

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Dissertação de Mestrado

**Caracterização citogenética e molecular de três espécies de *Gelasine*
(Iridaceae) ocorrentes no sul do Brasil: *Gelasine elongata*, *G. coerulea* e *G.*
*uruguayensis***



Joana Focchezatto

Porto Alegre
Agosto 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Caracterização citogenética e molecular de três espécies de *Gelasine*
(Iridaceae) ocorrentes no sul do Brasil: *Gelasine elongata*, *G. coerulea* e *G.*
*uruguayensis***

Joana Focchezatto

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

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Teixeira de Souza Chies

Coorientadora: Profa. Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos

Porto Alegre

Agosto 2015

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal do Rio Grande do Sul e realizado no Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas do Departamento de Botânica e no Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. O projeto foi subvencionado pelo CNPq (edital universal 2013 e PROTAX). A mestranda obteve bolsa de estudos da CAPES (24 meses).

A minha Mãe,
Arlete Maria Marchesini.

DEDICO

A meus irmãos, cunhados e sobrinho
Thiago, Thaise, Isabel, Juliano e Enzo

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a todos os professores por proporcionar a concretização de um sonho. Ao Elmo e ao Vitor por toda amizade e ajuda durante esses dois anos.

À professora Dra. Tatiana T. de Souza-Chies pela amizade, por aceitar-me orientar sem ao menos me conhecer. Obrigada pela confiança em mim depositada.

À professora Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos, pelos ensinamentos, amizade, orientações e pelas conversas informais que me ajudaram a passar por todos os momentos difíceis. A força que me passava me ajudou muito no meu crescimento profissional e pessoal.

À professora Dra. Lilian Eggers e o Dr. Olivier Chauveau, muito obrigada pela valorosa ajuda e os grandiosos ensinamentos.

À professora Dra. Eliana Forni Martins do Departamento de Biologia Vegetal da UNICAMP, por abrir as portas do seu laboratório para realização das análises de citogenética.

À Dra. Eudes, pela amizade, confiança, parceria, conversas, pelos dias em que mesmo atarefada ajudou incansavelmente, pelos momentos que aproveitava para tirar todas as dúvidas sem pé nem cabeça que surgiam no dia a dia. Muito do que sei hoje veio do seu amplo conhecimento.

À Dra. Luana pela amizade e por sempre estar de prontidão para tirar qualquer dúvida, por ser tão bem recebida em Campinas, pela confiança e parceria nas coletas.

À todos os colegas do laboratório: Leonardo, Eduardo, Cristiane, Camila, Ethiéne, Ana, Marcela, Isabel e Fernanda pelos momentos de descontração e companheirismo.

À Tamara Pastori por sua valorosa amizade, sem sua ajuda tudo teria sido mais difícil em Porto Alegre, inclusive teria me perdido no primeiro dia, as conversas que faziam a saudade de casa diminuir, sua amizade é muito importante.

À Paula, Daniela, Maurício e Nicole pelos momentos de descontração e estudo, pois conhecimento só é válido quando podemos receber e repassar, obrigado pela parceria e conversas. Sentirei saudades dos dias tão divertidos, no qual você poderia chegar em casa com uma "marca" rosa; foi bastante útil saber que Feulgen não cora só cromossomos, muitas vezes descobríamos isso de uma maneira muito divertida a qual demorava um pouco a sair. Conhecer vocês foi muito importante. Obrigado pela amizade.

À Camila Zanella, pela amizade e ajuda durante as análises moleculares.

Aos amigos Kassiano e Liliane por estarem sempre presentes, por fazer deste lugar nossa casa, alguns anos de amizade já e que certamente ainda serão muitos.

À minha mãe Arlete: há um tempo atrás quando foi preciso você deixou teus sonhos pelos meus, com você aprendi a honestidade, o caráter, a humildade, você não foi só mãe, foi pai e melhor amiga, sempre me acompanhou nos meus sonhos, nas minhas andanças e saiba, nada que fizer na vida será o suficiente para lhe retribuir. Te amo Dona Arletinha. Obrigado por ser meu porto seguro, meu ponto de partida e meu recomeço.

Aos meus irmãos Thiago e Thaise por sempre estarem ao meu lado, por incentivarem meus sonhos e por sempre estenderem a mão quando precisei. À minha cunhada Isabel, uma irmã de coração, que me presenteou com meu sobrinho/afilhado Enzo, a coisa mais fofa desse mundo, veio para unir nossa família, ele sempre terá orgulho da dinda; pode apostar. Ao meu cunhado Juliano pela amizade, parceria e companheirismo sempre. Amo Vocês.

À minha madrinha Nica e tia/madrinha Salete pela confiança depositada sempre.

Ao meu pai, quem sabe o maior aprendizado da vida. Te Amo.

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

É exatamente disso que a vida é feita, de momentos.
Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins,
para o nosso próprio aprendizado.
Nunca esquecendo do mais importante: Nada nessa vida é por acaso.
Absolutamente nada.
Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte,
da melhor forma possível.
A vida nem sempre segue a nossa vontade,
mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.

Chico Xavier

SUMÁRIO

RESUMO	10.
ABSTRACT	12.
INTRODUÇÃO GERAL	14.
1. Família Iridaceae	14.
2. Tribo Tigridieae	17.
3. Gênero <i>Gelasine</i>	18.
4. Estudos citogenéticos em Iridaceae	20.
5. Tamanho de genoma em Iridaceae	23.
6. Diversidade genética	24.
7. Marcadores moleculares e diversidade genética	25.
7.1 ISSR e suas aplicações em Iridaceae	26.
OBJETIVO GERAL	29.
Objetivos específicos	29.
MATERIAL E MÉTODOS	30.
1. Coleta de Material Vegetal	30.
2. Análise de variabilidade genética	32.
2.1 Extração de DNA Total	32.
2.2 Quantificação do DNA	33.
2.3 Amplificação do DNA (ISSR-PCR)	33.
2.4 Análise dos dados de ISSR	34.
3. Análises citogenéticas	35.
3.1 Coleta de Raízes	35.
3.2 Germinação de sementes	37.
3.3 Determinação do número cromossômico	38.
3.4 Visualização e análise dos dados citológicos	38.
3.5 Dupla coloração com os fluorocromos CMA/DAPI	39.
3.6 Análise de tamanho de genoma	40.
RESULTADOS	42.
1. Diversidade genética	42.
2. Estrutura genética populacional	46.
3. Caracterização citogenética	52.

DISCUSSÃO	62.
1. Diversidade genética	62.
2. Aspectos citogenéticos do gênero <i>Gelasine</i>	66.
CONCLUSÕES	71.
PERSPECTIVAS	72.
REFERÊNCIAS	73.

RESUMO

Gelasine Herb. (Tigridieae: Iridaceae) é composto por sete espécies nativas da América do Sul, sendo três delas encontradas no Rio Grande do Sul (Brasil): *G. coerulea* (Vell.) Ravenna, *G. elongata* (Graham) Ravenna e *G. uruguayensis* Ravenna. São plantas bulbosas de folhas plicadas, flores perfeitas azuis ou roxas e compostas por dois conjuntos de tépalas desiguais. *Gelasine elongata* e *G. coerulea* encontram-se na lista de espécies ameaçadas para o RS, sendo a primeira delas ameaçada e a segunda criticamente ameaçada. Apesar de seu atual estado de vulnerabilidade, *Gelasine* é um gênero ainda pouco estudado, não havendo nenhuma informação quanto à variabilidade e diversidade genética. Os dados citogenéticos são também ainda escassos. Assim, a presente dissertação tem por objetivo caracterizar as três espécies de *Gelasine* ocorrentes no sul do Brasil quanto a aspectos moleculares, citogenéticos, além de compreender suas relações. Para a caracterização da diversidade genética foram usadas duas populações de *G. coerulea* e duas de *G. elongata*; não foi possível a utilização de *G. uruguayensis* em função do número restrito de indivíduos. As amostras de DNA foram obtidas a partir de folhas das espécies mencionadas e empregada a técnica de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*). Foram testados 44 *primers* para ISSR, destes, 12 apresentaram um bom padrão de amplificação que em conjunto geraram 91 *loci*. A quantidade de bandas por *primer* variou em média de 7,5. Este trabalho resultou em dados inéditos para o gênero *Gelasine* quanto à variabilidade genética inter e intra-populacional. Os resultados indicam que a variação genética intrapopulacional é muito baixa e que a maior diversidade encontrada para estas espécies ocorreu entre as populações. Não foi verificada correlação significativa com a distância geográfica entre as populações. Tais resultados indicam que o sistema reprodutivo, o método de dispersão de sementes e a presença de descendência clonal oriunda da divisão dos bulbos subterrâneos são fatores de grande influência na diversidade. Para caracterização citogenética das espécies foi empregada coloração convencional e bandeamento CMA/DAPI, e realizadas medidas cromossômicas. Foi também estimado o tamanho do genoma por citometria de fluxo a partir de folhas frescas das três espécies. As análises citogenéticas se mostraram bastante eficientes para a

diferenciação das três espécies de *Gelasine* investigadas. *Gelasine coerulea* e *G. uruguayensis* apresentam o mesmo número cromossômico básico e somático ($2n = 2x = 14$), não sendo encontrados citótipos poliploides. Ambas têm cariótipos relativamente simétricos, porém se mostram bastante distintas quanto ao tamanho dos cromossomos e seu padrão de bandeamento, com uma grande variação na ocorrência e distribuição de sequências de DNA repetitivo (bandas CMA/DAPI). O conteúdo de DNA também permite a clara diferenciação dessas espécies, tendo *G. coerulea* $2C = 11,30$ pg e *G. uruguayensis* $2C = 16,88$ pg. *Gelasine elongata* possui número cromossômico básico diferente das anteriores ($2n = 2x = 12$) e cariótipo claramente bimodal. Os cromossomos têm menor tamanho, o que, conseqüentemente reflete no menor tamanho de genoma ($2C = 3,45$ pg). Além disso, o padrão de bandas CMA/DAPI é notadamente mais simples que das outras duas espécies, onde o maior par de cromossomos (par I) exibe as únicas bandas CMA+ presentes na região da constrição secundária. Os dados obtidos para *G. elongata* apontam para uma maior semelhança dessa espécie com outras duas do gênero *Eleutherine* ($2n = 2x = 12$), o que reforça os dados filogenéticos existentes, onde *G. elongata* está separada de *G. coerulea* e agrupada no mesmo ramo de *Eleutherine*. Não foi observado heteromorfismo cromossômico para *Gelasine elongata* e nem para as outras duas espécies investigadas, embora tal situação tenha sido reportada para aquela espécie. Os dados obtidos para *Gelasine* com o uso dos fluorocromos CMA e DAPI, bem como os demais parâmetros citogenéticos investigados permitiram a clara diferenciação entre as espécies. Associados a uma abordagem filogenética, tais resultados auxiliam a compreensão das relações entre essas espécies e sua evolução.

Palavras Chave: *Gelasine*, citogenética, marcadores moleculares, ISSR, CMA/DAPI.

ABSTRACT

Gelasine Herb. (Tigridieae: Iridaceae) comprises seven native species from South America, three of them are found in Rio Grande do Sul (Brasil): *G. coerulea* (Vell.) Ravenna, *G. elongata* (Graham) Ravenna and *G. uruguayensis* Ravenna. These species are bulbous plants with plicate leaves and blue or violet perfect flowers which are composed of two unequal groups of tepals. *Gelasine elongata* and *G. coerulea* are included in the list of endangered species from RS, the first one is considered endangered and the latter, critically endangered. Notwithstanding its current vulnerability status, *Gelasine* is still a poorly studied genus and genetic variability and diversity information concerning its species are lacking. Cytogenetic data are also scarce. Thus the present dissertation aims to characterize the three *Gelasine* species occurring in Southern Brazil regarding its molecular and cytogenetic aspects in addition to understand their relationships. To characterize their genetic diversity, two populations of *G. coerulea* and two of *G. elongata* were used; it was not possible to investigate *G. uruguayensis* due to its restricted number of individuals. DNA samples were obtained from leaves of the aforementioned species and ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) technique was employed. Forty-four ISSR primers were tested, 12 of these presented good amplification pattern which generated a total of 97 loci. The number of bands per primer had an average of 7.5. The present study resulted in novelty data for *Gelasine* concerning its inter and intrapopulation genetic variability. The results indicate a very low intrapopulation genetic variation and most of the diversity found in these species occurred among their populations. No significant correlation was verified between geographical distances of populations. Such results indicate that reproductive system, seed dispersal mechanisms and presence of clonal descendants generated from divisions of subterranean bulbs are factors that greatly influence in diversity. For cytogenetic characterization of the species, conventional staining and CMA/DAPI banding were employed and chromosome measurements were made. Also, genome size was estimated through flow cytometry using fresh leaves from the three species. Cytogenetic analyses were very efficient to differentiate all investigated species of *Gelasine*. *Gelasine coerulea* and *G. uruguayensis* have the same basic and somatic chromosome

number ($2n = 2x = 14$); polyploid cytotypes were not found. Both species display fairly symmetric karyotypes, however they are very distinct with respect to chromosome sizes and banding patterns, with a great variation in the occurrence and distribution of repetitive DNA sequences (CMA/DAPI bands). DNA content also allows clear differentiation of these species; *G. coerulea* has $2C = 11,30$ pg and *G. uruguayensis* has $2C = 16,88$ pg. *Gelasine elongata* has a different base chromosome number than both former species ($2n = 2x = 12$) and a clearly bimodal karyotype. Its chromosomes are smaller which, consequently, reflects on the smaller genome size ($2C = 3,45$ pg). Furthermore, its CMA/DAPI band pattern is markedly simpler than the ones from the other two species, where the largest chromosome pair (pair I) contains the only CMA+ bands present in the secondary constriction region. Data obtained from *G. elongata* points out a larger resemblance between this species and two others belonging to *Eleutherine* ($2n = 2x = 12$), which supports the phylogenetic data where *G. elongata* is separate from *G. coerulea* and groups with *Eleutherine*. Chromosome heteromorphism was not observed in *Gelasine elongata* nor in the two other investigated species, even though it had been reported for the first one. Data obtained from *Gelasine* with the use of CMA and DAPI fluorochromes, along with the other cytogenetic parameters investigated, allowed clear differentiation between species. Allied to a phylogenetic approach, these results can bring better understanding to the relations between these species and their evolution.

Keywords: *Gelasine*, cytogenetics, molecular markers, ISSR, CMA/DAPI.

INTRODUÇÃO GERAL

1 - Família Iridaceae

A família Iridaceae pertence às Asparagales (APGIII, 2009) e é considerada a segunda maior família desta ordem (Goldblatt & Manning, 2008). Iridaceae possui cerca de 2030 espécies distribuídas entre 65 a 75 gêneros (Goldblatt *et al.*, 2008).

As espécies de Iridaceae possuem ampla distribuição mundial, sendo encontradas em todos os continentes (Goldblatt, 1990). A maior diversidade da família se dá no hemisfério sul, com o maior centro de dispersão na África do Sul e o segundo na América do Sul. Segundo Goldblatt *et al.* (1998), as espécies estão melhor representadas no sul do continente africano e nas regiões temperadas e de terras altas das Américas Central e do Sul.

Uma característica importante para a família é a enorme variação morfológica observada em alguns grupos, o que torna a compreensão dos relacionamentos internos complexos (Chies *et al.*, 2014). A família Iridaceae caracteriza-se por plantas com caule frequentemente subterrâneo, do tipo bulbo, cormo ou rizoma, sendo o caule aéreo presente ou não, folhas cilíndricas ou planas, lisas ou plicadas. Apresentam perigônio com verticilos subiguais ou distintos, de cores variadas, androceu constituído de três estames livres ou unidos, e gineceu tricarpelar, trilocular, polispérmico, de placentação axial e ovário ínfero (Eggers, 2008).

Segundo Eggers (2008), muitas destas espécies foram ainda pobremente estudadas devido à floração curta (primavera) bem como a efemeridade das flores e a dificuldade de preservação de características morfológicas para estudos posteriores.

Tendo em vista a beleza das flores, esta família tem representantes de grande relevância econômica para flores de corte e de jardim. Alguns gêneros de Iridaceae possuem grande valor econômico em diversos países da Europa, Índia e Estados Unidos, onde seu valor econômico não se restringe somente ao uso em paisagismo, mas também como fonte de alimentação, no consumo de cormos ou

utilizando seus estiletos e estigmas como especiarias (Goldblatt *et al.*, 1998; Goldblatt & Manning, 2008).

Goldblatt (1990) realizou o primeiro estudo cladístico sobre a família Iridaceae, baseado em 52 caracteres morfológicos, fitoquímicos, citológicos e de estrutura de grão de pólen. A classificação proposta por Goldblatt sugere a existência de quatro subfamílias, sendo elas: Isophysidoideae (monotípica), Nivenioideae (seis gêneros e 63 espécies), Iridoideae (quatro tribos, 42 gêneros e 690 espécies) e Ixioideae (três tribos, 28 gêneros e 860 espécies).

Em continuidade aos estudos de Goldblatt (1990), Rudall (1994) conduziu um estudo no qual utilizou 33 caracteres morfológicos e anatômicos, com maior ênfase a características anatômicas; os resultados obtidos por Rudall confirmam as quatro subfamílias e sete tribos propostas por Goldblatt (1990).

Em sequência aos estudos de Goldblatt e de Rudall em que haviam sido utilizados somente dados morfológicos e anatômicos, Souza-Chies *et al.* (1997) publicaram a primeira análise filogenética da família Iridaceae utilizando dados moleculares. Nesse estudo, no qual os autores utilizaram sequências do gene plastidial *rps4*, foi verificado que *Isophysis* T. Moore ex Seem. constitui um grupo irmão do resto da família, a subfamília Ixioideae constitui um grupo bem suportado, mesmo havendo pouca resolução entre os gêneros desta tribo, além de a subfamília Nivenioideae ser evidenciada como um grupo não monofilético e a confirmação do monofilatismo da família Iridaceae.

A fim de melhor esclarecer as relações filogenéticas da família Iridaceae, Reeves *et al.* (2001) conduziram um estudo mais detalhado utilizando o gene do cloroplasto *rps4*, bem como o gene *rbcL*, o íntron do gene *trnL* e o espaçador intergênico *trnL-trnF*. Os dados obtidos evidenciam que as subfamílias são monofiléticas, exceto Nivenioideae, que permanece parafilética. A última filogenia publicada e a classificação mais aceita atualmente (Goldblatt *et al.*, 2008) propõe que a família Iridaceae seja subdividida em sete subfamílias: Isophysidoideae, Patersonioideae, Geosiridoideae, Aristeoideae, Nivenioideae, Crocoideae e Iridoideae.

Iridoideae é a única subfamília com representantes nos Neotrópicos, embora represente cerca de 40% do total de espécies de Iridaceae. Goldblatt (1990), a partir de marcadores morfológicos, descreveu a subfamília Iridoideae compreendendo quatro tribos, sendo elas: Irideae, Mariceae, Sisyrinchieae e Tigridieae. Após este estudo, Goldblatt *et al.* (2008) utilizaram dados de sequências plastidiais e propuseram a subdivisão de Iridoideae em cinco tribos: Diplarreneae, Irideae, Sisyrinchieae, Trimezieae e Tigridieae (Figura 1).

Na América do Sul são encontradas três das cinco tribos: Sisyrinchieae, Tigridieae e Trimezieae (Goldblatt & Manning, 2008; Goldblatt *et al.*, 2008). No Brasil as iridáceas são distribuídas em 18 gêneros, sendo três endêmicos, chegando a um número aproximado de 165 espécies, com 70 consideradas endêmicas (Eggers *et al.*, 2015).

Dentre os 18 gêneros de Iridoideae no Brasil, 12 ocorrem no sul do Brasil. São eles: *Calydorea* Herb., *Catila* Ravenna, *Cypella* Herb., *Eleutherine* Herb., *Gelasine* Herb., *Herbertia* Sweet, *Kelissa* Ravenna, *Onira* Ravenna, *Phalocallis* Herb. (Tigridieae); *Neomarica* Sprague e *Trimezia* Salisb. ex Herb. (Trimezieae) e *Sisyrinchium* L. (Sisyrinchieae) (Eggers *et al.*, 2015).

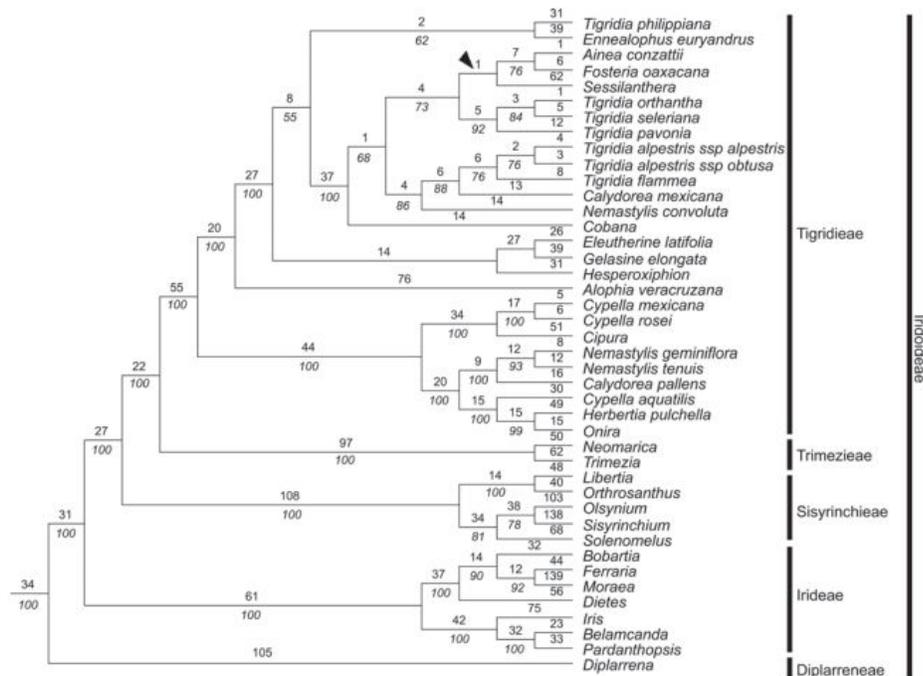


Figura 1: Árvore filogenética da subfamília Iridoideae, destacando as cinco tribos. Modificado de Goldblatt *et al.* (2008).

2 - Tribo Tigridaeae (Iridoideae)

A tribo Tigridaeae inclui de 15 a 20 gêneros e 172 espécies e foi dividida em duas subtribos: Cipurinae e Tigridiinae (Goldblatt, 1990). Tigridaeae é estritamente distribuída no Novo Mundo, com centros de diversidade na América do Sul e áreas no México e Guatemala (Rodríguez & Sytsma, 2006; Goldblatt *et al.*, 2008).

Tigridaeae é considerada uma tribo taxonomicamente complexa já que apresenta uma grande variação morfológica, a duração das flores é efêmera, as quais são difíceis de ser preservadas em material herborizado (Rodríguez & Sytsma, 2006). Tais situações tornam difícil a identificação taxonômica e suas relações filogenéticas são problemáticas; o número exato de gêneros e espécies ainda deve ser revisto, já que dentro desta tribo existem problemas de circunscrição (Rodríguez & Sytsma, 2006; Goldblatt & Manning, 2008). Para a tribo Tigridaeae são considerados os seguintes gêneros: *Alophia* Herb., *Calydorea* (incluindo *Itysa* Ravenna e *Tamia* Ravenna), *Catila*, *Cardenanthus* R.C.Foster, *Cipura* Aubl., *Cobana* Ravenna, *Cypella*, *Kelissa*, *Onira*, *Phalocallis*, *Eleutherine*

Herb., *Ennealophus* N.E.Br. (incluindo *Tucma* Ravenna), *Gelasine*, *Herbertia*, *Hesperoxiphion* Baker, *Larentia* Klatt, *Mastigostyla* I.M. Johnst., *Nemastylis* Nutt. e *Tigridia* Juss. (incluindo *Ainea* Ravenna, *Cardiostigma* Baker, *Colima* (Ravenna) Aarón Rod. & Ortiz-Cat., *Fosteria* Molseed, *Rigidella* Lindl. e *Sessilanthera* Molseed & Cruden (Goldblatt & Manning, 2008).

A fim de melhor esclarecer a filogenia desta tribo, análises filogenéticas foram realizadas por Chauveau *et al.* (2012). Este estudo evidenciou que Tigridieae divide-se em dois clados: A e B, e evidenciou que as duas subtribos (*Cipurinae* e *Tigridiinae*) propostas por Goldblatt (1990) não são monofiléticas. Os autores sugerem a divisão da tribo em dois clados: o clado A, que compreende somente espécies da subtribo *Cipurinae*, e o clado B que inclui tanto espécies de *Cipurinae* quanto de *Tigridiinae*.

3 - Gênero *Gelasine*

Gelasine é um gênero constituído por espécies nativas para a América do Sul (Eggers, 2015). Seu período de florescimento é durante a primavera, ocorrendo em campos de cultivo agrícola bem como em regiões de criação bovina, em beiras de estradas e trilhas. São plantas bulbosas, com folhas plicadas, flores em geral geminadas, de cor azul a roxa, com tépalas subiguais ou com o verticilo interno apresentando tépalas menores que o verticilo externo. Possui estilete delicado, com ramos filiformes, terminando em lobos estigmáticos relativamente alargados (Eggers, 2008).

O gênero é constituído por sete espécies: *Gelasine caldensis* Ravenna, *Gelasine coerulea*, *Gelasine elongata* (*Gelasine azurea* Herbert), *Gelasine gigantea* Ravenna, *Gelasine paranaensis* Ravenna, *Gelasine rigida* Ravenna e *Gelasine uruguayensis* (Eggers, 2015).

No Rio Grande do Sul são encontradas as espécies *Gelasine coerulea* e *G. elongata* (Figuras 2 A e B respectivamente), cujas diferenças concernem principalmente à morfologia e coloração das tépalas.

Recentemente, foi encontrada uma terceira espécie de *Gelasine* no Estado, *G. uruguayensis* (Figura 2C) (Rodríguez *et al.*, 2014). Como o próprio nome indica, a espécie é encontrada no Uruguai e compartilha o mesmo habitat descrito para as demais espécies de *Gelasine* (Ravenna, 1984).

As espécies de *Gelasine* são pouco observadas a campo tendo em vista o tamanho de suas populações que são relativamente pequenas. A dificuldade de manutenção de exemplares em herbários tem resultado num número bastante restrito de trabalhos já realizados com espécies de *Gelasine*. A lista de espécies ameaçadas para o estado do Rio Grande do Sul recentemente publicada inclui as espécies *Gelasine elongata* e *G. coerulea*, sendo a primeira delas ameaçada e a segunda, criticamente ameaçada (FZB/RS, 2014). Tais espécies ocorrem em populações constituídas de alguns poucos indivíduos, muitas vezes com menos de dez plantas por população, o que aumenta a vulnerabilidade das mesmas.

Na filogenia proposta por Chauveau *et al.* (2012), observou-se que o gênero *Gelasine* não é monofilético. Na árvore filogenética proposta pelos autores, *Gelasine elongata* agrupa com as espécies *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., *E. latifolia* (Mill.) Urb. e *Phalocallis coelestis* (Lehm.) Ravenna, enquanto que *G. coerulea* se posiciona como grupo irmão das demais espécies pertencentes ao clado B de Tigridaeae. Os autores reiteram a necessidade de realizar análises complementares a fim de compreender melhor a posição destas espécies.

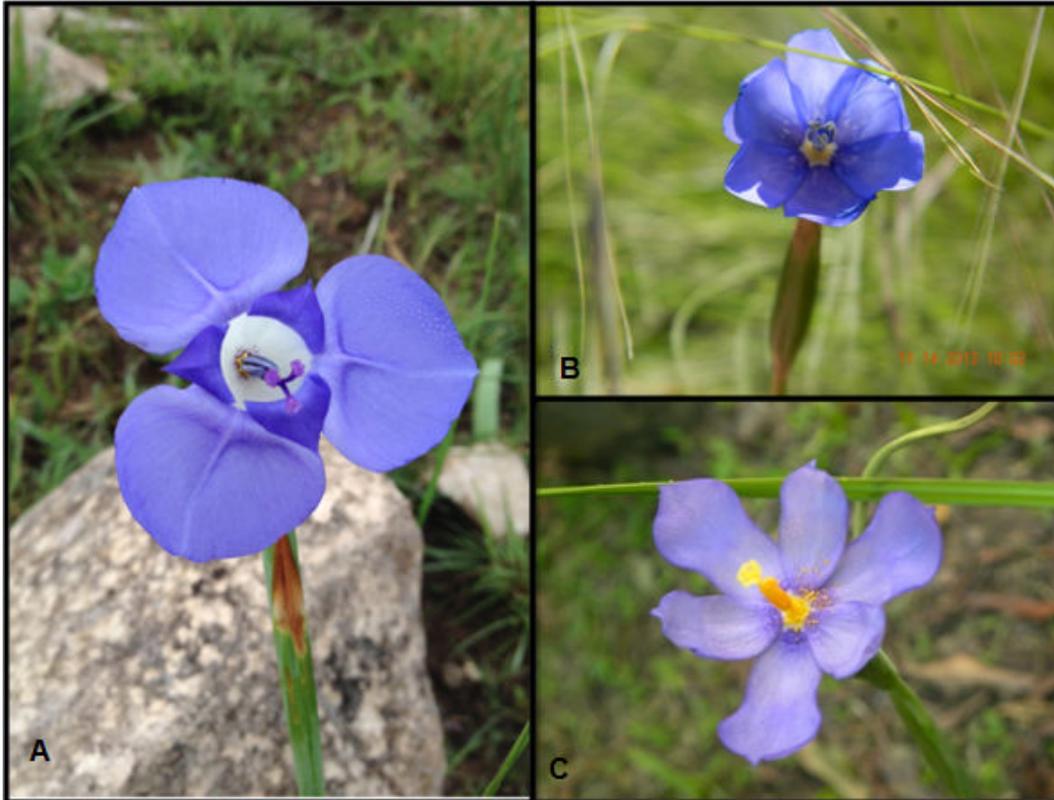


Figura 2: A: *Gelasine coerulea*; B: *G. elongata*; C: *G. uruguayensis*.

4 - Estudos citogenéticos em Iridaceae

A citogenética é uma ferramenta útil na resolução de problemas taxonômicos, especialmente para espécies vegetais (Guerra, 1988). Diferenças nas características cariotípicas, como número e morfologia cromossômica, podem ser usadas na elucidação das relações taxonômicas de vários táxons de plantas e ajudam a inferir o possível número cromossômico ancestral (Bareka *et al.*, 2012, Moraes *et al.*, 2015).

Estudos citogenéticos têm auxiliado na compreensão da sistemática e evolução de Iridaceae. O número básico, o nível de ploidia, o comprimento e razão dos braços cromossômicos, além da quantidade de heterocromatina são características importantes para considerações sistemáticas e evolutivas, além da compreensão de parentesco entre os táxons, uma vez que mudanças no cariótipo são improváveis devido às variações ambientais ou fisiológicas (Goldblatt & Takei, 1997; Alves *et al.*, 2011).

Em Iridaceae, aproximadamente 65% das espécies (~1.330 espécies) possuem dados citológicos publicados (Alves *et al.*, 2011; Goldblatt & Takei, 1997), embora a maioria dos resultados sejam relativos apenas ao número cromossômico, e grande parte das espécies seja do Velho Mundo.

Muitos dos estudos citogenéticos em Iridaceae foram desenvolvidos por Peter Goldblatt, o qual trabalha com esta família desde meados da década de 1960. Goldblatt (1982) apresentou um grande volume de dados citogenéticos de diversas espécies de Iridaceae, entretanto, a família apresenta um número cromossômico básico ainda incerto, embora o número ancestral tenha sido sugerido para quase todos os gêneros.

Dados citogenéticos para iridáceas do continente Americano são ainda escassos (Goldblatt, 1982; Kenton & Heywood, 1984; Kenton *et al.*, 1986) e são na grande maioria para espécies nativas (Alves *et al.*, 2011; Souza-Chies *et al.*, 2012; Tacuatiá *et al.*, 2012, Alencar, 2012). A escassez de informações citogenéticas tem dificultado a realização de estudos que associam dados cromossômicos às análises filogenéticas os quais auxiliariam na compreensão da evolução cromossômica e sua importância na diversificação de espécies da família (Moraes *et al.*, 2015).

Goldblatt & Takei (1997) sugerem que a variação frequente dos números básicos dentro de alguns gêneros é ocasionada pela poliploidia e disploidia originando números derivados, tais como $x_2 = 14, 12, 11, 9, 8, 7$ e 5. A ocorrência de eventos recorrentes de poliploidia e disploidia em Iridaceae são bastantes comuns. Assim, é possível encontrar na família desde $2n = 6$ até $2n = 230$ (Alves *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2015).

Goldblatt (1990) sugere que o provável número básico para as subfamílias Nivenioideae, Iridoideae e Crocoideae (Ixioidae) seja $x = 10$, mas observa uma grande variação dentro de cada tribo e gêneros. A morfologia e tamanho cromossômico também variam muito em Iridaceae, sendo a assimetria cariotípica frequente principalmente em Iridoideae (Alves *et al.*, 2011; Souza-Chies *et al.*, 2012). Outro aspecto interessante encontrado em diversas espécies da família é a bimodalidade cariotípica (presença de dois grupos distintos de cromossomos),

particularmente comum em Iridoideae (Kenton *et al.*, 1990). A bimodalidade cariotípica é considerada uma característica altamente especializada e ocorre em muitas espécies vegetais e animais (Moreno *et al.*, 2009).

Goldblatt (1982) propôs o número cromossômico básico de $x = 7$ para a tribo Tigridaeae e indica que a tribo possui cariótipo bimodal com pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, exceto em *Gelasine elongata*, onde ambos os pares maiores são acrocêntricos (Kenton & Rudall, 1987) e, segundo estes autores, $x = 6$.

Goldblatt *et al.* (2008), a partir de dados filogenéticos, indicaram que em Tigridaeae a bimodalidade surgiu diversas vezes em diferentes linhagens. A morfologia cromossômica variável e cariótipo bimodal têm sido utilizados na delimitação desta tribo (Kenton *et al.*, 1990; Goldblatt & Takei, 1997; Reeves *et al.*, 2001). Um exemplo disso ocorre na espécie *Eleutherine bulbosa* que possui um cariótipo fortemente bimodal, com 12 cromossomos cujos tamanhos variam de 4,6 a 10,9 μm . O par cromossômico maior é heteromórfico, devido à ocorrência de uma inversão pericêntrica desigual seguida de duplicação da RON (Região Organizadora do Nucléolo) em um dos homólogos (Alves *et al.*, 2011). Também tem sido verificado que a presença de heteromorfismo nos braços cromossômicos em algumas espécies é resultante de translocações recíprocas desiguais (Souza-Chies *et al.*, 2012).

Recentemente, Moraes *et al.* (2015) publicaram um estudo com o intuito de elucidar as questões evolutivas quanto ao número cromossômico ancestral dentro da subfamília Iridoideae. O número cromossômico básico ancestral sugerido para a subfamília foi $x = 8$, concordante entre todas as análises realizadas. Para as tribos, se atribui como sendo o número cromossômico básico ancestral $x = 9$ para Sisyrinchieae, $x = 7$ para Tigridaeae (confirmando dados propostos por Goldblatt, 1982) e $x = 14$ para Trimezieae. A partir dos resultados observa-se a complexidade da evolução citogenética na qual citótipos (séries poliploides) são comuns, especialmente em espécies do clado A de Tigridaeae. Já para o clado B de Tigridaeae e para Trimezieae, eventos de disploidia parecem ser especialmente importantes.

As informações citogenéticas encontradas para o gênero *Gelasine* são escassas, existindo estudos que apenas sugerem número cromossômico. Goldblatt (1982) propõe $x = 7$ para *Gelasine elongata* e Kenton & Rudall (1987), $x = 6$ para a mesma espécie; Ravenna (1984) reporta $x = 7$ para *Gelasine uruguayensis* e Moraes *et al.* (2015) $x = 7$ para *Gelasine coerulea*. Estudos mais aprofundados foram realizados apenas para *Gelasine elongata* por Kenton & Rudall (1987), que verificaram um caso incomum de heteromorfismo cromossômico (anteriormente descrita como *Gelasine azurea*). Este estudo foi o primeiro relato para Iridaceae quanto à existência de heteromorfismo cromossômico, sugerindo que é possível a formação de pares cromossômicos de tamanhos desiguais em espécies desta família como resultado de inversões e translocações.

5 - Tamanho de genoma em Iridaceae

A estimativa do tamanho do genoma por citometria de fluxo vem sendo muito utilizada nos últimos anos não apenas para determinar a quantidade de DNA das espécies, mas também para ajudar a elucidar questões evolutivas, aliando-se dados de citogenética clássica, molecular e fornecer informações adicionais para análise filogenética aumentando o número de caracteres a serem avaliados (Dolezel *et al.*, 2007; Kron *et al.*, 2007; Bennett & Leitch, 2011; Moraes *et al.*, 2015).

Em Iridaceae, a citometria de fluxo já foi aplicada para a estimativa da quantidade de DNA de cerca de 150 das 2.030 espécies (7,4%), sendo evidenciada uma amplitude de variação de 0,96 a 62,76 pg para o conteúdo diploide 2C (Moraes *et al.*, 2015).

Na tribo Tigridieae, estima-se que apenas 0,69% das espécies tenham sua estimativa da quantidade de DNA conhecida, destacando-se: *Cypella* spp. e três espécies de *Hesperoxiphion* (valores 2C que variam de 2,48 a 8,76 pg; Kenton *et al.*, 1990), *Kelissa brasiliensis* (2C = 17,50 pg), *Gelasine elongata* (2C = 3,50 pg), *Cipura paludosa* Aubl. (2C = 16,9 pg) e quatro espécies de *Tigridia* (7,75-16,20 pg) (Zonneveld *et al.*, 2005; Bennett & Leitch, 2012). Moraes *et al.* (2015) apresentam

um levantamento dos dados de conteúdo de DNA já publicados para Iridaceae e dados inéditos para 11 espécies. Neste estudo os dados citogenéticos (número cromossômico e tamanho de genoma) são analisados dentro de uma perspectiva filogenética a partir da árvore de Iridoideae reportada por Chauveau *et al.* (2012), a fim de melhor compreender a evolução cromossômica e buscar o número básico ancestral, com especial atenção para Tigridieae e Trimezieae.

6 - Diversidade genética

Segundo Heywood & Watson (1997) diversidade dividi-se em dois conceitos: diversidade genética explica-se pela soma da variabilidade genética presente na mesma espécie e diversidade ecológica estimava do número de espécies existentes em uma determinada comunidade.

Deste modo a análise da diversidade genética existente dentro e entre populações das espécies fornece os subsídios necessários para a seleção dos recursos a serem conservados (Gaiotto *et al.*, 2003; Zucchi *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2011). Para que estimativas dos níveis de diversidade genética em espécies vegetais sejam possíveis, é necessário o conhecimento de como a variabilidade genética se distribui nas diversas categorias hierárquicas que compõem os ecossistemas e biomas (Gaiotto *et al.*, 2003; Zucchi *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2009; 2011).

A variabilidade genética é essencial para a sobrevivência e adaptação de espécies; conhecer a diversidade genética intrapopulacional e o nível de diferenciação entre as populações de uma dada espécie é de fundamental importância para a definição de estratégias de conservação e uso sustentado dos recursos genéticos. Quantificar essa variabilidade nas populações é crucial para avaliar o potencial de manutenção das espécies e suas funções reprodutivas ao longo dos tempos (Gribel, 2001). Informações genômicas vêm sendo utilizadas em estudos de hibridação natural, história populacional, filogeografia e, ainda, avaliando o impacto do comportamento reprodutivo e da dispersão na estrutura genética de populações ameaçadas (Beaumont & Bruford, 1999).

Atualmente, o desenvolvimento de técnicas moleculares tem contribuído para o monitoramento da diversidade genética em ecossistemas ameaçados, fazendo possível a aplicação de estratégias que tentam minimizar o impacto provocado pela ação humana no meio ambiente (Varshney *et al.*, 2005).

7 - Marcadores moleculares e diversidade genética

Os marcadores moleculares são definidos como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, utilizados para caracterizar um ou mais indivíduos quanto aos seus genomas e suas características herdadas através do DNA. Tais marcadores são utilizados como ferramentas em trabalhos que visam identificar a variabilidade genética entre populações e entre indivíduos de uma mesma população e na caracterização de indivíduos aparentados (Milach, 1998; Ferreira & Grattapaglia, 1998; Brandão *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011a; Giustina *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de métodos que visam a obtenção de marcadores moleculares em plantas tem possibilitado o aumento do conhecimento sobre os níveis de diversidade e de estruturação genética de diferentes táxons. A estimativa da variabilidade genética em populações naturais é a base para o esclarecimento de diversos questionamentos no campo da genética de populações, tais como endogamia, processos evolutivos, entre outros (Vieira & Carvalho, 2008; Tacuatiá *et al.*, 2012).

Os marcadores moleculares são comparativamente mais informativos que os marcadores morfológicos, uma vez que não sofrem influência ambiental. Além disso, permitem a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos e a possibilidade de detecção de tais polimorfismos em qualquer estágio do desenvolvimento da planta (Xu, 2010).

Atualmente estão disponíveis vários marcadores moleculares baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que podem ser empregados para análises de estimativa de variabilidade genética, tais como: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); Microssatélites – SSR (*Simple Sequence Repeats*); AFLP

(*Amplified Fragment Length Polymorphism*); ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), os marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), entre outros. A detecção de marcadores polimórficos é fundamental para a realização de estudos que visem evidenciar os níveis de diversidade populacional das espécies. Porém, para a escolha do método mais adequado deve-se levar em consideração o custo, a consistência, a reprodutibilidade e o nível de polimorfismo detectado (Wolff & Morgan-Richards, 1998; Bernet & Branchard, 2001; Xu, 2010; Silva *et al.*, 2011b).

Com a disponibilidade de diferentes técnicas de biologia molecular, é comum a utilização de mais de um tipo de marcador molecular para avaliar a diversidade genética (Lamia *et al.*, 2010; Ferrão *et al.*, 2013).

As técnicas que se destacam, levando em conta o custo benefício são: SSR e ISSR, pois são úteis na caracterização de indivíduos aparentados, devido ao elevado grau de polimorfismo, apresentam alta reprodutibilidade quando comparadas a algumas técnicas como RAPD e AFLP, além de serem de baixo custo (Borba *et al.*, 2005).

Em Iridaceae, marcadores moleculares têm sido utilizados com sucesso tanto para a caracterização molecular de cultivares e de espécies (Caiola *et al.*, 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 & Orick, 2000; Wróblewska *et al.*, 2003; Tacuatiá *et al.*, 2012).

Além da importância na utilização dos marcadores moleculares, cabe ressaltar o uso de sequenciamento de fragmentos específicos de DNA, que permite detectar qualquer mutação de ponto, e tem sido utilizado em estudos de sistemática e filogenia molecular (Caiola *et al.*, 2004; Meerow *et al.*, 2005, 2007).

7.1 - ISSR e aplicações em Iridaceae

A técnica de ISSR, desenvolvida por Gupta *et al.* (1994) e Zietkiewicz *et al.* (1994), consiste em um marcador de herança dominante, baseia-se no método de

PCR e envolve a amplificação de um segmento de DNA presente a uma distância passível de amplificação entre duas regiões de microssatélites idênticas e orientadas em direções opostas. Na técnica de ISSR, os *primers* utilizados são compostos por sequências de 16-25 pares de bases (pb), compostos de sequências di, tri, tetra ou penta-nucleotídicas. Os produtos amplificados possuem entre 200 e 2000 pb e podem ser detectados em gel de agarose, uma grande vantagem do uso dos ISSR é não necessitar do conhecimento prévio das sequências alvo como na técnica de SSR, além de serem altamente polimórficos. (Reddy *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2010).

Os marcadores ISSR são recomendados para análises de espécies proximamente relacionadas, obtendo-se resultados confiáveis, devido a sua abundância e dispersão no genoma, sendo marcadores de alta reprodutibilidade, bastante polimórficos e por apresentarem rapidez em seus resultados com custos razoavelmente menores em comparação aos demais marcadores (Zhang *et al.*, 2007; Xu, 2010; Silva *et al.*, 2011b).

Atualmente, várias espécies da família Iridaceae com ocorrência no sul do Brasil vêm sendo investigadas quanto à diversidade genética e genética de populações utilizando marcadores do tipo ISSR (Souza-Chies *et al.*, 2012). Estudos pioneiros vêm sendo feitos em espécies endêmicas ou de ocorrência restrita ao sul da América do Sul os quais poderão contribuir de forma significativa para conhecimento da distribuição da variabilidade genética no continente sul-americano, o qual representa um dos grandes centros de diversificação de espécies da família Iridaceae (Goldblatt *et al.*, 2008).

Estudos na família Iridaceae foram realizados por Tacuatiá *et al.* (2012) que utilizaram marcadores ISSR em *Sisyrinchium micranthum* Cav. para avaliar os níveis de variabilidade genética dos diferentes citótipos encontrados para a espécie e para detectar se populações com mesmo citótipo compartilham o mesmo “*pool* gênico”. Alencar (2012) analisou populações de *Calydorea crocoides* Ravenna, utilizando marcadores ISSR para verificar a diversidade genética. Stiehl-Alves (2013), utilizando indivíduos de diferentes espécies de *Herbertia*, aplicou marcadores ISSR com o objetivo de melhor compreender os

aspectos evolutivos neste gênero e sua diversificação na região Sul do Brasil. Miz (2013) utilizou ISSR para verificar a variabilidade genética de populações naturais de *Sisyrinchium palmifolium* L. subsp. *palmifolium*. Fachinetto (2014), através de marcadores ISSR avaliou a diversidade intra e interpopulacional de 29 populações de diferentes espécies pertencentes ao clado V de *Sisyrinchium* L. além de fazer uma análise comparativa da diversidade intra e interpopulacional de diferentes populações de *Sisyrinchium sellowianum* Klatt.

A fim de ampliar as informações quanto à variabilidade e diversidade genética para espécies de Iridaceae e considerando que existem poucos estudos sobre o gênero *Gelasine*, fez-se necessária a realização de uma caracterização molecular das espécies *Gelasine coerulea*, *G. elongata* e *G. uruguayensis* ocorrentes na Região Sul do Brasil. Tal abordagem pode elucidar quanto à influência dos níveis de variabilidade genética no número restrito de indivíduos encontrados a campo, ou ainda inferir quanto ao modo reprodução das espécies e se este pode explicar a inclusão recente (2014) destas espécies na lista da flora nativa ameaçada de extinção para o Rio Grande do Sul, como ameaçadas (*Gelasine elongata*) e criticamente ameaçadas (*G. coerulea*).

Além disso, a utilização de análises citogenéticas podem auxiliar a elucidar o status parafilético de *Gelasine* evidenciado na filogenia de Tigridieae recentemente publicada por Chauveau *et al.* (2012). Nesse sentido, Kenton & Rudall (1987) relataram *Gelasine elongata* como sendo o primeiro caso de heteromorfismo cromossômico para a família Iridaceae, fato também revelado posteriormente por Guerra (1991) para *Eleutherine bulbosa*, duas espécies com grande afinidade filogenética. A busca por uma caracterização citogenética acurada faz-se importante para apoiar as evidências filogenéticas já conhecidas envolvendo as espécies de *Gelasine*.

OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo caracterizar três espécies de *Gelasine* (*G. elongata*, *G. coerulea* e *G. uruguayensis*) ocorrentes no sul do Brasil quanto aos aspectos citogenéticos e moleculares.

Objetivos Específicos

- Avaliação da variabilidade genética de populações correspondentes às espécies de *Gelasine*;
- Determinação do número cromossômico de diferentes populações das três espécies de *Gelasine*;
- Construção do cariótipo, idiograma e fórmula cariotípica das três espécies de *Gelasine*;
- Determinação do padrão da heterocromatina constitutiva (HC) com uso de fluorocromos CMA/DAPI para as três espécies de *Gelasine*.
- Confirmação do heteromorfismo cromossômico no par I de *Gelasine elongata*;
- Estimativa da quantidade de DNA destas espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Coleta de material vegetal

As coletas dos materiais utilizados nas análises citogenéticas e moleculares das espécies *Gelasine elongata* e *G. coerulea* foram realizadas nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Tabela 1, Figura 3). *Gelasine elongata* apresenta uma distribuição geográfica restrita à região Sul do Brasil (Rio Grande do Sul e Santa Catarina), já *G. coerulea* tem uma distribuição mais ampla, estando presente nas regiões Sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-Oeste (Goiás) (Figura 4). Para a espécie *G. uruguayensis*, foram realizadas coletas durante os meses de setembro a janeiro dos anos de 2012, 2013 e 2014, porém sem sucesso, diante desta dificuldade, o pesquisador Leonardo Paz Deble (UNIPAMPA, Universidade Federal do Pampa) enviou um indivíduo de sua coleção particular para análises filogenéticas e citogenéticas.

Em todas as expedições, foi coletado material testemunho na forma de exsicatas (voucher) a serem depositadas no herbário ICN da UFRGS, além de bulbos (para análises citológicas), material foliar (análises moleculares e de tamanho de genoma), e sementes quando possível (Tabela 1).

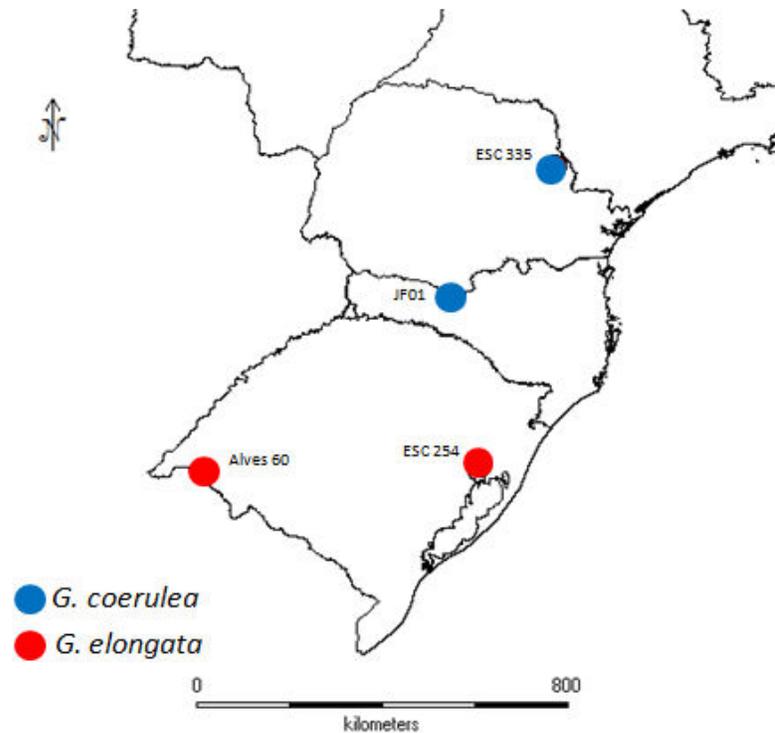


Figura 3: Localização das populações coletadas de *Gelasine coerulea* (JF01 e ESC335) e *G. elongata* (ALVES60, ESC254).



Figura 4: Mapa de distribuição geográfica de *Gelasine coerulea*: regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná; São Paulo e Minas Gerais; e Goiás, respectivamente). *Gelasine elongata*: região Sul (Rio Grande do Sul e Santa Catarina). *Gelasine uruguayensis*: região Sul (Rio Grande do Sul), identificada pelo triângulo vermelho como sendo visualizada a campo somente neste ponto e na divisa do município de Ácegua com o Uruguai (Ácegua tem toda a extensão territorial fazendo divisa com o Uruguai). Mapa adaptado do site Flora do Brasil distribuição geográfica das espécies do gênero *Gelasine*.

Tabela 1: Relação das populações de *Gelasine* coletadas no Sul do Brasil.

Acesso (Voucher)	Local	Latitude (S)	Longitude (W)	Nº Indiv.
<i>Gelasine coerulea</i> (ESC335)	Jaguariaíva, PR	24° 12' 13,9"	49° 38' 51,6"	12
<i>Gelasine coerulea</i> (JF01)	Água Doce, SC	26° 43' 34,44"	51° 38' 2,78"	20
<i>Gelasine elongata</i> (ESC254)	Porto Alegre, RS	30° 03' 13,0"	51° 07' 03,8"	20
<i>Gelasine elongata</i> (Alves60)	Quaraí, RS	30° 11' 43,56"	56° 29' 19,32"	11

2 - Análises de variabilidade genética

2.1 - Extração de DNA total

As extrações de DNA genômico foram realizadas a partir de folhas secas em sílica gel utilizando a técnica de CTAB (Doyle e Doyle, 1987) adaptada a tubos de microcentrífuga com algumas modificações. Esta técnica solubiliza as membranas e auxilia no processo de remoção de contaminantes como polissacarídeos e taninos que podem interferir na análise do DNA. O material foliar coletado a campo foi macerado utilizando um equipamento TissueLyser Quiagen, com velocidade de 3000 rpm por três minutos. No caso das amostras que não apresentavam boa maceração, essa etapa era repetida para aumentar a eficiência da extração. Para a extração do DNA, seguiu-se o protocolo padrão adaptado a tubos de microcentrífuga e realizou-se de três a cinco lavagens (etanol 70%), a mais do DNA para as espécies de *Gelasine* devido à grande quantidade de polissacarídeos presentes. Após o *pellet* estar seco, esse foi ressuspenso em tampão TE' (Tris-HCl pH 7,5; EDTA 0,5 M pH 8,0; H₂O Milli-Q) levando em consideração o tamanho do *pellet*, e as amostras foram mantidas na geladeira *overnight*. Após solubilização total, as amostras de DNA foram conservadas em freezer a -20°C.

2.2 - Quantificação do DNA

A concentração do DNA foi estimada por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo tampão TAE 1X (Tris Base; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,5 M pH 8,0;), sendo aplicado 1 μ L da amostra de DNA total acrescida de 2 μ L de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA). Marcadores de peso molecular (DNA do fago lambda Ludwig) nas concentrações de 25, 50 e 100 ng foram adicionados ao gel de agarose como padrões de intensidade de DNA conhecidas. A eletroforese horizontal foi submetida por 35 a 50 min a 100 volts. Ao final da eletroforese, as amostras foram observadas sob luz ultravioleta (UV) e os resultados foram registrados através do sistema de Fotodocumentação L-Pix Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia). Para a confirmação da estimativa da concentração do DNA visualizada no gel, foi realizada uma quantificação das mesmas amostras em espectrofotômetro L-Quant (Loccus Biotecnologia). A partir destas concentrações, realizou-se a diluição do DNA para que a concentração final ficasse entre 10 a 30 ng/ μ L para as análises de PCR-ISSR.

2.3 - Amplificação do DNA (PCR-ISSR)

Para a amplificação dos fragmentos de DNA a partir da técnica de PCR-ISSR, foram testados 44 *primers* disponíveis no laboratório de Sistemática Molecular de Plantas do Departamento de Botânica (Instituto de Biociências - da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS). Para estes testes, foram utilizados três indivíduos de cada espécie (*Gelasine elongata* e *G. coerulea*), além dos controles positivo e negativo. Selecionamos apenas os *primers* que amplificaram para as duas espécies.

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 μ L, a temperatura de anelamento foi a mesma (45 °C) para todos os *primers*, de acordo com as seguintes condições: 1 μ L de DNA (10 a 30 ng), 2,5 μ L de tampão 10X, 1,2 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1 μ L de dNTP (10 mM), 1 μ L de *primer* (10 pmol/ μ L), 0,2 μ L de *Taq* DNA polimerase (Ludwig) (5 U/ μ L) e 18,1 μ L de H₂O Milli-Q. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycle (Applied Biosystems), usando o seguinte programa: desnaturação inicial a 94 °C

por 5 min (1 ciclo); seguido por 42 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, seguido por anelamento a 45 °C durante 45 s; alongamento a 72 °C durante 2 min; e uma extensão final a 72 °C durante 5 min.

Os produtos de PCR foram corados com o intercalante de DNA GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA), aplicados em gel de agarose 1,5% e submetidos à eletroforese horizontal a 100 V por 4h, utilizando como referência o marcador de peso molecular Ladder 100 pb (Invitrogen). As imagens dos resultados foram registradas sob luz ultravioleta (UV) através do sistema Fotodocumentação de Géis L-Pix Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia).

2.4 - Análise dos dados de ISSR

Os fragmentos de DNA amplificados foram analisados em gel de agarose 1,5% pela presença (1) ou ausência (0) de bandas, gerando uma matriz binária de dados. A matriz obtida foi usada para calcular a similaridade genética intra/interpopulacional a partir do coeficiente de Jaccard conforme a seguinte fórmula: Coeficiente de Jaccard = $N_{AB}/(N_{AB} + N_A + N_B)$ onde N_{AB} é o número de bandas compartilhado pelas amostras, N_A representa os fragmentos amplificados na amostra A, e N_B representa os fragmentos na amostra B.

As análises de percentual de *loci* polimórficos (PIC), índice de informação de Shannon (*I*), análise de coordenadas principais (PCoA), teste de Mantel, similaridade em matrizes genéticas e distâncias genéticas entre as populações foram calculados utilizando o software GenAlEx ver.6.5 (Mantel & Valand, 1970; Lewontin, 1972; Nei, 1978; Peakall & Smouse, 2006, 2012).

A similaridade genética entre as populações foi calculada com base no coeficiente de Jaccard, com o auxílio do programa FAMD 1.23 (Schlüter & Harris, 2006). A matriz de similaridade obtida foi usada no software FigTree 1.31 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) para a construção de um dendrograma pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

A AMOVA (Analysis of Molecular Variance) foi estimada por meio do programa ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier *et al.*, 2005; Excoffier & Lischer, 2010) para

determinar a estruturação da variabilidade genética dentro e entre as populações. Os fenótipos ISSR são tratados como se fossem dados derivados através da análise de restrição de haploides, para compensar a natureza dominante de marcadores ISSR.

Uma análise Bayesiana foi realizada com o conjunto de dados usando o programa STRUCTURE versão 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2007) para detectar a estrutura das populações e estimar o número provável de agrupamentos (K). O número mais provável de agrupamentos populacionais (k) foi estimado sob o modelo de mistura e correlacionados às frequências alélicas, sem informação prévia sobre a origem da população. O programa foi executado para 10.000 iterações, após um “*burn-in*” de 10.000 iterações, para testar a subdivisão da população a partir de $k = 1$ até $k = 5$, e, assim, verificar se há qualquer subdivisão possível. Vinte reiterações foram realizadas para cada k para quantificar a variação na probabilidade, como um meio de verificar se corridas diferentes poderiam produzir valores de probabilidades diferentes. Proporções de misturas individuais e média (Q) para cada população em cada grupo genético encontrado pelo programa foram registradas para o modelo. Como auxílio para a identificação do número de agrupamentos de indivíduos (k), os resultados gerados pelo STRUCTURE foram subsequentemente analisados por meio do STRUCTURE HARVESTER versão 0.6.7 (Earl, 2015), de acordo com o método de Evanno *et al.* (2005).

3 - Análises citogenéticas

3.1 - Coleta das raízes

Para a realização das análises citogenéticas (Tabela 2), os bulbos coletados a campo tiveram suas raízes originais removidas com a ajuda de bisturi e posteriormente acondicionados em frascos contendo água destilada (Figura 5A), para que ocorresse o estímulo de crescimento de novas raízes. Decorridos aproximadamente 21 dias deste processo, as novas raízes emitidas que apresentassem aproximadamente 3 mm (Figuras 5 B e C) eram coletadas e pré-tratadas com uma solução antimitótica de colchicina 0,05% por 4 horas em

temperatura ambiente. Após esta etapa, as raízes foram fixadas em Carnoy (etanol/ácido acético 3:1) (Figura 5D) por 1 hora sob agitação, havendo então a troca do fixador; a fixação era feita em temperatura ambiente por no máximo 24h sendo feito o armazenamento do material no freezer para análises posteriores (Guerra, 1988).

Tabela 2: Relação das populações coletadas e utilizadas nas análises citogenéticas.

Populações	Espécie	Local	Tipo de acesso
ESC335	<i>Gelasine coerulea</i>	Jaguariaíva, PR	Sementes
JF01	<i>Gelasine coerulea</i>	Água Doce, SC	Bulbos e Sementes
ESC254	<i>Gelasine elongata</i>	Porto Alegre, RS	Bulbos
Alves60	<i>Gelasine elongata</i>	Quaraí, RS	Bulbos
Deble 13578	<i>Gelasine uruguayensis</i>	Aceguá, RS	Bulbo

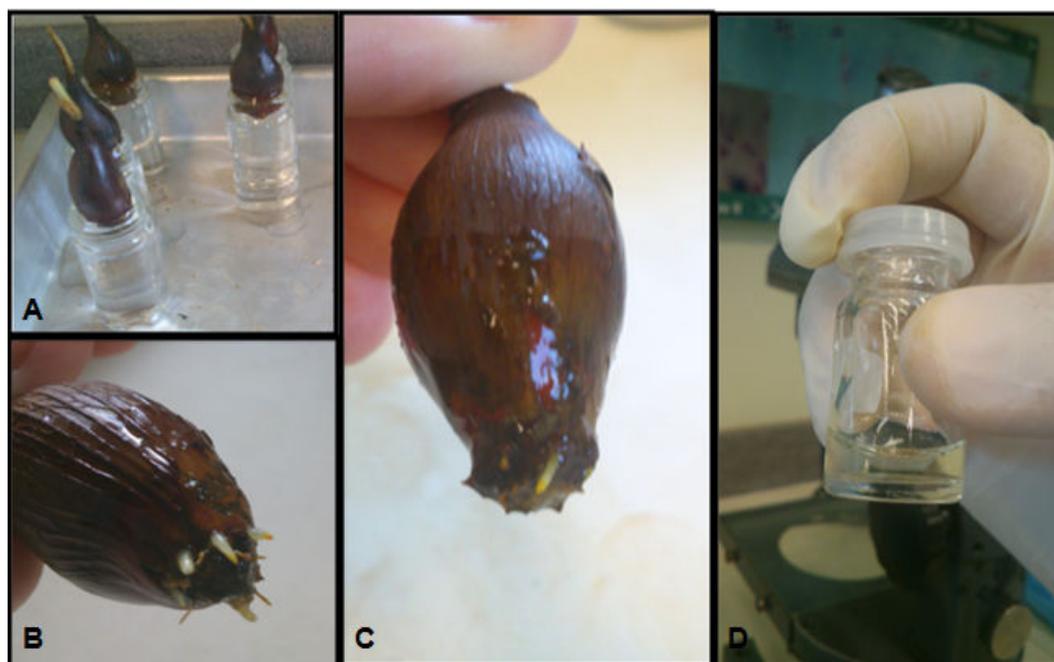


Figura 5: **A** - bulbos mantidos em frascos com água destilada; **B** e **C** - emissão de raízes em bulbos com 3mm a 5mm e **D** - frasco contendo fixador Carnoy: etanol/ácido acético (3:1).

3.2 - Germinação de sementes

Para os acessos ESC254 (*Gelasine elongata*), JF01 e ESC 335 (*G. coerulea*) foi possível a coleta de sementes, as quais foram germinadas para coleta de raízes e de material foliar. Para este procedimento, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de cálcio dissolvido em água destilada autoclavada seguindo procedimento padrão. Cada placa de Petri contendo um disco de papel filtro com água destilada recebeu cerca de 20 sementes. As placas foram mantidas em estufa a 25 °C para germinação. Decorridos 21 dias de incubação, as raízes foram coletadas utilizando-se o mesmo protocolo de tratamento e fixação de raízes descrito anteriormente.

Para o acesso ESC335 de *Gelasine coerulea*, as sementes que apresentaram emissão de material foliar (Figura 6A) foram transferidas para frascos contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) modificado sem adição de vitaminas, para alongamento foliar por cerca de 10 dias em estufa (Figura 6B), no momento que atingiram cerca de 5 cm de material foliar, as plântulas foram repassadas para copos descartáveis contendo vermiculita (Figura 6C) e mantidas por 12 dias em estufa para estímulo do alongamento foliar. Após esta etapa, procedeu-se à coleta de folhas para análises de citometria de fluxo visando à estimativa do tamanho do genoma.

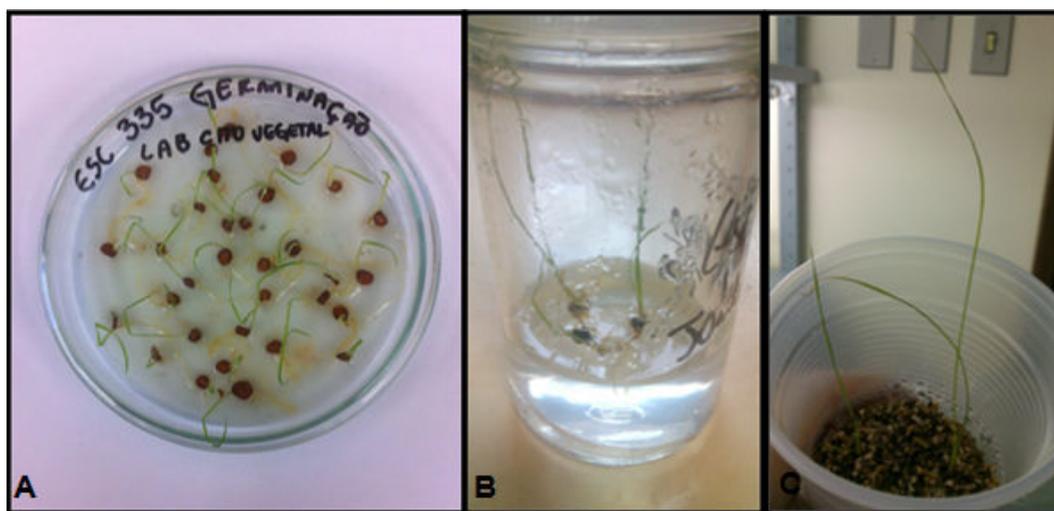


Figura 6: **A** sementes de *Gelasine coerulea* (população ESC 335) em etapa de germinação apresentando raiz e material foliar; **B** meio MS modificado para alongamento foliar; **C** plântulas do ESC 335 em vermiculita para coleta de material foliar.

3.3 - Determinação do número cromossômico

Para o preparo das lâminas, as raízes foram retiradas do fixador 3:1 e lavadas em água destilada por duas vezes de 10 min, sendo em seguida submetidas à hidrólise com HCL 5N por 20 min. Para a coloração, foi empregado o método de Feulgen com incubação das raízes hidrolisadas no reativo de Schiff por 2 horas no escuro. Posteriormente à coloração, as raízes foram lavadas em água destilada por duas vezes e submetidas à digestão enzimática (solução de celulase 2% e pectinase 20%) por 23 min em câmara úmida a 37 °C. Para o preparo da lâmina, as raízes tratadas foram maceradas em uma gota de ácido acético 60%.

3.4 - Visualização e análise dos dados citogenéticos

As lâminas foram analisadas em um fotomicroscópio óptico Zeiss Axioplan. As células contendo cromossomos com boa condensação e um bom espalhamento foram marcadas em lâmina ponto e fotografadas no microscópio Zeiss Imager D2 (Figura 7).

Foram registradas aproximadamente 20 metáfases para cada espécie e utilizou-se o programa Micro Measure 3.3, para a análise da arquitetura cariotípica, onde foram determinados o comprimento cromossômico (S - braço curto, L - braço longo e TL – comprimento total), razão entre os braços ($r = L/S$), índice centromérico ($CI = S/TL$), morfologia cromossômica, comprimento cromossômico médio (CL) e comprimento haploide total (THL). A assimetria do cariótipo foi estimada utilizando-se os índices A_2 (intercromossômico, respectivamente) de Romero Zarco (1986) e a classificação de Stebbins (1971).

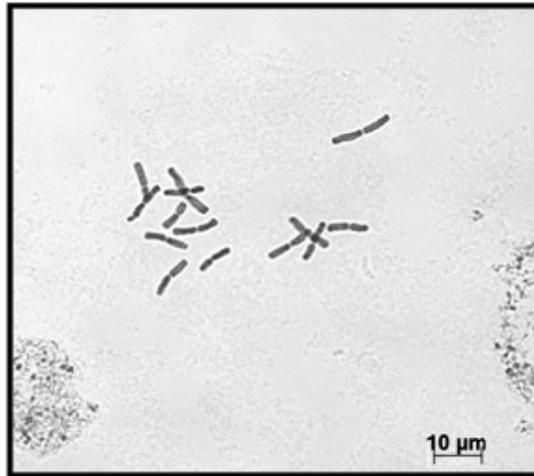


Figura 7: Aspecto das placas metafásicas analisadas apresentando cromossomos com boa condensação e espalhamento de *Gelasine coerulea*.

3.5 - Dupla-coloração com os fluorocromos CMA/DAPI

Seguindo protocolo de Guerra (1988) com modificações, as raízes foram retiradas do fixador Carnoy e lavadas em água destilada quatro vezes por 10 min, após esta etapa realizou-se a digestão enzimática conforme descrito anteriormente. As raízes passaram por uma lavagem em água destilada sendo então mantidas nela por cerca de 30 min em câmara úmida à temperatura ambiente. O preparo das lâminas foi feito com esmagamento das raízes em ácido acético 60%. A remoção da lamínula foi feita em nitrogênio líquido, sendo as lâminas secas por três dias em temperatura ambiente protegidas da poeira.

Após esta etapa, utilizamos o protocolo de Guerra (2000) de dupla coloração. A primeira etapa consiste na coloração com CMA (cromomicina A₃); foram aplicados cerca de 15 μL de CMA (0,5 mg/mL) sobre o material e coberto com uma lamínula de vidro. As lâminas foram mantidas em câmara úmida e escura por 1 hora. Após esta etapa, a lamínula e o excesso de corante foram retirados com água destilada, a lâmina foi seca com a auxílio de uma bomba de ar e mantida no escuro até o início do procedimento de coloração com DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol). Foram aplicados cerca de 15 μL de DAPI (2 μg/mL) sobre a lâmina e cobriu-se com uma lamínula de vidro. As lâminas foram mantidas em câmara úmida escura por 30 min, após, a lamínula e o excesso do

corante foram retirados com água destilada. As lâminas foram secas rapidamente e guardadas no escuro até a aplicação do meio de montagem glicerol/McIlvaine (contendo cerca de 12 µL de MgCl₂). As lâminas coradas foram guardadas em geladeira em câmara escura por pelo menos três dias antes de serem analisadas em microscópio de fluorescência.

3.6 - Análise de tamanho de genoma

Para a estimativa de quantidade de DNA, as análises por citometria de fluxo e o preparo das amostras foram realizadas no laboratório de Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Foram analisados cinco indivíduos dos acessos ESC 254 (*Gelasine elongata*), JF01 e ESC335 (*G. coerulea*), e um indivíduo do acesso Alves60 (*G. elongata*). Para a espécie *Gelasine uruguayensis*, foi utilizado um único indivíduo para o qual a análise de citometria foi realizada em três momentos.

Para cada amostra a ser analisada, foi macerado cerca de 20 a 30 mg de tecido foliar jovem da espécie e aproximadamente a mesma quantidade de material foliar da planta-padrão de referência. Para as espécies *Gelasine elongata* e *G. coerulea* utilizou-se como padrão *Pisum sativum* cv. Ctirad (2C = 9,09 pg) e para *G. uruguayensis* o padrão utilizado foi *Vicia faba* cv. Inovec (2C = 26,90 pg).

Com auxílio de um bisturi, as folhas foram trituradas em placa de Petri na presença do tampão LB01 (1 mL) para liberar os núcleos (Dolezel *et al.*, 1989). A solução proveniente desta maceração foi filtrada através de tubo contendo um filtro de 50 µm. Os núcleos foram corados com 25 µL de uma solução composta por iodeto de propídio 1 mg/mL⁻¹ e 5 µL de RNase.

Pelo menos 10.000 núcleos foram analisados para cada amostra usando um citômetro FACS-Calibur (Becton-Dickinson). Os histogramas de citometria de fluxo foram gerados no software Cell Quest e analisados pelo software 2,8 WinMDI disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html> (Trotter, 2000).

Os valores 2C de cada amostra foram calculados pela intensidade de fluorescência relativa da amostra e do padrão conforme a seguinte equação:

$$\text{DNA amostra} = \left(\frac{\text{G1 da amostra}}{\text{G1 do padrão}} \right) \times \text{DNA padrão}$$

O valor total de DNA 2C foi calculado utilizando a relação linear entre os sinais fluorescentes dos núcleos corados da amostra desconhecida e o padrão interno. As amostras foram avaliadas para cada espécie e o desvio-padrão (DP) foi calculado. O tamanho do genoma monoploide (1Cx) foi utilizado para representar o teor de DNA no cromossomo (x) de uma célula somática (Greilhuber, 2005), enquanto 2C refere-se a todo o GS (*Genome Size*) de uma célula somática. O valor de 1 pg de DNA equivale a 978 Mpb (Dolezel, *et al.*, 2003).

RESULTADOS

1 - Diversidade genética

A diversidade genética foi analisada para as espécies *Gelasine elongata* e *G. coerulea*, com base no padrão de *fingerprinting* utilizando marcadores ISSR. Durante as expedições de coletas se observou que as populações de *G. elongata* e *G. coerulea* são restritas a poucos indivíduos, ocorrendo em pequenas áreas cercadas por terras cultivadas e criação bovina. As coletas iniciaram por pontos previamente identificados pelo nosso grupo de pesquisa para tais espécies, porém em muitos destes pontos foi observado grande impacto por ação antrópica, não sendo possível em alguns casos encontrar as espécies alvo deste estudo (Figura 8). A espécie *G. elongata* não foi encontrada no estado de SC, assim foram obtidos acessos somente para o estado do RS. Por outro lado, para *G. coerulea*, foram realizadas coletas somente de uma população em SC e uma no PR (Figura 3). A dificuldade na coleta de indivíduos de ambas as espécies de *Gelasine* para o estado do RS reflete o grau de vulnerabilidade em que se encontram, estando estas espécies atualmente na lista de ameaçadas da flora do Rio Grande do Sul; *G. elongata* com status de ameaçada e *G. coerulea* criticamente ameaçada (FZB/RS, 2014).

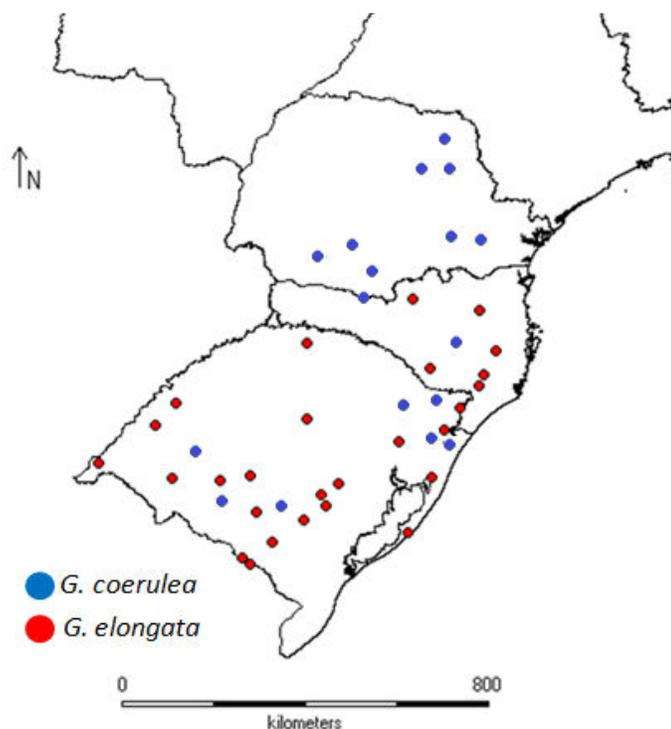


Figura 8: Esforço de coleta realizado entre os anos de 2013 e 2014 durante os meses de setembro a dezembro para localizar populações das espécies de *Gelasine elongata* e *G. coerulea*.

A partir dos testes realizados com 44 *primers* de ISSR, doze foram selecionados por apresentarem boa reprodutibilidade para os 63 indivíduos analisados dos quatro acessos das espécies *G. elongata* (ESC254 e Alves60) e *G. coerulea* (JF01 e ESC335) (Tabela 1). Os doze *primers* apresentaram um total de 91 fragmentos amplificados, o tamanho dos produtos variou de 400 a 2.080 pares de bases e o número de fragmentos amplificados variou de três para o *primer* ISCS20 [DHB (AG)₅] a 11 para os *primers* F13 [(CT)₈A] e ISCS32 [(AC)₈YG] com uma média de 7,58 fragmentos por *primer* (Tabela 3).

Tabela 3: Relação das sequência dos *primers* ISSR e seus iniciadores, número total de fragmentos obtidos e tamanho dos fragmentos amplificados.

<i>Primer</i> ISSR	Sequência	Número de Fragmentos	Tamanho (bp)
F3	(AG) ₈ C	10	500 > 1500
F4	(GA) ₈ C	8	500 > 1645
F11	(GACA) ₄	8	600 > 1645
F12	(GTGC) ₄	8	600 > 1500
F13	(CT) ₈ A	11	500 > 2080
P1	(AC) ₈ T	4	800 > 1500
SM1	T(CA) ₈	6	700 > 1375
ORYZA810	(GA) ₈ T	6	500 > 1250
ORYZA834	(AG) ₈ YT	7	500 > 1375
ISCS17	(DB) ₂ (CAC) ₅	9	600 > 1790
ISCS20	DHB (AG) ₅	3	700 > 900
ISCS32	(AC) ₈ YG	11	400 > 1500
Total	-	91	

O percentual de *loci* polimórficos médio foi de apenas 2%, com um intervalo de 3% para os acessos ESC254 (*G. elongata*) e JF01 (*G. coerulea*), 1,1% para o acesso ESC335 (*G. coerulea*) e chegando a 0% no acesso Alves60 (*G. elongata*). Quanto ao índice de *Shannon (I)* os valores variaram de 0,000 a 0,011 com valor médio 0,009 (Tabela 4). Foram observados alguns fragmentos específicos detectados nos acessos dentro das espécies (Figura 9).

Tabela 4: Índices de diversidade genética em populações das espécies de *Gelasine*.

Espécies	Acessos	Porcentagem de <i>loci</i> polimórficos (PPB)	Índice de <i>Shannon (I)</i>
<i>Gelasine elongata</i>	ESC254	3	0,011
	Alves60	0	0,000
<i>Gelasine coerulea</i>	JF01	3	0,016
	ESC335	1,1	0,005
	Média	2	0,009

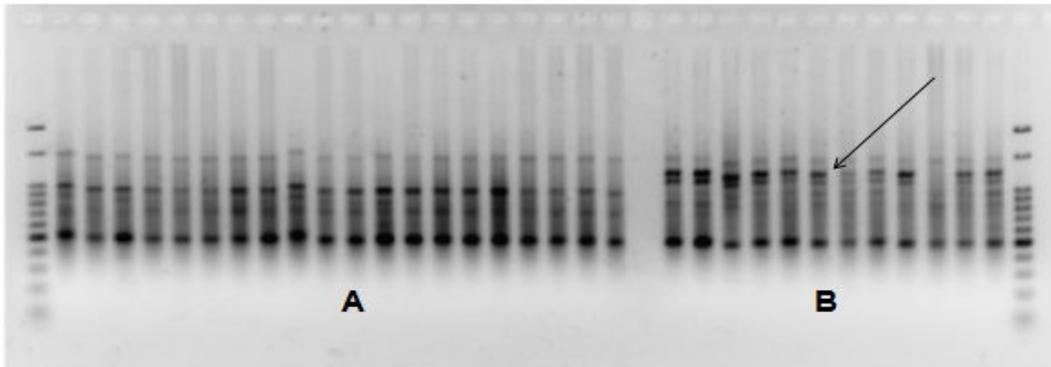


Figura 9: **A**, população JF01 (*G. coerulea*); **B**, população 335 (*G. coerulea*) a seta indica fragmentos populacionais específicos na espécie considerando o *primer* F3 [(AG)₈C].

A baixa taxa de polimorfismo encontrada nas espécies pode estar relacionada com o modo de reprodução destas espécies, além da forma de dispersão das sementes, observa-se a campo que os frutos maduros apresentam uma abertura superior que dificulta a dispersão das sementes a longas distâncias, fazendo com que as sementes se mantenham próximas às plantas-mãe, sugerindo barocoria (Figura 10) e a incidência de clonalidade dos bulbos (Figura 11 A e B).



Figura 10: **A:** Indivíduo de *Gelasine coerulea* apresentando fruto em formato de cápsula em processo de amadurecimento. **B:** Indivíduo de *G. coerulea* com fruto maduro apresentando abertura superior para dispersão de sementes. **C:** Indivíduo de *Phalocallis coelestis* apresentando fruto maduro em formato de cápsula com abertura superior.



Figura 11: **A:** Indivíduo de *Gelasine coerulea* coletado a campo. **B:** Indivíduo de *G. uruguayensis* cultivado no laboratório. Ambos exibem processo de clonalidade de bulbos.

2 - Estrutura genética populacional

O resultado da análise de variância molecular (AMOVA) mostrou variação genética significativa ($p < 0,001$) entre as populações. A maior taxa de variação ocorreu entre espécies (61,67%), enquanto que a variação das populações dentro das espécies foi menor (36,87%); já a variação intrapopulacional foi 1,45%. O valor de F_{ST} foi de 0,98, indicando uma alta estruturação (Tabela 5). A variação de 61,67% entre grupos já era esperada, visto que se trata de espécies distintas. Deste modo, realizou-se a análise separadamente para cada grupo de espécies a fim de avaliar a diversidade inter e intrapopulacional. Para *G. coerulea*, as populações JF01 e ESC 335 foram analisadas e revelaram que a maior variação foi entre populações (94,41%), do que dentro delas (5,59%), sendo o valor de F_{ST} de 0,94. Igualmente em *G. elongata*, a variação entre as populações ESC254 e Alves60 foi maior (96,20%) do que a variação intrapopulacional (3,80%), com

$F_{ST}=0,96$. Os valores altos de F_{ST} foram congruentes em todas as análises, mostrando uma alta estruturação populacional (Tabela 6).

Tabela 5: A análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro dos acessos das espécies de *Gelasine*.

Fonte de variação	d.f.	Soma dos Quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem da Variação
Entre Grupos	1	681,673	16,37784 Va	61,67
Entre Populações	2	286,660	9,79281 Vb	36,87
Dentro de Grupos				
Intra-populacional	59	22,794	0,38634 Vc	1,45
Total	62	991,127	26,55699	
Índice de Fixação: F_{ST} : 0,98				

Tabela 6: A análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro dos acessos da espécie de *Gelasine coerulea* e *G. elongata*.

<i>G. coerulea</i> Fonte de variação	d.f.	Soma dos Quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem da Variação
Entre populações	1	109,071	7,24280 Va	94,41
Intra-populacional	30	12,867	0,42889 Vb	5,59
Total	31	121,938	7,67169	
Índice de Fixação F_{ST} : 0,94				
<i>G. elongata</i> Fonte de variação	d.f.	Soma dos Quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem da Variação
Entre populações	1	114,187	8,02265 Va	96,20
Intra-populacional	29	9,200	0,31724 Vb	3,80
Total	30	123,387	8,33989	
Índice de Fixação F_{ST} : 0,96				

A identidade genética de Nei foi calculada entre pares e revelou um alto grau de similaridade genética entre as populações (Tabela 7).

Tabela 7: Análise de par a par e índices de identidade e diversidade de Nei calculados com base nos dados de ISSR.

Espécie	Acessos	Distância de Nei	Identidade de Nei
<i>Gelasine elongata</i>	ESC254 / Alves60	0,354	0,702
<i>Gelasine coerulea</i>	JF01 / ESC335	0,173	0,841

No dendrograma baseado na similaridade genética de Jaccard observa-se que os quatro acessos foram separados em dois grupos bem definidos correspondentes às espécies *Gelasine elongata* e *G. coerulea*. Ressalta-se que todos os indivíduos correspondentes a cada um dos acessos analisados agrupam entre si (Figura 12). A análise de coordenadas principais (PCoA) confirma a estrutura observada no dendrograma UPGMA, na qual o primeiro componente principal é responsável por 10,47% da variação genética total observada, enquanto que o segundo componente explicou 84% da variação. Os dois componentes resultaram em um percentual cumulativo de 94,47% demonstrando graficamente as semelhanças/diferenças dos indivíduos dos quatro acessos analisados (Figura 13). O teste de Mantel não mostrou correlação significativa entre a matriz de distância genética e de distância geográfica ($r = 0,515$, $P = 0,110$) (Figura 14).

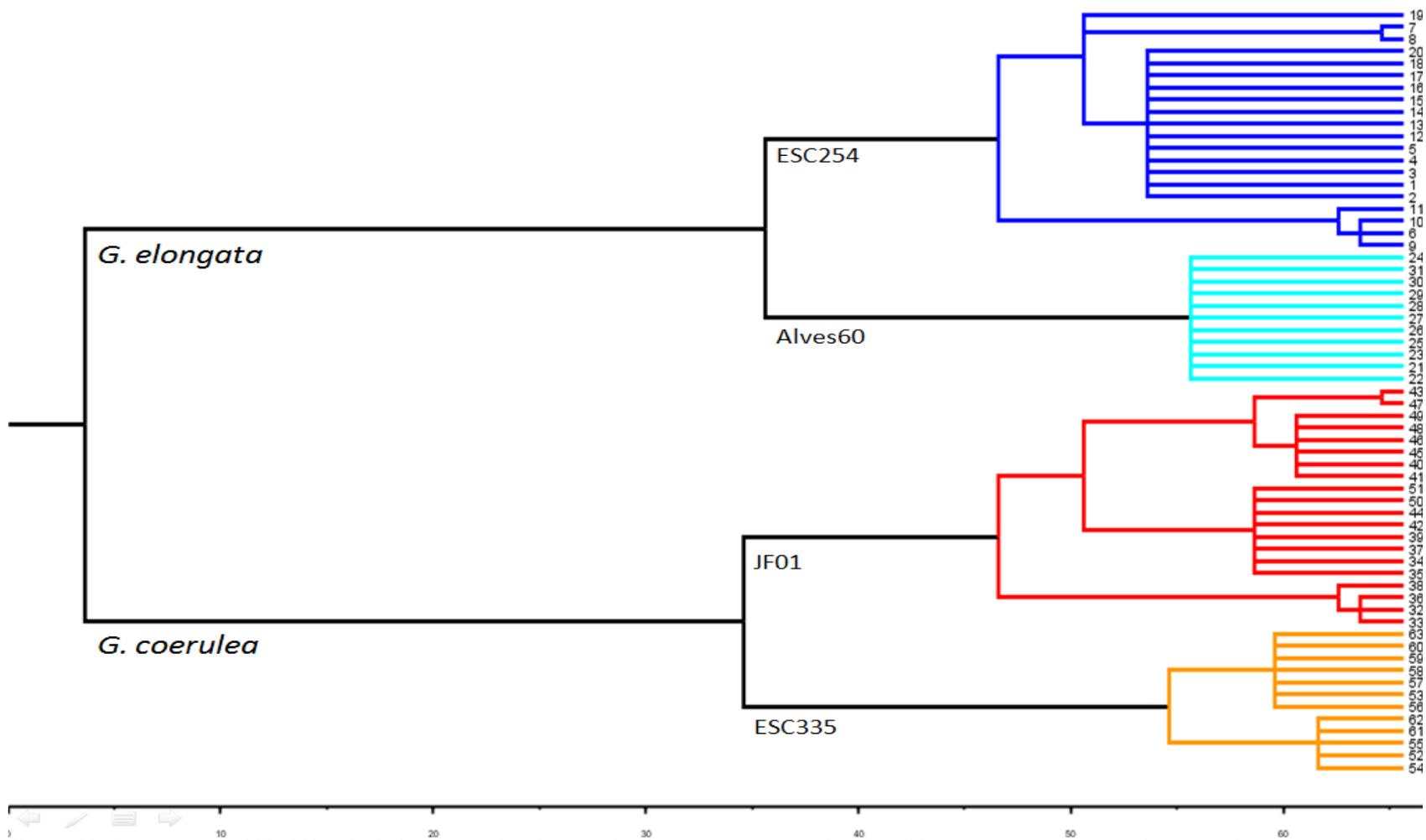


Figura 12: Dendrograma UPGMA calculado a partir dos dados oriundos de marcadores ISSR obtidos para *Gelasine coerulea* e *G. elongata*.

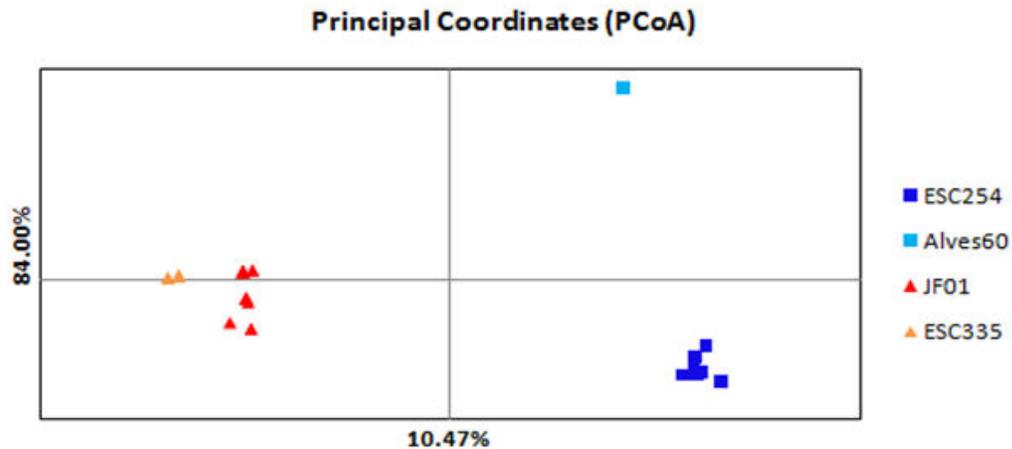


Figura 13: Análise das coordenadas principais (PCoA) obtidos através dos dados de ISSR para os acessos JF01 e ESC335 (*Gelasine coerulea*), ESC254 e Alves60 (*G.elongata*).

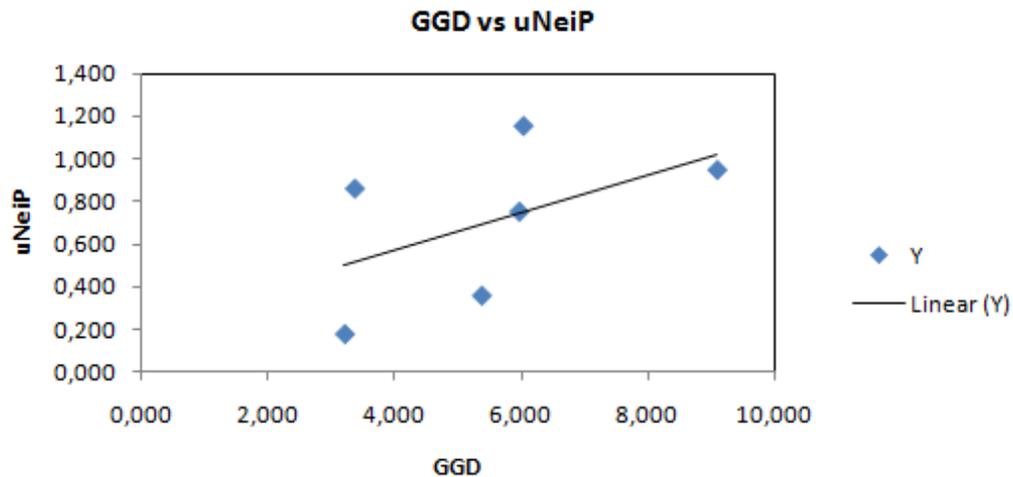


Figura 14: Teste de Mantel (correlação entre a distância genética e geográfica).

O programa STRUCTURE foi utilizado de duas formas distintas para a análise de dados: a primeira englobando a totalidade dos indivíduos; a segunda usando separadamente os acessos de *Gelasine elongata* (ESC254 e Alves60) e de *G. coerulea* (JF01 e ESC335). A primeira abordagem resultou em um agrupamento das amostras em dois *clusters* ($K = 2$) (Figura 15), resultados estes já esperados, visto que se tratam de duas espécies distintas. Na segunda análise (Figura 16), para cada uma das espécies foram formados dois *clusters*,

evidenciando a separação das populações. Em ambos os casos o delta de maior probabilidade de agrupamentos formados foi obtido quando as amostras foram agrupadas em dois *clusters* ($K = 2$). A decisão foi baseada na estatística k , na medida em que o número do pico mais alto do seu valor modal corresponde ao número de agrupamentos detectados pelo software. Estes agrupamentos foram totalmente consistentes com os resultados produzidos para UPGMA e PCoA.

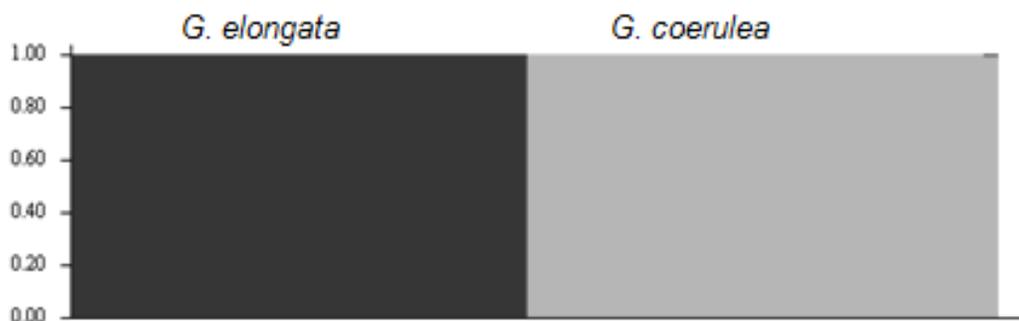


Figura 15: Cenário obtido pelo programa STRUCTURE 2.3.4. $K=2$ produzido a partir de dados ISSR dos quatro acessos analisados em conjunto.

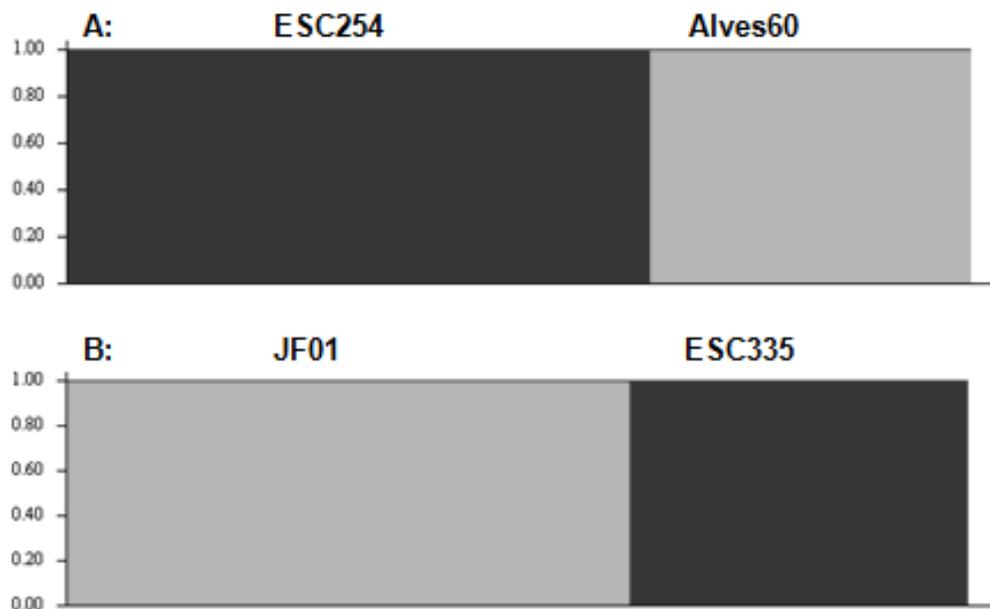


Figura 16: A e B Cenário produzido pelo programa STRUCTURE 2.3.4. $K=2$ a partir de dados ISSR dos acessos analisados separadamente ESC254 e Alves60 (*Gelasine elongata*) e JF01 e ESC335 (*G. coerulea*).

3. Análises citogenéticas

Análises citogenéticas foram realizadas com indivíduos das três espécies do gênero *Gelasine* provenientes de cinco populações (Tabela 2). Os indivíduos das populações JF01 e ESC335 de *Gelasine coerulea* e o indivíduo de *G. uruguayensis* apresentaram o número cromossômico básico $x = 7$.

Para as populações ESC254 e Alves60 de *G. elongata* foi determinado $x = 6$ como número cromossômico básico. As análises empregando coloração convencional em alguns momentos não eram totalmente claras quanto ao número de cromossomos, sugerindo a presença de 14 cromossomos, como nas outras duas espécies. Na verdade, devido à distensão da região da constrição secundária, os satélites do par I (Figura 17 A) muitas vezes se posicionam distantes do restante do cromossomo sugerindo a ocorrência de um par adicional. A ocorrência de 12 cromossomos pode ser confirmada a partir das análises de bandeamento CMA/DAPI onde a região da constrição secundária cora positivamente com CMA, evidenciando a conexão entre o satélite e o restante do cromossomo (Figura 17 B).

As três espécies de *Gelasine* apresentaram somente indivíduos diploides, $2n = 2x = 14$ e 12 , não sendo observados citótipos para estas espécies (Figuras 18A, B, C).

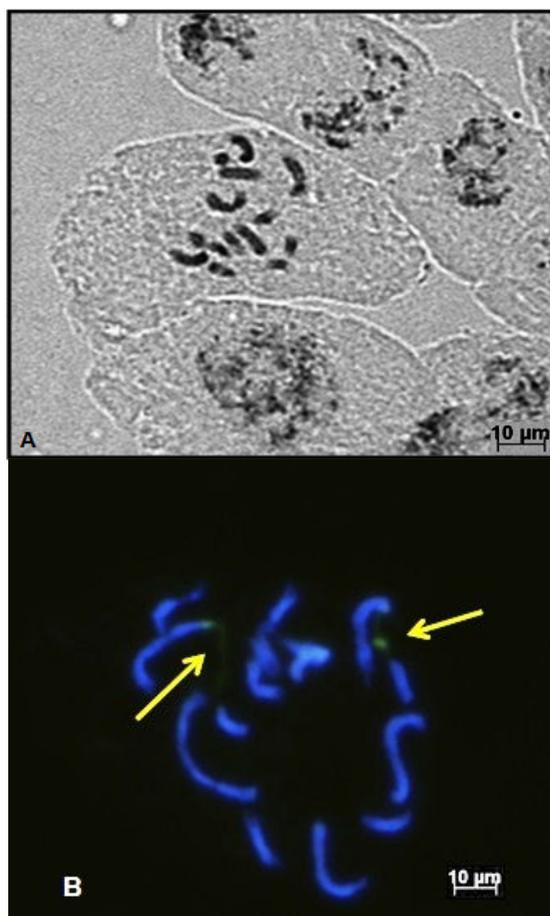


Figura 17: **A** *Gelasine elongata*, coloração convencional, distensão dos satélites presentes no par I. **B** *G. elongata* coloração por CMA/DAPI confirmando satélites distendidos do par I corando CMA⁺ região da constrição secundária. Setas apontam constrição secundária distendida ligando cada cromossomo ao seu respectivo satélite.

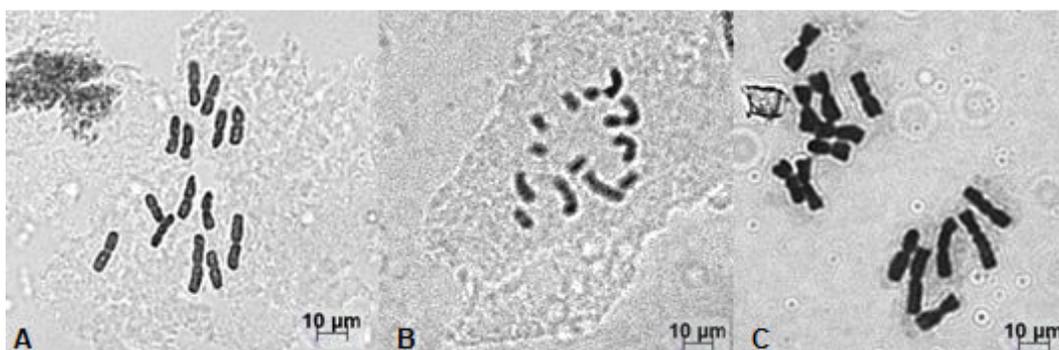


Figura 18: **A** *Gelasine coerulea* $2n = 2x = 14$; **B** *G. elongata* $2n = 2x = 12$; **C** *G. uruguayensis* $2n = 2x = 14$.

As medidas cariotípicas obtidas a partir de células metafásicas estão apresentadas na Tabela 8 e foram utilizadas na produção do cariógrama (Figura

19) e do ideograma (Figura 20). As espécies *Gelasine coerulea* e *G. uruguayensis* possuem cromossomos relativamente grandes, os quais apresentam um comprimento médio (CM) de 8,78 μm ($\pm 1,41$) e 10,07 μm ($\pm 1,20$), respectivamente, e comprimento haploide total (CHT) de 61,44 μm e 70,49 μm . *Gelasine elongata* apresentou cromossomos menores, tendo um CM de 4,69 μm ($\pm 1,87$) e CHT de 28,15 μm (Tabela 8). Quanto à fórmula cariotípica das três espécies, podemos observar a ocorrência de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos (Tabela 8). Satélites foram observados nas espécies *Gelasine coerulea* e *G. elongata* estando presentes em seis (pares II, III e IV) e dois cromossomos (primeiro par) respectivamente (Figuras 21 A e B). Quanto ao tamanho de cada par cromossômico, foram observadas diferenças quase imperceptíveis, as quais não sugerem heteromorfismo.

O comprimento relativo (CR) dos pares de cromossomos por cariótipo é apresentado na Figura 22. As espécies *Gelasine coerulea* e *G. uruguayensis* apresentam um padrão cariotípico semelhante, onde os cromossomos têm comprimentos relativos que não variam grandemente. Para *G. coerulea* os CRs do maior e menor cromossomo são respectivamente 18% e 12%, enquanto para *G. uruguayensis* os CRs variam entre 16% e 12%. Tais espécies também mostram poucas diferenças quanto ao CHT e o CM, ambas com cromossomos notadamente bem maiores que *G. elongata*. Quanto ao CR, *G. elongata* apresenta uma grande diferença de tamanho entre os cromossomos, sendo que o par maior representa quase 30% do tamanho total e o par menor cerca de 10%.

A comparação das diferentes medidas cromossômicas/cariotípicas para as três espécies evidencia similaridades entre *Gelasine coerulea* e *G. uruguayensis* e uma clara diferenciação destas em relação à *G. elongata*.

Tabela 8: Parâmetros cariotípicos de espécies de *Gelasine* mostrando número básico (x), número cromossômico somático (2n), comprimento haploide total (CHT), comprimento cromossômico médio (CM), razão entre os cromossomos maior e menor (R), fórmula cariotípica (FC), assimetria intercromossômica (A₂) e categoria de assimetria de Stebbins (Steb), quantidade total do genoma (2C), tamanho monoploide do genoma (Cx) e coeficiente de variação para análises de citometria (CV). Os valores expressam as médias de cada medida.

Espécie	x	2n	CHT (μm)	CM ($\mu\text{m} \pm \text{DP}$)	R	FC	A ₂	Steb	2C	Cx	CV
<i>G. coerulea</i>	7	14	61,44	8,78 \pm 1,41	1,76	5M+2SM	0,18	3 A	11,30	5,65	3,12
<i>G. elongata</i>	6	12	28,15	4,69 \pm 1,87	3,52	3M+3SM	0,40	3 C	3,45	1,73	2,02
<i>G. uruguayensis</i>	7	14	70,49	10,07 \pm 1,21	1,50	2M+5SM	0,12	3 A	16,88	8,44	4,01

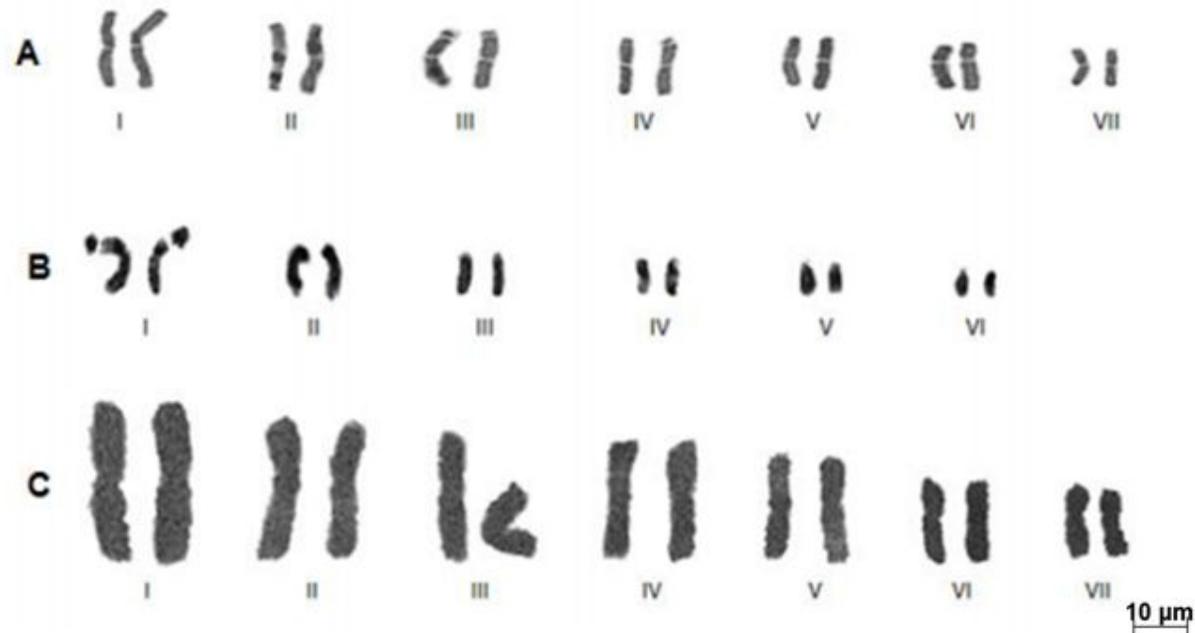


Figura 19: Cariogramas das espécies **A:** *Gelasine coerulea*; **B:** *G. elongata*; **C:** *G. uruguayensis*.

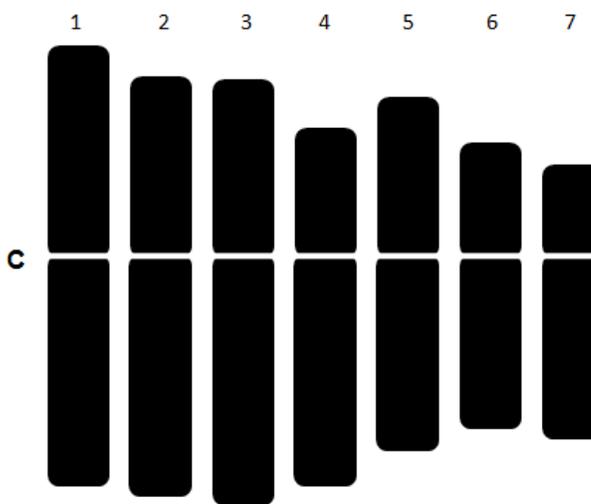
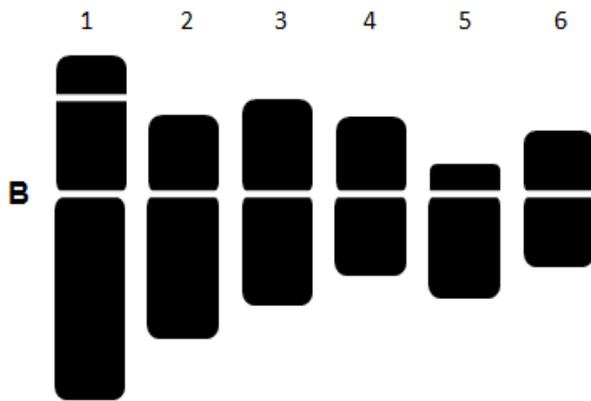


Figura 20: Ideogramas das espécies; **A:** *Gelasine coerulea*; **B:** *G. elongata*; **C:** *G. uruguayensis*.

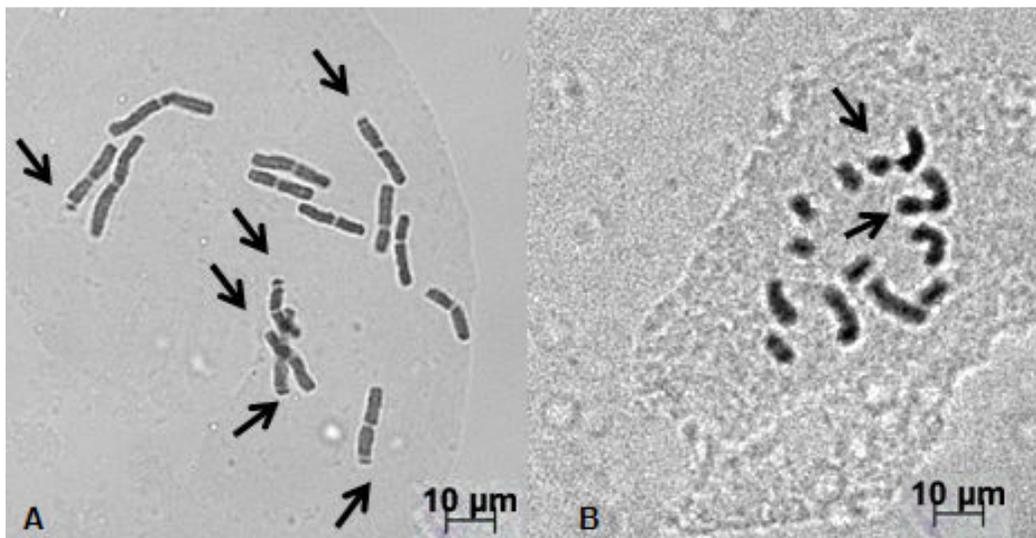
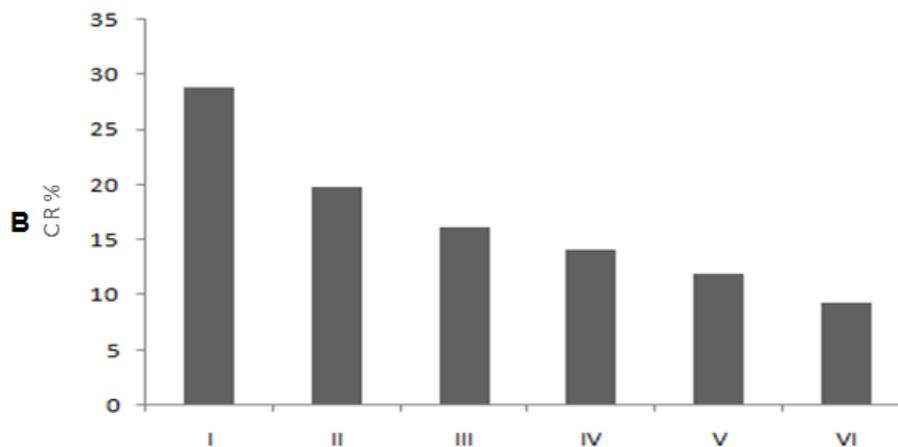
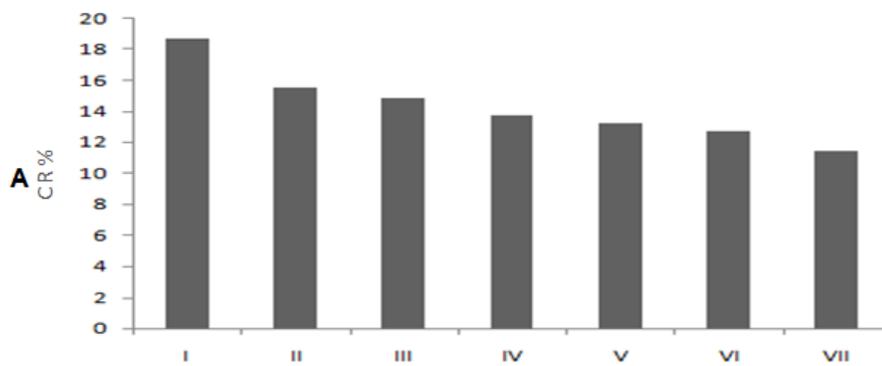


Figura 21: Metáfases mitóticas de **A:** *Gelasine coerulea* e **B:** *G. elongata*. Setas indicam a presença de satélites.



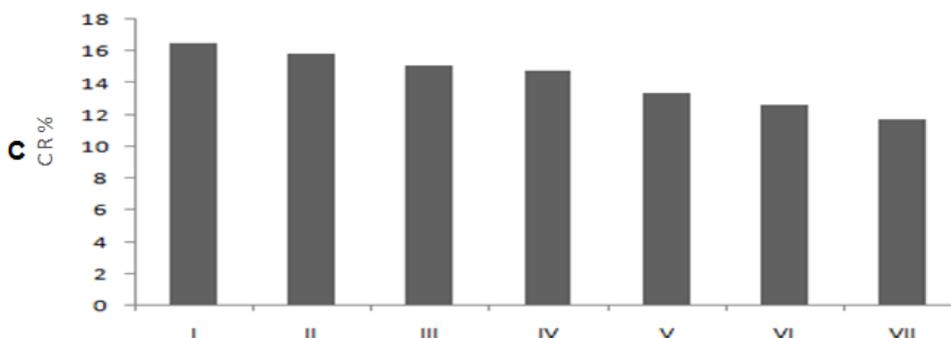


Figura 22: Comprimento relativo (CR) dos cromossomos das espécies **A:** *Gelasine coerulea*; **B:** *G. elongata*; **C:** *G. uruguayensis*.

Os cálculos de assimetria cariotípica (Tabela 8) indicam que as espécies *Gelasine coerulea* e *G. uruguayensis* são relativamente simétricas, sendo ambas classificadas na categoria 3A segundo Stebbins (1971). Os índices de assimetria intercromossomal (A_2) (Romero Zarco, 1986) corroboram a simetria de ambas, sendo $A_2 = 0,18$ para *G. coerulea* e $A_2 = 0,12$ para *G. uruguayensis*. Por outro lado, *G. elongata* apresenta cariótipo assimétrico e bimodal, sendo classificada como classe 3C e com $A_2 = 0,40$ (Tabela 8).

A análise de tamanho de genoma foi realizada para todas as populações das três espécies, sendo possível observar uma clara diferença entre elas (Tabela 8). Conforme já demonstrado pelos valores de CHT, *Gelasine elongata* possui um tamanho de genoma bem menor que as demais, tendo $2C = 3,45$ pg. *G. coerulea* apresenta uma quantidade de DNA que é mais de 3x superior à de *G. elongata* ($2C = 11,30$ pg). Os dados de tamanho de genoma para *G. uruguayensis* são inéditos e mostram que esta espécie apresenta o maior tamanho de genoma dentre as três espécies analisadas ($2C = 16,88$ pg).

Análises quanto à distribuição de heterocromatina constitutiva (HC) foram realizadas por meio do bandeamento cromossômico CMA/DAPI. Bandas CMA⁺ indicam a alta repetitividade de sequências GC e bandas DAPI⁺ indicam a alta repetitividade de sequências AT. Nas três espécies houve uma grande variação na distribuição e frequência destas bandas ao longo dos cromossomos (Tabela 9).

Tabela 9: Padrão de bandeamento para as espécies do gênero *Gelasine*. Número cromossômico (2n), bandas CMA⁺ intersticiais (Int) e terminais (Ter) e bandas DAPI⁺ intersticiais (Int) e terminais (Ter).

Espécie	2n	CMA ⁺		DAPI ⁺	
		Int	Ter	Int	Ter
<i>G. coerulea</i>	14	X	X	X	X
<i>G. elongata</i>	12	-	X	-	-
<i>G. uruguayensis</i>	14	X	X	X	-

Para *Gelasine coerulea* pode-se observar claramente a presença de três pares de cromossomos satelitados, todos eles apresentando o mesmo padrão de distribuição de bandas CMA/DAPI terminais. Tais cromossomos apresentam os satélites fortemente marcados com DAPI⁺, sendo estas regiões CMA⁻. A constrição secundária de cada um desses seis cromossomos é CMA⁺/DAPI⁻. Logo abaixo da constrição secundária há bandas DAPI⁺/CMA⁰. É interessante observar que todos os cromossomos exibem uma banda pericentromérica DAPI⁺. Bandas DAPI são também visualizadas nas regiões terminais e intersticiais no braço longo de praticamente todos os cromossomos do complemento (Figura 23).

Gelasine elongata apresenta um padrão cariotípico bem distinto das outras duas espécies. Há um único par cromossômico contendo satélites, sendo esse o maior par, conforme descrito anteriormente. Somente esses dois cromossomos apresentam uma banda CMA⁺/DAPI⁻ na constrição secundária, não sendo observadas outras bandas CMA ou DAPI nas demais regiões dos cromossomos (Figura 24).

Embora as imagens em coloração convencional não tenham permitido visualizar a presença de satélites em *Gelasine uruguayensis*, a partir da coloração CMA/DAPI fica evidente a ocorrência de três pares cromossômicos portando pequenos satélites os quais coram positivamente com CMA, sendo, porém, DAPI neutros. Um par desses cromossomos apresenta, ainda, uma banda intersticial CMA⁺/DAPI⁰. Bandas DAPI⁺ foram observadas de uma forma bem restrita nas regiões intersticiais (Figura 25).

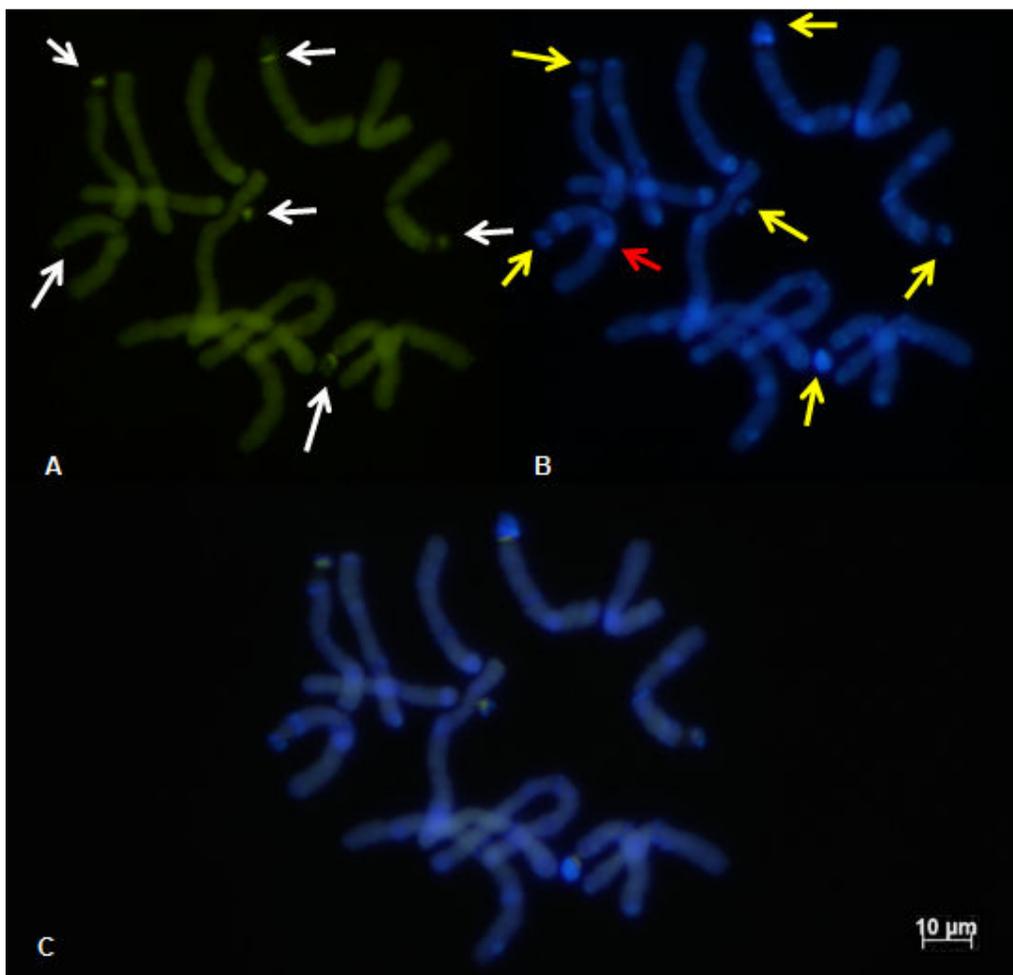


Figura 23: Espécie *Gelasine coerulea*, **A:** coloração CMA **B:** coloração DAPI **C:** sobreposição CMA/DAPI. Seta vermelha indica a presença de banda DAPI⁺/CMA⁻ na região pericentromérica, setas amarelas apresentam as bandas DAPI⁺/CMA⁻ indicando a presença dos satélites e as setas brancas apresentam as bandas CMA⁺/DAPI⁻ na região da constrição secundária.



Figura 24: Espécie *Gelasine elongata*, **A:** coloração CMA, **B:** coloração DAPI, **C:** sobreposição CMA/DAPI. Setas amarelas indicam a presença de bandas CMA⁺/DAPI⁻ na constrição secundária, evidenciando a presença dos satélites.

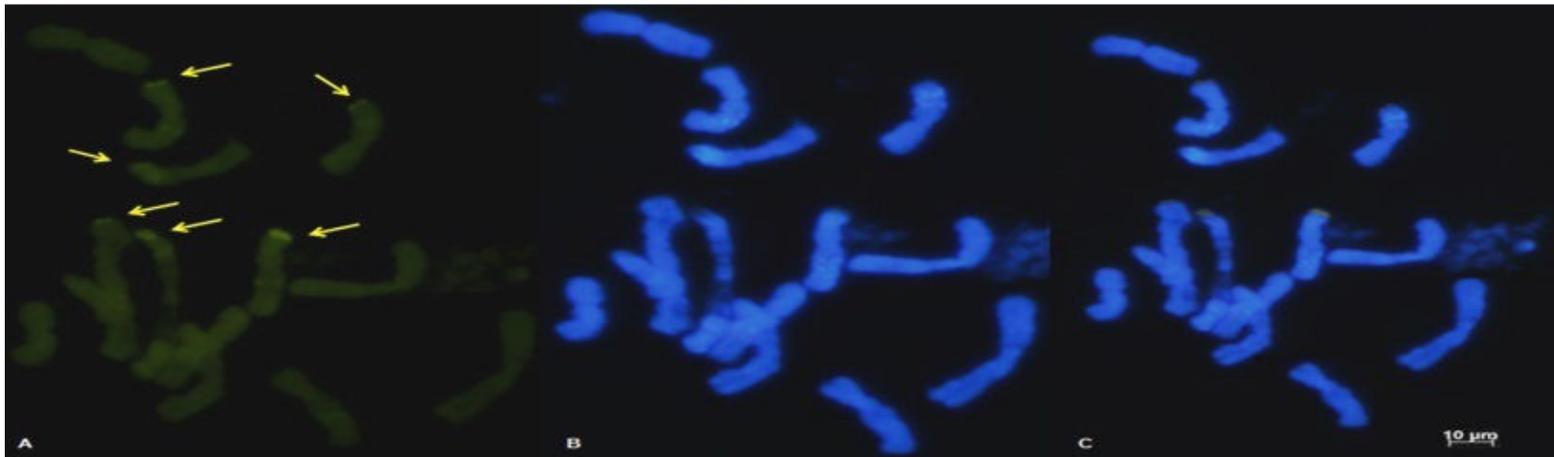


Figura 25: Espécie *Gelasine uruguayensis*, **A:** CMA **B:** DAPI **C:** CMA/DAPI setas amarelas apresentam bandas CMA⁺/DAPI⁰ indicando os satélites.

DISCUSSÃO

1 - Diversidade genética

Os dados de diversidade genética obtidos para as espécies *Gelasine elongata* e *G. coerulea* apresentados nesta dissertação são inéditos para ambas as espécies, bem como para o gênero *Gelasine*. Tais resultados relativos à análise da diversidade genética em populações nos permitem uma avaliação dos níveis atuais da variação genética e estruturação populacional das espécies *G. elongata* e *G. coerulea*, sendo de grande importância para a adaptação às flutuações ambientais e, como consequência, para a sobrevivência das espécies.

Os dados revelados pelos marcadores ISSR nas populações analisadas evidenciam uma diversidade genética baixa (PPB 2%), e índice de *Shannon* (*H*) com valor médio de 0,009. A diversidade genética tende a ser mais alta quanto maior o valor do índice de *Shannon* (Spellerberg & Fedor, 2003; Uramoto *et al.*, 2005).

A diversidade genética de espécies vegetais pode ser afetada por muitos fatores, tais como amplitude da área de distribuição, duração do ciclo de vida, sistema de cruzamento e modo de dispersão das suas sementes. Uma espécie que tem vida longa possui alta frequência de fluxo gênico e tende a apresentar alta diversidade genética (Schaal *et al.*, 1998; Chai *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). O gênero *Gelasine*, foco deste estudo, demonstra claramente populações com número restrito de indivíduos (Tabela 1), dispersão das sementes de forma restrita, o que sugere barocoria (Figura 10) e a incidência de clonalidade dos bulbos (Figura 11). Provavelmente tais fatores têm contribuído para que tais espécies sejam consideradas vulneráveis, estando elas na lista de ameaçadas da flora do Rio Grande do Sul.

Li & Xia (2005) sugerem que as espécies de distribuição geográfica restrita possuem um número limitado de indivíduos e tendem a manter menores níveis de variabilidade genética do que espécies com distribuição geográfica ampla. Sherwin & Moritz (2000) relatam que a baixa diversidade genética pode afetar a estrutura demográfica e ocasionar efeitos em nível populacional.

Estudos baseados em ISSR para estimar a diversidade genética são de grande importância entre espécies e vêm sendo utilizados para elucidar questões evolutivas em Iridaceae. Stiehl-Alves (2013) realizou um estudo com marcadores ISSR em *Herbertia lahue* que revelou uma baixa diversidade genética; os dados obtidos nesse estudo são muito semelhante aos resultados obtidos nas análises realizadas com o gênero *Gelasine*. Para *H. Lahue*, a baixa diversidade ocorreu especialmente nas populações hexaploides, onde foi observada a existência de multiplicação clonal através dos bulbos. Para Iridaceae, vários táxons apresentam algum nível de propagação clonal, com destaque para *Iris* L., *Gladiolus* L. e *Crocus* L. (Caiola *et al.*, 2004). Porém, informações sobre a ocorrência de multiplicação clonal são escassas para a maioria das espécies de iridáceas sem importância econômica. Muitos dos indivíduos do gênero *Gelasine* demonstram essa característica a campo; em *Gelasine uruguayensis*, a formação de bulbilhos a partir da partição do bulbo inicial foi observada no indivíduo mantido em laboratório, indicando a ocorrência de clonalidade (Figura 11).

Uma das maiores dificuldades intrínsecas à estimativa de diversidade genética intrapopulacional em espécies clonais é a obtenção de marcadores polimórficos que permitam estimativas confiáveis dos parâmetros genéticos populacionais (Arnaud-Haond *et al.*, 2005). Estimativas derivadas do uso de marcadores com baixo polimorfismo podem repercutir em inferências qualitativas e quantitativas errôneas da diversidade genética, o que tem levado ao questionamento sobre o poder de resolução de determinados marcadores utilizados em estudos com organismos clonais (Arnaud-Haond *et al.*, 2005; 2007).

A variabilidade genética dentro de uma espécie é fundamental para garantir seu potencial adaptativo frente às adversidades ambientais. A análise da variância molecular (AMOVA) em *Gelasine* mostrou que a maior parte da variação genética encontrada ocorreu entre as populações de cada espécie analisada, indicando uma alta estruturação populacional (Tabela 5 e 6). Outros estudos com enfoque em Iridaceae que envolveram genética de populações também evidenciaram forte diferenciação genética entre populações (Artyukova *et al.*, 2001; Arafeh *et al.*, 2002; Wróblewska *et al.*, 2003; Saad & Mahy, 2009; Beiki *et al.*, 2010; Tacuatiá *et al.*, 2012).

A biologia reprodutiva é um dos fatores mais importantes para a variabilidade genética de acordo com Hamrick e Godt (1990); segundo esses autores, espécies de plantas com polinização cruzada tendem a apresentar entre 10 e 20% de variação genética entre as populações, enquanto que espécies que apresentam autofecundação exibem variação, em média, de 50% entre as populações. Os valores observados para as espécies de *Gelasine* sugerem um sistema de autofecundação. Além disso, a existência de clonalidade, sugere um sistema misto de reprodução. Estes resultados são semelhantes aos observados em *Tacca chantrieri* Andre (Dioscoreaceae), onde são encontrados altos níveis de diferenciação entre as populações e baixos níveis de diversidade intrapopulacional, o que sugere a ocorrência de um sistema misto de reprodução no qual a autofertilização predomina (Zhang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

Embora não existam estudos específicos quanto ao modo de dispersão das sementes em espécies de *Gelasine*, presume-se que seja por barocoria em função do tamanho e peso dos frutos; nesse caso, a dispersão se dá por ação da força gravitacional, fazendo com que as sementes sejam alocadas a distâncias curtas mantendo-se dentro da área de distribuição da própria população e diminuindo a variabilidade genética (Van Der Pijl, 1982; Hamrick & Godt, 1996; Nybom, 2004; Givnish, 2010). Este modo de dispersão é amplamente encontrado em espécies de Iridaceae (Goldblatt & Manning, 2008; Chies *et al.*, 2014), sendo claramente observado a campo em indivíduos do gênero *Gelasine*, bem como em espécies relacionadas como é o caso de *Phalocallis coelestis* (Figura 10 C). Hazler Pilepic *et al.* (2008), estudando *Hypericum perforatum* L., sugerem que a baixa taxa de diversidade observada seria devido à apomixia ou por dispersão de sementes à curta distância (barocoria).

Visando elucidar a distribuição da diversidade genética entre as populações e entender melhor a relação das distâncias geográficas com a divergência genética entre as mesmas, foi calculada a correlação de Mantel. Nossos resultados não sugerem correlação entre a distância genética e distância geográfica ($r = 0,515$, $P = 0,110$) (Figura 15); com este resultado, observa-se que a distância geográfica não explica a diversidade genética encontrada entre as populações. Quando as populações são pequenas, tendem a ser

geograficamente e geneticamente isoladas umas das outras, resultando na estruturação genética e aumento na diferenciação entre as populações (Barrett & Kohn, 1991; Ellstrand & Elam, 1993).

O dendrograma produzido por UPGMA com base na matriz de similaridade genética, divide as quatro populações analisadas em dois grupos (Figura 13). O grupo I reúne as populações ESC254 e Alves60 (*G. elongata*), enquanto as populações remanescentes, ESC335 e JF01, foram agrupadas em um segundo grupo (*G. coerulea*). Esta separação foi consistente com o resultado obtido pela análise de coordenadas principais (PCoA), onde os indivíduos agruparam dentro de suas populações (Figura 14), assim como os resultados obtidos na análise de identidade de Nei (Tabela 7). Esses resultados são compatíveis com os observados pelos autores Archibald *et al.* (2006) que fizeram uso de marcadores ISSR em seu estudo com em *Tolpis* Adanson. (Asteraceae) e observaram que os indivíduos se agruparam em populações e grupo. Afirmando que o uso destes marcadores não agrupa indivíduos que sejam incompatíveis ou morfológicamente variáveis.

É importante notar nos agrupamentos formados no dendrograma de UPGMA que as populações Alves60 de *Gelasine elongata* (11 indivíduos) e ESC335 *G. coerulea* (12 indivíduos) formaram agrupamentos com pouca ou nenhuma variação, sendo 0% e 1,1% as taxas de *loci* polimórficos, respectivamente.

Os agrupamentos gerados no dendrograma UPGMA e os resultados da análise de PCoA são confirmados nas análises do STRUCTURE que separou as populações em dois grupos conforme sua afinidade (*G. elongata* e *G. coerulea*), (Figura 16), e através de uma análise Bayesiana de agrupamento que foi realizada em dois momentos (A e B) analisando separadamente as populações por espécies levando à alta estruturação populacional.

2 - Aspectos citogenéticos do gênero *Gelasine*

O número cromossômico básico encontrado para as espécies de *Gelasine coerulea* e *G. uruguayensis* foi $x = 7$, sendo ambas diploides ($2n = 14$). Estes resultados confirmam aqueles previamente descritos para as duas espécies por Moraes *et al.* (2015) e Ravenna (1984). Para *Gelasine elongata*, as duas populações analisadas (ESC254 e Alves60) apresentaram número cromossômico básico $x = 6$, sendo todos os indivíduos diploides $2n = 12$. Portanto, esta espécie difere das duas anteriores. Na literatura, são descritos dois números cromossômicos para *G. elongata*; Kenton & Rudal (1987), assim como no presente estudo, reportam $2n = 12$, enquanto Goldblatt (1982) refere $2n = 14$. Kenton & Rudall (1987) acreditam que o número cromossômico $2n = 14$ seja uma interpretação equivocada; segundo eles, usualmente o par satelitado apresenta a região da constrição secundária altamente descondensada permitindo que os satélites se posicionem separados do restante dos cromossomos, parecendo um par de cromossomos menores. É relatada a presença de um fio bastante fino ligando tais estruturas ao seu respectivo cromossomo. Essa situação foi também observada em nossas análises empregando coloração CMA/DAPI (Figuras 17 A e B), onde podem ser vistos os satélites do par maior distantemente posicionados do restante do cromossomo. A coloração amarela CMA⁺ na região da constrição secundária evidencia a ligação entre o satélite e o cromossomo correspondente.

Os dados obtidos no presente trabalho mostram que *Gelasine coerulea* e *G. uruguayensis* possuem o número cromossômico básico referido para a tribo Tigridieae (Moraes *et al.*, 2015) de $x = 7$. O gênero *Gelasine*, segundo a filogenia de Chauveau *et al.* (2012), pertence ao Clado B de Tigridieae, onde os números haploides são mais variáveis, refletindo eventos de poliploidia e displodia (Moraes *et al.*, 2015). Embora a poliploidia não tenha sido evidenciada em nenhuma espécie de *Gelasine*, o número haploide $n = 6$ em *G. elongata* aponta para a ocorrência de displodia. É interessante observar que esta espécie agrupa no mesmo ramo de *Phalocallis coelestis* ($x = 5$, $2n = 10$) e com duas espécies de *Eleutherine* (*E. latifolia* e *E. bulbosa*), ambas com $x = 6$ e $2n = 12$ (Chauveau *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2015). Assim, a partir do número ancestral $x = 7$, dois

eventos de dispoloidia decrescente resultaram nos números secundários $x_2 = 6$ e $x_2 = 5$ nas espécies desse ramo na árvore filogenética. Por outro lado, *G. coerulea*, que apresenta $x = 7$, encontra-se separada em outro agrupamento.

A realização de medidas cariotípicas e a avaliação da simetria são importantes para inferências quanto à evolução cromossômica, especialmente em famílias onde há ocorrência de eventos de rearranjos cromossômicos e poliploidia. A bimodalidade cariotípica ocorre em muitas plantas sendo considerada uma forma cariotípica altamente especializada e derivada, podendo ser utilizada para caracterizar grupos de gêneros ou espécies (Moreno *et al.*, 2009; Kenton *et al.*, 1990; Goldblatt & Takei, 1997; Naranjo *et al.*, 1998). A assimetria e a bimodalidade são características da maioria das espécies da tribo Tigridieae, tendo sido observadas para espécies dos gêneros *Alophia* e *Cipura* (Alves *et al.*, 2011), *Calydorea* (Alencar, 2012) e *Eleutherine* (Guerra, 1988; Alves *et al.*, 2011).

As análises cariotípicas (medidas cromossômicas e padrão de bandeamento) permitiram claramente diferenciar as três espécies de *Gelasine*, além de reforçar a separação de *Gelasine elongata* evidenciada na filogenia (Chauveau *et al.*, 2012; Moraes *et al.*, 2015). *Gelasine coerulea* e *G. uruguayensis* se assemelham em vários parâmetros investigados. Ambas possuem $2n = 14$, sendo estes cromossomos de tamanho médio a grande. Seus cariótipos são relativamente simétricos (classe 3A de Stebbins), onde os cromossomos decrescem gradualmente em tamanho não sendo observada bimodalidade cariotípica.

Para *G. elongata*, o cariótipo é claramente assimétrico, marcado pela bimodalidade, com cromossomos médios e pequenos, formando dois blocos claros, onde o primeiro bloco é formado pelo par maior de cromossomos (~ 8,09 μm) e o segundo formado por cinco pares de cromossomos variando de 5,58 a 2,60 μm .

Kenton & Rudall (1987) investigaram diversos aspectos citológicos de *Gelasine azurea* (sinonímia de *G. elongata*) a fim de compreender sua bimodalidade cariotípica e o heteromorfismo cromossômico. No referido trabalho,

os autores salientam o fato de o número básico $x = 6$ ser encontrado em Tigridaeae apenas em *G. azurea* e em *Eleutherine bulbosa* (número já descrito também para *E. latifolia* – Goldblatt & Snow, 1991), além das duas espécies possuírem cariótipos muito similares apresentando um par de cromossomos grandes com constrição secundária no braço curto. Esse mesmo padrão cariotípico referido por Kenton & Rudall (1987) foi observado em nossas análises (Figuras 20, 21 e 22).

Heteromorfismos cromossômicos são frequentes na tribo Tigridaeae, com registros também para *Eleutherine bulbosa* e *Cipura paludosa* (Guerra, 1988, 1991; Alves *et al.*, 2011). Tais heteromorfismos podem ser resultantes de inversões seguidas de duplicação em *tandem* ou de translocações.

Kenton & Rudall (1987) encontraram em *Gelasine azurea* um heteromorfismo cromossômico bastante claro no par I (chamado pelos autores de *L chromosomes*, ou *Large chromosomes*). Com base nas análises cariotípicas e de comportamento meiótico, os autores descrevem a bimodalidade e o heteromorfismo nessa espécie como resultado de uma série complexa de eventos de translocação.

No presente estudo, não foi observado heteromorfismo cromossômico para *Gelasine elongata* e nem para as outras duas espécies investigadas. As plantas analisadas por Kenton & Rudall (1987) são provenientes de sementes obtidas no Missouri Botanical Garden cujo local de origem parece ser o Brasil (Goldblatt, 1982). Muito provavelmente tais sementes não pertencem às mesmas populações por nós estudadas.

Dados referentes à quantidade de DNA (valor $2C$) são reportados na literatura para *Gelasine elongata* (Bennett & Leitch, 2012) e para *G. coerulea* (Moraes *et al.*, 2015), enquanto para *G. uruguayensis* tal informação é inédita. Os resultados obtidos para *Gelasine elongata* confirmam aqueles publicados, sendo em torno de 3,5 pg (Tabela 10). Moraes *et al.* (2015) reportam para *G. coerulea* um $2C = 5,05$ pg diferindo grandemente do valor por nós encontrado ($2C = 11,30$ pg); a razão para tal diferença precisa ser melhor investigada uma vez que ambas apresentam $2n = 14$, não se tratando, portanto, de citótipo poliploide. *Gelasine*

uruguayensis possui um tamanho de genoma ainda maior ($2C = 16,88$ pg) que as demais espécies, demonstrando que esse parâmetro permite distinguir as três espécies. Contudo, a diferença na quantidade de DNA entre *Gelasine uruguayensis* e *G. coerulea* é pequena quando comparamos estas espécies com *G. elongata*, que chega a ser três vezes menor; estes dados, mais uma vez, apontam para uma diferenciação entre *G. elongata* e as outras duas espécies.

Foi possível observar uma grande variação na ocorrência e distribuição de sequências de DNA repetitivo entre os representantes de *Gelasine* utilizados neste estudo. Guerra (2000) sugere que a grande variação nas sequências de DNA repetitivo ocorra em nível de grupos, não sendo comum tais diferenças serem observadas entre espécies relacionadas; uma grande variação entre espécies próximas é considerado um fato raro, já que se espera que a variação encontrada entre essas espécies seja apenas em número de bandas, mas não nos padrões de distribuição de CMA/DAPI (Fregonezi *et al.*, 2006).

Gelasine coerulea e *G. uruguayensis* apresentam um número bem maior de bandas CMA e DAPI do que *G. elongata*. Na verdade, nessa última espécie não foi visualizada a presença de regiões DAPI⁺. As análises mostraram para as três espécies um predomínio de bandas CMA⁺ nas regiões terminais, sendo essas usualmente DAPI⁻. As sequências ricas em AT (DAPI⁺), são menos frequentes e intersticiais em *G. coerulea*. Por outro lado, *G. coerulea* possui diversas regiões pericentroméricas e intersticiais ricas em AT. Guerra (2000) reporta que cromossomos médios e longos usualmente possuem mais regiões intersticiais ricas em AT do que GC.

Nas três espécies, os cromossomos portadores da constrição secundária apresentaram as bandas CMA⁺/DAPI⁻ associadas às RONS (Regiões Organizadoras de Nucléolo), as quais foram observadas em três pares de cromossomos para *G. coerulea* e para *G. uruguayensis* e em um par para *G. elongata*. A presença de heterocromatina rica em sequências GC, associadas à RON, tem sido observada em vários grupos de plantas, entre eles na família Iridaceae para os gêneros *Herbertia* (Moreno *et al.*, 2009) e *Eleutherine*, nas espécies *Eleutherine plicata* (Sw.) Herb. (Zaman *et al.*, 1985) e *E. bulbosa*

(Guerra, 1988). Isso demonstra que a distribuição da heterocromatina não ocorre ao acaso, mas há locais mais propensos a tal constituição (Guerra, 2000).

Os dados obtidos com o uso dos fluorocromo CMA e DAPI, para as três espécies de *Gelasine*, podem ser considerados como um fator de diferenciação entre elas e servindo como ferramenta para a caracterização evolutiva do gênero. Essa grande variabilidade da heterocromatina pode ser aliada a análises filogenéticas para auxiliar nos estudos evolutivos e explicar o status parafilético deste gênero.

CONCLUSÕES

O presente trabalho resultou na geração de dados inéditos quanto à diversidade genética inter e intrapopulacional de espécies do gênero *Gelasine* (Tigridaeae: Iridaceae). A ausência de correlação significativa com a distância geográfica entre as populações possivelmente indica que o sistema reprodutivo, o método de dispersão de sementes e a presença de descendência clonal oriunda da divisão dos bulbos subterrâneos são fatores de grande influência na diversidade do gênero. No caso de *Gelasine*, as análises evidenciam a alta estruturação populacional e confirmam as baixas taxas de variabilidade intrapopulacional. Os baixos níveis de diversidade genética das espécies analisadas sugerem que provavelmente as mesmas realizem autopolinização.

As análises citogenéticas realizadas para as três espécies de *Gelasine* investigadas se mostraram eficientes para a diferenciação das mesmas. Embora *G. coerulea* e *G. uruguayensis* possuam o mesmo número cromossômico ($2n = 14$) e ambas tenham cariótipos relativamente simétricos, elas se mostram bastante diferentes quanto ao tamanho dos cromossomos, conteúdo de DNA e padrão de bandeamento. *Gelasine elongata*, além de diferir das anteriores quanto ao número cromossômico ($2n = 12$), possui cariótipo bimodal, cromossomos menores e, conseqüentemente, menor tamanho de genoma; além disso, o maior par de cromossomos (par I) exibe as únicas bandas CMA⁺, estando essas na região da constrição secundária.

Os dados citogenéticos apoiam a condição não monofilética do gênero. Portanto, investigações quanto ao cariótipo das espécies, a quantificação de seu DNA nuclear e padrão CMA/DAPI podem contribuir para um melhor entendimento das relações entre as espécies, bem como as relações filogenéticas com grupos relacionados. Análises citogenéticas e filogenéticas incluindo as demais espécies de *Gelasine*, bem como outros gêneros relacionados, como *Phalocallis coelestis*, *Eleutherine latifolia* e *E. bulbosa*, serão de grande importância para esclarecer a evolução desse interessante grupo.

PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos deixam em aberto algumas questões a serem respondidas:

- ✓ Existem variáveis que podem estar sendo mascaradas pelo uso de um marcador dominante, como por exemplo clonalidade? A realização de um sequenciamento de nova geração buscando analisar regiões de microssatélites e SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) para investigar a variabilidade dentro das populações poderá trazer informações novas e mais consistentes quanto aos reflexos da clonalidade na estrutura genética das populações.
- ✓ Há de fato um modo de reprodução misto em *Gelasine*? Esse modo de reprodução pode estar influenciando ou causando algum impacto na diversidade genética das populações do gênero *Gelasine*? A realização de análises da biologia reprodutiva permitirá elucidar qual o modo de reprodução predominante no gênero.
- ✓ Variáveis bióticas e/ou abióticas podem estar influenciando na ocorrência restrita destas populações e no número restrito de indivíduos? Um esforço amplo de busca e coleta de populações das diferentes espécies de *Gelasine* poderão confirmar sua ocorrência limitada em toda a área de distribuição geográfica, confirmando sua vulnerabilidade.
- ✓ *Gelasine* é realmente um gênero não monofilético? Uma análise filogenética incluindo todas as espécies do gênero e outros gêneros relacionados poderá confirmar esta condição. Os dados citogenéticos analisados numa abordagem filogenética poderão trazer maiores evidências quanto à evolução cariotípica do grupo, tendo em vista as semelhanças cariotípicas encontradas entre *G. elongata* e as espécies de *Phalocallis coelestis*, *Eleutherine latifolia* e *E. bulbosa*.
- ✓ Kenton & Rudall (1987) encontraram um claro heteromorfismo cromossômico em *Gelasine elongata*, o qual não foi evidenciado no presente estudo. A realização de uma análise do comportamento meiótico e de hibridização *in situ* para esta espécie permitirá a confirmação desse dado.

REFERÊNCIAS

- Alencar LMJ (2012) Diversidade genética de *Calydorea crocoides* Ravenna (Iridaceae): aspectos moleculares e citogenéticos. 71p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Alves LIF, Lima SAA and Felix LP (2011) Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil. *Genet Mol Biol* 34:259-267.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group) III (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.
- Archibald JK, Crawford DJ, Santos-Guerra A and Mort ME (2006) The utility of automated analysis of Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) loci for resolving relationships in the Canary Island species of *Tolpis* (Asteraceae). *Am J Bot* 93:1154-1162.
- Arafeh RMH, Sapir Y, Shmida A, Iraki N, Fragman O and Comes HP (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. *Mol Ecol* 11:39-53.
- Arnaud-Haond S, Alberto F, Teixeira S, Procaccini GP, Serrão EA and Duarte CM (2005). Assessing genetic diversity in clonal organisms: low diversity or low resolution? Combining power and cost efficiency in selecting markers. *J Hered* 96:434-440.
- Arnaud-Haond S, Duarte CM, Alberto F and Serrão EA (2007) Standardizing methods to address clonality in population studies. *Mol Ecol* 16:5115-5139.
- Artyukova EV, Kozyrenko MM, Ilyushko MV, Zhuravlev YN and Reunova GD (2001) Genetic Variability of *Iris setosa*. *Mol Biol* 35:134-138.
- Bareka P, Siljak-Yakovlev S and Kamari G (2012) Molecular cytogenetics of *Bellevalia* (Hyacinthaceae) species occurring in Greece. *Plant Syst Evol* 298:421-430.
- Barret SC and Kohn JR (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Falk DA, Holsinger KE (eds) *Genetics and conservation of rare plants*. New York (NY): Oxford University Press 3-30.

- Beaumont M and Bruford MW (1999) Microsatellites in conservation genetics. In: Goldstein DB, Schlotterer C (eds) *Microsatellites*. New York (NY): Evolution and Applications Oxford University Press 165-182.
- Beiki AH, Keifi F and Mozafari J (2010) Genetic differentiation of *Crocus* species by random amplified polymorphic DNA. *Genet Eng Biotechnol J* 18:1-10.
- Bennett MD and Leitch IJ (2011) Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Ann Bot* 107:467–590.
- Bennett MD and Leitch IJ (2012) *Plant DNA C-values database*. Kew: Royal Botanic Gardens. Available at: [http:// data.kew.org/cvalues/](http://data.kew.org/cvalues/). Accessed 1 April 2014.
- Brandão MM, Vieira FA and Carvalho D (2011) Fine-scale genetic structure of *Myrcia splendens* (Myrtaceae). *Rev Árvore* 35:957-964.
- Bornet B and Branchard M (2001) Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol Biol Rep* 19:209–215.
- Borba RS, Garcia MS, Kovalleski A, Oliveira AC, Zimmer PD, Branco JSC and Malone G (2005) Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma* Westwood (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. *Neotrop Entomol* 34:565-569.
- Caiola MG, Caputo P and Zanier R (2004) RAPD analysis in *Crocus sativus* L. accessions and related *Crocus* species. *Biol Plant* 48:375-380.
- Chai XY, Chen SL and Xu W (2010) Using inter-simple sequence repeat markers to analyze the genetic structure of natural *Pteroceltis tatarinowii* populations and implications for species conservation. *Plant Syst Evol* 285:65-73.
- Chauveau O, Eggers L, Souza-Chies TT and Nadot S (2012) Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera. *Ann Botany* 110:713-729.
- Chies TTS, Burchardt P, Alves EMS, Essi L and Santos EK (2014) O estudo da biodiversidade e evolução vegetal através de marcadores de DNA e citogenética: exemplos em Iridaceae e Poaceae. *Ciência e Natura* 36:279-293.
- Dolezel J, Binarova P and Lucretti S (1989) Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biol Plantarum* 31:113-112.
- Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H and Greilhuber J (2003) Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A* 51:127–128.

- Dolezel J, Greilhuber J and Suda J (2007) Flow cytometry with plants: an overview. In: Dolezel J, Greilhuber J and Suda J (eds). *Flow Cytometry with Plant Cells* 41–65 Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Doyle JJ and Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15.
- Earl DA Structure harvester, ver. 0.6.1. <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/> acesso 29 de abril de 2015.
- Eggers L (2008) A família Iridaceae no Parque Estadual de Itapuã Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Biol* 6:167-175.
- Eggers L (2015) *Gelasine*. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB136>>. Acesso em: 23 Jun. 2015.
- Eggers L, Chukr N, Lovo J and Gil A (2015) Iridaceae. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB136>>. Acesso em: 08 Jan. 2015.
- Ellstrand NC and Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 24:217-242.
- Evanno G, Regnaut S and Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Mol Ecol* 14:2611-2620.
- Excoffier L, Laval LG and Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1:47-50.
- Excoffier L and Lischer HEL (2010) ARLEQUIN suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Res* 10: 564-567.
- Fachinetto MJ (2014) Aspectos evolutivos e da diversidade genética das espécies de *Sisyrinchium* L. pertencentes ao clado V. 157p. Tese (Doutorado) Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Falush D, Stephens M and Pritchard JK (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol Ecol* 7:574-578.

- Ferreira ME and Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas. 3 ed. Brasília, Embrapa/Cenargen. 220p.
- Ferrão LFV, Caixeta ET, Souza FD, Zambolim EM, Cruz CD, Zambolim L and Sakiyama NS (2013) Comparative study of different molecular markers for classifying and establishing genetic relationships in *Coffea canephora*. *Plant Syst Evol* 299:225–238.
- Fregonezi JN, Fernandes T, Torezan JMD, Vieira AOS and Vanzela ALL (2006) Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (Solanaceae) based on the physical mapping of repetitive DNA. *Genet Mol Biol* 29:97-104.
- FZB/RS (Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul) (2014) http://www.fzb.rs.gov.br/conteudo/4809/?Homologada_a_nova_Lista_da_Flora_Ga%C3%BAcha_Amea%C3%A7ada_de_Extin%C3%A7%C3%A3o Acesso 22 Janeiro 2015.
- Gaiotto FA, Grattapaglia D and Vencovsky R (2003) Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). *J Hered* 94:399–406.
- Giustina LD, Luz LN, Vieira FS, Rossi FS, Soares-Lopes CRA, Pereira TNS and Rossi AAB (2014) Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). *Genet Mol Res* 13:3510-3519.
- Givnish TJ (2010) Ecology of plant speciation. *Taxon* 59:1326–1366.
- 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. Missouri Bot. Gard* 77:607-627.
- Goldblatt P and Snow N (1991) Systematics and chromosome cytology of *Eleutherine* Herbert (Iridaceae) *Ann Missouri Bot Gard* 78:942–949.
- Goldblatt P and Takei M (1997) Chromosome cytology of Iridaceae, patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. *Ann Missouri Bot Gard* 84:285-304.
- Goldblatt P, Manning JC and Rudall P (1998) Iridaceae. In: Kubitzki K (ed) *The families and genera of vascular plants*. Springer, Berlin, pp 295-314.
- Goldblatt P and Manning JC (2008) *The Iris Family: natural history and classification*. Timber Press, Portland, 290 pp.

- Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, Davies TJ, Manning JC, Van Der Bank M and Savolainen V (2008) Iridaceae 'Out of Australasia'? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. *Syst Bot* 33:495-508.
- Greilhuber J, Dolezel J, Lysák MA and Bennett MD (2005) The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Ann Bot* 95:255–260.
- Gribel R (2001) *Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, manejo e conservação dos recursos naturais*. Humanidades, Brasília, DF 48:110-114.
- Guerra M (1988) Introdução a Citogenética Geral. In: Guerra M (eds) *Heterocromatina e Bandamento Cromossômico*. Guanabara, Rio de Janeiro, pp. 24-35.
- Guerra M (1991) Cis-acting regulation of the NOR cistrons in *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). *Gênica* 83:235–241.
- Guerra M (2000) Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genet Mol Biol* 4:1029-1041.
- Gupta M, Chui YS, Romero-Severson J and Owen JL (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple - sequence repeats. *Theor Appl Genet* 89:998–1006.
- Hamrick JL and Godt MJW (1990) Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL and Weir BS ed. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts.
- Hamrick JL and Godt MJ (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philos T Roy Soc B* 351:1291–1298.
- Hannan GL and Orick MW (2000) Isozyme diversity in *Iris cristata* and the threatened glacial endemic *I. lacustris* (Iridaceae). *Am J Bot* 87:293-301.
- Hazler Pilepic K, Males Z and Plazibat M (2008) Genetic structure in *Hypericum perforatum* L. population. *Period Biol* 110:367–371.
- Heywood VH and Watson RT (1997) *Global biodiversity assessment*. Cambridge: University Press, United National Environmental Programme 1:1-140.
- Kenton A and Heywood CA (1984) Cytological studies in South American Iridaceae. *Plant Syst Evol* 146:87-104.
- Kenton AY, Rudall PJ and Johnson AR (1986) Genome size variation in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) and its relationship to phenotype and habitat. *Bot Gaz* 147:342–354.

- Kenton A and Rudall P (1987) An unusual case of complex-heterozygosity in *Gelasine azurea* (Iridaceae), and ITS implications for reproductive biology. *Evol Trends Plants* 1:95-103.
- Kenton A, Dickie JB, Langton DH and Bennett MD (1990) Nuclear DNA amount and karyotype symmetry in *Cypella* and *Hesperoxiphion* (Tigridieae, Iridaceae). *Evol Trends Plants* 4:59-69.
- Kron P, Suda J and Husband BC (2007) Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 38:847-876.
- Lamia K, Hedia B, Jean-Marc A and Neila TF (2010) Comparative analysis of genetic diversity in Tunisian apricot germplasm using AFLP and SSR markers. *Sci Horti-Amsterdam* 127:54-63.
- Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. *Evol Biol* 6:381-398.
- Li FG and Xia NH (2005) Population structure and genetic diversity of an endangered species, *Glyptostrobus pensilis* (Cupressaceae). *Bot Bull Acad Sinica* 46:155-162.
- Lin X, Lou Y, Liu J, Peng J, Liao G and Fang W (2010) Crossbreeding of *Phyllostachys* species (Poaceae) and identification of their hybrids using ISSR markers. *Genet Mol Res* 9:1398-1404.
- Mantel N and Valand RS (1970) A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics* 26:547-558.
- Marco EG, Tacuatiá LO, Eggers L, Kaltchuk-Santos E and Souza-Chies TT (2009) Genetic variability within *Cypella fucata* Ravenna in southern Brazil. In: Mahoney CL and Springer DA (eds) *Genetic Diversity*. Nova Publishers, New York, pp 179-194.
- Meerow AW, Gideon M, Kuhn DN and Schnell RJ (2005) Isolation and characterization of 10 microsatellite loci from *Iris hexagona* (Iridaceae). *Mol Ecol Notes* 5:410-412.
- Meerow AW, Gideon M, Kuhn DN, Motamayor JC and Nakamura K (2007) Genetic structure and gene flow among south Florida populations of *Iris hexagona* Walt. (Iridaceae) assessed with 19 microsatellite DNA loci. *Int J Plant Sci* 168:1291-1309.
- Milach SCK (1998) Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: Milach SCK (ed). *Marcadores Moleculares em Plantas*. Porto Alegre, pp. 17-28.

- Miz RB (2013) Caracterização Genética da espécie *Sisyrinchium palmifolium* L. (Iridaceae) e espécies relacionadas na região sul do Brasil. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 167 pp.
- Moraga AR, Trapero-Mozos A, Gómez-Gómez L and Ahrazem O (2010) Intersimple sequence repeat markers for molecular characterization of *Crocus cartwrightianus* cv. albus. *Ind Crop Prod* 32:47-151.
- Moraes AP, Souza-Chies TT, Stiehl-Alves EM, Burchardt P, Eggers L, Siljak-Yakovlev S, Brown SC, Chauveau O, Nadot S and Bourge M (2015) Evolutionary trends in Iridaceae: new cytogenetic findings from the New World. *Bot J Linn Soc* 177:27–49.
- Moreno N, Peñas ML, Bernardello G and Roitman G (2009) Cytogenetic studies in *Herbertia* Sw. (Iridaceae). *Caryologia* 62:37-42.
- Moura TM, Sebbenn AM, Chaves LJ, Coelho ASG, Oliveira GC, Xa and Kageyama PY (2009) Diversidade e estrutura genética espacial em populações fragmentadas de *Solanum* spp. do Cerrado, estimadas por meio de locos microssatélites. *Sci Fors*, 37: 143-150.
- Moura NF, Chaves LJ, Venkovsky R, Naves RV, Aguiar AV and Moura MF (2011) Genetic structure of mangaba (*Hancorniaspeciosa* Gomes) populations in the Cerrado region of Central Brazil. *J Bioscience* 27:473-481.
- Murashige T and Skoog FA 1962. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Plant Physiol* 15:473-479.
- Naranjo CA, Ferrari MR, Palermo AM and Poggio L (1998) Karyotype, DNA content, and meiotic behaviour in five South American species of *Vicia* (Fabaceae). *Ann Bot* 82:757-764.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583–90.
- Nybom H, (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol* 13:1143–1155.
- Peakall R and Smouse PE (2006) GenAEx version 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6:288-295.
- Peakall R and Smouse PE (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539
- Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.

- Ranjan P, Bhat KV, Misra RL, Singh SK and Ranjan JK (2010) Genetic relationships of *gladiolus cultivars* inferred from fluorescence based AFLP markers. *Sci Hortic-Amsterdam* 123:562-567.
- Ravenna P (1984) The delimitation of *Gelasine* (Iridaceae), and *G. uruguayensis* sp. nov. from Uruguay. *Nord J Bot* 4:347-350.
- Reddy MP, Sarla N and Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17.
- Reeves G, Chase MW, Goldblatt P, Rudall P, Fay MF, Cox AV, Lejeune B and Souza-Chies TT (2001) Molecular systematics of Iridaceae: evidence from four plastid DNA regions. *Am J Bot* 88:2074-2087.
- Rodriguez A and Sytsma KJ (2006) Phylogenetics of the “tiger-flower” group (Tigridieae, Iridaceae): molecular and morphological evidence. *Aliso* 22:412-424.
- Rodriguez JB, Lima TG and Deble LP (2014) New Record to the Brazilian Flora: *Gelasine uruguayensis* Ravenna ssp. *uruguayensis* (Iridaceae-Tigridieae). *Iheringia Sér Bot Porto Alegre* 69:215-220.
- Romero-Zarco C (1986) A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35:526-530.
- Rudall PJ (1994) Leaf anatomy and systematics of the Iridaceae. *Bot J Linnean Soc* 114:1-21.
- Saad L and Mahy G (2009) Molecular and morphological variation of rare endemic *Oncocyclus* irises (Iridaceae) of Lebanon. *Bot J Linnean Soc* 159:123-135.
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT and Smith WA (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol Ecol* 7:465-474.
- Schlüter PM and Harris SA (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol Ecol Notes* 6:569-572.
- Sherwin WB and Moritz C (2000) Managing and monitoring genetic erosion. In: Young AG and Clarke GM (eds) *Genetics, demography and viability of fragmented populations*. Cambridge University Press.
- Silva MS, Vieira FA and Carvalho D (2011a) Diversity and genetic structure in natural populations of *Geonoma schottiana* Mart (Arecaceae): implications for conservation. *Cerne* 17:01-07.
- Silva KVP, Alves AAC, Martins MIG, Melo CAF and Carvalho R (2011b) Variabilidade genética entre acessos do gênero *Manihot* por meio de marcadores moleculares ISSR. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília* 46:1082-1088.

- Souza-Chies TT, Bittar G, Nadot S, Carter L, Besin E and Lejeune B (1997) Phylogenetic analysis of Iridaceae with parsimony and distance methods using the plastid gene *rps4*. *Plant Syst Evol* 204:109-123.
- Souza-Chies TT, Kaltchuk-Santos E, Eggers L, Flores AM, Alves EMS, Fachinetto J, Lustosa J, Corrêa LB, Tacuatiá LO, Piccoli P *et al.* (2012) Studies on diversity and evolution of Iridaceae species of southern Brazil. *Genet Mol Biol* 35:1027-1035.
- Spellerberg IF, Fedor PJ (2003) A tribute to Claude Shannon (1916–2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the ‘Shannon–Wiener’ Index. *Global Ecol Biogeogr* 12:177–179.
- Stiehl-Alves ME (2013) Diversidade genética e evolução de espécies de *Herbertia* (Iridaceae). 116p. Tese (Doutorado) Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Stebbins GL (1971) Chromosome variation and evolution. *Science* 152:1463-1469.
- Tacuatiá LO, Souza-Chies TT, Flores AM, Eggers L, Siljak-Yakovlev and Kaltchuk-Santos E (2012) Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. *Bot J Linn Soc* 169:350-364.
- Trotter J (2000) WinMDI[®]. Version 2.8. La Jolla: The Scripps Research Institute. Disponível em: <<http://facs.scripps.edu/software.html>>. Acesso em: 26 de maio de 2015.
- Uramoto K, Walder JMM and Zucchi RA (2005) Análise quantitativa e distribuição de populações de espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. *Neotrop Entomol* 34:3-39.
- Van Der Pijl L. Principles of dispersal in higher plants. 3.ed. New York: Springer Verlag, 1982.
- Varshney RK, Graner A and Sorrells ME (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol* 23:48-55.
- Vieira FA and Carvalho D (2008) Genetic structure of an insect-pollinated and bird-dispersed tropical tree in vegetation fragments and corridors: implications for conservation. *Biodivers Conserv* 17:2305-2321.
- Wang YJ, Shi XP and Zhong ZC (2012) Clonal diversity and genetic differentiation in rhizomatous herb, *Irisjaponica* (Iridaceae) populations on Jinyun Mountain, Southwest China. *Sains Malaysiana* 41:49–154.

- Wróblewska A, Brzosko E, Czarnecka B and 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.
- Wolff K and Morgan-Richards M (1998) PCR markers distinguish *Plantago major* subspecies. *Theor Appl Genet* 96:282-286.
- Xu Y (1998) *Molecular plant breeding*. USA: Cabi, 2010. pp735.
- Zaman MA, Begum R and Saha SR (1985) Karyomorphology and chromosome behaviour of a form of *Eleutherine plicata* Herb. (Iridaceae) with an aberrant chromosome number and a pericentric inversion. *Caryologia*, 38:20-211.
- Zhang LSCH, Barret JY, Gao J, Chen WW, Cole Y, Liu ZL and Bai QJLI (2005) Predicting mating patterns from pollination syndromes: the case of 'sapromyophily' in *Tacca chantrieri* (Taccaceae). *Am J Bot* 92: 517-524.
- Zhang LQJ, Li HT, Li J and Chen DZLI (2006) Genetic diversity and geographic differentiation in *Tacca chantrieri* (Taccaceae): an autonomous selfing plant with showy floral display. *Ann Bot* 98:449-457.
- Zhang XL, Yuan YM and Ge XJ (2007) Genetic structure and differentiation of *Gentiana atunsiensis* W. W. Smith and *G. striolata* T. N. Ho (Gentianaceae) as revealed by ISSR markers. *Bot J Linn Soc* 154:225-232.
- Zietkiewicz E, Rafalki A and Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.
- Zonneveld BJM, Leitch IJ and Bennett MD (2005) First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. *Ann Bot* 96:229–244.
- Zucchi MI, Brondani RPV, Pinheiro JB, Chaves LJ, Coelho ASG and Vencovsky R (2003) Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genet Mol Biol* 26: 449-457.