

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Diversidade genética e evolução de espécies de *Herbertia Sweet*
(Tigridieae: Iridaceae)**

Eudes Maria Stiehl Alves

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Orientadora: Prof^a. Dr^a Tatiana Teixeira Souza Chies

Porto Alegre, Maio de 2013

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas, Departamento de Botânica do Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, Brasil. O projeto foi subvencionado pelo CNPq, edital universal 2009 e 2011 e PROTAX. A doutoranda obteve bolsa de estudos do CNPq (48 meses).

*Dedico ao meu marido, Marco, por todo o amor e dedicação
nestes quinze anos de convivência.*

*Também dedico aos meus filhos, Rebeca e Marco Antonio, o
mais valioso encontro de genes concebido.*

*“As perguntas são diamantes que observas contra a luz.
Estuda uma vida inteira e verás diferentes cores na mesma
joia. As mesmas perguntas formuladas várias vezes te darão
as respostas que necessitas no momento exato.”*

(Richard Bach)

A G R A D E C I M E N T O S

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade e pela disponibilização de recursos.

Ao CNPq pela bolsa de Doutorado.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Teixeira Souza Chies, pela oportunidade de orientação, confiança, compreensão, apoio e paciência.

À Prof^ª. Dr^ª. Eliane Kaltchuk dos Santos.

À Prof^ª. Dr^ª. Lilian Eggers.

Ao Dr. Olivier Chauveau, por sua inestimável assistência em vários pontos deste trabalho, pelo companheirismo e auxílio nas questões de laboratório.

À Prof^ª. Dr^ª. Mardiore Pinheiro.

Ao Prof. Dr. Jorge Ernesto de Araujo Mariath.

Ao Dr. Adriano Silvério.

À Dr^ª. Luana Olinda Tacuatiá.

À Prof^ª. Dr^ª. Janette Palma Fett, ao Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto e a seus orientados.

Ao Prof. Dr. Jose Artur Bogo Chies e seus orientados.

Ao Prof. Dr. Giancarlo Pasquali.

À Prof^ª. Dr^ª. Claudete Ruas e sua equipe, pela acolhida calorosa em Londrina durante o curso de Microssatelites.

À Claudicéia, Eduardo, Gabi, Lenice, Katia, Luana, Sarah, Rafael, Marcos, Rafaela, Dhiego, pelos ótimos e generosos momentos durante o curso de Microssatélites.

Aos amigos e colegas: Adriana, Alice, Cassiano, Eduardo, Jaqueline, Juliana Fachinetto, Juliana Lustosa, Juliana Heck, Paula, Priscila, Raíssa, Rogéria, Tamara, Tiago e Victória.

À Janaína Gomes e ao Leandro Dal Ri.

Às professoras da Genética Vegetal Maria Helena Bodanese Zanetinni, Márcia Margis, Eliane Kaltchuk dos Santos, Fernanda Bered e Luciane Passaglia.

Ao Prof. Nelson Fagundes, por ser relator desta Tese.

À Sílvia Richter pelo apoio técnico.

Aos colegas da Genética Vegetal, em especial, à Andréia, Camila e à Márcia.

Ao Elmo, pela dedicação e profissionalismo.

À Regina Iara e Marco Antonio, os meus pais pelo destino, por toda a força.

À Nelza e Ernani, meus pais, pelo esforço e sacrifícios feitos.

A toda minha família, pelo apoio e incentivo.

E a todos que, de uma forma ou de outra, tornaram este trabalho possível.

OBRIGADA.

| | |
|---|-----------|
| RESUMO | 8 |
| ABSTRACT | 10 |
| CAPÍTULO I..... | 12 |
| Introdução Geral | 12 |
| 1. Iridaceae..... | 13 |
| 2. Sistemática e filogenia de Iridaceae | 16 |
| 3. Tigridieae (Iridoideae)..... | 18 |
| 4. O gênero <i>Herbertia</i> | 20 |
| 5. Aspectos citogenéticos de Iridaceae, com ênfase em Tigridieae | 24 |
| 6. Estimativas de diversidade genética fundamentadas em marcadores moleculares de herança dominante | 25 |
| 7. A importância da análise da biologia reprodutiva para Iridaceae | 28 |
| Objetivo Geral..... | 31 |
| CAPÍTULO II..... | 32 |
| Filogenia de <i>Herbertia</i> (Tigridieae: Iridaceae)..... | 32 |
| 1. Introdução..... | 33 |
| 2. Materiais e Métodos | 36 |
| 3. Resultados e Discussão..... | 41 |
| 4. Conclusão | 46 |
| Tabela Suplementar..... | 3 |
| Figura Suplementar | 4 |
| CAPÍTULO III..... | 50 |
| The breeding system and genetic diversity of populations of <i>Herbertia lahue</i> (Iridaceae) with varying ploidy levels and morphologies | 50 |
| Abstract | 52 |
| 1. Introduction..... | 52 |
| 2. Materials and methods..... | 55 |
| 3. Results | 58 |
| 4. Discussion..... | 66 |
| 5. Literature cited | 71 |

| | |
|--|------------|
| Appendix | 78 |
| Figures | 79 |
| Supplementary Data | 82 |
| CAPÍTULO IV | 83 |
| Breeding system and population genetic analyses in <i>Herbertia</i> species (Iridaceae) | |
| | 83 |
| Abstract | 85 |
| 1. Introduction..... | 85 |
| 2. Materials and Methods | 87 |
| 3. Results | 91 |
| 4. Discussion..... | 96 |
| 5. References..... | 99 |
| Figures | 102 |
| CAPÍTULO V | 104 |
| Discussão Final | 104 |
| ANEXO | 108 |
| BIBLIOGRAFIAS CITADAS NOS CAPÍTULOS I, II, E V. | 109 |

RESUMO

Iridaceae é uma das três famílias mais diversificadas de Asparagales, sendo bem representada em número de espécies na África do Sul e nas Américas. No sul do Brasil, já foram identificados dez gêneros de Iridaceae, representantes de três tribos de Iridoideae, Sisyrinchieae, Tigridieae e Trimezieae. A sistemática destas tribos é complexa em virtude da enorme variação morfológica exibida por suas espécies, principalmente relacionada à morfologia floral. Adicionalmente, o curto período de florescimento, a fragilidade e efemeridade das flores e a dificuldade de preservação das características morfológicas importantes para definição das espécies, são fatores que contribuem para o aumento da complexidade taxonômica desses grupos. *Herbertia* Sweet é um pequeno gênero de Tigridieae que apresenta seis (de sete) espécies distribuídas em áreas de campo do Rio Grande do Sul. Embora recentes reconstruções filogenéticas de Iridaceae tenham evidenciado a sua monofilia, a taxonomia infragenérica ainda não é bem compreendida. Isto ocorre principalmente devido à presença de variações da morfologia floral em algumas espécies, provavelmente um reflexo da adaptação a diferentes nichos e à disponibilidade de polinizadores.

Utilizando regiões codificantes (genes *matK* e *rps4*) e não codificantes (intron do *matK-trnK* e espaçadores intergênicos *rps4-trnS* e *trnQ-rps16*) do DNA plastidial (cpDNA), foi realizada uma inferência filogenética do gênero (**Capítulo II**). Foram amostradas todas as sete espécies correntemente aceitas para *Herbertia*. As espécies de *Herbertia* foram reunidas em três agrupamentos, dois deles com bom a moderado suporte de *bootstrap*. O terceiro agrupamento inferido teve baixo suporte e reuniu *H. crosae*, *H. lahue*, *H. tigridioides* (a única espécie que não ocorre no Brasil) e *H. zebrina*.

A região de campos do sul do Brasil é caracterizada pela presença de diversas áreas fitoecológicas, o que pode condicionar gradientes ambientais que estimulam a diversificação. *Herbertia lahue* é uma espécie que apresenta ampla distribuição geográfica (Rio Grande do Sul, Argentina, Uruguai e Chile), diferentes citótipos (de diploide a octaploide), e uma variabilidade morfológica marcante. Buscando compreender o relacionamento entre os citótipos hexaploide e octaploide de *H. lahue*, foi realizada uma análise combinada, que incluiu um conjunto de características quantitativas da flor, marcadores neutros (*Inter-Simple Sequence Repeat*, ISSR) e sistema reprodutivo (**Capítulo**

III). Treze populações (três hexaploides e dez octaploides), totalizando 364 indivíduos, foram amostradas no Rio Grande do Sul. Baixa diversidade genética intrapopulacional e forte diferenciação entre populações foram estimadas, coerente ao esperado para espécies de autopolinização. Embora as análises inferidas a partir de dados morfológicos e moleculares tenham discriminado os citótipos como grupos distintos, esses não são suficientes para considerá-los como espécies distintas. Ao contrário da ampla área de distribuição de *H. lahue*, três outras espécies, *H. darwinii*, *H. pulchella* e *H. quareimana* apresentam padrão regional de distribuição geográfica. Um aspecto interessante neste grupo é a abundante presença de tricomas glandulares nas tépalas internas, sobretudo em *H. darwinii* e *H. quareimana*, o que poderia favorecer a visitação por abelhas coletoras de óleos florais. A diversidade genética e a biologia reprodutiva dessas três espécies foram analisadas através de marcadores moleculares ISSR (seis *primers*, 125 marcadores informativos), experimentos de polinização manual e observação dos visitantes florais (**Capítulo IV**). Abelhas são os principais visitantes florais e *H. darwinii*, *H. pulchella* e *H. quareimana* são autoincompatíveis. Marcadores ISSR foram eficientes em discriminar as três espécies, bem como em detectar alta diversidade genética. Embora forte diferenciação entre populações tenha sido evidenciada nas três espécies, isto não foi correlacionado com a distância geográfica.

O presente estudo contribuiu com as primeiras informações sobre os fatores influentes na evolução de espécies de *Herbertia*. O conhecimento gerado pelas análises aqui apresentadas servirá de suporte para inferências que visem melhor compreensão do relacionamento entre grupos filogeneticamente próximos em Tigridaeae.

A B S T R A C T

Iridaceae is one of the three most diverse families of the Asparagales, and it is well represented in number of species in South Africa and Americas. In southern Brazil, ten genera of Iridaceae were already identified, representatives from three tribes of Iridoideae, Sisyrinchieae, Tigridieae and Trimezieae. The systematics of these species is complex due to the large morphological variation exhibited by their species, mainly related to flower. *Herbertia* is a small genus of Tigridieae with six species in grassland areas of the Rio Grande do Sul. Although recent phylogenetic reconstructions make evident the monophyly of the genus, the infrageneric taxonomy is not yet well understood. This occurs mainly due to the presence of variations in floral morphology in some species, probably a reflex of the adaptation to different niches and the availability of pollinators.

Non-coding regions of the plastid DNA (cpDNA) (*matK-trnK* intron; and *rps4-trnS* and *trnQ-rps16* intergenic spacers) and coding regions (*matK* and *rps4* genes) were used to perform a phylogenetic inference of the genus *Herbertia* (**Chapter II**). Were sampled all seven species currently accepted for *Herbertia*. Were discriminated three groups, two with high and moderate support. The third group was inferred low support and reunited *H. crosae*, *H. lahue*, *H. tigridioides* (the only that does not occur in Brazil) and *H. zebrina*.

The grassland areas in southern Brazil are characterized by the presence of several phytoecological areas, which can establish environmental gradients that encourage diversification. *Herbertia lahue* is a species which is widely geographically distributed (Rio Grande do Sul, Argentina, Uruguay and Chile), and present cytotypes (from diploid to the octoploid), and morphological variability. To understand the relationship among hexaploid and octoploid cytotypes of *H. lahue*, we performed a combined analysis that included a set of quantitative characteristics of the flower, neutral molecular markers (Inter-Simple Sequence Repeat, ISSR) and breeding system (**Chapter III**). The sampling consisted of thirteen populations collected in the Rio Grande do Sul, characterized as hexaploid (three populations) and octoploid (ten populations), totaling 364 individuals. Low genetic diversity within populations and strong differentiation among populations were estimated, consistent to that expected for selfing species. Although analyzes inferred from morphological and molecular data made possible the discrimination of cytotypes, these characters were not enough to consider them as separate species. The *H. darwinii*, *H.*

pulchella and *H. quareimana* species present a restricted geographic distribution, unlike to the widely distributed *H. lahue*. An interesting feature in this group is the presence of glandular trichomes in the inner tepals, notably in the *H. darwinii* and *H. quareimana*, which could encourage visitation by the oil-bees. The genetic diversity and reproductive biology of these three species were analyzed by ISSR molecular markers (six primers, 125 informative markers), manual pollination experiments and observations of floral visitors (**Chapter IV**). Bees are the principal flower visitors and self incompatibility was demonstrated in *H. darwinii*, *H. pulchella* and *H. quareimana*. ISSR markers were effective in discriminating the three species as well as to detect high genetic diversity. Even though strong population differentiation was observed for the three species, it was not correlated with geographic distance.

The present study contributed to the first information about the factors influencing the evolution of *Herbertia* species. The knowledge generated by analyzes presented here will provide support for inferences aiming better understanding the relationship between phylogenetically close groups in Tigridieae.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL



Herbertia (Tigridieae) é um gênero de Iridaceae com centro de diversificação localizado em áreas campestres do Rio Grande do Sul, Argentina, Uruguai e Chile. Vegetativamente, são similares em morfologia. A variação encontra-se presente nas flores e em caracteres citogenéticos.

1. IRIDACEAE

Iridaceae (Asparagales) compreende cerca de 2.030 espécies distribuídas entre 65 a 75 gêneros (Goldblatt *et al.*, 2008; APG III, 2009). Esta é uma família botânica de importância, não somente por apresentar várias espécies utilizadas em jardinagem, mas também pela ampla presença como componente de várias formações vegetacionais. O intenso processo de radiação adaptativa verificado em Iridaceae permite que se considerem dois os centros de diversidade para a família, um localizado no continente africano (estimado em 1.190 espécies em 37 gêneros) e o outro, sul-americano (mais de 210 espécies distribuídas em 24 gêneros) (Goldblatt e Manning, 2006; Rodriguez e Sytsma, 2006; Goldblatt *et al.*, 2008; Goldblatt e Manning, 2008). No Brasil ocorrem 19 gêneros (três deles endêmicos), distribuídos em 165 espécies, das quais 70 espécies são exclusivas do Brasil (Eggers *et al.*, 2013). Muitas destas espécies ainda são escassamente estudadas 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).

O interesse econômico em Iridaceae é bastante difundido nos países da Europa e dos Estados Unidos, onde cultivos comerciais visando a indústria de flores de corte para paisagismo de jardins são importante fonte de renda (Goldblatt *et al.*, 1998; Goldblatt e Manning, 2008). Gêneros como *Crocus* L., *Freesia* Eckl. ex Klatt, *Gladiolus* L., *Iris* L. e *Watsonia* Mill., são especialmente considerados na jardinagem pela beleza de suas espécies e cultivares (Goldblatt *et al.*, 1998). Outras espécies apreciadas secundariamente são *Iris chinensis* (L.) Redouté e *Tigridia pavonia* (L. f.) DC., além de espécies de *Dietes* Salisbury ex Klatt, *Ixia* L., *Moraea* Mill, *Sparaxis* Ker Gawl. e *Tritonia* Ker Gawl (Goldblatt *et al.*, 1998). O cultivo para a culinária do *Crocus sativus* L. é uma importante fonte de renda em países da Europa e da Índia, visto que, a partir dos seus estiletos e estigmas, se obtém o açafrão, um condimento bastante apreciado e um dos mais lucrativos. Os cormos de várias iridáceas são consumidos como alimento em regiões da Síria e da África (Goldblatt *et al.*, 1998; Goldblatt e Manning, 2008).

As iridáceas podem ser plantas decíduas ou perenes, herbáceas em sua maioria, apenas três gêneros com hábito arbustivo (*Klattia* Baker, *Nivenia* Vent. e *Witsenia* Thunb.) (Goldblatt *et al.*, 1998). A família se distingue de outras monocotiledôneas principalmente

pela presença de folhas isobilaterais e equitantes, flores fugazes e trímeras e ovário ínfero (exceto no gênero monotípico endêmico da Tasmânia, *Isophysis* T. Moore ex Seem.) (Goldblatt, 1990). Muitas espécies de Iridaceae apresentam grande plasticidade fenotípica dos caracteres florais em resposta à disponibilidade de polinizadores, além de variações morfológicas que, em conjunto com modificações cariológicas importantes, permitem uma boa capacidade de adaptação a nichos variados. No caso das espécies africanas de iridáceas, a diversidade de sistemas de polinização é correlacionada positivamente com a complexidade floral das espécies (Goldblatt e Manning, 2006). De acordo com esses autores, as espécies africanas de Iridaceae são polinizadas principalmente por insetos da ordem Hymenoptera, sobretudo por abelhas, porém interações com insetos das ordens Coleoptera, Diptera e Lepidoptera, e até aves passeriformes (Nectarinidae) também são possíveis.

A morfologia vegetativa de Iridaceae reúne plantas que apresentam raízes adventícias típicas de monocotiledôneas, órgãos subterrâneos do tipo rizoma (provavelmente uma condição ancestral), cormo ou bulbo. As duas últimas condições são derivadas, e as espécies bulbosas estão agrupadas na subfamília Iridoideae, em duas tribos (de cinco), Irideae e Tigridieae (Wilson, 2004; Goldblatt *et al.*, 2008). Em Irideae, as espécies bulbosas estão agrupadas em três subgêneros (de seis): *Hermodactyloides* B. Mathew, *Scorpiris* Spach e *Xiphium* (Miller) Spach, representando cerca de 30% (aproximadamente 70 espécies) de *Iris*, distribuídas em regiões áridas da Ásia, Nordeste da África e sul da Europa (Hall *et al.*, 2000; Wilson, 2004). Todas as Tigridieae são bulbosas (aproximadamente 170 espécies) e a sua distribuição geográfica abrange as regiões de clima temperado da América do Sul, norte da América Central, México e sul dos Estados Unidos (Goldblatt *et al.*, 1998; Rodriguez e Sytsma, 2006; Goldblatt *et al.*, 2008). A distribuição geográfica das espécies bulbosas em relação à abrangência das demais Iridaceae é representada na Figura 1.

A morfologia floral compreende flores dispostas em inflorescências determinadas, monocásios do tipo ripídio, frequentemente muito modificadas e, às vezes, reduzidas a uma flor solitária terminal. São protegidas por brácteas (espatas), sendo geralmente pediceladas. As flores trímeras são perfeitas, com simetria radial ou bilateral, compostas por dois verticilos de tépalas, o verticilo externo é às vezes diferenciado do interno, com as

tépalas podendo ser livres ou conatas, imbricadas e vistosas, apresentando manchas em algumas espécies.

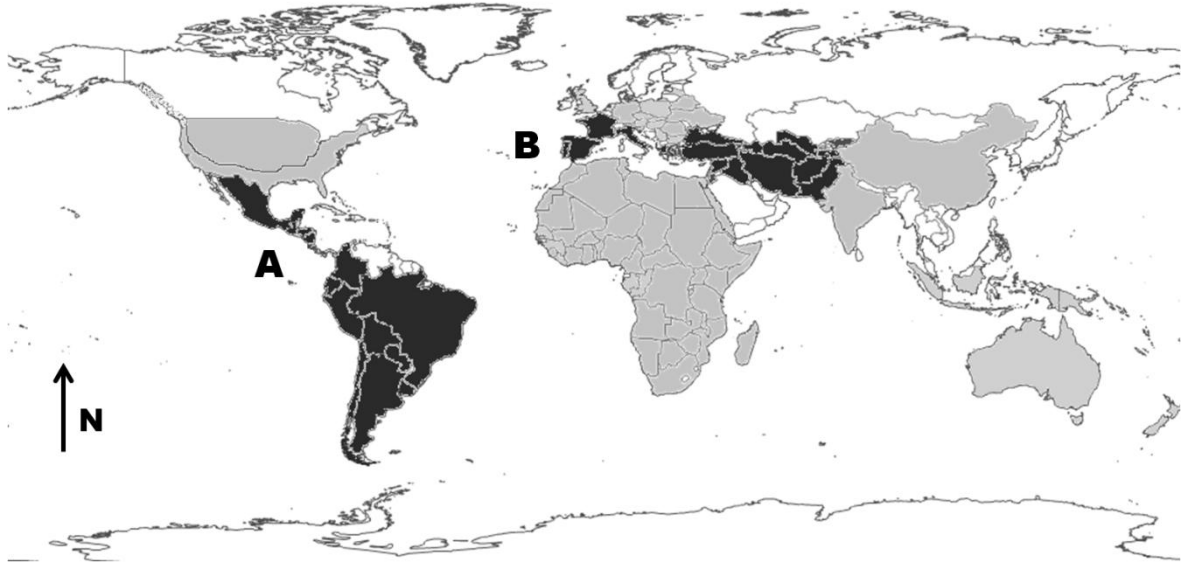


Figura 1. Distribuição geográfica das espécies de Iridaceae (em tons de cinza). Áreas em cinza escuro representam a distribuição das espécies bulbosas: em A, as espécies de Tigridaeae; em B, as espécies de Irideae. As áreas em cinza claro representam a distribuição das espécies não bulbosas de Iridaceae.

Os estames são tipicamente em número de três, opostos às tépalas externas, com filetes livres ou conatos, às vezes adnatos ao perianto; as anteras são livres ou às vezes adnatas aos ramos do estilete. Os grãos de pólen são geralmente monossulcados. O gineceu apresenta três carpelos conatos e o ovário é, na maioria das espécies, ínfero (exceto em *Isophysis*), com placentação axial. Os ramos do estilete podem ser expandidos e petalóides, com dois ou três estigmas terminais, ou também, presentes na superfície abaxial dos ramos do estilete. Os rudimentos seminais podem ser poucos a numerosos, anátropos ou campilótropos. As flores podem apresentar nectários nos septos do ovário ou nas tépalas. O fruto é uma cápsula loculicida, podendo apresentar sementes ariladas ou com uma testa carnosa (Goldblatt, 1990; Goldblatt *et al.*, 1998; Goldblatt e Manning, 2008).

Iridaceae produz fragrâncias florais derivadas de uma diversidade de classes biossintéticas, incluindo derivados de ácidos graxos, compostos benzênicos e isoprenóides; os odores florais podem ser muito variados entre espécies e, em certos casos, dentro de espécies (Goldblatt e Manning, 2006). Néctar é a oferta alimentar mais comum, produzido tanto em nectários septais localizados dentro das paredes radiais do ovário, quanto em nectários perigoniais (Goldblatt, 1990; Goldblatt e Manning, 2006). Outro recurso floral

importante encontrado nas espécies de iridáceas do Novo Mundo são óleos florais não voláteis, produzidos em tricomas glandulares chamados elaióforos (Goldblatt, 1990; Goldblatt e Manning, 2006; Renner e Schaefer, 2010; Chauveau *et al.*, 2011 e 2012).

Essa fonte alimentar é bastante restrita entre as famílias botânicas atualmente reconhecidas, sendo cerca de 1.500 a 1.800 espécies distribuídas em onze famílias (Figura 2), e é obtida por fêmeas de espécies altamente especializadas de duas famílias de Hymenoptera, Mellitidae e Apidae (Renner e Schaefer, 2010; Chauveau *et al.*, 2012). São descritas aproximadamente 370 espécies de abelhas que apresentam as modificações morfológicas necessárias para a obtenção de óleos florais, representantes das famílias Melittidae e Apidae (Buchmann, 1987; Renner e Schaefer, 2010). Essas abelhas utilizam óleos florais na ausência ou em associação ao néctar, para a alimentação das larvas; algumas espécies coletoras de óleos florais utilizam esse recurso como um tipo de selador à prova de água nas paredes das células que compõem os ninhos (Renner e Schaefer, 2010).

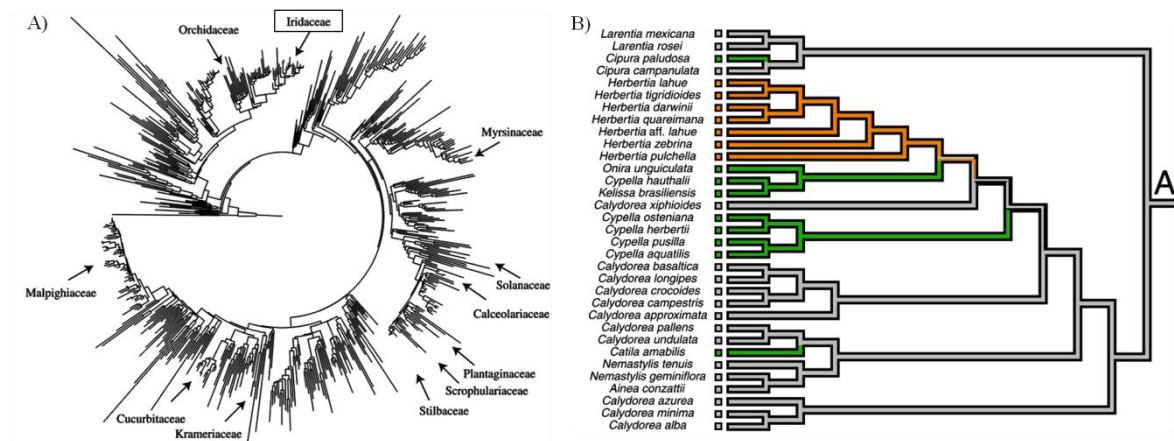


Figura 2. Relacionamento filogenético dos clados que disponibilizam óleos florais, com enfoque em Iridaceae. A) Filogenia representando 440 famílias de angiospermas (APG III, 2003), com enfoque nas onze que agrupam espécies produtoras de óleos florais, destacando Iridaceae (adaptado de Renner e Schaeffer, 2010). B) O clado A de Tigridieae (Iridaceae), mostrando o relacionamento inferido para *Herbertia*, que apresenta espécies que possuem tricomas glandulares nos dois anéis de tépalas (ramos em laranja, com *bootstrap* igual a 72 %). Com relação às outras espécies incluídas nesta filogenia, ramos em verde representam elaióforos nas tépalas internas; ramos cinza, elaióforos ausentes (adaptado de Chauveau *et al.*, 2012).

2. SISTEMÁTICA E FILOGENIA DE IRIDACEAE

A principal base para a classificação recente de Iridaceae é derivada do estudo conduzido por Goldblatt (1990), que utilizou um conjunto de características morfológicas,

citológicas, fitoquímicas e de grão-de-pólen (52 caracteres no total), para identificar quatro cladogramas maiores: Ixioideae, Isophysidoideae, Nivenioideae e Iridoideae. Morfológicamente, as principais sinapomorfias em Iridaceae são: i) folhas isobilaterais e unifaciais com lâminas orientadas no mesmo plano, dispostas em leque; ii) presença de cristais prismáticos de oxalato de cálcio, denominados estilóides, nas bainhas dos feixes vasculares (ocasionalmente ausentes); iii) inflorescências determinadas tipo ripídio; e, iv) três estames (Goldblatt *et al.* 2008; Judd *et al.* 2009).

A ampla variação morfológica encontrada em alguns táxons de Iridaceae, decorrente principalmente da radiação de síndromes florais em resposta à disponibilidade de polinizadores, contribuiu para um longo debate sobre os limites ao nível de subfamílias e em status inferiores. Muitas questões taxonômicas no contexto da família já puderam ser esclarecidas pela complementação das informações obtidas a partir de dados de sequências de DNA à análise morfológica tradicional (Souza-Chies *et al.*, 1997; Reeves *et al.*, 2001; Goldblatt *et al.*, 2008). Assim, a atual classificação proposta para Iridaceae aceita sete subfamílias: Isophysidoideae, Geosiridoideae, Patersonioideae, Aristeoideae, Nivenioideae, Crocoideae (anteriormente chamada de Ixioideae) e Iridoideae.

Curiosas são duas espécies de Isophysidoideae e de Geosiridoideae (ambas monoespecíficas): *Isophysis tasmanica* T. Moore ex Seem. e *Geosiris aphylla* Goldblatt & J.C. Manning. A primeira – endêmica de montanhas a oeste da Tasmânia – é a única iridácea com ovário súpero, razão pela qual durante muito tempo foi considerada uma família separada (Isophysidaceae) ou incluída ora em Hypoxidaceae, ora em Liliaceae (Goldblatt, 1990). Já *G. aphylla* é uma espécie aclorofilada saprofítica, nativa de Madagascar e das Ilhas Comoro. No caso das iridáceas do Novo Mundo, todas são exclusivas da subfamília Iridoideae, a qual é monofilética (Goldblatt, 1990; Reeves *et al.*, 2001; Rodriguez e Sytsma, 2006; Goldblatt *et al.*, 2008).

Atualmente, a resolução das filogenias de grupos específicos e complexos em Iridaceae tem sido melhorada pela ampliação da amostragem de espécies e de dados de sequências de DNA; essas informações têm sido relacionadas a elementos de citogenética, ecologia, anatomia e morfologia. Esses são os casos de *Moraea* (Goldblatt *et al.*, 2002); *Iris* (Wilson, 2003; 2004; 2011); *Crocus* (Petersen *et al.*, 2008); *Sisyrinchium* L. (Chauveau *et al.*, 2011; Karst e Wilson, 2012); e das tribos Sisyrinchieae (Chauveau *et al.*,

2012), Trimezieae (Lovo *et al.*, 2012) e Tigridieae (Rodriguez e Sytsma, 2006; Chauveau *et al.*, 2012).

Uma estimativa inferida através de relógio molecular foi realizada por Goldblatt *et al.* (2008) para calcular o possível tempo de divergência entre o ancestral das primitivas iridáceas e a família Doryanthaceae, utilizando o procedimento de calibração da árvore das Angiospermas seguido por Wikström *et al.* (2001). Através desse método, foi proposto que a divergência entre Iridaceae e Doryanthaceae teve origem ao sul, na antiga região formada pela união das massas terrestres da atual Austrália, Antártica, Nova Zelândia e Nova Caledônia, há cerca de 82 milhões de anos, em acordo com a metodologia de cenário geológico adotada por Sanmartín e Ronquist (2004). O gênero *Isophysis* (Isophysidoideae), considerado o mais antigo da família – principalmente por possuir flores com ovário súpero – teria divergido das primitivas iridáceas há cerca de 66 milhões de anos. Sua atual localização encontra-se limitada à Tasmânia, em acordo com as distribuições dos membros mais basais de Iridaceae, restritas às regiões da Tasmânia, Austrália, África do Sul e Ilha de Madagascar. Entre os eventos que possivelmente contribuíram para a antiga diversificação de Iridaceae estão os de duplicação cromossômica – em uma frequência maior do que a esperada – e de dispersão – em frequência significativamente menor (Sanmartín e Ronquist, 2004).

3. TIGRIDIEAE (IRIDOIDEAE)

Todas as espécies autóctones americanas de Iridaceae pertencem à Iridoideae (29 gêneros e cerca de 890 espécies), a segunda subfamília em número de espécies dentro de Iridaceae. Atualmente, Iridoideae é dividida em cinco tribos: Diplarreneae, Irideae, Sisyrinchieae, Trimezieae e Tigrideae (Goldblatt *et al.*, 2008). Tem uma ampla distribuição geográfica compreendendo regiões da Europa, China, América do Norte, América do Sul, Austrália, Nova Guiné, Nova Zelândia e África do Sul. As tribos Trimezieae (quatro gêneros e cerca de 60 espécies) e Tigridieae (15 gêneros e aproximadamente 172 espécies) são exclusivas das Américas (Goldblatt e Manning, 2008; Goldblatt *et al.*, 2008). No Brasil, os principais gêneros que representam Iridaceae são *Sisyrinchium* L. (58 espécies, sendo quatro endêmicas; Eggers, 2013), *Neomarica* Sprague (26 espécies e 23 endêmicas; Gil, 2013), *Pseudotrimezia* R.C. Foster (17 espécies; Lovo, 2013), *Trimezia* Salisb. ex Herb. (14 espécies, 10 endêmicas; Chukr, 2013) e *Cypella* Herb. (15 espécies, quatro

endêmicas; Eggers, 2013). No Rio Grande do Sul foram identificados dez gêneros de ocorrência natural (Figura 3), todos pertencentes à subfamília Iridoideae: *Calydorea* Herb., *Cypella*, *Gelasine* Herb., *Herbertia* Sweet, *Kelissa* Ravenna, *Onira* Ravenna, *Phalocallis* Herb. (tribo Tigridaeae); *Sisyrinchium* (tribo Sisyrinchieae); *Trimezia* e *Neomarica* (tribo Trimezieae) (Eggers, 2008).



Figura 3. Espécies representantes de nove gêneros de Iridaceae encontrados no Rio Grande do Sul. (A) *Sisyrinchium sellowianum* Klatt (tribo Sisyrinchieae). (B) *Calydorea alba* Roitman & J.A. Castillo, (C) *Cypella herbertii* (Lindl.) Herb., (D) *Gelasine elongata* (Graham) Ravenna, (E) *Kelissa brasiliensis* Ravenna, (F) *Onira unguiculata* Ravenna, (G) *Phalocallis coelestis* (Lehm.) Ravenna (de B–G, tribo Tigridaeae). (H) *Neomarica candida* (Hassl.) Sprague, e (I) *Trimezia spathata* (Klatt) Baker (tribo Trimezieae). Autoria das fotos: Eggers, L. (D e I); Verdi, M. (G). Demais fotografias: Stiehl-Alves, E.M.

A atual filogenia proposta para Tigridaeae estimou dois agrupamentos monofiléticos, os chamados clado *A* e clado *B* (Chauveau *et al.*, 2012). Estas estimativas foram baseadas em uma ampla amostragem de espécies representativas e inequívocas, com enfoque em espécies sul-americanas de Tigridaeae. Maior resolução filogenética foi obtida por causa do incremento no número de sequências de DNA (três regiões codificantes, *rps4*, *matK* e *rbcL*; a região *trnL-F* e o intron *rps16*), em associação com a análise das estruturas florais glandulares e seu tipo de recompensa. Isto se encontra em acordo com uma inferência filogenética anterior fundamentada em análise combinada de caracteres morfológicos e moleculares, com enfoque em espécies mexicanas e centro-americanas de Tigridaeae (Rodriguez e Sytsma, 2006). Em parte, essas inferências filogenéticas concordam com evidências anteriores (Goldblatt, 1982; 1990; Reeves *et al.*, 2001; Goldblatt *et al.*, 2008). Entre as dificuldades encontradas para a análise morfológica de Tigridaeae encontra-se a grande variação morfológica intraespecífica de alguns grupos, a duração efêmera das flores – as espécies produzem flores que florescem em apenas um dia e, a dificuldade de preservação destas em material herborizado (Rodriguez e Sytsma, 2006; Goldblatt *et al.*, 2008). Assim, a análise combinada de caracteres moleculares, morfológicos, citogenéticos e biogeográficos surge como uma ferramenta útil para a compreensão de relacionamentos ainda mal compreendidos em Tigridaeae.

4. O GÊNERO *HERBERTIA*

O gênero *Herbertia* (Tigridaeae: Iridoideae) compreende espécies de plantas herbáceas, bulbosas, perenes e sazonais, a maioria delas com flores violeta, presentes em áreas de campo aberto no sul da América do Sul, e são comumente chamadas de “Bibi”. A espécie-tipo é *Herbertia pulchella*, que foi inicialmente descrita por Robert Sweet em 1827, a partir de bulbos coletados no Uruguai e posteriormente cultivados nos EUA. Atualmente, são aceitas sete espécies (Goldblatt e Manning, 2008), e seis delas são encontradas nos campos do Rio Grande do Sul: *Herbertia crosae*, *H. darwinii*, *H. lahue*, *H. pulchella*, *H. quareimana* e *H. zebrina* Deble (Figura 4). A única espécie que não é encontrada no Rio Grande do Sul é *H. tigridioides*.



Figura 4. Espécies de *Herbertia* encontradas no Rio Grande do Sul. (A) *Herbertia crosae*, (B) *H. darwinii*, (C) *H. lahue*, (D) *H. pulchella*, (E) *H. quareimana*, e, (F) *H. zebrina*.

Morfologicamente, são plantas que compartilham grande uniformidade das características vegetativas, composta por folhas plicadas, simples e basais. Após o período do florescimento, as folhas secam, restando bulbos subterrâneos que asseguram a perenidade das espécies nas áreas de ocorrência (Goldblatt e Manning, 2008). A morfologia floral é constituída por inflorescências do tipo ripídio, com flores violeta (em *H. zebrina*, elas são brancas) e perfeitas. As flores são compostas por seis tépalas livres dispostas em dois verticilos, as tépalas externas maiores que as internas. O androceu é composto por uma coluna estaminal formada pela união de três filetes que culminam com anteras divergentes; o gineceu é formado por um estilete que se ramifica em três ramos, os quais são bifurcados na extremidade e contém região estigmática apical (Goldblatt *et al.*, 1998; Goldblatt e Manning, 2008).

Uma característica importante que distingue as espécies de *Herbertia* é a presença de tricomas glandulares produtores de óleos florais nos dois conjuntos de tépalas (Figura 2B), embora mais esparsos nas tépalas externas (Goldblatt e Manning, 2008; Chauveau *et al.*, 2012). Tricomas glandulares lembram pêlos glandulares vegetativos e são encontrados nas flores de algumas espécies de Iridaceae, Cucurbitaceae, Primulariaceae,

Scrophulariaceae e Solanaceae (Buchmann, 1987; Renner e Schaefer, 2010). Caracteristicamente, a secreção de lipídeos a partir de tricomas glandulares é ativa, embora em menor quantidade quando comparado a outro tipo de órgão secretor de óleos, os tricomas epiteliais (Buchmann, 1987). A ausência de estruturas glandulares foi estimada como ancestral para a tribo Tigrídieae e, possivelmente, a sua evolução se deu ao menos duas vezes e de forma independente dentro da tribo. Em Tigrídieae, a otimização dos estados ancestrais dos caracteres sugeriu que elaióforos presentes somente nas tépalas internas seria a condição ancestral (Chauveau *et al.*, 2012).

Análises recentes da filogenia de Iridaceae têm mostrado que *Herbertia* é monofilética (Chauveau *et al.*, 2012) e estreitamente relacionada a *Kelissa brasiliensis*, *Onira unguiculata* e *Cypella hauthalli* (Kuntze) R.C.Foster, formando um clado com outras espécies de *Cypella*, *Calydorea* e *Cipura* Aubl. (Figura 5) (Reeves *et al.*, 2001; Goldblatt e Manning, 2008; Goldblatt *et al.*, 2008; Chauveau *et al.*, 2012). Contudo, a delimitação taxonômica das espécies de *Herbertia* é dificultada pela semelhança das características vegetativas em associação com variações de alguns aspectos das características florais (Figura 6). Este fato também é comum a outros gêneros de Tigrídieae, o que torna a identificação de espécies possível somente durante o período do florescimento (Rodríguez e Sytsma, 2006). Adicionalmente, as flores são efêmeras e pouco conservadas em material de herbário, o que impossibilita o reconhecimento através de exsicatas. Este conjunto de fatores torna impraticável a delimitação taxonômica para grupos complicados de Tigrídieae baseada unicamente em morfologia, demandando a análise combinada de caracteres morfológicos, moleculares, citogenéticos e biogeográficos.

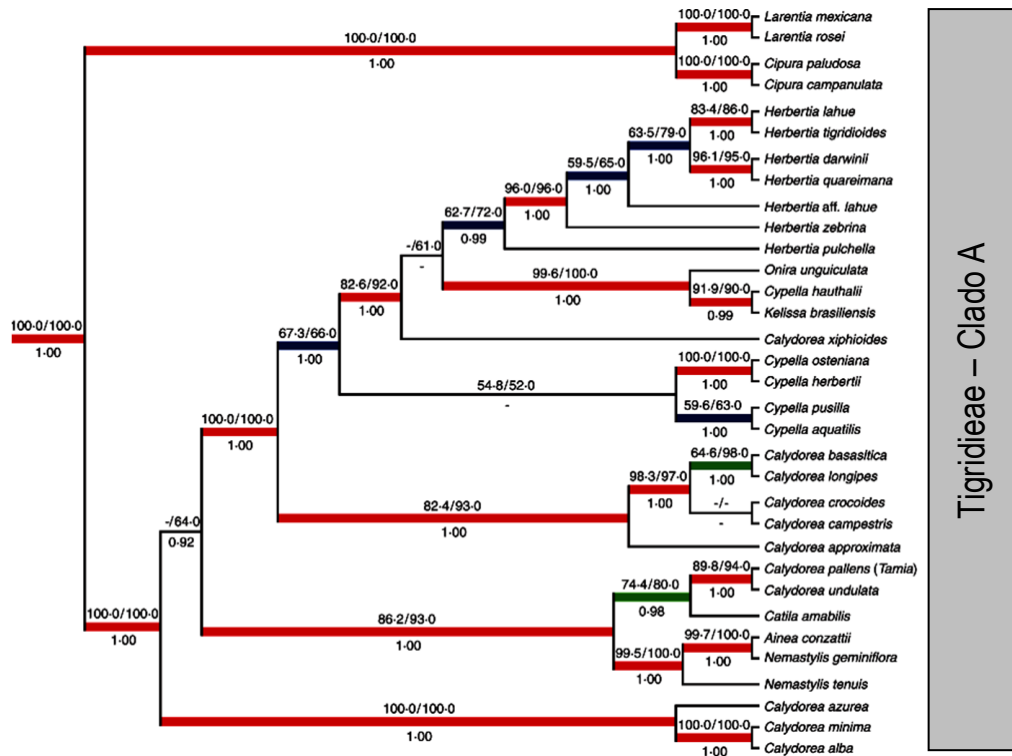


Figura 5. Relacionamento filogenético de *Herbertia* inferido através de uma análise combinada de caracteres moleculares e estados de caráter para estruturas florais glandulares (Chauveau *et al.*, 2012).

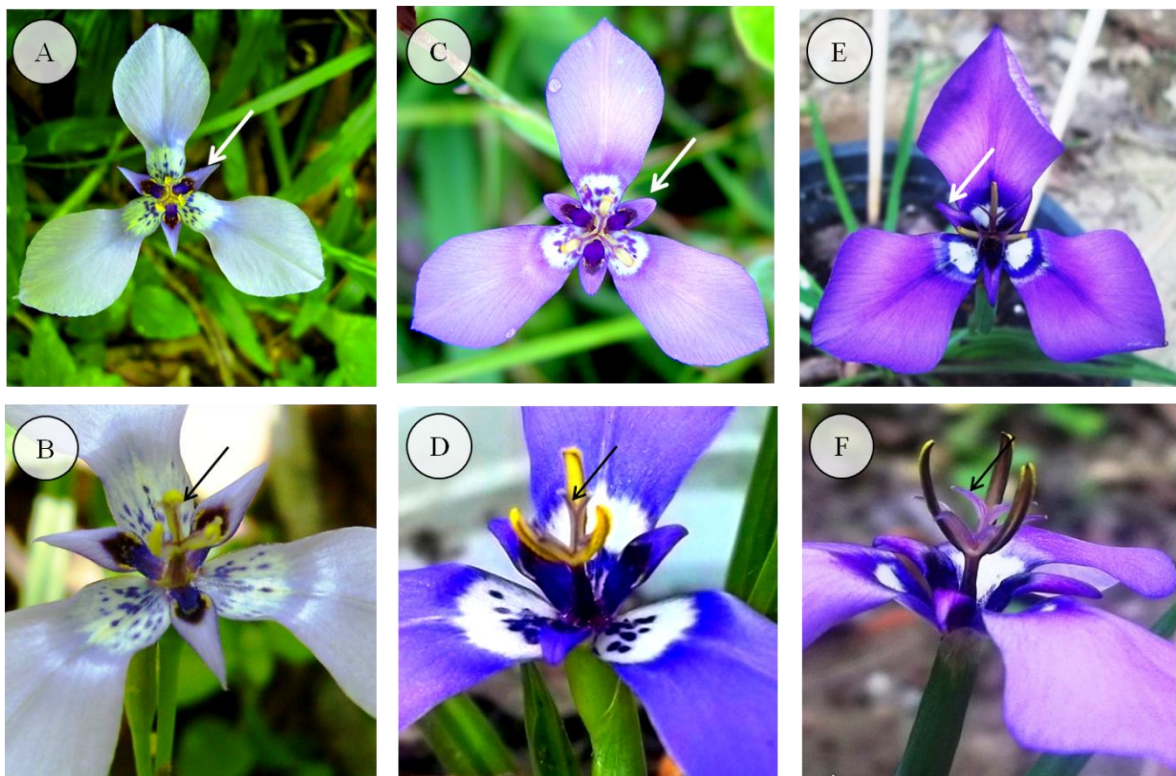


Figura 6. Algumas variações da morfologia floral verificadas em *Herbertia lahue*. Estas diferenças dizem respeito principalmente à forma das tépalas externas e internas (triângulo cinza), bem como ao

comprimento dos estiletes após a segunda bifurcação (seta negra) e anteras. (A–B) *H. lahue* citótipo hexaploide, (C–D) *H. lahue* citótipo octaploide, (E–F) *Herbertia* aff. *lahue*. Fotos: Stiehl-Alves, E.M.

5. ASPECTOS CITOGENÉTICOS DE IRIDACEAE, COM ÊNFASE EM TIGRIDIEAE

Embora os primeiros estudos voltados à citologia das iridáceas datem do início do século XX (por volta da década de 1930), eles foram restritos, sobretudo, às espécies do Hemisfério Norte e da África. Atualmente, tem-se o registro dos números cromossômicos de 1.330 espécies de Iridaceae, o que corresponderia a aproximadamente 65% do total de espécies da família, a maioria delas presente na flora do Velho Mundo (Alves *et al.*, 2011). Todavia, alguns estudos já foram realizados com algumas espécies sul-americanas, permitindo o avanço do nosso conhecimento sobre a citogenética de Iridaceae (Moreno *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2011; Tacuatiá *et al.*, 2012). Esta família é diferenciada pela variedade de características cariotípicas, incluindo número cromossômico básico, nível de ploidia e proporção dos braços dos cromossomos. Essas variações são consideradas importantes para a evolução e sistemática da família e têm sido utilizadas para a delimitação de *taxa* de Iridaceae (Goldblatt, 1982; Goldblatt e Takei, 1997; Tulio *et al.*, 2008; Souza-Chies *et al.*, 2012).

Possivelmente, $x=10$ é o número ancestral básico para Iridaceae (Goldblatt, 1990; Goldblatt *et al.*, 1998; Goldblatt e Takei, 1997). Foi proposta para a família uma origem paleopoliploide após um evento ancestral de duplicação do genoma (Goldblatt e Takei, 1997). Ao analisar a biogeografia da biota que compõe o Hemisfério Sul, Sanmartín e Ronquist (2004) estimaram que os principais fenômenos que agiram promovendo a especiação das iridáceas foram aqueles relacionados a eventos de duplicação cromossômica e, em menor proporção, a eventos de dispersão.

Inferências realizadas em Tigridieae a partir de características cariológicas e morfológicas têm sugerido uma condição derivada para este grupo (Goldblatt, 1990; Goldblatt *et al.*, 2008). A organização bimodal dos cromossomos, em que os cariótipos contêm cromossomos de dois tamanhos distintos, tem sido relacionada diretamente à especiação, pois provavelmente implica na translocação de genes, afetando ocasionalmente a recombinação (Vosa, 2005).

Nas espécies do clado A de Tigrideae amostradas até agora, o número cromossômico básico ($x=7$) é uma característica que permanece inalterada. A exceção é

Ainea konzattii (R.C.Foster) Ravenna, que apresenta número cromossômico básico $x=14$ e grãos-de-pólen bissulcados, atributos que, em inferências filogenéticas anteriores, a posicionavam fora deste clado (Goldblatt *et al.*, 1982). Porém, *Ainea* compartilha similaridades morfológicas com *Nemastylis geminiflora* Nutt. e *N. tenuis* (Herb.) S. Watson, dando suporte ao posicionamento filogenético inferido atualmente.

Em *Herbertia*, o número cromossômico básico $x=7$ aparentemente não apresenta alterações. Seis das sete espécies reconhecidas têm contagens cromossômicas inferidas e quatro níveis de ploidia são relatados: $2x$, $4x$, $6x$ e $8x$ (Winge, 1959; Kenton e Heywood, 1984; Goldblatt e Takei, 1997; Roitman e Castilho, 2004; Moreno *et al.*, 2009). As espécies diploides ($2n=14$) são *H. crosae* e *H. darwinii* (Roitman e Castilho, 2004; 2008; Moreno *et al.*, 2009). No caso de *H. darwinii*, o cariótipo é bimodal e coincide com outros cariótipos inferidos em táxons estreitamente relacionados, como *Cypella*, *Hesperoxiphion* Baker e *Calydorea* (Kenton *et al.*, 1990; Tulio *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2009). Nível de ploidia tetraploide ($2n=28$) é encontrado em *H. quareimana* e o cariótipo inferido para a espécie é simétrico (Goldblatt e Takei, 1997; Roitman e Castillo 2004, 2008; Moreno *et al.*, 2009). Séries poliploides foram inferidas para duas espécies, *H. lahue* e *H. pulchella*. No caso de *H. lahue*, uma espécie de ampla distribuição geográfica, quatro citótipos são mencionados na literatura: $2n=14$, 28 , 42 e 56 (Winge, 1959; Kenton e Heywood, 1984; Goldblatt e Takei, 1997; Moreno *et al.*, 2009). Cariótipos simétricos foram inferidos até o momento para *H. lahue* (Moreno *et al.*, 2009). Para *H. pulchella*, dois citótipos foram inferidos: $2n=14$ (Winge, 1959; Kenton e Heywood, 1984); e, $2n=42$ (Goldblatt e Takei, 1997).

6. ESTIMATIVAS DE DIVERSIDADE GENÉTICA FUNDAMENTADAS EM MARCADORES MOLECULARES DE HERANÇA DOMINANTE

O desenvolvimento de metodologias fundamentadas na tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR, “*polymerase chain reaction*”) foi um grande passo para tornar ampla a iniciativa de pesquisa com vários organismos, o que possibilitou o aumento do nosso conhecimento sobre os níveis de diversidade e de estruturação genética de diferentes táxons. A escolha de determinada metodologia deve levar em consideração aspectos como o custo, a consistência, a reprodutibilidade e o nível de polimorfismo detectado (Wolff e Morgan-Richards, 1998; Bornet e Branchard, 2001). A obtenção de marcadores

polimórficos é crucial para a execução de estimativas confiáveis de diversidade genética, visto que diferentes marcadores moleculares mostram níveis diferentes de divergência genética, dependente principalmente da taxa evolutiva (Wolff e Morgan-Richards, 1998). Em Iridaceae, marcadores moleculares têm sido utilizados com sucesso tanto para a caracterização molecular de cultivares e de espécies (Caiola, Caputo e Zanier, 2004; Marco *et al.*, 2009; Moraga *et al.*, 2010; Ranjan *et al.*, 2010; Tacuatiá *et al.*, 2012), quanto para a obtenção de estimativas de parâmetros genéticos intra e interpopulacionais (Hannan e Orick, 2000; Wróblewska *et al.*, 2003; Tacuatiá *et al.*, 2012). Inclusive, em espécies de *Gladiolus* presentes em uma região *hotspot*, a Região Florística do Cabo, os aspectos evolutivos envolvidos no processo de especiação puderam ser melhor compreendidos, tendo os autores correlacionado parâmetros de genética de populações obtidos por meio de marcadores AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) com análise espacial e de fenologia (Rymer *et al.*, 2010).

Entre os tipos de marcadores moleculares derivados de PCR, encontram-se aqueles obtidos através de *primers* não específicos, cuja popularidade provavelmente decorre da ausência de conhecimento *a priori* do genoma da espécie-alvo, tornando-os especialmente adequados àquelas situações em que não há pesquisa genética prévia, um fato bastante corriqueiro na maioria das espécies não domesticadas (Nybom, 2004). Marcadores baseados em polimorfismos de *inter simple sequence repeat* (ISSR) encontram-se na classe dos marcadores de DNA *fingerprinting* e seu polimorfismo é baseado no tamanho de sequências que entremeiam os microssatélites (SSR, *simple sequence repeat*) (Gupta *et al.*, 1994; Zietkiewicz *et al.*, 1994). São marcadores considerados semi-arbitrários, multilocos, de ampla distribuição ao longo do genoma e de evolução rápida, amplificados através de PCR usando um único *primer*, desenhado a partir de uma repetição di- ou trinucleotídeo, a qual pode ser ancorada ou não (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Godwin *et al.*, 1997).

Uma das principais limitações técnicas ao uso dessa metodologia, relacionada à reprodutibilidade, pode ser contornada com a escolha criteriosa de temperaturas de anelamento adequadas à sequência dos *primers* (Bornet e Branchard, 2001). Algumas medidas podem ser úteis para melhorar a qualidade da interpretação do sistema de bandas e elas incluem o uso de controles positivos nas eletroforeses (Bonin *et al.*, 2007). Além disso, a prática de ampliações e eletroforeses em replicatas também garantem uma boa interpretação do sistema de bandas (Bornet e Branchard, 2001; Bonin *et al.*, 2007).

Duas características fazem com que a análise estatística de marcadores dominantes seja menos informativa em comparação aos codominantes: a sua natureza bialélica e dominante. Normalmente, bandas ISSR são codificadas como presentes ou ausentes, resultando em uma matriz binária de caracteres. No caso da banda presente, há dificuldade em distinguir os indivíduos heterozigotos, a menos que o genótipo seja inferido através de estudos de *pedigree* (Lynch e Milligan, 1994; Nybom, 2004; Bonin *et al.*, 2007). Isso faz com que a análise estatística de marcadores dominantes torne-se sujeita a pressupostos adicionais (Lynch e Milligan, 1994). O uso concomitante de metodologias fundamentadas em frequência de bandas e frequências alélicas (incluindo procedimentos tradicionais de análise em conjunto com estimativa Bayesiana) é uma prática estatística interessante que visa consolidar os resultados (Bonin *et al.*, 2007; George *et al.*, 2009).

Entre as estimativas baseadas em frequência de bandas encontram-se vários coeficientes de similaridade, entre eles, os mais conhecidos são Jaccard e Dice. O primeiro, leva em conta a presença da banda em pelo menos um de dois indivíduos, não sendo, desta forma, afetado por bandas ausentes de caráter homoplásico. Em comparação, o coeficiente de Dice determina maior *score* para bandas presentes em ambos os indivíduos, destacando a similaridade (Bonin *et al.*, 2007). Nesses dois casos, a ênfase da análise se dá em nível individual.

No caso dos marcadores dominantes, as estimativas dos parâmetros genéticos baseadas em frequência alélica exigem que pressupostos adicionais sejam adotados, ou que informações sobre o coeficiente de *inbreeding* das populações analisadas estejam disponíveis (Bonin *et al.*, 2007). Os procedimentos que levam a estas estimativas enfatizam o nível de população. Muitas dessas estatísticas assumem o equilíbrio de Hardy-Weinberg em suas derivações. Entretanto, o procedimento Bayesiano de análise implementado por Holsinger *et al.* (2002) não considera o pressuposto de Hardy-Weinberg nos cálculos, bem como não assume um conhecimento *a priori* do grau de *inbreeding* dentro das populações em estudo. Desta maneira, esse tipo de estimativa surge como uma alternativa de análise para marcadores bialélicos e, de fato, tem sido bastante utilizada para inferir parâmetros de genética de populações em espécies vegetais (Bonin *et al.*, 2007; George *et al.*, 2009).

A correção proposta por Lynch e Milligan (1994) tem sido muito utilizada em estudos com marcadores dominantes e é baseada em um refinamento do método de raiz

quadrada (Stewart e Excoffier, 1996), tornando mais acurada a estimativa da frequência de alelos nulos. Para a correção do viés imposto pela característica dominante de marcadores ISSR, esta metodologia assume o equilíbrio de Hardy-Weinberg para as populações, o caráter bialélico para os locos em análise e ausência de co-migração de diferentes bandas para posições idênticas no gel. Contudo, tem sido observado que essa correção induz a outro tipo de viés, relacionado com a escolha dos locos em análise [determinado pela restrição da análise a locos em que a frequência do alelo nulo é superior a $3/N$ (em que N é o número de amostras)], juntamente com perda de informação na análise (Isabel *et al.* 1999; Bonin *et al.*, 2007).

A análise molecular da variância (AMOVA), desenvolvida por Excoffier *et al.* (1992), caracteriza outra metodologia para estimativas de estruturação genética de populações. A base para essa análise, no caso de marcadores dominantes, é o cálculo de uma matriz de distâncias fenotípicas (baseada em bandas), cujos componentes são tratados como desvios da média de um grupo. Trata-se de uma estatística facilmente aplicável em diversas situações e amplamente utilizada para a análise de populações vegetais.

7. A IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE DA BIOLOGIA REPRODUTIVA PARA IRIDACEAE

Iridaceae é caracterizada por ampla diversidade de mecanismos de polinização que favorecem a diversificação (Bernhardt e Goldblatt, 2000). Dois centros de diversidade, um sul-africano e outro sul-americano, são distintos para a família. No caso das espécies encontradas nas regiões temperadas e de terras altas das Américas Central e do Sul, elas são autóctones e pertencem basicamente a duas tribos: Tigridaeae e Trimezieae. A terceira tribo ocorrente nas Américas é Sisyrinchieae, que apresenta também espécies australianas, porém a maioria das espécies é americana.

Os mecanismos envolvidos na reprodução das espécies sul-africanas são bem compreendidos e contribuem com a alta diversidade de espécies e grande número de endemismos observado para a família (Bernhardt e Goldblatt, 2000; Goldblatt e Manning, 2006; Anderson *et al.*, 2009; Waal *et al.*, 2012). De uma maneira geral, a polinização cruzada é favorecida nas iridáceas sul-africanas através da autoincompatibilidade e da hercogamia (Bernhardt e Goldblatt, 2000). As síndromes de polinização variam consideravelmente e abrangem a polinização efetuada por abelhas de grande porte (família Apidae: *Amegilla*, *Anthofora* e *Apis*), bem como de abelhas pequenas (Andrenidae,

Fideliidae, Halictidae, Megachilidae e Melittidae), besouros (cantarofilia), moscas de probóscide longa e curta (miofilia), pássaros da família Nectarinidae (ornitofilia), borboletas (psicofilia) e mariposas (esfingofilia) (Bernhardt e Goldblatt, 2000).

Em contraste, há uma lacuna de estudos de biologia reprodutiva para Tigridaeae, uma tribo que reúne espécies interessantes pelo recurso disponibilizado a uma guilda restrita e especializada de polinizadores, as abelhas coletoras de óleos florais (Renner e Schaefer, 2010; Chauveau *et al.*, 2012). Em comparação, somente uma espécie de iridácea que oferta óleos florais é conhecida no universo de mais de 1.000 espécies de Iridaceae encontradas no sul da África (Figura 7A): *Tritoniopsis parviflora* (Jacq.) G.J. Lewis (tribo Tritoniopsidae, subfamília Crocoideae), a qual disponibiliza óleos florais para a abelha *Rediviva gigas* (Hymenoptera: Melittidae) (Manning e Goldblatt, 2005).

Esta forma de recompensa é restrita a onze famílias botânicas que ocorrem nas regiões tropical e subtropical do mundo e foi inferido que a evolução nesses grupos se deu ao menos 28 vezes (Renner e Schaefer, 2010). Em Iridaceae, os óleos florais constituem o terceiro tipo de recurso ofertado para polinizadores, juntamente com pólen e néctar, e são encontrados principalmente em Tigridaeae, Trimezieae e Sisyrinchieae (Figura 7B) (Goldblatt e Manning, 2008; Chauveau *et al.*, 2012). Aparentemente, as glândulas de óleo evoluíram uma única vez no ancestral comum de Tigridaeae e Trimezieae [a separação entre elas provavelmente se deu há cerca de 35 milhões de anos (Goldblatt *et al.*, 2008)] e foram perdidas ao menos seis vezes (Renner e Schaefer, 2010). Esse recurso é encontrado em tricomas glandulares localizados, sobretudo, nos estames nas espécies de *Sisyrinchium* (Chauveau *et al.*, 2011) e, em Tigridaeae e Trimezieae, na face adaxial das tépalas internas na ampla maioria das espécies já estudadas para este caráter (Chauveau *et al.*, 2012). De acordo com Chauveau e colaboradores, a exceção a este sistema é *Herbertia*, em que os tricomas glandulares aparecem nas duas séries de tépalas (Figura 2B). Desta maneira, a localização deste importante caráter distingue *Herbertia* das demais espécies estreitamente relacionadas inferidas na filogenia mais atual.

Abelhas constituem o grupo de visitantes florais mais frequentes em espécies sul-africanas de *Sparaxis* (Goldblatt *et al.*, 2000); *Gladiolus* (Goldblatt *et al.*, 2001) *Moraea* (Goldblatt *et al.*, 2002); *Romulea* Maratti (Goldblatt *et al.*, 2002); *Tritoniopsis* L. Bolus (Manning e Goldblatt, 2005); e, *Babiana* Ker Gawl. ex Sims (Goldblatt e Manning, 2007). Além das abelhas, também foram encontrados sirfídeos e besouros (Goldblatt e Manning,

2006). No caso dos coleópteros, aparentemente, suas visitas se dão com finalidade alimentar (alimentam-se de tépalas e estruturas reprodutivas) ou reprodutiva. Essas situações favoreceriam o contato passivo com anteras, um sistema também identificado em Iridaceae (Goldblatt *et al.*, 1998).

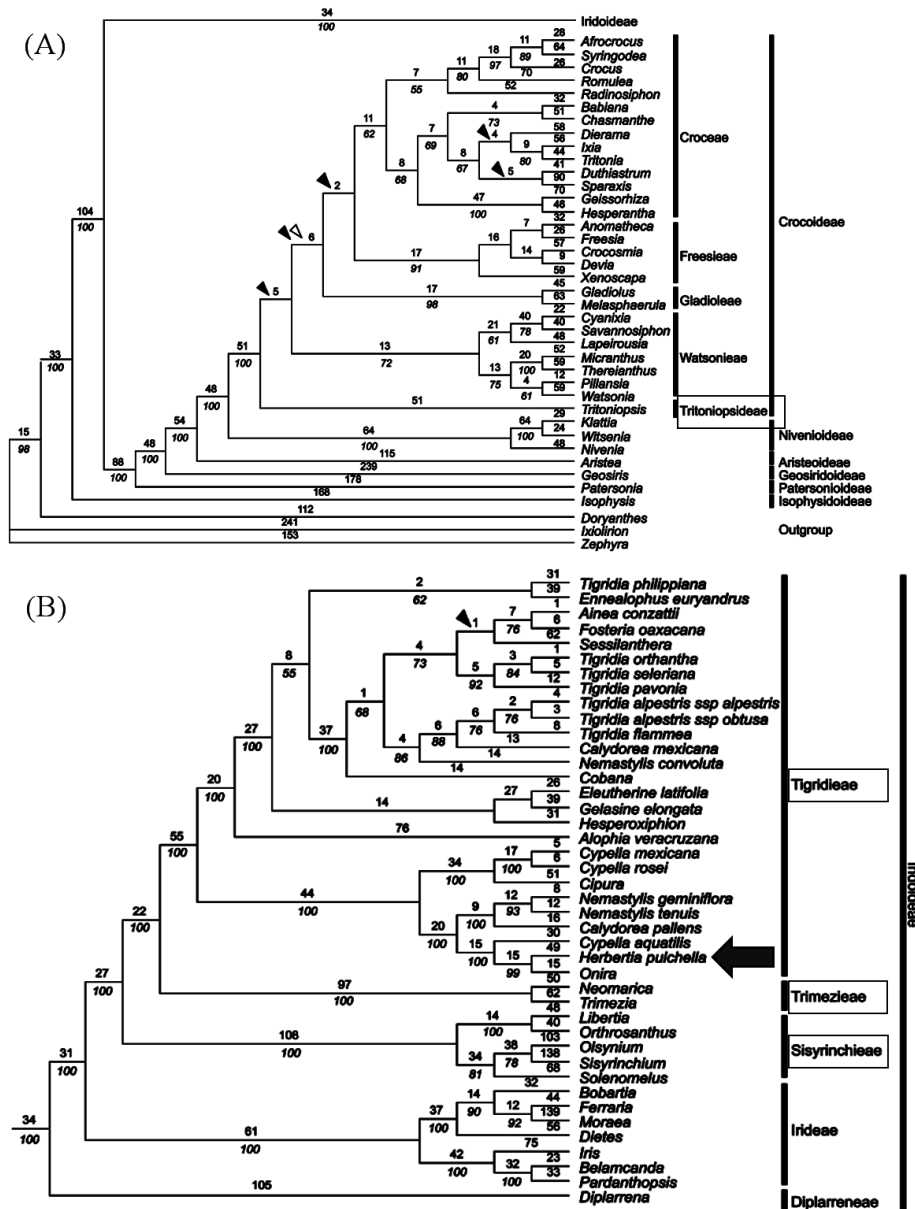


Figura 7. Relacionamento filogenético inferido para Iridaceae, destacando os grupos que incluem espécies que disponibilizam óleos florais. (A) Posicionamento filogenético de *Tritoniopsis parviflora* (Tritoniopsidae), a única espécie de Iridaceae do Velho Mundo que disponibiliza óleos florais. (B) Em Iridoideae, as três tribos que incluem espécies que oferecem óleos florais como recurso. A seta negra indica o posicionamento de *Herbertia pulchella*. Adaptado de Goldblatt *et al.*, 2008.

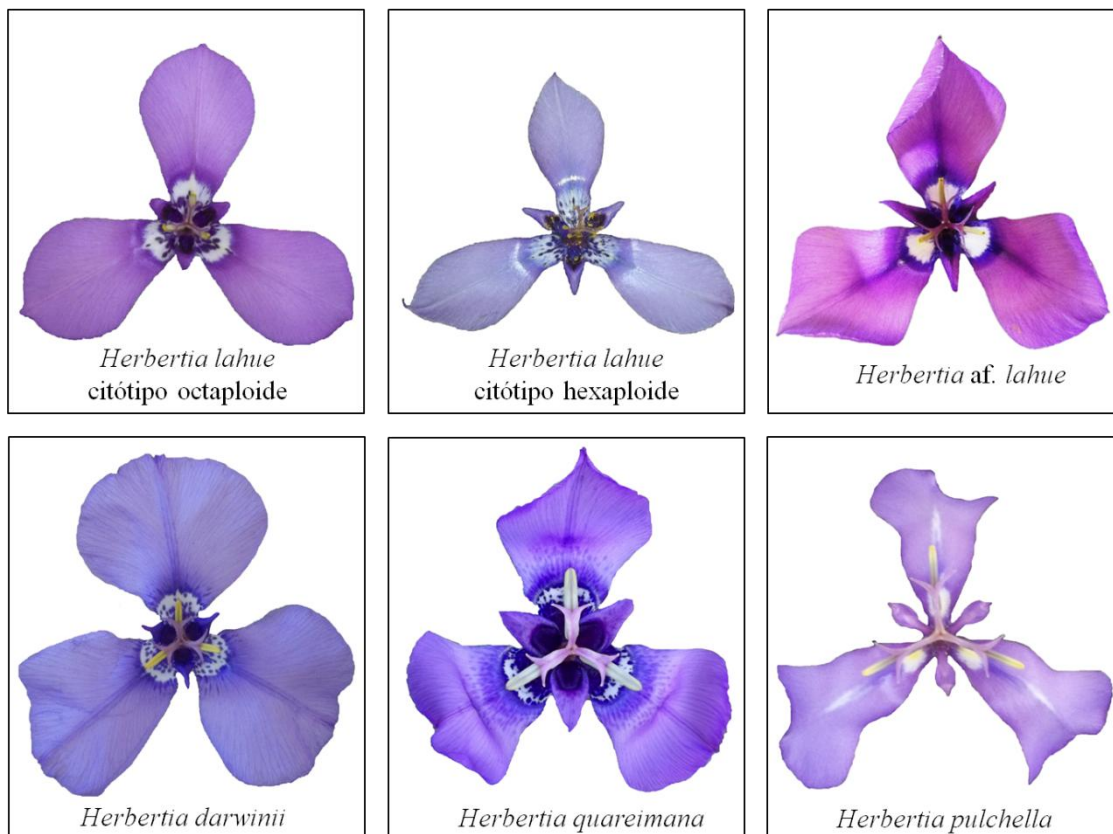
A maioria dos gêneros de Iridaceae citados anteriormente apresenta espécies com sistemas de polinização voltados a outros grupos de insetos ou pássaros. Positivamente, existe uma relação entre diversidade de mecanismos de polinização e diversidade de espécies, denotando a grande plasticidade fenotípica que caracteriza a família (Bernhardt e Goldblatt, 2000; Goldblatt e Manning, 2006). No caso de Tigridieae, há carência de informações que permitam tal relação, embora a grande variação morfológica encontrada nesse grupo sugira isso.

OBJETIVO GERAL

A presente tese está inserida em um projeto amplo que visa contribuir com estudos genéticos e moleculares de espécies de Iridaceae, a fim de aumentar o conhecimento sobre os aspectos evolutivos relacionados à sua diversificação na região sul do Brasil. Assim, a presente tese objetivou estimar a diversidade genética em espécies de *Herbertia* (Tigridieae: Iridoideae), relacionando as informações obtidas através de marcadores neutros com a diversidade morfológica e biologia reprodutiva das espécies. Adicionalmente, objetivou-se inferir o relacionamento filogenético intragenérico de *Herbertia*. A noção destes aspectos enriquecerá o conhecimento sobre a dinâmica evolutiva de espécies de *Herbertia*, bem como reunirá informações que servirão de suporte para inferências sobre o relacionamento filogenético entre os membros do clado A de Tigridieae.

CAPÍTULO II

FILOGENIA DE *HERBERTIA* (TIGRIDIEAE: IRIDACEAE)



A morfologia floral de *Herbertia* apresenta leves diferenças relacionadas principalmente ao gineceu e ao androceu. As variações morfológicas não são suficientes por si só para discriminar a variação em *Herbertia*. Assim, a inferência filogenética combinando diferentes abordagens moleculares e análise do sistema de cruzamento surgiu como uma ferramenta útil para entender os relacionamentos.

FILOGENIA DE *HERBERTIA* (TIGRIDIEAE: IRIDACEAE)

1. INTRODUÇÃO

Iridaceae (Asparagales) é uma ampla família de monocotiledôneas (cerca de 2000 espécies em mais de 60 gêneros) com marcante presença em todos os continentes (exceto nos extremos norte e sul do globo terrestre), tanto como componente florístico de importantes regiões fitogeográficas, ou com espécies utilizadas como elemento de jardinagem (Goldblatt e Manning, 2008). Além disso, o cultivo do *Crocus sativus* com finalidade alimentícia é milenar e constitui-se em um dos mais preciosos condimentos conhecidos. Outras espécies de Iridaceae também são conhecidas como fonte alimentar em países da África e da América do Sul (Goldblatt *et al.*, 1998; Goldblatt e Manning, 2008).

Apesar de amplamente difundida, Iridaceae é particularmente rica em espécies na África do Sul, no leste do Mediterrâneo, no México e na América do Sul (Goldblatt e Manning, 2008). No caso das espécies sul-africanas, os mecanismos de diversificação já são bem compreendidos e envolvem rápida radiação floral seguida de mudanças de tipo de polinizador (Goldblatt *et al.*, 2002). Embora iniciativas visando a compreensão dos processos envolvidos na diversificação dos grupos sul-americanos ainda sejam infreqüentes, algumas evidências obtidas em estudos recentes sugerem um mecanismo evolutivo similar (Chauveau *et al.*, 2011; Chauveau *et al.*, 2012). Na América do Sul, Iridaceae é representada por espécies incluídas em três (de cinco) tribos de Iridoideae, Sisyrinchieae, Trimezieae e Tigrídieae, as duas últimas autóctones do Novo Mundo (Goldblatt *et al.*, 2008).

Tigrídieae é a terceira tribo mais diversificada de Iridoideae, incluindo cerca de 20% das espécies desta subfamília (Goldblatt *et al.*, 2008). A filogenia molecular mais recente para Iridaceae indicou com bom suporte Tigrídieae como grupo monofilético e algumas sinapomorfias morfológicas sustentam este agrupamento (Figura 1) (Goldblatt, 1990; Goldblatt *et al.*, 2008). Morfológicamente, Tigrídieae reúne plantas bulbosas e com folhas plicadas. As flores actinomorfas são compostas por dois verticilos desiguais (o externo é o maior) com três tépalas cada. O androceu compreende filetes livres ou unidos e o gineceu apresenta um estilete com uma trifurcação intermediária, geralmente culminando cada ramo do estilete em uma bifurcação terminal. Os ramos do estilete variam desde

achatados até petalóides (Goldblatt, 1990; Goldblatt *et al.*, 1998; Goldblatt *et al.*, 2008; Goldblatt e Manning, 2008). Grande parte da variação referida a Tigridaeae encontra-se na morfologia floral. A taxonomia é complicada e é fundamentada em variações relacionadas ao androceu e gineceu, o que levou ao estabelecimento de vários gêneros monoespecíficos ou com reduzido número de espécies (Rodriguez e Sytsma, 2006; Goldblatt *et al.*, 2008; Chauveau *et al.*, 2012). Outras dificuldades também se fazem presentes na análise morfológica de Tigridaeae, incluindo a fugacidade das flores e a dificuldade de preservação destas em material herborizado.

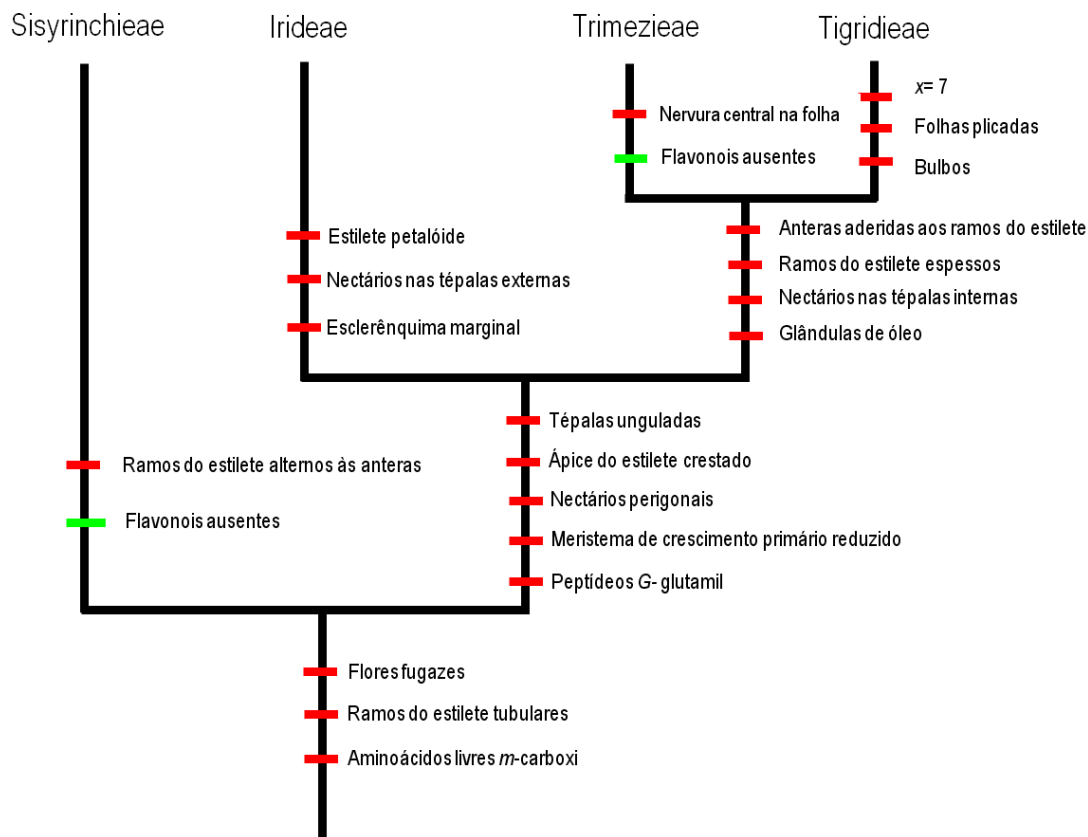


Figura 1. Relacionamento morfológico entre as quatro tribos de Iridoideae representadas no Novo Mundo. As principais sinapomorfias que caracterizam as tribos são indicadas pelas barras em vermelho. As barras verdes indicam paralelismos entre grupos distintos (adaptado de Goldblatt, 1990).

Em Tigridaeae, dois clados (atualmente denominados *A* e *B*) são notórios através de diferentes abordagens filogenéticas (Figura 2) (Goldblatt, 1982; Goldblatt, 1990; Reeves *et al.*, 2001; Rodriguez e Sytsma, 2006; Goldblatt *et al.*, 2008; Chauveau *et al.*, 2012). O clado *A* tem centro de diversificação localizado na América do Sul e os relacionamentos inferidos neste agrupamento de espécies têm indicado a necessidade de uma revisão taxonômica crítica para atender aos princípios da monofilia (Chauveau *et al.*, 2012).

Em *Herbertia*, alguns fatores contribuem para tornar complicada a delimitação taxonômica em algumas espécies. A morfologia vegetativa é bastante semelhante entre as espécies, em contraste com variações florais associadas principalmente ao formato das tépalas e a dimensões de estruturas que compõem o androceu e o gineceu. Possivelmente, isto reflete adaptação a diferentes nichos e à disponibilidade de polinizadores, mas este fato deve ser mais bem esclarecido. O período do florescimento para a maioria das *Herbertia* é curto (ocorre durante a primavera) e as flores são efêmeras (a maioria das espécies floresce pela manhã). A delicadeza das flores torna difícil o processo de preservação como exsicatas. Adicionalmente, algumas descrições taxonômicas são incompletas. Não há informações sobre a biologia reprodutiva em espécies de *Herbertia* e parâmetros de genética de populações são ausentes. Assim, a compreensão sobre a evolução deste grupo é inexistente, o que é comum a outras Tigridieae.

Por outro lado, algumas características tornam *Herbertia* um bom modelo para estudo em Tigridieae. São reconhecidas atualmente sete espécies (Goldblatt e Manning, 2008), as quais possuem variado padrão de distribuição geográfica (incluindo duas espécies endêmicas de distribuição geográfica muito restrita), o que pode repercutir nos padrões de fluxo gênico entre populações. Variação dos níveis de ploidia intraespecífica também foi descrita (Winge, 1959; Kenton e Heywood, 1984; Goldblatt e Takei, 1997; Moreno *et al.*, 2009). A presença de elaióforos sugere recompensa floral diversificada (pólen e/ou óleos florais) (Goldblatt e Manning, 2008; Chauveau *et al.*, 2012). Assim, buscando compreender o relacionamento infragênico de *Herbertia*, uma análise filogenética utilizando sequências de DNA foi realizada. As inferências aqui obtidas também servirão de suporte para um estudo maior focado nas espécies do clado A de Tigridieae, que busca melhorar o sinal filogenético entre os membros deste grupo através da revisão dos caracteres morfológicos até então utilizados para delimitar estas subdivisões.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram amostrados 24 terminais de *Herbertia* representando a totalidade de espécies reconhecidas para o gênero. Cada terminal representou uma população e, quando possível, mais de uma população foi amostrada por espécie (Tabela 1). Como *outgroup* foram selecionadas as espécies *Calydorea alba* (Tigridieae) e *Trimezia spathata* (Trimezieae).

Tabela 1. Relação de táxons de *Herbertia* amostrados para inferir a filogenia infragenérica.

| Voucher | Código | Localização | Latitude | Longitude |
|---|-----------|------------------------------|-------------|-------------|
| <i>Herbertia crosae</i> | | | | |
| ESC528 | Crosae01 | Uruguaiana, RS | - 30,044 | - 57,251 |
| <i>Herbertia darwinii</i> | | | | |
| ESC502 | Darw02 | Livramento, RS | - 30,875 | - 55,482 |
| ESC548 | Darw03 | São Borja, RS | -28.895 | - 55,654 |
| <i>Herbertia lahue</i> | | | | |
| Alves04 | LahOC01 | Bagé, RS | -31.260 | -54.159 |
| ESC488 | LahOC02 | São Gabriel, RS | -30.327 | -54.372 |
| ESC494 | LahOC03 | Santana do Livramento, RS | -30.804 | -55.263 |
| ESC495 | LahOC04 | Santana do Livramento, RS | -30.804 | -55.261 |
| ESC504 | LahOC05 | Santana do Livramento, RS | -30.888 | -55.476 |
| SP537 | LahOC06 | Region VIII, Diguilin, Chile | | |
| Alves25 | LahHX01 | Ipê, RS | -28.458 | -54.399 |
| Alves31 | LahHX02 | Pouso Novo, RS | | |
| ESC521 | LahHX03 | Uruguaiana, RS | -30.804 | -55.261 |
| ESC535 | LahHX04 | Entre-Ijuis, RS | -30.189 | -57.470 |
| <i>Herbertia</i> af. <i>lahue</i> | | | | |
| Alves32 | Af.Lah01 | Porto Alegre, RS | | |
| Alves33 | Af.Lah02 | Salto do Jacuí, RS | | |
| <i>Herbertia pulchella</i> | | | | |
| Alves29 | Pulc01 | São Jerônimo do Sul, RS | - 30,321 | - 51,874 |
| ESC260 | Pulc02 | Porto Alegre, RS | - 30,055 | - 51,126 |
| TLSalves168 | Pulc03 | Caçapava do Sul, RS | - 31,021 | - 52,052 |
| <i>Herbertia quareimana</i> | | | | |
| ESC513A | Quar01 | Quarai, RS | - 30,195 | - 56, 488 |
| ESC513B | Quar02 | Quarai, RS | - 30,195 | - 56, 488 |
| <i>Herbertia</i> af. <i>quareimana</i> | | | | |
| ESC536 | Af.Quar01 | Entre-Ijuis, RS | - 28,456 | - 54,399 |
| <i>Herbertia zebrina</i> | | | | |
| Alves23 | Zebr01 | Encruzilhada do Sul, RS | - 30,656 | - 52,405 |
| ESC421 | Zebr02 | Encruzilhada do Sul, RS | - 30,518 | - 52,697 |
| <i>Herbertia tigridioides</i> | | | | |
| SP586 | Tigrid01 | Argentina | | |
| <i>Calydorea alba</i> | | | | |
| SP522 | Calydorea | Uruguaiana, RS | 29°54'34,9" | 57°09'02,7" |
| <i>Trimezia spathata</i> | | | | |
| SP501 | Trimezia | Derrubadas, RS | | |

Extração de DNA, Amplificação e Sequenciamento – DNA total foi extraído a partir de folhas frescas ou secas em sílica gel utilizando o protocolo de Doyle e Doyle (1997) adaptado para microcentrífuga. Uma combinação de regiões codificantes (genes *matK* e *rps4*) e não-codificantes (intron do *matK-trnK* e espaçadores intergênicos *rps4-trnS* e *trnQ-rps16*) do DNA plastidial foi utilizada para inferir o relacionamento filogenético entre os táxons amostrados. Estas sequências foram selecionadas de acordo com a quantidade de caracteres parcimoniosamente informativos detectada em estudos anteriores (Souza-Chies *et al.*, 1997; Reeves *et al.*, 2011; Goldblatt *et al.*, 2008; Chauveau *et al.*, 2011 e 2012). As sequências do *primers* utilizados para a amplificação das regiões de DNA amostradas estão descritas na Tabela 2.

TABELA 2. *Primers* utilizados para amplificação e sequenciamento de regiões codificantes e não-codificantes de cpDNA para inferir o relacionamento filogenético entre espécies de *Herbertia* analisadas.

| Nome do primer | Direção | Sequência do primer (5' – 3') | Fonte |
|--|---------|-------------------------------|------------------------------------|
| <u>Região <i>matK</i> codificante e <i>matK-trnK</i> intron</u> | | | |
| matK-f1 | F | ATGGAAGAATTACAAGGATAT | Chauveau <i>et al.</i> (2011) |
| matK-f2 | F | CATATAAACCAATTATCAAAC | Chauveau <i>et al.</i> (2011) |
| matK-r2 | R | AGTTTGATAATTGGTTTATATG | Chauveau <i>et al.</i> (2011) |
| trnK-2r | R | AACTAGTCGGATGGAGTAG | (Johnston and Soltis, 1995) |
| <u>Região <i>rps4</i> codificante e espaçador intergênico <i>rps4-trnS</i></u> | | | |
| rps4-f | F | ATGTCCCGTTATCGAGGACCT | Souza-Chies <i>et al.</i> (1997) |
| trnS-r | R | TACCGAGGGTTTCGAATC | Souza-Chies <i>et al.</i> , (1997) |
| <u>Espaçador intergênico <i>trnQ-rps16</i></u> | | | |
| rps16-S1r | R | GTTGCTTTCTACCACATCGTTT | (Shaw <i>et al.</i> 2007) |
| trnQ-f6 | F | TTTCGGTTAAGTCAAAGGGGG | Chauveau <i>et al.</i> (2012) |
| trnQ-r3 | R | CCCTTTGAGTTAACCGAAAGGCATTG | Chauveau <i>et al.</i> (2012) |
| trnQ-S1f | F | GCGTGGCCAAGTGGTAAGGC | (Shaw <i>et al.</i> 2007) |

As reações foram preparadas para um volume total de 50 µL, contendo os seguintes componentes: 1,0 µL de DNA genômico (cerca de 20–100 ng de DNA); 1,0 µM de cada *primer*; 100 µM de dNTP; 1X tampão para *Taq*; 1,5 mM de MgCl; 1,5 U *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil). As amplificações por PCR foram feitas conforme as especificidades de cada região amostrada do cpDNA (Tabela 3), em um

termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycle, Applied Biosystems. Os produtos de PCR foram purificados por reação enzimática (Exonuclease e Shrimp Alkaline Fosfatase). Primers direto e reverso foram utilizados para o sequenciamento das reações purificadas (Cogenics, Meylan, França), utilizando um sequenciador automático ABI PRISM (Perkin Elmer, Courtaboeuf, França). CodonCode Aligner 3.5.3 (CodonCode Corp., Dedham, MA, USA) foi explorado para realizar a união das sequências direta e reversa de cada amostra. Em caso de ambiguidade, as bases foram corrigidas utilizando o cromatograma para exame, tornando possível a utilização das sequências consenso.

TABELA 3. Condições de PCR para amplificação do DNA. (1) Desnaturação inicial; (2) Número de ciclos; (3) Desnaturação, anelamento e passos de elongação para cada ciclo; (4) Elongação final. Temperatura e duração são indicadas para cada passo.

| Locus | Condições de PCR |
|-------------------------|---|
| <i>matK + matK-trnK</i> | (1) 94°C-3 min; (2) 40; (3) 94°C-1 min, 53°C - 40 s, 72°C-2 min; (4) 72°C-5 min |
| <i>rps4 + rps4-trnS</i> | (1) 94°C-3 min; (2) 40; (3) 94°C-1 min, 56°C - 40 s, 72°C-1:30 min; (4) 72°C-5 min |
| <i>trnQ-rps16</i> | (1) 94°C-5 min; (2) 40; (3) 94°C-1 min, 62°C - 40 s, 72°C-1:30 min; (4) 72°C-5 min |

Fonte: Chauveau *et al.* (2011); Chauveau *et al.* (2012).

Análise filogenética – Os alinhamentos foram produzidos manualmente utilizando o software MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011). Os *indels* detectados pelo alinhamento partilhados por dois ou mais táxons foram codificados como caracteres binários utilizando GapCoder (Young and Healy, 2003). Todas as cinco regiões do cpDNA foram analisadas independentemente, comparando as topologias resultantes. Após certificar-se da ausência de diferenças topológicas bem suportadas, os dados foram reunidos em uma única matriz para análise em conjunto, buscando melhor a resolução. O conjunto de dados (incluindo os *indels* codificados por GapCoder) foi analisado em PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) através do critério de Máxima Parcimônia (MP). Árvores consenso estrito e *majority rule* foram calculadas a partir das árvores mais parcimoniosas. MP foi conduzida com 1000 replicatas

bootstrap para avaliar a robustez dos agrupamentos inferidos. RAxML 7.2.6 (Stamatakis, 2006) foi utilizado para executar a análise de Máxima Verossimilhança (ML). A confiança das topologias ML inferidas foi avaliada através da análise não paramétrica de *bootstrap* utilizando 1000 pseudo-replicatas. MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) foi utilizado para executar a Análise Bayesiana, utilizando como parâmetros os modelos evolutivos calculados através de MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004), sob o critério de informação Akaike. No caso das análises probabilísticas, os dados foram particionados e foram estimados modelos evolutivos apropriados para cada tipo de partição (Tabela 4).

TABELA 4. Modelos evolutivos utilizados nas análises de Máxima Verossimilhança (MV) e Análise Bayesiana, inferidas a partir de matrizes de dados particionados, buscando inferir o relacionamento filogenético entre espécies de *Herbertia* analisadas.

| Partição dos dados | Tamanho do fragmento (pb) | Partição por posição do códon § | Modelo evolutivo | |
|--|---------------------------|---------------------------------|------------------|------------------------------------|
| | | | MV | AB |
| <u>Partição do DNA</u> | | | | |
| <i>matK</i> | 1561 | X | GTRGAMMA | HKY+I |
| <i>matK-trnK</i> | 270 | | | HKY |
| <i>rps4</i> | 606 | X | | HKY |
| <i>rps4-trnS</i> | 322 | | | HKY |
| <i>trnQ-rps16</i> | 1649 | | | GTR+I |
| <u>Partição dos indels codificada como caracteres binários</u> | | | | |
| <i>matK</i> | 7 | | BINGAMMA | Modelo simples com taxas variáveis |
| <i>matK-trnK</i> | 9 | | | |
| <i>rps4</i> | 5 | | | |
| <i>rps4-trnS</i> | 32 | | | |

Os agrupamentos inferidos a partir das três análises (MP, ML e Bayesiana) foram reportados sobre a árvore ML de melhor *score*. Para cada análise, um determinado valor foi considerado se o suporte *bootstrap* MP (BMP) ou ML (BML) $\geq 50\%$, ou se a probabilidade posterior (PP) $> 0,90$. Agrupamentos fortemente suportados foram definidos por um ponto de corte BMP $\geq 80\%$, BML $\geq 80\%$ e PP $\geq 0,95$. Agrupamentos foram

considerados moderadamente suportados com $BMP \geq 50\%$, $BML \geq 60\%$ e $PP \geq 0,95$. Ramos com valores abaixo destes parâmetros foram considerados de baixo suporte.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas incongruências entre as topologias resultantes da análise individual de cada região de cpDNA. Assim, o conjunto de dados moleculares foi combinado para a análise, totalizando 4408 caracteres dos quais 71 (1,61 %) foram filogeneticamente informativos. Individualmente, a região codificante do gene *matK* foi a mais parcimoniosamente informativa (1,41 %), o que já havia sido observado em estudo anterior (Chauveau *et al.*, 2012). Combinando as cinco regiões (Tabela S1), a análise MP resultou em 498.730 árvores mais parcimoniosas (38 árvores com os *indels* incluídos) com 267 passos (365 passos, considerando os *indels*), $CI = 0,917$ (0,816, contendo *indels*) e $RI = 0,869$ (0,782, incluindo *indels*). A análise Bayesiana resultou em 208.0000 árvores retidas, as quais foram sumarizadas em 50 % da árvore consenso *majority-rule*.

As análises filogenéticas suportaram a monofilia de *Herbertia* ($BMP = BML = 100\%$; $PP = 1,00$), em acordo com a inferência filogenética realizada para Tigrídieae por Chauveau *et al.* (2012). Dois agrupamentos principais são distintos através da análise (Figura 3): o primeiro (chamado de **grupo A**) é constituído por *Herbertia pulchella*, indicada como grupo-irmão das demais *Herbertia* com forte suporte ($BMP = 97,7\%$; $BML = 96,0\%$; $PP = 1,00$). A morfologia floral de *H. pulchella* apresenta algumas características que a distingue das demais: suas tépalas externas são reflexas com uma estria longitudinal mediana e branca; os filetes que compõem a coluna estaminal são livres (Figura suplementar 1) (Roitman e Castillo, 2008; Deble, 2010). O segundo grupo reúne todas as espécies que apresentam os filetes totalmente aderidos ou apenas levemente livres da coluna estaminal (Figura suplementar 1), apresentou baixo valor de suporte ($BMP = 100,00\%$; $BML = 51\%$; $PP < 0,95$) e é dividido em dois agrupamentos menores, o **grupo B** ($BMP = 63,5\%$; $BML = 50\%$; $PP < 0,95$) e o **grupo C** ($BMP < 50\%$; $BML < 50\%$; $PP < 0,95$) (Figura 3).

Internamente no **grupo B** encontram-se *H. darwinii* e *H. quareimana* (Figura 3), espécies ocorrentes na Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul e em áreas adjacentes da Argentina e Uruguai. O tipo fitoecológico predominante nesta região é “Estepe Gramíneo-Lenhosa” (ou Campo Limpo), de estrato vegetacional único constituído por duas sinúcias

(hemicriptófitos e geófitos) com adaptações relacionadas às condições de rigor estival, principalmente quando presentes em solos de arenito, litólicos e pedregosos (IBGE, 2012). Na morfologia floral, as duas espécies compartilham uma afinidade relacionada ao gineceu, ou seja, as divisões secundárias dos ramos do estilete são recurvas (Roitman e Castillo, 2008).

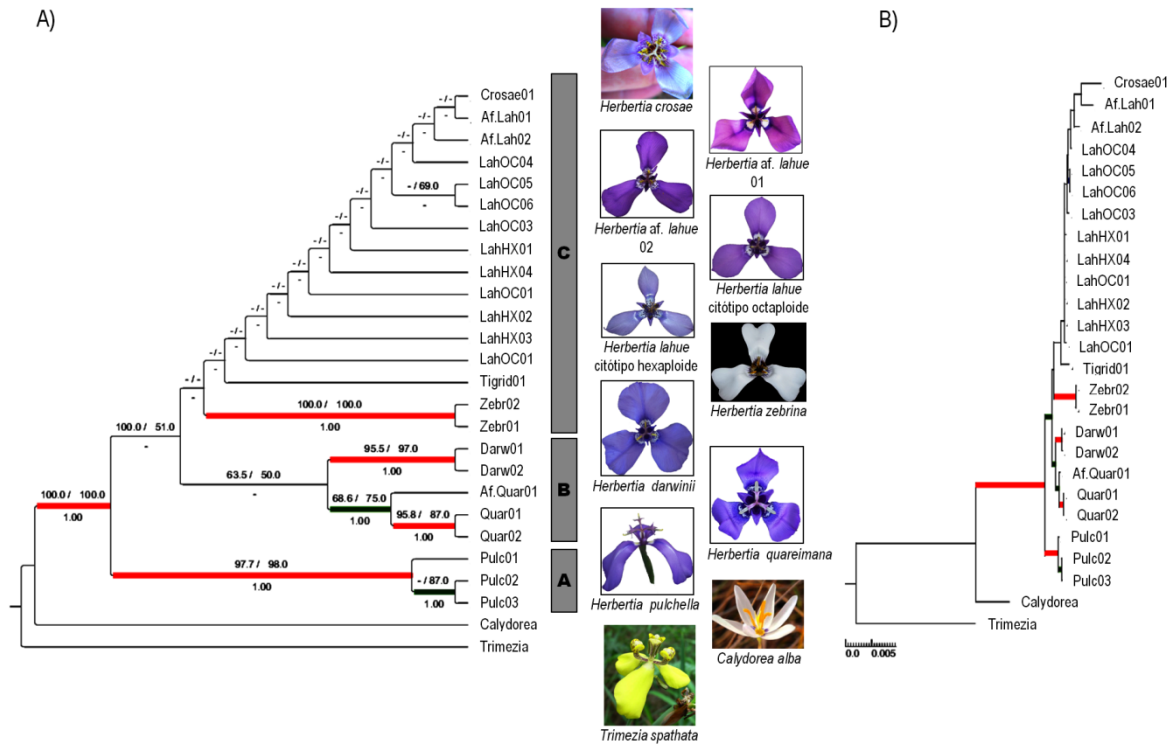


Figura 3. (A) A melhor topologia inferida por Máxima Verossimilhança, obtida a partir de um conjunto de dados combinado de duas regiões codificantes e três regiões não-codificantes de cpDNA, para inferir o relacionamento filogenético entre espécies de *Herbertia*. Valores de suporte aos nós são *bootstrap* por parcimônia (à esquerda, acima dos ramos), *bootstrap* por máxima verossimilhança (à direita, acima dos ramos) e probabilidade posterior Bayesiana (abaixo dos ramos). (B) Filograma obtido por Máxima Verossimilhança. Nos dois esquemas filogenéticos (A e B), ramos em vermelho indicam grupos com forte suporte (BMP ≥ 80%, BML ≥ 80% e PP ≥ 0,95); ramos em verde indicam suporte moderado (BMP ≥ 50%, BML ≥ 60% e PP ≥ 0,95).

O **grupo C** incluiu *Herbertia crosae*, *H. lahue* (e afins), *H. tigridioides* e *H. zebrina* (Figura 3). No caso de *H. zebrina*, o agrupamento formado é fortemente suportado (BMP= BML= 100%; PP= 1,00). Esta espécie é a única entre as demais *Herbertia* com flores brancas e com anteras que não ultrapassam o comprimento das divisões secundárias do estilete (Figura suplementar). Suas populações são endêmicas da Serra do Sudeste (Escudo Sul-Riograndense), com possível ocorrência em apenas três municípios daquela região, ou

seja, Encruzilhada do Sul, Amaral Ferrador e Santana da Boa Vista (Deble, 2010). Esta região é composta por vegetação do tipo “Estepe Arborizada”, em que a vegetação encontra-se distribuída em dois estratos, um formado por árvores de baixo porte ou arbustos (podendo incluir florestas de Galeria), e, o segundo estrato, predominantemente constituído por gramíneas cespitosas (IBGE, 2012). A região do Escudo Sul-Riograndense é formada por um planalto antigo, com solos rasos (com ou sem afloramentos rochosos) ou medianamente profundos (IBGE, 2012). Os processos evolutivos responsáveis pelo restrito endemismo de *H. zebrina* merecem maior esclarecimento. Outra espécie do **grupo C** com forte endemismo é *H. crosae*, restrita ao extremo oeste do Rio Grande do Sul (município de Barra do Quaraí) e ao departamento de Artigas, no Uruguai (Roitman e Castillo, 2004). Caracteristicamente, as flores de *H. crosae* têm uma coluna estaminal com pequenos pêlos vermelhos na base, com função ainda não elucidada (Roitman e Castillo, 2004).

Herbertia lahue apresenta a maior complexidade de relacionamento entre as espécies do **grupo C**. Esta espécie apresenta populações distribuídas por praticamente todas as regiões fitoecológicas do sul do Brasil, além de estar presente em áreas de campo da Argentina, Uruguai e Chile. Embora amostras dos dois citótipos (hexaploides e octaploides) tenham sido incluídas na filogenia, eles não foram discriminados em dois grupos pela filogenia molecular. A morfologia floral difere apenas na forma das tépalas externas e internas, e na maneira com que as anteras curvam-se quando deiscentes: no citótipo hexaploide, elas curvam-se pronunciadamente sobre as divisões do estilete, favorecendo a autopolinização, ao contrário do que ocorre nas flores de plantas do citótipo octaploide. A inferência filogenética sugere através do comprimento dos ramos que o grupo de *H. lahue* encontra-se em processo de diversificação, possivelmente com recentes eventos de hibridação entre citótipos. Os dois taxons descritos como afins a *H. lahue* apresentam algumas diferenças morfométricas no gineceu e na coluna estaminal que os distingue. Entretanto, o baixo suporte estimado sugere que a variação morfológica observada pode ser um produto de isolamento geográfico entre as populações levando à divergência incompleta.

De uma forma geral, os três grupos inferidos pela filogenia apresentaram algumas características morfológicas que podem ser associadas a um ou outro grupo. Outras particularidades menos conspícuas também podem ser combinadas de forma a prover um panorama explicativo dos relacionamentos inferidos aqui. Ferramentas de biologia

molecular foram utilizadas para inferir parâmetros de genética de populações e experimentos de polinização manual foram realizados para definir o sistema reprodutivo de quatro (*Herbertia darwinii*, *H. lahue*, *H. pulchella* e *H. quareimana*) das sete espécies de *Herbertia* (vide Capítulos III e IV para maior detalhamento).

As análises moleculares através de marcadores dominantes ISSR (*intersimple sequence repeat*) indicaram que forte diferenciação genética entre populações parece ser uma tendência nas espécies analisadas (Tabela 5). Restrito fluxo gênico entre populações pode ser produto de uma combinação de características que aumenta a diferenciação genética, incluindo restrições à presença de polinizadores ao longo da distribuição geográfica da espécie e/ou mecanismos que reduzem a dispersão de sementes (Givnish, 2010). No caso das espécies analisadas, diferentes tipos de polinizadores foram identificados, incluindo insetos que apresentam distância de vôo curta [sirfídeos (Diptera), no caso de *H. lahue*] e diferentes abelhas (coletoras de pólen e de óleos florais). O mecanismo de dispersão de sementes de Iridaceae, conhecido como barocoria (Goldblatt e Manning, 2008), proporciona disseminação de sementes a curtas distâncias. Já foi demonstrado que estimativas de diferenciação genética (por exemplo, o índice de fixação F_{ST}) são muito influenciáveis pela combinação de sistema reprodutivo e modo de dispersão de sementes, sendo maiores no caso de espécies autógamas que exibem barocoria (Hamrick e Godt, 1996; Nybom, 2004; Givnish, 2010). Outros estudos com Iridaceae que envolveram genética de populações também evidenciaram forte diferenciação genética entre populações (Artyukova *et al.*, 2001; Arafah *et al.*, 2002; Wróblewska *et al.*, 2003; Saad and Mahy, 2009; Beiki *et al.*, 2010; Tacuatiá *et al.*, 2012)

Herbertia lahue (**grupo C**) é a espécie com populações mais diferenciadas ($F_{ST}= 0,962$ em populações hexaploides; $F_{ST}= 0,779$ em populações octaploides) (Tabela 5). A espécie apresenta um sistema reprodutivo misto com alta taxa de sementes produzidas por autofecundação (Tabela 5). Adicionalmente, a autogamia espontânea também é possível. Assim, a ausência de polinizadores não constitui em barreira para efetivar a reprodução (Brunet and Sweet, 2006). Essa combinação de características de história da vida, juntamente com deriva genética, flutuações no tamanho efetivo das populações ou seleção, podem resultar em baixa diversidade genética e em aumento da divergência entre populações (Hamrick e Godt, 1996; Nybom, 2004). Comparativamente, as espécies que compõem o **grupo B**, *H. darwinii* e *H. quareimana*, também têm sistema reprodutivo

misto, porém a taxa de sementes produzidas através de autopolinização é bastante inferior (18,6 % em *H. darwinii*; 12,2 % em *H. quareimana*) e autogamia espontânea não acontece (Tabela 5). Os níveis de diversidade genética inferidos para ambas as espécies são altos ($H_S = 0,295$ – em *H. darwinii*; $H_S = 0,243$ – em *H. quareimana*), sendo mais compatíveis com o esperado para espécies de polinização cruzada (Nybom, 2004). A única espécie amostrada totalmente autoincompatível é *H. pulchella* (Tabela 5), inferida pela filogenia molecular dentro do **grupo A**.

Tabela 5. Agrupamentos inferidos para espécies de *Herbertia* através de distintas abordagens filogenéticas (Figura 3), relacionados com o sistema de cruzamento e com parâmetros de genética de populações. Parâmetros intrapopulacionais estimados: porcentagem de locos polimórficos (PLP); diversidade genética de Nei (H_S). A diferenciação genética entre populações é dada pelo índice de fixação proposto por Wright (F_{ST}).

| Espécie | Agrupamento inferido | Sistema de cruzamento | ⁽¹⁾ Média de sementes (\pm SE) | ⁽²⁾ Média de sementes (\pm SE) | PLP | H_S | F_{ST} |
|---|----------------------|-----------------------|--|--|-------|-------|----------|
| <i>Herbertia pulchella</i> | A | Polinização cruzada | 0,0 | 0,0 | 67,42 | 0,260 | 0,285 |
| <i>Herbertia darwinii</i> | B | Misto | 18,6 (\pm 11,5) | 0,0 | 76,04 | 0,295 | 0,303 |
| <i>Herbertia quareimana</i> | B | Misto | 12,2 (\pm 2,4) | 0,0 | 63,35 | 0,243 | 0,341 |
| <i>Herbertia lahue</i> citótipo hexaploide | C | Misto | 42,5 (\pm 23,3) | 24,5 (\pm 16,1) | 10,05 | 0,037 | 0,962 |
| <i>Herbertia lahue</i> citótipo octaploide | C | Misto | 90,8 (\pm 46,7) | 64,2 (\pm 52,3) | 24,25 | 0,094 | 0,779 |

Notas: ⁽¹⁾ Experimentos de autopolinização manual; ⁽²⁾ Experimentos de autopolinização espontânea.

O sistema de cruzamento foi inferido através de experimentos de polinização manual. Os parâmetros de genética de populações foram estabelecidos por meio de análise com marcadores dominantes neutros ISSR (*intersimple sequence repeat*). Maiores explicações sobre os procedimentos são dados nos capítulos III e IV da tese.

Evolutivamente, a aquisição da autogamia tem influência na evolução floral, por afetar a alocação de recurso sexual (Barret e Harder, 1996), afastando as populações sujeitas à autogamia do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Relacionando com estimativas de diferenciação genética, normalmente maiores valores de F_{ST} são observados em espécies endogâmicas, principalmente porque nelas é esperado menor tamanho efetivo populacional em relação às espécies de polinização cruzada (Hamrick e Godt, 1996; Ingvarsson, 2002).

Em todos os casos analisados acima, as matrizes genéticas não foram correlacionadas significativamente com as distâncias geográficas (Capítulos III e IV), sugerindo que os fatores reprodutivos exercem grande influência na evolução de espécies

de *Herbertia*. Combinando as informações obtidas pelas análises apresentadas com a inferência filogenética produzida pela análise de regiões codificantes e não-codificantes de cpDNA, pode-se sugerir uma evolução a partir da alogamia, verificada na espécie mais basal *H. pulchella* (**grupo A**), em direção ao relaxamento dos mecanismos de autoincompatibilidade, levando à autocompatibilidade (verificada em diferente intensidade nas espécies amostradas dos **grupos B e C**), em que progênie resultante de autopolinização é possível. Inclusive, em *H. lahue* (**grupo C**) autogamia espontânea é possível. Nas iridáceas sul-africanas, a polinização cruzada é favorecida pela presença de sistema de autoincompatibilidade e pela hercogamia (Bernhardt e Goldblatt, 2000), mas alguns cladogramas apresentam transições da alogamia para a autogamia. Isso é evidente em alguns gêneros de Crocoideae, ou seja, *Babiana* Ker Gawl. ex Sims (De Waal *et al.*, 2012), *Hesperantha* Ker Gawl. (Goldblatt *et al.*, 2004), *Ixia* L. (Goldblatt *et al.*, 2000), *Lapeirousia* Pourr. (Goldblatt *et al.*, 1995), *Melasmaerula* Ker Gawl. (Goldblatt *et al.*, 2005) e *Sparaxis* Ker Gawl (Goldblatt *et al.*, 2000). Em Iridoideae, *Iris* L. e *Moraea* Mill. (Irideae) também incluem algumas espécies autocompatíveis (Goldblatt e Bernhardt, 1999; Hannan e Orick, 2000; Cornman e Arnold, 2007).

Tendo em vista que a melhor árvore ML inferida apresentou alguns valores de suporte que variaram de moderado a baixo (BMP ou BML < 50 %; PP < 0,95), indicando grupos menos consistentes, outras questões deveriam ser esclarecidas. A origem dos poliploides (se auto ou aloploiploides) em *Herbertia* ainda é incerta e eventos de hibridação não são esclarecidos. O fluxo gênico entre espécies via introgressão também é comum em plantas e, somado à hibridação, podem causar ruído no sinal filogenético (Russell *et al.*, 2010). Dada à natureza uniparental do genoma plastidial, o sinal de evento de reticulação é mascarado. Assim, é necessário acrescentar à filogenia de *Herbertia* sequências de DNA nuclear, que possuem herança biparental, a fim de comparar as árvores filogenéticas obtidas pela análise das duas regiões de DNA. A ocorrência de incongruências comparando as árvores pode ser interpretada como um sinal de hibridação interespecífica (Russell *et al.*, 2010).

4. CONCLUSÃO

O presente estudo contribuiu com as primeiras informações sobre o relacionamento entre espécies de *Herbertia*, inferido através da análise filogenética de regiões codificantes

e não-codificantes do DNA plastidial. De acordo com a inferência filogenética, *Herbertia* é monofilética, com alto valor de suporte. Internamente, o suporte aos ramos variou de baixo a moderado em vários grupos formados, sugerindo possíveis eventos de reticulação. Mesmo assim, sistema reprodutivo e parâmetros de genética de populações puderam ser relacionados aos três grupos inferidos pela filogenia, indicando que alogamia ou autogamia tem influência nos processos de diversificação de *Herbertia*. A presença de reticulação deve ser investigada nas espécies deste grupo, visto que a sua ocorrência, pode causar mudanças genômicas em larga escala que afetam múltiplos genes, produzindo ruído no sinal filogenético inferido a partir da análise de genomas de herança uniparental.

TABELA S1. Comparação dos índices e comprimentos para a árvore de consenso estrito resultante da análise de parcimônia utilizando conjunto de dados em separado e combinado de duas regiões codificantes e três não codificantes de cpDNA, para inferir o relacionamento filogenético entre espécies de *Herbertia*.

| Partição dos dados | Caracteres (DNA) | Indels | Caracteres variáveis (%) | Caracteres parcimoniosamente informativos (%) | Árvores mais parcimoniosas (+ <i>indels</i>) | Comprimento (+ <i>indels</i>) | Índice de consistência (+ <i>indels</i>) | Índice de Retenção (+ <i>indels</i>) |
|--|------------------|--------|--------------------------|---|---|--------------------------------|---|---------------------------------------|
| <u>Matriz combinada</u> | 4408 | 53 | 239 (5,42 %) | 71 (1,61) | 498730 (38) | 267 (365) | 0,917 (0,816) | 0,869 (0,782) |
| <u>Região <i>matK</i> codificante e <i>matK-trnK</i> intron</u> | | | | | | | | |
| <i>matK</i> | 1561 | 7 | 88 (5,64 %) | 22 (1,41 %) | 30 (30) | 100 (100) | 0,900 (0,900) | 0,843 (0,844) |
| <i>matK-trnK</i> | 270 | 9 | 14 (5,19 %) | 3 (1,11 %) | 3 (60) | 14 (24) | 1,000 (0,958) | 1,000 (0,941) |
| <u>Região <i>rps4</i> codificante e espaçador intergênico <i>rps4-trnS</i></u> | | | | | | | | |
| <i>rps4</i> | 606 | 0 | 22 (3,63 %) | 8 (1,32 %) | 126 (0) | 23 (0) | 0,957 (0) | 0,929 (0) |
| <i>rps4-trnS</i> | 322 | 5 | 26 (8,07 %) | 5 (1,55 %) | 2 (3) | 26 (31) | 1,000 (1,000) | 1,000 (1,000) |
| <u>Espaçador intergênico <i>trnQ-rps16</i></u> | | | | | | | | |
| <i>trnQ-rps16</i> | 1649 | 32 | 89 (5,40 %) | 29 (1,76 %) | 2 (9) | 99 (140) | 0,939 (0,886) | 0,927 (0,890) |

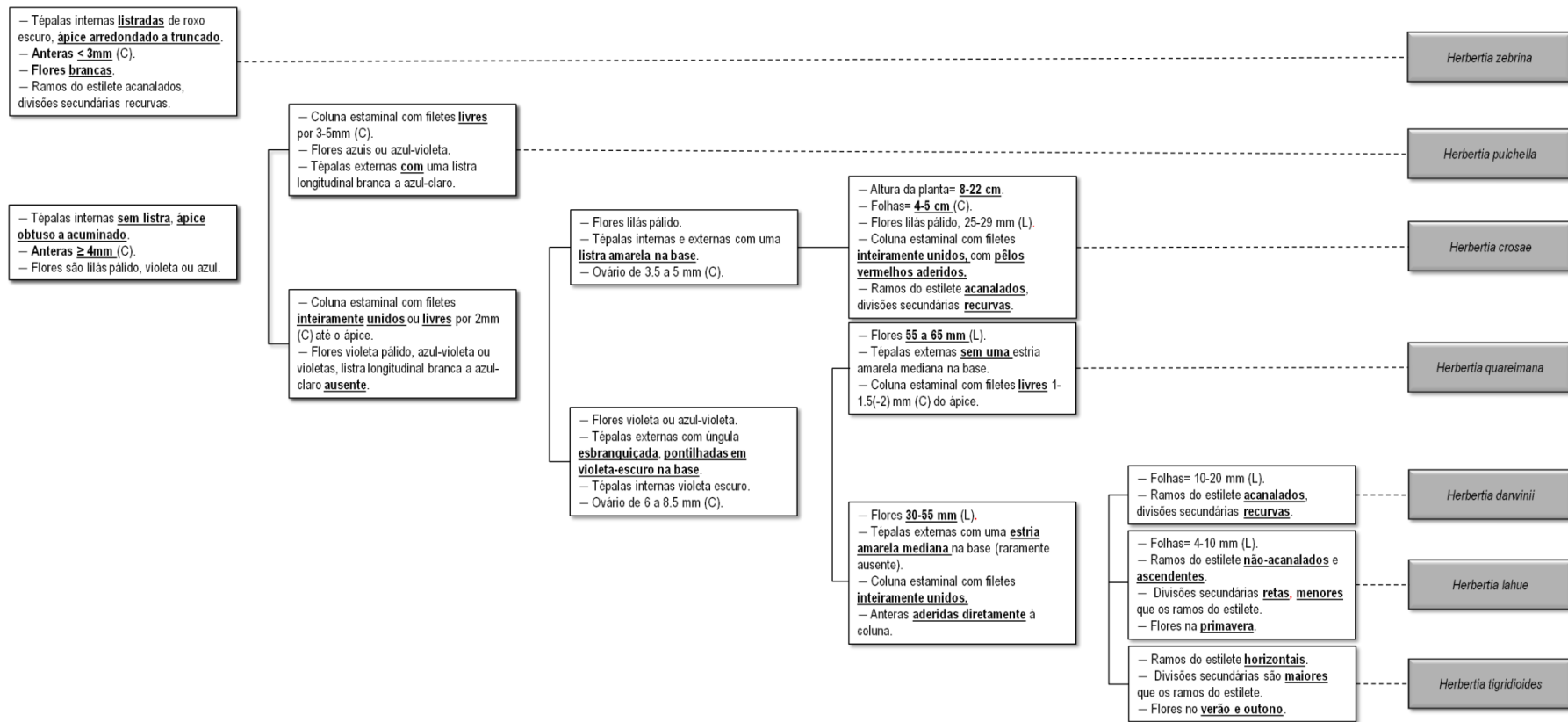
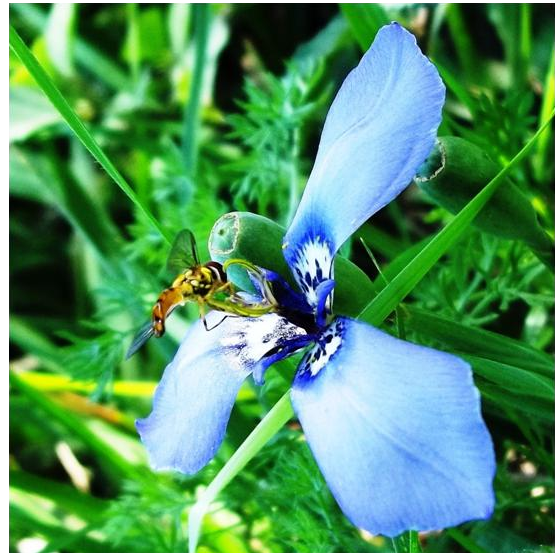


FIGURA SUPLEMENTAR

Figura Suplementar. Esquema contendo as principais características utilizadas para a distinção de espécies de *Herbertia*. As diferenças estão realçadas em negrito. O comprimento e a largura de diferentes estruturas são dados por (C) e (L), respectivamente. Adaptado de Roitman e Castillo (2004 e 2008); Deble (2010).

CAPÍTULO III

THE BREEDING SYSTEM AND GENETIC DIVERSITY OF POPULATIONS OF *HERBERTIA LAHUE* (IRIDACEAE) DISPLAYING DIFFERENT PLOIDY LEVELS AND MORPHOLOGIES



Herbertia lahue apresenta relacionamento complexo entre diferentes com leve variação da morfologia floral. Geneticamente, as populações hexaploides e octaploides são pouco diversas e muito diferenciadas, o que se relaciona principalmente com o sistema reprodutivo misto e altas taxas de sementes produzidas por autofecundação. A autogamia espontânea também é possível em *Herbertia lahue*.

**THE BREEDING SYSTEM AND GENETIC DIVERSITY OF POPULATIONS OF
HERBERTIA LAHUE (IRIDACEAE) DISPLAYING DIFFERENT PLOIDY LEVELS AND
MORPHOLOGIES**

Manuscrito submetido ao periódico *American Journal of Botany*.

Eudes Maria Stiehl-Alves¹, Alice Flores, Juliana Heck, Adriano Silvério², Lilian Eggers², Eliane Kaltchuk dos Santos¹, Jorge Ernesto de Araújo Mariath², Tatiana Teixeira de Souza-Chies^{1,2}.

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Eudes Maria Stiehl-Alves held the sampling and identification of plant material, the laboratory work, analysis and writing of the article. Alice Flores helped in the laboratory work. Juliana Heck performed measurements of the flowers. Adriano Silvério and Jorge Ernesto de Araújo Mariath performed the analysis of the gynoecium anatomy, and helped in the reviewing of the manuscript. Lilian Eggers proceeded to the collect, sample identification and manuscript revision. Eliane Kaltchuk dos Santos performed the characterization of the cytotypes and manuscript revision. Tatiana Teixeira de Souza-Chies conceived the project and participated in the writing of the manuscript.

ABSTRACT

- *Premise of the study*—*Herbertia lahue* is a perennial species distributed in South American grasslands. Parapatric or mixed populations of hexaploid and octoploid cytotypes are common. The mating system remains unknown and no population genetic estimates have been calculated. Although tepal shape varies between the cytotypes, it is unclear whether morphometric variation is adequate to allow discrimination of the cytotypes. The present study describes the breeding system of *H. lahue* and its relationship with genetic diversity in various populations. Relationships between cytotypes also were examined using molecular and morphological analyses.
- *Methods*—The breeding system and possible agamospermy were investigated by conducting hand-pollination experiments and anatomical analysis of gynoecia. ISSR analyses were employed to infer genetic parameters. Flower morphometric variation between cytotypes was also investigated to define the cytotypic relationship.
- *Key results*—A mixed breeding system with no apomixis was evident in both cytotypes. Genetically, hexaploid populations were less diverse ($H_E = 10.053$) than were octoploids ($H_E = 24.259$). Populations were genetically differentiated ($F_{ST} = 0.870$), despite the fact that distance isolation was not statistically significant. Morphologically, cluster analysis allowed slight distinctions between cytotypes to be noted, but no correlation between molecular and morphological variation was evident.
- *Conclusions*—This is the first report to describe the genetic parameters and breeding systems of *H. lahue* populations that differ in terms of ploidy. The ISSR data likely reflect the mating system and ongoing narrow gene flow. The cytotypes did not show molecular or morphological differentiation.

Key words: autonomous selfing; cytotypes; floral morphometry; gene flow; ISSR analysis; polyploidy; population genetics.

1. INTRODUCTION

The importance of polyploidy as a force driving evolution of plant adaptation has been shown over many years of research on various plant species. Different selective

pressures imposed by heterogeneous landscapes can cause diversification of ploidy levels among parapatric populations. Under such circumstances, factors promoting narrow gene flow, including morphological differentiation among cytotypes, may cause reproductive isolation to develop (Perny et al., 2005; Spaniel et al., 2008; Marhold et al., 2010; Fehlberg and Ferguson, 2012).

The evolutionary significance of polyploidal events has been well documented in the Iridaceae (Asparagales) (Kenton and Heywood, 1984; Goldblatt and Takei, 1997; Sanmartín and Ronquist, 2004; Goldblatt and Manning, 2008). The Iridaceae include approximately 2,000 species (in 65–70 genera) and are widely distributed across all continents. In the New World, all species belong to the Iridoideae (Goldblatt et al., 2008). The taxonomy of the Tigridieae (Iridoideae) is complicated, principally because of great variation in floral morphology, presumably caused by shifts in pollination syndromes (Rodríguez and Sytsma, 2006; Goldblatt et al., 2008; Goldblatt and Manning, 2008). Such events have been described principally in Old World Iridaceae. Studies of the Iridaceae have found positive relationships between the extent of diversity in pollination mechanisms and species diversity per se (Bernhardt and Goldblatt, 2000; Goldblatt and Manning, 2006). The Tigridieae do indeed use a variety of pollination mechanisms, although the great variation found in this group suggests that rapid floral radiations were accompanied by shifts among pollinating systems. Further, no genetic studies have yet been performed on the Tigridieae. In recent years, however, our understanding of cytogenetic and phylogenetic relationships within the tribe has increased (Kenton and Heywood, 1984; Goldblatt and Takei, 1997; Reeves et al., 2001; Rodríguez and Sytsma, 2006; Goldblatt et al., 2008; Goldblatt and Manning, 2008; Alves et al., 2011; Chauveau et al., 2012; Tacuatiá et al., 2012, and others).

Herbertia Sweet is a small genus of the Tigridieae, containing seven species that are perennial, herbaceous, and bulbous; with actinomorphic, perfect, fugacious flowers (Goldblatt and Manning, 2008). The vegetative morphology of *Herbertia* is uniform and the leaves are plicate, simple, and basal (Goldblatt et al., 1998; Goldblatt and Manning, 2008). Floral morphology varies markedly. After flowering, the leaves dry out, leaving underground bulbs that ensure species continuity in areas of occurrence (Goldblatt and Manning, 2008). The fruits are capsules containing small seeds that are dispersed by barochory (Goldblatt et al., 1998; Goldblatt and Manning, 2008). *Herbertia* is an

interesting subject for studies of Tigridae evolution because the various species differ in terms of their geographical distribution across grasslands in southern Brazil, Argentina, Uruguay, and Chile (Goldblatt and Manning, 2008).

In the present study, we focus on *Herbertia lahue* (Molina) Goldblatt, the only *Herbertia* that is widely distributed. This species occurs as hexaploid or octoploid populations, either parapatric or mixed in terms of distribution (Kenton and Heywood, 1984; Goldblatt and Takei, 1997; Moreno et al., 2009). The mating system is an important aspect of the life history of any plant and has a significant effect on genetic diversity (Nybom, 2004). The mating system of *H. lahue* is unknown and information on genetic parameters is lacking. Apart from cytotypic variation, the tepal shape also varies, and this may or may not be cytotype-specific. It remains unclear whether floral morphometric variation would enable the cytotypes to be distinguished. *H. lahue* populations can be found in grassland areas throughout southernmost Brazil, although natural populations are less frequent in heavily cropped areas.

Meta-analyses have revealed that species that are widely dispersed geographically and that demonstrate only a narrow form of seed dispersal (i.e., barochory) tend to exhibit less genetic diversity within populations and higher genetic divergence among populations (Hamrick and Godt, 1996; Nybom, 2004). These are crucial aspects of colonization in species occupying habitats embedded in heterogeneous landscapes, because a founder effect or a “bottleneck” can enhance loss of genetic diversity (Husband and Barrett, 1991; Amsellem et al., 2000; Pannell and Dorken, 2006). This applies not only to species that occupy new habitats during expansion, but also to persistence of a metapopulation. Local extinctions are balanced by colonization of habitats available in other parts of the region (Pannell and Dorken, 2006). The open fields of southern Brazil are characterized by the presence of several phytoecological regions (IBGE, 2012) that establish environmental gradients encouraging diversification.

In an effort to understand the relationship between *Herbertia lahue* cytotypes, we performed a combination of analyses. We examined quantitative characteristics of the flowers, performed genetic-neutral Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) analysis, and defined the mating system. Specifically we sought to answer the following questions: (1) What is the impact of the breeding system on the genetic diversity of the *H. lahue* hexaploid and octoploid cytotypes? (2) Can estimated genetic parameters suggest the

presence of asexual reproduction? (3) To what extent were the populations analyzed herein genetically differentiated? (4) Would consideration of a combination of floral morphometry and genetic variation allow the cytotypes to be distinguished? The answers would provide new information on the relationship between intraspecific variation and genetic structure, allowing evolution of the Tigridieae to be further explored.

2. MATERIALS AND METHODS

Sampling and study sites— We sampled 13 populations distributed throughout the State of Rio Grande do Sul, Brazil (Fig 1). Voucher specimens were deposited in the ICN Herbarium, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. All samples were collected in areas of natural grassland from 2009 to 2011. Sampling included almost all phytocological regions of Rio Grande do Sul, except for areas of intensive cultivation located in the northeast and northwest of the state. All populations were defined as hexaploid (HX) or octaploid (OC) by determination of chromosome number (Kaltchuk dos Santos *et al.*, in prep.).

Breeding system analyses— To define the breeding system of *Herbertia lahue*, we conducted controlled hand-pollination experiments *ex situ* using plants of the two cytotypes. Four treatments were employed, as follows: (1) Hand cross-pollination: Emasculated flowers were pollinated with a fresh pollen mixture collected from chosen plants and bagged with fine mesh. (2) Hand self-pollination: Emasculated flowers were pollinated with their own pollen and bagged. (3) Spontaneous self-pollination: Non-emasculated flowers were bagged to exclude visits by pollinators. (4) Agamospermy: Flowers of each cytotype were emasculated and bagged. All analysis employed a non-parametric Kruskal–Wallis procedure followed by application of the Dunn Test seeking error levels at 5% probability or below. The PAST 2.15 software (Hammer *et al.*, 2001) was used to this end. Reproductive isolation of the two cytotypes was not explored.

Anatomical analysis of gynoecia— Anatomical analysis of the gynoecia of hexaploid and octoploid plants was performed to assess embryo sac formation and early embryonic stages. Ovaries at pre-anthesis were fixed in 1% (w/v) glutaraldehyde and 4% (v/v) formaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2 (McDowell and Trump, 1976); dehydrated in a series of increasingly ethanolic baths; and embedded in hydroxyethylmethacrylate (Gerrits and Smid, 1983). Sections 5 μm in thickness were

obtained using a Leica microtome (RM2265), stained with Toluidine blue (0.05% w/v; pH 4.4) (Feder and O'Brien, 1968), and observed using a Leica® DMR-HC microscope. Anatomical illustrations were made from photomicrographs captured using a DFC500 camera.

DNA extraction and amplification of ISSR markers— Leaves were collected from individual plants growing not less than 5 m apart at each sampling site and dried using silica gel. A modification of the cetyl trimethylammonium bromide method (Doyle and Doyle, 1987) was used to isolate DNA, which was stored at -20°C prior to analysis. Seven ISSR primers that yielded consistent profiles across all populations were used. Primer sequences, the numbers of fragments yielded by each primer, and the sizes of amplified fragments, are shown in Appendix S1. PCR was carried out in 25 μL reactions using: 1 X Buffer; 2.4 mM MgCl_2 ; 1.6 mM dNTP mixture (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil); 0.4 mM of each primer (Integrated DNA Technologies / IDT); 1 U *Taq* DNA polymerase (CenBiot, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil); and 20–30 ng of genomic DNA. Amplification reactions were carried out in a thermocycler (Veriti 96 Well Thermal Cycle, Applied Biosystems), using the following program: 94°C for 5 min (1 cycle); 94°C for 1 s followed by annealing at 48°C for 45 s and elongation at 72°C for 2 min (40 cycles); and a final extension at 72°C for 5 min. The PCR products were stained with GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA), applied in 1.5% agarose gel. Electrophoresis was performed in 0.5 X Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer (pH 8.0) at 85 V for 2 – 2.5 h. The electronic image of the agarose gel was captured and documented using the Bio-Rad Molecular Imager® Gel Doc™ XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA). Bands were scored manually. The consistency of the band system was verified and bands/loci appearing in at least two replicates were considered present. Molecular weights were assigned to each band using a 100 bp ladder as reference. Each ISSR band (= fragments) was scored as “1” for presence and “0” for absence. Bands whose sizes were within 10 bp of each other were merged to account for any potential band migration discrepancies.

Genetic analyses—The binary ISSR dataset was analyzed in various ways to estimate relevant coefficients and indices of genetic diversity. GENALEX 6.5 (Peakall and Smouse, 2006) was employed to estimate the proportion of polymorphic loci (P). Nei's gene diversity parameter [in GENALEX, H_s is equivalent to the average expected

heterozygosity (H_e)] and Shannon's index (I) were also calculated. This algorithm assumes that Hardy–Weinberg equilibrium is in play and estimates allele frequencies (assuming that allele frequency is equal to fragment frequency), and uses the Lynch and Milligan (1994) method for correction of bias caused by the dominant nature of ISSR data. The data are used for correction of bias caused by the dominant nature of ISSR information. ARLEQUIN 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) was used to conduct an analysis of molecular variance (AMOVA) to infer population genetic structure and differentiation. In this approach, the ISSR phenotypes are treated as if they were data derived via analysis of haploid restriction fragment length polymorphisms, to compensate for the dominant nature of ISSR markers (assuming that all sites were fully linked, thus without recombination). Pairwise squared Euclidean distances between haplotypes were calculated to estimate F -statistics.

Using a non-parametric test implemented in GENALEX 6.5, we searched for correlations between the pairwise genetic and geographic distance matrices. Mantel testing was rendered robust by generating 999 permutations. To examine genetic variation, samples were divided into those of the two cytotypes, as were populations. In this manner, three groups were defined: (A) all *H. lahue* hexaploid and octoploid populations (13 in number); (B) all three hexaploid populations; and, (C) all ten octoploid populations.

In comparative testing, HICKORY version 1.1 (Holsinger and Lewis, 2003) was used to estimate Nei's (1973) average expected panmictic heterozygosity values (the H_S parameters) and the extent of genetic differentiation [Θ_I and Θ_{II} , comparable, respectively, to Wright's F_{ST} and Weir's and Cockerham (1984) F_{ST} , under default conditions). We also calculated f -values (estimates of F_{IS} , the within- population fixation index). Given the dominant nature of neutral ISSR markers, we conducted the HICKORY estimations using an f -free model (Holsinger and Lewis, 2003). Thus, calculation of Θ distributions is performed in the absence of f estimation bias (f values were randomly chosen from other numbers generated during the Markov Chain Monte Carlo [MCMC] process).

Different comparative strategies were used to verify the consistencies of hexaploid and octoploid genetic groups. PHYLIP (Felsenstein, 2004) was used to construct a phenogram from the matrix of similarity, using a neighbor-joining algorithm. The matrix of pairwise genetic distances was used to define population groups, with the aid of the Principal Coordinates Analysis (PCoA) feature of GENALEX 6.5.

Floral morphometric analyses— We examined the extent of variation in several morphological characters of flowers because these could potentially allow the two cytotypes to be distinguished. In the field, flowers of the two cytotypes can be distinguished principally by the shape of the outer and inner tepals (Fig. S1). Plants of the two cytotypes are similar in vegetative aspects. A total of 11 floral characters were examined. Flowers were collected from five populations (two hexaploid and three octoploid) and preserved in ethanol: glycerol solution (7: 3, v/v) prior to analysis. In the laboratory, the flowers were dissected and floral structures fixed onto transparent slides. Following dehydration, at least 10 flowers per population were analyzed. The non-parametric Kruskal–Wallis procedure of PAST 2.15 (Hammer et al., 2001) was used to test the statistical significance of observed morphometric differences. The Dunn test (at a *P*-value of 5%) was run when it was necessary to determine the significance of a difference among the mean values of morphometric analyses. The morphometric data were transformed into a Euclidean distance matrix, which was used to determine whether it was possible to distinguish the cytotypes morphologically. Two clustering methods implemented in PAST were exploited to this end. These were clustering analysis using Ward’s method (1963) and PCoA. GENALEX 6.5 (Peakall and Smouse, 2006) was used to seek correlations between the pairwise Nei’s genetic distance matrix (derived using ISSR data) and the Euclidean distance matrix (derived using morphometric data). Mantel testing was used to this end and significance was assured by the running of 999 permutations.

3. RESULTS

Breeding system and anatomical analysis of the gynoecium—No significant difference among the outcomes of manual cross-pollination and manual self-pollination were noted in octoploid individuals (Table 1). However, the average seed set by hexaploid plants differed significantly according to treatment (Table 1). We found that both cross-pollination and selfing were possible, and anatomical analysis of the gynoecium yielded no evidence of apomixes (Fig. 2A). The ovule is bitegmic and the nucellus poorly developed (thus with but a few layers of cells). The female gametophyte is completely formed at the pre-anthesis stage. The chalazal pole consists of three antipodal cells in a triangular arrangement. The central cell is the principal cell of the gametophyte. The cytoplasm has numerous vacuoles distributed regularly throughout the cell. Cytoplasmic strands are

visible in the gametophyte and a secondary nucleus is medially positioned (Fig. 2A). The micropylar region presents as two synergids and a well-developed filiform apparatus is located in the apical portion (Fig. 2B–2C). The egg cell is positioned laterally and contains a large vacuole (Fig. 2C). The nucleus is positioned in the inner region and lies beside the central cell. After anthesis, fertilization is of the porogamic type. The pollen tube extends through the micropyle and cell remnants from the synergids may be noted in the lateral region of the embryo (Fig. 2 D, E and F). On the fourth day after pollination the zygote is composed of basal and apical cells and a globular embryo develops by day 10 (Fig. 2 E and 2 F).

TABLE 1. Seed set mean (and standart error), number of fruits setting seeds (and success rate) and number of flowers handled, obtained from hand-pollination experiments conducted in *Herbertia lahue* hexaploid and octoploid plants. Different letters reveal significant differences ($P < 0.001$) by Dunn Test at 5%.

| Treatment | Hexaploid data set | | | | |
|------------------------------|---------------------------|--------|--------------------------|--------|----|
| | Seed set mean (\pm SE) | | Fruits setting seeds (%) | | N |
| Hand cross-pollination | 53.7 ^a | (33.7) | 44 | (89.8) | 49 |
| Hand self-pollination | 42.5 ^a | (23.3) | 22 | (73.3) | 30 |
| Spontaneous self-pollination | 24.5 ^b | (16.1) | 18 | (39.1) | 46 |
| Agamospermy | 0.00 ^a | — | 0 | — | |
| Treatment | Octoploid data set | | | | |
| | Seed set mean (\pm SE) | | Fruits setting seeds (%) | | N |
| Hand cross-pollination | 89.9 ^a | (36.4) | 14 | (93.3) | 15 |
| Hand self-pollination | 90.8 ^a | (46.7) | 25 | (89.3) | 28 |
| Spontaneous self-pollination | 64.2 ^a | (52.3) | 19 | (59.4) | 32 |
| Agamospermy | 0.00 ^a | — | 0 | — | |

Genetic Analyses—Seven ISSR primers used to amplify DNA from 13 *H. lahue* populations yielded 112 clearly identifiable bands ranging in size from 300 to 2,080 bp. The average number of ISSR fragments was 5.8–8.6 per primer (Appendix S1). Calculation of intrapopulation genetic diversity revealed low-level diversity in all populations studied ($P = 19.368$; $H_e = 0.075$; $I = 0.108$), both hexaploid ($P = 10.053$; $H_e = 0.037$; $I = 0.054$) and octoploid ($P = 24.259$; $H_e = 0.094$; $I = 0.136$) *H. lahue* populations

(Table 2). Bayesian estimates of average expected panmictic heterozygosity values (H_S parameters) in all sampled populations yielded results similar to those obtained by estimation of fragment frequency. This was true not only when all 13 populations were analyzed together ($H_S= 0.075$) but also when the hexaploid ($H_S= 0.039$) as octoploid populations ($H_S= 0.094$) were analyzed separately (Table 2). Mean estimates of fixation indices using the dominant ISSR dataset (under f -free modeling) revealed little variation when all 13 populations were analyzed together ($f= 0.500$) and also when the hexaploid ($f= 0.508$, range= 0.494–0.504) and octoploid populations ($f= 0.500$, range= 0.496–0.510) were analyzed separately (Table 2).

Estimates of genetic differentiation indicated that the populations were highly differentiated both when all 13 populations were analyzed together ($F_{ST}= 0.870$, $F_{SC}= 0.845$) and also when the hexaploid ($F_{ST}= 0.962$) and octoploid populations ($F_{ST}= 0.779$) were analyzed separately (Table 3). The extent of genetic differentiation between hexaploids and octoploids was moderate ($F_{CT}= 0.159$) (Table 3). The Θ_I and Θ_{II} values derived using the f -free model (Table 3) were slightly lower than the F_{ST} values for all 13 populations ($\Theta_I= 0.788$; $\Theta_{II}= 0.779$) and also for the hexaploid ($\Theta_I= 0.841$; $\Theta_{II}= 0.840$) and octoploid populations ($\Theta_{II}= 0.773$; $\Theta_{II}= 0.762$) considered individually.

The AMOVA data showed that much of the observed variation was attributable to differences among populations within groups (i.e., cytotypes) when all 13 populations were analyzed together (71.08 %) and also when the hexaploid and octoploid populations were analyzed separately (96.23 % and 77.94 %, respectively). Thus, few differences existed within populations (considering all populations= 13.00 %; hexaploid populations= 3.77 %; octoploid populations= 22.06 %) or among cytotypes (15.92 %) (Table 4). Mantel testing detected no significant correlation between genetic and geographic distance when all populations were analyzed together ($r= 0.24$; $P= 0.144$) and also when the hexaploid ($r= 0.75$; $P= 0.44$) and octoploid populations ($r= 0.39$; $P= 0.06$) were examined separately.

TABLE 2. Detailed sampling information for all thirteen *Herbertia lahue* populations collected in Rio Grande do Sul State, south Brazil. Number of sampled individuals for 112 ISSR fragments (N), percentage of polymorphic loci (PLP), average expected heterozygosity (H_e , analogous to H_s Nei's gene diversity), and Shannon's index (I) were all performed in GENALEX. Nei's average expected panmictic heterozygosity (H_s) and fixation index within populations (f) were estimated at HICKORY (sob F - Free model). Abbreviations after vouchers correspond to the labels in Fig. 1.

| Voucher | Elevation (m) | Lat | Long | Location | N | PLP | H_e | I | H_s | f |
|--|---------------|---------|---------|-----------------------|------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>Herbertia lahue</i> hexaploid populations | | | | | 82 | 10.053 | 0.037 | 0.054 | 0.039 | 0.508 |
| Alves25 (HX01) | 757 | -28.458 | -54.399 | Ipê | 33 | 09.524 | 0.036 | 0.052 | 0.049 | 0.499 |
| ESC521 (HX02) | 69 | -30.804 | -55.261 | Barra do Quaraí | 32 | 04.762 | 0.014 | 0.023 | 0.021 | 0.504 |
| ESC535 (HX03) | 328 | -30.189 | -57.470 | Entre-Ijuís | 17 | 15.873 | 0.061 | 0.089 | 0.048 | 0.494 |
| <i>Herbertia lahue</i> octoploid populations | | | | | 284 | 24.259 | 0.094 | 0.136 | 0.094 | 0.500 |
| Aita88 (OC01) | 151 | -30.195 | -56.489 | Quaraí | 31 | 35.185 | 0.137 | 0.199 | 0.134 | 0.498 |
| Alves01 (OC02) | 78 | -30.328 | -52.602 | Encruzilhada do Sul | 31 | 38.889 | 0.142 | 0.208 | 0.147 | 0.498 |
| Alves04 (OC03) | 311 | -31.260 | -54.159 | Bagé | 33 | 25.000 | 0.078 | 0.118 | 0.085 | 0.501 |
| Alves26 (OC04) | 757 | -28.458 | -54.399 | Ipê | 27 | 09.259 | 0.034 | 0.049 | 0.042 | 0.502 |
| ESC466 (OC05) | 273 | -30.833 | -53.504 | Caçapava do Sul | 13 | 21.296 | 0.090 | 0.126 | 0.096 | 0.496 |
| ESC488 (OC06) | 101 | -30.327 | -54.372 | São Gabriel | 27 | 25.000 | 0.102 | 0.146 | 0.102 | 0.499 |
| ESC494 (OC07) | 160 | -30.804 | -55.263 | Santana do Livramento | 30 | 18.519 | 0.070 | 0.102 | 0.064 | 0.498 |
| ESC495 (OC08) | 161 | -30.804 | -55.261 | Santana do Livramento | 30 | 16.667 | 0.061 | 0.088 | 0.061 | 0.499 |
| ESC504 (OC09) | 210 | -30.888 | -55.476 | Santana do Livramento | 31 | 21.296 | 0.096 | 0.134 | 0.091 | 0.510 |
| ESC573 (OC10) | 927 | -28.958 | -50.427 | Jaquirana | 31 | 31.481 | 0.130 | 0.187 | 0.117 | 0.496 |
| All thirteen <i>Herbertia lahue</i> populations | | | | | 366 | 19.368 | 0.075 | 0.108 | 0.075 | 0.500 |

TABLE 3. Genetic differentiation among *Herbertia lahue* populations using inter-simple sequence repeat analysis. Calculations for F -Statistics (i.e., F_{ST} , F_{SC} and F_{CT}) were performed with ARLEQUIN. Measures for Θ_I (corresponds to Wright's F_{ST}) and Θ_{II} (analogous to Weir's and Cockerham F_{ST}) were performed with HICKORY (using the f - free model).

| Genetic differentiation considering: | F_{ST} | F_{SC} | F_{CT} | Θ_I | Θ_{II} |
|--------------------------------------|----------|----------|----------|------------|---------------|
| All populations | 0.870* | 0.845* | 0.159* | 0.788 | 0.779 |
| Hexaploid populations | 0.962* | — | — | 0.841 | 0.840 |
| Octoploid populations | 0.779* | — | — | 0.773 | 0.762 |

Notes: *Values significant at $P < 0.05$. Sob F - free model, Θ_{II} estimation is performed without the influence of F_{IS} .

TABLE 4. Hierarchical analysis of molecular variation (AMOVA) in *Herbertia lahue* populations illustrating the proportion of variation attributable to differences between among cytotypes, among populations within cytotypes, and within populations.

| Source | Degrees of freedom | Sum of squares | Variance component | Percentage of variation |
|---|--------------------|----------------|--------------------|-------------------------|
| All <i>Herbertia lahue</i> populations | | | | |
| Among cytotypes | 001 | 1480.415 | 03.510 | 15.9 |
| Among populations/ within cytotypes | 011 | 5645.877 | 15.676 | 71.1 |
| Within populations | 433 | 1240.977 | 02.866 | 13.0 |
| <i>Herbertia lahue</i> hexaploid populations | | | | |
| Among populations | 002 | 809.982 | 15.344 | 96.2 |
| Within populations | 079 | 047.445 | 00.600 | 03.8 |
| <i>Herbertia lahue</i> octoploid populations | | | | |
| Among populations | 009 | 2819.980 | 11.046 | 77.9 |
| Within populations | 272 | 0850.637 | 03.127 | 22.1 |

Neighbor-joining (NJ) analysis identified two principal clusters, the hexaploid and octoploid populations (Fig. 3A). However, the bootstrap values were below 50%. PCoA (using molecular data) showed that clustering caused 46.82% of the observed variation (Fig. 3B), 25.88 % in the axis 1; 20.94% in the axis 2. Unlike what is possible using a NJ

tree, PCoA does not permit full discrimination among cytotypes. Nevertheless, a few groups formed genetically differentiated populations (in agreement with the pairwise population F_{ST} values). The three hexaploid populations (HX01, HX02, and HX03) and two octoploid populations (OC07 and 08) showed high levels of genetic differentiation (Table 5). The two octoploid populations formed a subgroup (with populations OC01 and OC09) on NJ analysis (Fig. 3A). Despite the geographical closeness (Fig. 1), all populations showed high levels of genetic differentiation (range F_{ST} = 0.681–0.772; Table 5). However, for these five populations, isolation by distance was rejected upon statistical analysis (r = 0.051; P = 0.610). The lowest pairwise population F_{ST} values were assigned to two octoploid populations (OC02 and OC10, F_{ST} = 0.395; Table 5). These populations were grouped both by NJ analysis and PCoA (Fig. 3A and 3B). Geographically, the populations are distant from each other (Fig. 1). Turning to the hexaploid cytotype, the three sampled populations were strongly differentiated (range F_{ST} = 0.914–0.965; Table 5), as evidenced by cluster analysis (Fig. 3B). However, although the populations are geographically distant (Fig. 1), isolation by distance was rejected upon statistical testing (r = 0.75; P = 0.44).

Genetic and morphological relationships amongst hexaploid and octoploid plants—Morphometric analysis of floral structures showed that no feature of the gynoecium (except for ovary length) varied significantly between cytotypes (P = 0.005; Table 6). However, tepal features (characters 1 to 4) and androecium measurements (characters 5 to 7) varied significantly among the populations (P < 0.001; Table 6). No variable floral character alone allowed strict discrimination of the two cytotypes. Variation in floral characters was correlated only weakly with geographic distance (r = 0.04; P = 0.006). Euclidean cluster analysis indicated that hexaploid populations were somewhat separated from octoploids, but some hexaploid individuals were admixed with octoploids (Fig. 4A). PCoA analysis (Fig. 4B) showed that Euclidean distances described more than 80% of the variation in floral morphology (axis 1 = 47.27%; axis 2 = 34.33%).

TABLE 6. Morphometric variation (mean and standart error – SE) in five populations of *Herbertia lahue* (two hexaploid and three octoploid populations). All measurements are given in millimeters (mm). Means with the same letter in the rows are not significantly different by the Kruskal-Wallis Test (5%). Different letters (a, b or c) reveal significant differences at P<0.001 by Dunn Test.

| Floral character | HX02 | | HX03 | | OC07 | | OC08 | | OC09 | |
|---|---------------------|-------|----------------------|-------|---------------------|-------|----------------------|-------|----------------------|-------|
| | Mean | SE | Mean | SE | Mean | SE | Mean | SE | Mean | SE |
| 01) Outer tepal length | 21.385 ^a | 1.446 | 18.650 ^a | 1.001 | 19.250 ^a | 1.291 | 19.118 ^a | 0.801 | 16.825 ^b | 1.444 |
| 02) Outer tepal width | 8.769 ^b | 1.092 | 6.825 ^{b,c} | 1.017 | 11.438 ^a | 0.892 | 9.265 ^b | 0.868 | 9.890 ^b | 1.449 |
| 03) Inner tepal length | 7.692 ^a | 0.630 | 7.080 ^{a,b} | 0.607 | 6.333 ^b | 0.516 | 5.794 ^b | 0.435 | 5.575 ^{b,c} | 0.674 |
| 04) Inner tepal width | 2.846 ^a | 0.376 | 2.350 ^{a,b} | 0.235 | 2.500 ^a | 0.577 | 2.441 ^{a,b} | 0.243 | 2.205 ^b | 0.239 |
| 05) Staminal column length | 2.985 ^b | 0.157 | 4.000 ^a | 0.000 | 4.000 ^a | 0.000 | 4.029 ^a | 0.278 | 3.675 ^{a,b} | 0.467 |
| 06) Free filament length | 0.538 ^a | 0.247 | 0.560 ^a | 0.160 | 1.000 ^a | 0.000 | 0.547 ^a | 0.174 | 0.255 ^b | 0.179 |
| 07) Anther length | 4.654 ^b | 0.549 | 4.625 ^b | 0.455 | 6.000 ^a | 0.000 | 5.500 ^{a,b} | 0.530 | 5.930 ^a | 0.560 |
| 08) Ovary length | 5.469 ^b | 1.065 | 8.075 ^{a,b} | 1.150 | 9.875 ^a | 1.147 | 8.353 ^{a,b} | 0.786 | 9.775 ^a | 1.674 |
| 09) Style length | 3.631 ^a | 0.293 | 4.000 ^a | 0.000 | 4.000 ^a | 0.000 | 4.029 ^a | 0.278 | 3.695 ^a | 0.451 |
| 10) Style branch length | 1.954 ^a | 0.224 | 2.050 ^a | 0.000 | 2.000 ^a | 0.139 | 2.000 ^a | 0.000 | 2.025 ^a | 0.112 |
| 11) Length of the dichotomic end of style | 0.969 ^a | 0.063 | 0.790 ^a | 0.234 | 1.025 ^a | 0.109 | 0.853 ^a | 0.235 | 0.910 ^a | 0.184 |

PCoA applied to genetic distance measures (from the ISSR dataset) of the five populations sampled described more than 46% of genetic variation (axis 1= 25.88%; axis 2= 20.94%), placed the cytotypes into distinct groups, and showed that the various populations differed from each other (Fig. 4C). However, no significant correlation between molecular and morphological variation was detected ($r= 0.030$; $P= 0.532$).

4. DISCUSSION

This is the first report to describe genetic parameters and the breeding system of natural populations of *Herbertia lahue*. Variation in ploidy is common in the Iridaceae, playing an important role in speciation. However, the processes driving evolution of *Herbertia* and closely related genera are not yet entirely understood (Kenton and Heywood, 1984; Goldblatt and Takei, 1997). The two cytotypes differ slightly in floral morphology as is true of other Iridaceae species (Goldblatt and Manning, 2006; Anderson et al., 2009; De Waal et al., 2012). In general, taxonomic boundaries within Tigridaeae remain problematic because some species descriptions were made in a careless manner (Rodríguez and Sytsma, 2006; Goldblatt and Manning, 2008; Chauveau et al., 2012). Some described variations may simply reflect environmental features, and are of no use in defining a species. Other work on the dominant markers of various species of Iridaceae reported higher levels of genetic diversity, possibly reflecting differences in life history and the extent of selective pressures (Artyukova et al., 2001; Arafteh et al., 2002; Wróblewska et al., 2003; Saad and Mahy, 2009; Beiki et al., 2010; Tacuatiá et al., 2012). Although our estimates of interpopulation genetic differentiation are higher than those of other works, differentiation among populations seems to be common in the Iridaceae. This may be a consequence of narrow gene flow (achieved either by pollinators or simple seed dispersal) associated with other factors promoting genetic drift among populations. In addition, outcrossing seems to be prevalent in Old World Iridaceae and is favored by self-incompatibility and herkogamy (Bernhardt and Goldblatt, 2000).

How does the breeding system affect the genetic diversity of Herbertia lahue?—

In the present work, hand-pollination experiments revealed that the breeding system was of the mixed type, in which individuals produce both selfed and outcrossed offspring. Further, it is possible that autonomous selfing (i.e., within-flower selfing without help from a pollinating vector) occurred in sampled hexaploid and octoploid plants. Some plant

features facilitate autonomous selfing. These include floral longevity, a low level of floral attractiveness, close spatial proximity between the anthers and the pistil, reduced dichogamy (i.e., simultaneous anther dehiscence and development of stigma receptivity), and inefficient pollen dispersal (i.e., the pollination vectors have quantitative or qualitative limitations) (Elle and Carney, 2003; Knight et al., 2005; Brunet and Sweet, 2006; Eckert et al., 2009; Elle et al., 2010; Harder and Aizen, 2010; Brys et al., 2011; Brys and Jacquemyn, 2011).

In *H. lahue*, autonomous selfing may be an evolutionary outcome of a combination of such features. The fugacious flowers remain open for about 7 h and the anthers and stigmatic surfaces lie close together. The flowers have been described as protogynous (Goldblatt et al., 1998), but possibly overlap the male and female phases. Pollen flow in *H. lahue* may be limited because the most frequent visitors to flowers are short-distance pollen dispersers (syrphids of the Diptera) and non-native honeybees (*Apis mellifera*). In some instances, autonomous selfing has been shown to promote reproductive assurance (Elle and Carney, 2003; Brys et al., 2011; Brys and Jacquemyn, 2011). However, this needs to be explored further in *H. lahue*.

The findings of the hand-pollination experiments were consistent with estimates of intrapopulation genetic differences obtained via analysis of ISSR-neutral dominant markers. The various parameters calculated highlighted the presence of low genetic diversity and a high fixation index, suggesting that selfing may be common within populations of the two *H. lahue* cytotypes analyzed. Although fixation index estimates obtained via analysis of dominant markers should be viewed with caution because bi-allelic loci only are assessed (i.e., a band is either present or absent) (Holsinger and Lewis, 2003; Kremer et al., 2005; Herrera and Bazaga, 2008; Levsen et al., 2008), our estimates of f (analogous to F_{IS}) are reasonable in the context of the type of reproductive system used (i.e., a mixed-mating system) as indicated by the hand-pollination experiments. Commonly, extreme values of f (0 or 1) are respectively indicative of outcrossing (where the population is near Hardy–Weinberg equilibrium) and full selfing. Intermediate values indicate that mixed mating is in play. Thus, despite the problems associated with use of dominant markers to estimate a fixation index, the molecular data and the outcomes of the hand-pollination experiments in the present study combine to render the estimated f value plausible.

Can analysis of genetic parameters suggest the incidence of asexual reproduction?—In the present study, we confirmed that asexual reproduction may occur in *Herbertia lahue*. All of a low intrapopulation genetic diversity, high-level interpopulation genetic differentiation, the presence of morphological variation, and the existence of intraspecific cytotypes, in certain cases, are shown by plants that reproduce asexually (Hollingsworth et al., 1998; Li and Ge, 2001; Hörandl and Greilhuber, 2002; Barcaccia et al., 2006; Li et al., 2006; Stöcklin et al., 2009; Liu et al., 2011). Thus, we performed anatomical analysis of the gynoecium to define *H. lahue* apomixes. We found that egg cells were both morphologically and cytologically structured in plants of both cytotypes, favoring sexual reproduction. One form of asexual reproduction in *H. lahue* may be spread from bulbs. This reproduction mode of plants is poorly known (Klimes et al., 1997), but is employed by other bulbous species of Iridaceae (Rudall, 1989; Rodriguez and Ortiz-Catedral, 2006). Under ex situ conditions, we observed clonal offspring from bulbs of hexaploid and octoploid plants (data not shown). The presence of clonal progeny in situ is suggested by the spatial plant distributions of some populations. However, the seed dispersal mechanism (barochory) of *H. lahue* would also cause plants to grow in close proximity. This fact, coupled with abiotic factors (principally soil fertility, soil water availability, and seasonality) means that the occurrence of clonal progeny in natural populations of *H. lahue* remains speculative. The impact of reproductive mode on intrapopulation genetic parameters requires further study.

What is the extent of genetic differentiation among Herbertia lahue populations?—Analyses of dominant markers revealed strong structuring when the entire sample set was analyzed and also when the cytotypes were examined separately. Despite the high level of differentiation detected using neutral dominant markers, the “isolation by distance” hypothesis was rejected upon statistical analysis. However, constraints imposed on gene flow by visits by short-distance pollen dispersers or restricted seed dispersal possibly influence the rate of differentiation among *H. lahue* populations, thus contributing to genetic drift. Potentially, the incidence of selfing within populations is also an important contributor to the strong interpopulation differentiation that was noted. Such an effect of the mating system in terms of the parameters of genetic differentiation was earlier noted when either dominant or allozyme markers were analyzed (Hamrick and Godt, 1996; Chapman et al., 2000; Nybom, 2004; Barcaccia et al., 2006).

AMOVA analysis indicated that most of the observed differences were attributable to differences among populations within cytotypes rather than differences among cytotypes or within populations. In a general sense, the intrapopulation genetic diversity levels of hexaploid and octoploid populations were lower than expected if a mixed-mating system was operative (Nybom, 2004). As in other plant species, it is possible that a founder effect or bottleneck ancestry may have influenced intrapopulation genetic diversity (Husband and Barrett, 1991; Amsellen et al., 2000; Chapman et al., 2000; Dorken and Eckert, 2001; Barcaccia et al., 2006; Pannel and Dorken, 2006; Stöcklin et al., 2009; Van Rossum, 2009; Voss et al., 2012). This could explain the strong genetic differentiation evident in the geographically related populations of the present study. Such features, together with selfing, create a complex evolutionary scenario that would have profound effects on the genetic structures of the *H. lahue* populations analyzed. Moderate between-cytotype genetic differentiation was evident in the present study. This was in agreement with PCoA groupings of the ISSR dataset. The hexaploid and octoploid populations overlapped. In terms of the two distinct groups identified via NJ analysis (i.e., the hexaploid and octoploid populations), the distinction was not supported statistically, indicating that the groupings were artificial.

Are the Herbertia lahue hexaploid and octoploid cytotypes genetically and morphologically distinct?—Environmental heterogeneity is known to promote genetic differentiation among populations. The selective pressures imposed on populations differ, contributing to genetic drift. Evolution of ecological divergence may result in selection of characteristics causing reproductive isolation, in turn leading to speciation (Pannel and Dorken, 2006; Givnish, 2010). In terms of floral traits, selective pressures imposed by the availability (or not) of pollinators contribute to morphological differentiation, creating conditions favorable for reproductive isolation when gene flow is insufficient to perform a homogenizing role (Brunet and Sweet, 2006; Givnish, 2010). Morphometrically, the tepals and the androecium were variable in both cytotypes, but morphometric analysis of floral characteristics did not enable us to discriminate between hexaploids and octoploids. In addition, no statistically significant correlation was evident between diversity revealed by analysis of ISSR markers and morphological variation. The former analyses revealed low-level neutral molecular variation within populations, and strong differentiation. In contrast, PCoA (using morphological data) showed that variation within populations of both *H.*

lahue cytotypes was high, probably because of variations in ecological microhabitat. Moreover, a positive correlation between the plasticity of floral morphology and range distribution has been shown in the Iridaceae (Sapir et al., 2002; Goldblatt et al., 2003; Goldblatt and Manning, 2006; Anderson et al., 2009; De Waal et al., 2012). This is caused principally by fluctuations in the types and densities of pollinators, rendering taxonomic classifications complicated.

Conclusion— The present study is the first to report on the genetic parameters and breeding system of *Herbertia lahue*, a species that exists as mixed or parapatric populations consisting of hexaploid and/or octoploid plants. Only low levels of genetic diversity were evident, possibly attributable to a combination of the type of breeding system used (progeny may be derived by autonomous selfing), genetic drift, and fluctuations in population sizes. Although no apomixes was evident, vegetative propagation via bulbs is apparently possible, which, in some circumstances, would create populations that were genetically rather similar. The studied populations were strongly differentiated in genetic terms, indicating that gene flow may be restricted. Further, although isolation by distance was not evidenced by molecular analysis, distance may in fact influence population differentiation, because the heterogeneous landscape of the range of *H. lahue* in southern Brazil features environmental gradients that promote differentiation. Further, morphometric variation was not correlated with molecular variation but was correlated with geographical distance. This shows that ecological shifts encouraging floral radiation may be important in the evolution of Tigridieae species, as has been shown in Old World Iridaceae. Our analysis suggested that *H. lahue* is a species undergoing a process of diversification. Intraspecific variation in ploidy and the genetic isolation of populations contrast with the incomplete separation of cytotypes both morphologically and genetically. These may represent responses to recent reticulation events and/or adaptations to different ecological niches. Our work provides a basis for future studies focusing on the evolutionary origin of cytotypes, the ecology of *H. lahue*, and the potential role played by reticulation events.

5. LITERATURE CITED

- ALVES, L.I.F., S.A.A. LIMA AND L.P. FELIX. 2011. Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 34(2): 259–267.
- AMSELLEM, L., J.L. NOYER, T. LE BOURGEOIS, AND M. HOSSAERT-MCKEY. 2000. Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology* 9: 443–455.
- ANDERSON, B., R. ALEXANDERSSON, AND S.D. JOHNSON. 2009. Evolution and coexistence of pollination ecotypes in an african *Gladiolus* (Iridaceae). *Evolution* 64: 960–972.
- ARAFEH, R.M.H., Y. SAPIR, A. SHMIDA, N. IRAKI, O. FRAGMAN, AND H.P. COMES. 2002. Patterns of genetic and phenotypic variation in *Iris haynei* and *I. atrofusca* (*Iris* sect. *Oncocyclus* = the Royal Irises) along an ecogeographical gradient in Israel and the West Bank. *Molecular Ecology* 11: 39–53.
- ARTYUKOVA, E.V., M.M. KOZYRENKO, M.V. ILYUSHKO, Y.N. ZHURAVLEV, AND G.D. REUNOVA. 2001. Genetic Variability of *Iris setosa*. *Molecular Biology* 35: 134–138.
- BARCACCIA, G., F. ARZENTON, T.F. SHARBEL, S. VAROTTO, P. PARRINI, AND M. LUCCHIN. 2006. Genetic diversity and reproductive biology in ecotypes of the facultative apomicts *Hypericum perforatum* L. *Heredity* 96: 322–334.
- BEIKI, A.H., F. KEIFI, AND J. MOZAFARI. 2010. Genetic Differentiation of *Crocus* Species by Random Amplified Polymorphic DNA. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*: GEBJ-18. Online.
- BERNHARDT, P., AND P. GOLDBLATT. 2000. The diversity of pollination mechanisms in the Iridaceae of southern Africa. In: Wilson, K.L. e Morrison D.A.. *Monocots: Systematics and Evolution*. CSIRO, Melbourne, Australia, p. 301–308.
- BRUNET, J., AND H.R. SWEET. 2006. Impact of insect pollinator group and floral display size on outcrossing rate. *Evolution* 60: 234–246.
- BRYNS, R., E. CROP, M. HOFFMANN, AND H. JACQUEMYN. 2011. Importance of autonomous selfing is inversely related to population size and pollinator availability in a monocarpic plant. *American Journal of Botany* 98: 1834–1840.

- BRYS, R., AND H. JACQUEMYN. 2011. Variation in the functioning of autonomous self-pollination, pollinator services and floral traits in three *Centaureum* species. *Annals of Botany* 107: 917–925.
- CHAPMAN, H.M., D. PARH, AND N. ORAGUZIE. 2000. Genetic structure and colonizing success of a clonal, weedy species, *Pilosella officinarum* (Asteraceae). *Heredity* 84: 401–409.
- CHAUVEAU, O., L. EGGERS, T.T.SOUZA-CHIES, AND S. NADOT. 2012. Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera. *Annals of Botany* 110: 713–729.
- DE WAAL, C., B. ANDERSON, AND S.C.H BARRET. 2012. The natural history of pollination and mating in bird-pollinated *Babiana* (Iridaceae). *Annals of Botany* 109: 667–679.
- DORKEN, M.E., AND C.G. ECKERT. 2001. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Journal of Ecology* 89: 339–350.
- DOYLE, J.J., AND J.L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- ECKERT, C.G., S. KALISZ, M.A. GEBER, R. SARGENT, E. ELLE, P.O. CHEPTOU, C. GOODWILLIE, M.O. JOHNSTON, J.K. KELLY, D.A. MOELLER, E. PORCHER, R.H. REE, M. VALLEJO-MARÍN, AND A.A. WINN. 2009. Plant mating systems in a changing world. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 35–43.
- ELLE, E., AND R. CARNEY. 2003. Reproductive assurance varies with flower size in *Collinsia parviflora* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 90: 888–896.
- ELLE, E., S. GILLESPIE, S. GUINDRE-PARKER, AND A.L. PARACHNOWITSCH. 2010. Variation in the timing of autonomous selfing among populations that differ in flower size, time to reproductive maturity, and climate. *American Journal of Botany* 97: 1894–1902.
- FEDER, N., AND T.P. O'BRIEN. 1968. Plant Microtechnique, Some Principles and New Methods. *American Journal of Botany* 55: 123–142.
- FELSENSTEIN, J. 2004 . PHYLIP (Phylogeny inference package), version 3.67 [computer program]. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, Washington, USA.

- FEHLBERG, S.D., AND C.J. FERGUSON. 2012. Intraspecific cytotypic variation and complicated genetic structure in the *Phlox amabilis*-*P. woodhousei* (Polemoniaceae) complex. *American Journal of Botany* 99: 865–874.
- GERRITS, P.O., AND L. SMID. 1983. A new, less toxic polymerisation system for the embedding of soft tissue in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* 132: 81–85.
- GIVNISH, T.J. 2010. Ecology of plant speciation. *Taxon* 59: 1326–1366.
- GOLDBLATT P., AND M. TAKEI. 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., J.C. MANNING, AND P. RUDALL. 1998. Iridaceae. In: Kubitzki K (ed.). The Families and Genera of Vascular Plants. III Flowering Plants. Monocotyledons: Liliales. Springer, Berlin, 1998. Pp. 295–333.
- GOLDBLATT P., V. SAVOLAINEN, O. PORTEOUS, I. SOSTARIC, M. POWELL, G. REEVES, J.C. MANNING, T.G. BARRACLOUGH, AND M.W. CHASE. 2003. Radiation in the Cape flora and the phylogeny of peacock irises *Moraea* (Iridaceae) based on four plastid DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 341–360.
- GOLDBLATT, P., AND J.C. MANNING. 2006. Radiation of Pollination Systems in the Iridaceae of sub-Saharan Africa. *Annals of Botany* 97: 317–344.
- GOLDBLATT, P., AND J.C. MANNING. 2008. The Iris family – Natural history and classification. Portland, OR: Timber Press.
- GOLDBLATT, P., A. RODRIGUEZ, M.P. POWELL, T.J. DAVIES, J.C. MANNING, M. VAN DER BANK, AND V. SAVOLAINEN. 2008. Iridaceae ‘Out of Australasia’? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. *Systematic Botany* 33: 495–508.
- EXCOFFIER, L., AND H.E.L. LISCHER. 2010. ARLEQUIN suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.
- HAMMER, O., D.A.T. HARPER, AND P.D. RYAN. 2001. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analyses. *Palaeontologia Electronica* 4: 9p.
- HAMRICK, J.L., AND M.J. GODT. 1996. Effects of Life History Traits on Genetic Diversity in Plant Species. *Philosophical Transactions of Royal Society B* 351: 1291–1298.

- HARDER, L.D. AND M.A. AIZEN. 2010. Floral adaptation and diversification under pollen limitation. *Philosophical Transactions of Royal Society B* 365: 529–543.
- HERRERA, C.M., AND P. BAZAGA. 2008. Adding a third dimension to the edge of a species' range: altitude and genetic structuring in mountainous landscapes. *Heredity* 100: 275–285.
- HOLLINGSWORTH, M.L., P.M. HOLLINGSWORTH, G.I. JENKINS, J.P. BAILEY, AND C. FERRIS. 1998. The use of molecular markers to study patterns of genotypic diversity in some invasive alien *Fallopia* spp. (Polygonaceae). *Molecular Ecology* 7: 1681–1691.
- HOLSINGER, K.E., AND P.O. LEWIS. 2003. Hickory: A package for analysis of population genetic data v1.1. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA.
- HÖRANDL, E., AND J. GREILHUBER. 2002. Diploid and autotetraploid sexuals and their relationships to apomicts in the *Ranunculus cassubicus* group: insights from DNA content and isozyme variation.
- HUSBAND, B.C., AND S.C.H. BARRETT. 1991. Colonization history and population genetic structure of *Eichhornia paniculata* in Jamaica. *Heredity* 66: 287–296.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2012. *Manual Técnico da Vegetação Brasileira*. 2 Ed. Rio de Janeiro. 271p.
- KENTON, A., AND C.A. HEYWOOD. 1984. Cytological studies in South American Iridaceae. *Plant Systematics and Evolution* 146: 87–104.
- KLIMES, L., KLIMESOVÁ, J., HENDRIKS, R., AND J. VAN GROENENDAEL. 1997. Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. In H. de Kroon, and J. van Groenendael [eds]. *The ecology and evolution of clonal plants*, 1–29. Backhuys Publishers: Leiden, Holanda.
- KNIGHT, T.M., J.A. STEETS, J.C. VAMOSI, S.J. MAZER, M. BURD, D.R. CAMPBELL, M.R. DUDASH, M.O. JOHNSTON, R.J. MITCHELL, AND T.L. ASHMAN. 2005. Pollen Limitation of Plant Reproduction: Pattern and Process. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 467–497.
- KREMER, A., H. CARON, S. CAVERS, N. COLPAERT, G. GHEYSEN, R. GRIBEL, M. LEMES, A.J. LOWE, R. MARGIS, C. NAVARRO AND F. SALGUEIRO. 2005. Monitoring genetic diversity in tropical trees with multilocus dominant markers. *Heredity* 95: 274–280.

- LEVSEN, N.D.; D.J. CRAWFORD, J.K. ARCHIBALD, A. SANTOS-GUERRA, AND M.E. MORT. 2008. Nei's to Bayes': Comparing computational methods and genetic markers to estimate patterns of genetic variation in *Tolpis* (Asteraceae). *American Journal of Botany* 95: 1466–1474.
- LI, A., AND S. GE. 2001. Genetic Variation and Clonal Diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) Detected by ISSR Markers. *Annals of Botany* 87: 585–590.
- LI, W., B. WANG, AND J. WANG. 2006. Lack of genetic variation of an invasive clonal plant *Eichhornia crassipes* in China revealed by RAPD and ISSR markers. *Aquatic Botany* 84: 176–180.
- LIU, W.S., W. WEI, AND M. DONG. 2009. Clonal and genetic diversity of *Carex moorcroftii* on the Qinghai-Tibet plateau. *Biochemical Systematics and Ecology* 37: 370–377.
- LYNCH, M., AND B.G. MILLIGAN. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91–99.
- MARHOLD, K., H. KUDOH, J.H. PAK, K. WATANABE, S. SPANIEL, AND J. LIHOVÁ. 2010. Cytotype diversity and genome size variation in eastern Asian polyploid *Cardamine* (Brassicaceae) species. *Annals of Botany* 105: 249–264.
- MCDOWELL, E.M., AND B. TRUMP. 1976. Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology and Laboratory of Medicine* 100: 405–414.
- MORENO N., M.L. LAS PEÑAS, G. BERNARDELLO, AND G. ROITMAN. 2009. Cytogenetic studies in *Herbertia* Sweet (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.
- NYBOM, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143–1155.
- PANNELL, J.R., AND M.E. DORKEN. 2006. Colonization as a common denominator in plant metapopulations and range expansions: effects on genetic diversity and sexual systems. *Landscape Ecology* 21: 837–848.
- PEAKALL, R., AND P.E. SMOUSE. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288 – 295.

- PERNÝ, M., A. TRIBSCH, T.F. STUESSY, AND K. MARHOLD. 2005. Taxonomy and cytogeography of *Cardamine raphanifolia* and *C. gallaecica* (Brassicaceae) in the Iberian Peninsula. *Plant Systematics and Evolution* 254: 69–81.
- REEVES, G., M.W. CHASE, P. GOLDBLATT, P. RUDALL, M.F. FAY, A.V. COX, B. LEJEUNE AND T.T. SOUZA-CHIES. 2001. Molecular systematics of Iridaceae: Evidence from four plastid DNA regions. *American Journal of Botany* 88: 2074–2087.
- RODRIGUEZ, A., AND L. ORTIZ-CATEDRAL. 2006. *Tigridia pugana* (Iridaceae: Tigridieae), a new species from Jalisco, Mexico. *Acta Botanica Mexicana* 76: 59–66.
- RODRIGUEZ, A. AND K.J. SYTSMA. 2006. Phylogenetics of the "tiger-flower" group (Tigridieae: Iridaceae): Molecular and morphological evidence. *Aliso* 22: 412–424.
- RUDALL, P. 1989. Stem Thickening Growth in Bulbous Iridaceae. *Botanical Gazette* 150: 132–138.
- SAAD, L., AND G. MAHY. 2009. Molecular and morphological variation of rare endemic *Oncocylus* irises (Iridaceae) of Lebanon. *Botanical Journal of the Linnean Society* 159: 123–135.
- SANMARTÍN, I., AND F. RONQUIST. 2004. Southern hemisphere biogeography inferred by event-based models: plant versus animal patterns. *Systematic Biology* 53: 216–243.
- SAPIR, Y., A. SHMIDA, O. FRAGMAN, AND H.P. COMES. 2002. Morphological variation of the *Oncocylus* Irises (*Iris*: Iridaceae) in the southern Levant. *Botanical Journal of the Linnean Society* 139: 369–382.
- SPANIEL, S., K. MARHOLD, I. HODÁLOVÁ, AND J. LIHOVÁ. 2008. Diploid and Tetraploid Cytotypes of *Centaurea stoebe* (Asteraceae) in Central Europe: Morphological Differentiation and Cytotype Distribution Patterns. *Folia Geobotanica* 43: 131–158.
- STÖCKLIN, J., P. KUSS, AND PLUESS, A.R. 2009. Genetic diversity, phenotypic variation and local adaptation in the alpine landscape: case studies with alpine plant species. *Botanica Helvetica* 119: 125–133.
- TACUATIÁ, L.O., L. EGGERS, E. KALTCHUK-SANTOS, AND T.T. SOUZA-CHIES. 2012. Population genetic structure of *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae) in Itapuã State Park, Southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 35: 99–105.
- VOSS, N.; ECKSTEIN, R.L. AND W. DURKA. 2012. Range expansion of a selfing polyploid plant despite widespread genetic uniformity. *Annals of Botany* 110: 585–593.

- WARD, J.H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* 58: 236–244.
- WEIR, B.S., AND C.C. COCKERHAM. 1984. Estimating F - statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323–354.
- WRÓBLEWSKA, A., E. BRZOSKO, B. CZARNECKA, AND J. NOWOSIELSKI. 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.

APPENDIX

APPENDIX S1. Inter-simple sequence repeat primers (5'– 3' orientation) that were employed to obtain genetic parameters in *Herbertia lahue* sampled populations, maximum number of bands scored for each primer and average number of bands per population. Degenerative nucleotides (Y= pyrimidine, C or T) were often used as the 3' anchor.

| Primer code | Primer sequence | Number of bands | Mean of bands per population | Size range (bp) |
|-------------|----------------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
| F03 | (AG) ₈ YC | 15 | 10 | 400 – 1790 |
| F04 | (GA) ₈ YC | 19 | 14 | 300 – 1790 |
| F07 | (GT) ₈ A | 15 | 9 | 400 – 2080 |
| F13 | (CT) ₈ A | 13 | 9 | 500 – 1790 |
| SP2 | (AG) ₈ C | 15 | 10 | 400 – 1250 |
| SP3 | (CT) ₈ G | 18 | 11 | 300 – 2080 |
| P02 | (GA) ₈ T | 17 | 10 | 430 – 1500 |

FIGURES

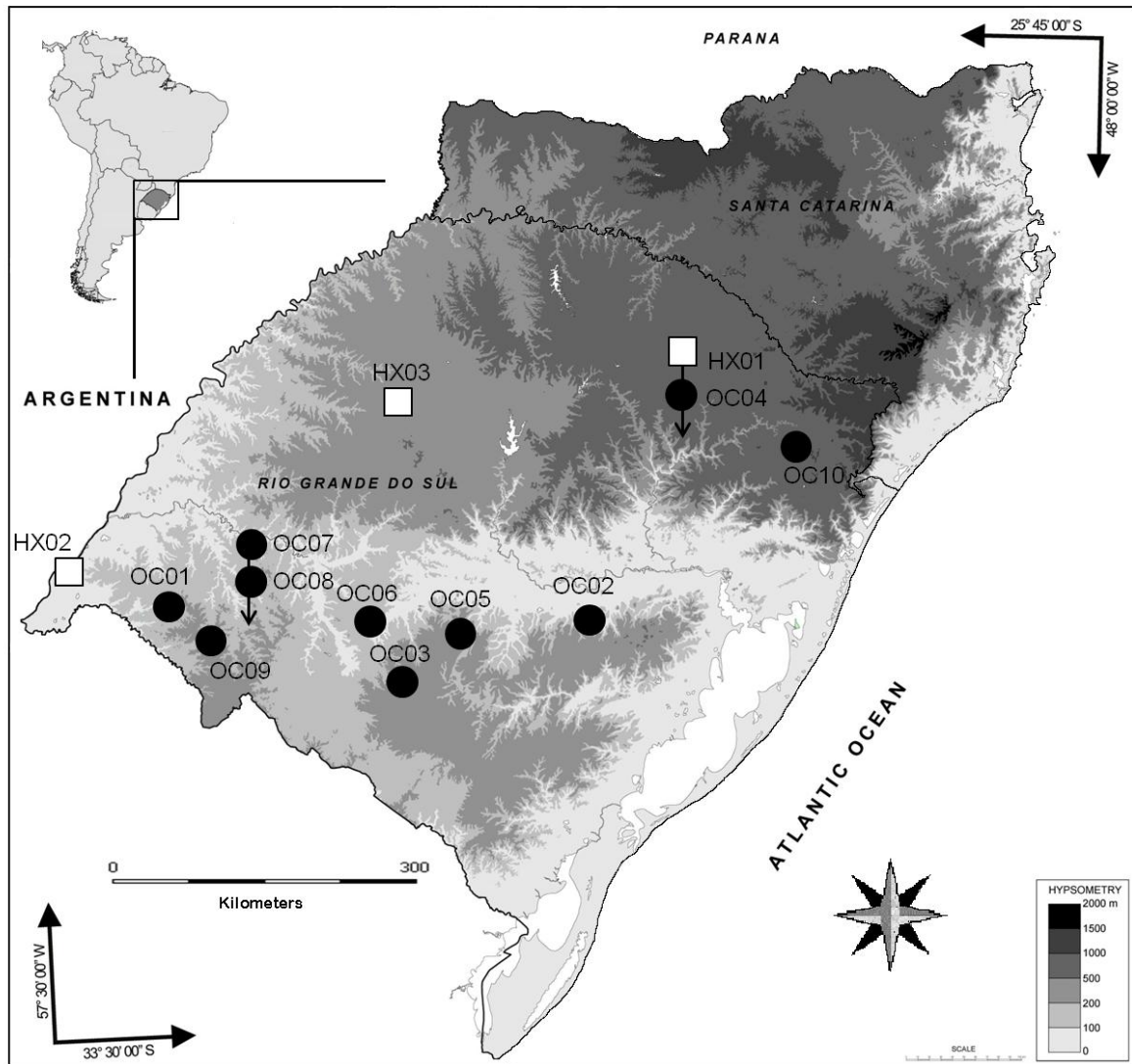


Fig. 1. Sampling localities for *Herbertia lahue* in Rio Grande do Sul state, Brazil. Sites with hexaploids are indicated by white squares and sites with octoploids by black circles. Arrows indicate sympatric hexaploid and octoploid populations. The codes from the populations are defined in the Table 1.

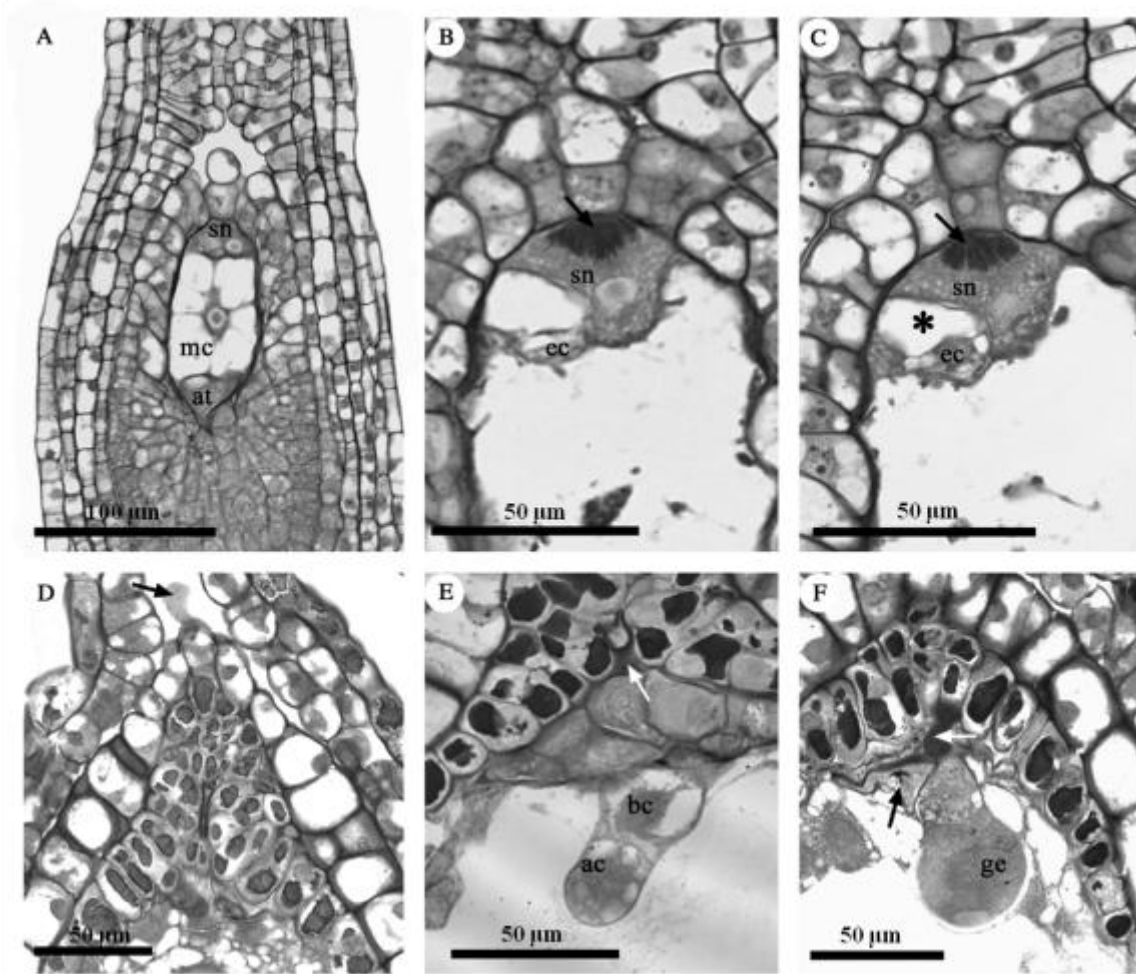


Fig. 2. Egg in *Herbertia lahue* during anthesis. (A) Female Gametophyte complete longitudinal section. It is possible observe the antipodes (at) in the antipodal pole, the average cell (mc), synergids and central (sn) in the micropylar pole. (B) and (C) Oospheric apparatus: the synergids (sn) exhibit fibrillar apparatus (arrow) developed and well positioned in the micropylar portion. The egg cell (ec) (gamete femininio) has a conspicuous vacuole (asterisk) and the synergids occur laterally. (D) Pollen tube (arrow) entering the micropyle. (E) The zygote with four days after fertilization, with the basal cell (bc) and apical cell (ac) and cellular debris pollen tube (white arrow). (F) Globular embryo stage details 10 days after the fecundation and cell debris pollen tube (white arrow) and synergids (black arrow). Scale bars= 100 µm (A) and 50 µm (B, C, D, E and F).

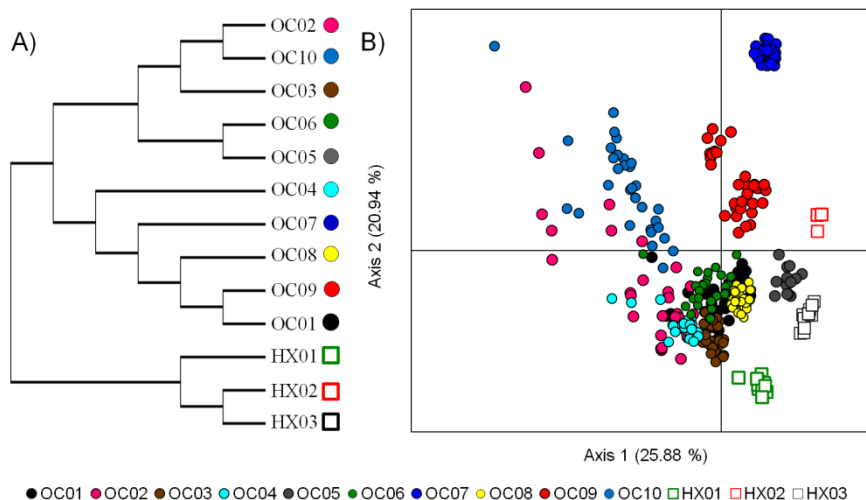


Fig. 3. Relationship between cytotypes of *Herbertia lahue* inferred by ISSR analysis. A) Neighbor-joining tree based on pairwise estimates of Nei's (1972) genetic distance between all pairs of 13 populations for the 112 ISSR loci. B) Principal coordinates analysis of ISSR data set among hexaploid and octoploid individuals of *H. lahue*. Principle coordinate axis 1 explains 25.88% of the variation, and axis 2 explains 20.94%. Hexaploids are indicated by squares, octoploids by circles. Abbreviations for cytotypes are defined in Table 2.

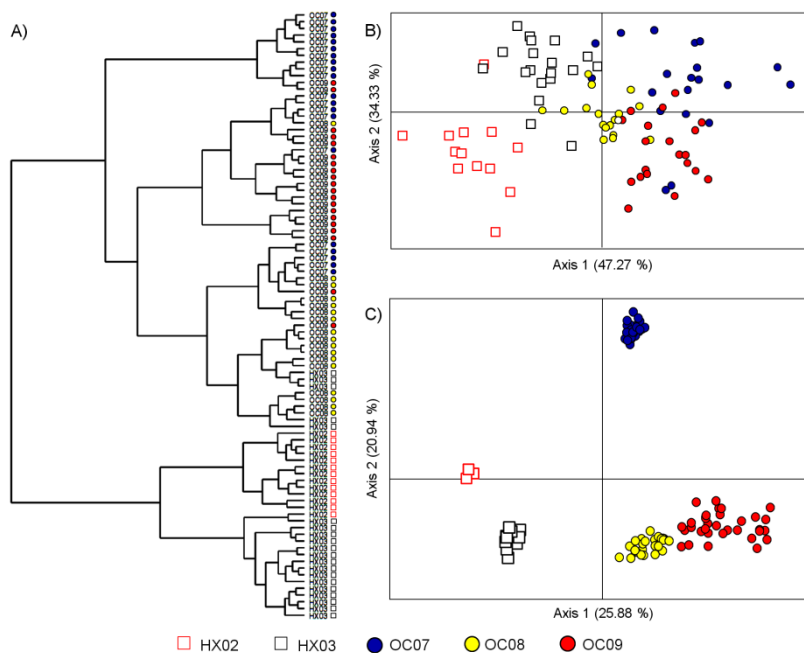


Fig. 5. Relationship between cytotypes of *Herbertia lahue* inferred from a combined analysis of floral morphology and molecular characters. A) Clustering analysis using Ward's method (1963) inferred through the variation in floral morphology observed in hexaploid and octoploid. The black arrows indicate hexaploids clustered between octoploids. Principal coordinate analysis using floral morphology variation (B) and ISSR loci (C). In (B) principle coordinate axis 1 explains 47.27 % of the variation, and axis 2 explains 34.33 %. In (C) principle coordinate axis 1 explains 25.88 % of the variation, and axis 2 explains 20.94 %. Hexaploids are indicated by squares, octoploids by circles, and abbreviations for cytotypes are defined in Table 2.

SUPPLEMENTARY DATA

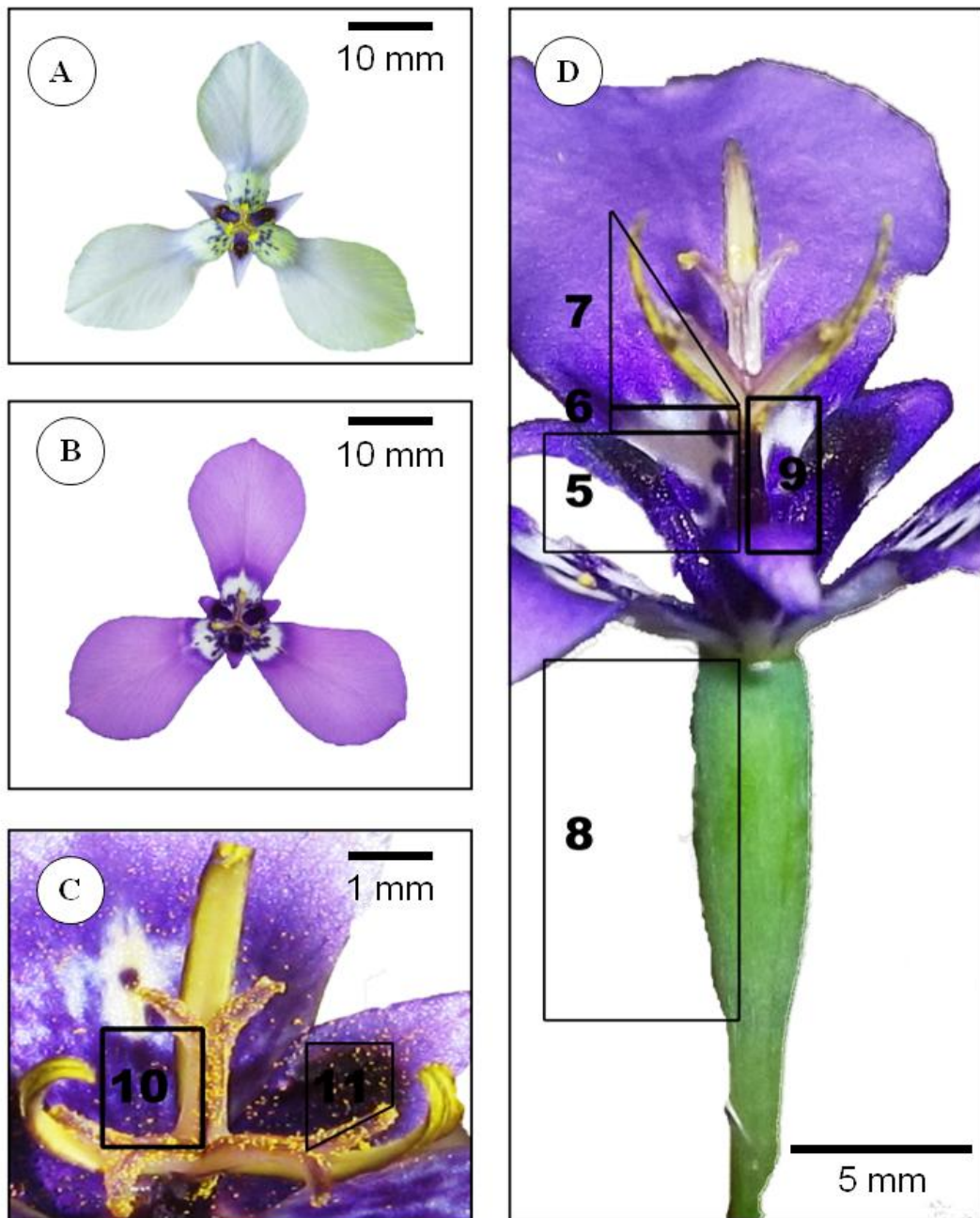


Fig. S1. Flowers of *Herbertia lahue* showing variation in tepal's shape found between hexaploids (A) and octoploids (B). Morphometric androecium characters measured: (5) staminal column length; (6) free filament length; and, (7) anther length. Morphometric gynoecium characters measured: (8) ovary length; (9) style length; (10) style branch length; and (11) length of the dichotomic end of style. All measurements were made in millimeters.

CAPÍTULO IV

BREEDING SYSTEM AND POPULATION GENETIC ANALYSES IN *HERBERTIA* SPECIES (IRIDACEAE)



A espécie mais basal na filogenia de *Herbertia* é *H. pulchella*, a única totalmente autoincompatível. Já *H. darwinii* e *H. quareimana* apresentam sistema reprodutivo misto, mas a autofecundação é prevenida na maioria das vezes. As três espécies tem populações com altos níveis de diversidade genética estimada.

**BREEDING SYSTEM AND POPULATION GENETIC ANALYSES IN
*HERBERTIA SPECIES (IRIDACEAE)***

Manuscrito em fase de submissão ao periódico *Botanical Journal of the Linnean Society*.

Eudes Maria Stiehl-Alves¹; Juliana Heck; Mardiore Tanara Pinheiro dos Santos³; Lilian Eggers²; Tatiana Teixeira de Souza-Chies^{1,2}.

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³Departamento de Biologia, Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, Rio Grande do Sul, Brazil.

Eudes Maria Stiehl-Alves held the sampling and identification of plant material, the laboratory work, manual pollination experiments, flower visitors observations, analysis and writing of the article. Juliana Heck helped in the manual pollination and pollen viability experiments. Mardiore Tanara Pinheiro dos Santos helped in the observation and identification of floral visitors, and manuscript revision. Lilian Eggers proceeded to the collect, sample identification and manuscript revision. Tatiana Teixeira de Souza-Chies conceived the project and participated in the writing of the manuscript.

ABSTRACT

Genetic variation and reproductive biology were investigated using ISSR markers, hand-pollination experiments and floral visitors behavior record in populations of *Herbertia darwinii*, *H. pulchella* and *H. quareimana* in southern Brazil. Genetic analyses indicated high levels of intra-population diversity and strong interpopulation differentiation ($F_{ST}= 0.482$), however, the levels of genetic variation were not related with geographic distance. Cluster analysis (UPGMA) revealed that the three species are genetically distinct, in agreement with the ordination by PCoA. Both *H. darwinii* as *H. quareimana* are partially self-incompatible species, but they are not capable of automatic selfing. Moreover, *H. pulchella* is fully self-incompatible. In the three species, ephemeral flowers are pollinated mainly by Apidae bees. Genetic analyses are consistent with expected for a combination of life history features (outcrossing, barochory seed dispersal, short-lived life form and regional geographic range). ISSR markers were effective to distinguish the three species. This study represents the first report of the genetic parameters and reproductive biology for outcrossing *Herbertia* species.

Key Words: *Apis mellifera*, *Centris*, genetic diversity, ephemeral flowers, inter simple sequence repeat (ISSR), mixed mating system, oil-producing flowers; solitary bees.

1. INTRODUCTION

Iridaceae (around 2,000 species in over 70 genera) are among the largest families of Asparagales, and is represented in nearly all continents (Goldblatt *et al.*, 2008). Iridaceae is marked by a wide diversity of pollination mechanisms favoring floral diversification and this factor contributes to a proposal for a bimodal distribution of its diversity (Bernhardt & Goldblatt, 2000; Goldblatt & Manning, 2006). Iridaceae's species found in temperate and highlands regions of Central and South America belongs to three tribes, Tigridieae, Trimezieae and Sisyrinchieae. Species with glandular trichomes which synthesize floral oils are particularly noteworthy in these taxonomic groups (Goldblatt & Manning, 2008; Chauveau *et al.*, 2011; Chauveau *et al.*, 2012). The presence of oil as floral reward is limited to eleven plant families (1,500 to 1,800 species) occurring in tropical and subtropical regions of the world and it was inferred that the evolution of floral oils in these groups occurred at least 28 times (Renner & Schaefer, 2010). Oil-bee species represent

about 2% of all bees (into Melittidae and Apidae) and they use this floral lipds, mixed with pollen, as constituent of the larval food and as materials for nest construction (Simpson & Neff, 1981; Cane *et al.* 1983).

The interaction between South African Iridaceae species and their pollinators is well detailed (Goldblatt & Bernhardt, 1999; Goldblatt, Bernhardt & Manning, 2002; Manning & Goldblatt, 2005; Goldblatt & Manning, 2006; Anderson *et al.*, 2009; Waal *et al.*, 2012). Likewise, molecular analysis utilizing genetic markers have been frequent in *Crocus* L. (Caiola, Caputo & Zanier, 2004; Sik *et al.*, 2008; Beiki, Keifi & Mozafari, 2010; Moraga *et al.*, 2010), *Gladiolus* L. (Ranjan *et al.*, 2010; Rymer *et al.*, 2010), *Iris* L. (Hannan & Orick, 2000; Wróblewska *et al.*, 2003; Sadler, 2007; Saad & Mahy, 2009) and *Sisyrinchium* L. species (Tacuatiá *et al.*, 2012). Outcrossing is prevalent breeding system in many Iridaceae species and it is favored by physical and physiological barriers to the selfing (Bernhardt & Goldblatt, 2000; Goldblatt & Manning, 2006). Different syndromes promotes the pollen flow and include pollination carried by Hymenoptera (mostly bees), Coleoptera (beetles), Diptera (short- and long-proboscid flies) and Lepidoptera (butterflies and moths), or by passerine birds (Nectarinidae) (Bernhardt & Goldblatt, 2000; Sapir, Shmida & Ne'eman, 2005; Goldblatt & Manning, 2006). Evidences accumulated allow inferring that a relationship exists between diversity of pollination mechanisms and species diversity in Iridaceae, showing the great phenotypic plasticity that characterizes the family (Bernhardt & Goldblatt, 2000; Goldblatt & Manning, 2006). Genetically, moderate to strong differentiation among populations appears to be a trend in taxa of Iridaceae already investigated, possibly due to a combination of effects of genetic drift among populations and factors that contribute to the reduction of gene flow between populations. As opposed, are few studies of reproductive biology and population genetics in species of Tigridaeae. This fact represents a barrier to understand the evolutionary processes involved in intense radiations floral in Tigridaeae.

Herbertia Sweet (Tigridaeae) comprises seven species of herbaceous, bulbous, perennial and seasonal plants spread in grassland areas in South American (Goldblatt, Manning & Rudall, 1998). Rio Grande do Sul state (in southern Brazil) is the center of diversification, presenting six species of *Herbertia* (including endemic one) (Eggers *et al.*, 2013). Knowledge of the reproductive biology and genetic diversity estimates are lacking for *Herbertia*, despite its outstanding presence in grasslands of southern Brazil. Their

species represent one interesting study group because they present different geographical range. The sources of morphological variation in *Herbertia* are the flowers and species are morphologically distinct from each other based on small changes in the androecium and gynoecium (Goldblatt & Manning, 2008). The most recent phylogenetical analysis focused on Tigridaeae showed that *Herbertia* is monophyletic and was distinguished by a combined analysis of molecular characters and morphological (Chauveau *et al.*, 2012). Notably, in *Herbertia* species, glandular trichomes are located in the inner and outer tepals of the flower, a characteristic that distinguishes this genus in Tigridaeae (Chauveau *et al.*, 2012). The presence of oil-producing flowers in *Herbertia* raises the possibility of interaction with specialized pollinators, the oil-bee collectors.

We focus on three *Herbertia* species (*Herbertia darwinii* Roitman & J.A. Castillo, *Herbertia pulchella* Sweet and *Herbertia quareimana* Ravenna). Either *H. darwinii* as the *H. quareimana* have been shown by the phylogenetic analysis forming a strongly supported monophyletic group, whereas *H. pulchella* has been shown with strong support as sister to the other *Herbertias*. Affinities shared between these three species are secondary divisions of the style arms recurved, contrasting with the other straight secondary divisions in *Herbertia* (Roitman & Castillo, 2008). In order to contribute with evidences that will allow to highlight our understanding of the *Herbertia's* evolution, the present study aimed: (1) to elucidate about the reproductive biology of the three species, and (2) to estimate the levels of genetic diversity and differentiation among populations. The knowledge generated by analyzes presented here will serve as support for inferences about the evolutionary aspects involved in the diversification of Tigridaeae species.

2. MATERIALS AND METHODS

Study area and plant species – All the analyses were conducted from 2009–2011 in grassland areas in Rio Grande do Sul State, Brazil (Fig.1). For molecular analysis, material foliar of twelve populations was collected. Species, collection sites, number of collected individuals by population and type of analyses appear in Table 1. Voucher specimens were deposited in the ICN Herbarium, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Table 1. Sample collection data and analyses.

| Population code | Latitude and Longitude | Location | No. of sampled individuals | ⁽¹⁾ Type of analyses | Voucher |
|-----------------------------|------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------------------|-----------------|
| <i>Herbertia darwinii</i> | | | | | |
| Darw01 | 29°32'20.8"S 56°48' 3.9"W | Itaqui | 30 | G / BS / FV / P | Aita90 |
| Darw02 | 30°52'29.9"S 55°28'54.0"W | Livramento | 32 | G / BS / P | ESC502 |
| Darw03 | 28°53'41.3"S 55°39'15.5"W | São Borja | 32 | G / BS / P | ESC548 |
| <i>Herbertia pulchella</i> | | | | | |
| Pulc01 | 30°19'16.7"S 51°52'28.2"W | São Jerônimo do Sul | 30 | G | Alves29 |
| Pulc02 | 31°31'06.4"S 53°31'11.0"W | Pinheiro Machado | 14 | G | ESC441 |
| Pulc03 | 31°01'16.4"S 52°03'09.7"W | Cristal | 30 | G / P | ESC671 |
| Pulc04 | 30°41'44.5"S 53°23'35.5"W | Caçapava do Sul | 32 | G / BS / FV / P | TLSALVES 168 |
| Pulc05 | 30°03'18.9"S 51°07'34.7"W | Porto Alegre | 5 | BS / FV / P | ESC260 |
| <i>Herbertia quareimana</i> | | | | | |
| Quar01 | 30°16'37.7"S 56°30'05.6"W | Quaraí | 31 | G | Alves09 |
| Quar02 | 30°11'43.6"S 56°29'19.6"W | Quaraí | 37 | G / BS / FV / P | ESC513 |
| Quar03 | 29°54'34.9"S 57°09'02.7"W | Uruguaiana | 30 | G | ESC520 |
| Quar04 | 28°27'21.8"S 54°23'56.7"W | Entre-Ijuís | 30 | G / BS | ESC536 |

⁽¹⁾ Type of analyses= genetic analyses (G); breeding system analyses (BS); floral visitors (FV); pollen viability (P).

Breeding System – In order to determine the breeding system of *H. darwinii*, *H. pulchella* and *H. quareimana*, we performed *ex situ* hand-pollination experiments (Table 1). The following treatments were applied: (1) Manual cross-pollination: emasculated flowers were pollinated with a fresh pollen mixture collected from distinct plants and bagged; (2) Manual self-pollination: emasculated flowers were pollinated with their own pollen and bagged; (3) Spontaneous pollination: non-emasculated flowers were bagged to assessing the ability to spontaneous self-pollination. A non-parametric Kruskal-Wallis procedure in the PAST 2.15 software (Hammer *et al.*, 2001) was used to analyze the

statistical significance of the results obtained in hand-pollination experiments described above. Dunn test at 5% probability was applied when necessary to estimate the difference among the mean values of the different treatments. Additionally, pollen grain viability was evaluated by the Alexander (1980) staining method. For this analysis, flower buds were collected and fixed in ethanol: acetic acid (3:1) solution (12-24 hours). The populations used in this analysis are detailed in Table 1. After fixation, the flower buds were transferred to tubes containing ethanol 70% and were stored at -18 °C.

Floral visitors were observed *in situ* (Table 1). The behavior of both pollination and flowers visitors was recorded in the field through notes and photographs and video record, whenever possible. The observations were made during September–November (2010 and 2011) at one population of *H. darwinii* (Darw01), two populations of *H. pulchella* (Pulc04 and Pulc05), and one population of *H. quareimana* (Quar02). Flower visitors and their behaviour were observed over a period of 1–5 days per site, for a total of 180, 5,100 and 1,920 minutes, respectively in *H. darwinii*, *H. pulchella* and *H. quareimana* populations.

Molecular Analysis – Fresh leaves material was collected from populations of *Herbertia darwinii*, *H. pulchella* and *H. quareimana* (Table 1) for genetic analyses. Leaf tissue was placed individually in a sealable, plastic bag containing up to 30 g of indicator silica, transported to the laboratory, and stored at room temperature until completely dry. DNA sample extraction was based on the method of Doyle & Doyle (1987) with modifications. Six ISSR primers (from a total of 25 primers tested) anchored at the 3' end that gave consistent profiles across the populations were used. All ISSR reactions was carried out in 25 µL reactions using: 1 X Buffer Taq DNA polymerase; 2.4 mM MgCl₂; 1.6 mM dNTP mixture (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil); 0.4 mM of each primer (Integrated DNA Technologies/IDT); 1 U Taq DNA polymerase (CenBiot, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil); and 20–30 ng of genomic DNA. Amplification reactions were carried out in an Applied Biosystems – Veriti 96 Well Thermal Cycle. The thermocycler program used for the reactions was as follows: 94 °C for 5 min (1 cycle); 94 °C for 1 s followed by annealing at 48 °C for 45 s and elongation at 72 °C for 2 min (40 cycles); and a final extension at 72 °C for 5 min. The PCR products were stained with GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA), applied to a 1.5% agarose gel. Electrophoresis was performed in 0.5× Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer (pH

8.0) at 85 V for 2 – 2.5 h. The electronic image of the agarose gel was captured and documented using the Bio-Rad Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA). Bands were scored manually and molecular weights were assigned to each band by using a 100 bp ladder. Each ISSR band/locus was scored as “1” for presence and “0” for absence. The cares with the band reproducibility included the use of positive controls, as well as performing extra amplifications and electrophoresis. Bands/loci appearing in at least two of three replicates were considered present. Bands whose sizes were within 10 bp of each other were merged to account for any potential band migration discrepancies.

The dominant nature of ISSR makes impossible to distinguish unambiguously between homozygotes (region present/present) and heterozygotes (region present/absent). Thus, additional assumptions must be made to estimate genetic diversity. Gene diversity computations (percentage of polymorphic loci [% P], Shannon’s index [I], and unbiased Nei’s gene diversity [H_e]) were performed in GENALEX 6 (Peakall & Smouse, 2006) which uses the Lynch & Milligan (1994) method to estimate allele frequencies. A Bayesian approach was also applied with HICKORY version 1.1 (Holsinger *et al.*, 2002), in order to estimate intrapopulation gene diversity (H_s). In this case, the assumption of Hardy-Weinberg is not considered for the calculations and no prior knowledge of the degree of within-population inbreeding is assumed. We have explored the Principal Coordinates Analysis (PCoA) implemented in GENALEX 6, in order to infer intrapopulation genetic similarity. For this purpose, the intrapopulation unbiased genetic matrix of pairwise distances was used.

Two approaches were used to infer population structure and genetic differentiation. An analysis of molecular variance (AMOVA) was conducted in ARLEQUIN 3.5 (Excoffier and Lischer, 2010) to infer population genetic structure and differentiation. Here, the ISSR phenotypes are treated like haploid restriction fragment length polymorphism data to compensate for the dominant nature of ISSR markers (assuming data to fully linked sites without recombination). Additionally, the relationship between binary genetic distances and the natural log of geographic distances among populations was evaluated using a Mantel test implemented in GENALEX 6. Comparatively, Bayesian estimation was made to calculate Θ_{II} (which is a measure of genetic differentiation analogous to statistic of Weir & Cockerham , 1984) and Θ_{III} . These calculations were

performed in HICKORY version 1.1. In this case, genetic differentiation was calculated according to the default settings under four different models: (1) full model, which includes priors for inbreeding (f) and differentiation (θ); (2) $f=0$ model, which assumes no inbreeding; (3) $\theta=0$ model, which assumes no population differentiation; and (4) f free model, which chooses values of f at random from its prior distribution to incorporate uncertainty in the magnitude of inbreeding. The deviance information criterion (DIC) was used to evaluate the fit between the data and a particular model and to choose among models (Holsinger *et al.*, 2002).

Unbiased genetic distance matrix (Nei, 1978) was generated by Tools for Population Genetic Analyses – TFPGA version 1.3 (Miller, 1997) to construct an unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) topology, which computed 1000 permutations and estimated the confidence limits of the dendrogram. For assessing the consistency of the NJ tree obtained, major patterns in the genetic data were visualized using principal coordinates analysis (PCoA) of unbiased pairwise genetic distances between populations of all three species.

3. RESULTS

Breeding system and Floral Visitors – The flower opening occurs synchronously within each species and among them. Flowering occurs over a period of three months (september to november) for the three species analyzed. Flowers are ephemeral (they open during a single day) and floral opening in *Herbertia darwinii*, *H. pulchella* and *H. quareimana* begins in the morning (about 7:00 h) and extends into the early afternoon (approximately 14:00 h). By flowering season, each species commonly produces a variable number of flowers per individual, which may vary from four to about ten flowers. Circa of two months after reproductive events, the capsules are ripe and the seeds are dispersed by gravity or by animals. After the reproductive period, the leaves are lost, remaining only underground bulbs that ensure perennial species in their environment.

During the flowering season in 2010 and 2011, it was totalized 120 hours of observations in the four populations analyzed (*H. darwinii*, three hours; *H. pulchella*, 85 hours; and, *H. quareimana*, 32 hours). *Apis mellifera* (Hymenoptera) represents the kind of floral visitors most frequently observed in three of the four populations (Darw01, Pulc05 e Quar02; Table 1). In Pulc04 (*H. pulchella*; Table 1), oil-bees (Apidae) was first recorded:

Centris sp. (Centridini) and *Arhysoceble picta* (Tapinotaspidini) (Fig. 2). Pollen bees have also been registered visiting flowers of *H. pulchella* in Pulc04 population: *Augochora* sp. (Halictidae) and *Trigona* sp. (Meliponina: Apidae). Behavior of the oil-bees *Centris* sp. in *H. pulchella* includes scraping the base of the outer tepals, where are scattered glandular trichomes. When performing such activity, the dorsal part of the bee touches the anthers, freeing up the pollen this way. In the case of pollen bees, it investigates the anthers looking for pollen. In both cases, several flowers of *Herbertia* are visited in the population.

Pollen viability by staining method was high in the three species analyzed (Table 2). Relative to the breeding system, *H. pulchella* is self-incompatible (Table 2). Although plants analyzed of *H. darwinii* and *H. quareimana* set seeds through manual self-pollination, there is significant differences between treatments of manual self-pollination and cross-pollination (in *H. darwinii*, $H= 21.98$, $p > 0.0001$; and, *H. quareimana*, $H= 13.63$, $P= 0.001$). Furthermore, no fruit were formed by spontaneous autogamy, indicating that this two species require the agency of a pollinator in order to set fruit. The average seed setting by manual cross-pollination was high (in *H. darwinii*, 67.5 ± 34.3 ; in *H. pulchella*, 56.4 ± 31.9 ; and, *H. quareimana*, 63.0 ± 34.4 ; Table 2), in contrast to the average seed setting verified by manual self-pollination (in *H. darwinii*, 18.6 ± 11.5 ; and, *H. quareimana*, 12.2 ± 2.4 ; Table 2).

Genetic Population Analyses – It was generated a total of 125 loci with six ISSR primers: 64 loci for *H. darwinii*, 66 loci for *H. pulchella* and 88 loci for *H. quareimana*. The average number of loci detected per population ranged from 6.3 to 11.7. Considering all populations, the highest number of bands was detected with the primers P02 and F13 (respectively, 37 and 41 ISSR bands). Species-specific bands were detected in *H. darwinii* (eight bands for five primers), *H. pulchella* (three bands for three primers) and *H. quareimana* (five bands for four primers).

Band-based and allele frequency-based estimates indicated lower genetic diversity in all three species combined ($P= 39.70\%$; $H_e= 0.223$; $I= 0.153$), and great genetic diversity among populations of each species: *H. darwinii* ($P= 76.04\%$; $H_e= 0.295$; $I= 0.429$); *H. pulchella* ($P= 67.42\%$; $H_e= 0.260$; $I= 0.377$); and *H. quareimana* ($P= 63.35\%$; $H_e= 0.243$; $I= 0.354$; Table 3). Bayesian estimates of genetic diversity calculated without assumptions for inbreeding or Hardy–Weinberg equilibrium were similar for all species: *H. darwinii* ($H_S= 0.332$ with a range of 0.285–0.396); *H. pulchella* ($H_S= 0.271$ with a range of

0.197–0.304); and, *H. quareimana* ($H_S = 0.261$ with a range of 0.251–0.272; Table 4). In addition, Bayesian estimates of the panmictic heterozygosity were significantly higher ($H_T = 0.308$; Table 3) in all three species combined and individually (in *H. darwinii*, $H_T = 0.404$; in *H. pulchella*, $H_T = 0.343$; and, in *H. quareimana*, $H_T = 0.356$; Table 3).

Table 2. Hand-pollination experiments and pollen viability in three *Herbertia* species. Different letters (a or b) reveal significant differences at $P < 0.001$ by Dunn test.

| Treatment | Number of flowers treated | Fruits setting seeds | | Seed set mean \pm SE | Pollen viability |
|-----------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------|------------------------------|------------------|
| | | N | Success rate(%) | | |
| <i>Herbertia darwinii</i> | | | | | |
| Manual cross-pollination | 37 | 35 | 94.6 | 67.5 ^a \pm 34.3 | 3273 (93.0 %) |
| Manual self-pollination | 32 | 13 | 40.6 | 18.6 ^b \pm 11.5 | |
| Spontaneous pollination | 30 | 1 | 3.3 | — | |
| <i>Herbertia pulchella</i> | | | | | |
| Manual cross-pollination | 20 | 15 | 75.0 | 56.4 \pm 31.9 | 5971 (93.8 %) |
| Manual self-pollination | 15 | 1 | 6.7 | — | |
| Spontaneous pollination | 18 | 1 | 5.6 | — | |
| <i>Herbertia quareimana</i> | | | | | |
| Manual cross-pollination | 23 | 21 | 91.3 | 63.0 ^a \pm 34.4 | 4445 (94.5 %) |
| Manual self-pollination | 18 | 5 | 27.8 | 12.2 ^b \pm 2.4 | |
| Spontaneous pollination | 21 | 1 | 4.8 | — | |

Considering all populations combined, all of them were strongly differentiated ($F_{ST} = 0.482$, $P = 0.001$), as well as considering within *H. darwinii* ($F_{ST} = 0.303$, $P = 0.001$), *H. pulchella* ($F_{ST} = 0.285$, $P = 0.001$), and *H. quareimana* ($F_{ST} = 0.341$, $P = 0.001$) (Table 4). Pairwise comparisons of all populations of the three species revealed similar estimates: $F_{ST} = 0.475$, $P = 0.001$ (combining *H. darwinii* and *H. pulchella* populations); $F_{ST} = 0.471$, $P = 0.001$ (combining *H. darwinii* with *H. quareimana* populations); and, $F_{ST} = 0.495$, $P = 0.001$ (with *H. pulchella* and *H. quareimana* populations) (Table 4). The deviance

information criterion values (DIC) presented better fit of the data to the full model (Holsinger *et al.*, 2002). Under full model, Bayesian estimates of genetic differentiation were similar with $\Theta_{II}= 0.333$ considering all populations combined, $\Theta_{II}= 0.283$ among *H. darwinii* populations, $\Theta_{II}= 0.319$ among *H. pulchella* populations, and $\Theta_{II}= 0.412$ among *H. quareimana* populations (Table 4).

Table 3. Descriptive statistics for each population and across all populations of three *Herbertia* species considered here. Genetic diversity measures were calculated from a dominant inter-simple sequence repeat binary data set.

| Populations | <i>P</i> | <i>I</i> | <i>H_e</i> | <i>H_s</i> | <i>H_T</i> |
|------------------------------------|----------|----------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <u>All populations combined</u> | 39.70 | 0.223 | 0.153 | 0.220 | 0.308 |
| <u><i>Herbertia darwinii</i></u> | | | | | |
| Darw01 | 68.75 | 0.410 | 0.287 | 0.285 | – |
| Darw02 | 75.00 | 0.420 | 0.287 | 0.315 | – |
| Darw03 | 84.38 | 0.458 | 0.301 | 0.396 | – |
| Mean | 76.04 | 0.429 | 0.295 | 0.332 | 0.404 |
| <u><i>Herbertia pulchella</i></u> | | | | | |
| Pulc01 | 74.24 | 0.436 | 0.303 | 0.297 | – |
| Pulc02 | 45.45 | 0.248 | 0.173 | 0.197 | – |
| Pulc03 | 74.24 | 0.399 | 0.272 | 0.287 | – |
| Pulc04 | 75.76 | 0.425 | 0.292 | 0.304 | – |
| Mean | 67.42 | 0.377 | 0.260 | 0.271 | 0.343 |
| <u><i>Herbertia quareimana</i></u> | | | | | |
| Quar01 | 62.50 | 0.342 | 0.233 | 0.251 | – |
| Quar02 | 68.18 | 0.365 | 0.247 | 0.272 | – |
| Quar03 | 62.50 | 0.358 | 0.248 | 0.268 | – |
| Quar04 | 60.23 | 0.350 | 0.244 | 0.252 | – |
| Mean | 63.35 | 0.354 | 0.243 | 0.261 | 0.356 |

Notes: *P*= (%) percentage of polymorphic loci; *I*= Shannon's information index. *H_e* = Unbiased Expected Heterozygosity. These estimates performed in GENALEX 6 (Peakall & Smouse, 2006). *H_s*= Bayesian estimates of genetic diversity within each population (defined as average panmictic heterozygosity). *H_T* is the panmictic heterozygosity based on mean allele frequencies. These estimates performed in HICKORY (Holsinger *et al.*, 2002).

Table 4. Genetic differentiation among populations of three *Herbertia* species calculated for all populations using the presence – absence data set. Calculations for F - statistics were performed with ARLEQUIN, and calculations for Θ_{II} and Θ_{III} were performed with HICKORY using the full model.

| Genetic differentiation | F_{ST} | F_{SC} | F_{CT} | Θ_{II} | Θ_{III} | DIC |
|---|----------|----------|----------|---------------|----------------|---------|
| All populations combined | 0.482 | 0.331 | 0.226 | 0.333 | 0.271 | 5303.09 |
| All <i>Herbertia darwinii</i> populations | 0.303 | — | — | 0.283 | 0.175 | 923.93 |
| All <i>Herbertia pulchella</i> populations | 0.285 | — | — | 0.319 | 0.196 | 1027.41 |
| All <i>Herbertia quareimana</i> populations | 0.341 | — | — | 0.412 | 0.252 | 1347.73 |
| All <i>H. darwinii</i> and <i>H. pulchella</i> populations combined | 0.475 | 0.297 | 0.253 | 0.456 | 0.319 | 1931.06 |
| All <i>H. darwinii</i> and <i>H. quareimana</i> populations combined | 0.471 | 0.337 | 0.202 | 0.485 | 0.336 | 2245.88 |
| All <i>H. pulchella</i> and <i>H. quareimana</i> populations combined | 0.495 | 0.323 | 0.254 | 0.482 | 0.348 | 2461.00 |

Note: *Values significant at $P= 0.001$. Deviance Information Criterion (DIC) was used to evaluate the fit between the dataset and a particular model.

Pairwise population comparisons for F_{ST} indicated that interspecific differentiation was not higher in relation to intraspecific differentiation in most cases, except in populations of *H. pulchella*, which are less differentiated. AMOVA estimates indicated that much of the observed variation was due to differences within populations (60%) rather than differences among populations (20%) (Table 5). There was no significant correlation between genetic and geographic distances when all populations were tested ($r= 0.399$, $P= 0.011$; Table 4), moreover when populations of each species were tested separately ($r= 0.955$, $P= 0.186$ for *H. darwinii*; $r= 0.296$, $P= 0.280$ for *H. pulchella*; and, $r=0.914$, $P= 0.243$ for *H. quareimana*; Table 4).

PCoA analysis of individuals and populations (Figure 3) revealed that the three species are genetically distinct (Figure 3A). Axis 1 explained 44.98% of the variation and it is consistent with the grouping inferred by the UPGMA dendrogram produced by TFPGA (Figure 4). Within populations, most of the individuals showed near similarity through PCoA estimates (Figure 3B). Axis 1 explained 34.12% of the variance and

allowed visualize some individuals less similar, especially in the self-incompatible *H. pulchella*.

Table 5. Hierarchical analysis of molecular variation (AMOVA) in *Herbertia* species showing the proportion of variation attributable to differences among species and populations, within species, and within populations.

| Source of variation | Degrees of freedom | Sum of squares | Percentage of variation |
|------------------------------------|--------------------|----------------|-------------------------|
| <u>All species</u> | | | |
| Among Pops | 10 | 2732.759 | 40 |
| Within Pops | 322 | 4149.45 | 60 |
| <u><i>Herbertia darwinii</i></u> | | | |
| Among Pops | 2 | 317.57 | 30 |
| Within Pops | 92 | 1017.80 | 70 |
| <u><i>Herbertia pulchella</i></u> | | | |
| Among Regions | 1 | 198.46 | 17 |
| Among Pops | 2 | 128.64 | 14 |
| Within Pops | 106 | 1182.52 | 70 |
| <u><i>Herbertia quareimana</i></u> | | | |
| Among Regions | 1 | 249.70 | 6 |
| Among Pops | 2 | 405.82 | 30 |
| Within Pops | 124 | 1574.73 | 64 |

4. DISCUSSION

In the present study, the species analyzed seed set primarily through cross-pollination, suggesting the presence of a self-incompatibility system which prevents self-pollen to fertilize ovules and produce seeds. A combination of physical and physiological mechanisms which encourage outcrossing is common to several species of Old World Iridaceae (Goldblatt & Bernhardt, 1999; Goldblatt *et al.*, 2000; Goldblatt & Manning, 2006; de Waal *et al.*, 2012). If on one hand the intraspecific synchronic flowering seen in *Herbertia darwinii*, *H. pulchella* and *H. quareimana* could promote cross-pollination,

likewise the contact by self-stigmas with pollen is possible. Thus, the inbreeding depression can be avoided by the presence of mechanisms that prevent selfed progeny (Holsinger, 2000).

Pollination in the three *Herbertia* species is mediated mainly by bees, including pollen bee (mostly *A. mellifera*) and female oil-bee collectors in a population of *H. pulchella*. Less specialized pollination systems are well documented for various taxa of Iridaceae from Old World presenting flowering overlap intra and intergeneric, possibly as a strategy related to the availability of pollinators (Goldblatt *et al.*, 1995; Goldblatt *et al.*, 2000; Goldblatt *et al.*, 2002; Manning & Goldblatt, 2005; Rymmer *et al.*, 2010). Considering the limited number of flowers produced individually by *Herbertia* species (around ten flowers per flowering season), flowering synchronic would serve to increase floral display, increasing the likelihood of pollinations.

In the present study, neutral inter-SSR markers were successful in showing diversity within the populations as well as to reveal great genetic differentiation among populations in the three species. Populations representing the three species are characterized by genetic parameters which are similar to values found in short-lived perennials, regional, gravity seed dispersal and outcrossing species (Nybom, 2004). The genetic diversity estimates for *H. darwinii*, *H. pulchella* and *H. quareimana* were higher than those found in rare and endangered *Iris aphylla* L. (Shannon's diversity values 0.21, 0.23 and 0.24, using 388 random amplified polymorphic markers in three populations; Wróblewska *et al.*, 2003). Moreover, our estimates were similar to those obtained in three species of *Iris* using 43 RAPD bands: *I. cedretii* Dinsmore ex Chaudhary, *I. sofarana* subsp. *kasruwana* (Dins.) Chaudhary and *I. sofarana* Foster subsp. *sofarana* (Saad & Mahy, 2009). These *Iris* species reproduce by sexual means; however, the vegetative spread by rhizomes is a possibility. Furthermore, estimates of genetic diversity were also similar to those based in a molecular analysis using inter-SSR in populations of oil-flower *Sisyrinchium micranthum* Cav., that presents populations with some geographic overlap with the three species focused in this study (Tacuatiá *et al.*, 2012).

The estimates of F_{ST} are larger than expected to outcrossing species ($F_{ST} = 0.27$; Nybom, 2004); moreover, our estimates are lower when considering different life history traits: short-lived perennials, regional, gravity seed dispersal (respectively, $F_{ST} = 0.41$, 0.42 and 0.45; Nybom, 2004). The estimates presented here are similar to F_{ST} estimates

obtained for other Iridaceae: *I. aphylla* (in pairwise comparisons F_{ST} range 0.17–0.31; Wróblewska *et al.*, 2003) and *S. micranthum* ($F_{ST} = 0.33$; Tacuatiá *et al.*, 2012). In *I. aphylla*, the strong differentiation among populations was correlated with geographic distance. In *S. micranthum*, the pollinator behavior seems to influence the differentiation estimates obtained by Tacuatiá *et al.* (2012), once the populations are located near and within a conservation area. Here, the differentiation estimated levels seems be result from a sum of factors that restrict gene flow among populations, including fluctuations in pollinator guild. Thus, pollinator quantitative analysis would be desirable in order to elucidate this issue.

AMOVA analysis indicates that major differences are observed within populations rather than among populations. The lack of significant correlation between genetic and geographic distances is not consistent with isolation by distance, however, the estimates showed strong differentiation among populations. Vicariance events related to fragmentation by anthropic action in the areas of natural occurrence of the species may lead populations to genetic drift. Comparatively, the Hickory Bayesian estimation of Θ_{III} , the variance is measured among contemporaneous populations assuming that samples have been taken from every population that is exchanging genes and may be different from Θ_{II} if the number of populations sampled is small (Holsinger *et al.*, 2002). Estimates of Θ_{III} were lower compared to Θ_{II} estimates and perhaps better reflect the differentiation from our sample set, since the F_{ST} value is an estimation sensitive to all samples (Nybom, 2004).

We report here the first estimates of genetic diversity and differentiation for populations of three species of *Herbertia*, *H. darwinii*, *H. pulchella* and *H. quareimana*, using for this purpose neutral inter-SSR markers. In addition, our focus included analyzes of the breeding system and register the type of pollinator most often found in these species. Results indicated that the species are self-incompatible and pollinated mainly by Apidae bees, a common fact to several species of Old World Iridaceae. Since they are dependent of the pollinator in order to set fruit, it is possible that quantitative fluctuation in the guild of the pollinators have direct impact on genetic parameters of the three species analyzed. Interestingly, three (of four) *H. pulchella* populations are genetically quite diverse and less differentiated from each other; interestingly these populations are located in areas with less human impact. In Iridaceae, a similar situation was described by Wróblewska *et al.* (2003) when they compared the genetic diversity in the endangered *Iris aphylla*. Here, in Pulc04,

oil-bees were observed visiting flowers looking for floral lipids. Larval provisioning is possibly the main usefulness of this resource for oil-bees, though some species also use oils for water-resistant cell linings (Renner & Schaeffer, 2010; Chauveau *et al.*, 2012). Genetic parameters inferred by Bayesian estimation proved to be most sensitive to detect differentiation in our dataset. This study showed that Inter-SSR molecular markers were efficient in detecting genetic diversity for three species, as well as distinguish them by molecular tools.

5. REFERENCES

- Alexander MP. 1980.** A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology* **55**: 13–18.
- Bernhardt P, Goldblatt P. 2000.** The diversity of pollination mechanisms in the Iridaceae of southern Africa. In: Wilson KL & Morrison DA. *Monocots: Systematics and Evolution*. CSIRO, Melbourne, Australia, p.301–308.
- Chauveau O, Eggers L, Raquin C, Silvério A, Brown S, Couloux A, Cruaud C, Kaltchuk-Santos E, Yockteng R, Souza-Chies TT, Nadot S. 2011.** Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Annals of Botany* **107**: 1287–1312.
- 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.
- Cocucci AA, Vogel S. 2001.** Oil-producing flowers of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. *Flora* **196**:26–46.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11–15.
- Goldblatt P, Manning JC, Bernhardt P. 1995.** Pollination biology of *Lapeirousia* subgenus *Lapeirousia* (Iridaceae) in southern Africa; floral divergence and adaptation for long-tongued fly pollination. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **82**: 517-534.
- Goldblatt P, Manning JC, Rudall P. 1998.** Iridaceae. In: Kubitzki K, ed. *The Families and Genera of Vascular Plants. III Flowering Plants. Monocotyledons: Lilianae*. Springer, Berlin, 295–333.

- Goldblatt P, Bernhardt P. 1999.** Pollination of *Moraea* species (Iridaceae) with a staminal column. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **86**: 47–56.
- Goldblatt P, Manning JC, Bernhardt P. 2000.** Adaptive radiation of pollination mechanisms in *Sparaxis* (Iridaceae: Ixioideae). *Adansonia* **22**: 57–70.
- Goldblatt P, Bernhardt P, Manning JC. 2002.** Floral biology of *Romulea* (Iridaceae: Crocoideae): a progression from a generalist to a specialist pollination system. *Adansonia* **24**: 243–262.
- Goldblatt P, Manning JC. 2006.** Radiation of pollination systems in the Iridaceae of Sub-Saharan Africa. *Annals of Botany* **97**: 317–344.
- Goldblatt P, Manning JC. 2008.** The *Iris* Family: Natural History and Classification. Timber Press.
- Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, Davies TJ, Manning JC, van der Bank M, Savolainen V. 2008.** Iridaceae ‘out of Australasia’? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. *Systematic Botany* **33**: 495–508.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001.** PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**: 9pp.
- Holsinger KE. 2000.** Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 7037–7042.
- Holsinger KE, Lewis PO, Dey DK. 2002.** A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Molecular Ecology* **11**: 1157–1164.
- Manning JC, Goldblatt P. 2005.** Radiation of pollination systems in the cape genus *Tritoniopsis* (Iridaceae: Crocoideae) and the development of bimodal pollination strategies. *International Journal of Plant Science* **166**: 459–474.
- Nybom H. 2004.** Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* **13**: 1143–1155.
- Peakall R, Smouse PE. 2006.** GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288–295.
- Ravenna P. 1989.** A new species of *Herbertia* (Iridaceae) from SE South America. *Nordic Journal of Botany* **9**: 55–56.
- Renner SS, Schaefer H. 2010.** The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. *Philosophical Transactions of Royal Society* **365**: 423–435.

- Rymer PD, Manning JC, Goldblatt P, Powell MP, Savolainen V. 2010.** Evidence of recent and continuous speciation in a biodiversity hotspot: a population genetic approach in southern African gladioli (*Gladiolus*: Iridaceae). *Molecular Ecology* **19**: 4765–4782.
- Saad L, Mahy G. 2009.** Molecular and morphological variation of rare endemic *Oncocyclus* irises (Iridaceae) of Lebanon. *Botanical Journal of the Linnean Society* **159**: 123–135.
- Silverio A, Nadot S, Souza-Chies TT, Chauveau O. 2012.** Floral rewards in the tribe Sisyrinchieae (Iridaceae): oil as an alternative to pollen and nectar? *Sex Plant Reprod* **25**: 267–279.
- Swofford D. 2003.** *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony*, v.4.10b. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Tacuatiá LO, Eggers L, Kaltchuk-Santos E, Souza-Chies TT. 2012.** Population genetic structure of *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae) in Itapuã State Park, Southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* **35**: 99–105.
- Waal C, Anderson B, Barrett SCH. 2012.** The natural history of pollination and mating in bird-pollinated *Babiana* (Iridaceae). *Annals of Botany* **109**: 667–679
- Weir BS, Cockerham CC. 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358–1370.
- Wróblewska A, Brzosko E, Czarnecka B, Nowosielski J. 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.

FIGURES

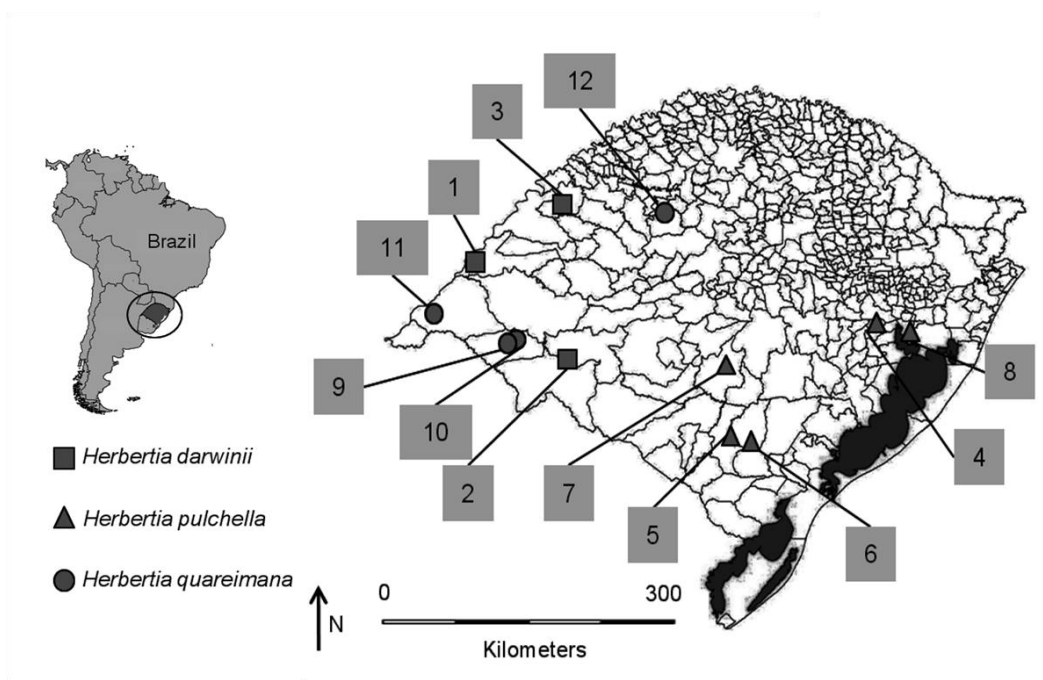


Figure 1. Map of the studied sampling populations of three *Herbertia* species. A) Map of South America. B) Distribution of the sampling sites in Rio Grande do Sul State. Numbers indicate populations and coordinates are given in Table 1.



Figure 2. *Herbertia* species and its pollinators. A, *Centris* sp. (Centridini) pollinating *H. pulchella* flower. Should be noted that bee searching the inside of tepals, where they are scattered glandular trichomes. During this activity, the dorsum of the bee touches the anther. B, *Arhysoceble picta* (Tapinotaspidini) on the tepals of *H. pulchella*. C, *Augochora* sp. (Halictidae) pollinating *H. pulchella* flower. Note that the bee pauses in the anthers in search of pollen. D, *Trigona* sp. in the flowers of *H. pulchella*. E–G, *Apis mellifera* in flowers of the *H. pulchella*, *H. quareimana* and *H. darwinii*. The authors of images are: Pinheiro, M. (A–D); and, Stiehl-Alves, EM. (F–G).

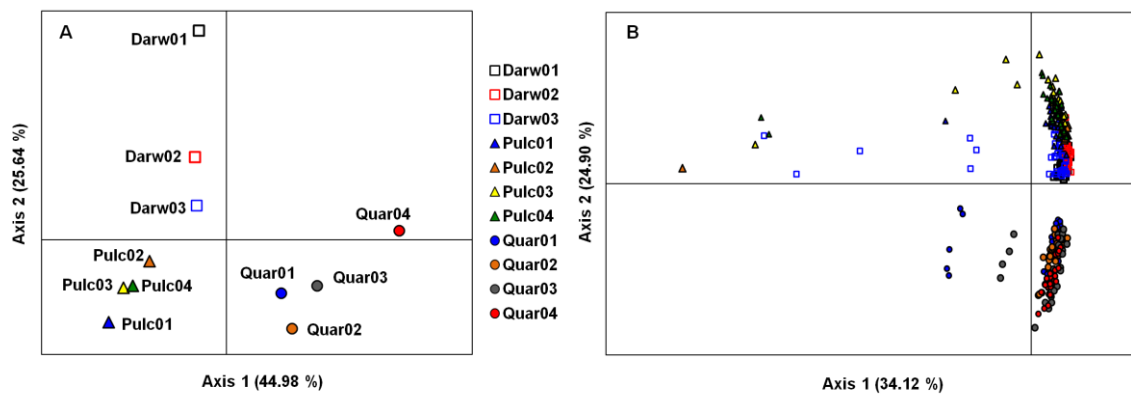


Figura 3. Principal coordinates analysis of inter-simple sequence variation among A) populations and B) individuals of *Herbertia darwinii*, *Herbertia pulchella* and *Herbertia quareimana*. In A, axis 1–2 explains 72.45% of the variation. In B, axis 1–2 Axis 1 explains 58.75% of the variation. Population abbreviations are defined in Table 1.

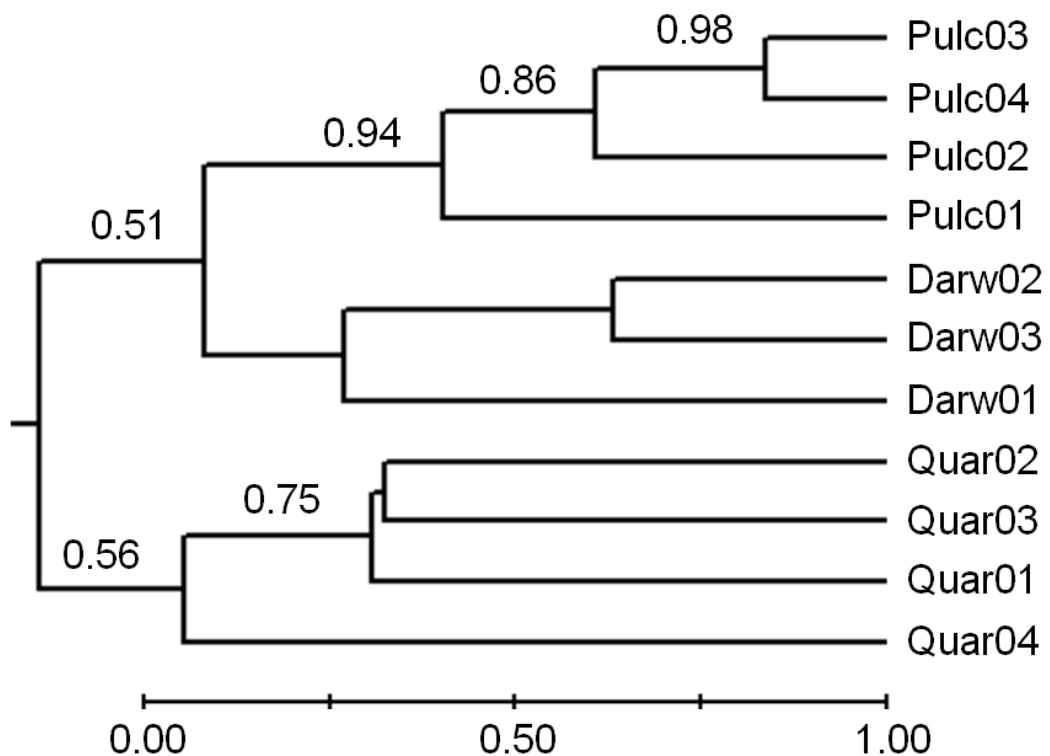


Figure 4. Unweighted pair-group method arithmetic average (UPGMA) based on Nei (1978) unbiased genetic distance in *Herbertia pulchella*, *Herbertia darwinii* and *Herbertia quareimana* populations. Above branches, bootstrap support values.

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO FINAL



Algumas considerações importantes podem ser concluídas para melhorar o entendimento dos processos envolvidos na diversificação das Iridaceae sul-americanas. O sistema reprodutivo parece importante para a evolução do grupo, entretanto, dada a ocorrência de poliploides nesta linhagem, investigar a sua origem também é necessário, visando melhorar a inferência do relacionamento filogenético de *Herbertia*.

A presente tese apresentou dados inéditos quanto aos fatores que contribuíram para a evolução de espécies de *Herbertia* (Tigridaeae: Iridaceae), um pequeno gênero sul-americano presente constantemente em áreas de campo aberto no sul do Brasil. Este trabalho encontra-se inserido em um projeto amplo que visa compreender as interações que resultaram nos padrões de diversidade observados em Iridaceae. Esta família botânica apresenta uma taxonomia complexa, resultado principalmente da plasticidade da morfologia floral, provavelmente em resposta às interações com insetos polinizadores variados.

De acordo com a reconstrução filogenética mais recente proposta para Iridaceae, (Chauveau *et al.*, 2012), *Herbertia* é um gênero monofilético que se encontra agrupado dentro do chamado clado A, um grupo fortemente suportado que reúne espécies estreitamente relacionadas que apresentam grande similaridade da morfologia vegetativa, em contraste com variabilidade das características florais e disponibilidade de combinações de recompensa aos insetos polinizadores (pólen, néctar e óleos). Embora a monofilia do gênero tenha sido evidenciada naquele estudo, a delimitação de algumas espécies ainda é confusa, resultado de variações da morfologia floral, relacionadas principalmente às tépalas e a características quantitativas do androceu e gineceu. Outras variações menos conspícuas que podem aumentar a complexidade são possíveis, como variações nos níveis de ploidia, (principalmente em *H. lahue*) e o tipo de recompensa floral (pólen, óleo ou ambos). Um aspecto importante ressaltado na filogenia inferida por Chauveau e colaboradores, bem como por outros especialistas em Iridaceae (Goldblatt *et al.*, 1998; Goldblatt e Manning, 2008) é a presença de tricomas glandulares produtores de óleos florais nas duas séries de tépalas (mais esparsos nas tépalas externas) de *Herbertia*, uma característica incomum. Estas estruturas são visíveis nas tépalas internas das outras espécies que compõem o clado A de Tigridaeae e em algumas espécies de Trimezieae, ou na coluna estaminal das flores de várias espécies de Sisyrinchieae. Embora não esteja adequadamente registrado, existem variações quantitativas dos tricomas glandulares entre espécies de *Herbertia*.

A inferência filogenética para *Herbertia* destacou que o sistema reprodutivo é importante para a evolução do gênero, podendo ser associado aos três grupos evidenciados (**Capítulo 2**). Combinado a isto, também se pode inferir que os grupos mais diversos geneticamente em *Herbertia* são os **grupos A e B** (*Herbertia pulchella*, *H. darwinii* e *H.*

quareimana), cujo sistema reprodutivo varia de totalmente autoincompatível (na espécie mais basal *H. pulchella*) a misto com baixa taxa de sucesso nos cruzamentos por autopolinização (em *H. darwinii* ou *H. quareimana*). O **grupo C** incluiu *H. lahue* uma espécie com algumas variações da morfologia floral e dos níveis de ploidia. Esta espécie também apresenta sistema reprodutivo misto, entretanto, a taxa de sucesso dos experimentos de autopolinização foi bem maior em relação às espécies do **grupo B**.

De acordo com as análises efetuadas no **Capítulo 3**, as populações de *H. lahue* são geneticamente diferenciadas entre si, mesmo considerando populações próximas e de mesmo citótipo. A ausência de correlação significativa com a distância geográfica entre as populações possivelmente indica que o sistema reprodutivo é um fator de grande influência na dinâmica evolutiva do gênero. No caso de *H. lahue*, as populações analisadas são capazes de produzir sementes oriundas de autopolinizações, inclusive, na ausência de insetos polinizadores. Este fato aparentemente tem reflexo nos baixos níveis de diversidade genética que foram estimados para a espécie no presente estudo. Provavelmente, a variação morfológica identificada em *H. lahue* é o resultado de uma complexa interação entre ocorrência de citótipos, autogamia e adaptação a nichos ecológicos diferenciados. Outro processo que talvez influencie nos parâmetros genéticos de *H. lahue* é a presença de descendência clonal oriunda da divisão dos bulbos subterrâneos. Esta possibilidade foi constatada *ex situ* e *in situ*, especialmente em plantas do citótipo hexaploide de *H. lahue*, e precisa ser mais bem compreendida, pelo uso de meios de amostragem que possibilitem a discriminação entre o fator de propagação clonal e reprodução sexual. Além do mais, do ponto de vista taxonômico, é evidente que as características morfológicas que são levadas em consideração na classificação de *H. lahue* precisam ser revistas, pois não são robustas para a delimitação da espécie.

As espécies que compõem o primeiro e o segundo agrupamentos da filogenia inferida para *Herbertia* são espécies autoincompatíveis ou parcialmente autoincompatíveis, bem como polinizadas por insetos. Os resultados da análise com marcadores moleculares neutros (**Capítulo 4**) foram coerentes com o esperado para espécies perenes de vida curta, com distribuição geográfica regional, autoincompatíveis e que exibem mecanismo de dispersão de sementes por meio da gravidade (Nybom, 2004). A diversidade genética estimada para as três espécies foi alta, consistente com o esperado para espécies autoincompatíveis. Neste estudo, foi estimada forte diferenciação genética, entretanto, não

houve correlação significativa com a distância geográfica, possivelmente indicando que fatores relacionados à reprodução ou vicariância possam ter maior influência nas estimativas apresentadas. Os resultados da análise da biologia reprodutiva permitiram ressaltar algumas semelhanças com o mecanismo inferido para as Iridaceae sul-africanas. A polinização cruzada é favorecida nas iridáceas sul-africanas principalmente através da autoincompatibilidade (Goldblatt e Manning, 2008). Aparentemente, a polinização em *Herbertia* envolve um sistema generalista, que inclui visitas feitas basicamente por abelhas da família Apidae, incluindo algumas espécies de abelhas coletoras de óleos florais. Paralelamente, o principal agente polinizador das Iridaceae sul-africanas são abelhas desta família. Com relação à disponibilidade de óleos florais, apenas uma espécie de *Tritoniopsis* oferece este recurso e uma espécie de abelha coletora de óleos florais foi identificada nesta iridácea. A interação entre insetos polinizadores generalistas e estas três espécies de *Herbertia* possivelmente é favorecida pela disponibilidade de recursos florais que combinam pólen e óleos florais como recompensa, entretanto, este fato necessita de maior esclarecimento.

O presente estudo forneceu informações inéditas sobre a evolução de espécies de *Herbertia* em áreas de campo do Rio Grande do Sul. Algumas considerações importantes para o entendimento da sistemática das Iridaceae sul-americanas podem ser concluídas, entre elas, a necessidade de revisão das características morfológicas atualmente utilizadas na distinção de grupos complexos, como é o caso de *H. lahue*. Outras características promissoras podem ser sugeridas para esta revisão, como número de botões florais por espata, densidade de tricomas glandulares nas tépalas externas e tipo de recompensa floral. Aparentemente, *Herbertia* vem evoluindo em resposta à mudança do sistema reprodutivo, da autoincompatibilidade em direção a espécies de reprodução mista. A autogamia espontânea em *H. lahue* possivelmente constitui uma novidade evolutiva que possibilita maior flexibilidade para contornar os efeitos de flutuações quali e quantitativas relacionadas aos polinizadores em diferentes nichos ecológicos. Adicionalmente, há necessidade de incluir sequências de DNA nuclear na análise, para inferir se eventos de reticulação tem influência na diversificação do gênero. Neste ponto, uma alternativa seriam fragmentos do genoma nuclear, especialmente aqueles envolvidos em processos do florescimento, embora, neste caso, questões técnicas talvez limitem o seu uso.

A N E X O

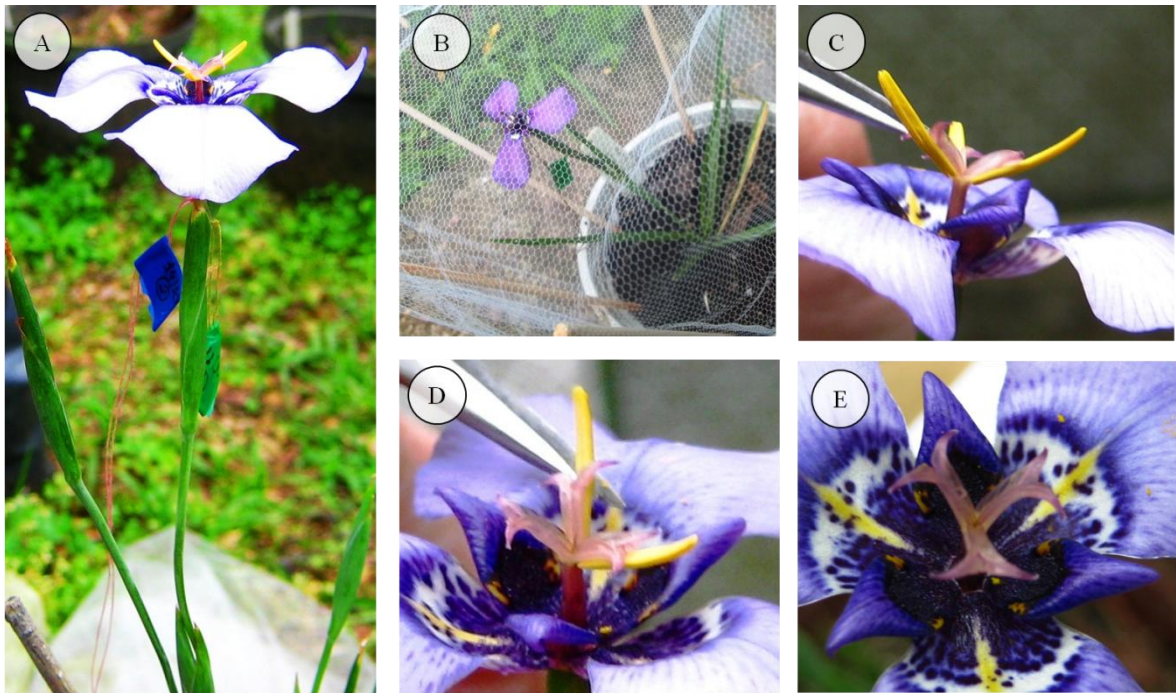


Figura A1. Procedimento adotado para os experimentos de polinização manual (polinização cruzada e autopolinização). (A) Planta de *Herbertia darwinii* contendo dois tratamentos identificados: fita azul, polinização cruzada manual; fita verde, autopolinização manual. B) Planta isolada por meio de saco de tecido fino. (C–E) Procedimento de emasculação. Fotos: Corrêa, L.B.

BIBLIOGRAFIAS CITADAS NOS CAPÍTULOS I, II, E V.

- Alves LIF, Lima SAA e Felix LP (2011) Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil. *Genet Mol Biol* 34(2): 259–267.
- APG III (Angiosperm Phylogeny Group) (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc* 161:105–121.
- Anderson B, Alexandersson R e Johnson SD (2009) Evolution and coexistence of pollination ecotypes in an african *Gladiolus* (Iridaceae). *Evolution* 64 (4): 960–972.
- Barret SCH e Harder LD (1996) Ecology and evolution of plant mating. *Tree* 2: 73–79.
- Bernhardt P e Goldblatt P (2000) The diversity of pollination mechanisms in the Iridaceae of southern Africa. In: Wilson KL e Morrison DA. *Monocots: Systematics and Evolution*. CSIRO, Melbourne, Australia, p. 301–308.
- Bonin A, Ehrich D e Manel S (2007) Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Mol Ecol* 16: 3737–3758.
- Bornet B e Branchard M (2001) Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Mol Biol Rep* 19: 209–215.
- Brunet J e Sweet HR (2006) Impact of insect pollinator group and floral display size on outcrossing rate. *Evolution* 60: 234–246.
- Buchmann SL (1987) The ecology of oil flowers and their bees. *Annu Rev Ecol Syst* 18: 343–369.
- Caiola MG, Caputo P e Zanier R (2004) RAPD analysis in *Crocus sativus* L. accessions and related *Crocus* species. *Biol. Plant.* 48: 375–380.
- Chauveau O, Eggers L, Raquin C, Silvério A, Brown S, Couloux A, Cruaud C, Kaltchuk-Santos E, Yockteng R, Souza-Chies TT e Nadot S (2011) Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Ann Bot* 107: 1287–1312.

- Chauveau O, Eggers L, Souza-Chies TT e Nadot S (2012) Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera. *Ann Bot* 110: 713–729.
- Chukr N (2013) *Trimezia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8076>).
- Deble LP (2010) *Herbertia zebrina* (Iridaceae, Tigridieae, Cipurinae) A new species from Rio Grande do Sul State (Brazil). *Darwiniana* 48: 93–96.
- Eggers L (2008) A família Iridaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Bio* 6: 167–175.
- Eggers L (2013) *Cypella* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/?id=FB8046>).
- Eggers L (2013) *Sisyrinchium* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8066>).
- Eggers L, Chukr N, Lovo J e Gil A (2013) Iridaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB136>).
- Excoffier L, Smouse PE e Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics* 131: 479–491.
- George S, Sharma J e Yadon VL (2009) Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadonii* (Orchidaceae) assessed with ISSR polymorphisms. *Am J Bot* 96: 2022–2030.
- Gil A (2013) *Neomarica* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8052>).
- Givnish TJ (2010) Ecology of plant speciation. *Taxon* 59: 1326–1366.
- Godwin ID, Aitken EAB e Smith LW (1997) Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18: 1524–1528.
- Goldblatt P (1982) Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of Neotropical Iridaceae. *Syst Bot* 7: 186–198.

- Goldblatt P (1990) Phylogeny and classification of the Iridaceae. *Ann Mo Bot Gard* 77: 607–627.
- Goldblatt P e Takei M (1997). Chromosome cytology of Iridaceae, patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. *Ann Mo Bot Gard* 84: 285–304.
- Goldblatt P, Bernhardt P e Manning JC (1998) Pollination of petaloid geophytes by monkey beetles (Scarabaeidae: Ruteliinae: *Hopliini*) in southern Africa. *Ann Mo Bot Gard* 85: 215–230.
- Goldblatt P, Bernhardt P e Manning JC (2002) Floral biology of *Romulea* (Iridaceae: Crocoideae): a progression from a generalist to a specialist pollination system. *Adansonia* 24: 243–262.
- Goldblatt P e Manning JC (2006) Radiation of pollination systems in the Iridaceae of Sub-Saharan Africa. *Ann Bot* 97: 317-344.
- Goldblatt P e Manning JC (2007) Floral biology of *Babiana* (Iridaceae: Crocoideae): adaptive floral radiation and pollination. *Ann Mo Bot Gard* 94: 709–733.
- Goldblatt P e Manning JC (2008) *The Iris Family: Natural History and Classification* Timber Press, 336p. 2008.
- Goldblatt P, Manning JC e Bernhardt P (2000) Adaptive radiation of pollination mechanisms in *Sparaxis* (Iridaceae: Ixioideae). *Adansonia* 22: 57–70.
- Goldblatt P, Manning JC e Bernhardt P (2001) Radiation of pollinations systems in *Gladiolus* (Iridaceae: Crocoideae) in Southern Africa. *Ann Miss Bot Gard* 88: 713–734.
- Goldblatt P, Manning JC e Rudall P (1998) Iridaceae. In: Kubitzki K (ed.). *The Families and Genera of Vascular Plants. III Flowering Plants. Monocotyledons: Lilianae*. Springer, Berlin, 1998. Pp. 295–333.
- Goldblatt P, Savolainen V, Porteous O, Sostaric I, Powell M, Reeves G, Manning JC, Barraclough TG e Chase MW (2002) Radiation in the Cape flora and the phylogeny of peacock irises *Moraea* (Iridaceae) based on four plastid DNA regions. *Mol Phylogenet Evol* 25: 341-360.

- Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, Davies TJ, Manning JC, Van der Bank M e Savolainen V (2008) Iridaceae ‘Out of Australasia’? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. *Syst Bot* 33: 495–508.
- Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J e Owen JL (1994) Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor Appl Genet* 89: 998–1006.
- Hannan GL e Orick MW (2000) Isozyme diversity in *Iris cristata* and the threatened glacial endemic *I. lacustris* (Iridaceae). *Am J Bot* 87: 293–301.
- Holsinger KE, Lewis PO e Dey DK (2002) A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Mol Ecol* 11: 1157–1164.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2012) Manual Técnico da Vegetação Brasileira, 2nd ed., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.
- Ingvarsson PK (2002) A metapopulation perspective on genetic diversity and differentiation in partially self-fertilizing plants. *Evolution* 56(12): 2368–2373.
- Isabel N, Beaulieu J, Thériault P e Bousquet J (1999) Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Mol Ecol* 8: 477–483.
- Judd WS, Campell CS, Kellog EA, Stevens PF e Donoghue MJ (2009) *Sistemática Vegetal – Um enfoque filogenético*. 3 ed. Artmed, Porto Alegre. 632p.
- Karst L e Wilson CA (2012) Phylogeny of the New World Genus *Sisyrinchium* (Iridaceae) based on analyses of plastid and nuclear DNA sequence data. *Syst. Bot* 37: 87–95.
- Kenton A e Heywood CA (1984) Cytological studies in South American Iridaceae. *Plant Syst Evol* 146: 87–104.
- Kenton A, Dickie J, Langton D e Bennett M (1990) Nuclear DNA amount and karyotype symmetry in *Cypella* and *Hesperoxiphion* (Tigridieae; Iridaceae). *Evol T Plants* 4: 59-65.
- Lovo J, Winkworth RC e Mello-Silva R (2012) New insights into Trimezieae (Iridaceae) phylogeny: what do molecular data tell us? *Ann Bot* 110(3): 689–702.
- Lovo J (2013) *Pseudotrimezia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB25589>).

- Lynch M e Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol Ecol* 3: 91–99.
- Manning JC, Goldblatt P (2005) Radiation of pollination systems in the Cape genus *Tritoniopsis* (Iridaceae: Crocoideae) and the development of bimodal pollination strategies. *Int J Plant Sci* 166: 459–474.
- Marco EG, Tacuatiá LO, Eggers L, Kaltchuk-Santos E e Souza-Chies TT (2009) Genetic variability within *Cypella fucata* Ravenna in southern Brazil. In: Mahoney CL e Springer DA (eds) *Genetic Diversity*. Nova Publishers, New York, pp 179-194.
- Moraga AR, Trapero-Mozos A, Gómez-Gómez L e Ahrazem O (2010) Intersimple sequence repeat markers for molecular characterization of *Crocus cartwrightianus* cv. *albus*. *Ind Crops Prod* 32: 47–151.
- Moreno N, Las Peñas ML, Bernardello G e Roitman G (2009) Cytogenetic studies in *Herbertia* Sw. (Iridaceae). *Caryologia* 62: 37–42.
- Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol* 13: 1143–1155.
- Nylander JAA (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Petersen G, Seberg O, Thorsøe S, Jørgensen T e Mathew B (2008) A phylogeny of the genus *Crocus* (Iridaceae) based on sequence data from five plastid regions. *Taxon* 57: 487-499.
- Ranjan P, Bhat KV, Misra RL, Singh SK e Ranjan JK (2010) Genetic relationships of gladiolus cultivars inferred from fluorescence based AFLP markers. *Sci Hortic* 123: 562–567.
- Reeves G, Chase MW, Goldblatt P, Rudall P, Fay MF, Cox AV, Lejeune B e Souza-Chies TT (2001) Molecular systematics of Iridaceae: Evidence from four plastid DNA regions. *Am J Bot* 88: 2074–2087.
- Renner SS e Schaefer H (2010) The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365: 423–435.
- Rodriguez A e Sytsma KJ (2006) Phylogenetics of the "tiger-flower" group (Tigridieae: Iridaceae): Molecular and morphological evidence. *Aliso* 22: 412–424.

- Roitman GG e Castillo A (2004) A new species, *Herbertia crosae* (Iridaceae) from Uruguay. *Brittonia* 56: 361–364.
- Roitman G e Castillo A (2008) *Herbertia darwinii* (Iridaceae: Tigridieae: Cipurinae), a new species from South America. *Bol Soc Argent Bot* 43: 311–314.
- Ronquist F e Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12): 1572–1574.
- Russell A, Samuel R, Klejna V, Barfuss MHJ, Rupp B e Chase MW (2010) Reticulate evolution in diploid and tetraploid species of *Polystachya* (Orchidaceae) as shown by plastid DNA sequences and low-copy nuclear genes. *Ann Bot* 106: 37–56.
- Rymer PD, Manning JC, Goldblatt P, Powell MP e Savolainen V (2010) Evidence of recent and continuous speciation in a biodiversity hotspot: a population genetic approach in southern African gladioli (*Gladiolus*; Iridaceae). *Mol Ecol* 19: 4765–4782.
- Sanmartín I e Ronquist F (2004) Southern hemisphere biogeography inferred by event-based models: plant versus animal patterns. *Syst Biol* 53: 216–243.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, *et al* (2005) The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot* 92(1): 142–166.
- Souza-Chies TT, Bittar G, Nadot S, Carter L, Besin E e Lejeune B (1997) Phylogenetic analysis of Iridaceae with parsimony and distance methods using the plastid gene *rps4*. *P1 Syst Evol* 204: 109–123.
- Souza-Chies TT, Kaltchuk-Santos E, Eggers L, Flores AM, Stiehl-Alves EM, Fachinetto J, Lustosa J, Corrêa LB, Tacuatiá LO, Piccoli PP e Miz RB (2012) Studies on diversity and evolution of Iridaceae species in southern Brazil. *Genet Mol Biol* 35(4): 1027–1035.
- Stamatakis A (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22(21): 2688–2690.
- Stewart CN e Excoffier L (1996) Assessing population genetic structure and variability with RADP data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). *J Evol Biol* 9: 153–171.

- Swofford DL (2002) PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), beta version 4.0. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Tacuatiá LO, Eggers L, Kaltchuk-Santos E e Souza-Chies TT (2011) Population genetic structure of *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae) in Itapuã State Park, Southern Brazil. *Genet Mol Biol* 35: 99–105.
- Tacuatiá LO, Souza-Chies TT, Flores AM, Eggers L, Siljak-Yakovlev S e Kaltchuk-Santos E (2012) Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. *Bot J Linn Soc* 169: 350–364.
- Tullio L, Roitman G e Bernardello G (2008) *Tamia* (Iridaceae), a synonym of *Calydorea*: cytological and morphological evidence. *Syst Bot* 33: 509–513.
- Vosa CG (2005) On chromosome uniformity, bimodality and evolution in the tribe Aloineae (Asphodelaceae). *Caryologia* 58: 83–85.
- Waal C, Anderson B, Barrett SCH (2012) The natural history of pollination and mating in bird-pollinated *Babiana* (Iridaceae). *Ann Bot* 109: 667–679
- Wikström N, Savolainen V e Chase MW (2001) Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268: 2211–2220.
- Wilson CA (2003) Phylogenetic relationships in *Iris* series *Californicae* based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Syst Bot* 28: 39–46.
- Wilson CA (2004) Phylogeny of *Iris* based on chloroplast *matK* gene and *trnK* intron sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 33: 402–412.
- Wilson CA (2011) Subgeneric classification in *Iris* re-examined using chloroplast sequence data. *Taxon* 60: 27–35.
- Winge H (1959) Studies on cytotaxonomy and polymorphism of the genus *Alophia* (Iridaceae). *Rev Bras Biol* 19: 195–201.
- Wolff K e Morgan-Richards M (1998) PCR markers distinguish *Plantago major* subspecies. *Theor Appl Genet* 96: 282—286.
- Wróblewska A, Brzosko E, Czarnecka B e Nowosielski J (2003) High levels of genetic diversity in populations of *Iris aphylla* L. (Iridaceae), an endangered species in Poland. *Bot J Linn Soc* 142: 65–72.

Young ND e Healy J (2003) GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* 4: 6.

Zietkiewicz E, Rafalski A e Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.