

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Paula Burchardt Piccoli**

**Caracterização citogenética e molecular de espécies do complexo  
*Sisyrinchium palmifolium* L. (Iridaceae)**

Porto Alegre  
Junho de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Paula Burchardt Piccoli**

**Caracterização citogenética e molecular de espécies do complexo  
*Sisyrinchium palmifolium* L. (Iridaceae)**

Trabalho de conclusão de curso submetido ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

O presente trabalho é apresentado na forma de artigo científico seguindo as instruções do periódico *Botanical Journal of the Linnean Society*.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Eliane Kaltchuk dos Santos**

**Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Tatiana Teixeira de Souza-Chies**

Porto Alegre

Junho de 2012

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Eliane e à Tatiana por terem me acolhido e orientado durante esses anos;

À Lilian Eggers, sem a qual não teríamos trabalho a realizar;

Aos colegas do grupo de Iridaceae por estudarem essas belas plantas, contribuindo ao meu engrandecimento pessoal e acadêmico;

Aos colegas de laboratório que, além de amigos, foram tantas vezes também meus orientadores;

À banca examinadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Schifino Wittmann e Dr<sup>a</sup>. Janaína Endres Georg-Kramer pela disponibilidade;

Às bioformandas por dividirem as angústias, alegrarem as quartas-feiras e por terem contribuído a tornar esse último semestre inequívoco;

À minha irmã Norah Ana pela parceria e principalmente à minha mãe Norah pela educação, apoio e incentivo incondicionais.

**Caracterização citogenética e molecular de espécies do complexo *Sisyrinchium palmifolium* L. (Iridaceae)**

Citogenética e genética populacional em *S. palmifolium*

Paula Burchardt Piccoli<sup>1,4\*</sup>, Tatiana Teixeira de Souza-Chies<sup>1,2</sup>, Rogéria Beatriz Miz<sup>2</sup>,

Adriana Morais Aita<sup>3</sup>, Lilian Eggers<sup>1</sup>, Eliane Kaltchuk dos Santos<sup>2,4</sup>

**Afiliações:**

<sup>1</sup> Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

\* Autor para correspondência. E-mail: polinhap@hotmail.com

## RESUMO

*Sisyrinchium palmifolium* é a espécie do gênero *Sisyrinchium* que apresenta maior distribuição e abundância na região Sul do Brasil. Por compartilhar certas características morfológicas com algumas outras espécies do gênero, estas formam o chamado complexo *Sisyrinchium palmifolium*. Este estudo busca auxiliar na elucidação de problemas taxonômicos que envolvem *S. palmifolium* e outras espécies da seção através de análises citológicas e moleculares. Foram analisados 27 acessos, incluindo-se nove espécies do complexo. As análises citológicas compreenderam determinação de número cromossômico, comportamento meiótico, viabilidade e morfologia de pólen, cariótipo e conteúdo de DNA. Constatou-se o número cromossômico  $2n = 2x = 18$  para todas as espécies, bem como uma alta estabilidade meiótica. A viabilidade polínica também foi elevada, tendo sido observados três diferentes morfologias de grãos de pólen. O cariótipo de *S. palmifolium* é bimodal e assimétrico, comportando grandes cromossomos (CL = 6,74  $\mu$ m). A medida do conteúdo de DNA revelou que *S. palmifolium* apresenta  $2C = 4,84$  pg, sendo este praticamente o dobro daquele de *Sisyrinchium*. sp. nov. 1, com  $2C = 2,54$  pg.

O estudo da diversidade genética de cinco acessos foi realizado com marcadores de ISSR, obtendo-se dados de variabilidade intra e interpopulacionais ( $\phi_{IS}$  e  $\phi_{ST}$ , respectivamente). Valores de  $\phi_{IS} = 0,68$  e  $\phi_{ST} = 0,32$  revelaram considerável estruturação genética entre as populações, fruto de baixo fluxo gênico entre elas.

Palavras-chave: cariótipo – comportamento meiótico – diferenciação genética – marcadores ISSR – número cromossômico – tamanho de genoma – viabilidade de pólen.

## ABSTRACT

Among species within the *Sisyrinchium* genus in southern Brazil, *Sisyrinchium palmifolium* stands out as being the most widely distributed species and of greater abundance. Due to shared morphological characteristics with some other species from the genus, they are grouped within the *S. palmifolium* complex. This study aims to contribute to the elucidation of taxonomic problems involving *S. palmifolium* and other species from the section through cytological and molecular analyses. Twenty seven accessions were analyzed, including nine species from the complex. Cytological analyses included chromosome number determination, meiotic behavior, pollen viability and morphology, karyotype and DNA content. All species presented chromosome number of  $2n = 2x = 18$ , as well a high meiotic stability. Pollen viability was also elevated and three different pollen grain morphologies were observed. *S. palmifolium* has a bimodal and asymmetrical karyotype, with large chromosomes (CL = 6.74  $\mu\text{m}$ ). DNA content measurements showed a  $2C$  value of 4.84 pg for *S. palmifolium*, almost double the amount of *Sisyrinchium*. sp. nov. 1 ( $2C = 2.54$  pg).

A study on the genetic diversity of five accessions was performed using ISSR markers; data were obtained regarding variability within and among populations ( $\phi_{IS}$  e  $\phi_{ST}$ , respectively).

The values of  $\phi_{IS} = 0.68$  e  $\phi_{ST} = 0.32$  revealed considerable genetic structure between the populations, a result of low genetic flow among them.

Keywords: chromosome number – DNA content – genetic differentiation – ISSR markers – karyotype – meiotic behavior – pollen viability.

## INTRODUÇÃO

Iridaceae é uma família de monocotiledôneas que pertence à ordem Asparagales (APG III, 2009) sendo considerada por Stevens (2001) a terceira maior em número de espécies. A família apresenta uma distribuição tropical e subtropical, sendo o sul da África o principal centro de dispersão (Goldblatt & Manning, 2008). Porém, a América do Sul também é considerada um centro evolutivo para Iridaceae e, muito provavelmente, o local de origem e o centro de distribuição do gênero *Sisyrinchium* L., onde uma grande variedade de espécies e formas têm se desenvolvido (Johnston, 1938).

O gênero *Sisyrinchium* é o segundo maior gênero de Iridaceae e o primeiro em número de espécies nas Américas, com cerca de 140 espécies (Goldblatt & Manning, 2008). As espécies de *Sisyrinchium* ocorrem em áreas de clima temperado ou tropical, neste último caso em altitudes elevadas e temperaturas mais baixas (Chukr & Capellari Jr., 2003). Compreende espécies de pequeno a médio porte, perenes ou anuais, com flores de coloração variada predominantemente amarelas, lilases e roxas (Goldblatt, Manning & Rudall, 1998; Chukr, 2003).

A taxonomia das espécies de *Sisyrinchium* é complicada em função da grande variação morfológica observada na Natureza (Johnston, 1938; Cholewa & Henderson, 1984; Kenton, Rudall & Johnson, 1986; Rudall *et al.*, 1986). Além disso, como as flores são extremamente delicadas, é difícil preservá-las em exsiccatas, dificultando a identificação do material seco além de mascarar a variação floral natural. Esforços de coleta na região Sul do Brasil têm apontado para a existência de mais de 20 espécies de *Sisyrinchium* (Eggers *et al.*, 2010).

O gênero *Sisyrinchium* foi subdividido, mais recentemente, por Ravenna (2000, 2003), em oito seções, com base principalmente na forma da folha, posição da sinflorescência e caracteres florais como forma e cor do perigônio, união dos filetes e aspecto do estilete. A seção *Hydastylus* compreende 23 espécies de acordo com Chukr & Capellari Jr., (2003). Foi

realizado, porém, um estudo filogenético do gênero *Sisyrinchium* (Chauveau *et al.*, 2011) em que foi evidenciado que a seção é polifilética. Segundo os autores, na realidade existe um clado que agrupa o complexo *S. palmifolium* (seção *Hydastylus*) com o complexo *S. vaginatum* Spreng. (seção *Viperella*). Esse clado comporta as espécies *S. nidulare* (Hand.-Mazz.) I.M.Johnst., *S. densiflorum* Ravenna, *S. caetanum* Ravenna, *S. brasiliense* (Ravenna) Ravenna, *S. palmifolium* ssp. *fuscoviride* (Ravenna) Ravenna, *S. palmifolium* ssp. *palmifolium* L., *S. wettsteinii* Hand.-Mazz., *S. rectilineum* Ravenna, *S. bromelioides* ssp. *bromelioides* R.C.Foster, *S. vaginatum* ssp. *vaginatum* Spreng., *S. weirii* Baker, *S. marchio* (Vell.) Steud., *S. cf. marchioides* Ravenna, *S. alatum* Hook., *S. restioides* Spreng., *S. balansae* Baker e *S. parvifolium* Baker.

Na seção *Hydastylus*, *Sisyrinchium palmifolium* se destaca das demais espécies por apresentar, na região Sul do Brasil, maior distribuição e abundância de indivíduos (Chukr & Capellari Jr., 2003).

*Sisyrinchium palmifolium* é uma espécie herbácea, perene, classificada dentro da subfamília Iridoideae (Iridaceae), tribo Sisyrinchieae (Goldblatt *et al.*, 1998). Essa espécie tem ocorrência no Uruguai, norte da Argentina, Bolívia, Peru e no Brasil é encontrada nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Bahia (Chukr & Capellari Jr., 2003, Eggers *et al.*, 2010).

O gênero *Sisyrinchium* apresenta um grande volume de dados citogenéticos, porém estes são, em sua maioria, referentes a espécies Norte Americanas. Os números cromossômicos básicos mais freqüentes para o gênero são  $x = 9$  e  $x = 8$ , sendo o primeiro deles o provável número básico ancestral e também o mais freqüente no Hemisfério Sul (Chauveau *et al.*, 2011; Kenton *et al.*, 1986; Goldblatt & Takei, 1997). A poliploidia foi um processo importante na evolução do gênero sendo encontrados diferentes níveis de ploidia dentro de *Sisyrinchium* (Goldblatt & Takei, 1997), bem como citótipos intra-específicos

(Souza-Chies *et al.*, 2012 no prelo; Tacuatiá *et al.*, 2012). Medidas de conteúdo de DNA em *Sisyrinchium* mostram que o valor-*C* é baixo variando de 0,25 a 3,26 pg (Goldblatt, Walbot & Zimmer, 1984; Kenton *et al.*, 1986; Kenton *et al.*, 1990).

Um grande número de marcadores moleculares, presentes nos três genomas vegetais (nuclear, plastidial e mitocondrial), tem auxiliado no esclarecimento de questões referentes à diversidade genética, estrutura populacional e filogeografia. Tal fato vem contribuindo para uma maior conservação e conhecimento da biodiversidade de diversas espécies, gêneros ou famílias de plantas. Uma das técnicas que vem sendo amplamente utilizada para estudos de variabilidade genética é o ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) que foi proposta pela primeira vez por Zietkiewicz, Rafalski & Labuda (1994). O ISSR é um método baseado na amplificação de DNA por PCR, que envolve a amplificação de fragmentos de DNA presentes em uma distância amplificável entre dois SSRs ou microssatélites idênticos repetidos, orientados em direções opostas (Reddy *et al.*, 2002).

Embora o uso de marcadores moleculares represente uma valiosa ferramenta para a caracterização da variabilidade intra e interespecífica e consequente relação com aspectos reprodutivos, filogenéticos e evolutivos, não existem estudos deste tipo já realizados para *Sisyrinchium palmifolium*.

A maior importância econômica da família Iridaceae reside nas espécies ornamentais. Contudo, infelizmente muitas delas têm uma distribuição muito restrita e estão ameaçadas de extinção devido à perda de habitat em função da agricultura e da urbanização (Manning & Raimondo, 2010; Rhazi & Grillas, 2010; Ortiz & Pulgar Sañudo, 2011). O gênero *Sisyrinchium* inclui muitas dessas espécies consideradas endêmicas e acredita-se que muitas ainda não estejam descritas. Por ser o gênero mais difundido da família no continente americano, e pela América do Sul ser considerada o local de origem e distribuição desse gênero, estudos de caráter genético, reprodutivo, morfológico e ecológico desse gênero na

região sul do Brasil são de extrema importância para o conhecimento e preservação de suas espécies. Portanto, o escasso conhecimento, a beleza, o potencial ornamental e a importância ecológica destas espécies de *Sisyrinchium* são aspectos relevantes e que justificam o desenvolvimento de estudos envolvendo este gênero. Especificamente quanto ao complexo *S. palmifolium*, não existe nenhum estudo já realizado quanto a aspectos genéticos, sejam eles determinação de número cromossômico, valor-*C* ou análise da variabilidade genética. Assim, o presente trabalho apresenta resultados relativos à citogenética de espécies deste complexo, bem como uma análise da estrutura populacional de diferentes acessos de *S. palmifolium*.

## **MATERIAL & MÉTODOS**

### ***Material vegetal***

O estudo inclui exemplares do complexo *Sisyrinchium palmifolium* coletados em 27 acessos da região sul do Brasil (Figura 1). Na Tabela 1 constam as espécies analisadas, os códigos dos acessos (vouchers), as localidades e as coordenadas geográficas. Exemplares de cada acesso estão depositados na forma de exsicatas no Herbário ICN, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Alguns exemplares estão ainda em processo de identificação taxonômica; sendo assim, quatro espécies afins de *S. palmifolium* são aqui tratadas como *S. aff. palmifolium* 1, *S. aff. palmifolium* 2, *S. aff. palmifolium* 3, *S. aff. palmifolium* 4. *Sisyrinchium* sp. nov. 1 é uma nova espécie identificada e em processo de descrição pelo grupo de pesquisa.

### ***Análises citológicas: coleta e fixação***

O material empregado para as análises de meiose e de pólen constituiu-se de inflorescências de 5 a 10 indivíduos (exemplares) por população (acesso) coletadas em campo e fixadas em solução 3:1 etanol/ácido acético por 12-24 h em temperatura ambiente. Após o

período de fixação, os botões florais foram mantidos na mesma solução em freezer à temperatura de -18°C até sua utilização.

Para as análises de mitose foram utilizadas raízes obtidas a partir de plantas cultivadas em vasos. As raízes foram pré-tratadas com agente antimitótico 8- Hidroxiquinoleína (8-HQ) por 4 horas à temperatura de 18°C sendo, após, fixadas em 3:1 por 12-24 h em temperatura ambiente. O material foi mantido em freezer à -18°C para posterior utilização.

#### *Comportamento meiótico, número cromossômico e viabilidade polínica*

O comportamento meiótico, índice meiótico e a viabilidade de pólen das espécies *Sisyrinchium* aff. *palmifolium* 1, *Sisyrinchium* aff. *palmifolium* 2, *Sisyrinchium* aff. *palmifolium* 3, *Sisyrinchium* aff. *palmifolium* 4, *S. avenaceum* Klatt., *S. bromelioides*, *S. palmifolium*, *S. sp. nov.* 1 e *S. rectilineum* foram avaliados num total de 22 acessos (ESC 200, ESC 204, ESC 213, ESC 231, ESC 280, ESC 284, ESC 382, ESC 132, ESC 141, ESC 148, ESC 150, ESC 193, ESC 215, ESC 255, ESC 405, ESC 469, ESC 482, ESC 486, ESC 487, ESC 570, ESC 586, ESC 650). Para a preparação das lâminas, as anteras foram lavadas com água destilada e esmagadas em carmim propiônico 2%. As análises das lâminas são feitas em fotomicroscópio óptico Zeiss Axioplan.

Todas as fases da meiose foram analisadas, conforme disponibilidade. Foram, também, avaliadas anormalidades como cromossomos não orientados em metáfase I, pontes e cromossomos retardatários em anáfase e telófase I e II. O Índice Meiótico (IM) foi calculado a partir de 200 tétrades por planta, através da fórmula  $IM = (n^\circ \text{ de tétrades normais} / n^\circ \text{ total de tétrades}) \times 100$ . Micrócitos, micronúcleos, pontes e células de tamanhos desiguais também foram considerados anormais. O número cromossômico foi determinado a partir da observação da fase de diacinese (prófase I) da meiose. Para a estimativa da viabilidade dos grãos de pólen foi utilizada a técnica de Alexander (1980), na qual foram analisados 500 grãos por indivíduo. Nessa análise foram incluídos 2-5 indivíduos por acesso.

### *Medidas dos grãos de pólen*

As medidas dos grãos de pólen foram realizadas com material das espécies *S. aff. palmifolium* 1 (ESC 231), *S. aff. palmifolium* 2 (ESC 141), *S. aff. palmifolium* 3 (ESC 150), *S. aff. palmifolium* 4 (ESC 193), *S. avenaceum* (ESC 280), *S. bromelioides* (ESC 382), *S. palmifolium* (ESC 148, ESC 215, ESC 405, ESC 469 e ESC 482), *S. sp. nov.* 1 (ESC 204 e ESC 570) e *S. rectilineum* (ESC 284). As medidas foram realizadas em 20 grãos de pólen maduros por indivíduo, corados pela técnica de Alexander, considerando o eixo polar (P) e o diâmetro equatorial (E) (Figura 2A). Com base nessas dimensões, calculou-se a razão P/E, utilizada para classificar a morfologia do pólen, de acordo com Erdtman (1971). As medidas foram realizadas em fotomicroscópio óptico Zeiss Axioplan.

### *Cariótipo e medidas cariotípicas*

O preparo das lâminas envolveu lavagem das raízes em água destilada por 10 minutos seguida de hidrólise em HCl 5N por 20 minutos. A coloração das pontas de raízes foi feita com Reagente de Schiff, em ambiente escuro, por 1 hora. Após a coloração, realizou-se digestão enzimática das raízes em solução de celulase 2% e pectinase 20% a 37°C por 10 minutos. O material foi esmagado em uma gota de ácido acético 45% e coberto com lamínula. As lâminas cujos cromossomos apresentaram bom espalhamento foram registradas em fotomicroscópio óptico Zeiss Axioplan. Para a análise da arquitetura cariotípica foram determinados o comprimento cromossômico (S - braço curto, L - braço longo e TL - total), razão entre os braços ( $R = L/S$ ), índice centromérico ( $CI = S/TL$ ), morfologia cromossômica, comprimento cromossômico médio (CL) e comprimento haplóide total (THL). A assimetria do cariótipo foi estimada utilizando-se os índices A1 e A2 (intra- e intercromossômico, respectivamente) de Romero Zarco (1986) e a classificação de Stebbins (1971). A montagem do cariótipo e as medidas cariotípicas foram realizadas no software de edição de fotos Adobe Photoshop CS5.

### *Estimativa do tamanho dos genomas*

O conteúdo do DNA total foi acessado por citometria de fluxo de acordo com Marie & Brown (1993). As análises de citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Citometria de Fluxo do Institut des Sciences du Végétale, CNRS UPR2355 Gyf-sur-Yvette, (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 conseqüente contaminação do material por fungos e bactérias, causando interferências na análise.

Conforme o tamanho do genoma da amostra analisada, diferentes padrões internos foram utilizados, segundo Marie & 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). Uma amostra de 100mg de folhas das espécies estudadas e dos padrões internos foram cortadas com uma lâmina de barbear em uma placa de Petri contendo 1mL do tampão de lise (tampão Galbraith 0,1% Triton; 100  $\mu$ g/mL RNase A), 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  $\mu$ m, 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  $\mu$ g/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.

O tamanho genômico monoploide (valor  $Cx$ ) foi calculado segundo Greilhuber *et al.* (2005) como o conteúdo de DNA absoluto (valor  $2C$ ) da espécie dividido por seu número de ploidia. Calculou-se também, como proposto por Smarda, Horova & Bures (2007), o valor  $C/n$ , para representar o tamanho cromossômico médio, obtido pela divisão do conteúdo de DNA somático total ( $2C$ ) pelo número cromossômico somático ( $2n$ ).

### ***Análises moleculares***

#### ***Material vegetal***

Exemplares de *S. palmifolium* de cinco acessos foram coletados (AITA 19, ESC 320, ESC 469, ESC 586 e ESC 650) sendo que ESC 320 e ESC 650 foram considerados uma mesma população por distarem apenas 130 metros uma da outra. O material vegetal utilizado foi folhas desidratadas em sílica-gel. Foram utilizados de 28 a 31 indivíduos por acesso para as análises populacionais, totalizando 149 indivíduos analisados.

#### ***Isolamento de DNA e amplificação de PCR ISSR***

A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo modificado de Doyle & Doyle (1987). Um total de 10 *primers* de ISSR foi testado; desses, nove foram selecionados (Tabela 2) para a amplificação de DNA de todas as populações. As reações de PCR foram realizadas de acordo com as seguintes condições (respeitando as particularidades de cada *primer*): 2-3  $\mu$ l de DNA (30-50 ng), 2,5  $\mu$ l de tampão 10x, 0,8-1  $\mu$ l de dNTPs (10 mM), 1,2-2,3  $\mu$ l de  $MgCl_2$

(50 mM), 1  $\mu$ l *primer* (10 pmol/ $\mu$ l), 0,2  $\mu$ l de *Taq* DNA polimerase (5U/ $\mu$ l), 0-1,5  $\mu$ l de DMSO (4%) e H<sub>2</sub>O suficiente para completar o volume de 25 $\mu$ l. As amplificações ocorreram em termociclador (MJ25+) seguindo os programas: desnaturação inicial a 94°C por 5 min.; seguido por 40 ciclos de 1 min. a 94°C, 45°C ou 48°C – variando de acordo com o *primer* – (Tabela 2) por 45 s, 72°C por 2 min.; extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% e corados com GelRed (amicon Corp., Lexington, MA). O tamanho dos fragmentos foi estimado comparativamente com Ladder 100bp (PB-L Produtos Bio-Lógicos).

#### *Análise de diversidade genética*

Os marcadores ISSR são dominantes e por isso, considera-se que cada banda representa o fenótipo de um único *locus* bialélico (Williams *et al.*, 1990). A presença (1) e ausência (0) das bandas foram inseridas em uma matriz binária. A estatística F foi computada no programa GenAlex 6.41, fornecendo  $\phi_{ST}$  como estimador de  $F_{ST}$  para marcadores dominantes (Hartl & Clark, 1989). Os valores de  $\phi$  são análogos à estatística F tradicional, de modo que valores positivos crescentes de  $\phi_{ST}$  (entre 0 e 1) indicam aumento da diferenciação genética entre populações e valores positivos crescentes de  $\phi_{IS}$  (entre 0 e 1) correspondem ao maior endocruzamento e menor diferenciação genética em uma mesma população. Uma análise de variância molecular (AMOVA) foi conduzida com GeneAlex 6.41 para calcular componentes de variância e seus níveis de significância para os níveis hierárquicos: entre as populações e entre indivíduos dentro das populações.

## **RESULTADOS**

### *Análises citológicas*

Das nove espécies estudadas, cinco tiveram seu número cromossômico determinado (Tabela 3). Em todos esses acessos foi observado o número cromossômico básico  $x = 9$ . O

nível de ploidia se manteve o mesmo, com todos os indivíduos dos acessos apresentando-se diploides, resultando no número cromossômico  $2n = 2x = 18$  (Figura 2B e C).

O comportamento meiótico foi regular, sendo detectados percentuais de irregularidades na meiose I e II inferiores a 4% (Tabela 3). Dentre as anormalidades encontradas estão cromossomos univalentes na fase de diacinese, cromossomos fora da placa na metáfase I e II e pontes cromossômicas e cromossomos retardatários na anáfase I e II e telófase I e II. Essas mesmas espécies apresentaram Índices Meióticos (IMs) elevados com o menor valor sendo o de *S. palmifolium* (97,05%). Com relação à viabilidade de pólen, todas as nove espécies tiveram esse parâmetro avaliado, segundo o qual se apresentaram altamente viáveis – valores superiores a 88%. Algumas anomalias registradas durante as análises meióticas e polínicas estão representadas nas Figuras 2D-F.

As medidas dos grãos de pólen (Figura 2A) foram, também, realizadas nas nove espécies e seus resultados são apresentados na Tabela 4. Houve diferença na proporção entre os eixos do pólen, o que acabou refletindo em morfologias diversas no material estudado, compreendendo grãos de pólen do tipo oblado, oblado esferoidal e suboblado, segundo classificação de Erdtman (1971). O tipo de pólen mais comum é o oblado esferoidal, que juntamente com o suboblado se enquadra na classe dos subesferoidais.

A análise de mitose foi realizada com indivíduos de *S. palmifolium* provenientes de dois acessos (ESC 567 e ESC 579). O estudo confirmou o número cromossômico para a espécie sendo possível a obtenção de dados quanto à arquitetura cariotípica (Figura 3). As medidas cariotípicas obtidas a partir de uma célula metafásica estão apresentadas na Tabela 5. Os cromossomos são relativamente grandes, apresentando um comprimento médio (CL) de 6,74  $\mu\text{m}$  ( $\pm 1,55$ ) e o comprimento haplóide total 91,17  $\mu\text{m}$  ( $\pm 2,41$ ). A espécie contém um cromossomo metacêntrico, seis submetacêntricos, um acrocêntrico e um telocêntrico. A assimetria cariotípica da espécie é classificada, segundo Stebbins (1971) como 2B. A análise

de assimetria pelo método de Zarco (1986) mostrou que quanto à assimetria intracromossômica A1 houve uma pequena variação no comprimento dos braços dos cromossomos; por outro lado, o índice de assimetria intercromossômica A2 demonstrou maior variação entre os cromossomos.

A quantidade de DNA foi obtida para quatro acessos de *S. palmifolium* e três acessos de *S. sp. nov. 1* (Tabela 6). *S. palmifolium* apresentou valor 2C médio de 4,84 pg ( $\pm 0,08$ ) sendo quase o dobro daquele encontrado para a espécie nova *S. sp. nov. 1*, que foi de 2,54 pg ( $\pm 0,33$ ).

### ***Análise molecular***

A amplificação dos nove *primers* resultou em 183 *loci* com 99,45% de polimorfismo. Os fragmentos de ISSR geraram uma média de 20,3 bandas por *primer*. O tamanho dos produtos amplificados variou de 280 a > 2080 pb (Tabela 2). O *primer* SV3 foi o que apresentou o menor número de fragmentos (11); em contrapartida o *primer* SV8 amplificou 42 fragmentos, apresentando também a maior amplitude de tamanho de fragmentos (280 - > 2080 pb).

A estatística  $\phi$  gerada pela AMOVA (Tabela 7) é análoga à estatística F de Wright. Essa análise revelou considerável estruturação das populações considerando que aproximadamente 32% da diversidade genética poderia ser atribuída ao isolamento populacional ( $\phi_{ST} = 0,32$ ;  $p < 0,001$ ). O nível de variabilidade genética intrapopulacional foi elevado com um  $\phi_{IS} = 0,68$  ( $p < 0,001$ ).

## DISCUSSÃO

### *Número cromossômico e comportamento meiótico*

Apesar da escassez de dados citológicos de espécies de *Sisyrinchium* da América do Sul, o gênero é o que comporta o maior volume de informações desse tipo em Iridaceae (Goldblatt, 1982; Kenton *et al.*, 1986; Goldblatt & Takei, 1997; Souza-Chies *et al.*, no prelo).

O número básico  $x = 9$  aqui relatado é considerado por Chauveau *et al.* (2011) o número básico ancestral de *Sisyrinchium* e está de acordo com Kenton & Heywood (1984) cujo estudo sugere ser esse o mais freqüente para o gênero no Hemisfério Sul.

Eventos de poliploidia são encontrados em diversas espécies do gênero *Sisyrinchium*, sendo este um processo extremamente importante na evolução deste grupo (Goldblatt & Takei, 1997). Tal informação pode ser ilustrada por duas espécies já estudadas por nosso grupo e que ocorrem no sul do Brasil. Tanto em *S. micranthum* Cav. (Goldblatt, 1982; Kenton & Heywood, 1984; Goldblatt & Takei, 1997; Tacuatiá *et al.*, 2012) como no complexo *S. vaginatum* (Corrêa, 2011), mais de um nível de ploidia já foi documentado, havendo desde diploides até hexaploides. Segundo Goldblatt & Takei (1997), no hemisfério Sul há um maior número de espécies diploides em *Sisyrinchium*, enquanto níveis de ploidia mais elevados, como octa e dodecaplóides são encontrados no hemisfério Norte. No presente estudo, as quatro espécies analisadas são diploides, não sendo encontrados citótipos poliploides. Apesar do pequeno número cromossômico e do comportamento dissômico, é possível que durante a evolução dessas espécies tenham ocorrido eventos de poliploidização remotos. Estudos moleculares recentes indicam que muitas espécies contemporâneas consideradas diploides são, na verdade, paleopoliploides, como por exemplo, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* e *Zea mays*. Estimativas sugerem que 70% das angiospermas teriam passado por pelo menos um *round* de duplicação do genoma (Hegarty & Hiscoch, 2008). As informações disponíveis para a família Iridaceae e para o gênero *Sisyrinchium* ainda mantêm como números ancestrais

$x = 10$  e  $x = 9$ , respectivamente. Contudo, a existência de números básicos menores  $x = 5, 6$  e  $7$  dentro de Iridaceae poderiam sugerir uma origem paleopoliploide para a família (Goldblatt & Takei, 1997).

Os resultados de comportamento meiótico e de viabilidade polínica obtidos para as espécies estudadas são relevantes à investigação de mecanismos envolvidos em seu processo evolutivo. Baixas frequências de anormalidades foram encontradas em quase todos os acessos correspondendo a altas taxas de viabilidade de pólen, sendo um indicativo de que as plantas são macho-férteis (Tacuatiá *et al.*, 2012). Por se tratarem de plantas diploides, a alta estabilidade no processo de microsporogênese já era esperada. Ainda assim, plantas poliploides podem, também, apresentar alta estabilidade na meiose, como demonstrou o estudo de Henderson (1976), que abrangeu 13 espécies de *Sisyrinchium* no Noroeste do Pacífico. A presença de algumas irregularidades na meiose, como univalentes da fase de diacinese, aqui apresentadas pode ocorrer em espécies dodecaplóides ( $n = 48$ ) como apresentado por Henderson (1976) e por Cholewa & Henderson (1984); esses autores levantam a hipótese de que sejam híbridos interespecíficos em processo de estabilização. A grande variação morfológica das plantas deste complexo gera muita dificuldade na distinção de espécies, mas até o momento, diferenças nos níveis de ploidia e ocorrência de hibridação natural não são explicações que serviriam para esclarecer essas incógnitas taxonômicas.

### ***Morfologia do pólen***

O tamanho do grão de pólen, bem como o de outros caracteres morfológicos, está relacionado diretamente com o nível de ploidia de espécies vegetais, sendo observado muitas vezes o “efeito giga” dessas características (Ramsey & Schemske, 2002; Tacuatiá *et al.*, 2012). Tacuatiá *et al.* (2012) encontraram relação positiva entre o nível de ploidia e tamanho de pólen ao estudar diferentes morfotipos de *S. micranthum*. No presente estudo, não houve diferença no nível de ploidia, não sendo aplicável o fenômeno giga em relação ao pólen. A

subfamília Iridoideae difere, consideravelmente, em muitos aspectos; um deles é a morfologia do grão de pólen (Goldblatt, 1990). Tal variação está bem representada nos resultados aqui demonstrados, tendo sido observadas três diferentes morfologias dentre os exemplares analisados.

### ***Tamanho genômico e medidas cariotípicas***

É interessante observar que apesar de todas as espécies do complexo *Sisyrinchium palmifolium* aqui estudadas apresentarem o mesmo número cromossômico, há uma grande disparidade em relação ao tamanho de genoma das espécies *S. palmifolium* e *S. sp. nov 1*,  $2C = 4,94$  pg e  $2,54$  pg, respectivamente. Ainda assim, seus genomas não destoam daqueles conhecidos para *Sisyrinchium* (valor  $C$  de  $0,25 - 3,26$  pg) (Souza-Chies *et al.*, no prelo). Tal diferença no conteúdo de DNA é inesperada considerando que ambas as espécies apresentam mesmo número cromossômico, não havendo uma nítida diferença no tamanho dos cromossomos. Uma análise cariotípica da espécie nova em comparação a *S. palmifolium* será fundamental para comprovar a constatação meramente visual da semelhança a partir dos cromossomos meióticos.

A variação no tamanho do genoma é amplamente reconhecida entre as angiospermas (Enke, Fuchs & Gemeinholzer, 2010), e em Iridaceae isso não é diferente: sua evolução cariotípica envolve eventos de aumento e diminuição no tamanho do genoma (Goldblatt *et al.*, 1984). Bennett (1972) discute a correlação da variação do tamanho genômico com o ciclo de vida da planta, de modo que plantas anuais tendem a ter genomas menores, enquanto as perenes comportariam maiores genomas. O paradigma de Bennett (1972) não se confirma neste caso, visto que ambas as espécies são perenes. Possivelmente outros fatores (fisiológicos e ambientais) estejam envolvidos (Knight & Beaulieu, 2008). Muitos dos estudos que abordam o tema da variação no tamanho do genoma envolvem, também, variação no nível de ploidia do grupo de plantas em questão. Contudo, Petrov (2001) chama a atenção

para que, qualquer que seja o cenário evolutivo da mudança do tamanho genômico, mecanismos mutacionais de adição e perda de DNA devem estar envolvidos. Portanto, é possível que elementos transponíveis, deleções e/ou inserções espontâneas, dentre outros, possam explicar a diferença observada no valor  $2C$  das duas espécies. É de se esperar que, uma vez realizado o estudo cariotípico da espécie *S. sp. nov 1*, essa venha a apresentar cromossomos significativamente menores em relação a *S. palmifolium*, podendo vir a confirmar a importante diferença entre o tamanho cromossômico médio  $C/n$  obtido a partir do valor  $C$ .

Diferentemente do que ocorre com muitas das espécies do gênero *Sisyrinchium* que apresentam cromossomos diminutos (Kenton *et al.*, 1986), os cromossomos de *S. palmifolium* são grandes, variando de 6,67 a 14,23  $\mu\text{m}$ . A espécie apresenta um cariótipo bimodal, em que há grande diferença entre o comprimento do maior e do menor cromossomo ( $R = 2,13$ ). A bimodalidade ocorre em muitas plantas e animais e é considerada uma forma cariotípica altamente especializada (Natalia *et al.*, 2009), podendo até mesmo servir para caracterizar grupos de gêneros ou espécies (Kenton *et al.*, 1990; Naranjo *et al.*, 1998).

Existe em *Sisyrinchium* uma tendência de cariótipos mais simétricos estarem associados a maiores tamanhos cromossômicos (Kenton & Heywood, 1984; Kenton *et al.*, 1986). Porém, no caso de *S. palmifolium* observou-se justamente o inverso: grandes cromossomos e uma forte assimetria cariotípica. Tal assimetria fornece uma idéia da evolução do cariótipo sendo que, de maneira geral, existe uma tendência de espécies com cariótipos mais simétricos serem mais ancestrais (Stebbins, 1971). Seguindo esse raciocínio, *S. palmifolium* seria considerada uma espécie mais derivada no gênero. Esta hipótese pode ser confirmada pela filogenia do gênero onde *S. palmifolium* se posiciona em um dos clados mais recentes na evolução de *Sisyrinchium* (Chauveau *et al.*, 2011).

### ***Estrutura populacional***

A estrutura genética populacional de plantas é um reflexo da história evolutiva, mutação, recombinação, deriva genética, fluxo gênico e dispersão de sementes, bem como distribuição geográfica e seleção natural. O fator que parece ter maior influência sobre a diferenciação genética entre populações é a distribuição geográfica, de modo que espécies mais amplamente distribuídas tendem a acumular mais polimorfismos do que espécies com restrita ocupação geográfica (Hamrick & Godt, 1996; Karron, 1991).

Em *Sisyrinchium palmifolium*, nove marcadores de ISSR revelaram um alto grau de variabilidade genética, visto que 99,45% das bandas apresentaram polimorfismo. Examinando-se a estrutura genética populacional da espécie, percebeu-se uma diferenciação relativamente alta entre as populações e uma alta variabilidade intrapopulacional. Um resultado similar foi encontrado nas espécies *S. micranthum*, *S. sellowianum* Klatt. e *S. vaginatum* (Souza-Chies *et al.*, no prelo). Os resultados de diversidade genética destas populações indicam baixo fluxo gênico devido, provavelmente, à distância geográfica e fragmentação das populações, resultando em estruturação populacional. O valor alto de  $\theta_{IS}$  obtido indica que cerca de 68% da variação total se encontra dentro das populações, semelhante à estrutura genética populacional já observada em *S. micranthum* e outras espécies do gênero (Tacuatiá *et al.*, 2012; Souza-Chies *et al.*, no prelo) e sendo aquela esperada para plantas de fecundação cruzada (Hamrick & Godt, 1996). No caso de *Sisyrinchium*, a polinização cruzada se dá, predominantemente, por abelhas. Estudos mais aprofundados usando marcadores microssatélites se encontram em andamento e certamente auxiliarão na compreensão deste e outros aspectos da genética populacional.

## CONCLUSÕES

Os resultados gerados por este trabalho são inéditos e ampliam o conhecimento acerca do gênero *Sisyrinchium*, e principalmente da espécie *S. palmifolium*. Não obstante, estes dados são iniciais para a resolução de incógnitas taxonômicas relacionadas a este complexo grupo. A associação destes dados a outras abordagens genéticas (moleculares e citogenéticas), bem como a caracteres morfológicos permitirão uma melhor compreensão dos processos evolutivos que envolvem este grupo de espécies.

## REFERÊNCIAS

- Alexander MP. 1980.** A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology* **55**: 13–18.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group) III. 2009.** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 105-121.
- Bennett MD. 1972.** Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proceedings of the Royal Society of London* **181**: 109–135.
- 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* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Annals of Botany* **107**: 1287-1312.
- Cholewa AF, Henderson DM. 1984.** Biosystematics of *Sisyrinchium* section *Bermudiana* (Iridaceae) of the Rocky Mountains. *Brittonia* **36**: 342–363.
- Chukr NS, Capellari L Jr. 2003.** Iridaceae. In: Wanderley MGL, Sheperd GJ, Giulietti AM, Melhem TS, coords. *Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo*. São Paulo: FAPESP, Rima, 127–147.
- Corrêa, LB. 2011.** *Diversidade Genética no complexo Sisyrinchium vaginatum: aspectos citogenéticos e moleculares*. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Cui L, Wall PK, Leebens-Mack JH, Lindsay BG, Soltis DE, Doyle JJ, Soltis PS, Carlson JE, Arumuganathan K, Barakat A, Albert VA, Ma H, de Pamphilis CW. 2006.** Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research* **16**: 738–749.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin, Botanical Society of America* **19**: 11–15.
- Eggers L, Chukr N, Lovo J, Gil A. 2010.** Iridaceae. In: Forzza RC *et al.* *Lista de espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1122- 1128.
- Enke N, Fuchs J, Gemeinholzer, B. 2011.** Shrinking genomes? Evidence from genome size variation in *Crepis* (Compositae). *Plant Biology* **13**: 185–193.
- Erdtman G. 1971.** *Pollen morphology and plant taxonomy: angiosperms: an introduction to palynology*. New York: Hafner Publishing Company.
- Goldblatt P. 1982.** Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of Neotropical Iridaceae. *Systematic Botany* **7**: 186-198.
- Goldblatt P. 1990.** Phylogeny and classification of Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **77**: 607-627.
- Goldblatt P, Manning JC. 2008.** *The Iris Family: natural history and classification*. Portland: Timber Press.

- Goldblatt P, Manning JC, Rudall P. 1998.** Iridaceae. In: Kubitski K, ed. *The Families and Genera of Vascular Plants*. Springer: Germany, 295-314.
- Goldblatt P, Takei M. 1997.** Chromosome cytology of Iridaceae – patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **84**: 285–304.
- Goldblatt P, Walbot W & Zimmer EA. 1984.** Estimation of genome size (C-value) in Iridaceae by cytophotometry. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **71**:176-180.
- Greilhuber J, Dolezel J, Lysak MA, Bennett MD. 2005.** The origin, evolution and proposed stabilization of the terms ‘genome size’ and ‘C-value’ to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany* **95**: 255–260.
- Hartl DL, Clark AG. 1989.** *Principles of Population Genetics*. Sinauer, Sunderland, Mass, USA.
- Henderson DM. 1976.** A biosystematic study of Pacific Northwestern blue-eyed grasses (*Sisyrinchium*, Iridaceae). *Brittonia* **28**: 149–176.
- Hegarty MJ, Hiscock SJ. 2008.** Genomic clues to the evolutionary success of polyploid plants. *Current Biology* **18**: R435-R444,
- Johnston IM. 1938.** The species of *Sisyrinchium* in Uruguay, Paraguay and Brazil. *Journal of the Arnold Arboretum*. **19**: 376-401.
- Kenton A, Heywood CA. 1984.** Cytological studies in South American Iridaceae. *Plant Systematic and Evolution* **146**:87-104.
- 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.
- Kenton A, Dickie JB, Langton DH & Bennett MD. 1990.** Nuclear DNA amount and karyotype symmetry in *Cypella* and *Hesperoxiphion* (Tigridieae: Iridaceae). *Evolutionary Trends in Plants* **4**: 59-69.
- Knight CA, Beaulieu JM. 2008.** Genome size scaling through phenotype space. *Annals of Botany*, **101**: 759–766.
- Manning J, Raimondo D. 2010.** *Romulea aquatica*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2012.1. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em 21 jun. 2012.
- Marie D, Brown SC. 1993.** A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell* **78**: 41-51.
- Naranjo CA, Ferrari MR, Palermo AM, Poggio L. 1998.** Karyotype, DNA content, and meiotic behavior in five South American species of *Vicia* (Fabaceae). *Annals of Botany* **82**: 757-764.
- Natalia M, Peñas ML, Bernardello G, Roitman G. 2009.** Cytogenetic studies in *Herbertia* Sw. (Iridaceae). *Caryologia* **62**: 37-42.
- Ortiz S, Pulgar Sañudo I. 2011.** *Iris boissieri*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2012.1. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 21 jun. 2012.

- Petrov DA. 2002.** DNA loss and evolution of genome size in *Drosophila*. *Genetica*, **115**: 81–91.
- Ramsey J, Schemske DW. 2002.** Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**: 589–639.
- Ravenna P. 2000.** Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* – VI. *Onira, Botanical Leaflets*, **5**: 13-19.
- Ravenna P. 2003.** Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* – XI. *Onira, Botanical Leaflets*, **8**: 48-54.
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq E. 2002.** Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* **128**: 9–17.
- Rhazi L, Grillas P. 2010.** *Romulea antiatlantica*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2012.1. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 21 jun. 2012.
- Romero Zarco C. 1986.** A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* **35**: 526–530.
- Rudall P, Kenton AY, Lawrence TJ. 1986.** An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied genera. *Botanical Gazette* **147**: 466–477.
- Smarda P, Horova L, Bures P. 2007.** Random distribution pattern and non-adaptivity of genome size in a highly variable population of *Festuca pallens*. *Annals of Botany* **100**: 141–150.
- Souza-Chies TT, Kaltchuk-Santos E, Eggers L, Flores AM, Alves EMS, Fachinetto J, Lustosa J, Corrêa LB, Tacuatiá LO, Piccoli P, Miz RB. 2012.** Studies on diversity and evolution of Iridaceae species of southern Brazil GMB *no prelo*.
- Stebbins GL. 1971.** *Chromosomal evolution in higher plants*. Bristol: Edward Arnold.
- Stevens, P. F. 2001.** Angiosperm Phylogeny Website. Version 9, June 2008 [and more or less continuously updated since]." Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 12 nov. 2009.
- Tacuatiá LO, Souza-Chies TT, Flores AM, 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**: 350-364.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski AJA, Tingey SV. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**: 6531-6535.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994.** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genome* **20**: 176–183.

## LEGENDAS

**Figura 1.** Localização dos acessos estudados do complexo *S. palmifolium*. A – mapa do Brasil e distribuição dos acessos na região Sul do país. B – visualização em detalhe da distribuição e respectiva identificação dos acessos. Ver Tabela 1 para classificação das espécies e coordenadas.

**Figura 2.** Análise citológica. A, medidas do grão de pólen (P, eixo polar; E, diâmetro equatorial). B-C, células-mãe de pólen em diacinese,  $n = 9$ . B, ESC 469 - *S. palmifolium*. C, ESC 382 - *S. bromelioides*. D-F, anormalidades encontradas nas análises de meiose e de pólen. D, 'tétrade' com 6 micrósporos. E, grão de pólen com forma anômala. F, grãos de pólen viável (escuro) e inviáveis (claros). Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

**Figura 3.** Cariótipo de *S. palmifolium* ( $n = 9$ ). A, célula mitótica. B, idiograma. Barra = 10  $\mu\text{m}$ .

## TABELAS

**Tabela 1.** Espécies e locais de coleta do complexo *Sisyrinchium palmifolium* da região Sul do Brasil.

Espécie	Acesso (voucher)	Localidade	Latitude (S)	Longitude (W)
<i>S. aff. palmifolium</i> 1	ESC 231	Curitibanos, SC	27° 18' 45,41"	50° 33' 43,07"
<i>S. aff. palmifolium</i> 2	ESC 141	Porto Alegre, RS	30° 03' 35,18"	51° 07' 29,30"
<i>S. aff. palmifolium</i> 3	ESC 150	Porto Alegre, RS	30° 11' 01,3"	51° 06' 43,6"
<i>S. aff. palmifolium</i> 4	ESC 193	Viamão, RS	30° 21' 53,0"	51° 01' 22,4"
<i>S. avenaceum</i>	ESC 280	São Lourenço do Sul, RS	31° 22' 22,2"	52° 05' 56,1"
<i>S. bromelioides</i>	ESC 382	Mariópolis, PR	26° 22' 00,5"	52° 31' 57,9"
<i>S. palmifolium</i>	AITA 19	Porto Alegre, RS	30° 7' 23,47"	51° 13' 36,73"
	ESC 132	Viamão, RS	30° 23' 04,3"	51° 01' 14,7"
	ESC 148	Porto Alegre, RS	30° 11' 29,9"	51° 07' 03,5"
	ESC 167	São Francisco de Paula, RS	29° 25' 25,7"	50° 30' 50,4"
	ESC 215	São Francisco de Paula, RS	29° 25' 25"	50° 30' 51"
	ESC 255	Porto Alegre, RS	30° 03' 13,0"	51° 07' 03,8"
	ESC 320	Campo Alegre, SC	26° 10' 13,9"	49° 13' 59,6"
	ESC 405	Santa Cecília, SC	26° 46' 22,5"	50° 20' 59,8"
	ESC 469	Aceguá, RS	31° 39' 00,8"	54° 09' 09,1"
	ESC 482	Capão do Leão, RS	31° 46' 49,1"	52° 32' 06,1"
	ESC 486	São Lourenço do Sul, RS	31° 22' 22,2"	52° 05' 56,1"
	ESC 487	São Gabriel, RS	30° 19' 40,1"	54° 22' 13,6"
	ESC 567	São Francisco de Paula, RS	29° 05' 55,7"	50° 37' 49,7"
	ESC 579	São Francisco de Paula, RS	29° 25' 25,9"	50° 30' 50,7"
	ESC 586	Porto Alegre, RS	30° 03' 35,2"	51° 07' 28,1"
	<i>S. sp. nov.1</i>	ESC 650	Campo Alegre, SC	26° 10' 16,5"
ESC 200		São Francisco de Paula, RS	29° 27' 00,5"	50° 36' 14,1"
ESC 204		Cambará do Sul, RS	29° 14' 26,9"	50° 16' 07,7"
ESC 213		São Francisco de Paula, RS	29° 26' 44,9"	50° 36' 17,6"
ESC 222		São José dos Ausentes, RS	28° 48' 06"	50° 57' 10"
<i>S. rectilineum</i>	ESC 570	Bom Jesus, RS	28° 40' 35,3"	50° 26' 16,3"
	ESC 284	São Lourenço do Sul, RS	31° 22' 22,2"	52° 05' 56,1"

ESC indica os coletores Eggers e Souza-Chies, AITA indica o coletor Aita; ambos são seguidos do número da coleta.

**Tabela 2.** *Primers* de ISSR utilizados nas análises de diversidade genética populacional de *Sisyrinchium palmifolium*, número de fragmentos registrados e tamanho dos fragmentos amplificados.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Nº de fragmentos	Tamanho dos fragmentos (pb)
F3	(AG)8C	48	14	400 - 2000
F4	(GA)8C	48	16	300 - >2080
F11	(GACA)4	48	15	700 - >2080
P1	(AC)6	48	14	500 - >2080
SM1	TC(AC)7A	48	15	400 - >2080
SV3	(AC)8A	48	11	600 - 2000
SV4	A(TG)7G	48	34	470 - >2080
SV5	(TG)8A	45	22	400 - 800
SV8	(GA)8AC	48	42	280 - >2080
Total			183	

**Tabela 3.** Percentual de irregularidades meióticas em células-mãe de pólen, índices meióticos e fertilidade do pólen em acessos do sul do Brasil.

Espécies	Números cromossômicos		Percentual de irregularidades na meiose I		Percentual de irregularidades na meiose II		Índice meiótico		Viabilidade do pólen	
	N <sup>1</sup>	n	N <sup>1</sup>	%	N <sup>1</sup>	%	N <sup>1</sup>	%	N <sup>1</sup>	%
<i>S. aff. palmifolium</i> 1	26 (1)	9	888 (3)	3,49	2224 (3)	1,17	1058 (3)	99,25	6000 (5)	89,73
<i>S. aff. palmifolium</i> 2									2500 (5)	96,84
<i>S. aff. palmifolium</i> 3									2500 (5)	96,12
<i>S. aff. palmifolium</i> 4	53 (1)	9	53 (1)	2,44					2500 (5)	94,16
<i>S. avenaceum</i>									2500 (5)	97,92
<i>S. bromelioides</i>	397 (4)	9	150 (1)	0			800 (4)	99,62	2500 (5)	99,08
<i>S. palmifolium</i>	1787 (22)	9	7703 (15)	2,44	1257 (4)	0,49	5400 (23)	97,05	14500 (33)	93,80
<i>S. sp. nov.</i> 1	1972 (10)	9	1333 (6)	1,83	1293 (4)	0,75	706 (4)	97,94	4000 (8)	97,50
<i>S. rectilineum</i>									1000 (2)	98,30

<sup>1</sup>N corresponde ao número de células analisadas e o número de indivíduos está entre parênteses.

**Tabela 4.** Resultados do eixo polar (P), do eixo equatorial (E) e da razão P/E dos acessos analisados.

Espécie	Acesso	P	E	P/E	Morfologia
		Média (µm)	Média (µm)	Média	
<i>S. aff. palmifolium</i> 1	ESC 231	30,92	35,28	0,88	oblado esferoidal
<i>S. aff. palmifolium</i> 2	ESC 141	29,03	38,83	0,75	oblado
<i>S. aff. palmifolium</i> 3	ESC 150	27,07	31,48	0,86	suboblado
<i>S. aff. palmifolium</i> 4	ESC 193	30,27	34,92	0,87	suboblado
<i>S. avenaceum</i>	ESC 280	29,63	36,13	0,82	suboblado
<i>S. bromelioides</i>	ESC 382	26,12	31,41	0,83	suboblado
<i>S. palmifolium</i>	ESC 148	31,33	33,39	0,94	oblado esferoidal
	ESC 215	34,32	37,82	0,91	oblado esferoidal
	ESC 405	29,8	32,59	0,91	oblado esferoidal
	ESC 469	28,58	32,05	0,89	oblado esferoidal
	ESC 482	31,75	35,5	0,89	oblado esferoidal
<i>S. sp. nov.</i> 1	ESC 204	30,71	31,31	0,98	oblado esferoidal
	ESC 570	27,86	32,03	0,87	oblado esferoidal
<i>S. rectilineum</i>	ESC 284	36,15	38,87	0,93	oblado esferoidal

**Tabela 5.** Medidas cariotípicas, fórmula cariotípica e índices de assimetria.

PARES	S (µm)	L (µm)	TL (µm)	CI	r	Morfologia
I	3,94	4,64	8,57	45,94	1,18	M
II	4,59	9,64	14,23	32,25	2,10	SM
III	4,08	7,92	12,00	33,99	1,94	SM
IV	4,32	7,30	11,62	37,18	1,69	SM
V	3,01	7,90	10,90	27,57	2,63	SM
VI	2,74	6,60	9,35	29,35	2,41	SM
VII	2,04	5,24	7,28	28,06	2,56	SM
VIII	1,90	8,64	10,54	18,02	4,55	A
IX	0,00	6,67	6,67	0,00	0,00	T

CL	6,74 (± 1,55) *
THL	91,17 (± 2,41) *
R	2,13
Fórmula cariotípica	1m + 6sm + 1a + 1t
Steb.	2B
A1	0,57
A2	0,23

S - braço curto; L - braço longo; TL - comprimento total; CI - índice centromérico; r - razão dos braços; m - metacêntrico; sm - submetacêntrico; a - acrocêntrico; t - telocêntrico. CL - comprimento cromossômico médio; THL - comprimento haplóide total; R = razão entre os comprimentos do cromossomo mais longo e o mais curto; Steb. - categoria de assimetria de Stebbins; A1 - assimetria intracromossômica; A2 - assimetria intercromossômica; \* Média (µm) ± DP

**Tabela 6.** Nível de ploidia, conteúdos 2C de DNA (valor 2C), tamanhos genômicos monoploides (valor Cx) e tamanho médio do genoma por cromossomo (valor C/n) das amostras analisadas.

Espécie	Nº de indivíduos	2n	Nível de ploidia	Valor 2C (pg) (± DP)	Cx	C/n
<i>S. palmifolium</i>	16	18	2x	4,84 (± 0,08)	2,42	0,27
<i>S. sp. nov. 1</i>	13	18	2x	2,54 (± 0,21)	1,27	0,14

**Tabela 7.** Análise de variância molecular (AMOVA) em *Sisyrinchium palmifolium*.

Fatores de variação	df	Sum Squares	Estatística F	P
Interpopulacional	3	901,16	$F_{ST} = 0,32$	<0.001
Intrapopulacional	145	2.460,43	$F_{IS} = 0,68$	
Total	148	3361,60		

FIGURA 1

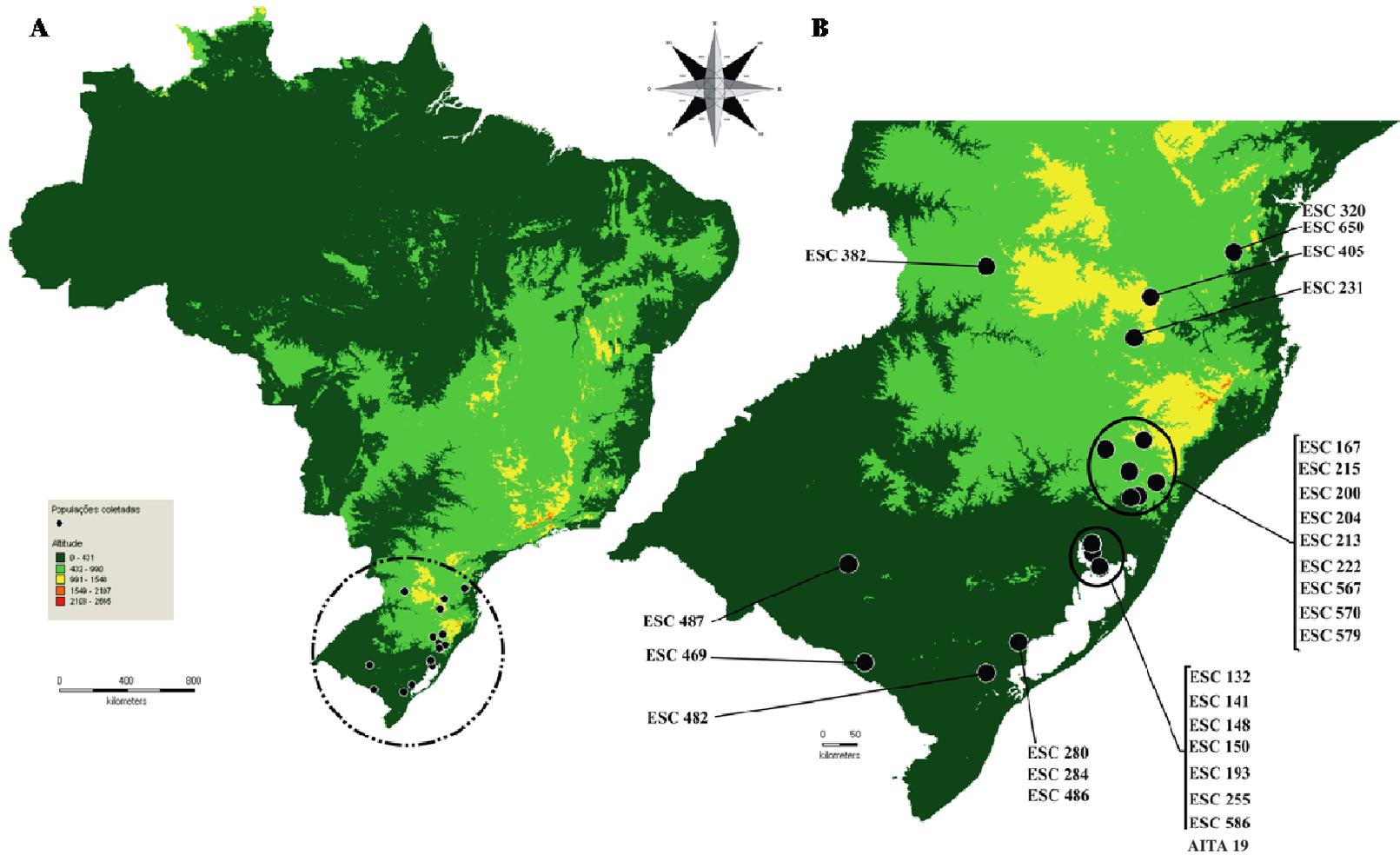


FIGURA 2

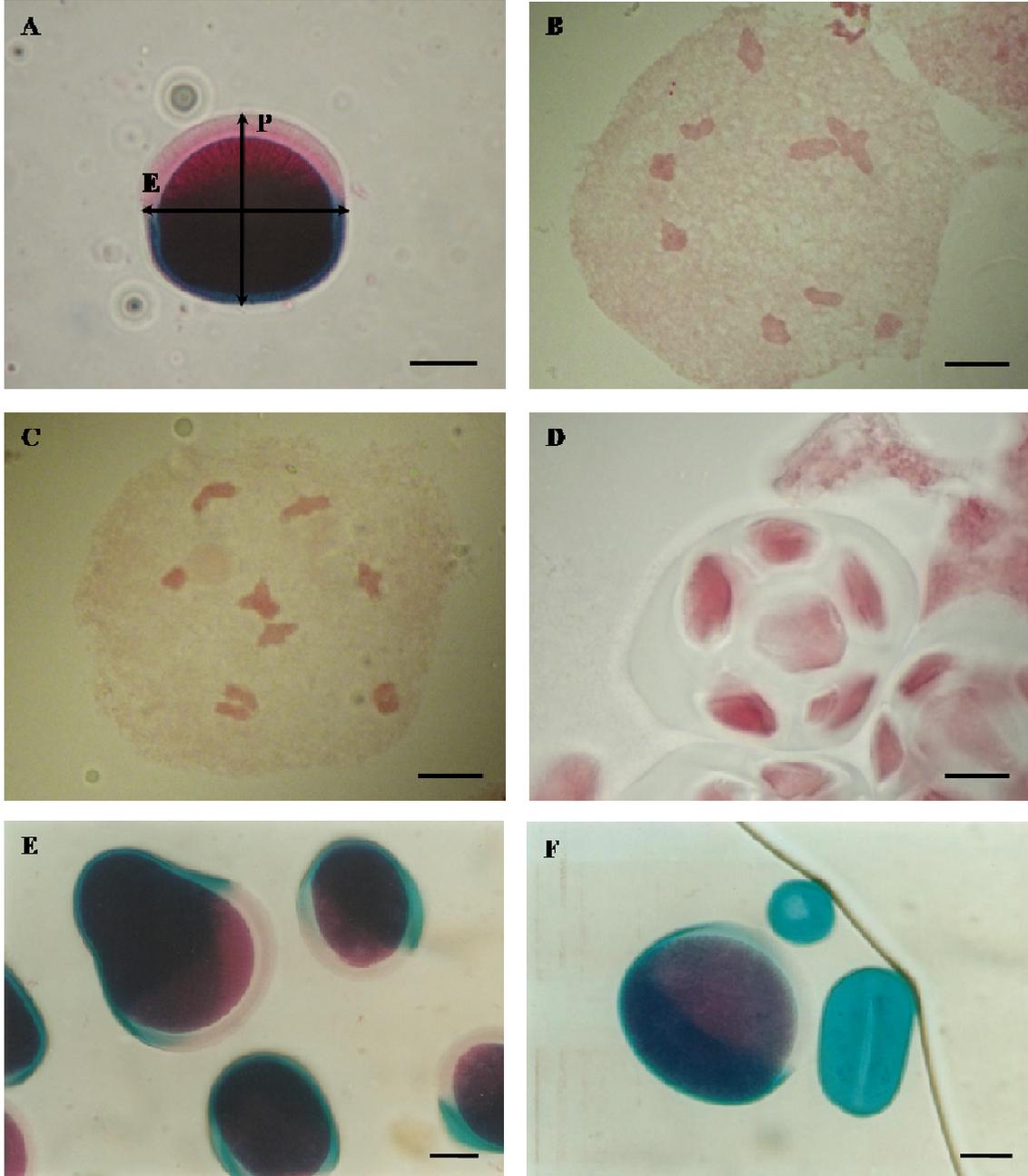
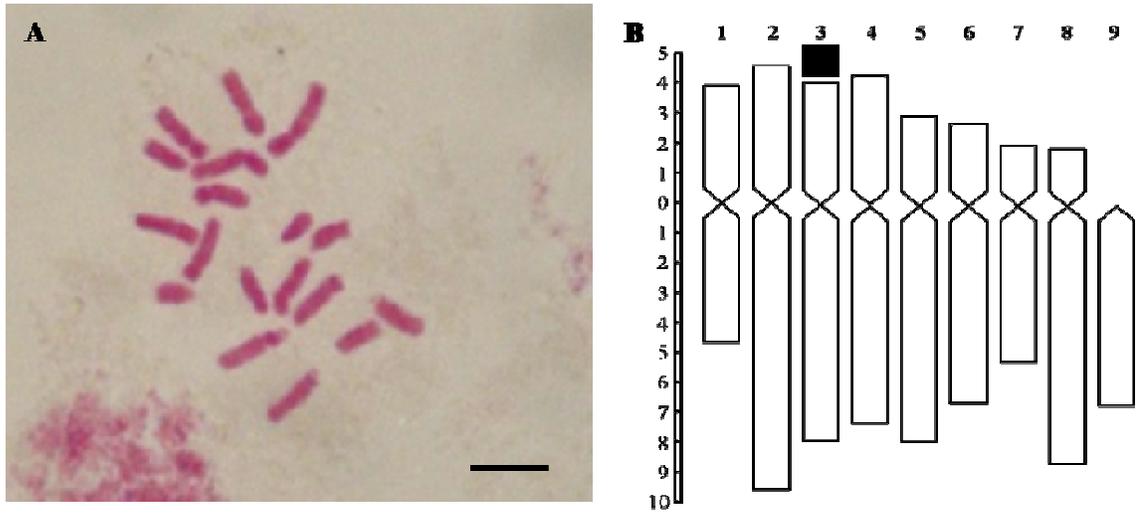


FIGURA 3



## ANEXO 1

### Instructions for Authors

The Linnean Society publishes four periodicals: the Biological, Botanical and Zoological Journals, and *The Linnean*, the Society's newsletter and proceedings.

The *Botanical Journal of the Linnean Society* publishes original papers on systematic and evolutionary botany and comparative studies of both living and fossil plants. Review papers are also welcomed which integrate fields such as cytology, morphogenesis, palynology and phytochemistry into a taxonomic framework. The Journal will only publish new taxa in exceptional circumstances as part of larger monographic or phylogenetic revisions.

Submissions to the Botanical Journal are now made on-line using ScholarOne Manuscripts. To submit to the journal go to <http://mc.manuscriptcentral.com/botjls>. If this is the first time you have used the system you will be asked to register by clicking on 'create an account'. Full instructions on making your submission are provided. You should receive an acknowledgement within a few minutes. Thereafter, the system will keep you informed of the process of your submission through refereeing, any revisions that are required, and a final decision. Manuscripts submitted by other methods will not be considered.

#### **Conflict of Interest**

The *Botanical Journal of the Linnean Society* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in a cover letter to the Editor, in the manuscript (under the Acknowledgement section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships. Corresponding authors will be asked to confirm whether or not a conflict of interest exists as part of the submission process.

#### **Ethical Guidelines**

The journal expects authors to abide by the guidelines of those statutory bodies, or, discipline that are specific to the country of origin, or, execution of the research.

#### **Copyright Transfer Agreement Form**

Authors will be required to sign a Copyright Transfer Agreement Form (CTA) for all papers accepted for publication. Signature of the Copyright Transfer Agreement Form is a condition of publication and papers will not be put into production until a signed form has been received. (Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission authors will

retain the right to publish their paper in various media/circumstances (please see the form for further details). A copy of the form may be downloaded [here](#).

### **OnlineOpen**

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Wiley-Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via Wiley Online Library. Each Online Open article will be subject to a one-off fee of US\$3000 to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. For the full list of terms and conditions, see

[http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen\\_Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms).

Authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: [https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen\\_order.asp](https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp) (Please note this form is for use with OnlineOpen material ONLY.)

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

### **Author material archive policy**

All original hardcopy artwork will be returned to authors after publication. **Please note that, unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all electronic material and remaining hardcopy two months after publication.** If you require the return of any of this material, you must inform the editorial office upon submission.

### **Offprints**

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs.

### **Manuscript preparation**

Authors should aim to communicate ideas and information clearly and concisely, in language suitable for the moderate specialist. Papers in languages other than English are not accepted unless invited. When a paper has joint authorship, one author must accept responsibility for all correspondence; the full postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author who is to check proofs should be provided. Although the Society does not specify the length of manuscripts, it is suggested that authors preparing long texts (20 000 words or more, including references, etc.) should consult the Editor before considering submission. **Please submit your manuscript in an editable format such as .doc or .rtf. If you submit your manuscript in a non-editable format such as PDF, this will slow the progress of your paper as we will have to contact you to request an editable copy.**

Papers should conform to the following general layout:

### *Title page*

This should include title, authors, institutions and a short running title. The title should be concise but informative, and where appropriate should include mention of family or higher taxon in the form: 'Taxonomy of the oak, *Quercus* (Fagaceae)'. A subtitle may be included, but papers in numbered series are not accepted. Names of new taxa should not be given in titles.

### *Abstract*

This must be on a separate page. The abstract is of great importance as it may be reproduced elsewhere, and is all that many may see of your work. It should be about 100-200 words long and should summarize the paper in a form that is intelligible in conjunction with the title. It should not include references. The abstract should be followed by up to ten keywords additional to those in the title (alphabetically arranged and separated by hyphens) identifying the subject matter for retrieval systems. Taxonomic authorities should not be included in the Abstract.

### *Subject matter*

The paper should be divided into sections under short headings. Except in systematic hierarchies, the hierarchy of headings should not exceed three. Do not combine Results and Discussion – these should be two different sections. Herbarium vouchers provide a permanent record of the plant material studied. Vouchers should be deposited in a recognized herbarium, and numbers/information should be included in the table or list of material used. In the case of population-level studies, one voucher per population will normally be considered adequate. Authors submitting papers to the *Botanical Journal* should consult [www.ipni.org](http://www.ipni.org) or *Authors of Plant Names* edited by R.K. Brummitt and C.E. Powell (Royal Botanic Gardens, Kew, 1992; ISBN 947-643-44-3). Names of genera and species should be printed in italic; suprageneric taxon names should be in roman. Cite the author of genera and lower taxa (subgenus, section, species, etc.) on first mention in the main text. Manuscripts without author names will be returned.

Authors of plant names should follow the abbreviations of Brummitt & Powell, 1992, paying particular attention to the spacing (most do not have spaces following the full stops). These standard abbreviations can be found online at [www.ipni.org](http://www.ipni.org)

Use SI units and the appropriate symbols (mm, not millimetre;  $\mu\text{m}$ , not micron; s, not sec; Myr for million years). Use the negative index ( $\text{m}^{-1}$ ,  $\text{l}^{-1}$ ,  $\text{h}^{-1}$ ) except in cases such as 'per plant'. Avoid elaborate tables of original or derived data, long lists of species etc.; if such data are absolutely essential, consider including them as appendices or as online-only supporting information. Avoid footnotes and keep cross references by page to an absolute minimum.

Families used follow APG III (2009). See *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121. Note particularly the use of Asteraceae (not Compositae) and Fabaceae (not Leguminosae). Names of suprageneric taxa (subtribe, tribe, subfamily, family, order etc.) are plural nouns and take plural verb forms e.g. "Allioideae are", "Betulaceae comprise" etc.

Use of 'chloroplast' should be avoided when referring to plastid genome studies based on total genomic DNA extractions as other plastid types are involved. Use of 'phylogeny' should be avoided when reporting the results of an analysis (there is only one true phylogeny). Use 'phylogenetic analysis', 'phylogenetic tree' or similar. If abbreviations are used, 'species'

should be abbreviated as 'sp.' (singular) or 'spp.' (plural) and 'subspecies' should be abbreviated as 'subsp.' (singular) or 'subsp.' (plural). Higher taxonomic ranks (genus, subgenus, section etc.) should not be abbreviated. *Sensu stricto* and *sensu lato* should be abbreviated as *s.s.* and *s.l.* (in italics), respectively.

#### References

We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

In the text, give references in the following forms: 'Stork (1988) said', 'Stork (1988: 331)' where it is desired to refer to a specific page, and '(Rapport, 1983)' where giving reference simply as authority for a statement. Note that names of joint authors are connected by '&' in the text. When papers are by three authors, use all names on the first mention and thereafter abbreviate to the first name *et al.* For papers by four or more authors, use *et al.* throughout.

The list of references must include all publications cited in the text and only these. Prior to submission, make certain that all references in the text agree with those in the references section, and that spelling is consistent throughout. In the list of references, titles of periodicals must be given in full, not abbreviated. For books, give the title, place of publication, name of publisher (if after 1930), and indication of edition if not the first. In papers with half-tones, plate or figure citations are required only if they fall outside the pagination of the reference cited. References should conform as exactly as possible to one of these four styles, according to the type of publication cited.

Burr FA, Evert RF. 1982. A cytochemical study of the wound-healing proteins in *Bryopsis hypnoides*. *Cytobios* 6: 199-215.

Gould SJ. 1989. *Wonderful life: the Burgess Shale and the nature of history*. New York: W.W. Norton.

Dow MM, Cheverud JM, Rhoads J, Friedlaender J. 1987b. Statistical comparison of biological and cultural/history variation. In: Friedlaender J, Howells WW, Rhoads J, eds. *Solomon Islands project: health, human biology, and cultural change*. New York: Oxford University Press, 265-281.

Gay HJ. 1990. The ant association and structural rhizome modifications of the far eastern fern genus *Lecanopteris* (Polypodiaceae). Unpublished D. Phil. Thesis, Oxford University.

Other citations such as papers 'in press' may appear on the list but not papers 'submitted', 'in review' or 'in preparation'. These may be cited in the text as 'unpubl. data'. A personal communication may be cited in the text but not in the reference list. Please give the initials and surnames for all authors of personal communications and unpublished data.

In the case of taxonomic reviews, authors are requested to include full references for taxonomic authorities.

Give foreign language references in ordinary English alphabetic form (but copy accents in French, German, Spanish, etc.), if necessary transliterating in accordance with a recognized scheme. For the Cyrillic alphabet use British Standard BS 2979 (1958). If only a published translation has been consulted, cite the translation, not the original. Add translations not supplied by the author of the reference in square brackets.

#### *Tables*

Keep these as simple as possible, with few horizontal and, preferably, no vertical rules. When assembling complex tables and data matrices, bear the dimensions of the printed page (225 x 168 mm) in mind; reducing typesize to accommodate a multiplicity of columns will affect legibility.

#### *Illustrations*

These normally include (1) half-tones reproduced from photographs, (2) black and white figures reproduced from drawings and (3) diagrams. Use one consecutive set of Arabic numbers for all illustrations (do not separate 'Plates' and 'Text-figures' - treat all as 'Figures'). Figures should be numbered in the order in which they are cited in the text. Use upper case letters for subdivisions (e.g. Figure 1A-D) of figures; all other lettering should be lower case.

1. Half-tones reproduced from photographs
2. Increasingly, authors' original images are captured digitally rather than by conventional film photography. In these cases, please use settings on your equipment for the highest possible image quality (minimum 300dpi).

Desktop technology now allows authors to prepare plates by scanning photographic originals and then labelling them using graphics programs such as Adobe Illustrator. These are acceptable provided:

3. Resolution is a minimum of 300 dpi at the final required image size. The labelling and any line drawings in a composite figure should be added in vector format. If any labelling or line drawings are embedded in the file then the resolution must be a minimum of 800 dpi. Please note that vector format labelling will give the best results for the online version of your paper.
4. Colour images are supplied in CMYK rather than RGB mode.
5. Electronic files are saved uncompressed as TIFF or EPS files.

In the case that it is not possible to provide electronic versions, please supply photographic prints with labelling applied to a transparent overlay or to a photocopy.

Grouping and mounting: when grouping photographs, aim to make the dimensions of the group (including guttering of 2 mm between each picture) as close as possible to the page dimensions of 168 x 225 mm, thereby optimizing use of the available space. Remember that grouping photographs of varied contrast can result in poor reproduction. If supplied as photographic prints, the group should be mounted on thin card. Take care to keep the surface of the prints clean and free of adhesive. Always provide overlays to protect the photographs from damage.

Lettering and numbering: If supplied as photographic prints, letters and numbers should be applied in the form of dry-transfer ('Letraset') letters, numbers, arrows and scale bars, but not measurements (values), to transparent overlays in the required positions, rather than to the photographs themselves; this helps to avoid making pressure marks on the delicate surface of the prints, and facilitates relabelling, should this be required. Alternatively, pencilled instructions can be indicated on duplicates or photocopies marked 'FOR LABELLING ONLY'. Self-adhesive labels should be avoided, but if they are used, they should not be attached directly to either photographs or overlays, but to photocopies, to indicate where they are to be positioned. Labelling will be inserted electronically by the typesetter in due course.

Colour: Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt for paid full colour (see the Colour Work Agreement Form [here](#))\*, covering the full cost of reproduction, such that colour is used both in the hardcopy and online. In this case, legends may make reference to colour if necessary, such as for a key. If your paper is accepted and you have opted for paid full colour, we will need a completed Colour Work Agreement Form. **Colour illustrations will be published free of charge provided that the colour is deemed essential by the Editor for interpretation of the figure.**

\*Please note that we are no longer able to accept electronic or scanned copies of Colour Work Agreement Forms. Please print out the form and return a signed hard copy to the production editor at the following address: Production Editor - *Botanical Journal of the Linnean Society*, Journals Content Management, Life Sciences, Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, 9600 Garsington Road, Oxford, OX4 2DQ, UK

Black and white figures reproduced from drawings

These should be scanned at a minimum resolution of 800 dpi and supplied in TIFF format. Please note that JPEG, Powerpoint and doc files are not suitable for publication. If it is not possible to provide electronic versions, the figures supplied should be in black ink on white card or paper. Lines must be clean and heavy enough to stand reduction; drawings should be no more than twice page size. The maximum dimensions of published figures are 168 × 225 mm. Scale bars are the most satisfactory way of indicating magnification. Take account of proposed reduction when lettering drawings; if you cannot provide competent lettering, it may be pencilled in on a photocopy.

© [date] The Linnean Society of London, *Botanical Journal of the Linnean Society*

Diagrams

In most instances the author's electronic versions of diagrams are used and may be re-labelled to conform to journal style. These should be supplied as vector format Encapsulated PostScript (EPS) files. Please note that diagrams or graphs will not reproduce well in the online version of your paper unless they are in vector format due to low maximum screen resolution.

Type legends for Figures in numerical order on a separate sheet. Where a 'key' is required for abbreviations used in more than one Figure, this should be included as a section of the main text.

Authors whose manuscripts contain large phylogenies, and who feel that these cannot be represented well in the standard page format, may opt to pay for fold-out pages as part of their article (see the Fold-Out Agreement Form [here](#)). Please note that fold-out pages will be included only with the Editor's agreement.

**Authors wishing to use illustrations already published must obtain written permission from the copyright holder before submitting the manuscript.** Authors may, in the first instance, submit good xerox or photographic copies of figures rather than the originals.

Detailed instructions on preparing illustrations in electronic form are available [here](#).

Authors may be charged for alterations at proof stage (other than printer's errors) if they are numerous.

#### Supplementary Material

Authors wishing to submit material to be hosted as online supplementary material should consult the author guidelines [here](#). Authors should note that the Editor may suggest that figures, tables, and lists not deemed necessary for the understanding of the paper should be published online as supplementary material.

Please follow these guidelines carefully:

- Include all parts of the text of the paper in a single .doc or .rtf file. The ideal sequence is: (1) Header (running heads; correspondence; title; authors; addresses; abstract; additional keywords, etc.). (2) Body of article. (3) Acknowledgements. (4) References. (5) Figure Legends. (6) Tables (for each table, the legend should be placed before the body of the table). (7) Appendices.
- Include all figure legends, and tables with their legends if available.
- **Do not embed figures in the text file**
- Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph.
- Turn the hyphenation option off.
- Specify any special characters used to represent non-keyboard characters.
- Take care not to use l (ell) for 1 (one), O (capital o) for 0 (zero) or ß (German esszett) for ß (beta).

#### Copyright

Authors receiving requests for permission to reproduce work published by the Linnean Society should contact Blackwell Publishing for advice.

#### Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

