação, produção de sementes e níveis de autocompatibilidade em ambos os picos de floração de *C. pusilla*.

## *Referências*

- Andrade, B.O., Marchesi, E., Burkart, S., Setubal, R., Lezama, F., Perelman, S., Schneider, A.A., Trevisan, R., Overbeck, G.E., & Boldrini, I.O. 2018. Vascular plant species richness and distribution in the Río de la Plata grasslands. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 188(3), 250–256.
- Alves, L. I. F., Lima, S. A. A., & Felix, L. P. 2011. Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 34, 259-267.
- Baldi, G., Paruelo, J.M. 2008. Land-use and land cover dynamics in South American temperate grasslands. *Ecol Soc* 13,6.
- Barringer, B. C. 2007. Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. *American Journal of Botany*, 94(9), 1527-1533.
- Caruso, C. M. 2006. The ecological genetics of floral traits. *Heredity*. 97,86-87.
- Chauveau, O., Eggers, L., Raquin, C., Silvério, A., Brown, S., Couloux, A., ... & Nadot, S. 2011. Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Annals of Botany*, 107(8), 1287-1312.
- Chauveau, O., Eggers, L., Souza-Chies, T. T., & Nadot, S. 2012. Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera. *Annals of botany*, 110(3), 713-729.
- Chauveau, O., Pastori, T., Souza-Chies, T.T., Eggers, L. 2014. Overlooked diversity in Brazilian Cypella (Iridaceae, Iridoideae): four new taxa from the Río de la Plata grasslands. *Phytotaxa* 174: 25-42.
- Chmura, H.E., Kharouba, H.M., Ashander, J., Ehlman, S.M., Rivest, E.B., & Yang, L.H. 2019. The mechanisms of phenology: the patterns and processes of phenological shifts. *Ecological monographs*. 89(1):01337.
- Devos, K. M., Brown, J. K., & Bennetzen, J. L. 2002. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in Arabidopsis. *Genome research*, 12(7), 1075-1079.

- Dias, A., Serra, A., Sampaio, D., Borba, E., Bonetti, A., & Oliveira, P. 2018. Unexpectedly high genetic diversity and divergence among populations of the apomictic Neotropical tree *Miconia albicans*. *Plant biology*, 20 2, 244-251. <https://doi.org/10.1111/plb.12654>.
- Eggers, L., Marchioretto, R., Souza-Chies, T.T., Pastori, T., & Chauveau, O. 2019. A taxonomic synopsis of *Cypella* (Iridaceae) in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 33, 741-769.
- Eggers, L., Pastori, T., Chauveau, O. 2020. *Cypella* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB8046>>
- Fenster, C.B., Armbruster, W.S., Wilson, P., Dudash, M.R., & Thomson, J.D. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 35, 375-403.
- Ramírez, S. R., Eltz, T., Fujiwara, M. K., Gerlach, G., Goldman-Huertas, B., Tsutsui, N. D., & Pierce, N. E. (2011). Asynchronous diversification in a specialized plant-pollinator mutualism. *Science*, 333(6050), 1742-1746.
- Frank, D., Reichstein, M., Bahn, M., Thonicke, K., Frank, D., Mahecha, M. D., ... & Zscheischler, J. 2015. Effects of climate extremes on the terrestrial carbon cycle: concepts, processes and potential future impacts. *Global change biology*, 21(8), 2861-2880.
- Goldblatt P. 1990. Phylogeny and classification of the Iridaceae. *Ann Missouri Bot Gard.* 7, 607-627.
- Goldblatt P. and Henrich E. 1991. *Calydorea* Herbert (Iridaceae-Tigrideae): Notes on this New World genus and reduction to synonymy of *Salpingostylis*, *Cardiostigma*, *Itysa* and *Catila*. *Ann Missouri Bot Gard.* 78, 504-511.
- Goldblatt P. and 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., Rodriguez A., Powell MP., Davies TJ., Manning JC., Van der Bank M. and Savolainen V. 2008. Iridaceae 'Out of Australasia'? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. *Syst Bot.* 33, 495-508.
- Goldblatt, P., Manning, J. C., & Rudall, P. (1998). Iridaceae. In *Flowering Plants: Monocotyledons* (pp. 295-333). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Guerra, M. 2004. FISH-Conceitos e aplicações na citogenética. In: Pedrosa-Harand, A., Guerra, M. (eds.). Contribuições da FISH para a citogenética de plantas. SBG, Ribeirão Preto.
- Guerra, M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetic and Genome research*, 120(3-4), 339-350.
- Guerra, M. 2012. Cytotaxonomy: the end of childhood. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146(3), 703-710.
- Johnson, S. D. 2010. The pollination niche and its role in the diversification and maintenance of the southern African flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1539), 499-516.
- Knight, T. M., Steets, J. A., Vamosi, J. C., Mazer, S. J., Burd, M., Campbell, D. R., ... & Ashman, T. L. 2005. Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 36, 467-497.
- Kudo, G., & Hirao, A.S. 2006. Habitat-specific responses in the flowering phenology and seed set of alpine plants to climate variation: implications for global-change impacts. *Population Ecology*. 48, 49-58.
- Leitch IJ, Johnston E, Pellicer J, Hidalgo O, Bennett MD. 2019. Angiosperm DNA C-values database (release 9.0, Apr 2019) <https://cvalues.science.kew.org/>
- Medan D, Torretta JP, Hodara K, De la Fuente EB, Montaldo NH (2011) Effects of agriculture expansion and intensification on the vertebrate and invertebrate diversity in the Pampas of Argentina. *Biodivers & Conservation* 20:3077–3100.  
<https://doi.org/10.1007/s10531-011-0118-9>
- Moraes, A. P., Souza-Chies, T. T., Stiehl-Alves, E. M., Burchardt, P., Eggers, L., Siljak-Yakovlev, S., ... & Kaltchuk-Santos, E. 2015. Evolutionary trends in Iridaceae: new cytogenetic findings from the New World. *Botanical journal of the Linnean Society*, 177(1), 27-49.
- Nuismer, S.L., & Cunningham, B.M. 2005. Selection for phenotypic divergence between diploid and autotetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution*, 59(9):1928-1935.
- Oleques, S. S., Radaeski, J. N., Bauerman, S., Chauveau, O., & de Souza-Chies, T. T. (2020). The specialization–generalization continuum in oil-bee pollination systems: a case study of six Brazilian species of Tigridaeae (Iridaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 129(3), 701-716.

- Osmolovsky, I., Shifrin, M., Gamliel, I., Belmaker, J., & Sapir, Y. (2022). Eco-Geography and Phenology Are the Major Drivers of Reproductive Isolation in the Royal Irises, a Species Complex in the Course of Speciation. *Plants*, 11(23), 3306.
- Otto SP, Whitton J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics* 34: 401–437.
- Parmesan, C. 2006. Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37:637-669.
- Pastori, T., Eggers, L., de Souza-Chies, T. T., & Chauveau, O. 2018. Iterative taxonomy based on morphological and molecular evidence to estimate species boundaries: a case study in *Cypella* (Iridaceae: Iridoideae). *Plant Systematics and Evolution*, 304(9):1117-1140.
- Pastori, T., Kuhn, S.A., Souza-Chies, D., Teixeira, T., Silvério, A., Mastroberti, A.A., ... & Mariath, J. 2022. Untold diversity of floral rewards in *Cypella* (Tigridieae: Iridaceae) and related genera: distribution and anatomy. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Pegoraro, L., Cafasso, D., Rinaldi, R., Cozzolino, S., & Scopece, G. 2016. Habitat preference and flowering-time variation contribute to reproductive isolation between diploid and autotetraploid *Anacamptis pyramidalis*. *Journal of Evolutionary Biology*, 29(10), 2070-2082.
- Ramsey J, Schemske DW. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 33,589–639.
- Rathcke, B. 1983. Competition and facilitation among plants for pollination. *Pollination biology*, 305, 329.
- Rezende, L., Suzigan, J., Amorim, F. W., & Moraes, A. P. 2020. Can plant hybridization and polyploidy lead to pollinator shift?. *Acta Botanica Brasilica*, 34, 229-242.
- Ribeiro, S., Moreira, L. F., Overbeck, G. E., & Maltchik, L. 2021. Protected Areas of the Pampa biome presented land use incompatible with conservation purposes. *Journal of Land Use Science*, 16(3), 260-272.
- Rieseberg LH, Willis JH. 2007. Plant speciation. *Science* 317: 910914.
- Root, T.L., Price, J.T., Hall, K.R., Schneider, S.H., Rosenzweig, C., & Pounds, J.A. 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*. 421(6918):57-60.
- Rudall, P. J. 1987. Laticifers in Euphorbiaceae—a conspectus. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 94(1-2), 143-163.

- Rudall, P. 1994. Anatomy and systematics of Iridaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 114(1), 1-21.
- Segraves, K. A., & Thompson, J. N. 1999. Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution*, 53(4), 1114-1127.
- Segraves, K. A., & Anneberg, T. J. 2016. Species interactions and plant polyploidy. *American journal of botany*, 103(7), 1326-1335.
- Šimová, I., & Herben, T. 2012. Geometrical constraints in the scaling relationships between genome size, cell size and cell cycle length in herbaceous plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279, 867 - 875. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1284>.
- Souza-Chies, T. T., Santos, E. K. D., Eggers, L., Flores, A. M., Alves, E. M. S., Fachinetto, J., ... & Miz, R. B. 2012. Studies on diversity and evolution of Iridaceae species in southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), 1027-1035.
- Soltis, P. S., & Soltis, D. E. 2009. The role of hybridization in plant speciation. *Annual review of plant biology*, 60, 561-588.
- Souza-Chies, T. T., Santos, E. K. D., Eggers, L., Flores, A. M., Alves, E. M. S., Fachinetto, J., ... & Miz, R. B. 2012. Studies on diversity and evolution of Iridaceae species in southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 1027-1035.
- Stiehl-Alves, E. M., Flores, A. M., Silvério, A., Heck, J., Eggers, L., Kaltchuk-Santos, E., ... & de Souza-Chies, T. T. 2016. Differentiation between two self-compatible cytotypes of *Herbertia lahue* (Iridaceae): evidence from genotypic and phenotypic variation. *Plant Systematics and Evolution*, 302(6), 669-682.
- Tacuatiá, L.O., Kaltchuk-Santos, E., Souza-Chies, T.T., Eggers, L., Forni-Martins, E.R., Pustahija, F., ... & Siljak-Yakovlev, S. 2017. Physical mapping of 35S rRNA genes and genome size variation in polyploid series of *Sisyrinchium micranthum* and *S. rosulatum* (Iridaceae: Iridoideae). *Plant Biosystems*, 151(3), 403-413.
- Tacuatiá, L. O., Souza-Chies, T. T., Flores, A. M., Eggers, L., Siljak-Yakovlev, S., & Kaltchuk-Santos, E. (2012). Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169(2), 350-364.
- Van der Niet, T., & Johnson, S. D. 2012. Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in ecology & evolution*, 27(6), 353-361.



- Van der Niet, T., Peakall, R., & Johnson, S. D. 2014. Pollinator-driven ecological speciation in plants: new evidence and future perspectives. *Annals of Botany*, 113(2), 199-212.
- Van de Peer, Y., Ashman, T.L., Soltis, P.S., & Soltis, D.E. 2021. Polyploidy: an evolutionary and ecological force in stressful times. *The Plant Cell*, 33(1), 11-26.
- Veselý, P., Šmarda, P., Bureš, P., Stirton, C., Muasya, A., Mucina, L., Horová, L., Veselá, K., Šilerová, A., Šmerda, J., & Knápek, O. 2020. Environmental pressures on stomatal size may drive plant genome size evolution: evidence from a natural experiment with Cape geophytes. *Annals of botany*. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa095>.
- Weis, A. E., & Kossler, T. M. 2004. Genetic variation in flowering time induces phenological assortative mating: quantitative genetic methods applied to *Brassica rapa*. *American Journal of Botany*, 91(6), 825-836.
- Wood, T. E., Takebayashi, N., Barker, M. S., Mayrose, I., Greenspoon, P. B., & Rieseberg, L. H. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the national Academy of sciences*, 106(33), 13875-13879.
- Woodhouse, M. R., Schnable, J. C., Pedersen, B. S., Lyons, E., Lisch, D., Subramaniam, S., & Freeling, M. 2010. Following tetraploidy in maize, a short deletion mechanism removed genes preferentially from one of the two homeologs. *PLoS biology*, 8(6), e1000409.

## Considerações Finais

Este estudo trouxe diversos resultados relevantes e inéditos quanto a aspectos fenológicos, reprodutivos e citogenéticos das espécies de *Cypella pusilla* e *C. fucata*. Os padrões fenológicos incomuns das espécies investigadas comparativamente àqueles observados no gênero e nas espécies relacionadas filogeneticamente, foi avaliado a partir de uma abordagem citogenética, enfoque este ainda pouco explorado para a maioria dos taxa de Iridaceae. Os resultados obtidos evidenciam a importância de obter dados citogenéticos e de analisá-los levando em conta aspectos reprodutivos da espécie, uma vez que eles lançam luz sobre os potenciais mecanismos subjacentes à diversificação das espécies vegetais.

No que diz respeito a *Cypella fucata*, os dados citogenéticos para quatro novas populações mostram apenas a ocorrência de indivíduos diplóides. Portanto, assim como outras espécies do gênero, séries poliplóides intraespecíficas não foram encontradas. Para *Herbertia*, gênero também do clado A de Tigrideae, são reportadas três espécies com séries poliploides (Moraes *et al.* 2015). Os dados de tamanho de genoma são inéditos para a espécie, e indicam não haver diferenças estatisticamente significativas entre as populações com diferenças no horário de antese floral. Embora as análises citogenéticas dessa espécie sejam preliminares, variações cariológicas parecem não explicar a diferenciação das populações de antese matinal e vespertina.

As diferenças na fenologia floral podem ser influenciadas por outros fatores além de variações em caracteres citogenéticos. Uma interpretação plausível para essa diferenciação poderia estar ligada às interações específicas que as espécies de *Cypella* têm com seus polinizadores. A literatura científica oferece indícios substanciais de que em sistemas de polinização considerados especializados, como é o caso das espécies de *Cypella* e as abelhas coletoras de óleo, até mesmo pequenas variações nas características florais podem estar suscetíveis à seleção (Fenster *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2011). A especialização na polinização frequentemente demanda uma estreita sintonia entre as plantas e seus polinizadores. Nesse contexto, alterações sutis nas propriedades das flores, como o horário da antese floral, podem desempenhar um papel crucial na atração seletiva de polinizadores específicos, otimizando assim a eficácia da polinização. Consequentemente, qualquer mudança que favoreça a interação entre a espécie de *Cypella* e as abelhas coletoras de óleo pode ser vantajosa em termos de sucesso reprodutivo. Certos fatores, como condições ambientais ou recursos disponíveis, podem variar ao longo do dia. Assim, a interação complexa entre fatores biológicos e ambientais pode moldar o momento da floração (Kudo,

2006). Portanto, as divergências fenológicas podem resultar de uma combinação complexa de fatores que influenciam o comportamento da floração das populações.

No contexto da *Cypella pusilla*, os dados fenológicos trouxeram aspectos importantes a serem considerados para a compreensão da dinâmica reprodutiva intra e interpopulacional dessa espécie. Os resultados relativos ao mecanismo fenológico de *C. pusilla*, apresentados pela primeira vez nesta dissertação, permitiram uma importante constatação: em uma dada população, os indivíduos que florescem no período da primavera não serão os mesmos que irão florescer durante o outono. Em essência, essa diferenciação temporal interrompe o fluxo gênico entre os indivíduos que florescem em diferentes estações, prevenindo, assim, seu intercruzamento. Esta observação tem implicações significativas para a troca de material genético entre os indivíduos dentro de uma mesma população. Além disso, foi observado um maior número de indivíduos em flor durante o outono, fato este que torna *C. pusilla* distinta das demais espécies do gênero e, até mesmo, da tribo. Esse aumento na floração durante o outono aponta fortemente para uma possível mudança fenológica nessa espécie. Essa mudança pode estar relacionada a adaptações específicas relacionadas à presença de polinizadores, competição entre espécies, fatores genéticos, variações citogenéticas ou condições ambientais distintas durante essa estação.

Os resultados referentes à reprodução de *C. pusilla* trazem contribuições relevantes para o estudo dessa espécie. Foi observado que o grupo de indivíduos que floresceu na primavera apresentou taxas reprodutivas significativamente mais baixas em comparação com o grupo que floresceu no outono, além de uma maior limitação de pólen. Esta observação está possivelmente relacionada a significativa redução na viabilidade do pólen, apontando para uma possível ligação entre a limitação polínica e a presença de pólen inviável nos indivíduos que florescem na primavera, o que ressalta a existência de uma barreira pré-zigótica. Isso, por sua vez, pode resultar em uma redução nas taxas reprodutivas da espécie e na remodelação de seus sistemas de polinização, conforme discutido por Rezende *et al.* (2019).

Diante dessa clara diferenciação entre as populações de primavera e de outono em *C. pusilla*, aspectos citogenéticos foram também investigados, uma vez que dados de número cromossômico inexistem para essa espécie. O número cromossômico encontrado para todas as populações foi de  $2n = 2x = 14$ , número esse encontrado nas demais espécies do gênero (à exceção da tetraploide *C. discolor* descrita nesse estudo). Por outro lado, a análise do tamanho do genoma revelou uma diferença significativa estatisticamente entre os indivíduos que florescem na primavera e aqueles que florescem no outono. Essa discrepância indica que, apesar de ambas as populações apresentarem o mesmo número de cromossomos, existem variações importantes na quantidade total de DNA entre esses dois grupos. Com isso, foi

realizada uma análise comparativa entre os cariótipos de indivíduos que florescem em diferentes estações do ano, mas não foram encontradas diferenças relevantes nos cariótipos das populações.

Os dados inéditos desta dissertação ressaltam a complexidade dos padrões reprodutivos em *C. pusilla*, evidenciando uma possível associação entre a fenologia, citogenética, limitação de pólen e o sucesso reprodutivo da espécie. O contraste entre as duas estações de floração levanta questões pertinentes sobre o significado adaptativo dessas diferenças. A prevalência de pólen inviável no grupo da primavera é resultado de restrições ambientais ou pressões seletivas específicas? A maior limitação de pólen e a menor viabilidade na primavera sugerem que fatores ecológicos ou fisiológicos estão afetando os processos reprodutivos nessa estação? Ou seriam fatores citogenéticos? Até que ponto as diferenças no tamanho do genoma explicam as diferenças fenológicas? Essas questões levantam a necessidade de investigações mais aprofundadas e empregando novas abordagens, como por exemplo, o uso de análises cariotípicas incluindo hibridização *in situ*, observação de polinizadores, levantamento florístico das espécies simpátricas nos períodos de florescimento, e outras voltadas para a compreensão dos mecanismos subjacentes às mudanças fenológicas nas espécies deste grupo.

Nesta dissertação fica evidente a importância de análises integrativas com o uso da citogenética, biologia reprodutiva, ecologia da polinização e fenologia da floração para entender os fatores que impulsionam a diversificação das Iridaceae. Portanto, este estudo abre novas perspectivas e questionamentos para investigações futuras relacionadas à família, suas características fenológicas e a trajetória evolutiva.

Além dos resultados obtidos referentes ao projeto inicial desta dissertação, resultados complementares referentes à citotaxonomia da tribo Tigridieae foram obtidos compondo o manuscrito submetido à *TAXON - IAPT/IOPB Chromosome Number Data* (Capítulo II). Nesse estudo, foram analisados dois gêneros da família Iridaceae: *Cypella* e *Gelasine*, que incluem alguns táxons pouco estudados em termos de dados citogenéticos. Este artigo forneceu pela primeira vez a contagem de cromossomos para *C. altouruguaya*, *C. amplimaculata*, *C. discolor*, *C. hauthalii* subsp. *minuticristata*, *C. luteogibbosa*, *C. magnicristata*, *C. pusilla* e *Gelasine* aff. *coerulea*. Até o momento, todas as espécies de *Cypella* investigadas são diploides, com  $2n = 14$ . De forma intrigante, surge o primeiro poliplóide para o gênero: *Cypella discolor*, tetraplóide com  $2n = 28$ . Além disso, neste trabalho foram evidenciados novos registros de tamanho de genoma para diferentes populações de *C. fucata*, *C. pusilla*, *G. uruguaiensis* e *G. elongata*. As informações

compiladas neste trabalho contribuem substancialmente para pesquisas taxonômicas e evolutivas futuras.

Adicionalmente, como parte de iniciativas voltadas para a sensibilização ambiental, foi elaborado um guia de identificação das diversas espécies de Iridaceae encontradas no Morro São Pedro, situado em Porto Alegre, no Rio Grande do Sul (Anexo 1). O referido guia já foi submetido ao *The Field Museum Field Guides* para uma futura publicação. Esse recurso irá enriquecer o conhecimento das comunidades locais sobre as espécies dessa família, inclusive promovendo a conscientização quanto à conservação dessas plantas, uma vez que o guia destaca características fundamentais de cada espécie.

## *Referências*

- Doležel, J., Greilhuber, J. & Suda, J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature protocols*. 2(9): 2233-2244.
- Doležel, J., Sgorbati, S. & Lucretti, S. 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow-cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiol. Plant.* 85: 625–631.
- Ebihara, A., Ishikawa, H., Matsumoto, S., Lin, S-J., Iwatsuki, K., Takamiya, M., Watano, Y. & Ito, M. 2005. Nuclear DNA, chloroplast DNA, and ploidy analysis clarified biological complexity of the *Vandenboschia radicans* complex (Hymenophyllaceae) in Japan and adjacent areas. *Amer. J. Bot.* 92(9): 1535-1547.
- Fenster, C.B., Armbruster, W.S., Wilson, P., Dudash, M.R., & Thomson, J.D. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 35, 375-403.
- Kudo, G., & Hirao, A.S. 2006. Habitat-specific responses in the flowering phenology and seed set of alpine plants to climate variation: implications for global-change impacts. *Population Ecology*. 48, 49-58.
- Ramírez, S. R., Eltz, T., Fujiwara, M. K., Gerlach, G., Goldman-Huertas, B., Tsutsui, N. D., & Pierce, N. E. (2011). Asynchronous diversification in a specialized plant-pollinator mutualism. *Science*, 333(6050), 1742-1746.
- Rezende, L., Suzigan, J., Amorim, F. W., & Moraes, A. P. 2020. Can plant hybridization and polyploidy lead to pollinator shift?. *Acta Botanica Brasilica*, 34, 229-242.
- Tacuatia, L. O., Souza-Chies, T. T., Flores, A. M., Eggers, L., Siljak-Yakovlev, S., & Kaltchuk-Santos, E. (2012). Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169(2), 350-364.

