

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

CAROLINE TREVELIN

**ANÁLISES POLÍNICAS EM QUATRO NÍVEIS DE PLOIDIA
DO GÊNERO *Herbertia* (IRIDACEAE)**

PORTO ALEGRE

2022

CAROLINE TREVELIN

**ANÁLISES POLÍNICAS EM QUATRO NÍVEIS DE PLOIDIA
DO GÊNERO *Herbertia* (IRIDACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Eliane Kaltchuk dos Santos

PORTO ALEGRE

2022

Trevelin, Caroline

Análises polínicas em quatro níveis de ploidia do gênero *Herbertia* (Iridaceae) / Caroline Trevelin. -- 2022.

50 f.

Orientadora: Eliane Kaltchuk dos Santos.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Bacharelado em Ciências Biológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Citogenética. 2. Poliploidia. 3. Pólen. 4. Iridaceae. 5. *Herbertia*. I. dos Santos, Eliane Kaltchuk, orient. II. Título.

CAROLINE TREVELIN

**ANÁLISES POLÍNICAS EM QUATRO NÍVEIS DE PLOIDIA
DO GÊNERO *Herbertia* (IRIDACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Eliane Kaltchuk dos Santos

Aprovado em: Porto Alegre, 11/10/2022

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Tatiana Teixeira de Souza Chies - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Mabel Rocio Báez Lizarazo - Universidad Distrital Francisco José de Caldas

Para a minha avó Gema (in memoriam), um dos pilares da minha existência. Tudo o que você fez por mim me fez chegar até esse momento. Por isso, obrigada.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desse trabalho de conclusão de curso só foi possível com a ajuda de diversas pessoas, dentre as quais agradeço:

Aos meus pais, Roberto e Simone, por todo auxílio durante a minha trajetória. Sem vocês, essa conquista definitivamente não seria possível. Obrigada por abraçarem as minhas angústias e me incentivarem a continuar trilhando o caminho dos meus sonhos, mesmo quando eu sentia que as minhas forças estavam esgotadas.

Aos meus irmãos, Tiago e Tatiane, por todos os momentos de descontração, piadas, conversas sérias e desabafos. Ao lado de vocês, não me sinto mais sozinha. Obrigada por serem o melhor presente inesperado que recebi nessa vida.

Às minhas colegas do laboratório, especialmente Lu e Arizinha. Obrigada por ouvirem minhas inquietações e acalmarem o meu coração diante dos empecilhos da vida. Por todas as metáforas encontradas, *croissants* de chocolate, risadas, protocolos estabelecidos, histórias compartilhadas e computadores explodindo, agradeço imensamente.

Às minhas amigas da graduação: Livia, Andressa, Fernanda, Giovanna e Júlia. Saibam que, independentemente dos caminhos que seguiremos a partir desse momento, jamais esquecerei do “Own nada minha filha”, das filas quilométricas do RU, dos lanches no Mc depois da aula de bioquímica, das conversas debaixo da árvore, das partidas de UNO que nunca joguei, dos piqueniques nas saídas de campo e dos rolês em que nunca tiramos foto.

Aos meus amigos de infância, Ana e Andrei. Não preciso falar com vocês todos os dias para saber que estão comigo. Obrigada por me ouvirem nos momentos em que eu mais precisava, por terem sido meu ombro amigo durante anos e por puxarem minha orelha quando isso se fez necessário. Vocês são muito importantes para mim, e sempre serão.

À Letícia, minha melhor amiga e dona de meus melhores sorrisos. Por oito anos, você se fez presente em minha vida todos os dias, escutando meus áudios gigantescos, lendo meus textos enormes e aguentando minha documentação constante em fotografias do meu dia. Obrigada pelos conselhos, por me acolher e por estar sempre aqui.

Às minhas colegas de apê atuais, Marina e Clari, mas também àqueles que já compartilharam o cotidiano comigo ao longo desses cinco anos no TNN. Obrigada por ouvirem meus desabafos após um dia cansativo, por buscarem minhas encomendas na administração, por sempre recomendarem os melhores restaurantes do *Ifood* e, acima de tudo, serem meu lar mesmo longe de casa.

À minha orientadora, Eliane Kaltchuk dos Santos, por todos os conhecimentos compartilhados e o incentivo dado ao longo desses quatro anos. Obrigada por ter me apresentado ao mundo da ciência e da Citogenética, pelo qual me apaixonei profundamente. Minha missão na biologia só será cumprida quando eu me tornar uma profissional como você.

Ao MSc. Alexandre Cristante Martins, por ter confiado em mim para realizar essas análises, bem como pela atenção e disponibilidade para solucionar minhas dúvidas durante todo este período.

Aos meus amigos da literatura, os quais ainda não tive oportunidade de conhecer pessoalmente. Saibam que, independentemente do tempo em que eu permanecer longe, sempre voltarei para o conforto dos nossos livros, nossas escritas, nossos áudios e nossos concursos literários.

Aos meus outros amigos e família em geral, cujos nomes são muitos para serem citados. Cada um de vocês teve um papel fundamental para que eu pudesse chegar até aqui. Sou grata pelo auxílio de todos, mais do que palavras são capazes de expressar.

Às agências financiadoras e à UFRGS, pelo incentivo durante a graduação que me permitiu ser bolsista de Iniciação Científica. Esse projeto não teria sido executado sem os recursos investidos na minha formação, dada por uma universidade pública, gratuita e de excelência no cenário nacional.

“Nada em biologia faz sentido exceto à luz da evolução.”

(Theodosius Dobzhansky)

RESUMO

A poliploidia é considerada um dos principais mecanismos evolutivos de diversificação e especiação das plantas com flores, responsável por afetar atributos ecológicos, morfológicos, fisiológicos e reprodutivos das espécies. *Herbertia* (Tigridieae, Iridaceae) é um gênero de plantas bulbosas e herbáceas que compreende oito espécies com notável variação morfológica e citogenética, sendo que séries poliploides já foram reportadas para *Herbertia lahue* ($2n = 2x = 14$, $2n = 6x = 42$, $2n = 8x = 56$) e *Herbertia pulchella* ($2n = 2x = 14$, $2n = 4x = 28$, $2n = 6x = 42$), apesar desta última ter citações na literatura de citótipos que ainda não foram identificados no Rio Grande do Sul ($2n = 2x = 14$, $2n = 6x = 42$). Visando caracterizar aspectos relacionados aos grãos de pólen de *H. lahue* ($2x$, $6x$ e $8x$) e *H. pulchella* ($4x$) e correlacionar estes dados com os níveis de ploidia encontrados em ambas espécies, botões florais de dezessete populações foram coletados antes da antese, fixados em etanol:ácido acético e macerados em corante Alexander 2%. As lâminas preparadas foram utilizadas para análises de: (1) potencial de fertilização, onde 500 grãos de pólen por indivíduo foram contabilizados e diferenciados em viáveis e inviáveis através do método de Alexander (1980); (2) quantificação através da Câmara de Neubauer, para estimativa de número de grãos por antera e por flor e (3) morfologia polínica, a partir das medidas dos eixos polares (P) e equatoriais (E) por meio do fotomicroscópio Zeiss Axioplan. Análises mitóticas com raízes pré-tratadas em 8HQ e seguindo um protocolo de secagem ao ar adaptado de Carvalho e Saraiva (1993) foram executadas para *H. pulchella*, a fim de investigar a presença da série poliploide no Rio Grande do Sul. Através de análises no software R, verificou-se que não houve diferenças significativas no potencial de fertilização dos quatro níveis de ploidia de *Herbertia* (Kruskall-Wallis, $p = 0,6138$), o que nos leva a hipotetizar que os citótipos poliploides estão bem estabelecidos nas populações naturais. Em relação à quantificação polínica, a ANOVA e o teste de Dunn mostraram que existem diferenças significativas [$F(3, 58) = 15,75$; $p < 0,001$] na quantidade de pólen produzido pelo citótipo diploide, sendo muito superior aos demais citótipos. Tais diferenças podem ocorrer pela tendência dos poliploides a seguirem caminhos distintos da reprodução sexuada, como a propagação clonal, buscando o estabelecimento a longo prazo na natureza. A razão entre os eixos polares e equatoriais indicou que todos os níveis de ploidia apresentam grãos de pólen do tipo subesfeirodal (suboblado ou oblado esfeirodal), sendo que o teste de Kruskal-Wallis indicou diferenças significativas entre os grupos, com os indivíduos hexaploides e octaploides apresentando os maiores grãos de pólen, enquanto os diploides apresentaram os menores, possivelmente retratando o efeito giga, comum em poliploides. No entanto, tais diferenças não foram suficientes para permitir a determinação do nível de ploidia dos citótipos unicamente através das medidas dos eixos. Ainda, uma diferença significativa foi encontrada entre indivíduos do mesmo citótipo pertencentes a populações de localidades diferentes, o que pode revelar a presença de fatores ambientais atuando sobre os grãos de pólen. Por fim, as análises mitóticas encontraram apenas indivíduos tetraploides para *H. pulchella* no Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: Poliploidia, Pólen, Iridaceae.

ABSTRACT

Polyploidy is considered one of the major evolutionary mechanisms of diversification and speciation in flowering plants, responsible for affecting ecological, morphological, physiological and reproductive species attributes. *Herbertia* (Tigridieae, Iridaceae) is a genus of bulbous and herbaceous plants comprising eight species with a remarkable morphological and cytogenetic variation. Polyploid series have already been reported for *Herbertia lahue* ($2n = 2x = 14$, $2n = 6x = 42$, $2n = 8x = 56$) and *Herbertia pulchella* ($2n = 2x = 14$, $2n = 4x = 28$, $2n = 6x = 42$), although the last one has citations in the literature for cytotypes ($2n = 2x = 14$, $2n = 6x = 42$) that haven't been identified in Rio Grande do Sul. In order to characterize aspects related to the pollen grains of *H. lahue* ($2x$, $6x$ and $8x$) and *H. pulchella* ($4x$) and to correlate these data with the ploidy levels found in both species, flower buds from seventeen populations were collected before anthesis, fixed in ethanol:acetic acid and macerated in Alexander 2%. The slides were used for three different analyses: (1) pollen stainability, where 500 grains per individual were counted and classified into viable and nonviable through Alexander's (1980) method; (2) quantification using the Neubauer Chamber, to estimate the number of grains per anther and per flower and (3) pollen morphology, with the measurements of the polar axis (P) and equatorial diameter (E) examined with a Zeiss Axioplan photomicroscope. In addition, mitotic analyses with roots pre-treated in 8HQ were performed for *H. pulchella* using an air-drying protocol adapted from Carvalho and Saraiva (1993) intending to investigate the presence of the polyploidy series in Rio Grande do Sul. Analysis performed with the R software indicates that the pollen stainability between the four levels of ploidy is very similar (Kruskal-Wallis, $p = 0,6138$), which leads us to hypothesize that polyploid cytotypes are well established in natural populations. Concerning quantification, ANOVA and Dunn's test showed statistical differences [$F(3, 58) = 15,75$; $p < 0,001$] between the amount of pollen produced by the diploid cytotype, much higher than the others. Such differences may occur due to the tendency of polyploids to follow different pathways of sexual reproduction, like clonal propagation, for long-term establishment in nature. The ratio between the polar axes and the equatorial diameter indicates that all ploidy levels have subspheroidal pollen grains (suboblate or spheroidal oblate). Significant differences in the pollen size dimensions between the groups were found by the Kruskal-Wallis test. Octaploid and hexaploid individuals presented the largest pollen grains, while diploids had the smallest, possibly due to the "giga" size effect in polyploids. However, these differences were not enough to determine the ploidy level of the cytotypes only with the pollen measurements. Also, a statistically significant difference was discovered between individuals of the same cytotype belonging to populations from different locations, which may indicate the presence of environmental factors acting on pollen grains. Finally, mitotic analyses found only tetraploids individuals for *H. pulchella* in Rio Grande do Sul.

Keywords: Polyploidy, Pollen, Iridaceae.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. OBJETIVOS.....	14
1.1.1. Objetivo Geral.....	14
1.1.2. Objetivos específicos.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1. A POLIPLOIDIA COMO MECANISMO EVOLUTIVO	15
2.1.1. Variabilidade citogenética na família Iridaceae	17
2.1.1.1. Poliploidia em Herbertia.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL	21
3.2. ANÁLISES MITÓTICAS.....	24
3.3. ANÁLISES POLÍNICAS	24
3.3.1. Quantificação.....	24
3.3.2. Potencial de fertilização.....	26
3.3.2. Morfologia.....	26
3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. ANÁLISES MITÓTICAS.....	28
4.2. ANÁLISES POLÍNICAS.....	28
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
APÊNDICE.....	47

1. INTRODUÇÃO

Os trabalhos clássicos de Hugo de Vries (1901 - 1903), Øjvind Winge (1915), Cyril Darlington (1937) e G. Ledyard Stebbins Jr. (1940, 1947, 1950) reportaram e fundamentaram a base dos estudos com poliploides (VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017; DARLINGTON, 1937). O termo poliploidia, no entanto, surgiu apenas em 1916, quando Winkler o utilizou pela primeira vez ao gerar os primeiros poliploides artificiais dos quais se tem conhecimento a partir de duas espécies da família Solanaceae: *Solanum lycopersicum* L. (tomate) e *Solanum nigrum* L. (erva-moura). Contudo, não tardou para que a ciência mostrasse que eventos de poliploidização não estavam tão distantes de nossa realidade: em 1911, Kuwada sugeriu que a evolução do milho (*Zea mays* L.), espécie vegetal de grande conhecimento popular e interesse econômico, estava atrelada à duplicação cromossômica (SOLTIS; VISGER; SOLTIS, 2014). Os desdobramentos dessas narrativas repletas de descobertas singulares nos trouxeram ao vasto campo de estudo dos poliploides, que perpetua por mais de um século.

Por se tratar de um evento massivo e instantâneo capaz de alterar as dinâmicas do genoma em uma única geração, organismos poliploides podem apresentar aspectos morfológicos, reprodutivos, ecológicos e fisiológicos distintos de seus parentais diploides (VISGER *et al.*, 2016; REZENDE *et al.*, 2020; VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017). Em angiospermas, a duplicação total do genoma (*Whole Genome Duplication*, WGD ou poliploidia) teve um impacto fundamental na história evolutiva do grupo, sendo considerada um dos principais mecanismos evolutivos envolvidos na diversidade de espécies das plantas com flores (VAN DRUNEN; HUSBAND, 2019). Esse é o caso de Iridaceae, família de monocotiledôneas da ordem Asparagales extremamente diversa em termos morfológicos e cariológicos, com comprovação de eventos de poliploidia e disploidia atuando na evolução do grupo (CHOI *et al.*, 2020, GOLDBLATT; TAKEI, 1993; MORAES *et al.*, 2015).

Nesse contexto, o gênero *Herbertia* Sweet (Tigridieae, Iridaceae) se torna um modelo ideal para a compreensão da poliploidia como um mecanismo evolutivo em ecossistemas campestres, visto que as espécies do gênero são sazonais, perenes, bulbosas e se propagam clonalmente, além de possuírem distintos modos de reprodução e quatro níveis de ploidia documentados na literatura: $2x$, $4x$, $6x$ e $8x$ (WINGE, 1959; KENTON; HEYWOOD, 1984; GOLDBLATT; TAKEI, 1997; MORENO *et al.*, 2009). Dentre as espécies do gênero, séries poliploides já foram reportadas para *Herbertia lahue* ($2n = 2x = 14$, $2n = 6x = 42$ e $2n = 8x =$

56) e *Herbertia pulchella* ($2n = 2x = 14$, $2n = 4x = 28$ e $2n = 6x = 42$), o que desperta um grande interesse nos estudos evolutivos e taxonômicos destas espécies (MORAES *et al.*, 2015, STIEHL-ALVES *et al.*, 2016).

Ao longo de anos, intensos esforços de coleta têm sido empregados pelo Grupo de Pesquisas em Iridaceae da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) a fim de investigar populações das espécies de *Herbertia*. Para *Herbertia lahue*, três citótipos foram encontrados (MARTINS *et al.*, 2020, MORAES *et al.*, 2015, TONETTO, comunicação pessoal). No entanto, no que diz respeito à *H. pulchella*, embora a literatura reporte a existência de uma série poliploide para a espécie (WINGE, 1959; KENTON; HEYWOOD, 1984; GOLDBLATT; TAKEI, 1997), apenas plantas tetraploides foram observadas, o que levanta um questionamento sobre a existência de outros citótipos para *H. pulchella*. Sendo assim, a ampliação de estudos citogenéticos para obtenção do número cromossômico em diferentes populações que visem cobrir a área de distribuição geográfica de *H. pulchella* é fundamental para a resolução deste dilema. Ademais, os dados citogenéticos relativos à *Herbertia* são de grande valia no contexto de taxonomia integrativa do gênero, podendo ser empregados junto a outras metodologias para a delimitação dos taxa, dado que os eventos de poliploidia e disploidia são capazes de originar um amplo polimorfismo que dificulta a caracterização de espécies unicamente pela morfologia.

Por representar o gametófito masculino das plantas, proveniente dos processos de mitose e meiose, o grão de pólen se torna um instrumento importante na investigação de diversos aspectos reprodutivos relevantes para a manutenção e caracterização de determinada espécie, como o potencial de fertilização, a quantidade de pólen produzido por antera e a morfologia polínica (SHIVANNA; TANDON, 2014). Nos poliploides, o fenômeno do efeito giga faz com que algumas espécies vegetais apresentem relação direta entre nível de ploidia e tamanho do grão de pólen, como em *Arabidopsis thaliana* L. Heynh e *Avena* L. (KATSIOTIS; FORSBERG, 1995; ALTMANN, 1994). Para Iridaceae, estudos envolvendo algumas espécies de *Sisyrinchium* L. (FACHINETTO *et al.*, 2018; TACUATIÁ *et al.*, 2012) demonstraram correlação entre os níveis de ploidia e o tamanho do grão de pólen para diferentes citótipos. Para *Herbertia*, a relação entre poliploidia e caracteres polínicos continua incerta, visto que não há estudos envolvendo esses aspectos para o gênero. Diferenças quanto à quantidade de pólen presente nos citótipos diploides e poliploides de *H. lahue* têm sido observadas nos experimentos de biologia reprodutiva a campo (TONETTO, comunicação pessoal), indicando uma possível relação entre o número de grãos de pólen por antera e o nível de ploidia da espécie.

A ausência de dados de quantificação, potencial de fertilização e tamanho do grão de pólen para os diferentes citótipos do gênero apresenta uma verdadeira lacuna do conhecimento que poderia auxiliar na resolução de questões fundamentais para a compreensão das adaptações reprodutivas que garantem a manutenção dos poliploides. Além disso, nas situações onde há correlação entre o tamanho do grão e o nível de ploidia, as análises polínicas são especialmente úteis, pois minimizam o tempo para determinação da ploidia quando comparados aos métodos de citogenética clássica por contagem cromossômica.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho é caracterizar aspectos relacionados ao grão de pólen de *Herbertia lahue* e *Herbertia pulchella*, buscando correlacionar estes dados com os níveis de ploidia encontrados em ambas espécies.

1.1.2. Objetivos específicos

- Obter o número de grãos de pólen produzido por cada citótipo de *H. lahue* e *H. pulchella*;
- Determinar o potencial de fertilização, o tamanho e a morfologia dos grãos de pólen de *H. lahue* e *H. pulchella*;
- Estimar o(s) nível(eis) de ploidia para populações de *H. pulchella* a partir dos dados citogenéticos, visando cobrir a área de distribuição da espécie;
- Investigar e confirmar dados da literatura quanto à ocorrência de séries poliploides para *H. pulchella*;
- Investigar uma possível correlação entre os caracteres polínicos (tamanho do grão de pólen, quantidade de grãos produzidos por antera e número de grãos inviáveis) e os níveis de ploidia de *H. lahue* e *H. pulchella*;
- Analisar comparativamente as informações obtidas sobre quantificação, potencial de fertilização, morfologia e tamanho dos grãos de pólen para *H. lahue* e *H. pulchella*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A POLIPLOIDIA COMO MECANISMO EVOLUTIVO

A poliploidia, também conhecida como WGD (*Whole Genome Duplication*), refere-se à presença de três ou mais conjuntos de cromossomos por núcleo (FOX *et al.*, 2020), fenômeno presente nos mais variados ramos da vida, desde organismos vegetais até invertebrados e vertebrados (SOLTIS *et al.*, 2015; RODRIGUEZ; ARKHIPOVA, 2018; NANDAKUMAR; GRUSHKO; BUTTITTA, 2020). Os eventos de poliploidização levam a mudanças bruscas e imediatas na estrutura do genoma, como rearranjos cromossômicos, perdas ou duplicações de sequências de DNA, alterações na expressão gênica e ativação de elementos de transposição, sendo responsáveis por refletir diretamente no fenótipo dos indivíduos, podendo conferir vantagens ou desvantagens na sobrevivência dos poliploides (OTTO, 2007; SOLTIS; SOLTIS, 1999).

Os poliploides são comumente gerados por duas vias distintas: a autopoliploidia, envolvendo a fusão de dois gametas não reduzidos da mesma espécie, e a aloploidia, onde a combinação de dois genomas de espécies distintas levam à formação de um híbrido (REZENDE *et al.*, 2020). Atualmente, sabe-se que a origem da maior parte dos poliploides é muito mais complexa do que as visões tradicionais apontavam, sendo que populações de origens independentes provenientes de um genitor diploide podem entrar em contato e hibridizar, gerando novos genótipos. Tais eventos tornam a classificação taxonômica e o reconhecimento das espécies poliploides ainda mais desafiadoras (SOLTIS; SOLTIS, 1999).

Nas angiospermas, a história evolutiva do grupo é intrincada pela poliploidia. Um dos episódios mais emblemáticos, conhecido como evento ζ (zeta) e ocorrido antes da divergência com as gimnospermas (ALIX *et al.*, 2017), revela que todas as plantas com flores já experienciaram a duplicação total do genoma ao longo da evolução (BOROWSKA-ZUCHOWSKA *et al.*, 2022). Acredita-se que 30 a 70% das espécies desse grupo apresentam poliploidia, dado estimado a partir de contagens de cromossomos, tamanho de genoma e medidas das células-guarda de estômato (BOROWSKA-ZUCHOWSKA *et al.*, 2022). Dessa forma, a WGD atua como um verdadeiro mecanismo evolutivo, fundamental para a diversificação e especiação das angiospermas (VAN DRUNEN; HUSBAND, 2019).

As alterações cromossômicas numéricas e estruturais provenientes da poliploidia podem atuar na formação de uma barreira reprodutiva forte que inviabiliza o fluxo gênico entre os parentais diploides e os indivíduos poliploides recém-surgidos, configurando-se como

um mecanismo de especiação imediata e simpátrica (RAMSEY; SCHEMSKE, 1998; OTTO; WHITTON, 2000; RIESEBERG; WILLIS, 2007). No entanto, tais barreiras também podem resultar na extinção natural dos poliploides, dificultando o seu estabelecimento nas comunidades vegetais (RICE *et al.*, 2019). Considerando que numa dada população o citótipo poliploide é minoritário em um ambiente repleto de indivíduos diploides, há dificuldade no encontro de um parceiro sexual compatível, gerando uma tendência de que os poliploides sigam por um caminho evolutivo onde a reprodução assexuada (como propagação clonal) e a autopolinização sejam as principais vias reprodutivas da espécie, em detrimento da reprodução sexuada e da polinização cruzada (VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017).

A ocorrência da poliploidia se encontra associada às mais diversas características dos indivíduos, visto que variações genéticas podem causar mudanças morfológicas, fisiológicas, reprodutivas e ecológicas (VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017). Em um nível fenotípico, poliploides podem apresentar o conhecido “efeito giga” (*giga size effect*), no qual estruturas florais, folhagens e raízes são mais robustas, e onde grãos de pólen e células-guarda de estômatos são maiores (REZENDE *et al.*, 2020; RAMSEY; SCHEMSKE, 2002). Possivelmente causado por uma relação entre o aumento do volume da célula e a quantidade de DNA (RAMSEY; SCHEMSKE, 2002), a presença do “efeito giga” varia entre ambientes e táxons distintos (OTTO, 2007), o que dificulta generalizações.

Reprodutivamente, mudanças morfológicas em caracteres florais que atraem polinizadores, incluindo cor e aroma das flores, são capazes de alterar a interação planta-polinizador, auxiliando no isolamento reprodutivo entre os poliploides e seus parentais diploides (VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017; REZENDE *et al.*, 2020). Alterações gênicas provenientes da poliploidia ainda podem afetar o tempo de abertura das flores e, conseqüentemente, a ação polinizadora sobre a espécie (OSBORN, 2004).

A diversidade alélica causada pela heterose e a grande plasticidade dos genomas poliploides também contribuem para a adaptação ambiental e conquista de novos nichos ecológicos distintos dos parentais diploides, tornando os indivíduos poliploides mais tolerantes ao estresse (VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017; COMAI, 2005). A relação entre o nível de ploidia, a amplitude de distribuição geográfica e a capacidade adaptativa das espécies parece favorecer a ocupação de distintos nichos ecológicos pelos poliploides em comparação aos diploides. Estudos recentes mostraram uma relação entre o nível de ploidia, a amplitude de distribuição geográfica e a capacidade adaptativa das espécies (VISGER *et al.*, 2016; MOLGO; SOLTIS; SOLTIS, 2017). Rice *et al.* (2019), por exemplo,

investigaram diversas linhagens de angiospermas, observando que espécies poliploides foram encontradas com mais frequência em ambientes de altas latitudes das zonas temperadas do hemisfério Norte, bem como em ambientes campestres de latitude, como as cordilheiras dos Andes.

Em suma, apesar dos poliploides terem sido tratados como becos evolutivos sem saída por muito tempo (VAN DE PEER; MIZRACHI; MARCHAL, 2017), novos estudos genéticos estão mudando as percepções tradicionais frente ao fenômeno da poliploidização (SOLTIS; SOLTIS, 1999), já que os poliploides podem se adaptar a certos contextos ecológicos, geográficos e climáticos onde seus parentais diploides não são capazes de obter sucesso (RICE *et al.*, 2019).

2.1.1. Variabilidade citogenética na família Iridaceae

De acordo com o APG (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP *et al.*, 2016), a família Iridaceae é uma das mais diversificadas da Ordem Asparagales, contendo cerca de 2030 espécies herbáceas distribuídas em sete subfamílias monofiléticas. Destas subfamílias, apenas Iridoideae tem representantes na região Neotropical, o segundo maior centro de diversidade de Iridaceae, perdendo apenas para a região sul-africana (GOLDBLATT; MANNING, 2008). No Brasil, a família é constituída por 23 gêneros e 190 espécies, sendo que 106 delas são endêmicas (GIL *et al.*, 2015), o que aponta o país como um importante centro de diversificação do grupo no continente americano.

Uma das características mais marcantes em Iridaceae é a grande diversidade de cariótipos, números cromossômicos somáticos e conteúdo de DNA das espécies, sendo que até mesmo o número cromossômico básico (x) permanece incerto para a família (SOUZA-CHIES *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2015). Goldblatt (1990) sugeriu que o mais provável seria $x = 10$, com eventos de poliploidia e disploidia associados dando origem a números cromossômicos derivados, como $x = 14, 12, 11, 9, 8, 7$ e 5 (GOLDBLATT; TAKEI, 1997).

A morfologia e tamanho dos cromossomos se diferencia ao longo das espécies de Iridaceae, sendo que os cariótipos bimodais e assimétricos são frequentes na família, particularmente em Iridoideae (SOUZA-CHIES *et al.*, 2012). Enquanto os números cromossômicos somáticos variam de $2n = 6$ até $2n = 230$ (ALVES; LIMA; FELIX, 2011), Goldblatt e Takei (1997) sugerem que a neopoliploidia seja comum em espécies norte-americanas da família, visto que séries poliploides intraespecíficas e/ou intergenéricas já

foram encontradas para diversos táxons. Em espécies presentes na América do Sul, os gêneros *Calydorea*, *Herbertia* e *Sisyrinchium* já tiveram séries poliploides reportadas (MORAES *et al.*, 2015), reforçando a importância da poliploidia na história evolutiva do grupo (ALVES; LIMA; FELIX, 2011). Apesar da grande diversidade observada nos Neotrópicos, existe uma carência de estudos citogenéticos para plantas nativas dessa região, posto que a literatura existente se limita ao estudo de espécies provenientes da América do Norte. Para as espécies brasileiras, dados de cariótipo e número cromossômico são escassos e, quando presentes, geralmente limitam-se ao número cromossômico (SOUZA-CHIES *et al.*, 2012).

Em Tigridaeae, tribo de Iridoideae que reúne plantas herbáceas, geófitas e com folhas plicadas, acredita-se que o número cromossômico básico seja $x = 7$, com uma possível origem por dispoloidias reducionais causadas por translocações Robertsonianas (MORAES *et al.*, 2015). Grande parte das espécies já investigadas da tribo Tigridaeae é tetraploide e hexaploide, reforçando a importância da poliploidia para a história evolutiva de espécies de Iridaceae das Américas do Sul e Central (GOLDBLATT; TAKEI, 1997).

2.1.1.1. Poliploidia em *Herbertia*

A tribo Tigridaeae (Iridaceae) compreende cerca de 172 espécies agrupadas em 15 a 20 gêneros (GOLDBLATT; MANNING, 2008), dentre os quais se destaca *Herbertia*, um pequeno gênero composto por oito espécies (DEBLE; ALVES, 2013) de plantas perenes, bulbosas, sazonais, herbáceas, polinizadas por insetos, com poucas folhas e geralmente com flores cor violeta (GOLDBLATT; MANNING, 2008), sendo sete delas encontradas no Rio Grande do Sul: *H. amabilis* Deble e F. S. Alves; *H. darwinii* Roitman e J.A.Castillo; *H. furcata* (Klatt) Ravenna; *H. lahue*; *H. pulchella* Sweet; *H. quareimana* Ravenna e *H. zebrina* Deble. Apenas *H. tigridioides* (Hicken) Goldblatt não é encontrada no estado, tendo sua distribuição restrita à Argentina e Bolívia (GBIF SECRETARIAT, 2022). Por apresentarem grande semelhança em sua morfologia vegetativa, o reconhecimento das espécies é dado por caracteres florais (STIEHL-ALVES *et al.*, 2016).

Assim como para as demais espécies de Tigridaeae, o número cromossômico básico reportado para *Herbertia* é $x = 7$, altamente conservado na tribo. Atualmente, seis das oito espécies aceitas apresentam contagens cromossômicas (*H. lahue*, *H. darwinii*, *H. pulchella*, *H. quareimana*, *H. zebrina* e *H. furcata*), evidenciando quatro níveis de ploidia no gênero: $2x$, $4x$, $6x$ e $8x$ (WINGE, 1959; KENTON; HEYWOOD, 1984; GOLDBLATT; TAKEI, 1997;

MORENO *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2015). Entre elas, séries poliploides já foram inferidas para *H. pulchella* e para *H. lahue*, além de terem sido observadas em análises recentes de nosso grupo de pesquisa para *H. quareimana* (Carvalho *et al.*, 2022 - dados não publicados), o que desperta um grande interesse nos estudos evolutivos e taxonômicos destas espécies.

Com distribuição ampla abrangendo o Brasil, Uruguai, Argentina e Chile, *H. lahue* possui três níveis de ploidia descritos na literatura que coexistem nas populações naturais ($2n = 2x = 14$, $2n = 6x = 42$ e $2n = 8x = 56$) (WINGE, 1959; KENTON; HEYWOOD, 1984; GOLDBLATT; TAKEI, 1997; MORENO *et al.*, 2009; MORAES *et al.* 2015), os quais podem ser distinguidos a campo a partir de diferenças sutis em sua morfologia floral. Segundo Stiehl-Alves *et al.* (2016), os hexaploides possuem tépalas internas lanceoladas e tépalas externas com constrição na base e ápice uncinado (Figuras 1C e 1D), enquanto os octaploides possuem as tépalas dos dois verticilos obovadas com constrição basal ou ápice uncinado ausentes (Figuras 1E e 1F). Os indivíduos diploides, por sua vez, estão associados a plantas caracterizadas como *H. aff. lahue* por Goldblatt e Takei (1997) (Figuras 1A e 1B), além de terem sido recentemente encontrados em populações naturais brasileiras por nosso grupo de pesquisa (TONETTO, comunicação pessoal).

Herbertia pulchella (Figuras 1G e 1H), por sua vez, apresenta distribuição restrita ao Uruguai e Brasil, facilmente distinta de *H. lahue* pela presença de uma listra branca longitudinal nas tépalas externas (SOUZA-CHIES *et al.*, 2012), sendo as duas espécies encontradas em simpatria. Apesar de três níveis de ploidia terem sido reportados para a espécie ($2n = 2x = 14$, $2n = 4x = 28$ e $2n = 6x = 42$) (WINGE, 1959; KENTON; HEYWOOD, 1984; GOLDBLATT; TAKEI, 1997), apenas indivíduos tetraploides foram encontrados no Rio Grande do Sul (MORAES *et al.*, 2015). Até o presente momento, não foram observados a campo caracteres morfológicos que indiquem a ocorrência de citótipos para *H. pulchella*.

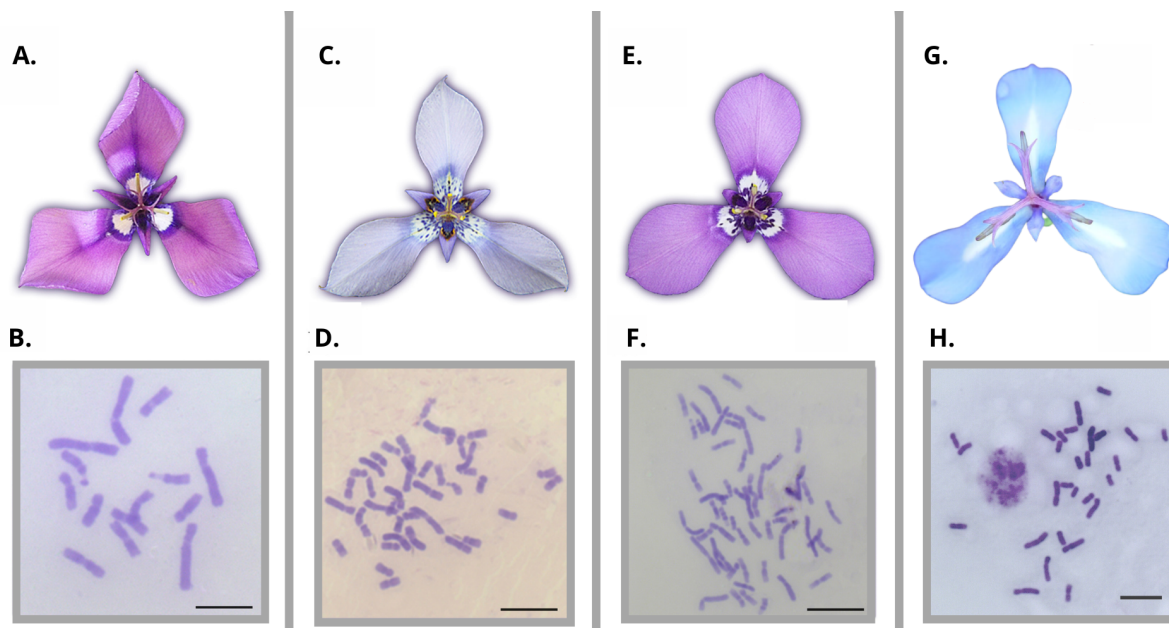


Figura 1. Números cromossômicos e morfologia floral para o gênero *Herbertia*: A e B - *H. lahue* diploide ($2n = 2x = 14$); C e D - *H. lahue* hexaploide ($2n = 6x = 42$); E e F - *H. lahue* octaploide ($2n = 8x = 56$); G e H - *H. pulchella* ($2n = 4x = 28$). Escala das imagens B, D, F e H: 5 μ m.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A coleta do material vegetal foi realizada em expedições a campo no estado do Rio Grande do Sul (Figura 2, Tabela 1). Para as análises polínicas, foram coletados no mínimo três botões florais para dezessete populações correspondentes à *Herbertia pulchella* e aos três citótipos de *Herbertia lahue*, posteriormente armazenados em 3:1 (etanol: ácido acético). Os citótipos de *H. lahue* foram reconhecidos através de sua morfologia floral, metodologia também empregada por Stiehl-Alves *et al.* (2016) e Martins *et al.* (2020), sendo que alguns acessos tiveram seu nível de ploidia previamente confirmado por Martins *et al.* (2020), como devidamente indicado na Tabela 1. Além disso, dez bulbos de sete populações de *H. pulchella* foram coletados, aclimatados e mantidos no laboratório de Citogenética Vegetal (Departamento de Genética/UFRGS) e/ou no viveiro do grupo de estudos em Iridaceae (Departamento de Botânica/UFRGS) para a obtenção de raízes para análises mitóticas, visando cobrir a área de distribuição da espécie no Rio Grande do Sul.

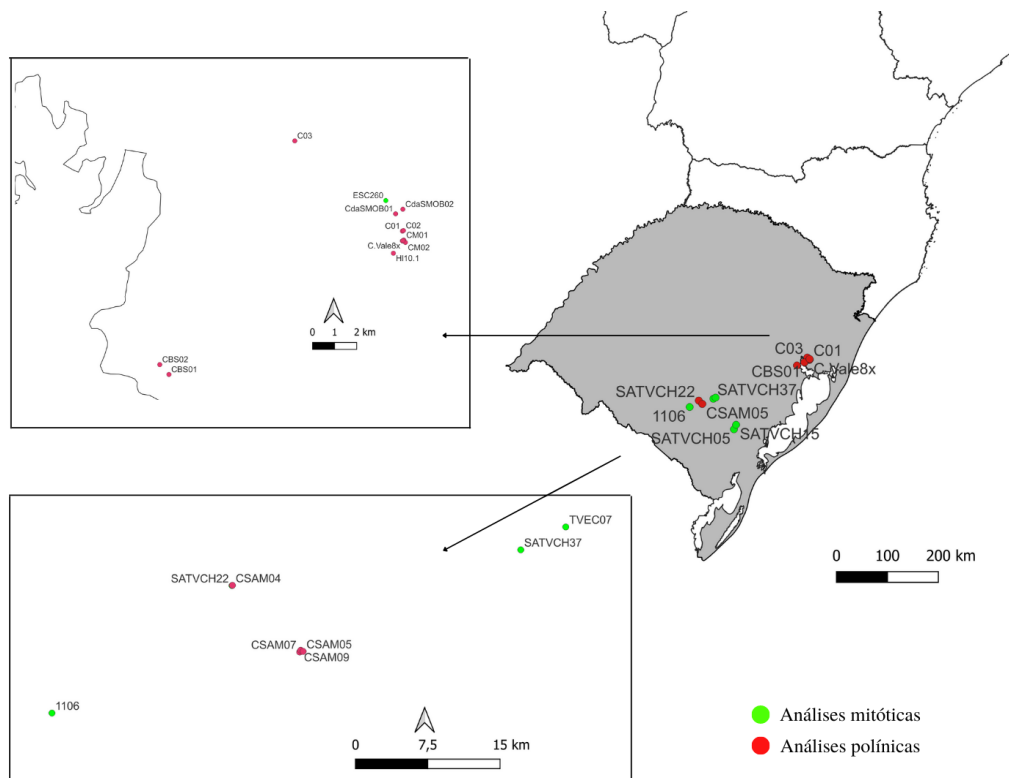


Figura 2. Mapa com os pontos de coleta para *H. pulchella* e *H.lahue*. Os retângulos em destaque permitem uma melhor visualização de pontos de coleta próximos..

Tabela 1. Sítios de coleta de todas as populações de *H. lahue* e de *H. pulchella* analisadas, apresentando o número de coleta, longitude, latitude, localidade, níveis de ploidia inferidos pela morfologia e/ou confirmados previamente pela literatura e tipo de análise realizada no trabalho (mitótica ou polínica).

Espécie	Nº de coleta	Longitude	Latitude	Localidade	Nível de ploidia inferido pela morfologia	Nível de ploidia confirmado na literatura*	Análises mitóticas	Análises polínicas
<i>H. lahue</i>	C01	-51.11988	-30.06768	Porto Alegre		2x*	-	X
<i>H. lahue</i>	C02	-51.11942	-30.06747	Porto Alegre		2x*	-	X
<i>H. lahue</i>	CMGA01	-51.39264	-30.18011	Guaíba	2x	2x*	-	X
<i>H. lahue</i>	CBS01	-51.22930	-30.12601	Porto Alegre		-	-	X
<i>H. lahue</i>	HI 10.1	-51.12411	-30.07669	Porto Alegre		-	-	X
<i>H. lahue</i>	CM01	-51.11923	-30.07136	Porto Alegre		6x*	-	X
<i>H. lahue</i>	CM02	-51.11847	-30.07229	Porto Alegre		6x*	-	X
<i>H. lahue</i>	C03	-51.17032	-30.03097	Porto Alegre	6x	6x*	-	X
<i>H. lahue</i>	C. Vale 6x	-51.11992	-30.07168	Porto Alegre		-	-	X
<i>H. lahue</i>	CSAM07	-53.43036	-30.89532	Caçapava do Sul		8x*	-	X
<i>H. lahue</i>	CSAM09	-53.42928	-30.89366	Caçapava do Sul	8x	8x*	-	X
<i>H. lahue</i>	C. Vale 8x	-51.11963	-30.07155	Porto Alegre		-	-	X
<i>H. pulchella</i>	CBS02	-51.23361	-30.12200	Porto Alegre		-	-	X
<i>H. pulchella</i>	CdaSMOB01	-51.12307	-30.06066	Porto Alegre		-	-	X
<i>H. pulchella</i>	CdaSMOB02	-51.11967	-30.05880	Porto Alegre	4x	-	-	X
<i>H. pulchella</i>	CSAM04	-53.50354	-30.83278	Caçapava do Sul		-	-	X

Tabela 1. Sítios de coleta de todas as populações de *H. lahue* e *H. pulchella* analisadas, apresentando o número de coleta, longitude, latitude, localidade, níveis de ploidia inferidos pela morfologia e/ou confirmados previamente pela literatura e tipo de análise realizada no trabalho (mitótica ou polínica).

Espécie	Nº de coleta	Longitude	Latitude	Localidade	Nível de ploidia inferido pela morfologia	Nível de ploidia confirmado na literatura*	Análises mitóticas	Análises polínicas
<i>H. pulchella</i>	CSAM05	-53.42671	-30.89471	Santana da Boa Vista		-	-	X
<i>H. pulchella</i>	1106	-53.699833	-30.952500	Bagé		-	X	-
<i>H. pulchella</i>	ESC260	-51.127667	-30.055250	Porto Alegre		-	X	-
<i>H. pulchella</i>	SATVCH05	-52.746667	-31.363333	Canguçu		-	X	-
<i>H. pulchella</i>	SATVCH15	-52.701111	-31.280278	Canguçu	4x	-	X	-
<i>H. pulchella</i>	SATVCH22	-53.504000	-30.833000	Caçapava do Sul		-	X	-
<i>H. pulchella</i>	SATVCH37	-53.189989	-30.799450	Santana da Boa Vista		-	X	-
<i>H. pulchella</i>	TVEC07	-53.141028	-30.777972	Santana da Boa Vista		-	X	-

Os asteriscos (*) correspondem aos dados de nível de ploidia das populações previamente confirmados através de citometria de fluxo por Martins *et. al* (2020). O traço vertical (-) representa a ausência de dados e, quando se refere ao nível de ploidia, supõe que foi obtido unicamente através da morfologia das espécies. O símbolo (X) se refere ao tipo de análise realizada no presente estudo para cada população.

3.2. ANÁLISES MITÓTICAS

Para a obtenção do número cromossômico e nível de ploidia das populações de *H. pulchella* (Tabela 1) em vista da investigação da existência da série poliploide, raízes jovens com aproximadamente 1 cm foram coletadas de bulbos, pré-tratadas com agente antimitótico (8-hidroxiquinolina) por 24 horas a 15°C e fixadas em solução Carnoy (3 álcool etílico : 1 ácido acético), sendo posteriormente armazenadas no freezer. No momento do preparo das lâminas, os meristemas radiculares passaram por digestão enzimática em banho-maria a 37°C por cerca de 1h30min, sendo dissociados em solução de 3:1 fresco seguindo o protocolo de secagem ao ar de Carvalho e Saraiva (1993). Subsequentemente, as lâminas foram coradas em solução de Giemsa (Merck) 2%, onde as melhores metáfases foram analisadas e fotografadas em microscópio Zeiss Axioplan, através do sistema de captura digital de imagem do software AxioVision Zeiss.

3.3. ANÁLISES POLÍNICAS

Para as análises de quantificação, potencial de fertilização e morfologia do grão de pólen, foram utilizados botões florais de, no mínimo, três indivíduos por população, coletados antes da antese e previamente fixados em solução Carnoy. Cada um destes indivíduos teve suas três anteras (com tamanho aproximado de 5-8,5 mm) maceradas em solução de Alexander 1% (Alexander, 1980), permitindo a visualização dos grãos de pólen para distintas análises. Demais dados referentes ao tamanho amostral se encontram junto aos resultados, nas tabelas 2, 3 e 4.

3.3.1. Quantificação

Dada a aparente diferença quanto à produção de pólen entre os distintos citótipos, uma metodologia visando a quantificação de grãos de pólen foi desenvolvida. As anteras dos indivíduos hexaploides e octaploides de *H. lahue* foram maceradas em 200µL de solução Alexander 1%, enquanto os indivíduos tetraploides de *H. pulchella* e diploides de *H. lahue* tiveram suas anteras maceradas em 1mL do mesmo preparo, totalizando 5 populações e 18 indivíduos para *H. lahue* 2x, 4 populações e 16 indivíduos para *H. lahue* 6x, 3 populações e 10 indivíduos para *H. lahue* 8x e 5 populações e 19 indivíduos para *H. pulchella*. Destes, 20µL foram transferidos para a Câmara de Neubauer (Figura 3A), uma placa de vidro grossa

marcada por depressões e elevações. A área com marcações é dividida em nove quadrados largos, cada um medindo 1 mm de largura e 1 mm de comprimento, sendo que os quatro quadrantes laterais foram utilizados para a contabilização dos grãos, indicados em vermelho na Figura 3B. A contagem seguiu as regras representadas na Figura 3C, onde apenas os grãos presentes no interior do quadrante e sobrepostos às linhas que demarcam dois lados do perímetro do quadrado foram considerados (representados em preto), enquanto os grãos no exterior do quadrante e nos outros dois lados do perímetro foram desconsiderados (visualizados em branco). No total, foram realizadas séries de quatro repetições por indivíduo. Visto que há um espaço de 0,1 mm entre a lamínula e a área de contagem (Figura 3D), foi possível realizar a estimativa do número de grãos de pólen por volume através das seguintes fórmulas, que retratam a quantificação do pólen por flor (três anteras) e em uma única antera:

$$\text{Produção de pólen por flor} = \frac{\text{Volume total de líquido} \times N^{\circ} \text{ de grãos de pólen contabilizados}}{\text{Volume de líquido contabilizado}}$$

$$\text{Produção de pólen por antera} = \frac{\text{Volume total de líquido} \times N^{\circ} \text{ de grãos de pólen contabilizados}}{\text{Volume de líquido contabilizado} / 3}$$

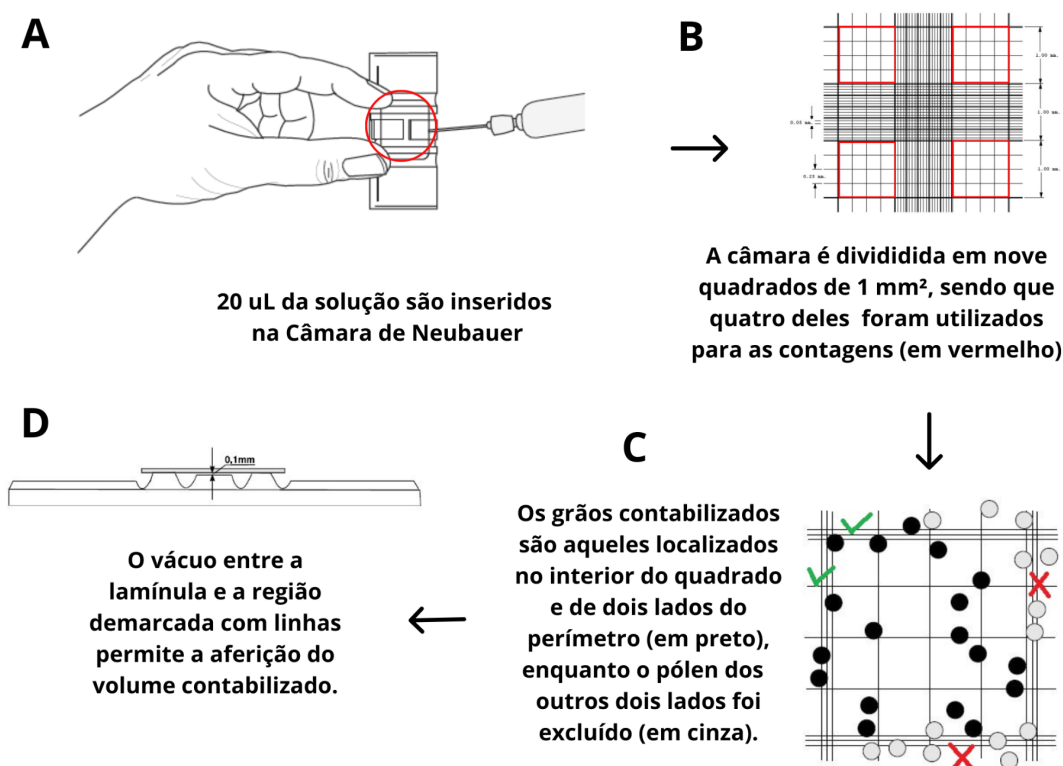


Figura 3. Método de quantificação de grãos de pólen através da Câmara de Neubauer. Fonte: Criado pela autora com imagens retiradas do tutorial “Manual Cell Counting With Neubauer Chamber”, de Laboratory Info (2022).

3.3.2. Potencial de fertilização

Para estimar o potencial de fertilização de *H. pulchella* e dos citótipos de *H. lahue*, 500 grãos de pólen corados em Alexander 1% foram contabilizados para cada indivíduo imediatamente após a coloração, totalizando 9000 grãos para o citótipo diploide de *H. lahue* (18 indivíduos), 8000 grãos para o citótipo hexaploide (16 indivíduos), 4500 grãos para o citótipo octaploide (18 indivíduos) e 9500 grãos para *Herbertia pulchella* (19 indivíduos). Dessa forma, os grãos puderam ser classificados em viáveis e inviáveis (ALEXANDER, 1980), onde os primeiros são cheios e apresentam coloração roxa, enquanto os inviáveis permanecem com um aspecto vazio e corados de verde.

3.3.2. Morfologia

Os eixos polares (P) e equatoriais (E) (Figura 4) de 20 grãos de pólen considerados viáveis foram mensurados através do software AxioVision Zeiss para cada indivíduo amostrado, com uma repetição de aproximadamente 3 indivíduos para cada uma das dezessete populações (Tabela 2). Por meio da razão entre os eixos polares e equatoriais (P/E), a morfologia dos grãos foi classificada de acordo com Erdtman (1971) para cada população.

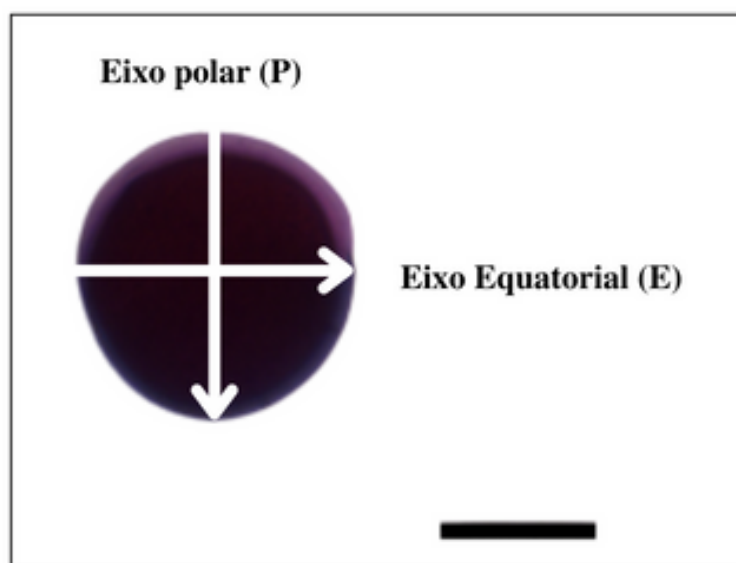


Figura 4. Eixos do grão de pólen do citótipo diploide de *H. lahue*. Escala: 20 μm .

3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Através do software R (versão 4.2.1), foram realizadas análises de significância estatística da variação do tamanho, da quantidade e do potencial de fertilização dos grãos de pólen entre os quatro citótipos de *Herbertia*. A variação das medidas do grão também foi testada entre as populações de um mesmo citótipo. O teste de Shapiro-Wilk e o teste de Levene foram utilizados para verificação da normalidade e homogeneidade das variâncias. Em dados paramétricos, utilizou-se a ANOVA com post-hoc do teste HSD de Tukey para comparação entre as médias dos grupos. Os dados não paramétricos foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn com correção de Bonferroni.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISES MITÓTICAS

A análise citogenética demonstrou que todas as sete populações de *H. pulchella* analisadas neste estudo (Tabela 1) possuem 28 cromossomos, configurando-se como tetraploides ($2n = 4x = 28$) e mantendo o número cromossômico básico de $x = 7$, característico da tribo Tigridieae (Figura 5).

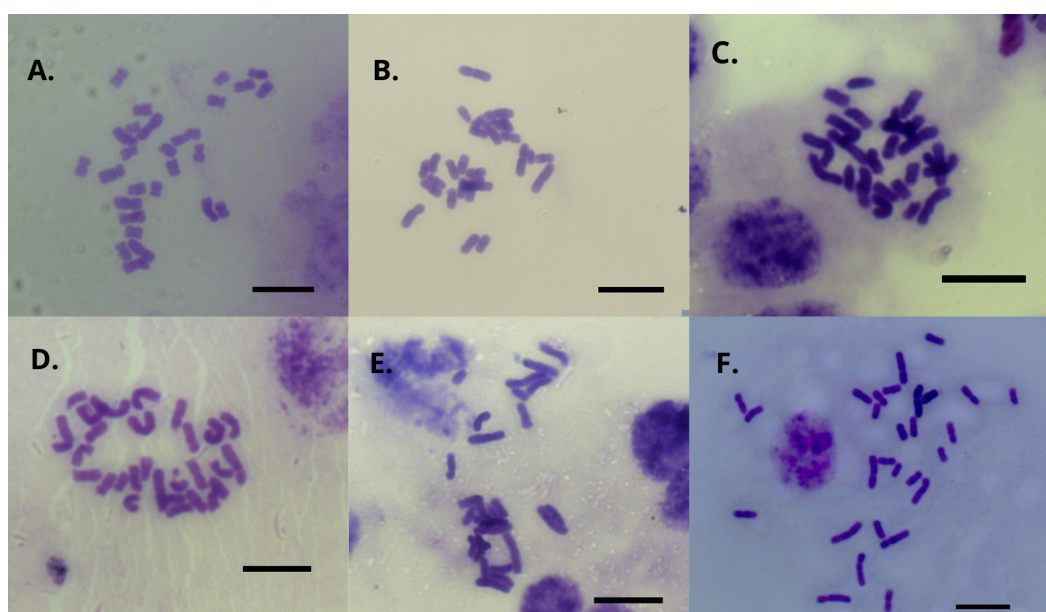


Figura 5. Números cromossômicos de seis populações de *H. pulchella* ($2n = 4x = 28$): A - ESC260; B - SATVCH05; C - SATVCH22; D - TVEC07; E - SATVCH15; F - SATVCH37. Escala: 10 μ m.

4.2. ANÁLISES POLÍNICAS

Os grãos de pólen de todos os citótipos de ambas as espécies foram classificados como subesfeirodal, dado que a razão entre P/E variou de 0,82 até 0,98, o que permite uma subclassificação entre as morfologias oblado esfeirodal e suboblado. O citótipo diploide apresentou acessos apenas com morfologia oblado esfeirodal, enquanto os demais citótipos apresentaram ambas morfologias citadas (Tabela 2). Os valores mínimos e máximos para a medida de cada eixo por acesso estão apresentados na Tabela 2, variando de 26,7 - 64,9 μ m para o eixo equatorial (E) e de 24,5 até 56,6 μ m para o eixo polar (P).

Tabela 2. Medidas relacionadas aos grãos de pólen das espécies *Herbertia lahue* e *Herbertia pulchella*, apresentando o nível de ploidia, n° de indivíduos mensurados por população (N), valores máximos, mínimos, média e desvio padrão (DP) para o eixo equatorial (E) e polar (P), razão entre os eixos e morfologia dos grãos.

Espécie	Ploidia	Acesso	N	Eixo equatorial (E) μm		Eixo polar (P) μm		Razão P/E	Morfologia*
				Mín-Máx (média)	DP	Mín-Máx (média)	DP		
<i>H. lahue</i>		C01	60	26,7-43,5(36,3)	4,18	30,5-40,4(35,5)	2,22	0,98	
<i>H. lahue</i>		C02	60	32,3-42,5(37,3)	2,60	30,1-38,7(34,7)	2,19	0,93	
<i>H. lahue</i>	2x	CMGA01	80	30,6-53,5(39,2)	4,73	27,8-47,4(35,5)	3,96	0,90	Oblado esferoidal
<i>H. lahue</i>		CBS01	80	29,2-42,6(35,4)	2,89	31,1-39,6(34,9)	1,9	0,98	
<i>H. lahue</i>		HI 10.1	80	27,6-43,2(34,8)	3,58	24,5-39,2(31)	2,58	0,89	
<i>H. pulchella</i>		CBS02	80	30,5-49,2(41)	4,68	26,4-42,9(36,1)	3,60	0,88	Oblado esferoidal
<i>H. pulchella</i>		CdaSMOB01	80	37,1-51(44,7)	3,02	32,7-43,3(37,4)	2,27	0,84	Suboblado
<i>H. pulchella</i>	4x	CdaSMOB02	60	37,5-50,1(42,1)	2,31	30-45,5(36,3)	2,88	0,86	Suboblado
<i>H. pulchella</i>		CSAM04	80	31,9-48,4(42,5)	4,04	33,6-44,4(39,1)	2,72	0,92	Oblado esferoidal
<i>H. pulchella</i>		CSAM05	80	35,1-49,4(42,1)	2,87	33,9-47,8(39,6)	2,95	0,94	Oblado esferoidal
<i>H. lahue</i>		CM01	80	38-57,6(51,4)	3,30	39,8-50,4(43)	2,06	0,84	Suboblado
<i>H. lahue</i>		CM02	80	42,6-58,6(49,3)	3,20	38,4-56,6(43,7)	3,04	0,87	Suboblado
<i>H. lahue</i>	6x	C03	80	30,4-47,8(37,3)	3,68	28-39,9(33,8)	3,04	0,90	Oblado esferoidal
<i>H. lahue</i>		C. Vale 6x	80	38,9-56,4(47,9)	3,26	36,1-49,7(41,1)	2,93	0,86	Suboblado
<i>H. lahue</i>		CSAM07	60	30,9-54,1(40,7)	5,60	30,4-42,1(36)	3,03	0,88	Oblado esferoidal
<i>H. lahue</i>	8x	CSAM09	40	34,1-54,1(42,8)	5,49	31,8-42,1(37,1)	2,90	0,87	Suboblado
<i>H. lahue</i>		C. Vale 8x	80	44,2-64,9(53,5)	5,77	36,8-56,2(44,1)	5,19	0,82	Suboblado

*Segundo Erdtman (1971).

Indivíduos octaploides ($2n = 8x = 56$) e hexaploides tiveram ($2n = 6x = 42$) as maiores medidas de grãos de pólen, em contraponto ao citótipo diploide ($2n = 2x = 14$), detentor das menores medidas polínicas (Figura 6A-6D, Tabela 4). O teste de Kruskal-Wallis revelou que existe diferença significativa entre os quatro níveis de ploidia para os eixos equatoriais e polares ($X^2_{(3)} = 471,39$, $p < 0,001$; $X^2_{(3)} = 358,94$, $p < 0,001$, respectivamente), sendo que todos os citótipos possuíram medidas dos eixos polares que os diferem entre si (Teste de Dunn, $p < 0,1$). No entanto, para o eixo equatorial, não houve diferença significativa entre hexaploides (48 e 7,94; mediana e amplitude interquartil) e octaploides (47,2 e 13,9). Ademais, as Figuras 7C-7D nos permitem visualizar certa sobreposição entre os valores mínimos e máximos dos eixos equatoriais e polares para as diferentes ploidias.

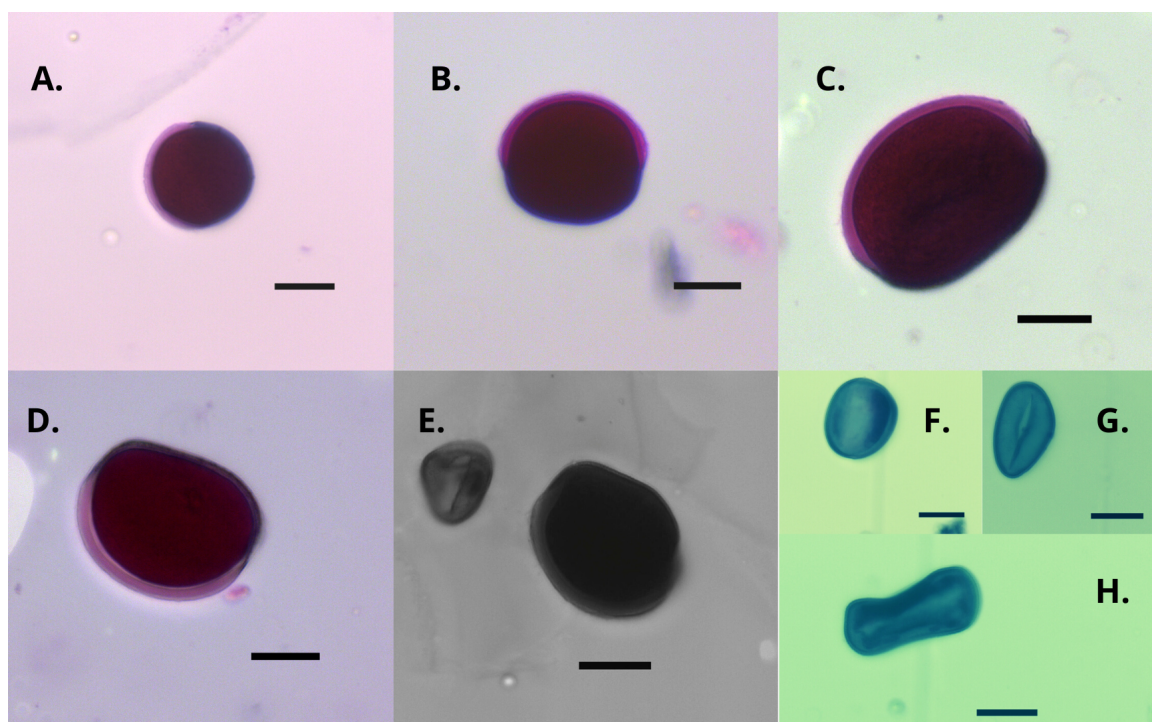


Figura 6. Grãos de pólen. A - *H. lahue* 2x. B - *H. pulchella* (4x). C - *H. lahue* 6x. D - *H. lahue* 8x. E - Comparação entre grão de pólen viável e inviável. F, G e H - Exemplos de grãos de pólen inviáveis frequentemente encontrados nas lâminas. Escala: 20 μ m.

Quando os testes estatísticos foram utilizados para comparações múltiplas entre os acessos de um mesmo citótipo, diploides apresentaram complexas relações de significância entre os eixos das cinco populações analisadas, com uma diferença significativa demonstrada pelo teste de Kruskal-Wallis entre alguns dos grupos (Equatorial: $X^2_{(4)} = 49,174$, $p < 0,001$; Polar: $X^2_{(4)} = 107,59$, $p < 0,001$). Enquanto as populações C01, C02 e CBS01 não diferiram

entre si, a população HI 10.1 diferiu de todas as outras, exceto no eixo equatorial de C01 e no de CBS01. CMGA, por sua vez, não diferiu de C02 (Apêndice, Figuras 1A-1B).

No citótipo tetraploide de *H. pulchella*, a população CdaSMOB01 diferiu de todas as outras quanto ao eixo equatorial (Teste de Dunn, $p < 0,01$). Para o eixo polar, a população CSAM05 diferiu das populações CdaSMOB01, CdaSMOB01 e CBS02. CdaSMOB01, por sua vez, se distinguiu de CSAM05 e de CSAM04, únicas populações de *H. pulchella* não pertencentes à região de Porto Alegre (Apêndice, Figuras 1C-1D).

Para as populações hexaploides, houve diferença significativa para ambos eixos pelo teste de Kruskal-Wallis (Equatorial: $X^2_{(3)} = 196,93$, $p < 0,001$; Polar: $X^2_{(3)} = 191,93$, $p < 0,001$), apesar de CM02 e CM01 não diferirem quanto ao eixo polar ($p = 1$, teste de Dunn), bem como CM02 e C. Vale 6x em relação ao eixo equatorial ($p = 0,478$, teste de Dunn) (Apêndice, Figuras 1E-1F). Em relação aos octaploides, a população C. Vale 8x, proveniente de Porto Alegre, (53,2 e 9,54; mediana e amplitude interquartil) diferiu significativamente em ambos eixos das populações de Caçapava do Sul CSAM07 (38,8 e 9,31) e CSAM09 (41,4 e 10,1), que se apresentaram como similares (Apêndice, Figuras 1G-1H).

Quanto ao potencial de fertilização, não houve diferença significativa entre os quatro níveis de ploidia de *Herbertia* segundo o teste de Kruskal-Wallis ($X^2_{(3)} = 1,8051$, $p = 0,6138$), visto que a porcentagem de grãos de pólen viáveis variou de 93,02% em *H. lahue* 8x até 94,96% para o citótipo tetraploide de *H. pulchella* (Tabela 4). A Figura 7B nos permite observar que as medianas dos quatro grupos são semelhantes, enquanto os resultados do potencial de fertilização por acesso estão expostos na tabela 3, onde podemos visualizar o valor mínimo de 83,40% para CSAM07 (*H. lahue* 8x) e o valor máximo de 99,45% para C. Vale 6x (*H. lahue* 6x).

Nas análises de quantificação, a ANOVA de uma via demonstrou que há efeito da ploidia na quantidade de grãos de pólen produzidos por flor [$F(3, 58) = 15,75$; $p < 0,001$]. O post-hoc de Tukey HSD mostrou que há diferença significativa entre o citótipo diploide, maior produtor de pólen, e os demais citótipos. Tetraploides, hexaploides e octaploides, no entanto, não apresentaram diferenças significantes entre si (Figura 7A, Tabela 4). Demais estimativas de quantificação, separadas por população, estão expostas na Tabela 3, variando amplamente de 11.750 grãos para CM02 (*H. lahue* 6x) até 70.555 grãos para C01 (*H. lahue* 2x).

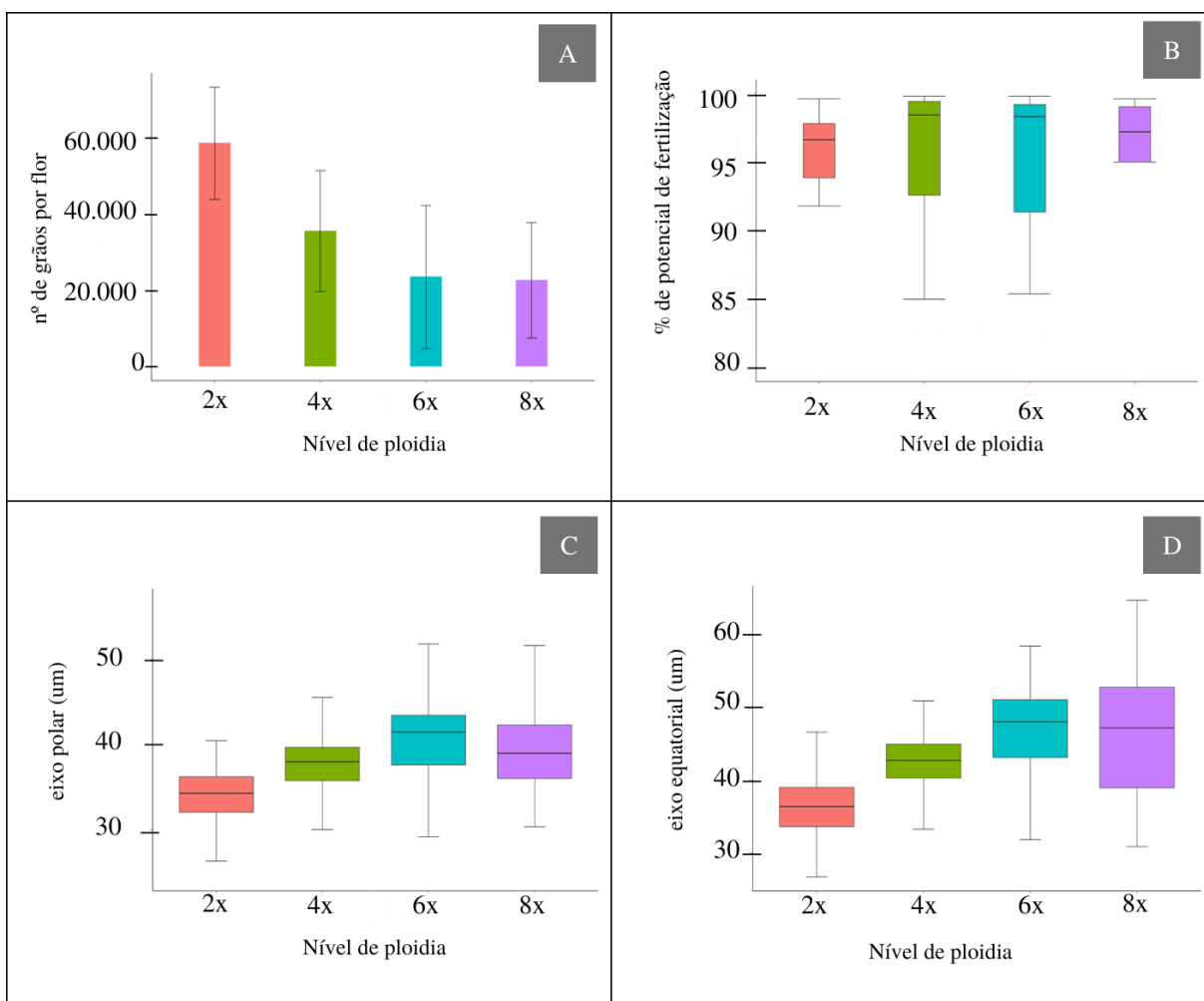


Figura 7. Boxplots da variação dos atributos polínicos analisados nos quatro níveis de ploidia do gênero *Herbertia*. A - Número de grãos por flor. B - Potencial de fertilização. C - Medidas do eixo polar (µm). D - Medidas do eixo equatorial (µm). Cada cor representa uma espécie ou citótipo distinto: *H. lahue* 2x (vermelho), *H. pulchella* 4x (verde), *H. lahue* 6x (azul) e *H. lahue* 8x (roxo).

Tabela 3. Quantificação e potencial de fertilização dos grãos de pólen das espécies *Herbertia lahue* e *Herbertia pulchella*, apresentando nível de ploidia, número de indivíduos utilizados para cada população, média do nº de grãos de pólen por antera e por flor, nº de grãos viáveis e inviáveis e porcentagem de grãos viáveis.

Espécie	Ploidia	Acesso	Quantificação			Potencial de fertilização	
			Nº de indivíduos	Nº de grãos por antera	Nº de grãos por flor	Nº de grãos viáveis (inviáveis)	% de grãos viáveis
<i>H. lahue</i>		C01	3	23.518	70.555	1356(144)	90,40%
<i>H. lahue</i>		C02	3	14.722	44.166	1444(56)	96,26%
<i>H. lahue</i>	2x	CMGA01	4	19.166	57.500	1930(70)	96,50%
<i>H. lahue</i>		CBS01	4	21.250	63.750	1930(70)	96,50%
<i>H. lahue</i>		HI 10.1	4	19.166	57.500	1805(195)	90,25%
<i>H. pulchella</i>		CBS02	4	9.375	28.125	1714(286)	85,70%
<i>H. pulchella</i>		CdaSMOB01	4	10.000	30.000	1941(59)	97,05%
<i>H. pulchella</i>	4x	CdaSMOB02	3	11.388	34.166	1409(91)	93,93%
<i>H. pulchella</i>		CSAM04	4	13.125	39.375	1984(16)	99,20%
<i>H. pulchella</i>		CSAM05	4	15.416	46.250	1973(27)	98,65%
<i>H. lahue</i>		CM01	4	4.708	14.125	1813(187)	90,65%
<i>H. lahue</i>		CM02	4	3.916	11.750	1878(122)	93,90%
<i>H. lahue</i>	6x	C03	4	18.208	54.625	1805(195)	90,25%
<i>H. lahue</i>		C. Vale 6x	4	4.708	14.125	1989(11)	99,45%
<i>H. lahue</i>		CSAM07	3	12.500	37.500	1251(249)	83,40%
<i>H. lahue</i>	8x	CSAM09	3	8.166	24.500	973(27)	97,30%

H. lahue

C. Vale 8x

4

6.125

18.375

1962(38)

98,10%

Tabela 4. Potencial de fertilização, quantificação e medidas dos grãos de pólen para os quatro níveis de ploidia de *Herbertia*.

Tipo de análise		<i>H. lahue</i> 2x	<i>H. pulchella</i>	<i>H. lahue</i> 6x	<i>H. lahue</i> 8x	
Medidas	Eixo Equatorial (μm)	Nº de grãos mensurados	360	380	320	180
		Média	36,6	42,5	46,5	46,8
		Mín-Máx	26,7-53,5	30,5-51	30,4-58,6	30,9-64,9
		Desvio Padrão	4,03	3,74	6,4	8,18
	Eixo Polar (μm)	Nº de grãos mensurados	360	380	320	180
		Média	34,2	37,8	40,4	39,8
		Mín-Máx	24,5-47,4	26,4-47,8	28-56,6	30,4-56,2
		Desvio Padrão	3,22	3,23	4,84	5,6
Potencial de fertilização	Nº de grãos viáveis (inviáveis)	8465(535)	9021(479)	7485(515)	4186(314)	
	% de grãos viáveis	94,05%	94,96%	93,56%	93,02%	
Quantificação	Nº de indivíduos	18	19	16	10	
	Média de grãos de pólen por antera	19.614	11.886	7.885	7.592	
	Média de grãos de pólen por flor	58.843	35.658	23.656	22.778	

5. DISCUSSÃO

A sobrevivência e manutenção dos poliploides em populações naturais enfrenta diversas barreiras significativas, como a exclusão do citótipo minoritário (LEVIN, 1975). A baixa frequência de determinados citótipos dificulta a procura por parceiros sexuais, reduzindo o *fitness* e levando à fixação do citótipo com maior taxa reprodutiva. Dessa forma, as desvantagens iniciais impostas pela poliploidia são muitas vezes superadas a partir de outras vias reprodutivas, tais como a autofertilização, a apomixia e a reprodução clonal (HUSBAND *et al.*, 2008; OTTO; WHITTON, 2000; STEBBINS, 1971). Nossos resultados mostram que para *Herbertia lahue*, a quantidade de pólen presente por flor nos indivíduos diploides é maior do que nos grupos poliploides, o que parece sugerir que este citótipo esteja mais comprometido com a reprodução sexual, e mais especificamente, com a fecundação cruzada, visto que experimentos recentes de nosso grupo de pesquisa apontam para a autoincompatibilidade no citótipo diploide de *Herbertia lahue*.

A quantidade reduzida de pólen nos citótipos octaploide e hexaploide de *H. lahue* possivelmente está relacionada a duas estratégias reprodutivas que permitem a simpatria dos citótipos através da exclusão da competição: a reprodução clonal via bulbos e a autofertilização. A incidência da reprodução assexuada via clonalidade em poliploides de angiospermas é fortemente suportada por evidências que demonstram uma correlação positiva entre propagação clonal, níveis de ploidia elevados e maior número cromossômico. No clado das monocotiledôneas, caso de *Herbertia*, evidências fortes sugerem que a reprodução clonal evoluiu como fator secundário associado à poliploidia (VAN DRUNEN; HUSBAND, 2019). A formação de frutos via autofertilização para os indivíduos octaploides e hexaploides de *H. lahue*, por sua vez, já foi demonstrada através do estudo de Stiehl-Alves *et al.* (2016), onde tais citótipos tiveram sucesso polínico similar associado a baixos índices de auto incompatibilidade (ISI) de 0,138 e 0,183, respectivamente. Por não serem dependentes de vetores polínicos, se propagarem vegetativamente por bulbos e utilizarem a autofertilização como estratégia reprodutiva, a coexistência dos citótipos em populações naturais pode ser favorecida. Além disso, fatores ecofisiológicos também podem interferir nessa questão, como apontado por Certner *et al.* (2022), ressaltando a importância de estudos envolvendo tais aspectos para as espécies de *Herbertia*.

A coexistência dos citótipos de *Herbertia* em determinados ambientes também parece levar a diferentes estratégias reprodutivas que evitam a competição e promovem o estabelecimento dos poliploides, como é o caso de *Butomus umbellatus* L. (Butomaceae). Para

esta espécie, a reprodução clonal explica a alta frequência de triploides em populações de ploidias mistas, visto que os demais citótipos estão comprometidos com a reprodução sexuada. Assim, o fitness dos indivíduos em populações mistas se torna praticamente independente da frequência citotípica (CERTNER *et al.*, 2022).

Herbertia pulchella, no entanto, foi considerada autoincompatível e dependente de polinizadores, especialmente abelhas coletoras de pólen (STIEHL-ALVES *et al.*, 2016; OLEQUES *et al.*, 2020; BÁEZ-LIZARAZO *et al.*, 2021), levantando um novo questionamento: como poderíamos explicar a baixa quantidade de pólen nessa espécie, quando comparada ao citótipo diploide de *Herbertia lahue*, com o qual também é encontrada em simpatria?

Apesar da amostragem considerável para as populações de *H. pulchella*, apenas o citótipo tetraploide foi encontrado no Rio Grande do Sul. No estudo de Winge (1959), o registro diploide para a espécie *Alophia pulchella* (Sweet) Kuntze permanece conflituoso, visto que incertezas taxonômicas e a dificuldade na delimitação das espécies são citadas pela própria autora em seu trabalho. A imagem representada de *A. pulchella* no artigo, inclusive, registra uma *H. lahue*, dada a ausência da listra vertical branca que caracteriza *H. pulchella*. Por sua vez, os únicos registros hexaploides para a espécie obtidos por Kenton e Heywood (1984) e Goldblatt e Takei (1997) tratam de populações da Argentina e Uruguai.

Considerando a inexistência de uma série poliploide no estado do Rio Grande do Sul, podemos inferir que *H. pulchella* e *H. lahue* seguiram caminhos evolutivos distintos. No entanto, tais inferências ainda são muito especulativas, dada a ausência de estudos fenológicos envolvendo *H. lahue*, bem como de estudos que testem a taxa reprodutiva entre *H. pulchella* e *H. lahue*, deixando uma lacuna sobre os reais termos de competição dessas espécies. Diferenças entre o tempo de abertura floral e a frequência de visita dos polinizadores, por exemplo, poderiam explicar seu comportamento reprodutivo e simpátrico. Para os citótipos de *Larrea* Cav., indivíduos tetraploides eram mais visitados por *Apis mellifera*, enquanto os indivíduos diploides eram polinizados mais vezes por espécies nativas. Tal especialização reduzia a influência do fenômeno do citótipo minoritário, permitindo a formação de uma barreira pré-zigótica efetiva (LAPORT; MINCKLEY; PILSON, 2021).

Por outro lado, o potencial de fertilização dos grãos de pólen não parece ter sido afetado por sua quantidade, visto que os índices de viabilidade entre os quatro níveis de ploidia do gênero foram similares. Sendo assim, apesar das espécies poliploides apresentarem pouco pólen quando comparadas com o citótipo diploide, o potencial destes grãos serem férteis continua alto. Os dados confirmam os já reportados pela literatura, que indicaram

porcentagens de viabilidade variando de 93-99% para o pólen de *H. pulchella* e de 98% para *H. lahue* (MORAES *et al.*, 2015; STIEHL-ALVES *et al.*, 2017). A alta viabilidade polínica indica regularidade na meiose, como apontado por Moraes *et al.* (2015), em estudo que comprova a estabilidade meiótica de *H. pulchella*.

Em poliploides recentes, a presença de anormalidades meióticas como univalentes, multivalentes e pontes cromossômicas é relativamente comum, visto que a geração de gametas normais é prejudicada pela segregação desigual dos homólogos, originando aneuploidias e desbalanceamentos cromossômicos (RAMSEY e SCHEMSKE, 2002; CIFUENTES *et al.*, 2010). No entanto, a alta estabilidade meiótica indicada pela presença dos grãos de pólen viáveis em *Herbertia* indica que os poliploides já se encontram bem estabelecidos nas populações naturais, tendo comportamento similar aos diploides na produção de gametas. O fenômeno conhecido como diploidização, onde poliploides passam a exibir um comportamento meiótico semelhante aos diploides também é um fator a ser considerado na manutenção dos citótipos de *Herbertia* (CIFUENTES *et al.*, 2010).

A alta viabilidade dos grãos de pólen também é fundamental para o sucesso da fertilização e formação do estoque de sementes (STIEHL-ALVES *et al.*, 2017). No entanto, Ramsey e Schemske (2002) alertam para o fato de que medidas do potencial de fertilização do pólen são frequentemente maiores do que o percentual de sementes realmente viáveis, fato confirmado em um estudo recente de Martins *et al.* (2020) envolvendo os quatro níveis de ploidia do gênero *Herbertia*. Entre a amostragem analisada, os octaploides apresentaram a menor porcentagem de sementes viáveis (84,7%), enquanto os hexaploides apresentaram as maiores taxas (90,2%), apesar do potencial de fertilização dos grãos de pólen não ter apresentado diferenças significativas em nosso estudo, demonstrando a necessidade de uma interpretação mais cuidadosa a respeito dos dados polínicos associados com demais estudos reprodutivos e ecofisiológicos.

Em *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae), o tamanho do grão de pólen pode ser utilizado para distinguir os diferentes citótipos do grupo, com os hexaploides tendo pequenas anteras com grandes grãos de pólen e os diploides possuindo anteras grandes e grãos de pólen pequenos (TACUATIÁ *et al.*, 2012). Contudo, apesar de diferenças significativas entre as medidas do pólen terem sido encontradas para os diferentes citótipos de *Herbertia*, estas não se mostraram suficientes para estimar o nível de ploidia unicamente por meio dessa metodologia, uma vez que há sobreposição de determinados valores para ambos eixos (Figuras 7C e 7D). Além disso, os níveis de ploidia superiores (octaploides e hexaploides) não apresentaram diferenças significantes em seu eixo polar. Tais resultados se assemelham aos

encontrados para *Pilosella* Hill (Asteraceae) por Rotreklová e Krahulcová (2016), onde o valor de significância encontrado pelo teste de Kruskal-Wallis não foi o bastante para distinguir todos os citótipos do gênero unicamente através dessa metodologia.

Todavia, a relação apontada por diversos estudos entre nível de ploidia e tamanho do grão de pólen também é observada em *Herbertia*, onde indivíduos de citótipos superiores apresentam grãos de pólen maiores. O famoso efeito “giga” é capaz de explicar estes resultados, dado que a duplicação cromossômica pode causar um aumento do tamanho e volume da célula, bem como de alguns órgãos reprodutivos ou vegetativos, como flores, anteras, folhas e sementes (RAMSEY; SCHEMSKE, 2002; NIAZIAN; NALOUSHI, 2020). Para *Eriotheca* Schott & Endl. (Malvaceae), por exemplo, os citótipos com maiores níveis de ploidia, como hexaploides, tiveram dimensões superiores em relação ao tamanho do grão de pólen quando comparados com tetraploides e diploides (MARINHO *et al.*, 2014).

Tais resultados relacionados ao “giga” *size effect* coincidem com os encontrados por Martins *et al.* (2020), onde as sementes dos indivíduos diploides possuem menores dimensões do que as sementes dos octaploides e hexaploides. Além disso, o citótipo hexaploide de *H. lahue* apresentou o maior valor de massa das sementes, sendo quase duas vezes o peso dos diploides. Outro aspecto relevante é o fato de que os níveis de ploidia com sementes maiores e mais pesadas de *Herbertia* (tetraploide, hexaploide e octaploide) apresentaram taxa de germinação mais elevada do que indivíduos diploides, o que também pode ser utilizado como argumento para sustentar a menor quantidade de pólen nesses citótipos, já que o sucesso de viabilidade das sementes parece ser maior do que em indivíduos diploides. Assim, poliploides poderiam investir em uma menor quantidade de pólen e sementes mais pesadas e maiores que garantam uma germinação adequada, enquanto os diploides investem na produção em larga escala de pólen e sementes, com taxa de sucesso menor. Além disso, grãos de pólen maiores também foram associados com a velocidade de crescimento e tamanho do tubo polínico, favorecendo o *fitness* dos gametas masculinos (HUMPHREY, 2016).

Por fim, as diferenças encontradas nas medidas entre as populações de um mesmo citótipo podem indicar a presença de efeitos ambientais atuando nos grãos de pólen, visto que populações próximas geograficamente e sujeitas a condições ambientais similares apresentaram similaridade no tamanho dos grãos. Em *Cucurbita pepo* L. (Cucurbitaceae), por exemplo, plantas presentes em solos com altos níveis de nitrogênio produzem grãos de pólen maiores (LAU; STEPHENSON, 1993), levando à uma plasticidade fenotípica adaptativa em resposta às condições locais do ambiente (HUMPHREY, 2016).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por representarem os gametófitos masculinos na reprodução sexuada das plantas, estudos envolvendo grãos de pólen se tornam fundamentais para o entendimento de questões envolvendo distintas estratégias reprodutivas das espécies vegetais. Nesse contexto, as análises polínicas realizadas no presente trabalho foram capazes de elucidar características importantes relacionados aos grãos de pólen de distintos citótipos de *Herbertia*, como potencial de fertilização, medidas do pólen, morfologia e quantidade de pólen por flor. Em relação ao potencial de fertilização, não houve diferença entre os diferentes níveis de ploidia do gênero, que aparentam estar bem estabelecidos nas populações naturais. As medidas do pólen foram capazes de revelar o “efeito giga” atuando sobre os poliploides, mas não são o suficiente para determinar o nível de ploidia unicamente através dessa metodologia. Os resultados de quantificação revelaram que os diploides apresentaram maior quantidade de pólen por flor do que os poliploides, evidenciando a importância da associação destes dados com experimentos de biologia reprodutiva. Por fim, conclui-se que os dados obtidos apontam para caminhos reprodutivos distintos entre poliploides e diploides do gênero, abrindo portas para diversos estudos interdisciplinares que envolvam aspectos genéticos, ecológicos, ambientais e reprodutivos das populações de *Herbertia*. Para esclarecer determinadas questões pendentes e compreender o efeito ambiental nos mais diversos atributos dos grãos de pólen, uma amostragem considerável de indivíduos pertencentes a populações distantes geograficamente é sugerida como uma estratégia de estudo relevante.

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M. P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain technology**, v. 55, n. 1, p. 13-18, 1980.

ALIX, Karine *et al.* Polyploidy and interspecific hybridization: partners for adaptation, speciation and evolution in plants. **Annals of botany**, v. 120, n. 2, p. 183-194, 2017.

ALTMANN, Thomas *et al.* Easy determination of ploidy level in *Arabidopsis thaliana* plants by means of pollen size measurement. **Plant Cell Reports**, v. 13, n. 11, p. 652-656, 1994.

ALVES, Lânia Isis F.; LIMA, Saulo Antônio A.; FELIX, Leonardo P. Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 259-267, 2011.

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP *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**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.

BÁEZ-LIZARAZO, Mabel R. *et al.* Contrasting patterns of plant–pollinator interactions among four oil-secreting species of Iridaceae from Pampean and Cerrado provinces (Brazil). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 196, n. 2, p. 256-277, 2021.

BOROWSKA-ZUCHOWSKA, Natalia *et al.* Tracing the Evolution of the Angiosperm Genome from the Cytogenetic Point of View. **Plants**, v. 11, n. 6, p. 784, 2022.

ČERTNER, Martin *et al.* A unique diploid–triploid contact zone provides insights into the evolutionary mechanisms of cytotype coexistence in flowering rush (*Butomus umbellatus*). **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 54, p. 125659, 2022.

CHOI, Bokyung *et al.* Genome size and chromosome number evolution in Korean *Iris* L. species (Iridaceae Juss.). **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1284, 2020.

CIFUENTES, Marta *et al.* Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. **New Phytologist**, v. 186, n. 1, p. 29-36, 2010.

COMAI, Luca. The advantages and disadvantages of being polyploid. **Nature reviews genetics**, v. 6, n. 11, p. 836-846, 2005.

DARLINGTON, Cyril Dean *et al.* Recent advances in cytology. **Recent advances in cytology.**, n. 2nd Ed, 1937.

DE CARVALHO, Carlos Roberto; SARAIVA, Luiz Sérgio. An air drying technique for maize chromosomes without enzymatic maceration. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 68, n. 3, p. 142-145, 1993.

DEBLE, Leonardo Paz; ALVES, Fabiano da Silva. *Herbertia amabilis* Deble & FS Alves (Iridaceae), a new species from Brazil. **Candollea**, v. 68, n. 1, p. 133-137, 2013.

FACHINETTO, Juliana *et al.* Multidisciplinary approaches for species delimitation in *Sisyrinchium* (Iridaceae). **Plant Species Biology**, v. 33, n. 1, p. 3-15, 2018.

FOX, Donald T. *et al.* Polyploidy: a biological force from cells to ecosystems. **Trends in cell biology**, v. 30, n. 9, p. 688-694, 2020.

GBIF Secretariat. *Herbertia tigridioides* (Hicken) Goldblatt. **GBIF Backbone Taxonomy**. Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/5297499>>. Acesso em: 15 de outubro de 2022.

GIL, A *et al.* Iridaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB136>>. Acesso em: 4 de setembro de 2022.

GOLDBLATT, Peter. Phylogeny and classification of Iridaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 77, n. 4, p. 607-627, 1990.

GOLDBLATT, Peter; MANNING, John C. **The Iris family: natural history & classification**. Timber Press, 2008.

GOLDBLATT, Peter; TAKEI, Masahiro; RAZZAQ, Z. A. Chromosome cytology in tropical African gladiolus (Iridaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 461-470, 1993.

GOLDBLATT, Peter; TAKEI, Masahiro. Chromosome cytology of Iridaceae-patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, p. 285-304, 1997.

HUMPHREY, Rebecca P. Pollen heteromorphism is pervasive in *Thalictrum* (Ranunculaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 302, n. 8, p. 1171-1177, 2016.

HUSBAND, Brian C. *et al.* Mating consequences of polyploid evolution in flowering plants: current trends and insights from synthetic polyploids. **International Journal of Plant Sciences**, v. 169, n. 1, p. 195-206, 2008.

KATSIOTIS, Andreas; FORSBERG, R. A. Pollen grain size in four ploidy levels of genus *Avena*. **Euphytica**, v. 83, n. 2, p. 103-108, 1995.

KENTON, A.; HEYWOOD, C. A. Cytological studies in South American Iridaceae. **Plant systematics and evolution**, v. 146, n. 1, p. 87-104, 1984.

LAPORT, Robert G.; MINCKLEY, Robert L.; PILSON, Diana. Pollinator assemblage and pollen load differences on sympatric diploid and tetraploid cytotypes of the desert-dominant *Larrea tridentata*. **American journal of botany**, v. 108, n. 2, p. 297-308, 2021.

LAU, Tak-Cheung; STEPHENSON, Andrew G. Effects of soil nitrogen on pollen production, pollen grain size, and pollen performance in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). **American Journal of Botany**, v. 80, n. 7, p. 763-768, 1993.

LEVIN, Donald A. Minority cytotype exclusion in local plant populations. **Taxon**, v. 24, n. 1, p. 35-43, 1975.

MARTINS, Alexandre Cristante *et al.* Seed traits of species from South Brazilian grasslands with contrasting distribution. **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, p. 730-745, 2020.

MARINHO, R. C. *et al.* Pollen and stomata morphometrics and polyploidy in *Eriotheca* (Malvaceae-Bombacoideae). **Plant Biology**, v. 16, n. 2, p. 508-511, 2014.

MORAES, Ana Paula *et al.* Evolutionary trends in Iridaceae: new cytogenetic findings from the New World. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, n. 1, p. 27-49, 2015.

MOLGO, Iwan E.; SOLTIS, Douglas E.; SOLTIS, Pamela S. Cytogeography of *Callisia* section *Cuthbertia* (Commelinaceae). **Comparative Cytogenetics**, v. 11, n. 4, p. 553, 2017.

MORENO, N. *et al.* Cytogenetic studies in *Herbertia* Sw.(Iridaceae). **Caryologia**, v. 62, n. 1, p. 37-42, 2009.

NANDAKUMAR, Shyama; GRUSHKO, Olga; BUTTITTA, Laura A. Polyploidy in the adult *Drosophila* brain. **Elife**, v. 9, 2020.

NIAZIAN, Mohsen; NALOUSHI, Ayoub Molaahmad. Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 142, n. 3, p. 447-469, 2020.

OLEQUES, Suiane Santos *et al.* The specialization–generalization continuum in oil-bee pollination systems: a case study of six Brazilian species of Tigridieae (Iridaceae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 129, n. 3, p. 701-716, 2020.

OSBORN, Thomas C. The contribution of polyploidy to variation in *Brassica* species. **Physiologia Plantarum**, v. 121, n. 4, p. 531-536, 2004.

OTTO, Sarah P. The evolutionary consequences of polyploidy. **Cell**, v. 131, n. 3, p. 452-462, 2007.

OTTO, Sarah P.; WHITTON, Jeannette. Polyploid incidence and evolution. **Annual review of genetics**, v. 34, n. 1, p. 401-437, 2000.

RAMSEY, Justin; SCHEMSKE, Douglas W. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. **Annual review of ecology and systematics**, p. 467-501, 1998.

RAMSEY, Justin; SCHEMSKE, Douglas W. Neopolyploidy in flowering plants. **Annual review of ecology and systematics**, p. 589-639, 2002.

REZENDE, Luiz *et al.* Can plant hybridization and polyploidy lead to pollinator shift?. **Acta Botanica Brasilica**, v. 34, p. 229-242, 2020.

RICE, Anna *et al.* The global biogeography of polyploid plants. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 2, p. 265-273, 2019.

RIESEBERG, Loren H.; WILLIS, John H. Plant speciation. **science**, v. 317, n. 5840, p. 910-914, 2007.

RODRIGUEZ, Fernando; ARKHIPOVA, Irina R. Transposable elements and polyploid evolution in animals. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 49, p. 115-123, 2018.

ROTREKLOVÁ, Olga; KRAHULCOVÁ, Anna. Estimating paternal efficiency in an agamic polyploid complex: pollen stainability and variation in pollen size related to reproduction mode, ploidy level and hybridogenous origin in *Pilosella* (Asteraceae). **Folia Geobotanica**, v. 51, n. 2, p. 175-186, 2016.

SHIVANNA, K. R.; TANDON, Rajesh. **Reproductive ecology of flowering plants: a manual**. New Delhi: Springer India, 2014.

SOLTIS, Pamela S. *et al.* Polyploidy and genome evolution in plants. **Current opinion in genetics & development**, v. 35, p. 119-125, 2015.

SOLTIS, Douglas E.; SOLTIS, Pamela S. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. **Trends in ecology & evolution**, v. 14, n. 9, p. 348-352, 1999.

SOLTIS, Douglas E.; VISGER, Clayton J.; SOLTIS, Pamela S. The polyploidy revolution then... and now: Stebbins revisited. **American journal of botany**, v. 101, n. 7, p. 1057-1078, 2014.

SOUZA-CHIES, Tatiana T. *et al.* Studies on diversity and evolution of Iridaceae species in southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, p. 1027-1035, 2012.

STEBBINS, George Ledyard *et al.* Chromosomal evolution in higher plants. **Chromosomal evolution in higher plants.**, 1971.

STIEHL-ALVES, Eudes Maria *et al.* Using a population genetics approach for a preliminary investigation concerning species boundaries in *Herbertia* (Iridaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 178, n. 6, p. 439-449, 2017.

STIEHL-ALVES, Eudes M. *et al.* Differentiation between two self-compatible cytotypes of *Herbertia lahue* (Iridaceae): evidence from genotypic and phenotypic variation. **Plant Systematics and Evolution**, v. 302, n. 6, p. 669-682, 2016.

TACUATIA, Luana O. *et al.* Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 2, p. 350-364, 2012.

VAN DE PEER, Yves; MIZRACHI, Eshchar; MARCHAL, Kathleen. The evolutionary significance of polyploidy. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 7, p. 411-424, 2017.

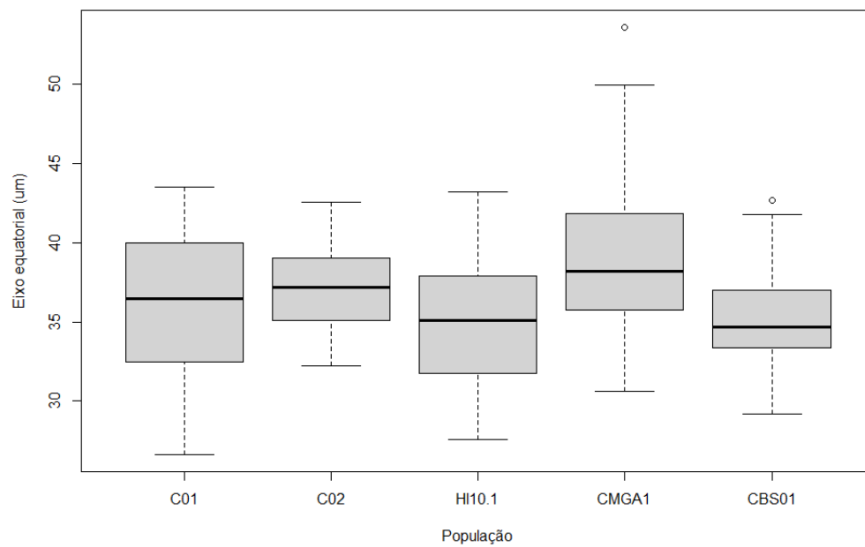
VAN DRUNEN, Wendy E.; HUSBAND, Brian C. Evolutionary associations between polyploidy, clonal reproduction, and perenniality in the angiosperms. **New Phytologist**, v. 224, n. 3, p. 1266-1277, 2019.

VISGER, Clayton J. *et al.* Niche divergence between diploid and autotetraploid *Tolmiea*. **American Journal of Botany**, v. 103, n. 8, p. 1396-1406, 2016.

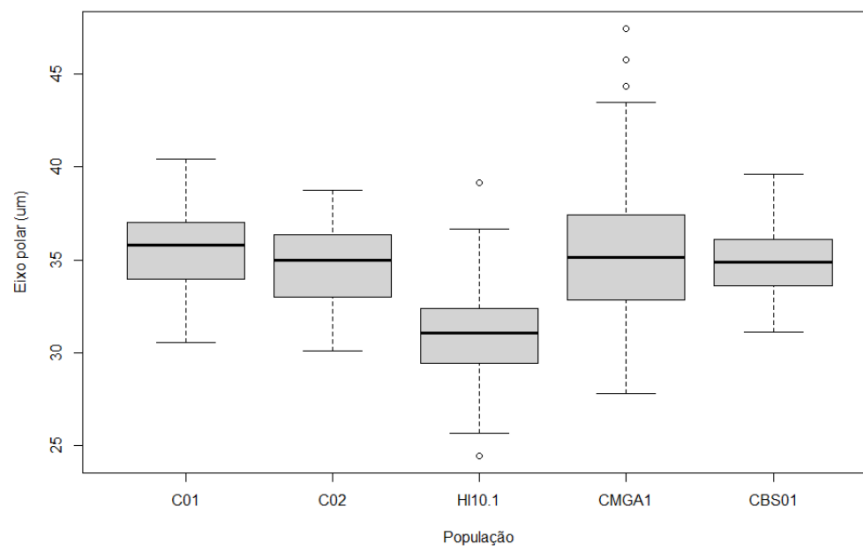
WINGE, H. Studies on cytotaxonomy and polymorphism of the genus *Alophia* (Iridaceae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 19, p. 195-201, 1959.

APÊNDICE

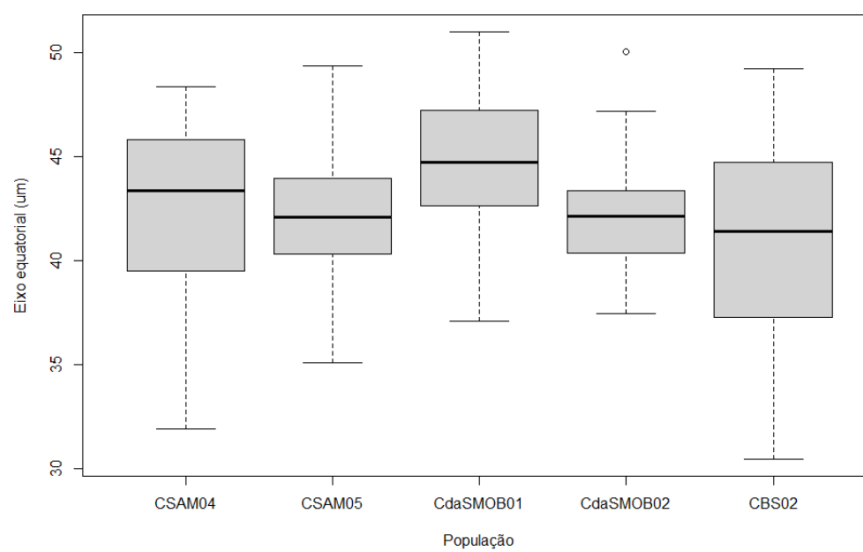
A



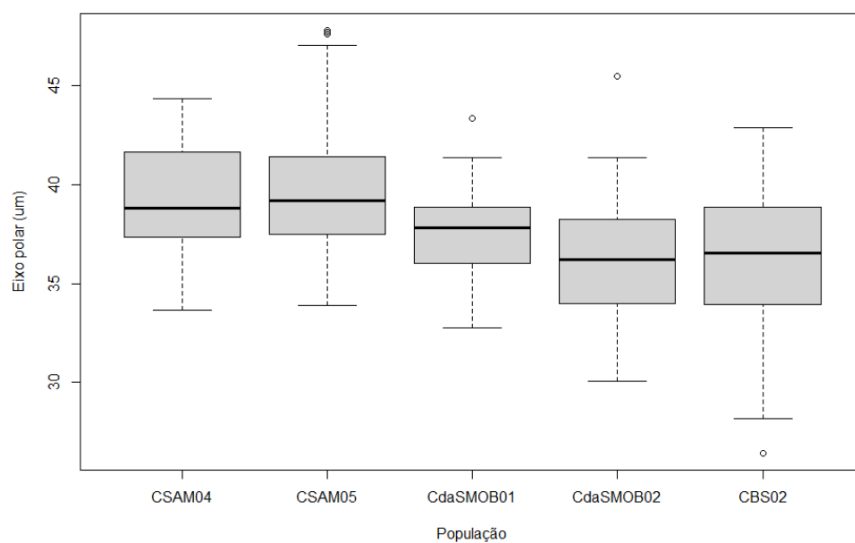
B



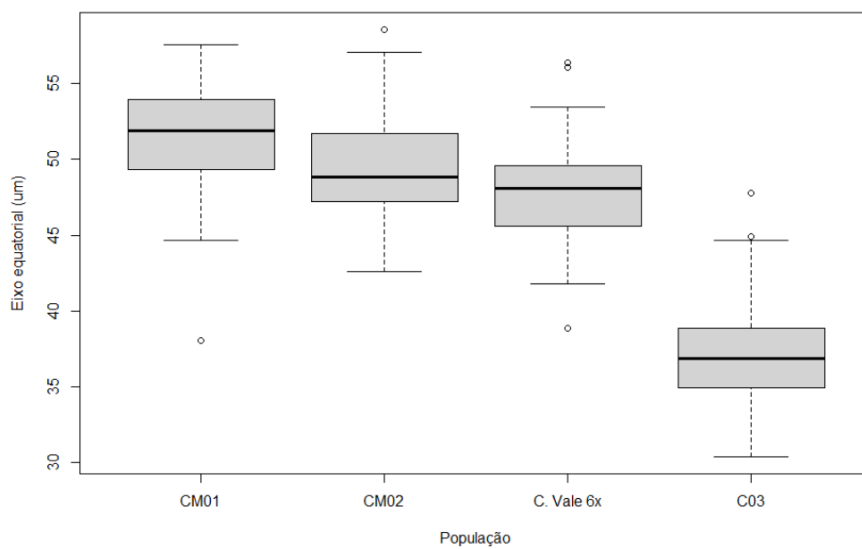
C



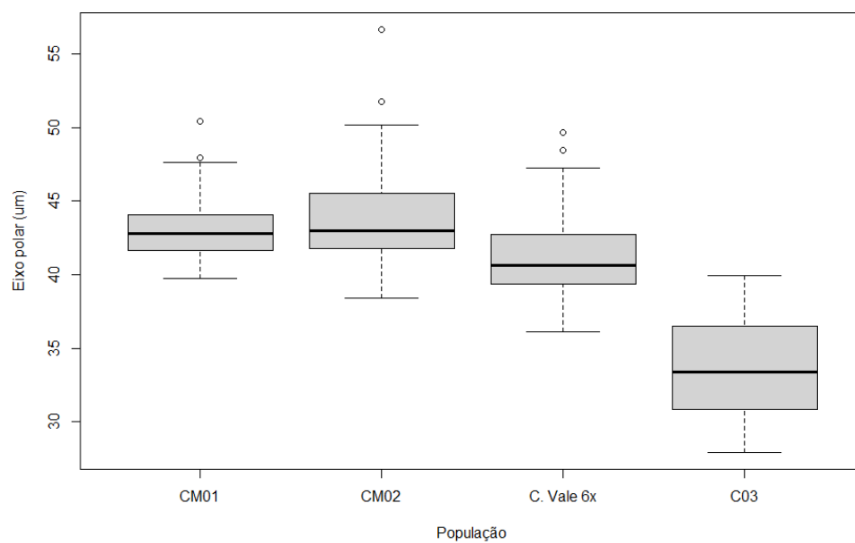
D



E



F



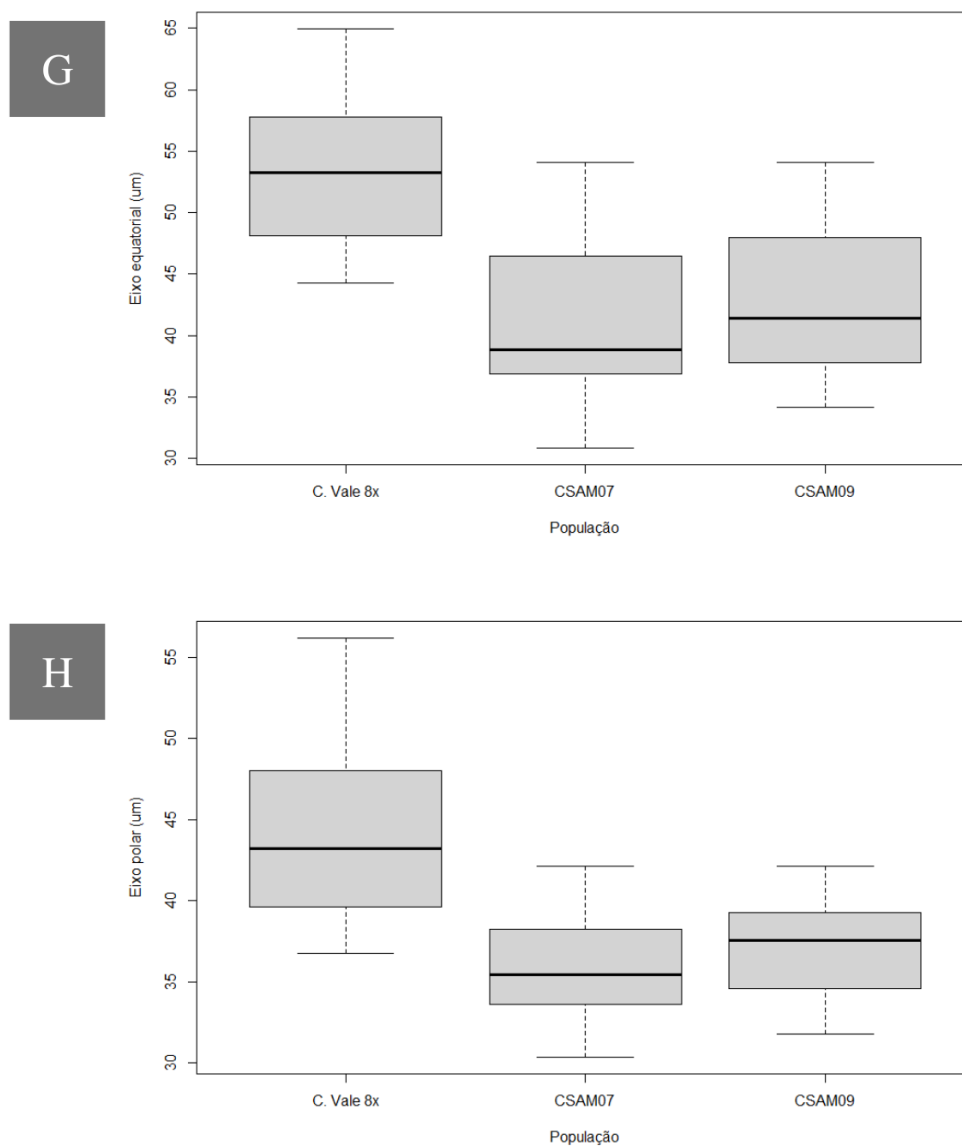


Figura 1. Eixos polares e equatoriais de cada população dos quatro níveis de ploidia de *Herbertia*. A. Eixo equatorial de *H. lahue* 2x. B. Eixo polar de *H. lahue* 2x. C. Eixo equatorial de *H. pulchella*. D. Eixo polar de *H. pulchella*. E. Eixo equatorial de *H. lahue* 6x. F. Eixo polar de *H. lahue* 6x. G. Eixo equatorial de *H. lahue* 8x. H. Eixo polar de *H. lahue* 8x.