

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Diversidade genética de *Calydorea crocoides* Ravenna
(Iridaceae): aspectos moleculares e citogenéticos**

Dissertação de Mestrado

Juliana Lustosa Matos de Alencar

Porto Alegre, agosto de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Juliana Lustosa Matos de Alencar

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

ORIENTADORA: Dr^a Tatiana Teixeira de Souza Chies

CO-ORIENTADORA: Dr^a Eliane Kaltchuk dos Santos

Porto Alegre, agosto de 2012.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós – Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por proporcionar a concretização de um sonho.

À minha orientadora Tatiana T. de Souza-Chies e co-orientadora Eliane Kaltchuk dos Santos pela orientação, ensinamento e confiança a mim dispensada.

À profa. Dra. Lilian Eggers muito obrigada pela preciosa ajuda nas saídas de campo.

A todos os professores do Departamento de Genética por contribuírem de forma grandiosa para minha formação, muito obrigada.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas Alice Flores, Cassiano Welker, Janaína Silva, Lauís Brisolará, Luana Tacuatiá, Paula Burchardt, Rogéria Miz, Tamara Pastori e Tiago Alves pelos momentos de descontração, carinho e companheirismo. Um carinho especial a Eudes Alves e Leandro Dal Ri por toda a colaboração na execução deste trabalho.

À Juliana Fachineto por sua valorosa orientação, amizade e gentileza em dividi os seus conhecimentos. Saiba que grande parte deste trabalho devo a você. Muito obrigada.

Às minhas amigas, Gislaine Souza, Josie Tim, Luciane Cardoso, Milene Tim e Silvia Dutra pelo carinho e amizade verdadeira.

À minha família, em especial aos meus pais, meus irmãos Cyntia, Rafael, Wandira, Sônia, Diana, Selma e Geraldo por sempre estarem ao meu lado. Wandira e família muito obrigada por tudo, esses anos que estou morando com vocês foram muito especiais.

A Deus, por sua infinita bondade e por estar presente em todos os momentos da minha vida.

RESUMO

O gênero *Calydorea* pertence à família Iridaceae, com aproximadamente 16 espécies, ocorrendo exclusivamente na América do Sul. Dentre essas, *Calydorea crocoides* Ravenna destaca-se por ser uma espécie bulbosa, perene, com distribuição predominante no Sul do Brasil, na Região dos Campos de Cima da Serra no Rio Grande do Sul. Esta região contém um número elevado de plantas endêmicas, sendo particularmente importante para estudos relativos à conservação e a padrões de diversificação em um ambiente subtropical de transição. Os Campos de Cima da Serra correspondem a uma região bastante antropizada por práticas agrícola e extrativista, o que sem dúvida fornece um laboratório natural para o estudo da origem e conservação da biodiversidade. O presente estudo objetivou investigar a variabilidade genética e caracterizar com ferramentas citogenéticas a espécie *Calydorea crocoides* ocorrente na Região Sul do Brasil. Os resultados da análise da variabilidade genética utilizando sete marcadores Inter Sequências Simples Repetidas (ISSR) para 235 indivíduos pertencentes a oito populações de *C. crocoides* amostradas nos estados do RS e SC mostrou que a diversidade genética detectada ao nível populacional foi baixa, no entanto ao nível de espécie foi relativamente alta evidenciando uma moderada estruturação populacional. Espécies com faixa de distribuição geográfica limitada tendem a manter menores níveis de variação genética do que espécies com distribuição geográfica ampla. Diversidade genética alta é esperada ser encontrada em uma espécie que tem vida longa, uma alta frequência de fluxo gênico e dispersão de sementes. Espécies com baixo fluxo gênico, resultado observado em *C. crocoides*, tendem a apresentar maior diferenciação genética do que espécies com alto fluxo gênico refletindo um certo grau de isolamento espacial, embora não tenha havido correlação entre distância geográfica e distância genética. Provavelmente o nível atual de diversidade genética seja apenas um reflexo parcial de um polimorfismo ancestral de *C. crocoides*, uma vez que é sabido que o fluxo gênico atual é limitado entre as populações. A fragmentação da população pelas atividades humanas também pode aumentar artificialmente a diferenciação genética entre as populações ao longo do tempo. Resultados provenientes das análises citogenéticas mostraram que *C. crocoides* é uma espécie diploide ($2n=14$), número cromossômico básico $x=7$, com o cariótipo claramente assimétrico, sendo marcado pela bimodalidade. A avaliação da arquitetura cariotípica é de extrema relevância

para inferências acerca da evolução cromossômica na família Iridaceae uma vez que a grande diversidade de números e tamanhos cromossômicos encontrada resulta da ocorrência de eventos de rearranjos cromossômicos, disploidias e poliploidia. A assimetria cariotípica, provavelmente resultante de inversões e/ou translocações, sugere a evolução recente de *C. crocoides*, embora uma alta viabilidade polínica tenha sido observada. Mesmo que alterações cromossômicas resultassem em diminuição da fertilidade, provavelmente a presença de bulbos em *C. crocoides* permita a sobrevivência da espécie via reprodução assexuada. Os dados gerados por este trabalho são inéditos e ampliam o conhecimento acerca do gênero *Calydorea*, e principalmente da espécie *C. crocoides*. A associação de dados moleculares e citogenéticos, bem como de caracteres morfológicos permitirá uma melhor compreensão dos processos evolutivos que envolvem este grupo de espécies.

ABSTRACT

The genus *Calydorea*, which belongs to the family Iridaceae, comprises about 16 species and occurs exclusively in South America. Among these species, *Calydorea crocoides* Ravenna highlights for being a bulbous, perennial species which occurs predominantly in the Southern Brazil, in the Campos de Cima da Serra region in Rio Grande do Sul. This region contains numerous endemic plants and is considered particularly important in the conservation approaches and studies concerning the diversification patterns in a subtropical environment transition. The Campos de Cima da Serra region is very disturbed by agricultural and extractive practices, which undoubtedly provides a natural laboratory for studying the origin and biodiversity conservation. The present study aimed to investigate the genetic variability and characterize with cytogenetic tools *Calydorea crocoides* occurring in southern Brazil. The results of the analysis of genetic variability using seven Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers to 235 individuals from eight populations of *C. crocoides* sampled in the states of RS and SC showed that the genetic diversity detected at the population level was low, however the species level was relatively high indicating a moderate population structuring. Species with limited geographical distribution range tend to maintain lower levels of genetic variation than species with wide geographic distribution. High genetic diversity is expected to be found in a species that has long life, a high frequency of gene flow and seed dispersal. Species with low gene flow, a result observed in *C. crocoides*, tend to have higher genetic differentiation than species with high gene flow reflecting a degree of spatial isolation, although there was no correlation between geographic distance and genetic distance. Probably the current level of genetic diversity is only a partial reflection of an ancestral polymorphism of *C. crocoides*, since it is known that the current flow is restricted among populations. The fragmentation of populations by human activities can also artificially increase the genetic differentiation among populations over time. Results from the cytogenetic analyses showed that *C. crocoides* is a diploid species ($2n = 14$), basic chromosome number $x = 7$, with the karyotype clearly asymmetrical, being characterized by bimodality. The evaluation of karyotype architecture is very important for inferences about chromosomal evolution in the family Iridaceae since the great diversity of chromosomal numbers and sizes found, results from the occurrence of chromosomal

rearrangements, disploidy and polyploidy. The karyotype asymmetric, probably resulting from inversions and/or translocations, suggests a recent evolution of *C. crocoides*, although a high pollen viability has been observed. Even chromosomal changes resulted in decreased fertility, probably the presence of bulbs in *C. crocoides* allow the survival of the species through asexual reproduction. The data generated by this work extend the knowledge about the genus *Calydorea* and especially for the species *C. crocoides*. The association of molecular and cytogenetic data as well as morphological characters allowed better understand the evolutionary processes involving this group of species.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	9
Iridaceae - Aspectos morfológicos, sistemática e filogenia	10
O gênero <i>Calydorea</i> Herb.	14
Estudos citogenéticos	17
Estudos citogenéticos de <i>Calydorea</i>	19
Análise da diversidade genética	20
Justificativa	22
Objetivos	23
Objetivos específicos	23
CAPÍTULO II - Aspectos da diversidade genética de <i>Calydorea crocoides</i> (Iridaceae): uma espécie de distribuição restrita aos Campos de Cima da Serra	24
CAPÍTULO III – Considerações finais	63
REFERÊNCIAS (CAPÍTULO I, III)	66
ANEXO	72

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

IRIDACEAE - ASPECTOS MORFOLÓGICOS, SISTEMÁTICA E FILOGENIA.

A família Iridaceae Jussieu pertence à ordem Asparagales (APGIII 2009) com cerca de 2.030 espécies distribuídas entre 65-75 gêneros, sendo uma família relativamente grande dentre as plantas monocotiledôneas (Goldblatt & Manning, 2008). Iridaceae possui ampla distribuição mundial, tendo o sul da África como seu principal centro de diversidade e a América do Sul o segundo centro de diversidade (Chukr & Capellari Jr, 2003). No Brasil, a família está representada por 19 gêneros e 156 espécies, dentre as quais 60 são endêmicas, distribuídas desde a caatinga e a região do cerrado, ao longo da Floresta Atlântica, até a região Sul do país, nos campos e na Floresta de Araucárias (Eggers *et al.*, 2012).

Grande parte das espécies nativas da família foi pouco estudada até então devido ao curto período de florescimento, à fragilidade das flores e à dificuldade de preservação das características morfológicas importantes para definição das espécies (Eggers, 2008).

Iridaceae é constituída por ervas, raramente arbustivas, perenes ou anuais. São plantas que podem apresentar sistema caulinar subterrâneo do tipo bulbo, cormo ou rizoma e caule aéreo presente ou não. Apresentam folhas basais ou caulinares em número variado, cilíndricas ou laminares, lineares ou ensiformes, planas ou plicadas, paralelinérveas, equitantes ou não, bi ou unifaciais. As flores são dispostas em inflorescência determinadas do tipo rispídio, frequentemente modificada e às vezes reduzidas a uma flor solitária, terminal. Flores bissexuadas possuem simetria radial ou bilateral. Apresentam seis tépalas, as externas às vezes diferenciadas das internas, livres ou conadas, petaloides. Os estames são em número de três (dois em *Diplarrhena* Labill), opostos às tépalas externas, com filetes livres ou conados, anteras lineares ou sagitadas. Ovário ínfero (súpero em *Isophysis* Moore), sincárpico, tricarpelar, trilocular, placentação axilar, multiovulado. Possuem três estiletos, livres ou unidos parcialmente, estigmas inteiros a profundamente divididos (Figura 1). Em quase todos os gêneros, o fruto é seco (cápsula loculicida), com pericarpo firme e cartilaginoso ou papiráceo a rígido e lenhoso. Sementes com abundante

endosperma, tipicamente duras e relativamente grandes (Judd *et al.*, 2007; Goldblatt *et al.*, 2008).



Figura 1- Aspectos morfológicos de *Calydorea crocoides*. **A-** Flor em vista frontal. **B-** Anteras e estiletos. **C-** Fruto. **D-** Indivíduo isolado, flor, espatas envolvendo o ripídio. **E-** Indivíduos agregados. **F-** Bulbos. Fotos: Leandro Dal Ri

Iridaceae é um grupo botânico complexo taxonomicamente, sendo a segunda família mais numerosa da ordem Asparagales (Goldblatt & Manning, 2008). Dahlgren *et al.* (1985) realizaram os primeiros estudos filogenéticos da família Iridaceae. Esses autores consideraram cinco subfamílias: Aristeoideae, Isophysidoideae, Iridoideae, Ixioideae e Sisyrinchioideae, dispendo *Geosiris aphylla* em Geosiridaceae.

O primeiro estudo cladístico amplo da família Iridaceae, abrangendo um total de 52 caracteres morfológicos, embriológicos, citológicos, químicos e anatômicos foi realizado por Goldblatt (1990), segundo este autor a família foi dividida em quatro subfamílias: Iridoideae (tribos Trimezieae, Irideae, Sisyrinchieae e Tigridieae, 42 gêneros, 60 espécies),

Isophysidoideae (gênero monoespecífico), Ixioideae – atualmente Crocoideae - (tribos Pillansieae, Watsonieae e Ixieae, 28 gêneros, 860 espécies) e Nivenioideae (seis gêneros, 83 espécies). Neste trabalho foi apontado que a tribo Tigridaeae é pouco compreendida taxonomicamente, apresentando três importantes sinapomorfias: folhas plicadas, presença de bulbo e número cromossômico básico $x=7$. Devido à dificuldade em se obter uma classificação de consenso entre algumas subfamílias de Iridaceae, estudos posteriores foram realizados na tentativa de elucidar essas dúvidas.

Souza-Chies *et al.* (1997) analisaram a filogenia molecular de Iridaceae, com base no gene plastidial *rps4*, mostrando que a monofilia da família é bem sustentada, em conformidade ao demonstrado por Dahlgren *et al.* (1985). A monofilia da subfamília *Nivenioideae* não foi confirmada, evidenciando o parafiletismo do grupo que reúne os gêneros *Aristea* Aiton, *Nivenia* Ventenat e *Partersonia* R. Brown. *Isophysis tasmanica* Moore foi indicada como sendo a espécie mais basal na família.

Reeves *et al.* (2001) utilizando quatro regiões do DNA plastidial (os genes codificadores *rbcL*, *rps4*, o íntron *trnL* e o espaçador intergênico *trnL-F*) realizaram um estudo de sistemática molecular em Iridaceae. O trabalho indicou que as subfamílias Isophysidoideae, Iridoideae e Crocoideae (ou Ixioideae) são monofiléticas, com exceção de Nivenioideae que forma um grupo basal com Ixioideae. Resultado este congruente aos observados por Goldblatt (1990) e Souza-Chies *et al.* (1997) em relação à monofilia das subfamílias. A parafilia em Nivenioideae se deve à presença de sequências extremamente divergentes, além de ausência de sinapomorfias morfológicas. *Geosiris aphylla*, referida às vezes como Geosiridaceae ou Burmanniaceae, foi incluída no grupo de Nivenioideae, e *Isophysis tasmanica* considerada como grupo irmão do restante da família.

Um estudo filogenético multigênico em Iridaceae utilizando o íntron *rps16*, a região *trnL-F* e os genes *rbcL*, *rps4* e *matK* foi realizado por Goldblatt *et al.* (2008). Os autores confirmaram a posição de Isophysidoideae como grupo irmão ao restante da família e a parafilia da subfamília Nivenioideae, propondo uma nova disposição infrafamiliar, com a criação de três novas subfamílias (Aristeioideae, Patersonioideae e Geosiridoideae), tornando Nivenioideae monofilética e reconhecendo desta forma, sete subfamílias: Isophysioideae, Patersonioideae, Geosiridoideae, Aristeoideae, Nivenioideae, Crocoideae e Iridoideae, classificação hoje aceita.

Todas as espécies autóctones americanas de Iridaceae pertencem à subfamília Iridoideae e compreende as tribos: i) Diplarrheneae (ocorrentes na Austrália e Tasmânia); ii) Irideae (África, Eurásia e América do Norte); iii) Tigrídieae (Sul da América do Norte, América Central e do Sul); iv) Trimezieae (América Central e América do Sul) e v) Sisyrinchieae (Américas e Austrália) (Goldblatt *et al.*, 2008).

As tribos Tigrídieae, Sisyrinchieae e Trimezieae da subfamília Iridoideae têm representantes no sul do Brasil. De forma geral, no Brasil a família está representada por 19 gêneros e aproximadamente 156 espécies, sendo que 12 desses gêneros são encontrados na região sul do Brasil. Os mais representativos são *Calydorea* Herb. (nove espécie) (Figura 2),

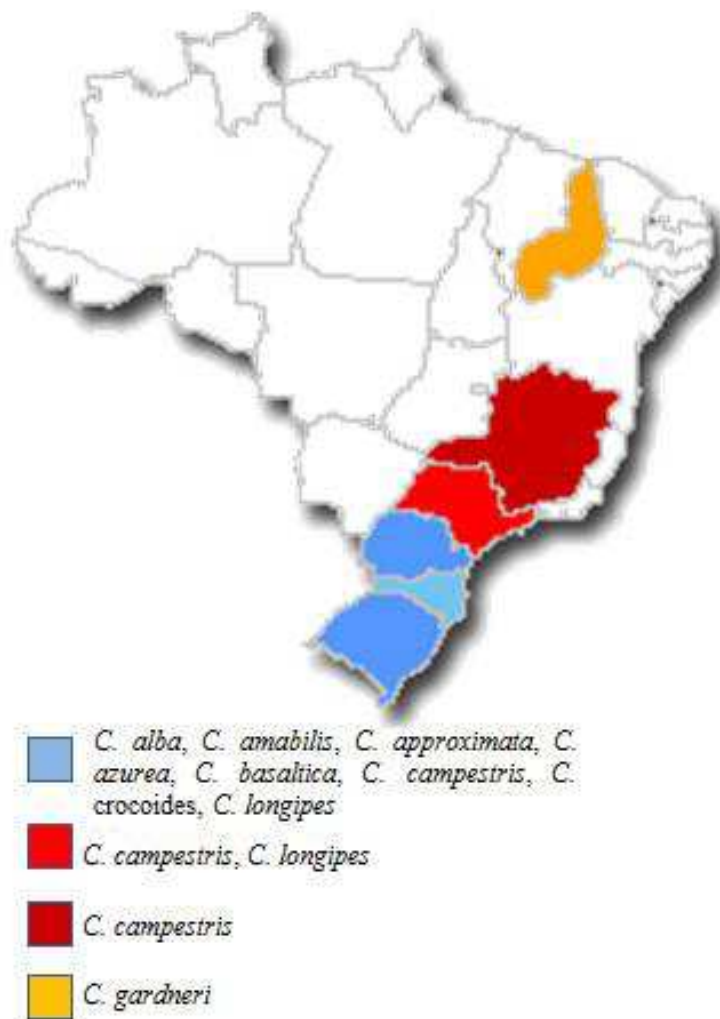


Figura 2- Mapa de distribuição geográfica de *Calydorea* Herb.

Cypella Herb. (onze espécies), *Herbertia* Sweet (seis espécies) e *Sisyrinchium* L. (45 espécies) (Eggers *et al.*, 2012).

Tigridieae inclui as espécies americanas bulbosas com folhas plicadas, abrangendo os gêneros *Alophia* Herb., *Calydorea*, *Cardenanthus* R. C. Foster, *Cipura* Aubl., *Cobana* Ravenna, *Cypella*, *Eleutherine* Herb., *Ennealophus* N. E. Br, *Gelasine* Herb., *Herbertia*, *Hesperoxiphion* Baker, *Larentia* Klatt, *Mastigostyla* I.M. Johnst., *Nemastylis* Nutt. e *Tigridia* Juss, compreendendo 172 espécies e duas subtribos, Trigridiinae e Cipurinae (Rodriguez & Sytsma, 2006; Goldblatt *et al.*, 2008).

A tribo Tigridieae está estritamente distribuída no Novo Mundo, com centros de diversidade na América do Sul e áreas no México e Guatemala, sendo uma tribo com relações filogenéticas pouco compreendidas (Rodriguez & Sytsma, 2006). As dificuldades taxonômicas são devidas à grande variação morfológica e duração efêmera das flores, que tem favorecido a criação de um grande número de gêneros com poucas espécies.

Um estudo envolvendo caracteres morfológicos e moleculares de 23 espécies da tribo reconheceu a monofilia do grupo, que compreende dois cladogramas principais. O primeiro clado inclui os gêneros pertencentes à subtribo Cipurinae: *Calydorea*, *Cipura*, *Cypella* e *Nemastylis*, o segundo inclui todos os gêneros tradicionalmente dispostos na subtribo Trigridiinae, além de *Eleutherine*, *Ennealophus*, *Cardiostigma* e *Nemastylis* anteriormente dispostos em Cipurinae (Rodriguez & Sytsma, 2006). Segundo estes autores, houve uma recorrente dispersão de espécies da subtribo sul-americana Cipurinae em direção à América do Norte, sugerindo a origem sul-americana do clado mexicano-guatemalteco das espécies da subtribo Trigridiinae.

O GÊNERO *CALYDOREA* HERB.

Calydorea é um gênero cuja monofilia vem sendo questionada por englobar diversos gêneros que expandem sua circunscrição (Chauveau *et al.*, 2012; Souza-Chies *et al.*, in press). Goldblatt & Henrich (1991) tendo como base uma análise cladística utilizando dados morfológicos de *Calydorea*, *Salpingostylis* W. Bartram, *Cardiostigma* Baker, *Itysa* Ravenna, *Catila* Ravenna, *Onira*, *Cypella* e outros gêneros, concluíram que *Cardiostigma*, *Itysa*, *Catila* e *Salpingostylis* são incluídos em *Calydorea*, não sendo gêneros válidos. *Calydorea* seria um membro moderadamente especializado dentro de Tigridieae que

possivelmente evoluiu de um ancestral semelhante à *Cypella*, no qual os ramos do estilete perderam o espessamento e os apêndices apicais, bem como redução entre as tépalas externas e internas. A flor de *Catilla amabilis* é a mais próxima deste tipo ancestral. Segundo estes autores, *Cardiostigma* e *Salpingostylis* dificilmente são distinguíveis entre si e diferem de *Calydorea* pelo estilete que se divide próximo do ápice das anteras em ramos simples e que tal característica não justificaria a separação genérica.

A taxonomia de *Calydorea* sofreu mudanças após os resultados do estudo realizado por Rodriguez & Systma (2006) utilizando dados moleculares e morfológicos para a tribo Tigridieae. As espécies *C. mexicana* (R. C. Foster) Goldblatt & Henrich e *C. coelestina* (W. Bartram) Goldblatt & Henrich, dispostas em *Calydorea* por Goldblatt & Henrich (1991), e que ocorrem na América Central e América do Norte, foram retiradas do gênero e incluídas em *Cardiostigma* Baker e *Salpingostylis* Small, respectivamente. Goldblatt & Manning (2008) também revalidaram o gênero *Salpingostylis*, devido à ausência de dados citológicos necessários à possível transferência de *S. coelestina* Bartram para *Tigridia*, invalidando assim *C. coelestina*. Atualmente, os sinônimos genéricos aceitos para *Calydorea* são: *Catila* Ravenna, tipo: *C. amabilis* = *C. amabilis* (Ravenna) Goldblatt & Henrich; *Itysa* Ravenna, tipo: *Itysa gardneri* (Baker) Ravenna = *C. gardneri* Baker; *Tamia* Ravenna, tipo: *Tamia pallens* (Griseb.) Ravenna = *C. pallens* Griseb.

Calydorea possui aproximadamente 16 espécies, incluindo *Catila*, *Itysa* e *Tamia*, ocorrendo exclusivamente na América do Sul (Goldblatt & Manning, 2008; Goldblatt *et al.*, 2008). Este gênero caracteriza-se por apresentar plantas perenes, pequenas, com bulbos providos de túnicas de cor marrom escura (Figura 1). As folhas são pouco numerosas, lineares ou ensiformes. O caule florífero é simples ou pouco ramificado, as inflorescências são ripídios, com espatas verdes, de texturas membranáceas a coriáceas. As flores são radialmente simétricas, com tépalas subiguais ou as externas marcadamente maiores que as internas, com coloração variando de branca a púrpura escuro. Os estames são simetricamente arranjados, com filetes livres, ascendentes, anteras suberetas ou divergentes, frequentemente associadas aos ramos do estilete. O estilete é curto ou excede um pouco as anteras, dividido em três ramos curtos a longos. As cápsulas são obovoides a cilíndricas, contendo sementes angulares.

Na América do Sul, espécies de *Calydorea* foram registradas em quase todos os países, exceto no Equador, Guiana Francesa, Peru e Suriname (IPNI 2012; KEW, 2012; TROPICOS, 2012) (Tabela 1).

Tabela 1 – Lista das espécies de *Calydorea* encontradas na América do Sul e o seu respectivo local de ocorrência.

Local de ocorrência	Espécie	Referência
Argentina	<i>C. amabilis</i> (Ravenna) Goldblatt & Henrich	Ravenna, 1983, 2001 Roitman <i>et al.</i> , 2008
	<i>C. approximata</i> R. C. Foster,	TROPICOS, 2012
	<i>C. azurea</i> Klatt	
	<i>C. campestris</i> (Klatt) Baker	
	<i>C. minima</i> Roitman & Castillo	
	<i>C. nuda</i> (Herb.) Baker	
	<i>C. pallens</i> Griseb	
	<i>C. undulata</i> Ravenna	
	<i>C. alba</i>	Eggers <i>et al.</i> , 2012
	Brasil	<i>C. amabilis</i>
<i>C. approximata</i>		
<i>C. azurea</i>		
<i>C. basaltica</i> Ravenna		
<i>C. campestris</i>		
<i>C. crocoides</i> Ravenna		
<i>C. gardneri</i>		
<i>C. longipes</i> Ravenna		
<i>C. luteola</i> (Klatt) Baker.		
<i>C. approximata</i>		Foster, 1958
Bolívia	<i>C. azurea</i>	Innes, 1985
	<i>C. campestris</i>	Ravenna, 2001
	<i>C. pallens</i>	

Tabela 1 (Cont.).

Local de ocorrência	Espécie	Referência
	<i>C. bifida</i> Ravenna	Innes, 1985
Chile	<i>C. xiphioides</i> (Poepp) Espinosa	Muñoz-Schick, 2003
Colômbia	<i>C. cipuroides</i> Klatt	Innes, 1985
	<i>C. approximata</i>	Innes, 1985
Paraguai	<i>C. campestris</i> var. <i>longicaulis</i> Baker	Roitman & Castillo,
	<i>C. gardneri</i> (Baker) Goldblatt & Henrich	2007; Roitman <i>et al.</i> , 2008
	<i>C. mínima</i>	
	<i>C. alba</i> Roitman & A. Castillo	Ravenna, 1983
Uruguai	<i>C. approximata</i>	Lombardo, 1984
	<i>C. azurea</i>	Innes, 1985
	<i>C. campestris</i>	Roitman & Castillo,
	<i>C. nuda</i>	2005
		Roitman <i>et al.</i> , 2008
	<i>C. venezolensis</i> (Baker) Goldblatt & Henrich	Innes, 1985
Venezuela	Henrich	

Para o Brasil, Eggers *et al.* (2012) citaram a ocorrência de dez espécies de *Calydorea*. No estudo *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*, Chukr & Capellari Jr (2003) citaram a ocorrência *C. campestris*, sendo também encontrada nos Estados de Minas Gerais e Paraná. Em um estudo sobre a Taxonomia das espécies sul-brasileiras de *Calydorea*, Dal Ri (2012) relatou a ocorrência de cinco espécies: *C. alba*, *C. approximata*, *C. basaltica*, *C. campestris* e *C. crocoides*.

ESTUDOS CITOGENÉTICOS

A análise citológica de espécies vegetais tem sido utilizada como ferramenta para o entendimento de questões evolutivas, através da identificação de variação do número e morfologia cromossômica, bem como o uso de diferentes marcadores que contribuam para uma melhor compreensão das relações filogenéticas.

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

Em Iridaceae, dados citológicos foram avaliados para aproximadamente 65% das espécies, principalmente para as espécies do Velho Mundo (Alves *et al.*, 2011; Goldblatt & Takei, 1997). A maioria desses estudos limita-se a contagem cromossômica. Para o continente americano, destacam-se os trabalhos de Goldblatt (1982) que revisou os números cromossômicos para alguns gêneros neotropicais e de Kenton & Heywood (1984) que analisaram um total de 13 gêneros e 43 espécies sul-americanas. Esses estudos incluíram poucos táxons de *Calydorea* e apresentam amostragens amplas dentro de Iridaceae.

Iridaceae apresenta número cromossômico básico, tamanho cromossômico e morfologia cariotípica muito variáveis, o que torna a análise citológica uma importante ferramenta para esclarecer a sistemática e a evolução desta família (Goldblatt & Takei, 1997).

O número básico para a família permanece incerto, embora o número cromossômico ancestral tenha sido sugerido para quase todos os gêneros (Goldblatt, 1990; Goldblatt & Takei, 1997). O mais provável é $x=10$ (Goldblatt, 1990), com muitos números derivados tais como 9, 8, 7 e 5 sendo essa variação possivelmente resultante de disploidia decrescente (Goldblatt & Takei, 1997).

O número cromossômico em Iridaceae varia de $2n=6$ a aproximadamente $2n=230$, sugerindo que a poliploidia tem sido um evento importante na evolução das espécies desta família (Alves *et al.*, 2011). A poliploidia parece ser o evento mais importante na evolução das espécies de Iridaceae da América do Sul e Central, com alguns gêneros exclusivamente poliploides como *Fosteria* Molseed, *Cobana* e *Sessilanthera* Molseed & Cruden, ambos com número básico $x=7$ e número diploide igual 28 (Goldblatt & Takei, 1997; Goldblatt *et al.*, 1998).

Estudos citológicos em espécies neotropicais pertencentes à tribo Tigridae indicam que na tribo o cariótipo é bimodal com pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Goldblatt, 1982), exceto em *Gelasine azurea*, onde ambos os pares maiores são acrocêntricos (Kenton & Rudall, 1987). Cariótipos assimétricos do tipo bimodal são ditos como sendo de evolução recente, resultando de fusões cêntricas entre cromossomos do provável genoma ancestral (Goldblatt & Takei, 1993). Goldblatt *et al.* (2008), a partir de dados filogenéticos, indicaram que o aumento da bimodalidade ocorreu diversas vezes em diferentes linhagens. A morfologia cromossômica variável e cariótipo bimodal têm sido utilizados na delimitação desta tribo (Kenton *et al.*, 1990; Goldblatt & Takei 1997; Reeves *et al.*, 2001).

ESTUDOS CITOGENÉTICOS DE *Calydorea*

Goldblatt & Takei (1997) avaliaram padrões de variação cromossômica em cerca de 1630 espécies de Iridaceae, observando variações não usuais nas características do cariótipo, como disploidias, níveis de ploidia e número cromossômico básico. Em *Calydorea* o número cromossômico foi determinado para as espécies *C. amabilis*, *C. azurea*, *C. nuda*, *C. pallens* e *C. xiphioides*, todas com $x=7$, embora três diferentes números cromossômicos diploides foram encontrados ($2n=14$, 28 ou 42) (Goldblatt, 1982; Goldblatt & Takei 1997).

De Tullio *et al.* (2008) realizaram um estudo citológico e cromossômico com *Tamia pallens* Ravenna e *Calydorea undulata* com a finalidade de avaliar a validade desta última. O cariótipo de *C. undulata* ($2n=14$) foi descrito como bimodal, possuindo dois pares cromossômicos metacêntricos e cinco pares submetacêntricos, sendo dois satelitados. *T. pallens* é tetraploide ($2n=28$), e o cariótipo é moderadamente assimétrico. *T. pallens* é considerada sinônimo de *C. pallens*.

Das espécies de *Calydorea* que ocorrem na Região Sul do Brasil *C. amabilis*, *C. alba*, *C. approximata*, *C. campestris* e *C. longipes* têm número cromossômico determinado, sendo todas diploides $2n=14$ (Goldblatt & Takei, 1997; Kaltchuk - Santos *et al.*, dados não publicados). Nenhum estudo citológico foi realizado até o momento em *C. crocoides*.

ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Análises utilizando marcadores moleculares têm sido realizadas visando avaliar a diversidade genética em espécies da família Iridaceae, além de estudos citogenéticos para determinação do número cromossômico e quantidade de DNA (Sik *et al.*, 2008; Brisolara Corrêa, 2011; Tacuatiá *et al.*, 2012 a, b).

A análise da variabilidade genética nos níveis inter e/ou intrapopulacional, é de extrema relevância em estudos que visam a caracterização biológica de uma espécie e também sua conservação. Permite relacionar sua condição atual e sua história evolutiva possibilitando delinear propostas de manejo e de manutenção da espécie.

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

A técnica de ISSR está baseada no método de PCR (Polymerase Chain Reaction) e envolve a amplificação de um segmento de DNA presente a uma distância passível de amplificação entre duas regiões de microssatélites idênticas e orientadas em direções opostas. São utilizados “primers” (iniciadores) de 16 a 25 pares de bases (pb), constituídos de sequências di, tri, tetra ou penta-nucleotídicas. Não necessita do conhecimento prévio das sequências alvo como na técnica de SSR. Os produtos amplificados possuem entre 200 a 2000 pb e podem ser detectados em gel de agarose ou de poliacrilamida. Possui alta probabilidade de detecção de polimorfismo devido ao fato das taxas evolutivas na região de microssatélites serem altas (Reddy *et al.*, 2002). Por sua herança dominante, ou seja, apenas um alelo por loco é detectado, todos os outros alelos são agrupados em uma classe simbolizada pela ausência da banda no gel de eletroforese.

A aplicabilidade da técnica de ISSR é ampla: “fingerprinting” genômico, mapeamento do genoma, determinação da frequência de motivos SSR, seleção assistida, biologia evolutiva e análise da diversidade genética (Reddy *et al.*, 2002).

Poucos estudos têm sido realizados utilizando marcadores moleculares nucleares para investigar a diversidade de espécies de Iridaceae. A maioria refere-se a estudos filogenéticos e taxonômicos. Considerando essa escassez, é de suma importância estudos que visem à caracterização biológica de uma espécie. A variabilidade genética é considerada crucial para a sobrevivência a longo prazo e contínua evolução de populações ou espécies (Frankel, 1983; Kim *et al.*, 2005), portanto, um bom conhecimento do seu nível e distribuição nos permite estimar a importância de algumas forças evolutivas, como seleção, mutação, migração e deriva genética. Tais parâmetros só podem ser obtidos por meio de uma análise genética populacional (Hamrick & Godt, 1989). É importante entender esses padrões da estrutura populacional, bem como, os padrões de divergência genética espacial porque a degradação e fragmentação dos ecossistemas naturais podem produzir uma vegetação em ilha, com a população em tais áreas tornando-se menor devido à redução na distribuição original das espécies (Souza *et al.* 1999; Telles *et al.*, 2006). Hoffmann & Parsons (1991) referiram que o estresse ambiental grave pode ser considerado como um teste ambiental levando a percepções evolutivas úteis que são difíceis de revelar sob condições menos extremas. A quantidade e distribuição da variação genética entre e dentro das populações está correlacionada com as características da história de vida e história populacional de uma espécie, além de fatores ambientais (Hamrick & Godt, 1989).

Calydorea crocoides é uma espécie com distribuição predominante na Região dos Campos de Cima da Serra no Rio Grande do Sul (figura 3, anexo 1). Esta é uma região bastante ameaçada pela silvicultura e degradação, associada à invasão de espécies exóticas, além da pecuária. Uma grande diversidade de espécies e um alto nível de endemismo na composição florística desta região são fatos relevantes a serem considerados para estudos referentes à conservação (Iganci *et al.*, 2011). A compreensão da variação genética dentro e entre populações é essencial para o estabelecimento de práticas efetivas e eficientes de conservação e manejo. Muitos aspectos da biologia da conservação, como perda da diversidade genética em programas de conservação e restabelecimento de populações ameaçadas só podem ser resolvidos por um detalhado estudo de genética populacional (Hamrick & Godt, 1996; Luan *et al.*, 2006).

JUSTIFICATIVA

A escassez de estudos para a família Iridaceae na Região Sul do Brasil evidencia a importância da pesquisa de suas espécies. Além disto, a existência de espécies endêmicas enfatiza a relevância do estudo, no sentido de colaborar no conhecimento da biodiversidade.

As espécies de *Calydorea* são pouco conhecidas devido a diferentes aspectos, sendo o principal deles, a floração fugaz das plantas, que dura um ou dois dias. Além disto, os caracteres vegetativos das plantas, como folhas estreitas e altura total que não ultrapassa 30 a 35 cm, faz com que sejam pouco percebidas no campo.

Calydorea crocoides é uma espécie de ocorrência restrita à Região Sul do Brasil, principalmente na região dos Campos de Cima da Serra. Região bastante rica em termos de diversidade e endemismo de plantas, mas bastante ameaçado por atividades humanas. Não são conhecidas as estimativas da variabilidade genética desta espécie e a sua relação com a distribuição geográfica, o que interfere na tomada de decisões para a sua conservação.

Combinar metodologias diversas aumenta a confiabilidade e robustez das análises genéticas, para *C. crocoides* estudos são escassos, portanto, é extremamente interessante aliar técnicas de citogenética e de marcadores do tipo ISSR-PCR para caracterizar as populações ocorrentes na Região Sul do Brasil e também contribuir para o conhecimento taxonômico e evolutivo. Em um estudo de estrutura populacional, do ponto de vista genético e evolutivo, procura-se determinar variabilidade morfológica e quantitativa existente entre os indivíduos, seu comportamento reprodutivo, os padrões de fluxo gênico, e as estratégias adaptativas aos ambientes locais.

OBJETIVOS

O presente projeto tem por objetivo geral investigar a variabilidade genética e aspectos citogenéticos da espécie *Calydorea crocoides* ocorrente na Região Sul do Brasil.

Objetivos Específicos

- Avaliar a diversidade genética intra e interpopulacional de *Calydorea crocoides* através de marcadores moleculares ISSR-PCR;
- Determinar o número cromossômico desta espécie e investigar a ocorrência de citotipos para a espécie;
- Caracterizar cariotipicamente a espécie;
- Avaliar a viabilidade e morfologia polínica.

CAPÍTULO II

Aspectos da diversidade genética de *Calydorea crocoides* (Iridaceae): uma espécie de distribuição restrita aos Campos de Cima da Serra.

Artigo a ser convertido para o Inglês, para submissão ao periódico *Botanical Journal of the Linnean Society*

Aspectos da diversidade genética de *Calydorea crocoides* (Iridaceae): uma espécie de distribuição restrita aos Campos de Cima da Serra

Genética populacional e citogenética em *C. crocoides*

Juliana Lustosa M. A^{1*}, Eliane Kaltchuk-Santos^{1,2}, Juliana Fachineto¹, Tatiana T. Souza-Chies^{1,3}

Afiliações:

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, RS, Brasil.

² Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor para correspondência. E-mail: julianaalencar2003@yahoo.com.br

RESUMO

Calydorea crocoides Ravenna é uma espécie com distribuição predominante no Sul do Brasil, encontrada na Região dos Campos de Cima da Serra (Rio Grande do Sul, Brasil) em altitudes variando de 800 a 1.500 m. Aspectos relativos à diversidade genética e à citogenética da espécie foram investigados. Para análise populacional, marcadores Inter Sequência Simples Repetidas (ISSR) foram usados para investigar os níveis e padrão da variação genética dentro e entre populações de *C. crocoides*. Foi detectada uma diversidade genética relativamente baixa ao nível populacional (percentual de bandas polimórficas $PPB= 51,16\%$, número efetivo de alelos $N_e= 1,3268$, diversidade gênica de Nei $h= 0,1873$, índice de informação de Shannon $I= 0,2771$). A análise da variação molecular mostrou que maior parte da variação total (76%) foi encontrada entre indivíduos dentro das populações, enquanto que apenas 24% ocorreram entre as populações. O nível de fluxo gênico (N_m) foi de 0,9724 indivíduos por geração entre populações, sugerindo que a troca de genes entre populações foi baixa. A análise citológica mostrou que *C. crocoides* é uma espécie diploide ($2n=14$), com cromossomos relativamente grandes, apresentando um comprimento médio (CL) de $7,7\mu\text{m} (\pm 2,65)$. O cariótipo é assimétrico e bimodal. Foi observado heteromorfismo em dois pares cromossômicos, sendo o par I ligeiramente diferente e o par II com um heteromorfismo mais pronunciado. A espécie apresentou uma viabilidade polínica elevada, tendo sido observados duas diferentes morfologias de grãos de pólen. *C. crocoides* apresenta uma distribuição geográfica limitada; assim, fatores como fragmentação do habitat, isolamento, sistema de cruzamento, dispersão de pólen e de sementes, podem estar interferindo no fluxo gênico entre as populações.

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

ABSTRACT

Calydorea crocoides Ravenna is a species distributed predominantly in Southern Brazil, found in the region of Campos de Cima da Serra (Rio Grande do Sul, Brazil) at altitudes ranging from 800 to 1500m. Aspects of diversity and cytogenetics of the species were investigated. For population analyses, Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers were used to investigate the levels and pattern of genetic variation within and among populations of *C. crocoides*. Relatively low genetic diversity was detected at population level (percentage of polymorphic bands $PPB = 51.16\%$, effective number of alleles $N_e = 1.3268$, Nei's gene diversity $h = 0.1873$, Shannon information index $I = 0.2771$). Analysis of molecular variance showed that most of the total variation (76%) was found between individuals within populations, whereas only 24% occurred among populations, the level of gene flow (Nm) was 0.9724 individuals per generation between populations, suggesting that gene flow between populations was low. Cytological analysis showed that *C. crocoides* is a diploid species ($2n=14$) in which chromosomes are relatively large with an average length (CL) of $7.7\mu\text{m}$ (± 2.65). The karyotype is asymmetrical and bimodal. Heteromorphism was observed in two chromosome pairs, the pair I is slightly different and the pair II showed a more pronounced heteromorphism. The species had a high pollen viability was observed two different morphologies of pollen grains. *C. crocoides* has a limited geographic distribution factors such as habitat fragmentation, isolation, mating system, pollen and seeds dispersal may be influencing gene flow among populations.

Keywords: chromosome number – genetic differentiation – ISSR markers – karyotype – pollen viability.

INTRODUÇÃO

Calydorea Herb., pertence à família Iridaceae, subfamília Iridoideae, tribo Tigridieae. Este gênero, restrito ao continente sul-americano, contém 16 espécies (Goldblatt & Manning, 2008), sendo citada a ocorrência de 10 espécies para o Brasil (Eggers *et al.*, 2012).

Calydorea crocoides Ravenna é uma espécie com distribuição predominante no Sul do Brasil, na Região dos Campos de Cima da Serra no Rio Grande do Sul. Esta região é conhecida como *hotspot* de biodiversidade, uma vez que mantém alta diversidade de espécies, sendo caracterizada por um endemismo elevado na composição florística (Boldrini *et al.*, 2009; Iganci *et al.* 2011). Sem dúvida, tal região fornece um laboratório natural para o estudo da origem e conservação da biodiversidade.

Calydorea crocoides é uma herbácea bulbosa, de pequeno porte, com flores frágeis, de curta duração, com coloração lilás arroxeadas, encontrada em campos limpos, campos com herbáceas, encostas de morros, com altitude variando de 897 até 1.481 m (Dal Ri *et al.*, 2012 em preparação).

Iridaceae contem cerca de 2030 espécies distribuídas entre 65-75 gêneros (Goldblatt & Manning, 2008). Certos gêneros têm sido estudados extensivamente, devido à importância econômica como plantas ornamentais, alimentícia e especiarias (Tacuatiá *et al.*, 2012). No entanto, pouco se conhece em relação à maioria dos gêneros desprovidos de valor econômico, tais como as espécies de *Calydorea*.

Esta família é relativamente bem estudada quanto a informações citogenéticas, com número cromossômico determinado para mais de 1.000 espécies (aproximadamente 65%

do total na família), especialmente táxons do Velho Mundo (Goldblatt & Takei, 1997). As espécies do Novo Mundo têm sido menos estudadas (Goldblatt, 1982; Kenton *et al.*, 1986; Goldblatt & Takei, 1997).

O padrão cromossômico na tribo Americana Tigridaeae é razoavelmente claro, sendo o número ancestral básico fortemente conservado entre as suas espécies ($x=7$), apesar desta homogeneidade do número básico existe uma grande diversidade cariotípica (Goldblatt & Takei, 1997). A assimetria, a bimodalidade e o heteromorfismo cromossômico são comuns na tribo e indicam a ocorrência de rearranjos cromossômicos envolvendo inversões e translocações (Goldblatt, 1982; Kenton *et al.*, 1990; Goldblatt & Takei, 1997; De Tullio *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2011).

O gênero *Calydorea* possui o número básico da tribo $x=7$ havendo sido já descritos três níveis de ploidia ($2n=14$, 28 e 42) (Goldblatt, 1982; Goldblatt & Takei, 1997). Contudo, séries poliploides intraespecíficas não são relatadas para o gênero. Apesar da importância das informações sobre número cromossômico, análise do cariótipo e viabilidade polínica em estudos biosistemáticos (Stace, 1989), até o momento não houve relatos de pesquisas utilizando estas abordagens para *C. crocoides*.

Dentre as várias ferramentas moleculares, utilizadas para estudos genéticos de populações, especialmente em plantas (Gupta *et al.*, 1994; Bornet *et al.*, 2002; Reddy, Sarla & Siddiq, 2002), os marcadores ISSR “Inter-Simple Sequence Repeats” têm sido amplamente empregados devido ao seu alto nível de polimorfismo e reprodutibilidade (Bornet & Branchard, 2001). A técnica de ISSR é baseada no método de PCR (Polymerase Chain Reaction) e envolve a amplificação de um segmento de DNA presente a uma distância passível de amplificação entre duas regiões de microssatélites idênticas e

orientadas em direções opostas, as quais são abundantes e dispersas por todo o genoma, não sendo necessário o conhecimento da sequência flanqueada (Zietkiewicz, Rafalski & Labuda, 1994). ISSRs são particularmente vantajosos para a análise de genomas desconhecidos quando há uma falta de informação genômica para o táxon estudado (Shi *et al.*, 2006).

Estudos utilizando marcadores moleculares para investigar a diversidade genética em espécies da família Iridaceae têm sido realizados (Wróblewska *et al.*, 2003, Caiola, Caputo & Zanier, 2004; Spier *et al.*, 2008; Sik *et al.*, 2008; Tacuatiá *et al.* 2012 a, b). Contudo, não existem trabalhos relativos às espécies de *Calydorea*. Considerando que *C. crocoides* é uma espécie com distribuição restrita, teria ela uma menor variabilidade genética do que espécies mais amplamente distribuídas? Em virtude de seu padrão de distribuição, a diferenciação genética entre as populações é alta ou baixa? O presente estudo se propõe a investigar a diversidade e diferenciação genética de populações naturais de *C. crocoides* através de marcadores ISSR, tendo como objetivos específicos (a) avaliar os níveis de diversidade genética de populações naturais, (b) determinar o grau de diferenciação entre as populações, (c) caracterizar citogeneticamente a espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Espécimes de *Calydorea crocoides* foram amostrados em oito locais de coleta na Região Sul do Brasil (Fig.1; Tab.1). Exemplares de cada população estão depositados na forma de exsicatas no Herbário ICN, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

O material vegetal utilizado foi folhas desidratadas em sílica-gel, sendo empregados de 25 a 30 indivíduos por população para as análises populacionais.

Isolamento de DNA e amplificação de PCR ISSR

A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo modificado de Doyle & Doyle (1987). Um total de 31 *primers* de ISSR foi testado; desses, tendo como base a repetibilidade, a nitidez dos fragmentos e o percentual de espécimes em que houve amplificação, sete *primers* foram selecionados para a amplificação de DNA de todas as populações (Tabela 2). As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25µl de acordo com as seguintes condições (respeitando as particularidades de cada *primer*): 3 µl de DNA (30 ng), 2,5 µl de tampão 10x, 0,8-1 µl de dNTPs (10 mM), 1,2-2,0 µl de MgCl₂ (2,4 – 5,0 mM), 1 µl *primer* (10 pmol/µl), 0,2 µl de *Taq* DNA polimerase (5U/µl), q.s.p. 25µl H₂O. As amplificações ocorreram em termociclador Biocycler MJ96G seguindo as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 min.; seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min., anelamento a 48°C por 45s, 72°C por 2 min.; extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% e corados com GelRed (Amicon Corp., Lexington, MA). O tamanho dos fragmentos foi estimado comparativamente com Ladder 100bp (Ludwig Biotec/Brasil).

Análise Estatística

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados como variáveis binárias, categorizadas em presença (1) ou ausência (0) para cada tamanho amplificado gerando uma matriz binária de dados. Parâmetros genéticos incluindo o percentual de lócus polimórficos (PPB), número de alelos observados (N_a), número efetivo de alelos (N_e),

índice de informação de Shannon (I) (Lewontin, 1972), diversidade gênica de Nei (h) (Nei, 1973) e fluxo gênico (N_m) foram calculados usando o programa computacional POPGENE v. 1.31 (Yeh, Yang & Boyle, 1999).

Uma matriz de distância genética (Nei, 1978) foi gerada pelo TFPGA versão 1.3 (Tools for Population Genetic Analyses; Miller, 1997) para construir um agrupamento pareado não ponderado baseado na média aritmética (UPGMA) com 1000 permutações. Frequências dos marcadores foram estimadas com base na estimativa de expansão Lynch e Milligan (1994) Taylor. Para avaliar o relacionamento genético entre as populações, um dendrograma UPGMA baseado na similaridade de Jaccard foi produzido no programa NTSYS (Rohlf, 2000).

A análise hierárquica da variância molecular (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) foi obtida com o programa GenAlEx versão 6.4 para determinar os componentes da variância e os seus níveis de significância.

Para testar a correlação entre a matriz de distância genética e distância geográfica (em Km) entre as populações, um Teste de Mantel foi empregado usando GenAlEx versão 6.4.

Uma análise Bayesiana da estrutura populacional foi realizada no conjunto de dados usando o programa STRUCTURE versão 2.3.1 (Falush *et al.*, 2007) para detectar a estrutura das populações e estimar o número provável de agrupamentos (K) em uma amostra. O número mais provável de agrupamento populacional (k) foi estimado sob o modelo de mistura e correlacionados às frequências alélicas, sem informação prévia sobre a origem da população. O programa foi executado para 10.000 iterações, após um “*burn-in*” de 10.000 iterações, para testar a subdivisão da população a partir de $k = 1$ para $k = 16$,

e, assim, verificar se há qualquer subdivisão possível. Vinte rodadas foram realizadas para cada k para quantificar a variação na probabilidade, como um meio de verificar se corridas diferentes poderiam produzir valores de probabilidade diferentes. Proporções de misturas individuais e média (Q) para cada população em cada grupo genético encontrado pelo programa foram registradas para o modelo. Como auxílio para a identificação do número de agrupamentos de indivíduos (k), os resultados gerados pelo STRUCTURE foram subsequentemente analisados por meio do STRUCTURE HARVESTER versão 0.6.7 (Earl, 2011), de acordo com o método de Evanno *et al.* (2005). As estimativas de diversidade genética (h_s ; definida como heterozigosidade média panmítica) dentro de cada população foram também calculadas usando o programa HICKORY version 1.1 (Holsinger *et al.* 2002).

Utilizou-se o programa BOTTLENECK 1.2.02 (Piry, Luikart & Cornuet, 1999) para testar se as populações se encontram em equilíbrio entre mutação e deriva genética, conforme metodologia descrita em Cornuet & Luikart (1996). O Modelo de Mutação de Infinitos Alelos (IAM) e Modelo de “Passos de Mutação” (SMM-stepwise mutation model) foram implementados para *sign test*.

ANÁLISE CITOLÓGICA

Número cromossômico e cariótipo

A determinação do número cromossômico e a caracterização cariotípica foram realizadas a partir da análise de cromossomos mitóticos. Para tanto, raízes obtidas a partir de bulbos foram pré-tratadas com paradiclorobenzeno (PDB) a 10°C por 24h, fixadas em etanol:ácido acético (3:1) por 12-24h à temperatura ambiente e estocadas à -20°C. Para

determinação do número cromossômico, foram analisados vinte indivíduos pertencentes às populações ESC 661, ESC 677, ESC 684, ESC 692, ESC 688 e JLM-1.

O preparo das lâminas envolveu lavagem das raízes em água destilada por 10 minutos seguida de hidrólise em HCl 5N por 20 minutos. Realizou-se digestão enzimática das raízes em solução de celulase 2% e pectinase 20% a 37°C por 30 minutos. O material foi esmagado em uma gota de ácido acético 45% e coberto com lamínula. Utilizou-se coloração convencional com Giemsa 2% por 15min.

As células, cujos cromossomos apresentaram bom espalhamento, foram registradas em fotomicroscópio óptico Zeiss Axioplan. Para a análise da arquitetura cariotípica foram determinados o comprimento cromossômico (S - braço curto, L - braço longo e TL - total), razão entre os braços ($R = L/S$), índice centromérico ($CI=S/TL$), morfologia cromossômica, comprimento cromossômico médio (CL) e comprimento haploide total (THL). A assimetria do cariótipo foi estimada utilizando-se os índices A1 e A2 (intra- e intercromossômico, respectivamente) de Romero Zarco (1986) e a classificação de Stebbins (1971). A montagem do cariótipo e as medidas cariotípicas foram realizadas no software de edição de fotos Adobe Photoshop CS.

Morfologia e viabilidade dos grãos-de-pólen

O material empregado para as análises de pólen constituiu-se de inflorescências de cinco a 10 indivíduos por população (ESC 692, ESC 688 e ESC 677), as quais foram coletadas a campo e fixadas em solução 3:1 etanol/ácido acético por 12-24 h a temperatura ambiente. As lâminas foram preparadas seguindo o método de Alexander (Alexander, 1980), em que os grãos de pólen vazios inviáveis coram-se de verde e grãos de pólen viáveis coram-se de púrpura. Para determinação da viabilidade polínica, foram analisadas amostras de 500 grãos de pólen por flor a partir de, pelo menos, sete indivíduos por

população. Foram também realizadas medidas dos eixos polar (P) e equatorial (E) de 20 grãos de pólen por lâminas para a determinação da morfologia conforme Figura 4 D.

RESULTADOS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Diversidade genética

Neste estudo, a diversidade genética foi examinada em *Calydorea crocooides*, com base no padrão de fingerprinting com marcadores ISSR. Sete primers foram escolhidos para amplificar um total de 235 indivíduos de oito populações (Tabela 1). O tamanho dos produtos amplificados variou de 200 a 2.080 pares de bases e o número de fragmentos amplificados para cada primer foi de sete [A(TG)₈] a 18 [(GACA)₄] com uma média de 13,86 por primer. O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) variou de 0,24 a 0,41 com uma média de 0,29 (Tabela 2). Os sete primers produziram um total de 97 fragmentos claramente identificáveis onde o percentual de loci polimórfico médio foi 51,16%, com um intervalo de 36,08% (ESC 218) a 61,86% (JLM-1) ao nível populacional (Tabela 3). O número médio de alelos efetivos por loco foi 1,3268. Assumindo equilíbrio de Hardy–Weinberg, a diversidade de Nei (*h*) variou entre 0,1331 a 0,2233 com uma média de 0,2821, e o índice de informação de Shannon (*I*) variou de 0,1970 a 0,3276 com valor médio 0,4319. Resultados para diversidade genética dentro de cada população (*h_s*) para uma análise Bayesiana no programa HICKORY (modelo completo) variou de 0,1418 a 0,2238, semelhante ao obtido para o índice de Nei.

Nenhum fragmento específico foi detectado em cada população. A divergência entre as populações foi atribuída principalmente a diferenças de frequência dos fragmentos de DNA e não por fixação de alelos.

Estrutura genética populacional

O resultado da análise de variância molecular (AMOVA) mostrou variação genética significativa ($p < 0.001$) entre as populações. A maior parte da variação total (76%) foi encontrada entre indivíduos dentro das populações, enquanto que apenas 24% ocorreram entre as populações. Além disso, o nível de fluxo gênico (N_m) foi 0,9724 indivíduos por geração entre populações, sugerindo que a troca de alelos entre populações foi baixa. Com o intuito de analisar o fluxo gênico (N_m) e estruturação populacional (F_{ST}) entre as oito populações de *C. crocoides*, uma matriz par a par foi construída. As populações ESC 661 e ESC 218 foram as que apresentaram os maiores valores de F_{ST} (0,41) e menores N_m (1,152) (Tabela 4).

A identidade genética de Nei calculada entre pares de populações variou de 0,8080 (ESC 218 e ESC 677) a 0,8999 (ESC 677 e ESC 692), valores estes que, por serem próximos a 1, mostram o alto grau de similaridade genética entre as populações avaliadas. A distância genética de Nei, calculada para inferir a divergência genética entre populações, variou de 0,1055 a 0,2132, e seu menor valor foi observado entre os pares de populações ESC 677 e ESC 692, enquanto o maior valor foi observado entre os pares ESC 218 e ESC 677. ESC 677 é uma população originária do município de Tainhas (RS) e ESC 692 é originária de Bom Jardim (SC) distando quase 120 km uma da outra. A população ESC 218 está localizada em São José dos Ausentes, RS a aproximadamente 61 km da população ESC 677. As populações próximas geograficamente, não são necessariamente aquelas mais similares geneticamente.

A figura 2 ilustra o dendrograma produzido pelo programa TFPGA, o qual apresenta uma topologia idêntica àquela gerada pelo programa NTSYS baseado na

similaridade genética no índice de Jaccard (não ilustrado). O dendrograma revela que as oito populações foram separadas em dois grupos, um contendo as populações ESC 661 e ESC 218 (grupo I) e o segundo contendo as demais (ESC 677, ESC 692, ESC 688, DR 71, JLM-1 e ESC 684). No grupo I todos os indivíduos da mesma população foram arranjados em cada agrupamento populacional específico, o mesmo não sendo observado no segundo agrupamento. O teste de Mantel não mostrou uma correlação significativa entre a matriz de distância genética e de distância geográfica ($r = 0,299$, $p < 0.089$, 999 permutações).

Na análise realizada com o programa STRUCTURE (Figura 3), a maior probabilidade de agrupamentos formados foi obtida quando as amostras foram agrupadas em dois grupos ($K = 2$). A decisão foi baseada na estatística k , na medida em que o número do pico mais alto do seu valor modal corresponde ao número de agrupamentos detectados pelo software. Estes agrupamentos foram totalmente consistentes com os resultados produzidos para UPGMA pelo TFPGA e NTSYS.

Pelos testes de adequação aos modelos de Mutação de Infinitos Alelos e de “Passos de Mutação” (Cornuet & Luikart 1996), as populações ESC 661 e ESC 218 passaram por um efeito gargalo de garrafa (*bottleneck*), enquanto que as demais populações mostraram-se em Equilíbrio de Mutação e Deriva (Tabela 5).

ANÁLISE CITOGENÉTICA

Análise mitótica foi realizada com indivíduos de *Calydorea crocoides* provenientes de seis populações. Todos os acessos têm número cromossômico básico $x=7$. O nível de ploidia se manteve o mesmo, com todos os indivíduos dos acessos apresentando-se diploides, $2n = 2x = 14$ não sendo observados citótipos para esta espécie (Figura 4 A, B).

As medidas cariotípicas obtidas a partir de células metafásicas estão apresentadas na Tabela 6. Os cromossomos são relativamente grandes, apresentando um comprimento médio (CL) de $7,7\mu\text{m}$ ($\pm 2,65$), sendo o comprimento haploide total de $54,40\mu\text{m}$ ($\pm 2,65$). A espécie contém quatro cromossomos metacêntricos e dez submetacêntricos. Dois satélites foram observados nos braços curtos de um par cromossômico metacêntrico (Figura 4 B). Foi observado heteromorfismo em dois pares cromossômicos, sendo os cromossomos do par I ligeiramente diferentes e os do par II com um heteromorfismo mais pronunciado (Figura 4 B).

Uma clara bimodalidade foi verificada em *C. crocoides*, onde o par I metacêntrico é bem maior que o restante do complemento. Quanto à assimetria cariotípica, *C. crocoides* é classificada, segundo Stebbins (1971) como 3B. A análise de assimetria pelo método de Romero Zarco (1986) mostrou a existência de assimetria intracromossômica ($A1=0,39$) com variação no comprimento dos braços dos cromossomos; também foi verificada uma variação moderada no tamanho dos cromossomos com relação sendo o índice de assimetria intercromossômica $A2$ de 0,34.

Com relação à viabilidade de pólen, os três acessos avaliados apresentaram valores superiores a 90%. As medidas dos grãos de pólen (Figura 4 D) foram também realizadas. A razão entre eixos do pólen (P/E) variou de 0,90 a 1,06 (Tabela 7), compreendendo grãos de pólen do tipo prolado esferoidal e oblado esferoidal, segundo classificação de Erdtman (1971) sendo ambos os tipos pertencentes a classe subesferoidal. O pólen do tipo oblado esferoidal é o mais frequente.

DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Diversidade genética

No presente trabalho, são apresentados os primeiros dados genéticos referentes a populações naturais de *Calydorea crocooides*. Esses dados permitem uma avaliação dos níveis atuais da variação genética e estruturação populacional podendo contribuir para a conservação e manejo da espécie que apresenta uma distribuição restrita.

Como revelado por marcadores ISSR, *C. crocooides* tem uma diversidade genética relativamente alta ($PPB = 98,97\%$, $h = 0,2821$), sendo maior do que os valores médios encontrados em herbáceas perenes ($PPB = 39,30\%$, $h = 0,1240$) e em espécies com distribuição endêmica ($PPB = 40\%$, $h = 0,096$) (Hamrick *et al.* 1990). No entanto, em contraste, a diversidade genética ao nível populacional foi baixa ($PPB = 51,16\%$, $h = 0,1873$). Geralmente, espécies com faixa de distribuição geográfica pequena, por serem adaptadas a um nicho de distribuição geográfica restrita, bem como espécies ameaçadas, tendem a manter menores níveis de variação genética do que espécies com distribuição geográfica ampla (Xiao, Ge & Gong, 2004; Li *et al.*; 2005). Contudo, exceções não são incomuns (Luan *et al.*, 2006; Lopez-Pujol *et al.*, 2002).

A diversidade genética de espécies vegetais pode ser afetada por muitos fatores, tais como amplitude da área de distribuição, duração do ciclo de vida, sistema de cruzamento e modo como suas sementes são dispersas. Uma espécie que tem vida longa, uma alta frequência de fluxo gênico e muitas sementes tende a apresentar alta diversidade genética (Wang *et al.* 2012; Chain, Chen, Xu, 2010; Schaal *et al.* 1998). A partir de observações a

campo foi verificado que *C. crocoides* é uma herbácea perene polinizada por abelhas pequenas, as quais podem promover fecundação cruzada, possibilitando a manutenção de variabilidade genética entre as populações mesmo sendo esta uma espécie que ocorre em região fragmentada. A região dos Campos de Cima da Serra, área de ocorrência natural de *C. crocoides*, é hoje um fragmento de floresta cercado por áreas agrícolas. É provável que a alta diversidade genética encontrada seja derivada de uma única população original mais ampla.

Estrutura genética populacional

A análise da variância molecular mostrou que a maior parte da variação genética encontrada ocorreu dentro das populações (76%), com F_{ST} global = 0,239 evidenciando uma moderada estruturação populacional. Os dados de variação genética sugerem uma estrutura genética característica de plantas de fecundação cruzada. Segundo Hamrick & Godt (1996), há mais variação genética global e menos diferenciação entre as populações de plantas alógamas do que em plantas de autofecundação. Embora os valores de F_{ST} globais apontem para populações mais estruturadas, as análises realizadas para *C. crocoides* levam a evidências de amplo fluxo gênico entre as populações investigadas.

A estrutura genética populacional de plantas reflete a interação de vários processos evolutivos, incluindo a história evolutiva a longo prazo, como mudanças na distribuição, fragmentação do habitat e isolamento populacional, mutação, deriva genética, sistema reprodutivo, fluxo gênico e seleção (Schaal et al. 1998). Fatores como o isolamento e fluxo gênico, os quais afetam diretamente o tamanho efetivo da população, podem ter uma grande influência sobre os níveis de diversidade genética dentro e entre populações de espécies arbóreas (Hamrick, Godt, Sherman-Broyles, 1992).

Espécies com baixo fluxo gênico tendem a apresentar maior diferenciação genética do que espécies com alto fluxo gênico. A diferenciação entre populações com $N_m < 1$ ocorrerá, sobretudo, a partir de fluxo gênico limitado em condições de pressão seletiva alta ou à distribuição descontínua (Wright, 1951; Slatkin, 1985). No presente estudo, N_m para *C. crocoides*, foi de 0,9724 indicando que existe isolamento espacial e diferenciação genética entre as populações.

Na árvore inferida por UPGMA, as populações foram divididas em dois grupos principais (Figura 2). O grupo I reúne as populações ESC 661 e ESC 218, enquanto as populações remanescentes foram agrupadas em um segundo grupo. Esta constatação foi consistente com o resultado da análise Bayesiana, onde claramente foram identificados os mesmos agrupamentos (Figura 3).

É importante notar que nas populações ESC661 e ESC 218 a percentagem de loci polimórficos foi menor, na maioria dos indivíduos não houve mistura de alelos com as demais populações (Figura 3), e os índices de diversidade genética foram os mais baixos (Tabela 3).

O teste de Mantel mostrou, no entanto, que não houve correlação significativa entre distância geográfica e distância genética com base nos dados de ISSR ($r = 0,299$, $p < 0,089$). Múltiplos fatores podem ser responsáveis por este padrão. Primeiro, é provável que o nível atual de diversidade genética seja apenas um reflexo parcial de um polimorfismo ancestral de *C. crocoides*, uma vez que é sabido que o fluxo gênico atual é limitado entre as populações. Segundo, a análise de *bottleneck* sugeriu que as populações ESC661 e ESC 218 possam ter experimentado um *bottleneck* recente sob os modelos IAM e SMM, sugerindo que estas populações possam ter sofrido subsequente redução do tamanho

através de uma diminuição periódica da população (Tabela 5). Terceiro, a deriva genética pode ter exercido um papel importante na determinação da estrutura genética, uma vez que a diferenciação genética deve aumentar em populações cada vez menores e mais isoladas.

Barreiras geográficas podem impedir o fluxo gênico, causando diferenciação entre as populações. No entanto, a fragmentação da população pelas atividades humanas também podem aumentar artificialmente a diferenciação genética entre as populações ao longo do tempo (Hao *et al.*, 2006).

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA

Número cromossômico e análises cariotípicas

O número cromossômico e o cariótipo de *Calydorea crocoides* foram relatados pela primeira vez a partir deste estudo. Seguindo o padrão da tribo Tigridieae, *C. crocoides* têm número cromossômico básico $x=7$, sendo uma espécie diploide ($2n=14$), o que, juntamente com a presença de bulbos e folhas plicadas, é considerada uma sinapomorfia para a tribo Tigridieae (Goldblatt, 1982). Embora espécies poliploides sejam conhecidas no gênero *Calydorea* (*C. azurea* Klatt, *C. pallens* Griseb., $2n=28$ e *C. xiphioides* (Poepp.) Espinosa $2n=42$; Goldblatt 1982; Goldblatt & Takei, 1997), e a ocorrência de séries poliploides intraespecíficas seja comum na tribo Tigridieae e na família Iridaceae (Souza-Chies *et al.*, 2012 no prelo), não foi observada poliploidia em *C. crocoides*.

A bimodalidade cariotípica ocorre em muitas plantas e animais e é considerada uma forma cariotípica altamente especializada podendo ser utilizada para caracterizar grupos de gêneros ou espécies (Natalia *et al.*, 2009; Kenton *et al.*, 1990; Naranjo *et al.*, 1998). *C. crocoides* apresenta cariótipo claramente assimétrico, sendo marcado pela bimodalidade.

Os cromossomos são grandes variando de 5,74 a 13,75 μm onde se observa uma grande diferença entre o comprimento do maior e do menor cromossomo ($R= 2,40$) (Tabela 6 e Figura 4). De Tullio *et al.* (2008) observaram uma pronunciada bimodalidade em *C. undulata* Ravenna, onde dois dos setes pares cromossômicos eram claramente maiores do que o restante. Em *C. crocoides* apenas um dos pares difere significativamente em tamanho dos demais.

A avaliação da simetria cariotípica é de extrema relevância para inferências acerca da evolução cromossômica, especialmente na família Iridaceae onde a ocorrência de eventos de rearranjos cromossômicos, disploidias e poliploidia resultam em uma grande diversidade de números e tamanhos cromossômicos. Como já mencionado anteriormente, a assimetria tem sido encontrada em inúmeras espécies da tribo Tigridieae e entre elas, espécies de *Calydorea* (De Tullio, 2008; Kaltchuk-Santos, dados não publicados). Em *C. crocoides* os índices de assimetria intra e intercromossômica ($A1$ e $A2$, respectivamente) e a classificação de Stebbins (1971) evidenciam a existência de assimetria, com variação na morfologia e tamanho dos cromossomos. Os índices de assimetria encontrados no presente estudo ($A1=0,39$ e $A2=0,34$) são semelhantes aos encontrados para *C. undulata* ($A1=0,31$ e $A2=0,30$), embora na classificação de Stebbins as duas espécies estejam em categorias distintas, 3B e 2B respectivamente (De Tullio, 2008). Estes dados indicam uma maior assimetria em *C. crocoides*.

Segundo Stebbins (1971) existe uma tendência de espécies com cariótipos mais simétricos serem mais ancestrais e aqueles com maior assimetria mais derivadas. O gênero *Calydorea*, assim como os demais gêneros da tribo Tigridieae, exibe uma pronunciada assimetria diferentemente das outras duas tribos da subfamília Iridoideae, Trimezieae e Sisyrinchieae. As filogenias da família Iridaceae e da subfamília Iridoideae (Goldblatt *et*

al., 2008; Chaveau *et al.*, 2012), baseadas em marcadores moleculares corroboram tais dados cariotípicos, sendo Tigridaeae mais derivada.

Heteromorfismos cromossômicos são frequentes na tribo Tigridaeae, com registros para *Eleutherine bulbosa* (Mill) Urb., em *Gelasine elongata* (R. Graham) Ravenna e *Cipura paludosa* (Kenton & Rudal, 1987; Guerra, 1988, 1991; Alves *et al.*, 2011). Tais heteromorfismos podem ser resultantes de inversões seguidas de duplicação em tandem ou de translocações. Em *C. crocoides* foi evidenciada a existência de heteromorfismo em dois pares cromossômicos. Uma identificação mais precisa do tipo de alteração estrutural envolvida na formação desses heteromorfismos será possível após um estudo do comportamento meiótico e da análise cariotípica empregando coloração diferencial como CMA/DAPI, bandamento C e FISH. Análises meióticas preliminares (Kaltchuk-Santos, dados não publicados) tem evidenciado em *C. crocoides* uma alta frequência de pontes anafásicas, sugerindo a ocorrência de rearranjos, muito embora a viabilidade polínica tenha sido elevada (>90 % - Tabela 7). Mesmo que alterações cromossômicas resultassem em diminuição da fertilidade, provavelmente a presença de bulbos em *C. crocoides* permita a sobrevivência da espécie via reprodução assexuada.

Morfologia e viabilidade do pólen

A quantidade e qualidade do pólen produzido por uma flor é um componente importante do *fitness* (Dafni & Firmage, 2000; Kelly, Rasch, Kalis, 2002), sendo a qualidade muitas vezes equiparada à viabilidade polínica, isto é, a proporção de grãos de pólen que são viáveis (Stanley & Linskens, 1974; Heslop-Harrison & Shivanna, 1984). Um método comum para avaliar a quantidade de pólen e sua viabilidade é a coloração e contagem direta (Alexander, 1980; Barrett, 1985; Dudash, 1991).

Em todos os acessos analisados de *C. crocoides*, sem exceção, a média dos grãos de pólen viáveis foi significativamente superior à de inviáveis (Tabela 7). Altas taxas de viabilidade de pólen podem ser um indicativo de que as plantas são macho-férteis (Tacuatiá *et al.*, 2012). Embora não tenha sido analisado o comportamento meiótico, a alta viabilidade polínica (90,73% - 96,84%) é um indicativo de processo meiótico regular.

Em relação à morfologia do pólen, sabe-se que existe uma relação entre o tamanho do grão de pólen, bem como o de outros caracteres morfológicos, como o nível de ploidia de espécies vegetais, sendo observado muitas vezes o efeito giga dessas características (Ramsey & Schemske, 2002; Tacuatiá *et al.*, 2012). Tacuatiá *et al.* (2012) encontraram relação positiva entre o nível de ploidia e tamanho de pólen ao estudar diferentes morfotipos de *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae). No presente estudo, apesar de haver diferença estatisticamente significativa em relação ao tamanho do grão de pólen, todos os acessos analisados eram diplóides, não sendo aplicável o fenômeno giga em relação ao pólen.

Em um estudo sobre a morfologia do pólen em Tigridieae, Rudall & Wheeler (1988) observaram que a subfamília Iridoideae, a qual *C. crocoides* está inserida, difere consideravelmente quanto à forma e tamanho do grão de pólen, com o tamanho variando entre e dentro das espécies. Tal variação está bem representada nos resultados demonstrados aqui, tendo sido observadas duas diferentes morfologias dentre os exemplares analisados.

CONCLUSÕES

O sucesso da manutenção e preservação de uma espécie depende de um bom entendimento do nível e distribuição da variação genética. A diversidade genética em populações naturais pode afetar significativamente a sobrevivência e a evolução das espécies ou populações em ambientes em mudança e, portanto, quaisquer esforços de conservação devem ter como objetivo preservar a diversidade genética máxima dentro do “pool” de genes-alvo.

Os resultados reportados no presente estudo mostraram uma baixa diversidade genética ao nível populacional e uma alta diversidade ao nível de espécie em *Calydorea crocoides*. O fluxo genético entre as populações geograficamente distantes é reduzido, porém não foi observada correlação entre a distância geográfica e genética, excluindo-se o modelo “isolamento por distância”. Os altos níveis de polimorfismo mantidos nesta espécie asseguram práticas conservacionistas onde o objetivo principal é preservar o máximo possível do potencial evolutivo da espécie através da manutenção da diversidade genética.

A fragmentação do habitat, predominantemente atribuída a pressões antrópicas causando uma redução do tamanho da população, torna a espécie suscetível à perda do polimorfismo genético pelo efeito da deriva genética aleatória e da endogamia. A partir dos resultados obtidos neste estudo, é possível fazer inferências sobre a conservação de *C. crocoides*. Entre as populações estudadas, a população DR 71 deve ser considerada para uma conservação *in situ*, pois apresenta um nível considerado de diversidade genética e está distribuída ao longo de uma região preservada, o Parque Nacional dos Aparados da Serra, podendo garantir a sobrevivência desta espécie. Para uma conservação *ex situ* a população JLM-1 deve ser considerada, pois apresenta uma diversidade genética elevada em relação às demais populações, podendo assim fornecer quase todos os polimorfismos genéticos desta

espécie. Uma vez que nenhum fragmento específico foi detectado em cada população e a divergência foi atribuída a diferenças de frequência dos fragmentos de DNA e não por fixação de alelos.

Os resultados gerados por este trabalho são inéditos e ampliam o conhecimento acerca do gênero *Calydorea*, e principalmente da espécie *C. crocoides*. A associação de dados moleculares e citogenéticos, bem como de alguns caracteres morfológicos permitirá uma melhor compreensão dos processos evolutivos que envolvem este grupo de espécies.

REFERÊNCIAS

- Alexander MP. 1980.** A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology* **55**: 13–18.
- Alves LI, Lima SAA, Felix LP. 2011.** Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* **34**(2): 259–267.
- Boldrini II, Eggers L, Mentz LA, Miotto STS, Matzen-Bacher NI, Longhi-Wagner HM, Trevisan R, Schneider AA, Setúbal RB. 2009.** Flora. In: Boldrini I, ed. *Biodiversidade dos Campos do Planalto das Araucárias*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 39–94.
- Bornet B, Branchard M. 2001.** Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and polymorphic tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**:209–215.
- Bornet B, Goraguier F, Joly G, Branchard M. 2002.** Genetic diversity in European and Argentinean cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome* **45**:481–484.
- Caiola MG, Caputo P, Zanier R. 2004.** RAPD analysis in *Crocus sativus* L. accessions and related *Crocus* species. *Biologia Plantarum* **48**: 375–380.
- Cornuet JM, Luikart G. 1996.** Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. **144**:2001-2014.
- Chai XY, Chen SL, Xu W. 2010.** Using inter-simple sequence repeat markers to analyze the genetic structure of natural *Pteroceltis tatarinowii* populations and implications for species conservation. *Plant Systematics and Evolution* **285**. 65-73
- 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.
- Dafni A, Firmage D. 2000.** Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 113-132.
- De Tullio L, Roitman G, Bernardello G. 2008.** *Tamia* (Iridaceae), a synonym of *Calydorea*: Cytological and morphological evidence. *Systematic Botany*. **33** (3):509-513.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin, Botanical Society of America* **19**: 11–15.
- Dudash MR. 1991.** Plant size effects on female and male function in hermaphroditic *Sabatica angularis* (Gentianaceae). *Ecology* **72**: 1004–1012.
- Eggers L, Chukr N, Lovo J, Gil A. 2012.** Iridaceae in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000136>. Acesso em 30 de junho de 2012.

Erdtman G. 1971. *Pollen morphology and plant taxonomy: angiosperms: an introduction to palynology*. New York: Hafner Publishing Company.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology* **14**:2611-2620.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**:479-491.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology* **7**:574-578.

Goldblatt P. 1982. Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of Neotropical Iridaceae. *Systematic Botany* **7**: 186–198.

Goldblatt P. 1990. Phylogeny and classification of Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **77**: 607-627.

Goldblatt P, Takei M. 1997. Chromosome cytology of Iridaceae – patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **84**: 285–304.

Goldblatt P, Manning JC. 2008. *The Iris Family: Natural History and Classification* Timber Press, 336p.

Guerra M. 1988. Introdução a Citogenética Geral. In: Guerra M. (eds.) *Heterocromatina e Bandeamento Cromossômico*. Guanabara, Rio de Janeiro, pp. 24-35.

Guerra M. 1991. Cis-acting regulation of the NOR cistrons in *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). *Genetica* **83**:235-241.

Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J, Owen JL. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* **89**: 998–1006.

Hamrick JL, Godt MJW. 1990. Allozyme Diversity in Plant Species. In *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*; Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L., Weir, B.S., Eds.; Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA, pp. 43–63.

Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles LS. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New For* **6**:95–124

Hamrick JL, Godt MJ. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. **351**:1291–1298

Hao B, Wang L, Linchum M, Li Y, Rui Z, Mingxia T, Weikai B. 2006. A study of conservation genetics in *Cupressus chengiana*, an endangered endemic of China, using ISSR markers. *Biochemical Genetics* **44**:31–45.

Kenton AJB, Dickie JB, Langton DH, Bennett MD. 1990. Nuclear DNA amount and

karyotype symmetry in *Cypella* and *Hesperoxiphium* (Tigridieae; Iridaceae). *Evolutionary Trends in Plants* **4**:59-59

Heslop-Harrison J, Heslop-Harrison Y, Shivanna KR. 1984. The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theoretical and Applied Genetics* **67**: 367–375.

Holsinger KE, Lewis PO, Dey DK. 2002. A Bayesian method for analysis of genetic population structure with dominant marker data. *Molecular Ecology* **11**:1157-1164.

Iganci JRV, Heiden G, Miotto STS, Pennington RT. 2011. Campos de Cima da Serra: the Brazilian Subtropical Highland Grasslands show an unexpected level of plant endemism. *Botanical Journal of the Linnean Society* **167**, 378–393.

Kelly JK, Rasch A, Kalisz S. 2002. A method to estimate pollen viability from pollen size variation. *American Journal of Botany* **89**: 1021–1023.

Kenton A, Heywood CA. 1984. Cytological studies in South American Iridaceae. *Plant Systematic and Evolution* **146**:87-104.

Kenton AY, Rudall PJ, Johnson AR. 1986. Genome size variation in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) and its relationship to phenotype and habitat. *Botanical Gazette* **147**: 342–354.

Kenton A, Dickie JB, Langton DH & Bennett MD. 1990. Nuclear DNA amount and karyotype symmetry in *Cypella* and *Hesperoxiphium* (Tigridieae: Iridaceae). *Evolutionary Trends in Plants* **4**: 59-69.

Lewontin, R.C. 1972. Apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* **6**, 381–398.

Li FG, Xia NH. 2005. Population structure and genetic diversity of an endangered species, *Glyptostrobus pensilis* (Cupressaceae). *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **46**, 155–162.

Luan S, Chiang TY, Gong X. 2006. High genetic diversity vs. low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, revealed by ISSR fingerprinting. *Annals of Botany* **98**, 583–589.

Lopez-Pujol J, Bosch M, Simon J, Blanche C. 2002. Allozyme variation and population structure of the very narrow endemic *Seseli farrenyi* (Apiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **138**: 305–314.

Lynch M, Milligan BG. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**:91-99.

Miller MP. 1997. *Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA)*, ver. 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.

Naranjo CA, Ferrari MR, Palermo AM, Poggio L. 1998. Karyotype, DNA content, and meiotic behavior in five South American species of *Vicia* (Fabaceae). *Annals of Botany* **82**: 757-764.

- Natalia M, Peñas ML, Bernardello G, Roitman G. 2009.** Cytogenetic studies in *Herbertia* Sw. (Iridaceae). *Caryologia* **62**: 37-42.
- Nei, M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **70**, 3321–3323
- Nei M. 1978.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**:583-590.
- Özhatay N. 2002.** Diversity of bulbous monocots in Turkey with special reference. Chromosome numbers. *Pure and Applied Chemistry* **74**:547–555.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM. 1999.** *BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data.* *Journal of Heredity* **90**:502-503.
- Ramsey J, Schemske DW. 2002.** Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**: 589–639.
- Reddy MP, Sarla N, Siddiq E. 2002.** Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* **128**: 9–17.
- Rohlf FJ. 2000.** NTSYS-pc: *numerical taxonomy and multivariate analysis system*, version 2.1. New York: Exeter Publications.
- Romero Zarco C. 1986.** A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* **35**: 526–530.
- Rudall P, Wheeler A. 1988.** Pollen morphology in Tigridaeae (Iridaceae). *Kew Bulletin*. **43**: 693-701.
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM. 1998.** Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* **7**: 465–474.
- Sik L, Candan F, Soya S, Karamenderes C, Kesercioglu T, Tanyolac B. 2008.** Genetic variation among *Crocus* L. species from Western Turkey as revealed by RAPD and ISSR markers. *Journal of Applied Biological Sciences* **2**(2): 73-75.
- Shi S, Qiu Y, Wu L, Fu C. 2006.** Interspecific relationships of *Lycoris* (Amaryllidaceae) inferred from inter-simple sequence repeat data. *Scientia Horticulturae* **110**: 285–291.
- Slatkin M. 1987.** Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**:787–792
- Souza-Chies TT, Kaltchuk-Santos E, Eggers L, Flores AM, Alves EMS, Fachinetto J, Lustosa J, Corrêa LB, Tacuatiá LO, Piccoli P, Miz RB. 2012.** Studies on diversity and evolution of Iridaceae species of southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* (Impresso).
- Spier FF, Tacuatiá LO, Agostini G, Eggers L, Souza-Chies TT. 2008.** Uso de marcadores PCR-RFLP como ferramenta na identificação de espécies da subfamília Iridoideae (Iridaceae) presentes no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências* **6**: 159–165.

- Stace CA. 1989.** *Plant taxonomy and biosystematics*. London: Edward Arnold.
- Stanley RG, Linskens HF. 1974.** Pollen: biology, biochemistry, and management. *Springer-Verlag*, New York, New York, USA.
- Stebbins GL. 1971.** *Chromosomal evolution in higher plants*. Bristol: Edward Arnold.
- Tacuatiá LO, Eggers L, Kaltchuk-Santos E, Souza-Chies T. 2012a** Population genetic structure of *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae) in Itapuã State Park, Southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, **35**, 99- 105.
- Tacuatiá LO, Souza-Chies T, Flores AM, Eggers L, Siljak-Yakovlev S, Kaltchuk-Santos E. 2012 b.** Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. . *Botanical Journal of the Linnean Society*, **169**, 350–364.
- Wang XM, Hou XQ, Zhang YQ, Yang R, Feng SF, Li Y, Ren Y. 2012.** Genetic diversity of the endemic and medicinally important plant *Rheum officinale* as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 3900-3915.
- Wright S. 1951.** The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* **15**:323–354
- Wróblewska A, Brzosko E, Czarnecka BE, Nowosielski JL. 2003.** High levels of genetic diversity in populations of *Iris aphylla* L. (Iridaceae), an endangered species in Poland. *Botanical Journal of the Linnean Society* **142**: 65–72.
- Xiao LQ, Ge XJ, Gong X. 2004.** ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guixhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany* **94**: 133–138.
- Yeh F, Yang R, Boyle T. 1999.** POPGENE Version 1.32; Microsoft Window based Freeware for Population Genetic Analysis; *Molecular Biology and Biotechnology Center*, University of Alberta: Edmonton, AB, Canada.

LEGENDAS

Figura 1. Localização das populações estudadas de *Calydorea crocoides*. A – mapa do Brasil e distribuição dos acessos na região Sul do país. B – visualização maior com distribuição e respectiva identificação dos acessos.

Figura 2. Dendrograma UPGMA baseado na distância genética de Nei (1978) das populações de *Calydorea crocoides*: ESC 661, ESC 218, ESC 677, ESC 684, ESC 688, ESC692, JLM-1 e DR-71. Uma escala da distância genética é fornecida no topo do gráfico.

Figura 3. Proporções de mistura Bayesiana (Q) de indivíduos de *Calydorea crocoides* para $K= 2$, identificadas no STRUCTURE, indicadas em diferentes cores. O número mais provável de agrupamentos (k) foi estimado com o modelo de mistura e correlacionado as frequências alélicas, sem nenhuma informação a priori da origem da população. Populações analisadas: ESC 661, ESC 218, ESC 677, ESC 684, ESC 688, ESC 692, JLM-1 e DR-71.

Figura 4. Análise citogenética de *Calydorea crocoides*. A- célula mitótica $2n=14$, ESC 677. B- idiograma $n=7$. C- grão de pólen, ESC 692. D- medidas do grão de pólen (P, eixo polar; E, diâmetro equatorial). Grãos de pólen viável (escuro) e inviáveis (claros). Barra = 10 μm .

TABELAS

Tabela 1. Dados de coleta das populações analisadas de *Calydorea crocoides* na região Sul do Brasil.

População	Localidade	Latitude (°S)	Longitude (°W)	Altitude (m)	Nº indivíduos	Voucher
ESC 661	Bom Jardim, SC	28°21'41,0"	49°35'20,0"	1360	30	173569 ICN
ESC 692	Bom Jardim, SC	28°23'08,3"	49°33'18,6"	1450	30	Eggers& Souza-Chies 692
ESC 688	São Joaquim, SC	28°13'43,2"	49°50'51,3"	1481	30	Eggers& Souza-Chies 688
ESC 218	São José dos Ausentes, RS	28°48'09,2"	49°57'0,35"	1350	25	173567 ICN
ESC 677	Tainhas/RS	29°18'59,8"	50°09'59,5"	946	30	Eggers& Souza-Chies 677
ESC 684	Bom Jesus, RS	28°28'53,9"	50°19'49,0"	1073	30	Eggers& Souza-Chies 684
JLM-1	São Francisco de Paula, RS	29°27'21,9"	50°36'28,3"	897	30	173415 ICN
DR 71	Cambará do Sul, RS	29°10'40,4"	50°06'15,2"	954	30	173573 ICN
Total					235	

ESC indica os coletores Eggers e Souza-Chies, DR indica o coletor Dal Ri, JLM coletor Juliana Lustosa Matos.

Tabela 2. Tamanho alélico (pb), número de locos (A) e conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) observado em cada um dos sete primer de ISSR analisados em oito populações de *Calydorea crocoides*.

<i>Primer</i>	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho alélico (pb)	Número de locos	PIC
F3 (AG)₈YC	48	250-2080	17	0,26
F4 (GA)₈YC	48	250-2080	17	0,23
F12 (GTGC)₄	48	400-1600	11	0,34
F11(GACA)₄	48	200-2080	18	0,24
SV8 (GA)₈C	48	500-2080	14	0,23
SV4 A(TG)₈	48	700-1400	7	0,25
SP2 (AG)₈C	48	400-2080	13	0,27
Total			97	
Média			13,86	0,26
Mín-Máx		200 – 2080		0,23 - 0,34

Tabela 3 - Diversidade genética para populações de *Calydorea crocoides*.

Populações	N_a	N_e	h	I	PPB (%)	hs
ESC 661	1,4227	1,2280	0,1369	0,2074	42,27	0,1418
ESC 218	1,3608	1,2315	0,1331	0,1970	36,08	0,1509
ESC 677	1,5670	1,3809	0,2171	0,3195	56,70	0,2207
ESC 684	1,5773	1,3986	0,2231	0,3261	57,73	0,2218
ESC 688	1,4948	1,2986	0,1763	0,2639	49,48	0,2003
ESC 692	1,5876	1,3967	0,2233	0,3276	58,76	0,2238
JLM-1	1,6186	1,3783	0,2143	0,3182	61,86	0,2152
DR- 71	1,4639	1,3018	0,1743	0,2574	46,39	0,1852
Média	1,5116	1,3268	0,1873	0,2771	51,16	0,1464
Nível de espécie	1,9897	1,4724	0,2821	0,4319	98,97	0,1950

N_a : número de alelos observados; N_e : número efetivo de alelos; h : diversidade de gene Nei's (1973); I : índice de informação de Shannon's; PPB: percentual de bandas polimórfica, h_s : diversidade genética.

Tabela 4 - Matriz par a par de fluxo gênico (N_m) e estruturação populacional (F_{ST}) entre as oito populações de *Calydorea crocoides*.

F_{ST} \ N_m								
	ESC 661	ESC 218	ESC 677	ESC 684	ESC 688	ESC 692	JLM 1	DR 71
ESC 661	-	1,152	1,462	1,491	1,612	1,318	1,47	1,084
ESC 218	0,41	-	1,099	1,459	1,511	1,257	1,2	1,015
ESC 677	0,417	0,411	-	2,573	2,402	2,82	2,208	2,106
ESC 684	0,36	0,334	0,169	-	2,076	2,239	1,925	2,017
ESC 688	0,306	0,311	0,148	0,141	-	2,339	2,134	2,018
ESC 692	0,36	0,341	0,099	0,134	0,111	-	2,605	2,225
JLM 1	0,361	0,368	0,173	0,198	0,138	0,122	-	1,918
DR 71	0,407	0,397	0,074	0,14	0,127	0,08	0,169	-

Tabela 5 – Resultados para análise de *bottleneck* das oito populações de *Calydorea crocoides*.

População	Teste do Sinal							
	IAM				SMM			
	N*	Déficit	Excesso	P	N*	Déficit	Excesso	P
ESC 661	41.58	67	30	0.01061	48.45	69	28	0.00002
ESC 218	44.67	68	29	0.00084	47.92	73	24	0.00000
ESC 677	41.14	50	47	0.13539	48.43	54	43	0.15792
ESC 684	41.29	49	48	0.10131	48.56	52	45	0.26725
ESC 688	41.32	58	39	0.35572	48.67	61	36	0.00648
ESC 692	41.37	50	47	0.14581	48.77	52	45	0.25321
JLM 1	41.42	53	44	0.33299	48.95	56	41	0.06487
DR 71	41.35	60	37	0.21536	48.53	60	37	0.01224

N* número esperado de locos com excesso de heterozigosidade sob o modelo, seguido pelos respectivos números de locos com déficit e excesso de heterozigosidade; P= probabilidade.

Tabela 6. Medidas cariotípicas, fórmula cariotípica e índices de assimetria de *Calydorea crocoides*.

PARES	S (µm)	L (µm)	TL (µm)	CI	r	Morfologia
I	6,35	7,40	13,75	46,16	1,17	M
II	2,59	3,66	6,25	41,38	1,42	M
III	2,67	5,33	7,99	33,37	2,00	SM
IV	2,52	4,79	7,31	34,45	1,90	SM
V	2,49	4,39	6,88	36,22	1,76	SM
VI	2,36	4,13	6,49	36,30	1,76	SM
VII	2,02	3,72	5,74	35,23	1,84	SM

CL	7,77 (± 2,65) *
THL	54,4 (± 2,65) *
R	2,40
Fórmula cariotípica	4M + 10SM
Número de satélite	2
Steb.	3B
A1	0,39
A2	0,34

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

Tabela 7 – Morfologia e fertilidade do pólen em acessos de *Calydorea crocoides* na região sul do Brasil.

População	Eixo polar (P) (μm)	Eixo equatorial (E) (μm)	P/E	Morfologia	Pólen viável	Pólen inviável	Viabilidade (%)
ESC 692	40,63a	38,28a	1,06	Prolado esferoidal	3500	356	90,76
ESC 688	39,32b	41,88b	0,94	Oblado esferoidal	3500	235	93,70
ESC 677	37,14c	41,20b	0,90	Oblado esferoidal	3500	114	96,84

FIGURA 1

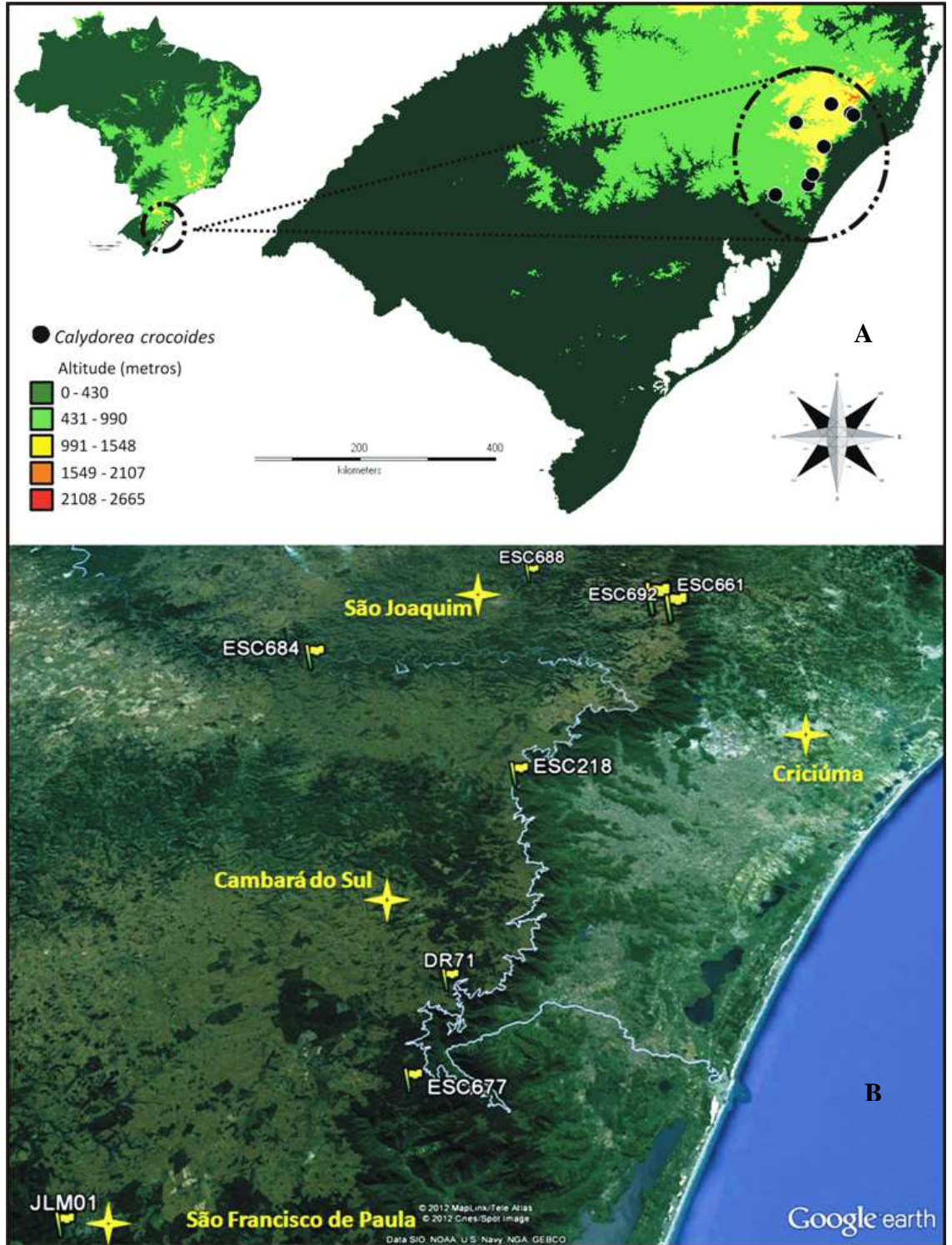


FIGURA 2

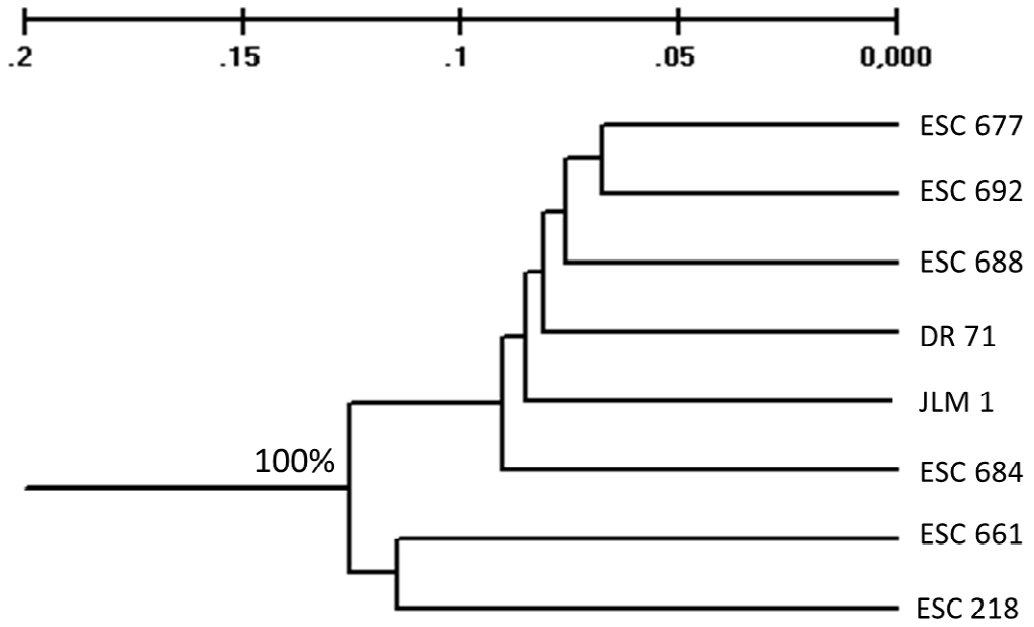


FIGURA 3

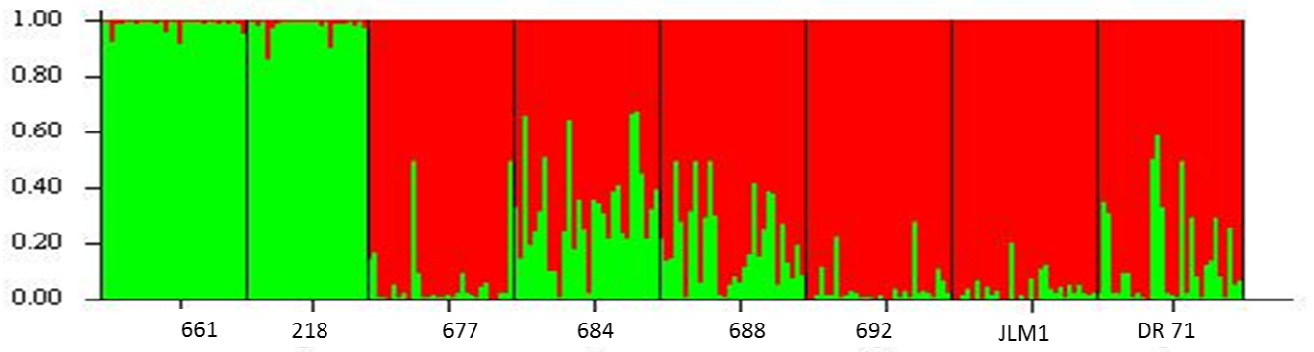
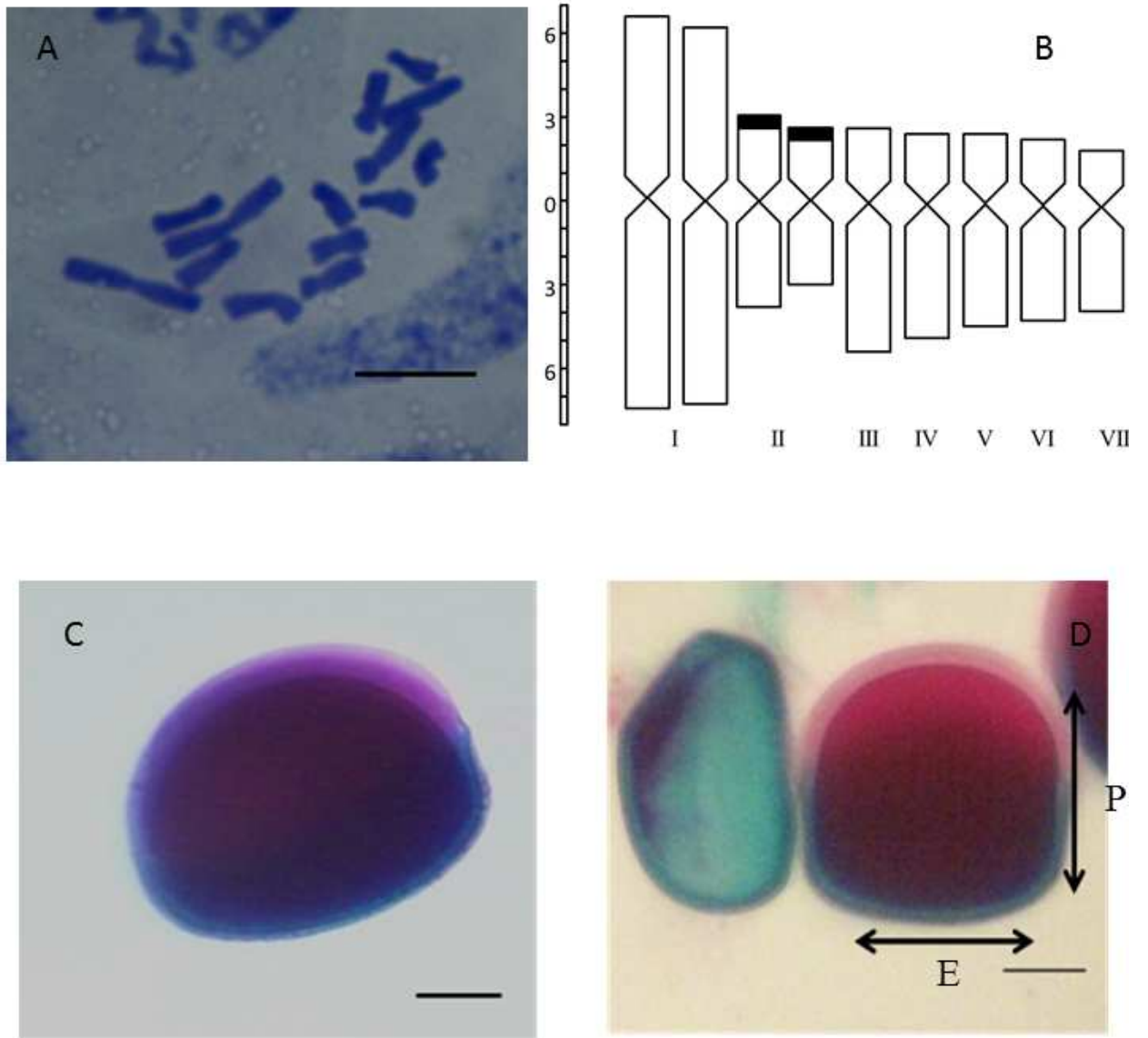


FIGURA 4



CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados moleculares e citológicos apresentados constituem dados inéditos e relevantes sobre a caracterização da espécie *Calydorea crocoides*, uma espécie de distribuição restrita ao domínio Mata Atlântica, predominantemente no sul do Brasil na Região dos Campos de Cima da Serra (RS). Pouco era conhecido sobre esta espécie, além de sua descrição morfológica em 1965 pelo botânico chileno Pierfelice Ravenna, tendo como base exemplares coletados em São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul. O endemismo para a região Sul do Brasil é questionável, uma vez que, um espécime de *C. crocoides* foi registrado para o estado de Minas Gerais. No entanto, novas buscas desta planta no sudeste brasileiro se fazem necessárias para confirmação do registro e análise da abrangência de sua distribuição.

Através de uma análise da estrutura populacional de *C. crocoides* ao longo dos estados do RS e SC foi possível observar que grande parte da variabilidade genética é encontrada dentro das populações com nível de fluxo gênico baixo, demonstrando uma moderada estruturação populacional. As análises de agrupamento por indivíduos evidenciaram que os mesmos tendem a agrupar por local de origem (por população), porém mistura de indivíduos são observadas. Vários fatores podem explicar um cenário de baixa diversidade genética, como sistema de cruzamento, dispersão de pólen e sementes, alterações entre as interações planta-polinizador, além de fragmentação do habitat. A região dos Campos de Cima da Serra, área de ocorrência natural de *C. crocoides*, é hoje um fragmento de floresta cercado por áreas agrícolas.

Uma análise citológica para determinação do número cromossômico permitiu identificar um único nível de ploidia nos espécimes analisados para os estados de SC e RS ($2n=2x=14$). Apesar da ocorrência de séries poliploides intraespecíficas ser comum na tribo Tigridieae e na família Iridaceae (Souza-Chies *et al.*, 2012 no prelo), não foi encontrada poliploidia em *C. crocoides*. Bimodalidade e assimetria cariotípica são claramente evidenciadas em *C. crocoides*, com heteromorfismo observado em dois pares cromossômicos.

A bimodalidade cariotípica é considerada uma forma cariotípica altamente especializada podendo ser utilizada para caracterizar grupos de gêneros ou espécies

(Natalia *et al.*, 2009; Kenton *et al.*, 1990; Naranjo *et al.*, 1998). Existe uma tendência de espécies com cariótipos mais assimétricos serem mais derivados (Stebbins, 1971).

Calydorea é um gênero pequeno com aproximadamente 16 espécies cuja monofilia vem sendo questionada por englobar táxons duvidosos dificultando a compreensão da real circunscrição deste gênero (Chauveau *et al.*, 2012; Souza-Chies *et al.*, in press). Caracteres morfológicos, citológicos e moleculares têm sido utilizados como ferramentas para o entendimento de questões evolutivas, ou seja, uma melhor compreensão das relações filogenéticas. Dados quanto à diversidade genética das espécies de *Calydorea* são praticamente inexistentes, sendo este trabalho pioneiro nessa linha. Salienta-se a importância em conhecer cada espécie para uma contribuição do conhecimento do gênero como um todo.

A integração de diferentes técnicas é de suma importância para a compreensão dos processos evolutivos como um todo. A partir dos resultados apresentados e devido às questões taxonômicas incertas ocorrentes no gênero *Calydorea*, novas pesquisas poderão aprimorar o conhecimento sobre este gênero.

REFERÊNCIAS

(CAPÍTULOS I, III)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, L.I.; Lima, S. A. A.; Felix, L. P. (2011). Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. 34(2): 259-267.
- APG III (2009). Un update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 161: 105-121.
- Brisolara Corrêa, L. (2011). Diversidade genética do complexo *Sisyrinchium vaginatum* (Iridaceae): aspectos moleculares e citogenéticos. Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS. (Dissertação de Mestrado). 108p.
- Capellari Jr, L. (2005). Iridaceae da planície litorânea de Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brasil. **Hoehnea**. 32(2) : 207-213.
- Chauveau, O.; Eggers, L.; Souza-Chies, T. T.; Nadot, S. (2012). Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera. **Annals of Botany**. 110: 713–729.
- Chukr, N. S (1992). Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Iridaceae. **Boletim Botânica**. v.13, p.111
- Chukr, N. S.; Capellari Jr., L. (2003). Iridaceae In: Wanderley, M.G.L.; Shepherd, G.J.; Giulietti, A.M.; Melhem, T.S. (Coords.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Fapesp/Rima. v. 3: p. 127-147.
- Dahlgren, R.M. T.; Clifford, H. T.; Yeo, P. F. (1985). **The families of the Monocotyledons**. Springer-Verlag, Berlim. 520 p.
- Dal Ri, L. (2012). Taxonomia das espécies sul-brasileiras de *Calydorea* Herbert (Iridaceae) e caracterização por DNA “barcode”. Curso de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS. (Dissertação de Mestrado). 144p.
- De Tullio, L.; Roitman, G.; Bernardello, G. (2008). *Tamia* (Iridaceae), a synonym of *Calydorea*: Cytological and morphological evidence. **Systematic Botany**. 33 (3): 509-513.
- Dias, E. B. A. (2010). Iridaceae Juss. no Distrito Federal, Brasil. Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Dep. Botânica. (Dissertação de Mestrado) 61p.

- Eggers, L. (2008). A família Iridaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. 6(3): 167-175.
- Eggers, L.; Chukr, N.; Lovo, J.; Gil, A. (2012). *Iridaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
<http://floradobrasiljbrj.gov.br/2012/FB000136>. Acesso em 30 de junho de 2012.
- Foster, R.C. (1958). A catalogue of the ferns and flowering plants of Bolivia. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**. 184: 47-48.
- Frankel, O.H. (1983). The place of management in conservation. In: Schoenwald, C.C.M., Chamber, S.M., MacBryde, B., Thomas, L. (Eds.), **Genetics and Conservation**. Benjamin/Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA, pp. 125–151.
- Garcia, R. J. F.; Pirani, J. R. (2005). Análise florística, ecológica e fitogeográfica do Núcleo Curucutu, Parque Estadual da Serra do Mar (São Paulo), com ênfase nos campos junto à crista da Serra do Mar. **Hoehnea**. 32 (1): 1-48.
- Goldblatt, P. (1982). Chromosome Cytology in Relation to Suprageneric Systematics of Neotropical Iridaceae. **Systematic Botany**. Missouri Botanical Garden: St. Louis, Missouri.
- Goldblatt, P. (1990). Phylogeny and classification of Iridaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 77:607-627.
- Goldblatt, P.; Henrich, J. E. (1991). *Calydorea* Herbert (Iridaceae-Tigridieae) Notes on this New World genus and reduction to synonymy of *Salpingoltylis*, *Cardiostigma*, *Itysa* and *Catila*. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 78:504-511
- Goldblatt P., Takei M. (1993) Chromosome cytology in tropical african genus *Lapeirousia* (Iridaceae-Ixioideae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 80:961–973.
- Goldblatt P & Takei M (1997) Chromosome cytology of Iridaceae – patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 84:285 304.
- Goldblatt P & Manning JC (2008a). **The Iris Family: Natural History and Classification** Timber Press, 336p.
- Goldblatt, P.; Rodriguez, A.; Powell, M.P.; Jonathan Davies, T.; Manning, J.C.; van der Bank, M. & Savolainen, V. (2008b). Iridaceae ‘Out of Australasia?’ Phylogeny, Biogeography, and Divergence Time Based on Plastid DNA sequences. **Systematic Botany**. 33(3): 495-508.

- Hamrick, J. L.; Godt, M. J. W. (1989). Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS, eds. **Plant population genetics, breeding, and genetic resources**. Sunderland, MA: Sinauer, 43–63.
- Humrick, J. L.; Godt, M. J. W. (1996). Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise, J. C.; Humrick, J. L, eds. **Conservation genetics: case histories from nature**. New York, NY: Chapman and Hall, 281-304.
- Iganci, J. R. V.; Heiden, G.; Miotto, S. T. S.; Pennington, R. T. (2011) Campos de Cima da Serra: the Brazilian Subtropical Highland Grasslands show an unexpected level of plant endemism. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 167, 378–393.
- Innes, C. (1985). **The world of Iridaceae: a comprehensive record**. Ashington, Sussex : Holly Gate International. 405 p.
- INPI -The International Plant Names Index- (2012). Disponível em <<http://www.ipni.org>>. Acesso em 20 Jan de 2012.
- Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellog, E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J (2007). **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Massachusetts: Sinauer Associates, 464p.
- Kenton, A.; Heywood, C. A. (1984) Cytological studies in South American Iridaceae. **Plant Systematics Evolution**. 146:87-104.
- Kenton, A.; Rudall, P. (1987) An unusual case of complex heterozygosity in *Gelasine azurea* (Iridaceae), and its implications for reproductive biology. **Evolution Trends in Plants**. 1: 95-103.
- Kenton, A.J.B.; Dickie, J.B.; Langton, D.H.; Bennett, M.D. (1990). Nuclear DNA amount and karyotype symmetry in *Cypella* and *Hesperoxiphium* (Tigridieae; Iridaceae). **Evolutionary Trends in Plants**. 4:59-59
- KEW (2012) World Checklist of selected plant families. Disponível em: <http://apps.kew.org/wcsp/qsearch.do;jsessionid>
- Kim, S.C.; Lee, C., Santos-Guerra, A. (2005). Genetic analysis and conservation of the endangered Canary Island woody sow-thistle, *Sonchus gandogerii* (Asteraceae). **Journal of Plant Research**. 118, 147–153
- Lombado, A. (1984) Flora Montevicensis. **Montevideo: Intendencia Municipal**. Vol. 3, 456p.
- Luan, S.; Chiang, T. Y.; Gong, X. (2006). High genetic diversity vs. Low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, Revealed by ISSR fingerprinting. **Annals of Botany**. 98: 583-589.

- Naranjo, C.A; Ferrari, M.R; Palermo, A.M, Poggio, L. (1998). Karyotype, DNA content, and meiotic behavior in five South American species of *Vicia* (Fabaceae). **Annals of Botany**. 82: 757-764.
- Natalia, M; Peñas, M.L; Bernardello, G; Roitman, G. (2009). Cytogenetic studies in *Herbertia* Sw. (Iridaceae). **Caryologia**. 62: 37-42.
- Ravenna, P. (1983). *Catila* and *Onira*, two new genera of South American. **Nordic Journal of Botany** 3(2):197-205.
- Ravenna, P. (2001). The Iridaceae of the Cuyo region Argentina. **Onira**. 6:1-18
- Reddy MP, Sarla N & Siddiq E (2002) A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**. 128: 9–17.
- Reeves, G; Chase, M. K.; Goldblatt, P.; Rudall, P.; Fay M. F., Cox, A. V.; Lejeune, B.;Souza-Chies, T. (2001). Molecular Systematics of Iridaceae: Evidence from four plastid DNA regions. **American Journal of Botany**. 88:2074-2087.
- Rodriguez, A. & Sytsma, K. (2006). Phylogenetics of the “Tiger-flower” group (Tigridiae:Iridaceae) molecular and morphological evidence. **Aliso**. 22: 412-424.
- Roitman, G.G. & Castillo, A. (2007). *Calydorea minima* (Iridaceae:Tigridieae) a new species from South America. **Bulletin of the Botanical Society of Argentina** 42(3-4): 321
- Roitman, G; Castillo, A.; Mara, I. (2008). In: Zuloaga, F.O.; Morrone, O.; Belgrano, M.J.; Marticorena, C.; Marchesi, E. (Eds.). **Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur: Pteridophyta, Gymnospermae, Monocotyledonea**. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 107(1): p. 423-453.
- Sik, L.; Candan, F.; Soya, S.; Karamenderes, C.; Kesercioglu, T.; Tanyolac, B. (2008) Genetic variation among *Crocus* L. species from Western Turkey as revealed by RAPD and ISSR markers. **Journal of Applied Biological Sciences** 2(2):73-75.
- Souza, F.L.; Cunha, A.F; Oliveira, M.A; Pereira, G.A.G; Pinheiro, H.P; Reis, S.F. (2002). Partitioning of molecular variation at local spatial scales in the vulnerable Neotropical freshwater turtle, *Hydromedusa maximiliani* (Testudines, Chelidae): implications for the conservation of aquatic organisms in natural hierarchical systems. **Biological Conservation**. 104: 119–126.
- Souza-Chies, T. T.; Bittar, G; Nadot, S.; Carter, L.; Besin, E.; Lejeune, B. (1997). Phylogenetic analysis of *Iridaceae* with parsimony and distance methods using the plastid gene *rps4*. **Plant Systematics and Evolution**. 204: 109-123.

- Souza-Chies, T. T. ; Kaltchuk-Santos, E. ; Eggers, L. ; Flores, Alice M. ; Stiehl, E. M. ; Fachinetto, J. ; Lustosa, J. ; Brisolara-Correa, L. ; Tacuatiá, L. O. ; Piccoli, P.B. ; Miz, R. B. (2012). Studies on diversity and evolution of Iridaceae species of southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. (In press).
- Sybenga, J. Cytogenetics in Plant Breeding. Berlin: Springer, 1992.
- Tacuatiá, L. O.; Eggers, L.; Kaltchuk-Santos, E; Souza-Chies, T. (2012 a) Population genetic structure of *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae) in Itapuã State Park, Southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. 35, 1, 99-105
- Tacuatiá, L. O.; Souza-Chies, T.; Flores, A. M.; Eggers, L.; Siljak-Yakovlev, S.; Kaltchuk-Santos (2012 b). Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 169: 350–364.
- Takeuchi, C.; Affonso, P.; Chukr, N. S. (2008). Levantamento de Iridaceae Juss. no Núcleo Curucutu, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. **Revista do Instituto Florestal** 20 (1): 51-63.
- Telles, M. P. C; Bastos, R. P; Soares, T. N; Resende, L. V; Diniz-Filho, J. A. F. (2006). RAPD variation and population genetic structure of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae) in Central Brazil. **Genetica**. 128:323-332.
- TROPICOS (2012). Missouri Botanical Garden. Disponível em: <http://www.tropicos.org/NameSearch>
- Wanderley, M. G. L.; Toledo, C. B. (1986). Flora Fanerogâmica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo-Brasil) - Iridaceae. **Hoehnea**. 13: 144-147.

ANEXO



Figura 3- Área do Parque Nacional dos Aparados da Serra em Cambará do Sul, RS, Brasil, região de ocorrência natural de *Calydorea crocoides*.