

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

**Variabilidade intraespecífica de *Herbertia quareimana*
Ravenna (Iridaceae): uma abordagem citogenética,
morfológica e ecológica**



LUANA CRESTANI DE CARVALHO

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos

Coorientadora: Dra. Eudes Maria Stiehl Alves

Porto Alegre, fevereiro de 2022

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

**Variabilidade intraespecífica de *Herbertia quareimana*
Ravenna (Iridaceae): uma abordagem citogenética,
morfológica e ecológica**

LUANA CRESTANI DE CARVALHO

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

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos

Coorientadora: Dra. Eudes Maria Stiehl Alves

Porto Alegre, fevereiro de 2022

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal do Rio Grande do Sul e realizado no Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. O projeto foi subvencionado pelo CNPq, Chamada Universal MCTI/CNPq Nº 28/2018, processo número 425650/2018-9. A mestranda obteve bolsa de estudos da CAPES (30 meses).

A meu companheiro, minha mãe, meu pai e meu irmão,
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a todos os professores pelas oportunidades de aperfeiçoamento disponibilizados durante a minha formação. Ao Elmo por sempre nos auxiliar e socorrer, literalmente.

À professora Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos, minha orientadora, por nunca desistir de mim, nem quando quebrei o braço. Tua dedicação e incentivo me fizeram ter fé em mim mesma de que eu poderia concluir essa etapa de minha vida.

À Dra. Eudes, minha coorientadora, por todas as conversas, elucidações, por tua orientação nas mais diversas questões e confiança em mim depositada.

À professora Dra. Tatiana T. de Souza-Chies por permitir a concretização dessa conversa tão bonita entre morfologia e citogenética.

Às grandes amigas com as quais o Laboratório de Citogenética Vegetal me presenteou: Ari e Carolzinha. Obrigada por todas as sessões de terapia coletiva, vocês são incríveis!

Ao MSc. Alexandre Cristante Martins por todo auxílio, disponibilidade, reuniões em horários malucos e por reacender em mim a paixão por programar.

Ao MSc. Luiz Fernando Esser pelos ensinamentos e por toda colaboração com relação às análises de Modelagem de Nicho, estando sempre disposto a encarar os mais variados desafios com os citótipos.

À minha família, especialmente meu companheiro Gustavo, meu pai André, minha mãe Celeni e meu irmão Guilherme. Vocês me ampararam quando foi necessário, mas sem deixar de me impulsionar cada vez mais. Meu eterno muito obrigada.

Se você faz sempre as mesmas coisas, por que espera resultados diferentes?

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	8
<u>ABSTRACT</u>	10
<u>INTRODUÇÃO</u>	12
<u>OBJETIVOS</u>	25
<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>1. Coleta/estratégia de amostragem</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>2. Análises citogenéticas</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>2.1 Contagem cromossômica</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>2.2 Tamanho de genoma</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>3. Análises morfométricas</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>4. Análises estatísticas</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>5. Modelagem de nicho</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>RESULTADOS</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>1. Análises citogenéticas</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>1.1 Contagem cromossômica</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>1.2 Tamanho de genoma</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>2. Análises morfométricas</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>3. Modelagem de nicho</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>DISCUSSÃO</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</u>	Erro! Indicador não definido.
<u>REFERÊNCIAS</u>	26

RESUMO

Herbertia quareimana é uma espécie herbácea com distribuição restrita a poucas localidades do bioma Pampa próximas à fronteira do Brasil com Argentina e Uruguai. Dois tipos de populações de *H. quareimana* são observados a campo: populações próximas à Fronteira-Oeste do Estado do Rio Grande do Sul com características florais e vegetativas maiores (morfotipo grande) e populações na região das Missões com morfologia aparentemente menor (morfotipo pequeno). Populações mistas contendo os dois morfotipos não foram encontradas até o momento. Análises citogenéticas preliminares realizadas pelo grupo de pesquisa indicavam a existência de plantas diploides em *H. quareimana* nas Missões, em adição ao citótipo tetraploide (morfotipo grande) já descrito na literatura. A existência de variação intraespecífica em nível de ploidia é um evento comum em Iridaceae e outros grupos de plantas. A poliploidia pode resultar em diferenças morfológicas e ecológicas, com reflexo na taxonomia. Assim, o presente estudo tem como objetivo responder aos seguintes questionamentos: i) existem realmente dois morfotipos distintos de *H. quareimana*? ii) há alguma relação entre essa diferença morfológica e o nível de ploidia? iii) o que poderia explicar a separação geográfica entre eles? Para atingir esse objetivo, foi utilizado um conjunto de abordagens que contemplaram técnicas de citogenética, análise morfométrica e de modelagem de nicho. Contagem cromossômica e citometria de fluxo foram empregadas para acessar o nível de ploidia de indivíduos pertencentes tanto ao morfotipo pequeno quanto ao morfotipo grande. Para a análise morfométrica foram examinados 22 caracteres florais e 23 vegetativos e estatística univariada e multivariada foi empregada para acessar a variação. Modelagem de nicho foi realizada para investigar a distribuição de *H. quareimana*, através de uma abordagem focada em *machine learning*, gerando modelos de distribuição para cada citótipo e para a espécie. As análises citogenéticas revelaram a existência de um citótipo diploide que corresponde ao morfotipo pequeno e confirmaram o citótipo tetraploide já previamente reportado na literatura (morfotipo grande). Não foram observadas populações mistas para os dois níveis de ploidia em nenhuma das amostragens investigadas. Os resultados das análises morfométricas foram consistentes com as observações a campo e identificaram dois grupos morfológicos bastante distintos: um somente com indivíduos pequenos (diploides) e outro somente com indivíduos grandes (tetraploides). Além disso, a análise estatística mostrou que os níveis de ploidia de *H. quareimana* podem ser identificados através de nove caracteres

florais. A análise dos dados geográficos disponíveis para *H. quareimana* mostrou que os citótipos encontram-se segregados geograficamente: populações diploides ocorrem na região noroeste do Rio Grande do Sul (na região das Missões) e populações tetraploides são encontradas no sudoeste do Rio Grande do Sul (compreendendo a região da Campanha). Esse resultado foi validado pela modelagem de nicho: foi verificado que os citótipos ocupam nichos distintos, com áreas de probabilidade de ocorrência com abrangência distinta entre os níveis de ploidia. As estratégias de análise empregadas no presente estudo permitiram confirmar a existência de dois citótipos em *Herbertia quareimana*, bem como evidenciaram que o nível de ploidia impacta na morfologia e na ecologia do organismo em questão. Esses resultados contribuem para um melhor entendimento sobre os limites de espécie em *H. quareimana* e sugerem novas perspectivas para hipóteses evolutivas. Ainda, os resultados de modelagem podem também ser úteis como subsídio em uma futura revisão do status de conservação da espécie.

PALAVRAS-CHAVE: caracteres morfológicos, citometria de fluxo, citótipos, modelagem de nicho, morfometria, número cromossômico, Pampa, poliploidia, Tigridieae, variação morfológica.

ABSTRACT

Herbertia quareimana is an herbaceous species with distribution restricted to a few localities in the Pampa biome near the border of Brazil with Argentina and Uruguay. Two types of populations of *H. quareimana* are observed in the field: populations close to the Fronteira-Oeste of the State of Rio Grande do Sul with larger floral and vegetative characteristics (large morphotype) and populations in the Missões region with apparently smaller morphology (small morphotype). Mixed populations containing both morphotypes have not been found so far. Preliminary cytogenetic analyzes carried out by the research group indicated the existence of diploid plants in *H. quareimana* in the Missões, in addition to the tetraploid cytotype (large morphotype) already described in the literature. The existence of intraspecific variation at the ploidy level is a common event in Iridaceae and other plant groups. Polyploidy can result in morphological and ecological differences, with an impact on taxonomy. Thus, the present study aims to answer the following questions: i) are there really two distinct morphotypes of *H. quareimana*? ii) is there any relationship between this morphological difference and the ploidy level? iii) what could explain the geographical separation between them? To achieve this goal, a set of approaches was used that included cytogenetic, morphometric analysis and niche modeling techniques. Chromosome counting and flow cytometry were used to assess the ploidy level of individuals belonging to both the small and large morphotypes. For the morphometric analysis, 22 floral and 23 vegetative characters were examined and univariate and multivariate statistics were used to assess the variation. Niche modeling was performed to investigate the distribution of *H. quareimana*, through a machine learning approach, generating distribution models for each cytotype and for the species. Cytogenetic analyzes revealed the existence of a diploid cytotype that corresponds to the small morphotype and confirmed the tetraploid cytotype previously reported in the literature (large morphotype). Mixed populations were not observed for the two ploidy levels in any of the investigated samples. The results of the morphometric analyzes were consistent with the field observations and identified two very distinct morphological groups: one with only small individuals (diploid) and the other with only large individuals (tetraploid). Furthermore, the statistical analysis showed that the ploidy levels of *H. quareimana* can be identified through nine floral characters. The analysis of the geographic data available for *H. quareimana* showed that the cytotypes are geographically segregated: diploid populations occur in northwestern Rio

Grande do Sul (in the Missões region) and tetraploid populations are found in southwestern Rio Grande do Sul (comprising the Campanha region). This result was validated by niche modeling: it was verified that the cytotypes occupy distinct niches, with areas of probability of occurrence with different coverage between ploidy levels. The analysis strategies employed in the present study allowed us to confirm the existence of two cytotypes in *Herbertia quareimana*, as well as showing that the level of ploidy impacts the morphology and ecology of the organism in question. These results contribute to a better understanding of species boundaries in *H. quareimana* and suggest new perspectives for evolutionary hypotheses. Furthermore, the modeling results may also be useful as input in a future review of the conservation status of the species.

KEYWORDS: chromosome number, cytotypes, flow cytometry, morphological characters, morphological variation, morphometry, niche modeling, Pampa, polyploidy, Tigridaeae.

INTRODUÇÃO

1. Poliploidia

A poliploidia é a condição hereditária em que o organismo possui mais de dois conjuntos completos de cromossomos, resultado da duplicação do genoma inteiro (WGD ou Whole Genome Duplication). Este é um mecanismo considerado de grande importância na evolução das plantas uma vez que possibilita o aumento da diversidade genética (SOLTIS *et al.*, 2009; JIAO *et al.*, 2011; GLENNON *et al.*, 2014; VAN DE PEER *et al.*, 2017, 2021; BANIAGA *et al.*, 2019). Estima-se que a poliploidia esteja envolvida na origem de um grande número de espécies, variando de 15 a 80% das angiospermas, dependendo do estudo (MASTERSON, 1994; LEITCH e BENNETT, 1997; WOOD *et al.*, 2009; RICE *et al.*, 2019).

Os poliploides podem ser estáveis, especialmente quando estes apresentam um número par de conjuntos cromossômicos, sendo a tetraploidia (quatro conjuntos) o nível de ploidia mais comum (COMAI, 2005; KUSHWAH *et al.*, 2018; QU *et al.*, 2021). Esta estabilidade é importante, pois a formação de gametas não-balanceados, aqueles com cromossomo(s) extra(s) ou faltante(s), diminui a probabilidade de estabelecimento dos poliploides.

Os poliploides podem ser classificados de acordo com sua origem em autopoliploides ou aloploploides. São denominados autopoliploides aqueles poliploides que surgem dentro de uma única espécie como resultado da duplicação de um conjunto de cromossomos; os aloploploides são aqueles que surgem através da fusão dos conjuntos de cromossomos de diferentes espécies (hibridação) e subsequente duplicação (VAN DE PEER, 2017).

A determinação do nível de ploidia de uma dada espécie ou conjunto de espécies é muito importante sendo o método mais preciso para isso a contagem do número de cromossomos mediante análises mitóticas ou meióticas. Outro método que vem sendo largamente utilizado atualmente para inferir o nível de ploidia é a estimativa do tamanho do genoma através da citometria de fluxo (DOLEŽEL *et al.*, 2007; TE BEEST *et al.*, 2012). Embora seja um método bastante rápido e eficiente, é fundamental o conhecimento prévio relativo aos números cromossômicos do taxa em questão, a fim de melhor interpretação dos dados.

A poliploidia pode acarretar em aumento nuclear e celular, irregularidades meióticas e mitóticas tais como a produção de células aneuploides (com cromossomo/s extra/s ou

faltante/s) e instabilidade epigenética que pode impactar na regulação e expressão gênica, podendo ainda trazer impactos no sistema reprodutivo, como a perda da auto-incompatibilidade e ganho de reprodução assexuada (COMAI, 2005; TE BEEST *et al.*, 2012; MORGAN *et al.*, 2020). Quando há isolamento reprodutivo em relação aos parentais diploides, os poliploides recém-formados precisam encontrar parceiros poliploides para se reproduzir em um ambiente onde geralmente estão rodeados por diploides, sendo necessário superar a exclusão dos citótipos minoritários para que se mantenham (VAN DE PEER *et al.*, 2017).

Por outro lado, a poliploidia traz diversas alterações que representam vantagens adaptativas aos organismos. A duplicação do genoma resulta em redundância gênica que pode trazer benefícios importantes, como o mascaramento do efeito deletério de alelos recessivos por alelos dominantes ou servir de matriz para a diversificação gênica, com eventos de neofuncionalização (VAN DE PEER, 2017). Também alterações em nível de expressão gênica em termos temporais e/ou espaciais, bem como, subfuncionalização (CLARK e DONOUGHUE, 2018; WENDEL *et al.*, 2018). Tem sido observado que tais alterações podem levar ao aumento da tolerância a uma gama mais ampla de condições ecológicas e ambientais (tolerância à estresse), resultando na separação de nicho dos parentais diploides e tamanho da população, aumento dos órgãos das plantas, proteção contra mutações deletérias, aumento da heterozigosidade e do vigor híbrido (SATLER *et al.*, 2016; VAN DE PEER *et al.*, 2017; QIU e KÖHLER, 2021).

Tem sido observado que várias características reprodutivas podem diferir significativamente em virtude da duplicação do genoma, como os tamanhos relativos e relações espaciais dos órgãos florais (DE BOTT *et al.*, 2005) e a fenologia. Níveis de ploidias distintos podem diferir quanto ao início do período de floração, sua duração e tempo de desenvolvimento da planta (CORNEILLIE *et al.*, 2019). Também a fertilidade pode ser impactada em termos de produção de sementes, sua viabilidade e germinabilidade (CORNEILLIE *et al.*, 2019). Todas essas características podem resultar em uma diferenciação de nicho ecológico entre os diploides e os poliploides. Em outras palavras, a poliploidia, por vários caminhos, pode levar à especiação (OTTO e WHITTON, 2000; VAN DE PEER *et al.*, 2017; MEUDT *et al.*, 2019).

Eventos de poliplodia estão diretamente relacionados a momentos decisivos na história evolutiva das plantas, como importantes transições evolutivas, grandes saltos no desenvolvimento e/ou radiações adaptativas de espécies, bem como podem afetar a interação

com polinizadores, assim, sugerindo que a poliploidia tenha seu papel na especiação adaptativa (DE BODT *et al.*, 2005; FAWCETT *et al.*, 2009; REZENDE *et al.*, 2020).

2. ***Herbertia* Sweet: um gênero de Iridaceae**

Pertencente à Asparagales (APG IV, 2016), Iridaceae é constituída de sete subfamílias reconhecidas, sendo elas: Isophysidoideae, Patersonioideae, Geosiridoideae, Aristeoideae, Nivenioideae, Crocoideae e Iridoideae. A família possui mais de 2.000 espécies distribuídas dentre 65 a 75 gêneros (GOLDBLATT *et al.*, 2008).

Iridaceae possui uma distribuição cosmopolita, sendo o sul da África um de seus centros de diversidade uma vez que é o local de ocorrência de mais da metade das espécies. A segunda zona de maior riqueza encontra-se no Hemisfério Sul, onde existe uma grande ocorrência de espécies na região Neotropical, muitas delas endêmicas (GOLDBLATT *et al.*, 2008; GOLDBLATT e MANNING, 2008). Possui espécies utilizadas como plantas ornamentais e como flores de corte, especialmente os gêneros *Iris* L., *Gladiolus* L., *Belamcanda* Adans. e *Freesia* Eckl. ex Klatt (SINGAB *et al.*, 2016). Na economia, *Crocus sativus* L. (a fonte do açafrão) e *Iris* (raiz de orris) são considerados os mais importantes representantes da família (GLIMN-LACY e KAUFMAN, 2006).

Possuindo pelo menos 900 espécies e representando cerca de 40% da riqueza de espécies em Iridaceae (GOLDBLATT e MANNING, 2008), Iridoideae é a única subfamília com representantes no Brasil (EGGERS *et al.*, 2020). Iridoideae é subdividida atualmente, com base em sequências plastidiais, em cinco tribos: Diplarreneae, Iridaeae, Sisyrinchieae, Trimezieae e Tigrídieae (GOLDBLATT *et al.*, 2008) (Figura 1). Dessas, três tribos são encontradas na América do Sul, Sisyrinchieae, Tigrídieae e Trimezieae (GOLDBLATT e MANNING, 2008; GOLDBLATT *et al.*, 2008).

No Brasil, as espécies de Iridaceae concentram-se principalmente nas regiões Sul e Sudeste, com forte representatividade na flora dos biomas Pampa, Mata Atlântica e Cerrado. São 26 gêneros abarcando 212 espécies, das quais 115 são endêmicas (EGGERS *et al.*, 2020), indicando que o Brasil seja provavelmente o maior centro de diversificação de Iridaceae no continente americano. A região sul do país conta com o maior número de espécies, 116. O Rio Grande do Sul é o Estado com maior número de espécies (91) e o Pampa o terceiro maior bioma com 61 espécies (EGGERS *et al.*, 2020; LIZARAZO, 2019).

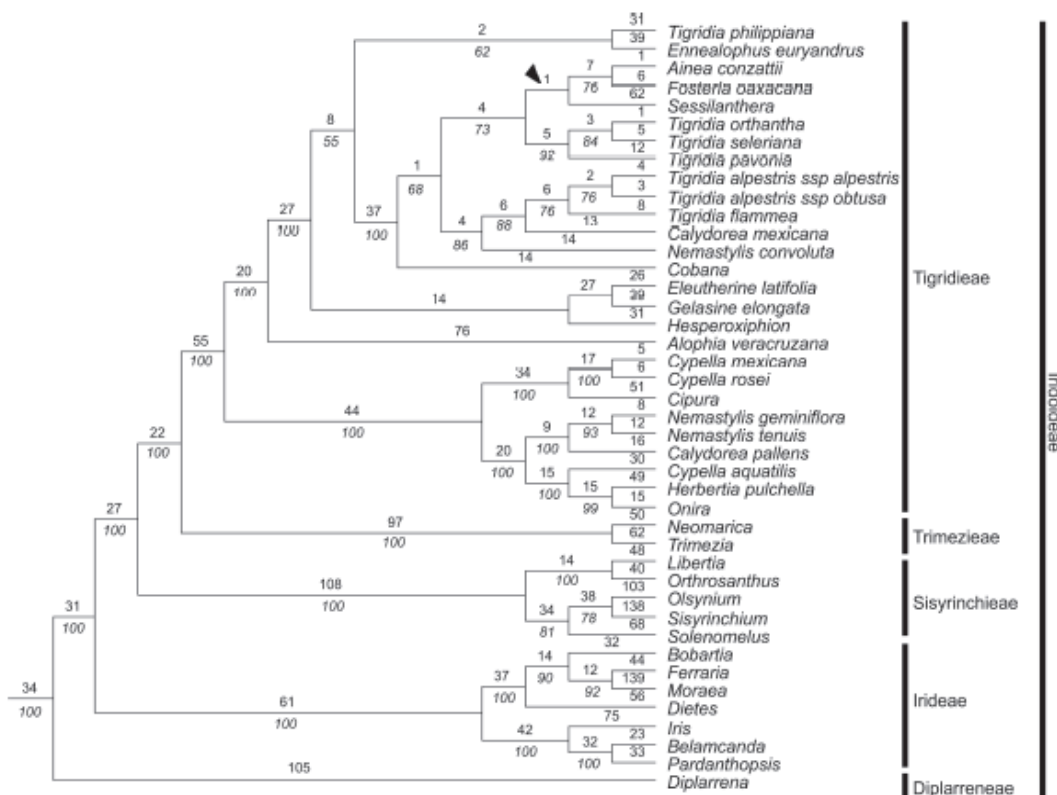


Figura 1: Árvore filogenética da subfamília Iridoideae, destacando as cinco tribos: Diplarreneae, Irideae, Sisyrrinchieae, Tigridae e Trimezieae. Modificado de Goldblatt et al. (2008).

A tribo Tigridae compreende de 15 a 20 gêneros e 172 espécies, divididos em dois cladogramas principais que são formalmente chamados de Clado A e Clado B (CHAUVEAU *et al.*, 2012). No sul do Brasil são encontrados nove gêneros (EGGERS *et al.*, 2020), a saber *Calydorea* Herb., *Catila* Ravenna, *Cypella* Herb., *Eleutherine* Herb., *Gelasine* Herb., *Herbertia* Sweet, *Kelissa* Ravenna, *Onira* Ravenna e *Phalocallis* Herb.

Tigridae é considerada uma tribo taxonomicamente complexa. Há grande variação na cor, forma e estrutura das flores, mas essas são muito efêmeras e preservam-se precariamente como espécimes de herbário (RODRIGUEZ e SYTSMA, 2006). Há também descrições superficiais e com falta de caracteres diagnósticos. Somando-se todos esses fatores, o resultado foi uma taxonomia confusa do grupo e o estabelecimento de 40 gêneros distintos, vários deles monotípicos (RODRIGUEZ e SYTSMA, 2006). Em 1990 Goldblatt propôs que Tigridae fosse dividida em Cipurinae e Tigridiinae. Essa divisão foi parcialmente refutada por Chauveau e colaboradores em 2012, quando publicaram uma filogenia que demonstrou a tribo subdividida em dois cladogramas denominados A e B, como mencionado anteriormente (Figura 2).

Essa é uma família bastante variável em nível de ploidia e número cromossômico básico (x), sendo o número básico ancestral para a família $x = 10$ (KENTON e HEYWOOD, 1984; MORAES *et al.*, 2015, BURCHARDT *et al.*, 2018). É comum nos membros da família que ocorrem no Hemisfério Norte a neoploidia (relativa à poliploidia infragenérica), sendo estimada sua ocorrência em cerca de 60% das espécies (GOLDBLATT e TAKEI, 1997). Eventos recorrentes de poliploidia são bastante comuns, o que resulta em uma variação na família de $2n = 6$ até $2n = 230$ (ALVES *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2015).

Outro fenômeno importante na evolução cariotípica de Iridaceae é a disploidia. A disploidia é o aumento ou o decréscimo gradual no número cromossômico haploide (n) originada de rearranjos estruturais. Diferentemente da aneuploidia, onde a mudança do número cromossômico se deve à segregação irregular na divisão celular com consequente perda ou ganho de cromossomos, na disploidia a alteração se deve especialmente a eventos de fusão e fissão cromossômica.

A diversidade de números básicos dentro de alguns gêneros dessa família é causada por eventos de poliploidia e disploidia, resultando em números básicos secundários tais como $x_2 = 5, 7, 8, 9, 11, 12$ e 14 (GOLDBLATT e TAKEI, 1997; MORAES *et al.*, 2015).

Aproximadamente 10% das espécies de Iridoideae são poliploides e 10% das demais espécies possuem tanto populações diploides como poliploides. Nesse sentido, observa-se a importância da poliploidia na evolução das Iridáceas das Américas do Sul e Central, onde grande parte das espécies já investigadas da tribo Tigridieae são tetraploides e hexaploides (GOLDBLATT e TAKEI, 1997; SOUZA-CHIES *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2015, BURCHARDT *et al.*, 2018).

Em Tigridieae o número básico é relativamente uniforme (KENTON e HEYWOOD, 1984) com a maioria das espécies apresentando $x = 7$ (GOLDBLATT, 1982), exceto para o gênero *Eleutherine* Herb., para *Gelasine elongata* (Graham) Ravenna com $x = 6$ e para *Phalocallis coelestis* (Lehm.) Ravenna com $x = 5$ (KENTON e RUDALL, 1987; MORAES *et al.*, 2015). Moraes *et al.* (2015), usando dados citogenéticos dentro de uma abordagem filogenética elucidaram algumas questões relativas à evolução do número básico para Iridoideae. Foi sugerido o número básico ancestral $x = 8$ para a subfamília, $x = 9$ para Sisyrinchieae, $x = 7$ para Tigridieae (em conformidade com o que foi proposto por Goldblatt em 1982) e $x = 14$ para Trimezieae. Observando os demais resultados é possível notar que séries poliploides intragenéricas e intraespecíficas são comuns, principalmente no clado A de

Tigridieae e parecem ser especialmente importantes clado B de Tigridieae e em Trimezieae.

Assim como a maior parte dos gêneros da tribo Tigridieae, *Herbertia* possui um único número cromossômico básico $x = 7$. Para seis das oito espécies aceitas no gênero existem contagens cromossômicas realizadas, sendo reportados quatro níveis de ploidia: $2x$, $4x$, $6x$ e $8x$ (KENTON e HEYWOOD, 1984; GOLDBLATT e TAKEI, 1997; MORENO *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2015). Além disso, séries poliploides intraespecíficas foram descritas para *H. lahue* ($2n = 14$, 42 e 56) e *H. pulchella* Sweet ($2n = 14$ e 28) (MORAES *et al.*, 2015).

A estimativa de tamanho de genoma por citometria de fluxo está se tornando cada vez mais difundida devido à sua aplicabilidade. Os dados de conteúdo de DNA além de serem frequentemente usados para inferir níveis de ploidia (PELLICER e LEITCH, 2014), vêm sendo empregados na elucidação de questões evolutivas dos mais diversos taxa. Estimativas de tamanho de genoma podem integrar e enriquecer as análises filogenéticas (DOLEŽEL *et al.*, 2007; MORAES *et al.*, 2015; BURCHARDT *et al.*, 2018; BAINARD *et al.*, 2020; MOEGLEIN *et al.*, 2020; CHOI *et al.*, 2020), bem como serem empregadas dentro de uma abordagem ecológica de modelagem de nicho.

De acordo o Plant DNA C-Values Database o tamanho médio de genoma para Iridaceae é de $2C = 11,31$, variando de 1,0 até 62,70 pg (LEITCH *et al.*, 2019). Em *Herbertia*, os valores variam de $2C = 4,13$ a $2C = 15,43$ pg, tendo *H. quareimana* um conteúdo $2C$ de 8,70 pg para indivíduos com $2n = 28$ (MORAES *et al.*, 2015).

4. Um pouco mais sobre *Herbertia*

Conhecido popularmente como “Bibi”, *Herbertia* é integrante do clado A de Tigridieae (Figura 2) (CHAUVEAU *et al.*, 2012), sendo composto por oito espécies (DEBLE e ALVES, 2013) de plantas herbáceas, bulbosas, perenes e sazonais, com poucas folhas. *Herbertia* apresenta plantas com flores que variam de lilás a violeta ou são brancas (EGGERS, 2020), são polinizadas por insetos e estão presentes naturalmente em áreas de campo aberto no sul da América do Sul (STIEHL-ALVES, 2013). Essas plantas possuem grande semelhança vegetativa. Contudo, algumas exibem elevado polimorfismo floral, tornando possível o reconhecimento das espécies através da flor.

Quanto à distribuição geográfica, este gênero engloba desde espécies restritas ao bioma Pampa, como a *H. darwinii* Roitman & J. A.Castillo, até espécies de distribuição mais

abrangente como a *H. lahue* (Molina) Goldblatt, que é encontrada nos três Estados da região Sul do Brasil, na Argentina, Uruguai, Paraguai e Chile (EGGERS, 2020). *Herbertia quareimana* Ravenna, foco do presente estudo, é encontrada no sul do Rio Grande do Sul, Uruguai e no centro leste da Argentina (EGGERS, 2020) e atualmente é avaliada como quase ameaçada de extinção (NT). Enquanto isso, *H. furcata*, assim como *H. darwinii* são classificadas como “em perigo” e *H. zebrina* está categorizada como “criticamente em perigo” (Tabela 1) (SEMA, 2014).

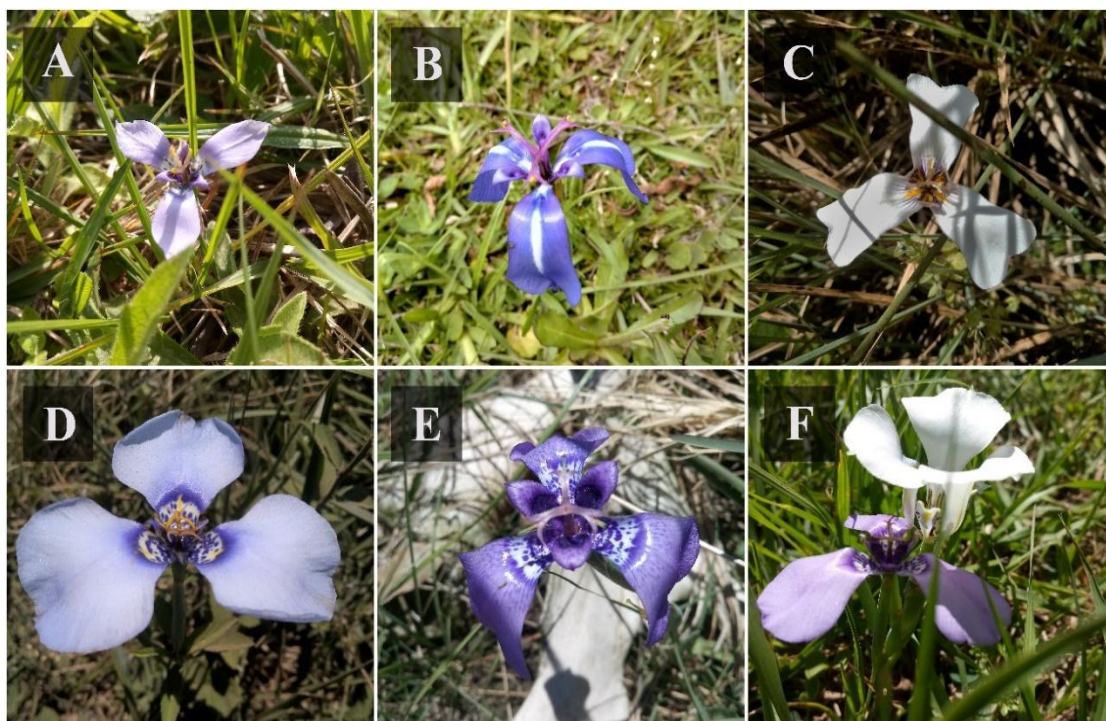


Figura 3. Algumas das espécies de *Herbertia* ilustrando a diversidade do gênero: (A) *Herbertia lahue* (6x); (B) *H. pulchella*; (C) *H. zebrina*; (D) *H. quareimana* (morfolito pequeno); (E) *H. quareimana* (morfolito grande); e, (F) *H. quareimana* (morfolito pequeno) ao lado de *Cypella hauthalii* (Kuntze) R.C.Foster. Fotos: Luana Carvalho.

Tabela 1. Padrões de distribuição geográfica e status de conservação das oito espécies de *Herbertia*.

Espécie	Distribuição geográfica	Status de Conservação	Regiões de ocorrência
<i>H. amabilis</i> Deble & F. S. Alves	Endêmica	Não avaliado, provavelmente Criticamente em Perigo (CR)	Rio Grande do Sul (provavelmente restrita à Depressão Central)
<i>H. darwinii</i> Roitman & J.A.Castillo	Restrita	Em Perigo (EN)	Fronteira do Rio Grande do Sul com Argentina e Uruguai
<i>H. furcata</i> (Klatt) Ravenna	Endêmica	Em Perigo (EN)	Fronteira do Rio Grande do Sul com Argentina
<i>H. lahue</i> (Molina) Goldblatt	Ampla	Não avaliado	Sul do Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Chile
<i>H. pulchella</i> Sweet	Restrita	Não avaliado, provavelmente Em Perigo	Rio Grande do Sul e Uruguai
<i>H. quareimana</i> Ravenna	Restrita	Quase ameaçada (NT)	Fronteira do Rio Grande do Sul com Argentina e Uruguai
<i>H. tigridioides</i> (Hicken) Goldblatt	Provavelmente endêmica	Não avaliado	Província de Tucumán, Argentina
<i>H. zebrina</i> Deble	Endêmica	Criticamente em Perigo (CR)	Rio Grande do Sul (restrita à Serra do Sudeste)

Notas: ¹ Status de conservação conforme decreto Nº 52.109, de 1º de dezembro de 2014 publicado pela Assembleia Legislativa do estado do Rio Grande do Sul.

5. Morfometria

Tradicionalmente, a identificação das espécies depende fortemente de caracteres morfológicos. Em plantas, os caracteres morfológicos são avaliados a partir de medidas, formas e cores das flores, das folhas, do pólen, do caule, enfim, de tudo que possa caracterizá-las (HAIDER, 2018). Contudo, as espécies compõem um sistema complexo e possuem relações multidimensionais com seu próprio ambiente e outras espécies. Para melhor entender esse sistema, é benéfico utilizar dados morfológicos integrados a dados genéticos, demandas ecológicas, preferência de nicho, entre outros (RAJEI, 2015; ERST *et al.*, 2020, LUCEÑO *et*

al., 2021).

Estudos de caracteres morfológicos (florais e vegetativos) têm sido bastante proveitosos na investigação e delimitação de citótipos. Em 1999, Keeler e Davis relacionaram o citótipo nonaploide ($2n = 9x = 90$) de *Andropogon gerardii* Vitman a um morfotipo maior e mais alto quando comparado com o morfotipo hexaploide ($2n = 6x = 60$). De lá para cá, tem aumentado os estudos que relacionam positivamente caracteres morfológicos a séries poliploides (PADOAN *et al.*, 2013; SINSKI *et al.*, 2014; CHANSLER *et al.*, 2016; MCCARTHY *et al.*, 2016; MUÑOZ-PAJARES *et al.*, 2018; SILBERNAGL e SCHÖNSWETTER, 2019).

Em Iridaceae, essa abordagem se mostra bastante promissora. Estudos demonstram que muito mais que variar em tamanho total, os poliploides da família apresentam variação mais expressiva nas flores (TACUATIÁ *et al.*, 2012; STIEHL-ALVES *et al.*, 2016; FACHINETTO *et al.*, 2017). Assim, a utilização de abordagens morfométricas poderia ser bastante informativa e esclarecedora em nosso estudo.

6. Modelagem de nicho

Fatores abióticos, tais como temperatura e precipitação, desempenham um papel fundamental na distribuição de espécies e na biodiversidade (CASTRO *et al.*, 2020). Unindo esses fatores abióticos com a distribuição geográfica, surgem os modelos de nicho ambiental, os quais são gerados através da combinação de dados de ocorrência de espécies com camadas de dados ambientais (obtidos a partir de um sistema de informação geográfica). Modelos de nicho vem sendo utilizados para responder a questões de evolução de nicho, especiação e acúmulo de diversidade ecológica dentro de clados (WARREN *et al.*, 2008, HUANG *et al.*, 2017; MUÑOZ-PAJARES *et al.*, 2018; BOSCH *et al.*, 2019; SILBERNAGL e SCHÖNSWETTER, 2019).

É fundamental conhecer bem a distribuição de espécies endêmicas, assim como a paisagem bioclimática associada às mesmas. Nesse sentido, estudos que fazem uso da modelagem de nicho e de distribuição têm se mostrado muito importantes (SEGATTO *et al.*, 2017; FLORES-TOLENTINO *et al.*, 2019), não apenas como forma de caracterizar a adequação e probabilidade de ocorrência das espécies, mas também auxiliando na avaliação de risco de extinção e no estabelecimento de estratégias de conservação dessas espécies (GILS

et al., 2012; SOHN *et al.*, 2013; ALENCAR *et al.*, 2015; SRINIVASULU *et al.*, 2021). Esses estudos são valiosos uma vez que podem auxiliar na busca de estratégias para a preservação do Bioma Pampa, sabidamente possuidor de elevado índice de endemismo (BOLDRINI, 2020). Contudo, a literatura é ainda escassa (SEGATTO *et al.*, 2017; PEDRANA *et al.*, 2018).

Em Iridaceae existe apenas um estudo utilizando de modelagem de nicho (ALENCAR *et al.*, 2015). No estudo, foi investigada *Calydorea crocoides* Ravenna, uma espécie ameaçada de extinção típica das regiões serranas do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (EGGERS e CHAUVEAU, 2020). Através da modelagem de nicho foi possível identificar a distribuição potencial focada em habitats adequados para a espécie, contribuindo assim para o entendimento da evolução do taxa e permitindo a sugestão da atualização do status de conservação a qual passou de “menor preocupação” para “vulnerável” na Lista Vermelha (IUCN).

A modelagem de nicho pode também ser empregada em estudos de poliploidia. Níveis mais altos de ploidia podem resultar em nicho ecológico mais amplo e maior tolerância a condições mais extremas, o que pode levar a diferentes nichos e segregação espacial. Isso foi demonstrado recentemente por Decanter e colaboradores (2020) em *Saxifraga rosacea* Moench, onde a temperatura média anual adequada para os hexaploides é mais alta do que para de octoploides, assim como maior tolerância à geada entre os octoploides. Também Castro e colaboradores (2020) verificaram que para o tetraploide de *Jasione maritima* var. *sabularia* (Cout.) Sales & Hedge as mudanças nos requisitos ambientais podem ter permitido que ele se espalhasse em habitats não favoráveis ao seu progenitor diploide. Tetraploides e hexaploides de *Eutrema edwardsii* R. Br. foram avaliados quanto ao nicho e verificou-se que o tetraploide possuía um nicho mais estreito em comparação do hexaploide, este com uma adequação maior a diferentes ambientes (MASTIN *et al.*, 2018).

7. Por que estudar *Herbertia quareimana*?

Descrita em 1989, as plantas desta espécie apresentam flores com coloração violeta viva e escura. Diferenciam-se das demais espécies do gênero pela presença anteras retas, lâmina das tépalas externas amplamente obovadas e divisões secundárias dos estiletos recurvadas.

O modo como as plantas se reproduzem tem efeito direto na estrutura genética das populações, uma vez que determinará o fluxo gênico entre as populações da espécie. Stiehl-

Alves e colaboradores (2017) realizaram experimentos a fim de investigar o modo de reprodução dessa espécie com tratamentos de autopolinização autônoma, autopolinização manual e polinização cruzada manual. *Herbertia quareimana* foi definida como uma espécie auto-incompatível e, portanto, alógama. Nesse artigo também foi realizada uma análise de ISSR. Essa análise identificou que *H. quareimana* apresenta a maior parte da variabilidade genética distribuída dentro de populações (66%) e diferenciou-a geneticamente dos dois outros grupos (*H. darwinii* e *H. pulchella*).

Atualmente sabe-se que *H. quareimana* é uma espécie endêmica do Pampa (ou Campos Sulinos). Sua distribuição é descrita para os campos de Artigas no Uruguai e em Quaraí no Rio Grande do Sul, sendo que nessa última localidade ela cresce junto à *H. lahue* (Ravenna, 1989). A distribuição atual de *H. quareimana* inclui a região das Missões, em municípios como Entre-Ijuís, São Borja, São Nicolau, Santo Antônio das Missões e São Miguel das Missões) e em municípios da Fronteira Oeste (Alegrete, Uruguaiana e Barra do Quaraí). Em praticamente todas estas áreas a espécie cresce com a presença de outras espécies de Iridaceae (STIEHL-ALVES *et al.*, 2017).

Durante incursões em campo de nosso grupo foi observada a ocorrência de populações de *H. quareimana* cujas plantas apresentavam diferenças morfológicas evidentes, principalmente quanto ao porte das plantas e tamanho das flores (STIEHL-ALVES, dados não publicados). Aparentemente, há uma distribuição disjunta das populações dos dois tipos morfológicos, com as plantas de porte maior ocorrendo na Fronteira Oeste enquanto os indivíduos menores são encontrados apenas em populações na região das Missões. Populações mistas com plantas dos dois morfotipos ainda não foram localizadas, apesar de intenso esforço de coleta empregado até o momento.

Herbertia quareimana é uma espécie tetraploide ($2n = 4x = 28$) cujo tamanho de genoma é de $2C = 8,70$ pg (RAVENNA, 1989; MORENO *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2015). Até o momento, não foram reportados outros citótipos ou uma série poliploide para *H. quareimana*, como já descrita para outras espécies do gênero. Entretanto, análises preliminares de indivíduos reconhecidos como afins à *H. quareimana* indicam a existência de diploides $2n = 2x = 14$ (dados não publicados). Aparentemente, estes putativos diploides de *H. quareimana*, diferem dos tetraploides quanto às dimensões dos caracteres morfológicos florais e vegetativos.

Tendo em vista variação morfológica observada para *H. quareimana*, a ocorrência disjunta dos morfotipos e a possível existência de dois níveis de ploidias, nossa hipótese para

esse estudo é essa espécie possui indivíduos diploides e tetraploides, os quais podem ser distinguidos a partir de caracteres morfológicos, especialmente aqueles relacionados ao tamanho de estruturas florais. Além disso, com base nos dados de distribuição geográfica obtidos até então, acreditamos que tais citótipos não ocorrem em simpatria, estando geograficamente e, presumivelmente, ecologicamente separados.

Justificativa

Assim, surgem perguntas:

- i) existem realmente dois morfotipos distintos de *H. quareimana*?
- ii) há alguma relação entre essa diferença morfológica e o nível de ploidia?
- iii) o que poderia explicar a separação geográfica entre eles?

Com base no que foi apresentado, este trabalho busca caracterizar morfometricamente *H. quareimana* a fim de confirmar a existência de dois morfotipos e sua possível relação com o nível de ploidia. O presente estudo se propõe ainda, a buscar subsídios que possam explicar a distribuição disjunta dos morfotipos.

Atualmente, *H. quareimana* apresenta o status de espécie “quase ameaçada de extinção” (NT) ou B1ab (iii) (SEMA, 2014), porém sua conservação requer a elucidação dessas lacunas de conhecimento, as quais trarão informações relevantes não apenas para a compreensão da diversidade dessa espécie geófita de campos sulinos, mas também fornecer subsídios para sua preservação.

OBJETIVOS

O presente estudo tem por objetivo entender e descrever a diversidade de *H. quareimana*, através de uma abordagem multidisciplinar, visando uma melhor compreensão não só do taxon, mas também buscando informações que possam contribuir para um maior entendimento a respeito da evolução e diversificação do gênero *Herbertia*. Para atingir tal objetivo, serão empregadas análises citogenéticas, morfométricas e de modelagem de nicho.

Objetivos específicos

- a) Confirmar a existência de populações de plantas diploides, bem como sua distribuição geográfica;
- b) Determinar número cromossômico e estimar o tamanho de genoma de indivíduos de diferentes populações ao longo da distribuição geográfica da espécie;
- c) Realizar análises de morfometria a fim de delimitar os morfotipos e elucidar sua relação com os citótipos;
- d) Revisar a distribuição geográfica de *H. quareimana* a partir de coletas a campo e bancos de dados;
- e) Analisar a distribuição de *H. quareimana* através da modelagem de distribuição de espécies, levando em consideração o nível de ploidia.

REFERÊNCIAS

- Alencar, Juliana e Kaltchuk-Santos, Eliane e Fachinetto, Juliana e Tacuatiá, Luana e Forni-Martins, Eliana e Stiehl-Alves, Eudes e Chies, Tatiana. (2018). Genetic and ecological niche modeling of *Calydorea crocoides* (Iridaceae): an endemic species of Subtropical Highland Grasslands. *Genetics and Molecular Biology*. 41. 327-340. 10.1590/1678-4685-gmb-2017-0078.
- Alves LIF, Lima SAA and Felix LP (2011) Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil. *Genet Mol Biol* 34:259-267.
- Baeza, C. M., G. Kottirsch, J. Espejo e R. Reinoso. (2001) Recuento cromosomicos en plantas que crecen en Chile. I. *Gayana, Bot.* 58(2): 133–137.
- Bainard JD, Newmaster SG, Budke JM. 2020. Genome size and endopolyploidy evolution across the moss phylogeny. *Ann Bot. Mar* 29;125(4):543-555. doi: 10.1093/aob/mcz194. PMID: 31777923; PMCID: PMC7102977.
- Baniaga, A.E., Marx, H.E., Arrigo, N. and Barker, M.S. (2020), Polyploid plants have faster rates of multivariate niche differentiation than their diploid relatives. *Ecol Lett*, 23: 68-78. <https://doi.org/10.1111/ele.13402>.
- Becher, H., Powell, R. F., Brown, M. R., Metherell, C., Pellicer, J., Leitch, I. J., e Twyford, A. D. (2021). The nature of intraspecific and interspecific genome size variation in taxonomically complex eyebrights. *Annals of botany*, 128(5), 639–651. <https://doi.org/10.1093/aob/mcab102>.
- Boldrini II. 2020. Por que e para que conservar o Pampa? P. 12-29. In: TEIXEIRA FILHO A e WINCLE LT (Eds). *Anais do I Congresso sobre o Bioma Pampa: Reunindo Saberes*, Editora UFPel, Pelotas, RS.
- Bosch, M., Sonia Herrando-Moraira, Alberto del Hoyo, Jordi López-Pujol, Sergi Massó, Josep A. Rosselló, Joan Simon, Cèsar Blanché, 2019. New conservation viewpoints when plants are viewed at one level higher. Integration of phylogeographic structure, niche modeling and genetic diversity in conservation planning of W Mediterranean larkspurs, *Global Ecology and Conservation*, Volume 18, e00580, ISSN 2351-9894, <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00580>.
- Breiner, F. T., Guisan, A., Bergamini, A., e Nobis, M. P. (2015). Overcoming limitations of modelling rare species by using ensembles of small models. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(10), 1210-1218.
- Brown, J. L., Hill, D. J., Dolan, A. M., Carnaval, A. C., e Haywood, A. M. (2018). PaleoClim, high spatial resolution paleoclimate surfaces for global land areas. *Scientific data*, 5(1), 1-9.
- Burchardt, Paula et al. Cytological and genome size data analyzed in a phylogenetic frame: Evolutionary implications concerning *Sisyrrinchium* taxa (Iridaceae: Iridoideae). *Genetics and Molecular Biology* [online]. 2018, v. 41, n. 1 suppl 1 [Accessed 23 November 2021] , pp. 288-307. Available from: <<https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0077>>. Epub 01 Mar 2018. ISSN 1678-4685. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0077>.

- Byng, J. et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, [s. l.], v. 181, n. 1, p. 1–20, 2016.
- Castro M, Loureiro J, Figueiredo A, Serrano M, Husband BC and Castro S (2020) Different Patterns of Ecological Divergence Between Two Tetraploids and Their Diploid Counterpart in a Parapatric Linear Coastal Distribution Polyploid Complex. *Front. Plant Sci.* 11:315. doi: 10.3389/fpls.2020.00315.
- Chansler, Matthew e Ferguson, Carolyn e Fehlberg, Shannon e Prather, L.. (2016). The role of polyploidy in shaping morphological diversity in natural populations of *Phlox amabilis*. *American journal of botany*. 103. 10.3732/ajb.1600183.
- Chauveau O, Eggers L, Souza-Chies TT, Nadot S. 2012. Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera. *Annals of Botany* 110: 713–729.
- Choi, Bokyung, Hanna Weiss-Schneeweiss, Eva M. Temsch, Soonku So, Hyeon-Ho Myeong, and Tae-Soo Jang. (2020) "Genome Size and Chromosome Number Evolution in Korean *Iris* L. Species (Iridaceae Juss.)" *Plants* 9, no. 10: 1284. <https://doi.org/10.3390/plants9101284>.
- Clark, P.J. e Donoghue, P.C.J (2018) Whole-Genome Duplication and Plant Macroevolution. *Trends in Plant Science*, October 2018, Vol. 23, No. 10 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.07.006>.
- Comai, L. (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Rev Genet* 6, 836–846. <https://doi.org/10.1038/nrg1711>.
- Corneillie, S., De Storme, N., Van Acker, R., Fangel, J. U., De Bruyne, M., De Rycke, R., Geelen, D., Willats, W., Vanholme, B., & Boerjan, W. (2019). Polyploidy Affects Plant Growth and Alters Cell Wall Composition. *Plant physiology*, 179(1), 74–87. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00967>.
- De Bodt S, Maere S, Van de Peer Y. (2005) Genome duplication and the origin of angiosperms. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 591–597.
- De Tullio L, Roitman G, Bernardello G, Tullio LD. (2008) *Tamia* (Iridaceae), a synonym of *Calydorea*: cytological and morphological evidence. *Systematic Botany* 33: 509–513.
- Deble, L.P. e Alves, F.S. 2013. *Herbertia amabilis* Deble e F. S. Alves (Iridaceae) a new species from Brazil. *Candollea (Genève)*, v.68, p.133-137.
- Decanter, Lucile e Colling, Guy e Elvinger, Nora e Heiðmarsson, Starri e Matthies, Diethart. (2020). Ecological niche differences between two polyploid cytotypes of *Saxifraga rosacea*. *American Journal of Botany*. 107. 10.1002/ajb2.1431.
- Dolezel J, Greilhuber J and Suda J (2007) Flow cytometry with plants: an overview. In: Dolezel J, Greilhuber J and Suda J (eds). *Flow Cytometry with Plant Cells* 41–65 Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Duchoslav M, Jandová M, Kobrlová L, Šafářová L, Brus J, Vojtěchová K. (2020) Intricate Distribution Patterns of Six Cytotypes of *Allium oleraceum* at a Continental Scale: Niche Expansion and Innovation Followed by Niche Contraction With Increasing Ploidy Level. *Front Plant Sci.* 2020 Dec 9;11:591137. doi: 10.3389/fpls.2020.591137.

PMID: 33362819; PMCID: PMC7755979.

- Eggers, L. (2020) *Herbertia* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB36338>>. Acesso em: 19 nov. 2021.
- Eggers, L.; Chauveau, O. (2020) *Calydorea* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB36309>>. Acesso em: 25 nov. 2021.
- Eggers, L.; Gil, A.S.B.; Inácio, C.D.; Lovo, J.; Pastori, T.; Hall, C.F.; Damasceno, R.G.L.; Chauveau, O. (2020) Iridaceae in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB136>>. Acesso em: 23 nov. 2021.
- Eng WH e Ho WS (2019) Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review. *Scient Hortic* 246:604–617. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.010>.
- Erst AS, Sukhorukov AP, Mitrenina EYu, Skaptsov MV, Kostikova VA, Chernisheva OA, Troshkina V, Kushunina M, Krivenko DA, Ikeda H, Xiang K, Wang W (2020) An integrative taxonomic approach reveals a new species of *Eranthis* (Ranunculaceae) in North Asia. *PhytoKeys* 140: 75-100. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.140.49048>.
- Fachinetto, J., Kaltchuk-Santos, E., Dellanese Inácio, C., Eggers, L. and de Souza-Chies, T.T. (2018) Multidisciplinary approaches for species delimitation in *Sisyrinchium* (Iridaceae). *Plant Species Biol.*, 33: 3-15. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12181>.
- Fawcett JA, Maerea S, Van de Peer Y. (2009) Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106:5737–5742.
- Flores-Tolentino, Mayra, Ortiz, Enrique, e Villaseñor, José Luis. (2019). Ecological niche models as a tool for estimating the distribution of plant communities. *Revista mexicana de biodiversidad*, 90, e902829. Epub 09 de septiembre de 2019. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2829>.
- GBIF.org (19 de Agosto de 2021) GBIF Occurrence Download <https://doi.org/10.15468/dl.rp7yau>.
- Gils, H., Conti, F., Ciaschetti, G., e Westinga, E. (2012). Fine resolution distribution modelling of endemics in Majella National Park, Central Italy. *Plant Biosystems - PLANT BIOSYST.* 146. 276-287. [10.1080/11263504.2012.685194](https://doi.org/10.1080/11263504.2012.685194).
- Glennon, K. L., Ritchie, M. E., e Segraves, K. A. (2014). Evidence for shared broad-scale climatic niches of diploid and polyploid plants. *Ecology Letters*, 17, 574– 582. <https://doi.org/10.1111/ele.12259>.
- Glimn-Lacy, J., Kaufman, P.B., (2006) *Botany Illustrated: Introduction to Plants, Major Groups Flowering Plant Families*. Springer.
- Goldblatt P (1982) Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of Neotropical Iridaceae. *Syst Bot* 7:186-198.
- Goldblatt P and 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* 84:285–204.
- 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. (1990) Phylogeny and Classification of Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 77, No. 4, pp. 607-627. Missouri Botanical Garden Press. <https://www.jstor.org/stable/2399667>.
- Goldblatt, P., Walbot, V., e Zimmer, E. A. (1984). Estimation of Genome Size (C-Value) in Iridaceae by Cytophotometry. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 71(1), 176–180. <https://doi.org/10.2307/2399061>.
- Goldblatt, P.; Manning, J. C. (2008) *The Iris Family: Natural History e Classification*. [s.l.] : Timber Press.
- Guerra, M (1988) Introdução a Citogenética Geral. In: Guerra M (eds) *Heterocromatina e Bandeamento Cromossômico*. Guanabara, Rio de Janeiro, pp. 24-35.
- Guerra, M. (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet Genome Res*;120:339-350. doi: 10.1159/000121083.
- Guerra, M. (2012) Cytotaxonomy: The end of childhood, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146:3, 703-710, DOI: 10.1080/11263504.2012.717973.
- Haider, Nadia. (2018) A Brief Review on Plant Taxonomy and its Components, *Jour Pl Sci Res* 34 (2) 275-290.
- Harrell, F.E., Lee, K.L. e Mark, D.B. (1996) Tutorial in biostatistics multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Statistics in medicine*, 15, 361–387.
- Hijmans, R., Cameron, S., Parra, J., Jones, P., Jarvis, A., (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. (25). , pp. 1965–1978.
- Huang, BH., Huang, CW., Huang, CL. et al. (2017) Continuation of the genetic divergence of ecological speciation by spatial environmental heterogeneity in island endemic plants. *Sci Rep* 7, 5465. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05900-1>.
- Ilia J. Leitch, Michael D. Bennett, (1997). Polyploidy in angiosperms, *Trends in Plant Science*, Volume 2, Issue 12. Pages 470-476, ISSN 1360-1385, [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01154-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01154-0).
- Japkowicz, N., e Stephen, S. (2002). The class imbalance problem: A systematic study. *Intelligent data analysis*, 6(5), 429-449.
- Jeffery NW, Hultgren K, Chak ST, Gregory TR, Rubenstein DR. Patterns of genome size variation in snapping shrimp. *Genome*. 2016 Jun;59(6):393-402. doi: 10.1139/gen-2015-0206. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27171678.
- Jiao et al (2011) Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* doi:10.1038/nature09916.

- Julie Josse, Francois Husson (2016). missMDA: A Package for Handling Missing Values in Multivariate Data Analysis. *Journal of Statistical Software*, 70(1), 1-31. doi:10.18637/jss.v070.i01.
- Kapur, J. N., Sahoo, P. K., e Wong, A. K. C. (1985). A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 29(3), 273–285. doi:10.1016/0734-189x(85)90125-2.
- Keeler, K.H. and Davis, G.A. (1999), Comparison of common cytotypes of *Andropogon gerardii* (Andropogoneae, Poaceae). *Am. J. Bot.*, 86: 974-979. <https://doi.org/10.2307/2656614>.
- Kenton A and Heywood CA (1984) Cytological studies in South American Iridaceae. *Plant Systematics and Evolution* 146: 87–104.
- Kenton A and Rudall P (1987) An unusual case of complex-heterozygosity in *Gelasine azurea* (Iridaceae), and ITS implications for reproductive biology. *Evol Trends Plants* 1:95-103.
- 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.
- Kenton, A., e Heywood, C. A. (1984). Cytological Studies in South American Iridaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 146(1/2), 87–104. <http://www.jstor.org/stable/23670124>.
- Kiedrzyński, M., Ziełńska, K.M., Jedrzejczyk, I. et al. (2021) Tetraploids expanded beyond the mountain niche of their diploid ancestors in the mixed-ploidy grass *Festuca amethystina* L.. *Sci Rep* 11, 18735. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97767-6>.
- Kolarčík, Vladislav e Vašková, D. e Mirková, M. e Mártonfi, Pavol. (2019). Pollen morphology in natural diploid–polyploid hybridogeneous complex of the genus *Onosma* (Boraginaceae–Lithospermeae). *Plant Systematics and Evolution*. 305. 10.1007/s00606-018-1559-3.
- Kushwah, Kalyan & Verma, Rakesh & Patel, Sapan & Jain, NK. (2018). Colchicine Induced Polyploidy in *Chrysanthemum carinatum* L.. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*. 06. 10.4172/2329-9002.1000193.
- Laport, R.G., Minckley, R.L., Ramsey, J., (2012) Phylogeny and cytogeography of the North American creosote bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae). *Syst. Bot.* 37,153-164.
- 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/>.
- Lizarazo, M. R. B. (2019). Padrões biogeográficos de Tigridieae (Iridaceae: Iridoideae) na América do Sul e sistemas de polinização. Tese (Doutorado em Botânica). Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Lobo, J. M., Verdú, J. R., & Numa, C. (2006). Environmental and geographical factors affecting the Iberian distribution of flightless *Jekelius* species (Coleoptera: Geotrupidae). *Diversity and Distributions*, 12(2), 179-188.
- Luceño, M., Villaverde, T., Márquez-Corro, J. I., Sánchez-Villegas, R., Maguilla, E., Escudero, M., Jiménez-Mejías, P., Sánchez-Villegas, M., Miguez, M., Benítez-

- Benítez, C., Muasya, A. M., e Martín-Bravo, S. (2021). An integrative monograph of *Carex* section *Schoenoxiphium* (Cyperaceae). *Peer J*, 9, e11336. <https://doi.org/10.7717/peerj.11336>.
- Martins, A. C., Marchioretto, R. M., Vieira, A. T., Stiehl-Alves, E. M., Santos, E. K. D., & Souza-Chies, T. T. D. (2021). Seed traits of species from South Brazilian grasslands with contrasting distribution. *Acta Botanica Brasilica*, 34, 730-745.
- Masterson, J. (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms, *Science* 264, 421-424.
- Mastin, J. E., Anthamatten, P. e Bruederle, L.P. (2018) Climatic niche modeling reveals divergence between cytotypes in *Eutrema edwardsii* (Brassicaceae). *Botany*. 96(12): 813-823. <https://doi.org/10.1139/cjb-2018-0027>.
- McCarthy EW, Chase MW, Knapp S, Litt A, Leitch AR, Le Comber SC (2016) Transgressive phenotypes and generalist pollination in the floral evolution of *Nicotiana* polyploids. *Nat Plants*. 2016 Aug 8;2:16119. doi: 10.1038/nplants.2016.119. PMID: 27501400.
- Meudt HM, Albach DC, Tanentzap AJ, Igea J, Newmarch SC, Brandt AJ, Lee WG, Tate JA. (2021) Polyploidy on Islands: Its Emergence and Importance for Diversification. *Front Plant Sci*. 2021 Mar 4;12:637214. doi: 10.3389/fpls.2021.637214. PMID: 33763097; PMCID: PMC7982887.
- Moeglein, M. K., Chatelet, D. S., Donoghue, M. J., and Edwards, E. J.. (2020) Evolutionary dynamics of genome size in a radiation of woody plants. *American Journal of Botany* 107(11): 1527– 1541.
- Moraes AP, Souza-Chies TT, Stiehl-Alves EM, Burchardt P, Eggers L, Siljak-Yakovlev S, Brown SC, Chauveau O, Nadot S, Bourge M, et al. (2015) Evolutionary trends in Iridaceae: New cytogenetic findings from the New World. *Bot J Linn Soc* 177:27-49.
- Moreno, N. et al. (2009) Cytogenetic studies in *Herbertia* sw. (Iridaceae). *Caryologia*, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 37–42.
- Morgan C, Zhang H, Henry CE, Franklin FCH, Bomblies K. (2020) Derived alleles of two axis proteins affect meiotic traits in autotetraploid *Arabidopsis arenosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 21;117(16):8980-8988. doi: 10.1073/pnas.1919459117. Epub 2020 Apr 9. PMID: 32273390; PMCID: PMC7183234.
- Muñoz-Pajares, A.J., Perfectti, F., Loureiro, J., Abdelaziz, M., Biella, P., Castro, M., Castro, S. and Gómez, J.M. (2018), Niche differences may explain the geographic distribution of cytotypes in *Erysimum mediohispanicum*. *Plant Biol J*, 20: 139-147. <https://doi.org/10.1111/plb.12605>.
- Müntzing, A., (1936) The evolutionary significance of autoploidy. *Hereditas*, 21(2-3), pp.363-378.
- Naimi, B., e Araújo, M. B. (2016). sdm: a reproducible and extensible R platform for species distribution modelling. *Ecography*, 39(4), 368-375.
- Nandini, Adayapalam e Murray, Brian e O'brien, I. e Hammett, K.. (2008). Intra- and interspecific variation in genome size in *Lathyrus* (Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 125. 359 - 366. 10.1111/j.1095-8339.1997.tb02265.x.

- Niazian, Mohsen e Nalousi, Ayoub. (2020). Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 142. 10.1007/s11240-020-01888-1.
- Osorio-Olvera, L., Lira-Noriega, A., Soberon, J., Peterson, A. T., Falconi, M., Contreras-Díaz, R. G., ... e Barve, N. (2020). ntbox: an R package with graphical user interface for modelling and evaluating multidimensional ecological niches. *Methods in Ecology and Evolution*, 11(10), 1199-1206.
- Otto, S.P. e Whitton, J. (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet* 34, 401–437.
- Pacella, L.F. e Lara, M.B. (2019) Paleoenvironmental interpretation of the mid-late Holocene of Corrientes province, Argentina. *Nordic Journal of Botany*, 37:. <https://doi.org/10.1111/njb.02252>.
- Padoan, Diego et al. (2013) Ploidy levels in Citrus clementine affects leaf morphology, stomatal density and water content. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*. , v. 25, n. 4, pp. 283-290. Available from: <>. Epub 10 Feb 2014. ISSN 2197-0025.
- Pastori, T., Eggers, L., de Souza-Chies, T.T. et al (2018). Iterative taxonomy based on morphological and molecular evidence to estimate species boundaries: a case study in *Cypella* (Iridaceae: Iridoideae). *Plant Syst Evol* 304, 1117–1140. <https://doi.org/10.1007/s00606-018-1536-x>.
- Pedrana, J., Bernad, L., Maceira, N., Isacch, J. (2018). Niche Overlap Determination Through Habitat Suitability Models: A Management Tool for Native Birds of the Argentinean Pampas. *Ardeola: revista ibérica de ornitología*. 65. 10.13157/arla.65.1.2018.ra2.
- Pellicer J., Leitch I.J. (2014) The Application of Flow Cytometry for Estimating Genome Size and Ploidy Level in Plants. In: Besse P. (eds) *Molecular Plant Taxonomy. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1115. Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9_14.
- Pinho, P. F., Anjos, L. J. S. ., Rodrigues-Filho, S. ., Santos , D. V., e Toledo, P. M. (2020). Projections of Brazilian biomes resilience and socio-environmental risks to climate change. *Sustainability in Debate*, 11(3), 225–259. <https://doi.org/10.18472/SustDeb.v11n3.2020.33918>.
- Qiu Y, Köhler C. (2021) Endosperm evolution by duplicated and neofunctionalized Type I MADS-box transcription factors. *Mol Biol Evol*. Dec 13:msab355. doi: 10.1093/molbev/msab355. Epub ahead of print. PMID: 34897514.
- Qu, Manman & Zhang, Luyue & Li, Kunpeng & Sun, Jianying & Li, Zongyun & Han, Yonghua. (2021). Karyotypic stability of *Fragaria* (strawberry) species revealed by cross-species chromosome painting. *Chromosome Research*. 29. 10.1007/s10577-021-09666-1.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rajaei, Hossein. (2015). Integrative Taxonomy, a New Approach to Answer the Questions in

- the Biosystematics: A Case Study of the Genus *Gnopharmia* (Geometridae). *Entomologie heute*. 27. 25-35.
- Ramsey J., Schemske D.W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Ann Rev Ecol Syst* 29: 467-501. Annual Review of Ecology and Systematics. 29. 467-501. 10.1146/annurev.ecolsys.29.1.467.
- Ravenna P. (1989) A new species of *Herbertia* (Iridaceae) from SE South America. *Nordic Journal of Botany* 9: 55–56.
- Rezende L, Suzigan J, Amorim FW, Moraes AP. (2020) Can plant hybridization and polyploidy lead to pollinator shift? *Acta Botanica Brasilica* 34: 229–242.
- Rice, A., Šmarda, P., Novosolov, M. et al (2019). The global biogeography of polyploid plants. *Nat Ecol Evol* 3, 265–273. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0787-9>.
- Rodriguez A and Sytsma KJ (2006) Phylogenetics of the “tiger-flower” group (Tigridieae, Iridaceae): molecular and morphological evidence. *Aliso* 22:412-424.
- Sattler MC, Carvalho CR, Clarindo WR (2016) The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta* 243: 281–296.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019.
- Segatto, A.L.A., Reck-Kortmann, M., Turchetto, C. et al. (2017). Multiple markers, niche modelling, and bioregions analyses to evaluate the genetic diversity of a plant species complex. *BMC Evol Biol* 17, 234. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-1084-y>.
- SEMA - Secretaria do Estado do Meio Ambiente do Rio Grande do Sul. 2014. Decreto nº 52.109, de 1º de dezembro de 2014. Declara as espécies da flora nativa ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul. Disponível em <<http://www.al.rs.gov.br/filerepository/repLegis/arquivos/DEC%2052.109.pdf>>. Acesso em 20 de novembro de 2021.
- Šemberová, K., Svitok, M., Marhold, K., Suda, J., Schmickl, R.R. (2021) Morphological and environmental differentiation as prezygotic reproductive barriers between parapatric and allopatric *Campanula rotundifolia* agg. cytotypes, *Annals of Botany*, 2021;, mcab123, <https://doi.org/10.1093/aob/mcab123>
- Silbernagl, L., Schönswetter, P. (2019) Genetically divergent cytotypes of *Vaccinium uliginosum* co-occurring in the central Eastern Alps can be distinguished based on the morphology of their flowers. *Preslia*. 91. 143-159. 10.23855/preslia.2019.143.
- Sillero, N., e Barbosa, A. M. (2021) Common mistakes in ecological niche models. *International Journal of Geographical Information Science*, 35(2), 213-226.
- Singab, A. N. B., Iriny M. Ayoub, Mohamed El-Shazly, Michal Korinek, Tung-Ying Wu, Yuan-Bin Cheng, Fang-Rong Chang, Yang-Chang Wu, (2016) Shedding the light on Iridaceae: Ethnobotany, phytochemistry and biological activity, *Industrial Crops and Products*, Volume 92, 2016, Pages 308-335, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.040>.
- Sinski, I., Bosco, D., Pierozzi, N., Maia, J., Ritschel, P., Quecini, V. (2014) Improving in vitro

- induction of autopolyploidy in grapevine seedless cultivars. *Euphytica*. 196. 10.1007/s10681-013-1034-8.
- Sohn, e Fernandez, Mario e Papes, Monica e Anciaes, Marina. (2013). Ecological niche modeling in practice: Flagship species and regional conservation planning. *Oecologia Australis*. 17. 429-440. 10.4257/oeco.2013.1703.11.
- Soltis, D.E., Albert, V.A., Leebens-Mack, J., Bell, C.D., Paterson, A.H., Zheng, C., Sankoff, D., de Pamphilis, C.W., Wall, P.K. and Soltis, P.S. (2009), Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany*, 96: 336-348. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800079>
- Souza-Chies, Tatiana T. et al. (2012) Studies on diversity and evolution of Iridaceae species in southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* [online], v. 35, n. 4 suppl 1 [Accessed 16 December 2021] , pp. 1027-1035. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600018>>. Epub 18 Dec 2012. ISSN 1678-4685. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600018>.
- Srinivasulu, A.; Srinivasulu, B.; Srinivasulu, C. (2021) Ecological niche modelling for the conservation of endemic threatened squamates (lizards and snakes) in the Western Ghats. *Glob. Ecol. Conserv.* 28, e01700.
- Stiehl-Alves EM et al. (2017) Using a population genetics approach for a preliminary investigation concerning species boundaries in *Herbertia* (Iridaceae). *International Journal of Plant Sciences* 178: 439–449.
- Stiehl-Alves, E. M. (2013). Diversidade genética e evolução de espécies de *Herbertia* Sweet (Tigridaeae: Iridaceae). Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Stiehl-Alves, E., Flores, A., Silvério, A., Heck, J., Eggers, L., Kaltchuk-Santos, E., Mariath, J. e Chies, T. (2016). Differentiation between two self-compatible cytotypes of *Herbertia lahue* (Iridaceae): evidence from genotypic and phenotypic variation. *Plant Systematics and Evolution*. 302. 10.1007/s00606-016-1297-3.
- 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. *Bot J Linn Soc* 169:350–364.
- te Beest M, Le Roux JJ, Richardson DM, Brysting AK, Suda J, Kubesová M, Pysek P. (2012) The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Ann Bot*. Jan;109(1):19-45. doi: 10.1093/aob/mcr277. Epub 2011 Oct 31. PMID: 22040744; PMCID: PMC3241594.
- Troy E. Wood, Naoki Takebayashi, Michael S. Barker, Itay Mayrose, Philip B. Greenspoon, Loren H. Rieseberg (2009) The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (33) 13875-13879; DOI: 10.1073/pnas.0811575106.
- Van de Peer, Y., Mizrachi, E. e Marchal, K. (2017) The evolutionary significance of polyploidy. *Nat Rev Genet* 18, 411–424. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.26>.
- Van de Peer, Y., Tia-Lynn Ashman, Pamela S Soltis, Douglas E Soltis (2021). Polyploidy: an

evolutionary and ecological force in stressful times, *The Plant Cell*, Volume 33, Issue 1, January, Pages 11–26, <https://doi.org/10.1093/plcell/koaa015>.

Wendel, J.F., Lisch, D., Hu, G. e Mason, A.S. (2018) The long and short of doubling down: polyploidy, epigenetics, and the temporal dynamics of genome fractionation. *Current Opinion in Genetics & Development* 2018, 49:1–7 <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2018.01.004>.

Wickham, H. (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.