

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

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



LUANA CRESTANI DE CARVALHO

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos

Coorientadora: Dra. Eudes Maria Stiehl Alves

Porto Alegre, fevereiro de 2022

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

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

LUANA CRESTANI DE CARVALHO

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

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos

Coorientadora: Dra. Eudes Maria Stiehl Alves

Porto Alegre, fevereiro de 2022

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	8
<u>ABSTRACT</u>	10
<u>INTRODUÇÃO</u>	12
<u>OBJETIVOS</u>	25
<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	26
<u>1. Coleta/estratégia de amostragem</u>	26
<u>2. Análises citogenéticas</u>	27
<u>2.1 Contagem cromossômica</u>	28
<u>2.2 Tamanho de genoma</u>	28
<u>3. Análises morfométricas</u>	29
<u>4. Análises estatísticas</u>	31
<u>5. Modelagem de nicho</u>	31
<u>RESULTADOS</u>	34
<u>1. Análises citogenéticas</u>	34
<u>1.1 Contagem cromossômica</u>	34
<u>1.2 Tamanho de genoma</u>	34
<u>2. Análises morfométricas</u>	35
<u>3. Modelagem de nicho</u>	46
<u>DISCUSSÃO</u>	52
<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</u>	59
<u>REFERÊNCIAS</u>	60

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

INTRODUÇÃO

1. Poliploidia

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

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

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

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

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

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

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

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

Eventos de poliploidia estão diretamente relacionados a momentos decisivos na história evolutiva das plantas, como importantes transições evolutivas, grandes saltos no

desenvolvimento e/ou radiações adaptativas de espécies, bem como podem afetar a interação com polinizadores, assim, sugerindo que a poliploidia tenha seu papel na especiação adaptativa (DE BODT *et al.*, 2005; FAWCETT *et al.*, 2009; REZENDE *et al.*, 2020).

2. *Herbertia* Sweet: um gênero de Iridaceae

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

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

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

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

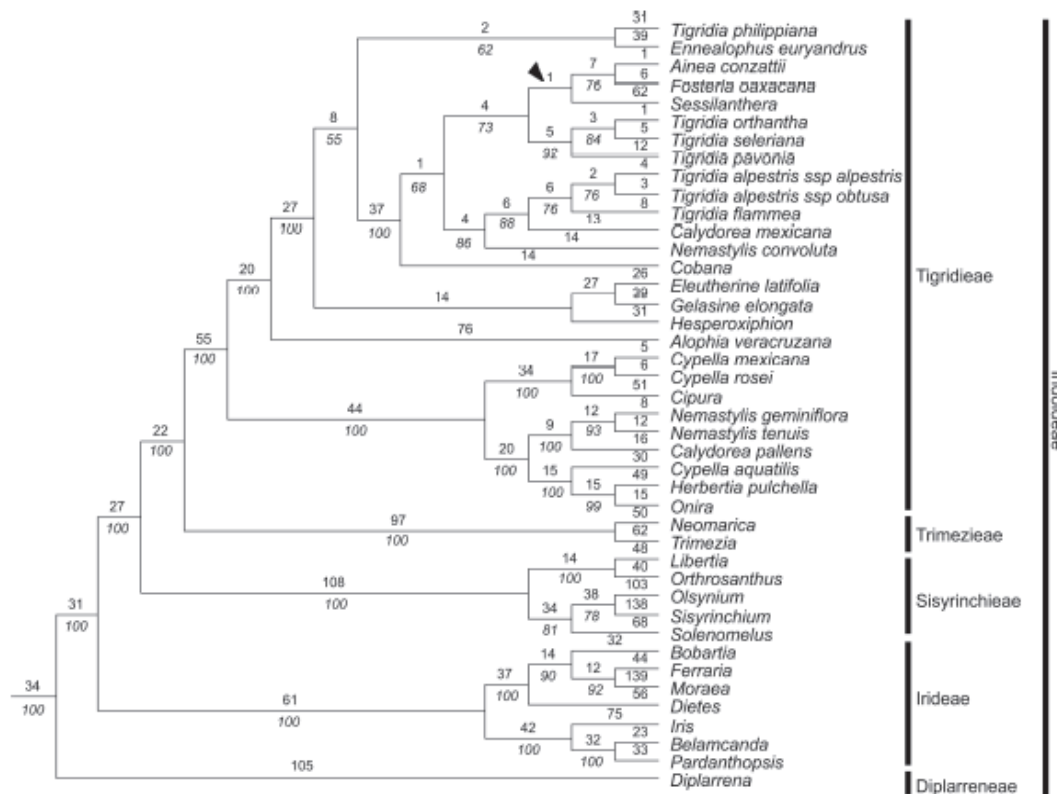


Figura 1: Árvore filogenética da subfamília Iridoideae, destacando as cinco tribos: Diplarreneae, Irideae, Sisyrrinchieae, Tigridae e Trimezieae. Modificado de Goldblatt et al. (2008).

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

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

mencionado anteriormente (Figura 2). O clado A é composto por gêneros incluídos exclusivamente na subtribo Cipurinae Benth. & Hook.f. (inclusive *Herbertia*), porém não todos. O clado B compreende os gêneros restantes de Cipurinae e todos da subtribo Tigridiinae Pax.

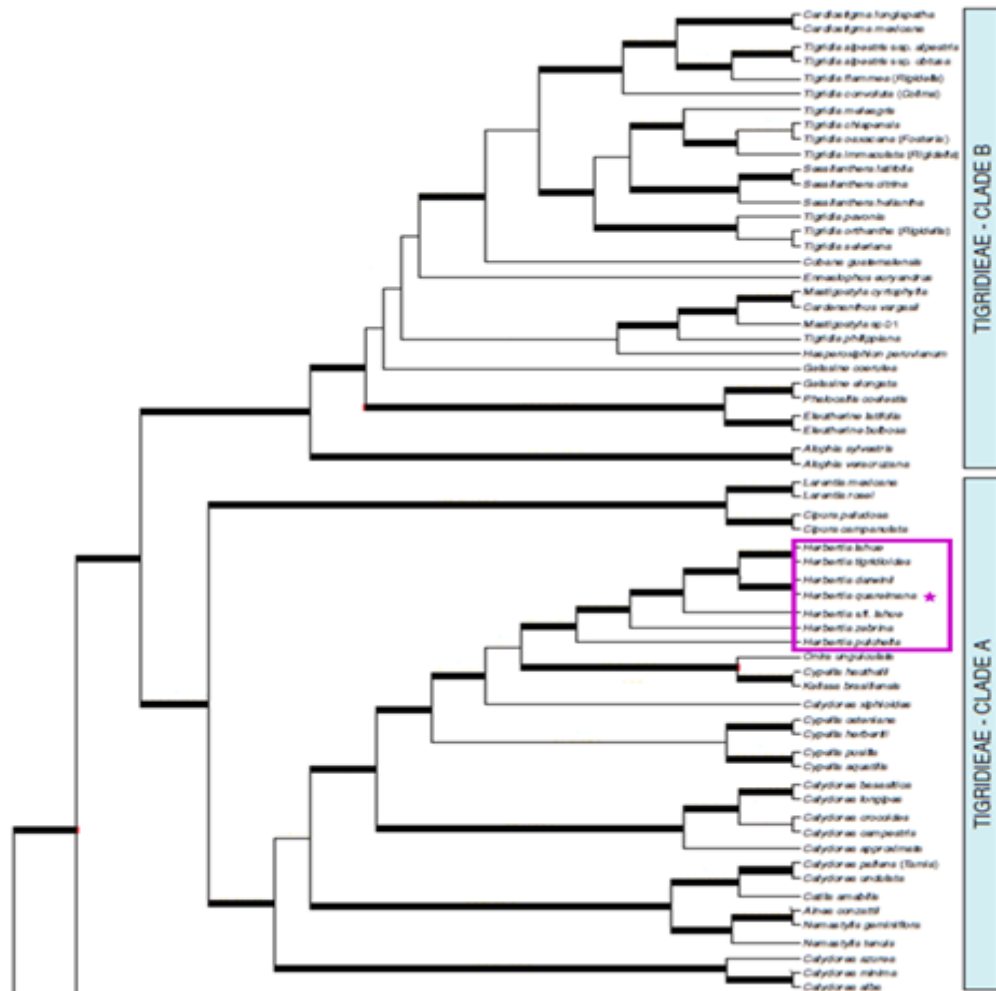


Figura 2: Árvore filogenética de Iridoideae, destacando clado A e clado B de Tigridaeae. O quadrado marca a posição do gênero *Herbertia* dentro do clado A e a estrela indica *Herbertia quareimana*, espécie foco do presente estudo. Adaptado de Chauveau *et al*, 2012.

3. Citogenética em Iridaceae

A citogenética é uma ferramenta útil na resolução de problemas taxonômicos, especialmente para espécies vegetais (GUERRA, 1988; 2008; 2012), uma vez que o conhecimento sobre caracteres citológicos tem sido especialmente importante para a ajudar a resolver a circunscrição e entender a relação de gêneros e espécies (GOLDBLATT e TAKEI, 1997).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. Um pouco mais sobre *Herbertia*

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

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

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

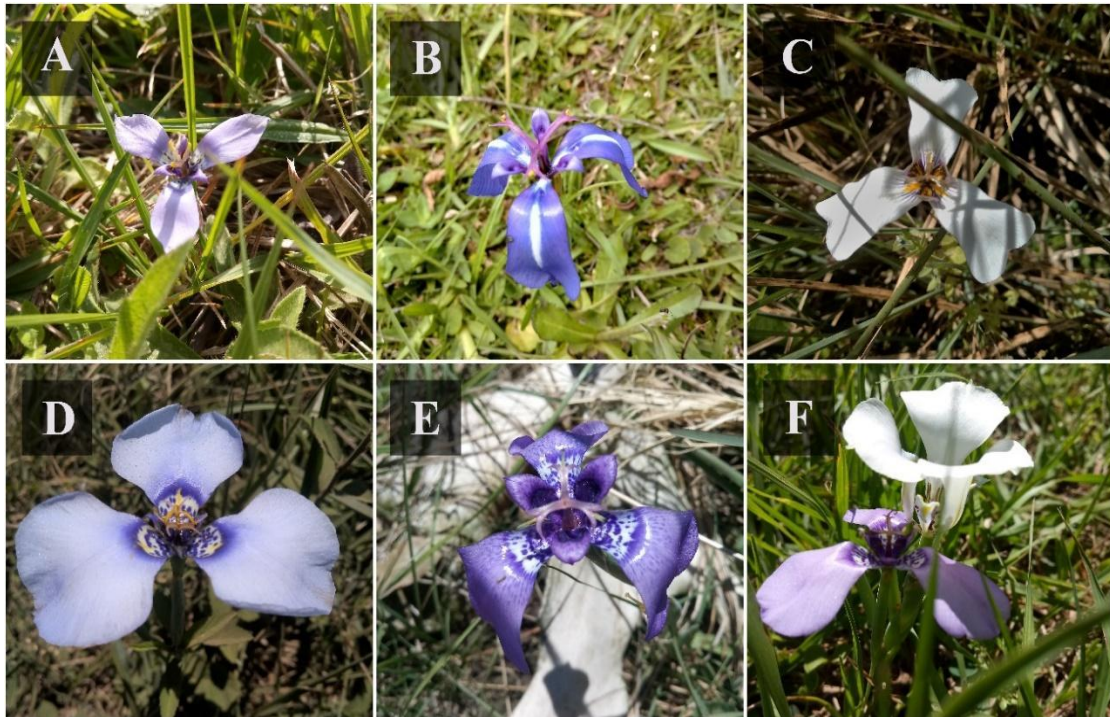


Figura 3. Algumas das espécies de *Herbertia* ilustrando a diversidade do gênero: (A) *Herbertia lahue* (6x); (B) *H. pulchella*; (C) *H. zebrina*; (D) *H. quareimana* (morfotipo pequeno); (E) *H. quareimana* (morfotipo grande); e, (F) *H. quareimana* (morfotipo pequeno) ao lado de *Cypella hauthalii*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

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

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

Notas: ¹ Status de conservação conforme decreto N° 52.109, de 1° de dezembro de 2014 publicado pela Assembleia Legislativa do estado do Rio Grande do Sul.

5. Morfometria

Tradicionalmente, a identificação das espécies depende fortemente de caracteres morfológicos. Em plantas, os caracteres morfológicos são avaliados a partir de medidas, formas e cores das flores, das folhas, do pólen, do caule, enfim, de tudo que possa caracterizá-las (HAIDER, 2018). Contudo, as espécies compõem um sistema complexo e possuem relações multidimensionais com seu próprio ambiente e outras espécies. Para melhor entender esse sistema, é benéfico utilizar dados morfológicos integrados a dados genéticos, demandas ecológicas, preferência de nicho, entre outros (RAJEI, 2015; ERST *et al.*, 2020, LUCEÑO *et al.*, 2021).

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

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

6. Modelagem de nicho

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

É fundamental conhecer bem a distribuição de espécies endêmicas, assim como a paisagem bioclimática associada às mesmas. Nesse sentido, estudos que fazem uso da modelagem de nicho e de distribuição têm se mostrado muito importantes (SEGATTO *et al.*, 2017; FLORES-TOLENTINO *et al.*, 2019), não apenas como forma de caracterizar a adequação e probabilidade de ocorrência das espécies, mas também auxiliando na avaliação de risco de extinção e no estabelecimento de estratégias de conservação dessas espécies (GILS *et al.*, 2012; SOHN *et al.*, 2013; ALENCAR *et al.*, 2015; SRINIVASULU *et al.*, 2021). Esses estudos são valiosos uma vez que podem auxiliar na busca de estratégias para

a preservação do Bioma Pampa, sabidamente possuidor de elevado índice de endemismo (BOLDRINI, 2020). Contudo, a literatura é ainda escassa (SEGATTO *et al.*, 2017; PEDRANA *et al.*, 2018).

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

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

7. Por que estudar *Herbertia quareimana*?

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

O modo como as plantas se reproduzem tem efeito direto na estrutura genética das

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

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

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

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

Tendo em vista variação morfológica observada para *H. quareimana*, a ocorrência disjunta dos morfotipos e a possível existência de dois níveis de ploidias, nossa hipótese para esse estudo é essa espécie possui indivíduos diploides e tetraploides, os quais podem ser distinguidos a partir de caracteres morfológicos, especialmente aqueles relacionados ao tamanho de estruturas florais. Além disso, com base nos dados de distribuição geográfica obtidos até então, acreditamos que tais citótipos não ocorrem em simpatria, estando geograficamente e, presumivelmente, ecologicamente separados.

Justificativa

Assim, surgem perguntas:

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

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

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

OBJETIVOS

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

Objetivos específicos

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

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta/estratégia de amostragem

A espécie do presente estudo é endêmica do Bioma Pampa. O Pampa está localizado ao sul da América do Sul e possui uma porção brasileira (176.496 km², aproximadamente 2,07% do território nacional) que se conecta ao restante do bioma no Uruguai, na Argentina e à uma pequena parte no Paraguai. Forma um ambiente peculiar e muito antigo geológica, climática e biologicamente. Essas características dão ao bioma um potencial endógeno vasto. Apesar dessas características, o pampa permanece carente de pesquisas e desenvolvimento. É um bioma com elevado índice de endemismos (cerca de 260 espécies da flora) e com muitos gêneros da fauna e flora ameaçados de extinção (BOLDRINI, 2020), o que torna necessário estratégias de conservação.

Nesse contexto, em outubro de 2019 foram realizadas expedições a campo no interior do estado do Rio Grande do Sul em busca de populações naturais de *H. quareimana*. Foram encontradas três populações do morfotipo pequeno (uma em São Miguel das Missões e duas em Santo Antônio das Missões, identificadas como SATVCM 03, SATVCM 04 e SATVCM 06) e três do morfotipo grande (todas em regiões distintas no município de Alegrete, identificadas como SATVCM 22, SATVCM 23 e SATVCM 24) (Figura 4, Tabela 2). Embora muitas buscas tenham sido feitas no ano de 2019 e em anos anteriores, regiões de simpatria não foram encontradas.

Para cada população, foram coletados indivíduos para as diferentes análises previstas: bulbos para análises citogenéticas, flores com tépalas íntegras fixadas em solução de álcool-glicerol 7:3 e plantas preservadas para análise morfológica. Em todas as expedições, foi coletado material testemunho na forma de exsicatas (voucher) a serem depositadas no herbário ICN da UFRGS.

Tabela 2: Tabela com a localização do material coletado em 2019.

População	Morfotipo	Localidade	Longitude	Latitude
SATVCM 03	Pequeno	São Miguel das Missões/RS	-54.55389	-28.546
SATVCM 04	Pequeno	Santo Antônio das Missões/RS	-55.21797	-28.506
SATVCM 06	Pequeno	Santo Antônio das Missões/RS	-55.23392	-28.523
SATVCM 22	Grande	Alegrete	-55.88517	-29.858
SATVCM 23	Grande	Alegrete	-55.97544	-29.984
SATVCM 24	Grande	Alegrete	-55.98703	-30.281

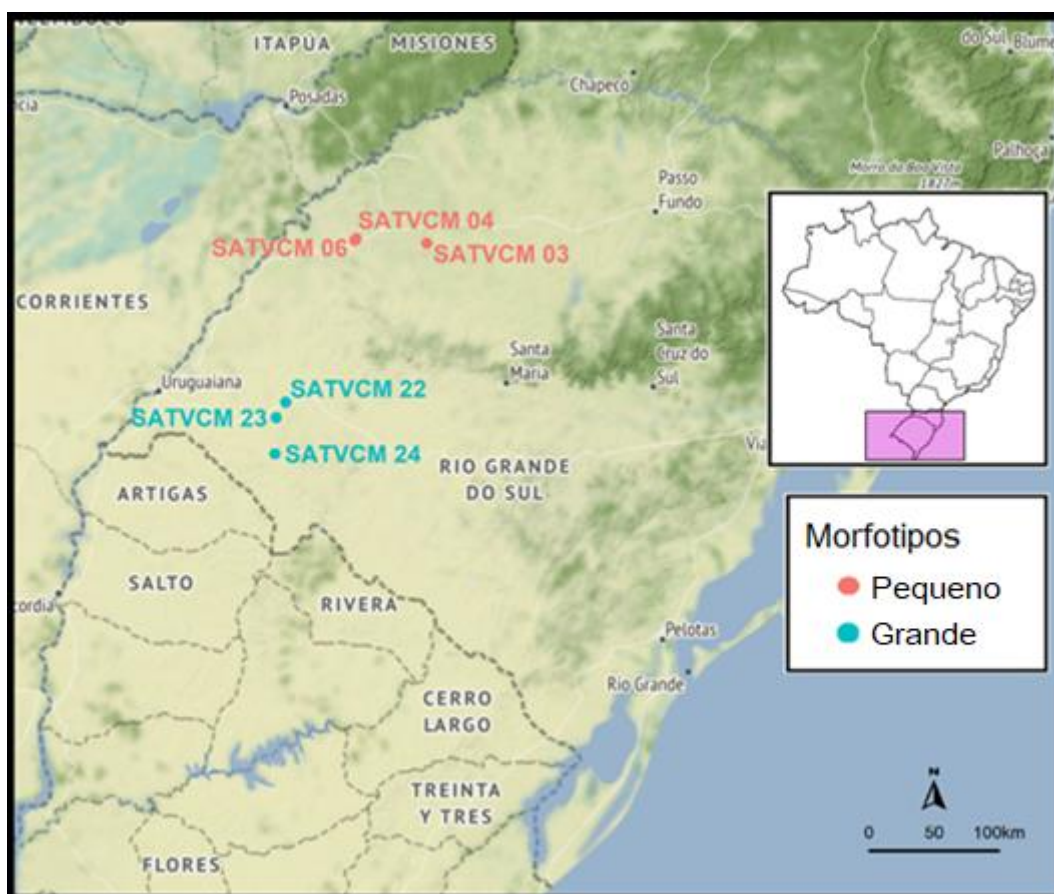


Figura 4: Mapa indicando os locais de ocorrência das populações de *Herbertia quareimiana* amostradas em 2019. Pontos rosas no mapa indicam populações com morfotipo pequeno e pontos azuis indicam populações com morfotipo grande.

2. Análises citogenéticas

Visando a manutenção das plantas e a obtenção de raízes para análises citogenéticas, os bulbos coletados foram limpos, as raízes originais removidas com bisturi e plantados em vasos contendo terra e vermiculita (2:1, v/v). Aproximadamente 14 dias após o plantio, os

bulbos foram lavados e as raízes jovens foram coletadas e pré-tratadas com solução de 8-hidroxiquinolina 2 mM por 4h a 15°C. Subsequentemente as raízes foram fixadas em solução de etanol-ácido acético 3:1 (v/v) fresco e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

2.1 Contagem cromossômica

Para acessar o número cromossômico foram utilizados materiais da presente coleta e também de coletas anteriores que estavam armazenados no laboratório (morfotipo pequeno: SAFS17; morfotipo grande: E1103, ECP733 e ESC513), pelo menos cinco indivíduos por população. Para a preparação das lâminas, as raízes foram lavadas em água destilada para remoção do fixador e então, submetidas à digestão enzimática (1% de macerozima (Sigma), 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma) em banho-maria à 37°C. O tempo de digestão variou de 30 a 65 minutos, dependendo do tamanho da raiz. O preparo da lâmina se deu por esmagamento do meristema radicular em uma gota de ácido acético 45%. As lâminas foram congeladas em nitrogênio líquido para retirada da lamínula com o auxílio de um bisturi e depois secadas em temperatura ambiente.

As lâminas com as melhores metáfases foram selecionadas em contraste de fase no microscópio Zeiss Axioplan para posterior coloração. Estas então foram coradas em solução Giemsa a 2% por 20 minutos e montadas em Entellan (Merck). Pelo menos dez células com bom espalhamento cromossômico e em condensação equivalente foram analisadas por planta. As melhores metáfases foram fotografadas em microscópio Zeiss Axioplan, equipado com sistema de captura digital de imagem software AxioVision Zeiss e selecionadas para contagem do número cromossômico.

2.2 Tamanho de genoma

Para a estimativa de conteúdo de DNA foi empregada citometria de fluxo. Fragmentos de folhas frescas de 2 cm² foram macerados em 1 mL de tampão de lise LB01. Posteriormente, os núcleos em suspensão foram filtrados com malha de nylon de 40 µm em microtubos de citometria. No momento da análise, foi adicionado 50 µg mL⁻¹ de RNase e 50 µg mL⁻¹ de iodeto de propídeo. Espécies de tamanho de genoma conhecido foram utilizadas como padrões internos, sendo maceradas junto com as amostras de *H. quareimana*. Foram empregadas *Solanum lycopersicum* L. ‘Stupické’ (2C = 1,96 pg) e *Pisum sativum* L. (2C = 9,09 pg) (DOLEŽEL *et al.*, 2007).

As suspensões nucleares foram analisadas em citômetro de fluxo FACS-Aria

(Becton-Dickinson). Cerca de 10.000 núcleos foram analisados. Os histogramas foram gerados a partir do software BD FACSDiva software 6.0. A estimativa do conteúdo de DNA das espécies foi realizada através da comparação dos picos correspondentes aos estágios de G0/G1 da espécie padrão e das amostras de *H. quareimana*.

3. Análises morfométricas

Para as análises morfométricas foram feitas medidas florais de todos os acessos coletados (neste contexto, o termo “acesso” refere-se às populações e será empregado daqui para frente), exceto SATVCM 24 (morfotipo grande), uma vez que não foram encontradas flores íntegras para análise. Esse acesso foi substituído por SADR09 (ICN184238), outro morfotipo grande, advindo de Quaraí/RS, que possuía flores íntegras previamente coletadas em glicerol-álcool e estocadas em laboratório. Um total de 51 indivíduos foram analisados, sendo 25 do morfotipo pequeno e 26 do grande. Para as medidas vegetativas foram utilizados indivíduos de todos os acessos da coleta de 2019, totalizando 57 indivíduos mensurados (27 do morfotipo pequeno e 30 do morfotipo grande).

Com o auxílio de um paquímetro digital, dados de 41 características morfológicas, 18 florais e 23 vegetativas, foram coletados para cada planta (Tabela 4). As tépalas mantidas em solução de etanol e glicerol foram colocadas sobre cartões (4x4cm) de papel de gramatura média Canson branco (140g/m²), sendo identificadas por indivíduo e população. Para melhor representar a forma das tépalas externas, seu comprimento foi subdividido em duas medidas e sua largura em quatro (Figura 5). Algumas estruturas florais, por serem demasiado pequenas, necessitaram de auxílio de lupa para medição.

Para medir área e perímetro, os cartões foram fotografados com uma câmera digital Nikon D5300 em resolução máxima (6000 x 4000 pixels) e o contorno das tépalas externas e internas foi recuperado e disposto sobre fundo preto utilizando o software GIMP 2.10.24 (Figura 6). A análise foi executada no pacote de processamento de imagem de código aberto Fiji-ImageJ2 (SCHINDELIN *et al.*, 2012), utilizando *Set Scale* para definir a escala espacial das estruturas para que os resultados das medições possam ser apresentados em unidades calibradas (em centímetros). A seguir, as imagens foram convertidas para tons de cinza em 8-bits utilizando o submenu *Type*, os limites superiores e inferiores da análise foram

estabelecidos utilizando o submenu *Image*, a seguir *Adjust – AutoThreshold – RenyiEntropy method*.(KAPUR *et al*, 1985) e as imagens foram então binarizadas utilizando *Process – Binary – Make binary*. *Analyze (Set Measurements)* foi utilizado para estabelecer os parâmetros da análise de contorno.

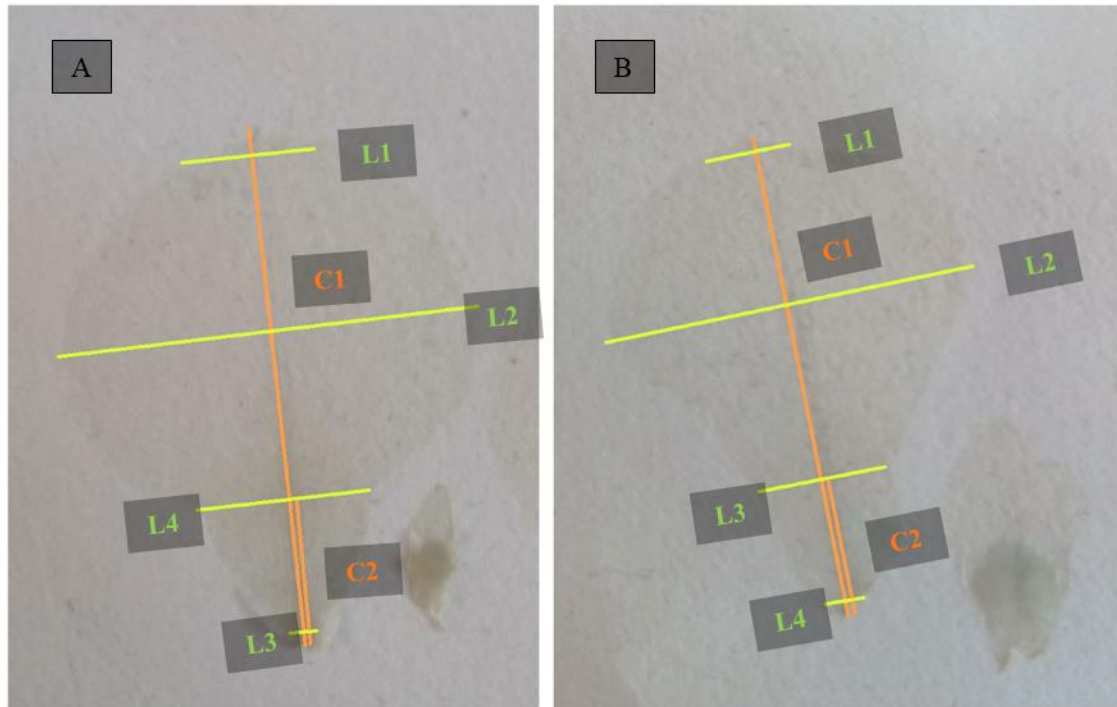


Figura 5: Medidas de comprimento e largura das tépalas externas de *H. quareimana* diploide (A) e tetraploide (B) (Tabela 3).

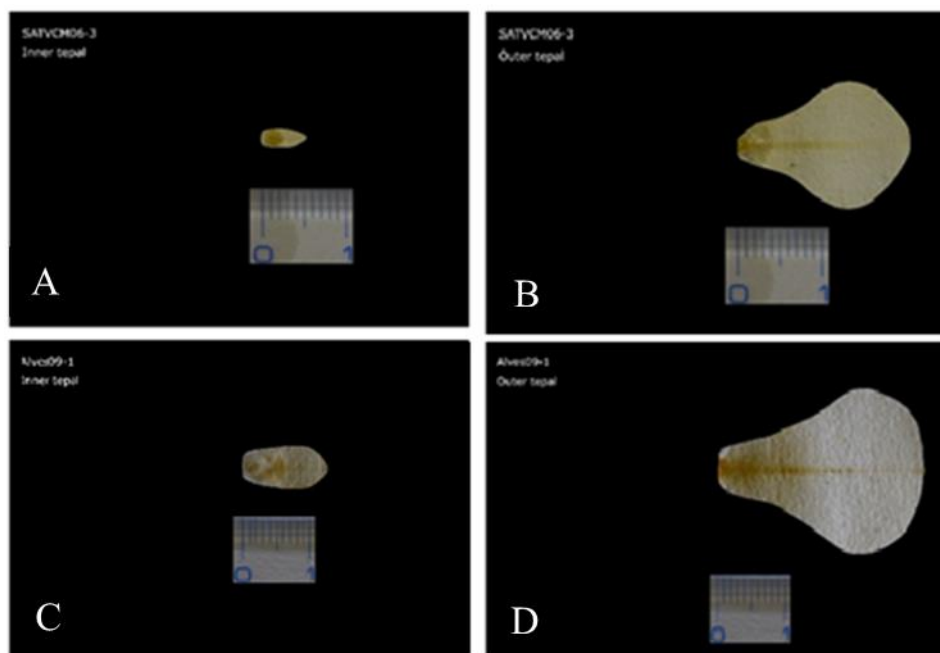


Figura 6: Exemplo de imagens de tépalas internas (A e C) e externas (B e D) de *H. quareimana* utilizadas para obter dados de área e de perímetro. Plantas diploides acima (A e B) e tetraploides abaixo (C e D). Escala: 1 cm.

4. Análises estatísticas

Para os dados morfológicos, foram verificadas as suposições do teste ANOVA (com o teste post hoc de Tukey para comparações pareadas) a partir do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e do teste de homocedasticidade de Levene. Uma vez não satisfeitos os requisitos da ANOVA, o teste de Kruskal-Wallis (com teste post hoc de Mann-Whitney para determinar a significância) foi aplicado ($\alpha = 0,05$).

O teste de correlação de Spearman foi aplicado para testar a correlação entre os caracteres. Dois caracteres de morfologia floral foram excluídos (comprimento total do estilete e braços do estilete - comprimento da parte concrecente) antes de realizar as próximas análises pois estavam altamente correlacionados com pelo menos um outro parâmetro ($r > 0,95$) ou ainda por apresentarem alta correlação com pelo menos dois outros parâmetros ($0,90 < r > 0,95$) (KOLARČIK *et al.*, 2019). Os demais seguiram para análise de componentes principais (PCA). Devido à fase de florescimento encontrada durante a coleta, alguns indivíduos tetraploides não possuíam cápsulas, o que levou a dados faltantes nesses caracteres, situação que foi contornada utilizando a função `imputePCA` do pacote `missMDA` (versão 1.18) (JOSSE e HUSSON, 2016).

Os gráficos ilustrando as análises foram criados usando o pacote `ggplot2` (versão 3.3.5) (WICKHAM, 2016). Todas as análises foram realizadas no software R (versão 4.0.2) (R Core Team, 2020).

5. Modelagem de nicho

Para a modelagem de nicho foram compiladas informações atualizadas obtidas a partir das coletas de *Herbertia quareimana* da própria equipe, bem como dados já existentes de plataformas de dados digitais, como Species Link (<http://slink.cria.org.br>) e Global Biodiversity Information Facility – GBIF (<https://www.gbif.org>; Agosto de 2021). Seguiram para análise oito pontos para a diploide e 25 pontos para a tetraploide, totalizando 33 pontos

para a espécie (Tabela 5).

O processo de seleção de variáveis utilizou variáveis bioclimáticas atuais obtidas do PaleoClim (BROWN *et al.*, 2018), com resolução espacial de 2,5 arco-minutos. Foram pré-selecionadas seis variáveis ecologicamente significativas que poderiam apresentar efeito de causalidade com a persistência da espécie, são elas: Faixa Diurna Média (C°) (BIO2), Isothermalidade (BIO3), Temperatura máxima do mês mais quente (°C*10) (BIO5), Temperatura mínima do mês mais frio (°C*10) (BIO6), Precipitação Anual (mm/ano) (BIO12) e Precipitação do mês mais seco (mm/mês) (BIO14). Foi construída uma análise de componentes principais (PCA) com variáveis e eixos projetados no espaço ambiental. Uma vez que o número de registros é pequeno, foram mantidos três eixos para evitar sobreajuste (BREINER *et al.*, 2015; HARREL *et al.*, 1996). Os três eixos sintetizam 95,2% da variância ambiental da espécie. A projeção da PCA foi feita através do pacote ntbbox do R (OSORIO-OLVERA *et al.*, 2020; R Core Team, 2021). O R foi escolhido para essa e as demais análises devido à possibilidade de melhor parametrização dos algoritmos.

Pseudo-ausências foram geradas pela criação de um envelope climático, que é um método baseado apenas em presenças para construir modelos de distribuição de espécies. O envelope foi binarizado levando em consideração que qualquer valor maior que zero seria considerado uma presença. Pseudo-ausências foram coletadas na região com zero probabilidade de ocorrência (a região fora do envelope climático), mas dentro de um raio de 5 graus em torno dos registros de presença. Esta abordagem constrói pseudo-ausências que são mais similares a ausências reais (LOBO *et al.*, 2006). Foram construídos 10 conjuntos de pseudo-ausências para rodar os modelos e cada conjunto possuía números iguais de presenças e pseudo-ausências. Esta simetria entre presenças e pseudo-ausências é importante para evitar problemas de desequilíbrio que podem comprometer a validação do modelo (JAPKOWICZ e STEPHEN, 2002).

Para a construção dos modelos foram utilizados três algoritmos de *machine learning* de diferentes classes: Radial Basis Function (um algoritmo de rede neural), Support Vector Machine (um algoritmo de máquina vetorial) e Mixed Discriminant Analysis (um algoritmo discriminante). Para evitar sobreajuste, os algoritmos foram definidos para parametrização padrão. Cada algoritmo foi rodado 10 vezes, uma vez que algoritmos *machine learning* possuem um efeito randômico no início que pode enviesar os resultados (SILLERO e BARBOSA, 2021).

A validação dos modelos foi realizada por uma validação cruzada com quatro grupos, somando um total de 1200 modelos (10 conjuntos de pseudo-ausências em validação cruzada quatro vezes, rodando 10 vezes três algoritmos). Foram calculadas a área sob a curva (AUC) e *True Skill Statistic* (TSS) para cada modelo, bem como suas médias. Modelos com valores de AUC e TSS maiores que a média foram agrupados usando uma votação simples: as projeções são binarizadas com um limiar que maximize a soma de sensibilidade e especificidade; após, os rasters são somados e normalizados. Isso resulta em um raster que varia de zero a um, onde zero é onde todos os modelos concordam com as ausências e um é onde todos os modelos concordam com as presenças, resultando em um raster com incerteza e probabilidade de ocorrência. Os modelos foram projetados para o cenário atual e passados, compreendendo Holoceno Médio (entre 4,2 e 8,3 mil anos atrás) e o Último Máximo Glacial (cerca de 21 mil anos atrás). A modelagem de nicho foi feita utilizando o pacote *sdm* versão 1.0-89 no R (NAIMI e ARAÚJO, 2016). Como existem poucos registros para o citótipo diploide, não foi possível obter seu nicho através de algoritmos de *machine learning*. Desta forma, a título de comparação, as projeções desse citótipo foram obtidas subtraindo as projeções do citótipo tetraploide das projeções utilizando todos os registros.

Para testar se os nichos climáticos dos níveis de ploidia são semelhantes, foram extraídos, das projeções das tetraploides, os valores de probabilidade de ocorrência nos registros das diploides. Em seguida, foram simulados 1200 conjuntos dados de pseudo-ausências, excluindo o envelope bioclimático obtido dos registros de presença das diploides (oito registros). O AUC foi calculado para cada um dos conjuntos de dados de pseudo-ausência e também foi calculada uma correlação de Pearson entre AUCs de diploides e tetraploides. O nicho bioclimático da espécie deverá ser menos diferente do que o esperado ao acaso se $P > 0,95$. Também foi calculada uma correlação de Pearson entre as projeções geradas.

RESULTADOS

1. Análises citogenéticas

1.1 Contagem cromossômica

O número cromossômico foi determinado para sete acessos (Tabela 3, Figura 7). Desses sete acessos, os três do morfotipo pequeno apresentaram $2n = 2x = 14$ e os quatro do morfotipo grande apresentaram $2n = 4x = 28$. Portanto, para todas as populações investigadas, o número cromossômico encontrado confirmou o nível de ploidia sugerido pelo fenótipo. Esses dados trazem pela primeira vez a ocorrência de citótipo diploide para *H. quareimana*, além de confirmar os dados já presentes na literatura para o citótipo tetraploide.

1.2 Tamanho de genoma

Com relação ao conteúdo de DNA, foram analisados seis acessos (Tabela 3). Desses, somente um acesso, com três indivíduos analisados, é do morfotipo pequeno (SATVCM 06). Os cinco acessos restantes são todos do morfotipo grande e possuem de dois a cinco indivíduos analisados. Nas diploides o valor $2C$ foi de 4,80 pg, sendo pela primeira vez registrado o conteúdo de DNA para esse citótipo. Já nas tetraploides variou de 8,57 a 9,46 pg, um pouco maior que o reportado na literatura. É possível observar um aumento nos valores de $2C$ em *H. quareimana* ocorrendo juntamente com o aumento da ploidia.

Tabela 3: Dados das análises citogenéticas para os acessos analisados: número cromossômico e tamanho de genoma.

População	Localidade	Morfotipo	2n	Valor 2C (pg)*
SAFS17	São Nicolau/RS	Pequeno	2x = 14	ND
SATVCM 03	São Miguel das Missões/RS	Pequeno	2x = 14	ND
SATVCM 04	Santo Antônio das Missões/RS	Pequeno	ND	ND
SATVCM 06	Santo Antônio das Missões/RS	Pequeno	2x = 14	4,80 (0,04)
E1103	Santana do Livramento/RS	Grande	4x = 28	9,41 (0,06)
ECP733	Uruguaiana/RS	Grande	4x = 28	9,46(0,07)
ESC513	Quaraí/RS	Grande	ND	8,57 (0,17)
SATVCM 22	Alegrete	Grande	4x = 28	9,04 (0,14)
SATVCM 23	Alegrete	Grande	4x = 28	9,32 (0,20)
SATVCM 24	Alegrete	Grande	ND	ND

*Média e desvio padrão (entre parênteses) para conteúdo de DNA; ND = Não Determinado.

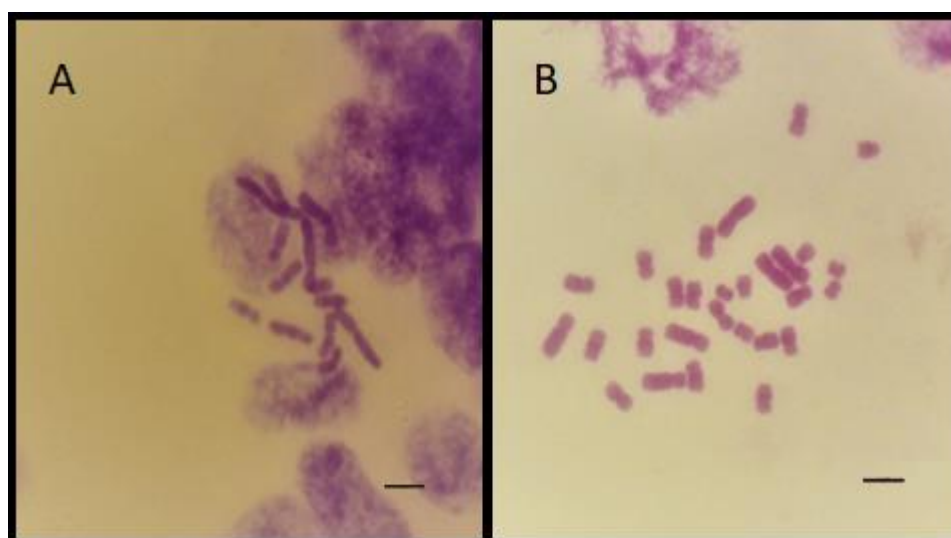


Figura 7: Metáfases mitóticas de *H. quareimana*. (A) citótipo diploide $2n = 14$ pertencente ao acesso SATVCM 06 e (B) citótipo tetraploide $2n = 28$ pertencente ao acesso SATVCM 22. Escala: 10 μ m.

2. Análises morfométricas

Foram analisados 45 caracteres morfológicos, sendo 22 florais e 23 vegetativos (Tabela 4, Figuras 8 e 9). Dentre os caracteres florais, somente as larguras 2 e 4 da tépala externa não apresentaram diferença significativa. Quanto aos caracteres vegetativos, nove deles não apresentaram diferença significativa, sendo todos referentes a comprimentos: da planta (parte área e subterrânea), do caule floral, do primeiro entrenó, da primeira folha

caulinar, das brácteas caulinares, do pedúnculo do ripídio, da cápsula e do pedúnculo da cápsula.

No total, foram 34 caracteres que apresentaram diferenças significativas entre os citótipos (20 florais e 14 vegetativos). Desses, a grande maioria (29 caracteres) evidenciava maiores médias para os indivíduos tetraploides, sendo que somente cinco caracteres apresentaram maior média nos diploides, todos eles vegetativos: número de folhas basais, comprimento da folha basal mais longa, comprimento das folhas caulinares basais, número de espatas e largura da cápsula. Nove caracteres não apresentaram sobreposição entre os citótipos: comprimento 1 da tépala externa, comprimento, largura, área e perímetro da tépala interna, comprimento dos filamentos da parte conata e comprimento total do estilete, dos braços do estilete e da parte concrecente dos braços do estilete.

A PCA dos caracteres florais é apresentada na figura 10. Na base, indivíduos de ploidia semelhante agruparam juntos, indicando uma associação entre a ploidia e a variação fenotípica dos eixos primários. O primeiro componente principal (PC1) explica 52,22% da variação morfológica observada entre os indivíduos. O segundo componente principal (PC2) é responsável por 9,62% da variação entre os indivíduos. Não é observado sobreposição das elipses: os diploides apresentam autovalores mais baixos do que os tetraploides no PC1 e compartilham alguns autovalores no PC2.

A PCA dos caracteres vegetativos é apresentada na figura 11. Assim como na PCA dos caracteres florais, indivíduos de ploidia semelhantes agruparam juntos. Os componentes principais da PCA explicam, respectivamente, 35,23% e 19,72% da variação morfológica observada nos indivíduos. Ainda, os caracteres vegetativos apresentaram uma pequena sobreposição das elipses. Embora os autovalores sejam maiores no tetraploide, ambos compartilham uma pequena faixa de autovalores tanto no PC1 como no PC2.

Uma PCA que reúne todos os caracteres morfológicos analisados é apresentada na figura 12. O primeiro componente principal (PC1) explica 37,21% da variação morfológica observada entre os indivíduos. O segundo componente principal (PC2) é responsável por 15,17% da variação entre os indivíduos. Nessa PCA fica ainda mais evidente amplitude morfológica entre as ploidias. Não é observado sobreposição das elipses.

Tabela 4: Relação dos caracteres florais e vegetativos analisados. Os resultados estão organizados de acordo com os supostos níveis de ploidia. A média e o erro padrão encontram-se na segunda coluna, desvio padrão na terceira coluna, valores mínimos e máximos na quarta e quinta coluna respectivamente e o coeficiente de variação na sexta coluna.

Caracteres	Citótipo	Desv. Pad.	Min.	Máx.	Coef. de var.
FLORAL					
Ovário					
Ovário – comprimento (mm)	2x (média = 5,29; EP = 0,140)*	0,699	3,73	6,63	13,209
	4x (média = 6,83; EP = 0,215)*	1,096	5,17	9,87	13,209
Ovário – largura (mm)	2x (média = 2,46; EP = 0,069)*	0,345	1,87	3,00	14,023
	4x (média = 2,88; EP = 0,086)*	0,439	2,00	3,70	14,023
Tépalas externas					
Tépala externa – comprimento 1 (mm)	2x (média = 26,34; EP = 0,426)*	0,551	3,03	5,30	12,849
	4x (média = 35,30; EP = 0,722)*	0,728	3,57	6,63	12,849
Tépala externa – comprimento 2 (mm)	2x (média = 7,58; EP = 0,265)*	1,393	6,83	12,37	15,440
	4x (média = 9,79; EP = 0,283)*	1,754	6,83	13,33	15,440
Tépala externa – largura 1 (mm)	2x (média = 4,29; EP = 0,110)*	2,289	14,80	21,90	12,323
	4x (média = 5,37; EP = 0,143)*	4,131	16,13	31,93	12,323
Tépala externa – largura 2 (mm)	2x (média = 9,02; EP = 0,279)	1,903	4,93	11,63	21,646
	4x (média = 9,90; EP = 0,344)	1,525	6,13	12,17	21,646
Tépala externa – largura 3 (mm)	2x (média = 18,58; EP = 0,458)*	2,130	22,30	29,30	8,086
	4x (média = 21,14; EP = 0,810)*	3,679	29,77	45,47	8,086
Tépala externa – largura 4 (mm)	2x (média = 8,79; EP = 0,381)	1,327	5,80	11,23	17,513
	4x (média = 9,26; EP = 0,299)	1,443	6,07	12,17	17,513

Caracteres	Citótipo	Desv. Pad.	Min.	Máx.	Coef. de var.
Tépala externa – área (cm ²)	2x (média = 2,78; EP = 0,107)*	0,537	1,89	3,61	19,342
	4x (média = 4,21; EP = 0,259)*	1,213	2,68	7,33	19,342
Tépala externa – perímetro (cm)	2x (média = 10,78; EP = 0,399)	1,955	8,27	16,97	18,138
	4x (média = 13,33; EP = 0,359)	1,682	9,40	16,08	18,138
Tépalas internas					
Tépala interna – comprimento (mm)	2x (média = 7,95; EP = 0,194)*	0,972	5,67	9,37	12,781
	4x (média = 14,44; EP = 0,348)*	1,775	9,57	17,60	12,781
Tépala interna – largura (mm)	2x (média = 3,77; EP = 0,096)*	0,482	2,70	4,53	12,223
	4x (média = 6,67; EP = 0,207)*	1,058	5,37	10,03	12,223
Tépala interna – área (cm ²)	2x (média = 0,15; EP = 0,007)*	0,035	0,10	0,25	22,364
	4x (média = 0,58; EP = 0,030)*	0,137	0,37	0,94	22,364
Tépala interna – perímetro (cm)	2x (média = 2,79; EP = 0,096)*	0,478	2,06	3,87	17,128
	4x (média = 4,96; EP = 0,181)*	0,849	3,94	6,82	17,128
Estames					
Filamentos – comprimento da parte conata (mm)	2x (média = 4,74; EP = 0,079)*	0,395	3,93	5,40	8,336
	4x (média = 7,35; EP = 0,135)*	0,689	5,57	8,50	8,336
Filamentos – comprimento da parte livre (mm)	2x (média = 0,99; EP = 0,059)*	0,294	0,57	1,70	29,598
	4x (média = 2,13; EP = 0,145)*	0,737	1,00	4,13	29,598
Anteras – comprimento (mm)	2x (média = 8,22; EP = 0,220)*	1,102	5,13	10,53	13,409
	4x (média = 9,37; EP = 0,169)*	0,862	7,23	11,63	13,409

Anteras – largura (mm)	2x (média = 0,32; EP = 0,013)*	0,064	0,23	0,50	20,246
	4x (média = 0,38; EP = 0,011)*	0,057	0,30	0,53	20,246

Caracteres	Citótipo	Desv. Pad.	Min.	Máx.	Coef. de var.
Estilete e estigma					
Estilete – comprimento total (mm)	2x (média = 4,92; EP = 0,091)*	0,454	4,03	5,67	9,245
	4x (média = 7,72; EP = 0,120)*	0,611	6,77	8,93	9,245
Braços do estilete – comprimento total (mm)	2x (média = 2,40; EP = 0,072)*	0,359	1,67	3,10	14,976
	4x (média = 3,65; EP = 0,083)*	0,425	2,93	4,47	14,976
Braços do estilete – comprimento da parte concrecente (mm)	2x (média = 3,33; EP = 0,069)*	0,346	2,57	4,23	10,390
	4x (média = 5,67; EP = 0,124)*	0,631	4,47	7,03	10,390
Braços do estilete – comprimento da parte livre (mm)	2x (média = 1,46; EP = 0,050)*	0,249	1,00	2,07	17,021
	4x (média = 1,67; EP = 0,059)*	0,300	1,17	2,43	17,021
VEGETATIVO					
Altura da planta					
Planta – parte aérea (cm)	2x (média = 19,40; EP = 0,458)	23,844	15,52	23,85	12,291
	4x (média = 22,51; EP = 1,087)	59,541	108,90	358,60	12,291
Planta – parte subterrânea (cm)	2x (média = 56,46; EP = 2,245)	11,666	33,07	75,90	20,660
	4x (média = 56,07; EP = 2,866)	15,165	34,00	94,00	20,660
Bulbo					
Bulbo – comprimento (mm)	2x (média = 26,00; EP = 0,835)*	4,091	19,00	33,47	15,732
	4x (média = 28,50; EP = 0,580)*	3,178	23,00	35,00	15,732

Bulbo – largura do eixo menor (mm)	2x (média = 15,26; EP = 0,401)*	1,967	13,00	20,60	12,887
	4x (média = 18,29; EP = 0,488)*	2,670	11,00	24,00	12,887
Bulbo – largura do eixo maior (mm)	2x (média = 18,49; EP = 0,603)*	2,955	13,00	24,73	15,982
	4x (média = 20,50; EP = 0,524)*	2,867	13,00	28,00	15,982

Caracteres	Citótipo	Desv. Pad.	Min.	Máx.	Coef. de var.
Folhas basais					
Número de folhas basais	2x (média = 4,25; EP = 0,199)*	1,031	2,00	7,00	24,288
	4x (média = 3,86; EP = 0,200)*	1,092	2,00	7,00	24,288
Folha basal mais longa – comprimento (cm)	2x (média = 20,29; EP = 0,666)*	28,278	16,01	25,04	13,935
	4x (média = 15,83; EP = 1,433)*	62,473	7,83	29,61	13,935
Folha basal mais longa – largura (mm)	2x (média = 2,58; EP = 0,104)*	0,441	1,80	3,50	17,056
	4x (média = 4,09; EP = 0,173)*	0,792	2,20	4,95	17,056
Folhas caulinares basais – comprimento (cm)	2x (média = 18,32; EP = 0,960)*	39,580	10,48	24,63	21,602
	4x (média = 15,08; EP = 1,541)*	67,164	6,65	29,61	21,602
Folhas caulinares basais – largura (mm)	2x (média = 2,57; EP = 0,080)*	0,413	1,33	3,45	16,054
	4x (média = 4,17; EP = 0,149)*	0,814	2,83	5,93	16,054
Caule floral					
Caule floral – comprimento (cm)	2x (média = 14,94; EP = 5,123)	26,620	11,56	24,12	17,820
	4x (média = 16,44; EP = 0,892)	48,839	8,16	24,81	17,820
Primeiro entrenó – comprimento (cm)	2x (média = 4,97; EP = 0,230)	11,974	2,50	6,99	24,073
	4x (média = 5,09; EP = 0,510)	27,919	1,93	11,93	24,073
Primeira folha caulinar – comprimento (cm)	2x (média = 10,12; EP = 0,508)	22,709	6,13	14,14	22,373

	4x (média = 11,68; EP = 0,929)	43,577	5,43	20,92	22,373
Primeira folha caulinar – largura (mm)	2x (média = 2,91; EP = 0,153)*	0,797	1,83	4,73	27,376
	4x (média = 4,41; EP = 0,302)*	1,655	2,47	9,75	27,376
Brácteas caulinares (totalmente revestidas) – comprimento (mm)	2x (média = 39,89; EP = 1,424)	7,397	25,03	56,43	18,543
	4x (média = 42,92; EP = 1,824)	9,822	30,17	70,10	18,543
Pedúnculo do ripídio – comprimento (mm)	2x (média = 58,84; EP = 1,996)	10,373	44,70	85,60	17,629
	4x (média = 64,44; EP = 3,766)	20,628	31,27	139,90	17,629
<hr/>					
Caracteres	Citótipo	Desv. Pad.	Min.	Máx.	Coef. de var.
<hr/>					
Espatas					
Número de espatas	2x (média = 1,67; EP = 0,123)*	0,641	1,00	4,00	38,447
	4x (média = 1,22; EP = 0,054)*	0,295	1,00	2,00	38,447
Valva inferior da espata – comprimento (mm)	2x (média = 28,02; EP = 0,388)*	2,013	23,43	32,73	7,186
	4x (média = 35,12; EP = 0,872)*	4,778	28,20	51,05	7,186
Valva superior da espata – comprimento (mm)	2x (média = 33,96; EP = 0,488)*	2,535	29,50	38,40	7,466
	4x (média = 42,06; EP = 0,938)*	5,135	30,33	54,85	7,466
Espata – largura (mm)	2x (média = 3,89; EP = 0,108)*	0,563	3,07	5,27	14,462
	4x (média = 5,41; EP = 0,190)*	1,041	3,70	7,45	14,462
Cápsula					
Cápsula – comprimento (mm)	2x (média = 10,64; EP = 0,761)	3,804	5,43	17,50	35,753
	4x (média = 7,67; EP = 0,713)	1,234	6,30	8,70	35,753
Cápsula – largura (mm)	2x (média = 5,37; EP = 0,976)*	4,880	2,63	15,03	90,882
	4x (média = 2,67; EP = 0,088)*	0,153	2,50	2,80	90,882
Pedúnculo da cápsula – comprimento (mm)	2x (média = 3,16; EP = 0,243)	1,217	2,00	7,50	38,459

4x (média = 3,57; EP = 0,841) 1,457 2,40 5,20 38,459

Notas: (*) indicam diferenças estatisticamente significativa.

Caracteres florais analisados

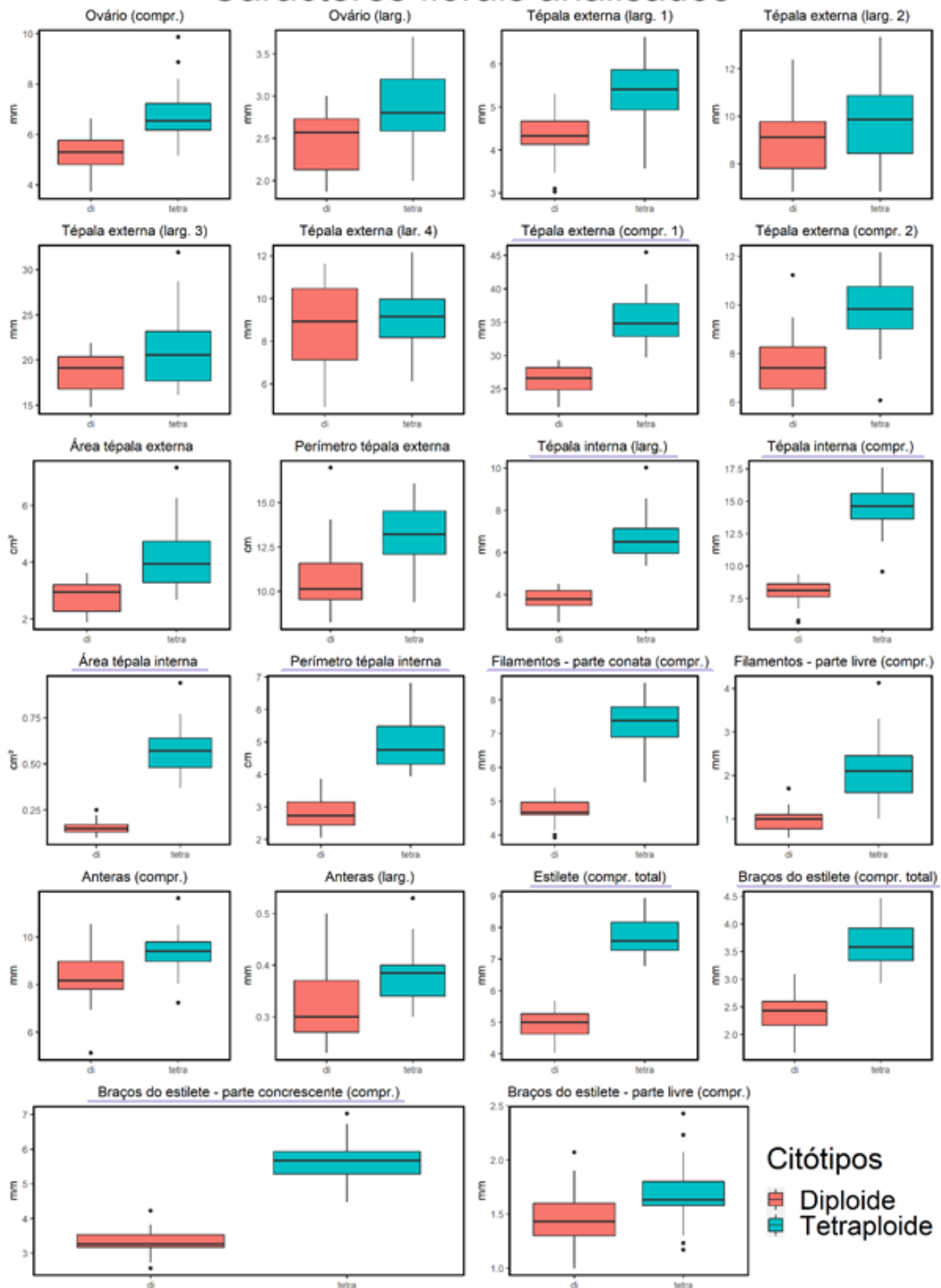


Figura 8: Análise *boxplot* dos valores contínuos dos caracteres florais mensurados em indivíduos diploides (rosa) e tetraploides (azul) de *H. quareimana*. As caixas indicam as distâncias medianas e interquartis dos valores dos caracteres; linhas retas estendem-se aos valores máximos e mínimos do intervalo interquartil; os círculos representam outliers além do intervalo interquartil. Caracteres sublinhados não apresentaram sobreposição de médias.

Caracteres vegetativos analisados

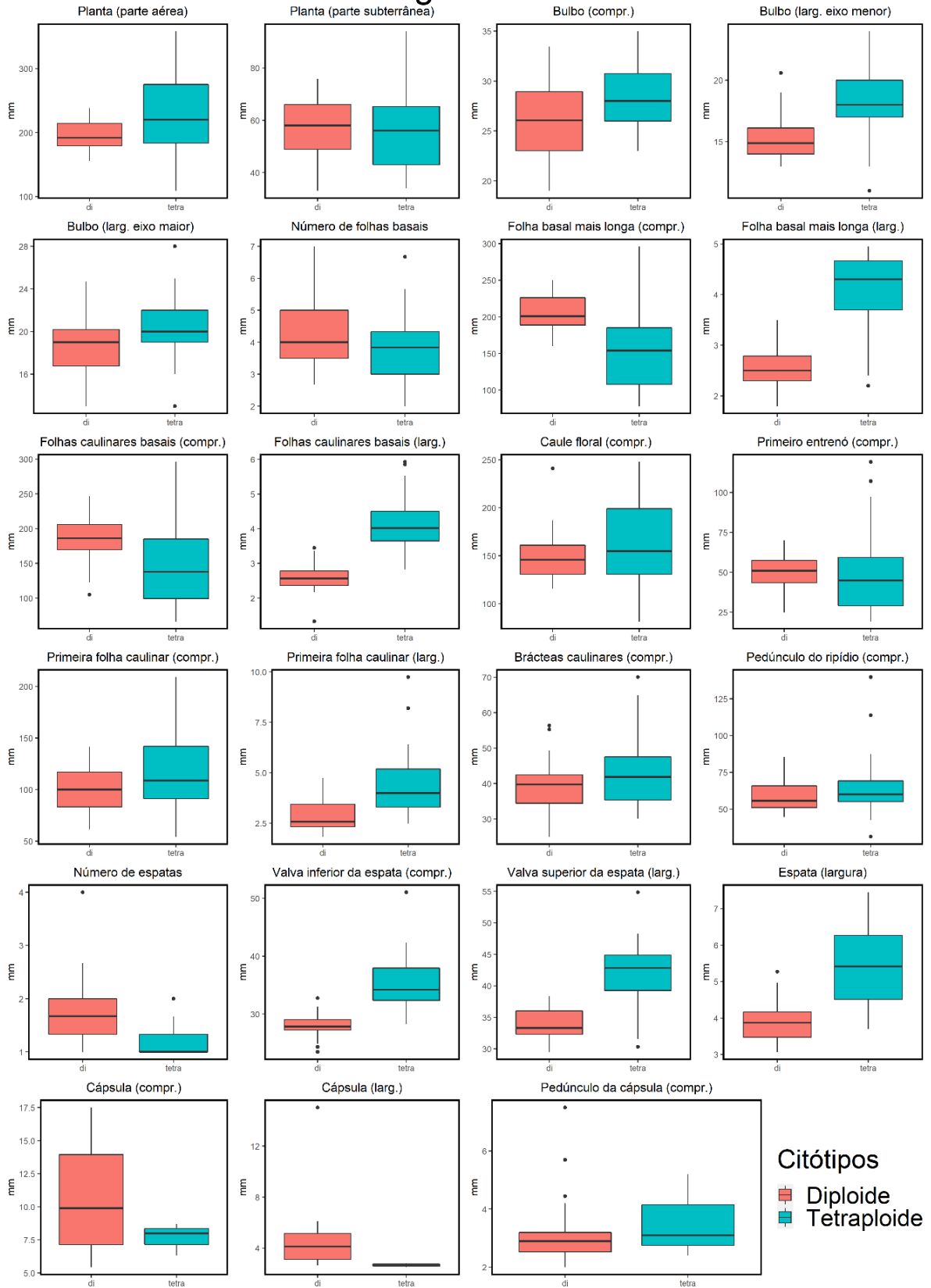


Figura 9: Análise *boxplot* dos valores contínuos dos caracteres vegetativos mensurados em indivíduos diploides (rosa) e tetraploides (azul) de *H. quareimana*. As caixas indicam as distâncias medianas e interquartis dos valores dos caracteres; linhas retas estendem-se aos valores máximos e mínimos do intervalo interquartil; os círculos representam outliers além do intervalo interquartil.

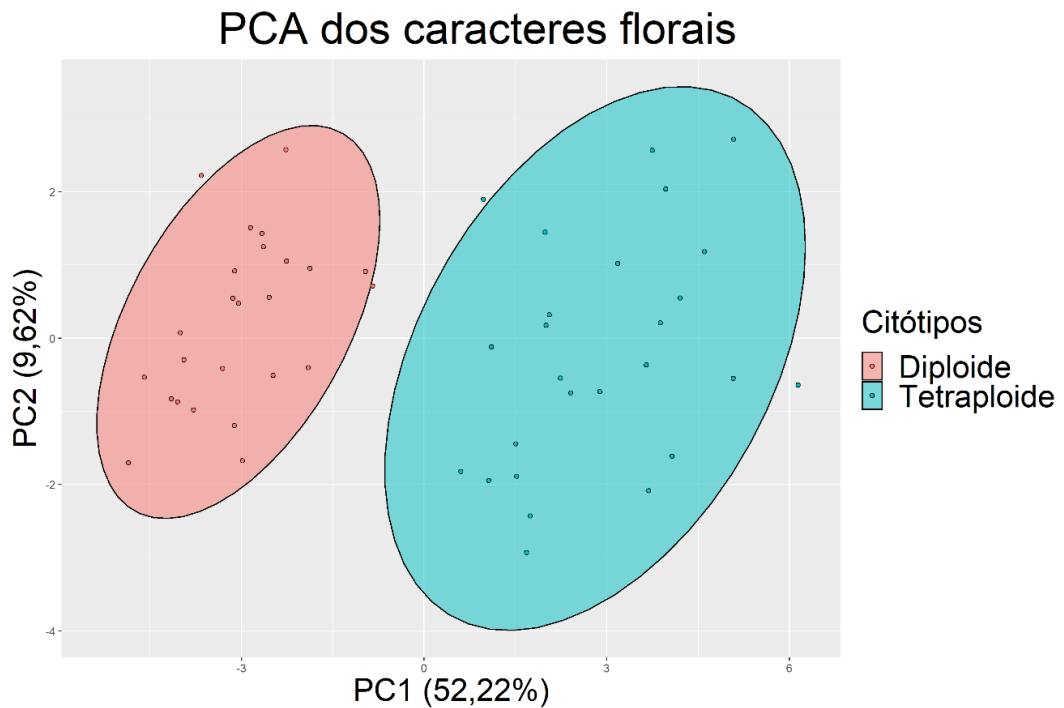


Figura 10: Análise de componentes principais (PCA) de 18 caracteres florais amostrados a partir de populações diploides (rosa) e tetraploides (azul) de *H. quareimana*. A contribuição de cada eixo é mostrada dentro dos parênteses. Sem sobreposição de elipses (intervalo de confiança de 95%).

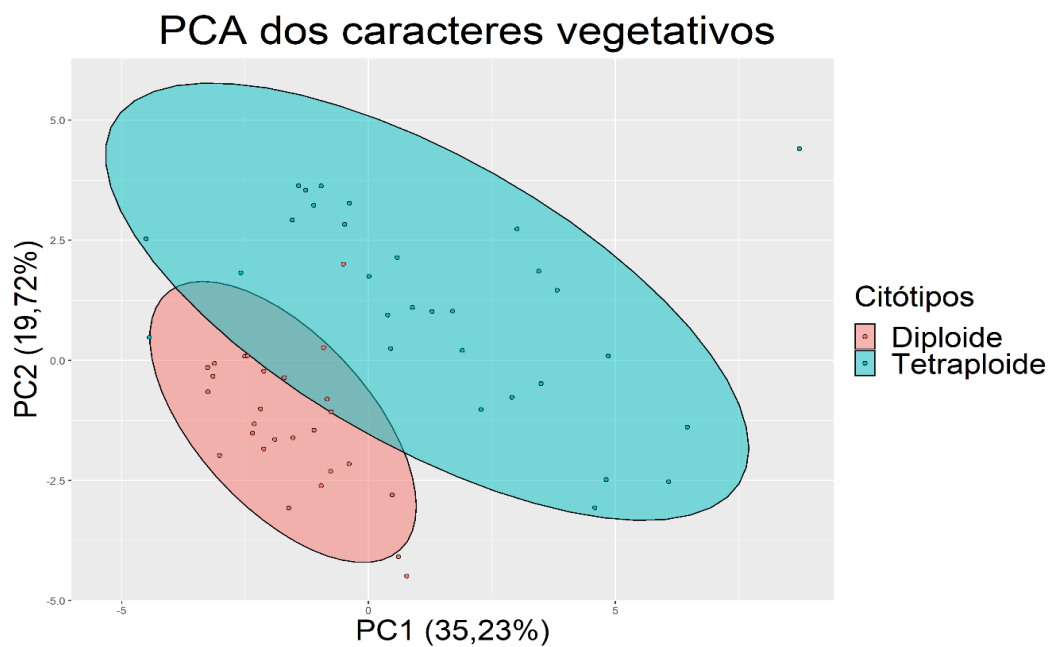


Figura 11: Análise de componentes principais (PCA) de 23 caracteres vegetativos amostrados a partir de populações diploides (rosa) e tetraploides (azul) de *H. quareimana*. A contribuição de cada eixo é mostrada dentro dos parênteses. Com sobreposição de elipses (intervalo de confiança de 95%).

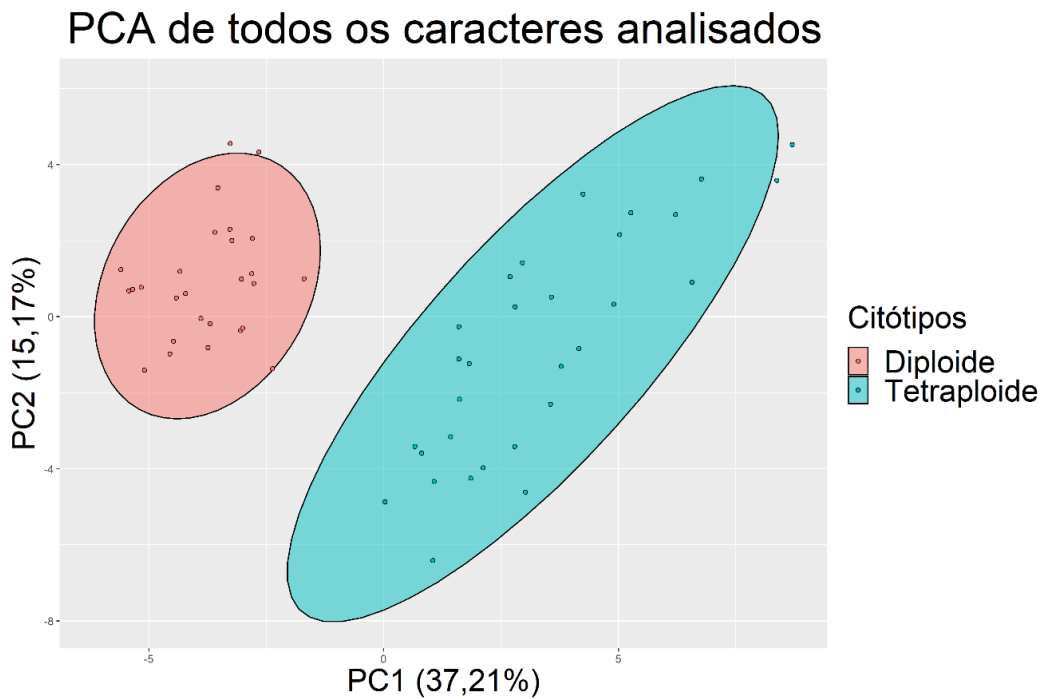


Figura 12: Análise de componentes principais (PCA) de todos os caracteres morfológicos amostrados a partir de populações diploides (rosa) e tetraploides (azul) de *H. quareimana*. A contribuição de cada eixo é mostrada dentro dos parênteses. Sem sobreposição de elipses (intervalo de confiança de 95%).

3. Modelagem de nicho

Os modelos e projeções de probabilidade de ocorrência para cada cenário climático e conjunto de dados foram gerados para *H. quareimana* utilizando 33 pontos (Tabela 5) e são mostrados na figura 13. Também foram realizados modelos e projeções levando-se em consideração separadamente a distribuição dos citótipos diploide e tetraploide de *H. quareimana* (Figura 13). As estatísticas associadas a AUC e TSS são apresentadas na tabela 6.

Tabela 5: Locais de ocorrência da espécie e suas respectivas coordenadas empregados na análise de modelagem de nicho.

Morfotipo putativo	Longitude	Latitude	Localidade	Contagem cromossômica*	Código de campo	Voucher (Herbário)
Diploide	-54,64133	-28,40164	Vitória das Missões/RS		ECP768	Eggers et al 768 (ICN)
Diploide	-54,55722	-28,54639	São Miguel das Missões/RS		ESC-112	Eggers & Souza-Chies 112 (ICN)
Diploide	-54,55808	-28,54413	São Miguel das Missões/RS		SAFS-02	Stiehl-Alves et al 37 (ICN)
Diploide	-55,27542	-28,47522	Santo Antônio das Missões/RS		SAFS-14	Stiehl-Alves et al 48 (ICN)
Diploide	-55,32050	-28,20820	São Nicolau/RS		SAFS17	Stiehl-Alves et al, 51 (ICN)
Diploide	-54,55389	-28,54557	São Miguel das Missões/RS		SATVCM 03	Stiehl-Alves et al, 106
Diploide	-55,21797	-28,50614	Santo Antônio das Missões/RS		SATVCM 04	Stiehl-Alves et al, 107
Diploide	-55,23392	-28,52334	Santo Antônio das Missões/RS		SATVCM 06	Stiehl-Alves et al, 109
Tetraploide	-56,48869	-30,19542	Quaraí/RS	$2n = 4x = 28$	ESC513	Eggers & Souza-Chies 513 (ICN)
Tetraploide	-56,43556	-30,39250	Quaraí/RS	$2n = 4x = 28$	E-699	Eggers 699 (ICN)
Tetraploide	-55,63411	-30,78781	Santana do Livramento/RS		E1103	Eggers et al 1103
Tetraploide	-56,51111	-30,46639	Artigas, Uruguai		ECIP-834	Eggers et al 834 (ICN)
Tetraploide	-57,12125	-29,88950	Uruguaiana/RS		ECP733	Eggers et al 733 (ICN)
Tetraploide	-56,36250	-30,01389	Uruguaiana/RS		ECIP-870	Eggers et al 870 (ICN)
Tetraploide	-55,61250	-30,80778	Santana do Livramento/RS		ESC-50	Eggers & Souza-Chies 50 (ICN)
Tetraploide	-56,05917	-30,57556	Santana do Livramento/RS		ESC-53	Eggers & Souza-Chies 53
Tetraploide	-57,15075	-29,90969	Uruguaiana/RS	$2n = 4x = 28$	ESC-520	Eggers & Souza-Chies 520 (ICN)
Tetraploide	-54,39908	-28,45606	Entre-Ijuís/RS	$2n = 2x = 14^{**}$	ESC-536	Eggers & Souza-Chies 536
Tetraploide	-55,92528	-30,45972	Santana do Livramento/RS		F-723	Ferreira 723 (FURB)
Tetraploide	-55,53278	-30,88944	Santana do Livramento/RS		H-sn	Haesbaert sem número (MPUC)
Tetraploide	-54,49778	-30,25917	São Gabriel/RS		LIV-sn	Lindeman et al sem número
Tetraploide	-56,49389	-30,39472	Artigas, Uruguai		MB-sn	Berro sem número
Tetraploide	-55,97583	-29,98333	Alegrete/RS		PJSF-2079	Silva Filho et al 2079 (ICN)
Tetraploide	-56,51333	-30,42306	Artigas, Uruguai	$2n = 4x = 28$	PR-008	Ravenna 008
Tetraploide	-56,44806	-30,35861	Quaraí/RS	$2n = 4x = 28$	PR-999	Ravenna 999

Morfotipo putativo	Longitude	Latitude	Localidade	Contagem cromossômica*	Código de campo	Voucher (Herbário)
Tetraploide	-56,50156	-30,27714	Quaraí/RS	$2n = 4x = 28$	SADR-09	Stiehl-Alves & DalRi 09 (ICN)
Tetraploide	-55,88517	-29,85767	Alegrete/RS		SATVCM 22	Stiehl-Alves et al, 125
Tetraploide	-55,97544	-29,98411	Alegrete/RS		SATVCM 23	Stiehl-Alves et al, 126
Tetraploide	-55,98703	-30,28083	Quaraí/RS		SATVCM 24	Stiehl-Alves et al, 127
Tetraploide	-56,45140	-30,38750	Quaraí/RS		S-2021	Stehmann et al 2021 (UEC)
Tetraploide	-55,52603	-30,70372	Santana do Livramento/RS		TSB-1006	Trevisan et al-1006
Tetraploide	-55,94639	-30,29389	Quaraí/RS		VE-407	Vogel-Ely et al 407 (ICN)
Tetraploide	-56,95000	-28,76000	Corrientes, Argentina		96845	Schinini 96845 (IBODA)

Notas: * dados presentes na literatura (GOLDBLAT e TAKEI, 1997; MORENO *et al*, 2009; MORAES *et al*, 2015); ** Dados não publicados do grupo de pesquisa

Tabela 6: Resultados de modelagem de nicho ecológico. Valores de área sob a curva (AUC) e *True Skill Statistics* (TSS).

	AUC		TSS	
	Mín.–Máx.	Média	Mín.–Máx.	Média
<i>H. quareimana</i>	0 – 1	0,95	0 – 1	0,89
<i>H. quareimana</i> (4x)	0 – 1	0,92	0 – 1	0,86

Áreas atuais de probabilidade de ocorrência para diploide incluem pequenas zonas em Santa Catarina, Paraná, Argentina e Paraguai. Para a tetraploide, a distribuição das áreas de probabilidade de ocorrência encontra-se centrada na Fronteira Oeste do Rio Grande do Sul, próximo à região onde foi originalmente descrita (Quaraí) e estende-se lateralmente tanto à leste (em direção ao centro do estado) quanto à oeste (incluindo pequenas regiões da Argentina e do Uruguai). Ao utilizar todo o conjunto de dados, ou seja, modelando a espécie como um todo, é possível notar certa perda de áreas de probabilidade de ocorrência ao norte e um grande ganho de áreas ao sul do mapa, ocupando regiões maiores da Argentina e do Uruguai.

No Holoceno Médio quase não há mudanças nas áreas de probabilidade de ocorrência das diploides quando comparado ao presente, exceto talvez por uma leve adição da região nos arredores de Carazinho e Passo Fundo. Para as tetraploides, no entanto, praticamente inexistem áreas de probabilidade de ocorrência. Para a espécie como um todo, é possível notar uma contração à sudoeste na Argentina e adição de zonas ao norte e leste quando comparado com a distribuição atual das áreas de probabilidade de ocorrência.

No Último Máximo Glacial as áreas de probabilidade de ocorrência das diploides situam-se mais ao norte, restritas a pequenas zonas ao sul do Paraguai. Para as tetraploides essas áreas não existem. Contudo, a espécie ainda apresenta uma considerável abrangência dessas áreas. Sua distribuição está centrada próximo à região de Formosa na Argentina e se estende ao sudoeste do Paraguai.

Ao observar todo o conjunto de projeções (Figura 13) chamam a atenção duas coisas: 1) a ausência quase completa de áreas de probabilidade de ocorrência para a tetraploide no passado em comparação com a extensão dessas áreas no presente, ocupando um território muito maior do que a diploide; e 2) o aparente movimento dessas áreas, cada vez mais ao sul do continente.

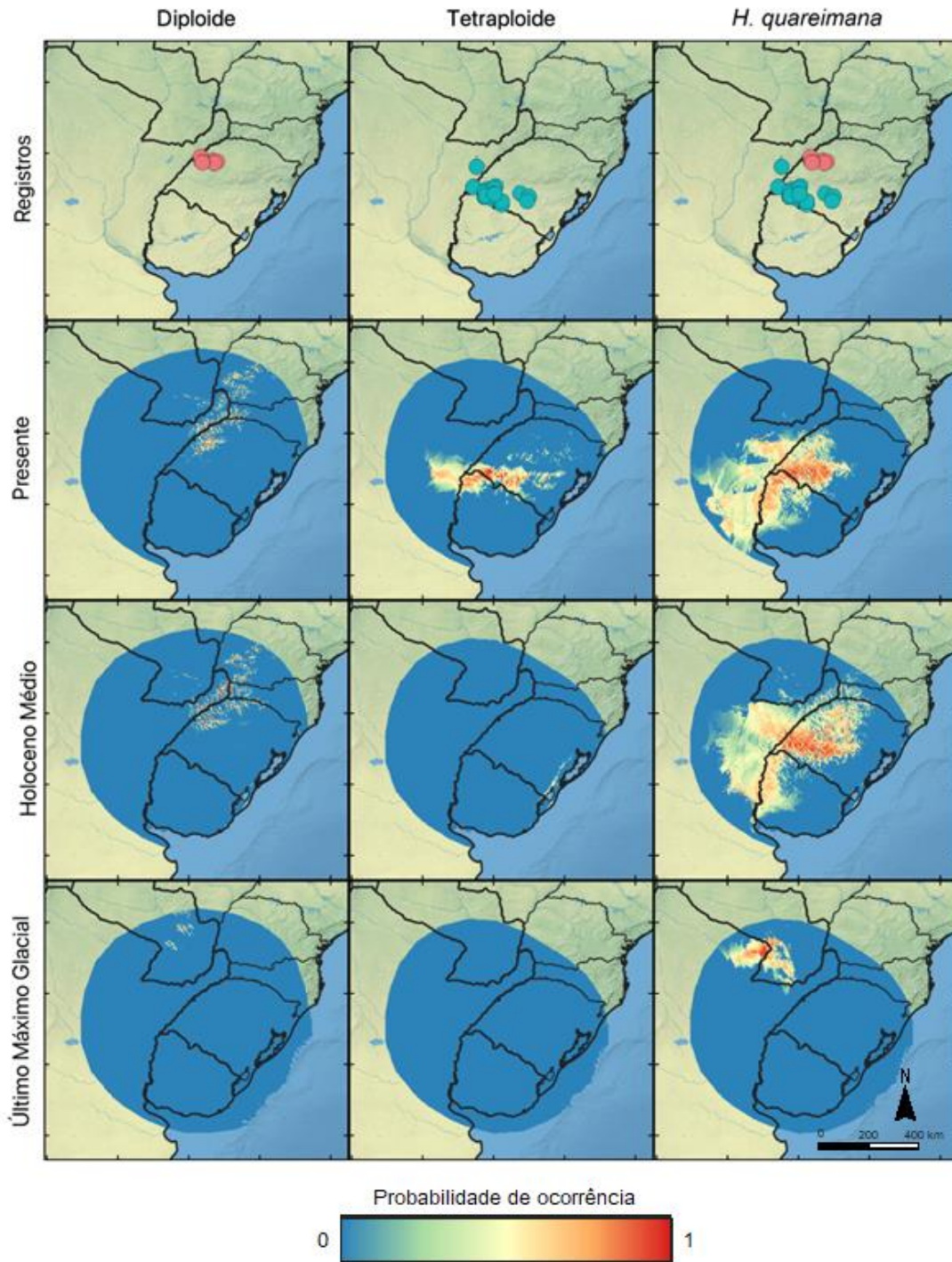


Figura 13: Projeções para a distribuição das áreas de probabilidade de ocorrência de *Herbertia quareimana* para múltiplos cenários (linhas) considerando diferentes conjuntos de dados (colunas).

Na tabela 7 é apresentada a correlação de Pearson calculada entre os as projeções dos modelos. Com base em seus valores, entende-se que o modelo de *H. quareimana* assemelha-se com os modelos das diferentes ploidia. Porém, entre ploidias os modelos são extremamente

diferentes, reiterando a diferença entre os nichos ocupados por diploides e tetraploides.

Tabela 7: Correlação de Pearson calculada para os modelos.

	<i>H. quareimana</i>	Diploide	Tetraploide
<i>H. quareimana</i>	1,0000	0,7106	0,6131
Diploide		1,0000	-0,0020
Tetraploide			1,0000

Ainda, é possível observar como se comportaram as variáveis bioclimáticas, utilizadas para a construção das projeções e modelos, nos diferentes citótipos (Tabela 8). A Bio12 (precipitação anual) foi a que apresentou a maior variação, enquanto a Bio3 (isotermalidade) foi a com menor variação.

Tabela 8: Variação observadas nas variáveis bioclimáticas entre os citótipos diploide e tetraploide.

Variáveis bioclimáticas	Citótipo	Min.	Máx.	Range
Bio12	Diploide	1644	2077	433
	Tetraploide	1274	1705	431
Bio14	Diploide	109	147	38
	Tetraploide	58	92	34
Bio2	Diploide	82	84	2
	Tetraploide	86	87	1
Bio3	Diploide	42	42	0
	Tetraploide	40	41	1
Bio5	Diploide	289	304	15
	Tetraploide	281	306	25
Bio6	Diploide	95	108	13
	Tetraploide	71	97	26

DISCUSSÃO

A motivação para a realização do presente estudo surgiu de observações a campo onde se visualizava que dentro de *Herbertia quareimana* havia um nítido dimorfismo fenotípico entre indivíduos de diferentes populações. Entretanto, esses dois morfotipos não eram encontrados em simpatria, sendo sua ocorrência em regiões bastante distantes uma da outra. Essas particularidades constatadas dentre os morfotipos, instigaram à busca por informações que permitissem uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no estabelecimento dessa espécie. A hipótese era de que existiriam dois citótipos, os quais refletiam diferenças morfológicas e ecológicas. Para confirmar tais suposições foi utilizado um enfoque multidisciplinar, cujas abordagens empregadas se encontram ilustradas na Figura 14.

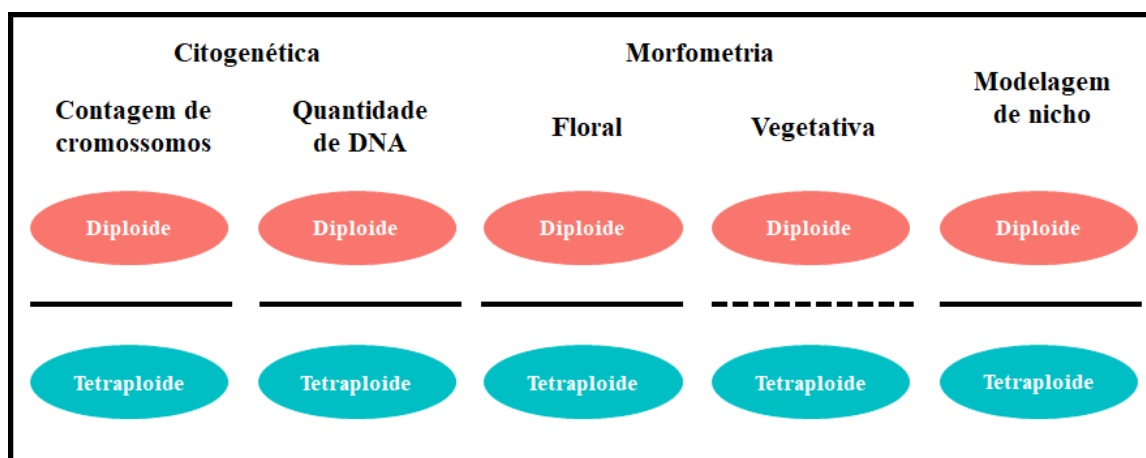


Figura 14: Representação esquemática das abordagens utilizadas no estudo dos citótipos de *Herbertia quareimana*. Com base nas análises estatísticas realizadas neste estudo, as linhas sólidas indicam dados que permitiram distinguir diploides de tetraploides, enquanto as linhas tracejadas indicam os dados que distinguiram parcialmente os citótipos.

As análises citogenéticas confirmaram a existência de dois números cromossômicos para *Herbertia quareimana*, onde o número básico é $x=7$, conforme esperado para o gênero (WINGE, 1959; KENTON e HEYWOOD, 1984; GOLDBLAT e TAKEI, 1997; BAEZA *et al.*, 2001; MORENO *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2015; STIEHL-ALVES *et al.*, 2017). Esse é o primeiro registro de citótipo diploide para a espécie, bem como da existência de uma série poliploide.

Esses dados corroboram estudos prévios que indicam o número cromossômico básico

$x = 7$ para o clado A da tribo Tigridaeae, apresentando séries poliploides sem eventos de disploidia (GOLDBLATT, 1982; KENTON *et al.*, 1990; ALVES *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2015). Apesar deste ser o primeiro registro de um diploide de *H. quareimana*, séries poliploides são frequentemente observadas entre os gêneros de Tigridaeae. São exemplos algumas espécies de *Calydorea*: *C. azurea* Klatt e *C. pallens* ($2n = 4x = 28$) e *C. xiphioides* (Poepp.) Espinosa ($2n = 6x = 42$) (GOLDBLATT, 1982; GOLDBLATT e TAKEI, 1997; DE TULLIO *et al.*, 2008). Em *Herbertia* esta condição é encontrada em *H. lahue* para qual três níveis de ploidia são reportados ($2x$, $6x$ e $8x$) e em *H. pulchella* com três citótipos ($2x$, $4x$ e $6x$) (WINGE, 1959; KENTON e HEYWOOD, 1984; GOLDBLATT e TAKEI, 1997; MORENO *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2015).

Análises de tamanho de genoma por citometria de fluxo foram realizadas para os dois citótipos investigados. As estimativas de quantidade de DNA corroboram os dados de contagem cromossômica, evidenciando dois níveis de ploidia.

Dados de tamanho de genoma estão reportados para diversas espécies da tribo Tigridaeae, incluindo *Herbertia*, conforme revisado por Moraes *et al.* (2015). O valor $2C$ encontrado no presente estudo para o citótipo diploide assemelha-se àqueles descritos para algumas outras espécies diploides do clado A da tribo Tigridaeae, como *Calydorea approximata* R.C.Foster (4,58pg), *Cypella laxa* Ravenna (4,83pg), *Kelissa brasiliensis* (Baker) Ravenna (4,73pg) e *Onira unguiculata* (Baker) Ravenna (4,57pg) (MORAES *et al.*, 2015). Dentro de *Herbertia* existem ainda duas espécies diploides que apresentam tamanho de genoma relativamente próximos ao do diploide de *H. quareimana*, são elas: *H. furcata* Roitman & J.A. Castillo (4,13pg) e *H. darwinii* Roitman & J.A.Castillo (4,60pg) (MORAES *et al.*, 2015).

Quanto ao citótipo tetraploide de *H. quareimana*, a quantidade de DNA foi um pouco maior em comparação com os dados da literatura para a mesma espécie (8,70pg) e também para a outra tetraploide do gênero com tamanho de genoma determinado, *H. pulchella*, com $2C = 8,60pg$ (MORAES *et al.*, 2015). A respeito da diferença entre os valores encontrados em nossa análise, sendo mais altos que os presentes na literatura, é possível que variações intraespecíficas ocorram (NANDINI *et al.*, 2008; LAPORT *et al.*, 2012; JEFFERY *et al.*, 2016; BECHER *et al.*, 2021). De toda forma, limitações metodológicas podem também ter resultado na referida variação. As dificuldades encontradas na obtenção de boas leituras e também o fato dos dados para diploides se restringirem a uma população, motivam à realização

de novas análises incluindo um maior número de populações, bem como a otimização do protocolo.

Uma das perguntas que norteou a condução desse estudo era se realmente existiam dois morfotipos para *H. quareimana*, como sugerido nas observações a campo. Através das análises morfométricas, foi demonstrado que a espécie de fato apresenta dois fenótipos distintos, principalmente quanto ao tamanho de diversos caracteres florais. Outro questionamento era quanto a uma possível relação entre as diferenças morfológicas e os níveis de ploidia, o que fora confirmado, sendo os indivíduos do citótipo diploide aqueles de morfologia pequena e os tetraploides de morfologia grande. Para muitos dos caracteres morfológicos analisados, as medidas aumentam de acordo com o nível de ploidia dos indivíduos, isso tanto nos caracteres florais quanto nos vegetativos. Uma das consequências possíveis da duplicação do genoma é o efeito giga. Entende-se que o efeito giga (células e órgãos maiores) seja resultante da necessidade de acomodar uma maior quantidade de DNA dentro das células (MÜNTZING, 1936; STEBBINS, 1971), levando ao aumento destas e, conseqüentemente, dos órgãos e do tamanho da planta (SALMA *et al.*, 2017; ENG e HO, 2019; NIAZIAN e NALOUSHI, 2020). Lembrando que o tamanho da célula é frequentemente maior em poliploides e o aumento do tamanho da célula é o efeito mais conhecido de poliploidização em plantas (NIAZIAN e NALOUSHI, 2020).

Em Tigridaeae, caracteres florais normalmente são usados como diagnósticos para as espécies por serem mais variáveis, enquanto caracteres vegetativos costumam ser negligenciados como diagnósticos por serem mais uniformes em suas características e medidas entre as espécies (RODRÍGUEZ e SYTSMA, 2006; GOLDBLATT *et al.*, 2008). Entretanto, a variação morfométrica dos caracteres ainda não é bem compreendida em muitas espécies de Tigridaeae, visto que muitas descrições taxonômicas para a tribo são superficiais e focadas na análise de um ou dois indivíduos apenas. Este fato gera confusão e torna intrincada a taxonomia de alguns gêneros de Tigridaeae, além de dificultar o reconhecimento de espécies a campo.

Um exemplo é o gênero *Herbertia*, onde as espécies são reconhecidas em sua maioria pelos caracteres florais e, mais especificamente em *H. lahue*, seus citótipos são diferenciados apenas por sutis diferenças no formato das tépalas: hexaploides frequentemente apresentam tépalas externas com ápice uncinado e constrição na base e tépalas internas lanceoladas, enquanto octoploides não apresentam ápice uncinado nem constrição na base da tépala externa

e a tépala interna é obovada (STIEHL-ALVES *et al.*, 2016), não havendo diferença no porte das plantas ou tamanho das flores. Para os citótipos de *H. quareimana*, entretanto, seria possível traçar limites tanto nos caracteres florais quanto nos caracteres vegetativos (Tabela 4), sendo a primeira espécie do gênero a apresentar diferença estatística em caracteres vegetativos referente a diferentes citótipos. Dos caracteres florais analisados, 90,91% (20 de 22) apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os citótipos. Dentre os que apresentaram diferença estatística, nove poderiam ser úteis como diagnósticos entre os citótipos pois não apresentam sobreposição de médias (aqueles caracteres sublinhados na figura 8): comprimento 1 da tépala externa, comprimento, largura, área e perímetro da tépala interna, comprimento dos filamentos da parte conata e comprimento total do estilete, dos braços do estilete e da parte concrecente dos braços do estilete. Quanto aos caracteres vegetativos, 60,87% (14 de 23) também apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Apesar disso, nenhum deles seria um bom candidato a caracter diagnóstico uma vez que todos apresentam sobreposição de médias.

A terceira pergunta que guiou esse estudo era sobre o que poderia explicar a separação geográfica entre os morfotipos. Análises de modelagem de nicho associadas a registros geológicos são largamente empregados, porém em Iridaceae tais registros são ainda escassos. Contudo, foi identificada a presença de pólen de *Cypella* na região de Corrientes (Argentina) referente ao Holoceno Médio (PACELLA e LARA, 2019). Esta informação mostra-se importante uma vez que em populações naturais, *H. quareimana* e *Cypella hauthalii* podem ser encontradas em simpatria (Figura 3-F) e também pela ocorrência *H. quareimana* tetraploide em Corrientes (Tabela 5). Considerando-se isso, pode-se dizer que a projeção de *H. quareimana* no Holoceno Médio é congruente com a literatura, uma vez que esta inclui em suas áreas de probabilidade de ocorrência a mesma região descrita por de Pacella e Lara, 2019.

Observando a figura 13 é possível ver que as tetraploides possuem áreas de probabilidade de ocorrência não somente distintas, mas também muito mais abrangentes do que as diploides. De fato, os resultados da tabela 7 evidenciam essa diferença uma vez que entre ploidias os modelos são extremamente distintos. Esses resultados estão de acordo com alguns estudos que indicam que pode haver diferença de nicho e/ou aumento da tolerância ambiental por poliploides em relação aos diploides (MUÑOZ-PAJARES *et al.*, 2018; BANIAGA *et al.*, 2019; CASTRO *et al.*, 2020; DECANter *et al.*, 2020; KIEDRZYŃSKI *et al.*, 2021).

Um estudo publicado por Duchoslav e colaboradores em 2020 pontua ainda que o aumento da tolerância ambiental em poliploides pode ser seguido por uma subsequente contração de nicho. Ao estudarem seis citótipos ($3x$, $4x$, $5x$, $6x$, $7x$ e $8x$) de *Allium oleraceum* L. eles encontraram tanto inovação quanto expansão de nicho do tetraploide em relação ao triploide. Entretanto, níveis mais altos de ploidia mostraram quase zero expansão de nicho. Isso foi causado por uma contração dos envelopes de nicho em direção à menor continentalidade do clima e resultou em uma diminuição gradual da amplitude do nicho.

Embora a poliploidia possa levar à maior tolerância ambiental em relação aos diploides e ocupação de novos nichos, essa não é uma regra (GLENNON *et al.*, 2014). Um estudo com a tribo Potentilleae (Rosaceae) demonstrou que as transições para níveis maiores de ploidia estão, na verdade, associadas a tamanho e amplitude ecológica reduzidos (BRITTINGHAM *et al.*, 2018). Em *H. lahue*, por exemplo, é possível encontrar cada um dos três citótipos ($2x$, $6x$ e $8x$) ocorrendo isoladamente, bem como em simpatria. Ao proceder a modelagem de nicho, foi constatado que os citótipos possuem nichos equivalentes, mas não semelhantes ou sobrepostos (TONETTO-VIEIRA, A., dados não publicados).

A diferença de nicho observada entre diploides e tetraploides de *H. quareimana* é reiterada ao examinar-se a tabela 8. Das seis variáveis bioclimáticas analisadas, três apresentam sobreposição de valores, são elas BIO5 (temperatura máxima do mês mais quente), BIO6 (temperatura mínima do mês mais frio) e BIO12 (precipitação anual). No caso das variáveis BIO5 e BIO6, apesar de haver sobreposição das faixas de temperatura, em ambas variáveis a faixa é maior nas tetraploides, o que parece indicar que plantas tetraploides de *H. quareimana* estariam aptas a ocupar ambientes mais extremos (maior tolerância ambiental) que as diploides. Em outras palavras, a tetraploide de *H. quareimana* parece apta a habitar ambientes com maior amplitude térmica do que a diploide.

No presente estudo não foram estimadas projeções para o futuro em *H. quareimana*, contudo, Pinho e colaboradores (2020) publicaram um estudo a respeito da resiliência dos biomas brasileiros frente às mudanças climáticas. Nesse artigo, eles definem a resiliência (limiares de transição ecossistêmicos pelos quais habitats conseguem se estruturar perante perturbações externas) do Pampa: temperatura de 18 a 22°C e precipitação anual de 1.100 a 2.000 ml. As projeções foram feitas para quatro cenários, sendo o último o fim do século (2070 a 2099). Os valores das variáveis bioclimáticas extraídos dos pontos utilizados para a modelagem de nicho de *H. quareimana* estão dentro da faixa de valores de resiliência

calculados por Pinho e colaboradores, 2020. Ou seja, se apenas essas variáveis fossem necessárias para garantir a manutenção das populações de *H. quareimana*, a espécie poderia passar por essas mudanças climáticas sem maiores problemas. Além do fato das variáveis bioclimáticas de *H. quareimana* se encontrarem dentro da faixa de resiliência proposta no artigo, a projeção dos modelos mostra uma tendência das áreas de probabilidade de ocorrência de *H. quareimana* moverem-se em direção ao Sul. Contudo, existe a possibilidade de que a contração do bioma seja rápida demais para que a espécie acompanhe essas mudanças, sem mencionar que esses não são os únicos fatores que impactam a distribuição do taxa. Na verdade, há uma tendência de aumento da vulnerabilidade às mudanças climáticas no Pampa devido às projeções de aumento de temperatura e eventos pluviométricos extremos, o que afetará sua resiliência e capacidade adaptativa (PINHO *et al.*, 2020), colocando em risco todos os organismos que nele vivem.

Em suma, os dados obtidos no presente estudo confirmam que em *H. quareimana* são encontradas populações que apresentam diferenças entre si quanto ao nível de ploidia (número de cromossomos e quantidade de DNA), quanto à morfologia (floral e vegetativa) e ao nicho ambiental por eles ocupado (Figura 14). Os dados apresentados reforçam que há uma relação entre o nível de ploidia e o fenótipo, corroborando a percepção de que a poliploidia pode contribuir com maior diversidade fenotípica em populações naturais (CHANSLER *et al.*, 2016). As análises morfométricas demonstraram que existem nove caracteres morfológicos florais que podem ser utilizados no reconhecimento dos dois citótipos de *H. quareimana* e que dois conjuntos fenéticos inteiramente distintos foram formados através da análise multivariada (Figura 12). Através da modelagem de nicho foi possível identificar que existe variação intraespecífica no nicho climático em *H. quareimana*: diploides e tetraploides não compartilham áreas de probabilidade de ocorrência, suportando a hipótese de divergência de nicho entre citótipos (CHANSLER *et al.*, 2016; MASTIN *et al.*, 2018; DECANter *et al.*, 2020).

Estudos que investigam os efeitos da poliploidia em um contexto integrativo estão tornando-se representativos. Em *Erysimum mediohispanicum* Polatschek (Brassicaceae) indivíduos diploides e tetraploides apresentam nichos diferentes, nos quais a precipitação foi maior nas regiões ocupadas por indivíduos tetraploides, que apresentam tubos de corola mais largos e caules mais finos, porém mais altos que os diploides (MUÑOZ-PAJARES *et al.*, 2018). Em *Campanula rotundifolia* L. (Campanulaceae) foi investigado como a diferenciação

morfológica e ambiental poderiam atuar como barreiras reprodutivas pré-zigóticas utilizando três citótipos ($2x$, $4x$ e $6x$) da espécie (ŠEMBEROVÁ *et al.*, 2021). Diploides apresentaram o nicho ambiental mais amplo, enquanto os hexaploides apresentaram nicho menor e especializado. Houve também diferença morfológica: enquanto a morfologia da folha e da parte aérea foi influenciada pelas condições ambientais e poliploidia, a morfologia da flor dependeu exclusivamente do citótipo. Além disso, diploides e poliploides apresentaram isolamento pós-zigótico. Por outro lado, foi verificado que entre os poliploides a mudança de nicho ambiental é essencial para o isolamento reprodutivo (ŠEMBEROVÁ *et al.*, 2021).

Durante a coleta de 2019 os indivíduos encontrados na região das Missões apresentavam cápsulas, o que quase não ocorreu com os tetraploides. Essa observação inicial poderia estar indicando uma diferença no tempo de floração e maturação dos citótipos. Essa condição foi reportada em *Arabidopsis thaliana* ao comparar diploides com tetra, hexa e octaploides (CORNEILLIE *et al.*, 2019). Dentro do gênero, os citótipos de *H. lahue* apresentam diferenças quanto a algumas características das sementes, requerimentos ecofisiológicos, tempo de floração e também no timer de abertura/fechamento das flores (diploides abrem antes das poliploides) (MARTINS *et al.*, 2021; TONETTO-VIEIRA, A., dados não publicados).

A segregação temporal entre indivíduos de diferentes níveis de ploidia, pode resultar no isolamento reprodutivo de linhagens e em sua especiação. Variações em traços florais, na fenologia, bem como diferenças nos níveis de autocompatibilidade já foram observadas por nossa equipe em espécies de Iridaceae. Assim, uma investigação mais cuidadosa da fenologia floral é fundamental para avaliar seu possível impacto na separação citótipos. Experimentos de biologia reprodutiva são necessários para verificar se existe isolamento reprodutivo entre os citótipos. Os tetraploides de *H. quareimana* são auto-incompatíveis e, portanto, alógamos (STIEHL-ALVES *et al.*, 2017). É necessário também determinar o modo de reprodução do citótipo diploide, bem como investigar se existem polinizadores associados à sua reprodução. Estudos preliminares indicam que, assim como o citótipo tetraploide, o citótipo diploide apresenta polinização cruzada, é auto-incompatível e necessita de vetores para a polinização. Análises adicionais de fenologia e biologia reprodutiva são necessárias para responder essas questões que ficaram em aberto a respeito de *H. quareimana*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Nesse estudo, uma combinação de abordagens foi utilizada para entender melhor *H. quareimana* sendo gerados dados novos que poderão auxiliar na compreensão da evolução do gênero *Herbertia*. As abordagens utilizadas responderam às perguntas iniciais do estudo, permitiram determinar um novo citótipo para a espécie e também evidenciaram que o nível de ploidia impacta a morfologia e adequabilidade ecológica dos organismos.

Estudos citogenéticos adicionais são necessários para inclusão das demais populações coletadas e que, em virtude da pandemia, não foram contempladas a tempo da finalização da dissertação. Esse material encontra-se fixado e armazenado no laboratório estando disponível para análises não somente quanto à determinação de números cromossômicos, como para estudos cariotípicos convencionais e hibridização *in situ*. É necessário que se otimize o protocolo de citometria e que análises adicionais sejam realizadas para inclusão de novas populações e assim confirmar os tamanhos de genoma de ambos os citótipos, além de confrontar com os dados presentes na literatura.

Uma vez que é confirmada a existência de um novo citótipo para a espécie e este difere do previamente descrito, é necessário que se faça a descrição formal desse novo citótipo diploide, bem como a confecção de uma chave dicotômica para identificá-los. É importante também que sejam realizados estudos de morfometria geométrica pois eles podem trazer caracteres adicionais úteis para a descrição dos citótipos.

Tendo conhecimento a respeito das áreas de probabilidade de ocorrência, tanto para os citótipos quanto para a espécie, essas informações podem ser úteis como subsídio em uma futura atualização de status de conservação da espécie.

REFERÊNCIAS

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

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

PMID: 33362819; PMCID: PMC7755979.

- Eggers, L. (2020) *Herbertia* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB36338>>. Acesso em: 19 nov. 2021.
- Eggers, L.; Chauveau, O. (2020) *Calydorea* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB36309>>. Acesso em: 25 nov. 2021.
- Eggers, L.; Gil, A.S.B.; Inácio, C.D.; Lovo, J.; Pastori, T.; Hall, C.F.; Damasceno, R.G.L.; Chauveau, O. (2020) Iridaceae in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB136>>. Acesso em: 23 nov. 2021.
- Eng WH e Ho WS (2019) Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review. *Scient Hortic* 246:604–617. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.010>.
- Erst AS, Sukhorukov AP, Mitrenina EYu, Skaptsov MV, Kostikova VA, Chernisheva OA, Troshkina V, Kushunina M, Krivenko DA, Ikeda H, Xiang K, Wang W (2020) An integrative taxonomic approach reveals a new species of *Eranthis* (Ranunculaceae) in North Asia. *PhytoKeys* 140: 75-100. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.140.49048>.
- Fachinetto, J., Kaltchuk-Santos, E., Dellanese Inácio, C., Eggers, L. and de Souza-Chies, T.T. (2018) Multidisciplinary approaches for species delimitation in *Sisyrinchium* (Iridaceae). *Plant Species Biol.*, 33: 3-15. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12181>.
- Fawcett JA, Maerea S, Van de Peer Y. (2009) Plants with double genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous–Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106:5737–5742.
- Flores-Tolentino, Mayra, Ortiz, Enrique, e Villaseñor, José Luis. (2019). Ecological niche models as a tool for estimating the distribution of plant communities. *Revista mexicana de biodiversidad*, 90, e902829. Epub 09 de septiembre de 2019. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2829>.
- GBIF.org (19 de Agosto de 2021) GBIF Occurrence Download <https://doi.org/10.15468/dl.rp7yau>.
- Gils, H., Conti, F., Ciaschetti, G., e Westinga, E. (2012). Fine resolution distribution modelling of endemics in Majella National Park, Central Italy. *Plant Biosystems - PLANT BIOSYST.* 146. 276-287. [10.1080/11263504.2012.685194](https://doi.org/10.1080/11263504.2012.685194).
- Glennon, K. L., Ritchie, M. E., e Segreaves, K. A. (2014). Evidence for shared broad-scale climatic niches of diploid and polyploid plants. *Ecology Letters*, 17, 574– 582. <https://doi.org/10.1111/ele.12259>.
- Glimn-Lacy, J., Kaufman, P.B., (2006) *Botany Illustrated: Introduction to Plants, Major Groups Flowering Plant Families*. Springer.
- Goldblatt P (1982) Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of Neotropical Iridaceae. *Syst Bot* 7:186-198.
- Goldblatt P and Takei M (1997) Chromosome cytology of Iridaceae – patterns of variation,

- determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84:285–204.
- Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, Davies TJ, Manning JC, Van Der Bank M and Savolainen V (2008) Iridaceae ‘Out of Australasia’? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. *Syst Bot* 33:495-508.
- Goldblatt, P. (1990) Phylogeny and Classification of Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 77, No. 4, pp. 607-627. Missouri Botanical Garden Press. <https://www.jstor.org/stable/2399667>.
- Goldblatt, P., Walbot, V., e Zimmer, E. A. (1984). Estimation of Genome Size (C-Value) in Iridaceae by Cytophotometry. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 71(1), 176–180. <https://doi.org/10.2307/2399061>.
- Goldblatt, P.; Manning, J. C. (2008) *The Iris Family: Natural History e Classification*. [s.l.] : Timber Press.
- Guerra, M (1988) Introdução a Citogenética Geral. In: Guerra M (eds) *Heterocromatina e Bandeamento Cromossômico*. Guanabara, Rio de Janeiro, pp. 24-35.
- Guerra, M. (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet Genome Res*;120:339-350. doi: 10.1159/000121083.
- Guerra, M. (2012) Cytotaxonomy: The end of childhood, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 146:3, 703-710, DOI: 10.1080/11263504.2012.717973.
- Haider, Nadia. (2018) A Brief Review on Plant Taxonomy and its Components, *Jour Pl Sci Res* 34 (2) 275-290.
- Harrell, F.E., Lee, K.L. e Mark, D.B. (1996) Tutorial in biostatistics multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Statistics in medicine*, 15, 361–387.
- Hijmans, R., Cameron, S., Parra, J., Jones, P., Jarvis, A., (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. (25). , pp. 1965–1978.
- Huang, BH., Huang, CW., Huang, CL. et al. (2017) Continuation of the genetic divergence of ecological speciation by spatial environmental heterogeneity in island endemic plants. *Sci Rep* 7, 5465. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05900-1>.
- Ilia J. Leitch, Michael D. Bennett, (1997). Polyploidy in angiosperms, *Trends in Plant Science*, Volume 2, Issue 12. Pages 470-476, ISSN 1360-1385, [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01154-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01154-0).
- Japkowicz, N., e Stephen, S. (2002). The class imbalance problem: A systematic study. *Intelligent data analysis*, 6(5), 429-449.
- Jeffery NW, Hultgren K, Chak ST, Gregory TR, Rubenstein DR. Patterns of genome size variation in snapping shrimp. *Genome*. 2016 Jun;59(6):393-402. doi: 10.1139/gen-2015-0206. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27171678.
- Jiao et al (2011) Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature* doi:10.1038/nature09916.

- Julie Josse, Francois Husson (2016). missMDA: A Package for Handling Missing Values in Multivariate Data Analysis. *Journal of Statistical Software*, 70(1), 1-31. doi:10.18637/jss.v070.i01.
- Kapur, J. N., Sahoo, P. K., e Wong, A. K. C. (1985). A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing*, 29(3), 273–285. doi:10.1016/0734-189x(85)90125-2.
- Keeler, K.H. and Davis, G.A. (1999), Comparison of common cytotypes of *Andropogon gerardii* (Andropogoneae, Poaceae). *Am. J. Bot.*, 86: 974-979. <https://doi.org/10.2307/2656614>.
- Kenton A and Heywood CA (1984) Cytological studies in South American Iridaceae. *Plant Systematics and Evolution* 146: 87–104.
- Kenton A and Rudall P (1987) An unusual case of complex-heterozygosity in *Gelasine azurea* (Iridaceae), and ITS implications for reproductive biology. *Evol Trends Plants* 1:95-103.
- Kenton A, Dickie JB, Langton DH, Bennett MD. (1990) Nuclear DNA amount and karyotype symmetry in *Cypella* and *Hesperoxiphion* (Tigridieae: Iridaceae). *Evolutionary Trends in Plants* 4: 59–69.
- Kenton, A., e Heywood, C. A. (1984). Cytological Studies in South American Iridaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 146(1/2), 87–104. <http://www.jstor.org/stable/23670124>.
- Kiedrzyński, M., Ziełńska, K.M., Jedrzejczyk, I. et al. (2021) Tetraploids expanded beyond the mountain niche of their diploid ancestors in the mixed-ploidy grass *Festuca amethystina* L.. *Sci Rep* 11, 18735. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97767-6>.
- Kolarčík, Vladislav e Vašková, D. e Mirková, M. e Mártonfi, Pavol. (2019). Pollen morphology in natural diploid–polyploid hybridogeneous complex of the genus *Onosma* (Boraginaceae–Lithospermeae). *Plant Systematics and Evolution*. 305. 10.1007/s00606-018-1559-3.
- Kushwah, Kalyan & Verma, Rakesh & Patel, Sapan & Jain, NK. (2018). Colchicine Induced Polyploidy in *Chrysanthemum carinatum* L.. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*. 06. 10.4172/2329-9002.1000193.
- Laport, R.G., Minckley, R.L., Ramsey, J., (2012) Phylogeny and cytogeography of the North American creosote bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae). *Syst. Bot.* 37,153-164.
- Leitch IJ, Johnston E, Pellicer J, Hidalgo O, Bennett MD. 2019. Angiosperm DNA C-values database (release 9.0, Apr 2019) <https://cvalues.science.kew.org/>.
- Lizarazo, M. R. B. (2019). Padrões biogeográficos de Tigridieae (Iridaceae: Iridoideae) na América do Sul e sistemas de polinização. Tese (Doutorado em Botânica). Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Lobo, J. M., Verdú, J. R., & Numa, C. (2006). Environmental and geographical factors affecting the Iberian distribution of flightless *Jekelius* species (Coleoptera: Geotrupidae). *Diversity and Distributions*, 12(2), 179-188.
- Luceño, M., Villaverde, T., Márquez-Corro, J. I., Sánchez-Villegas, R., Maguilla, E., Escudero, M., Jiménez-Mejías, P., Sánchez-Villegas, M., Miguez, M., Benítez-

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

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

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

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

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

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

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