

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**ARIANE TONETTO VIEIRA**

**O PAPEL DA POLIPLOIDIA NA DIVERSIFICAÇÃO E VARIAÇÃO  
INTRAESPECÍFICA DE *Herbertia lahue* (Iridaceae)**

**Porto Alegre  
2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**ARIANE TONETTO VIEIRA**

**O PAPEL DA POLIPLOIDIA NA DIVERSIFICAÇÃO E VARIAÇÃO  
INTRAESPECÍFICA DE *Herbertia lahue* (Iridaceae)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular;

**Orientadora: Profa. Dra.** Eliane Kaltchuk dos Santos

**Co-orientadora: Dra.** Eudes Maria Stiehl Alves

**Porto Alegre  
2023**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Vegetal (Departamento de Genética, IB, UFRGS) e parte no Laboratório de Sistemática Molecular (Departamento de Botânica, IB, UFRGS). Teve como instituições financiadoras: FUNBIO (Fundo Brasileiro Para A Biodiversidade) número 044/2021; UNIVERSAL–MCTI/CNPq processo 425650/2018-9; PROTAX 2020-Chamada CNPq/MCTI/CONFAP-FAPS, FAPERGS número 151211/2021-3 e CNPQ número 441412/2020-3. Bolsa de estudos com financiamento da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil).

Dedico este trabalho à minha família e ao meu noivo por todo companheirismo e apoio.

## AGRADECIMENTOS

É com profunda gratidão que reconheço todas as pessoas que tornaram possível a realização e conclusão desta tese. Cada pessoa desempenhou um papel fundamental para que eu conseguisse chegar até este momento:

Agradeço ao Universo, a Deus, essa grande força divina que permeia a minha existência, por guiar meus passos, iluminar meu caminho e me conceder força e coragem ao longo desta jornada tão desafiadora e difícil. E agradeço a mim mesma por não desistir.

Ao meu noivo William, por seu apoio e encorajamento constante, por todo seu amor e paciência, companheirismo, principalmente em várias madrugadas de estudo. Obrigada por tornar minha vida mais feliz e mais leve.

À minha família, meu pai, meu irmão e meus avós por toda ajuda, durante a minha trajetória acadêmica. Também agradeço aos meus queridos sogros, Isaura e Reni, por todo apoio, por coletarem as plantinhas de *Herbertia lahue* em suas viagens, por sempre me ajudarem nos momentos mais difíceis desde que me mudei para o RS.

À minha orientadora, Eliane Kaltchuk, que não apenas compartilhou seus conhecimentos e orientação, mas também acreditou em mim a cada passo deste estudo. Se não fosse por ela, com certeza eu não teria conseguido terminar essa tese. Obrigada por toda orientação, ensinamento, apoio fundamental, orações e todo carinho.

À minha coorientadora, Eudes Maria Stiehl Alves, pelos ensinamentos em campo, por sua paciência e contribuição ao longo de toda a minha trajetória neste estudo.

Ao Elmo que esteve sempre à disposição para oferecer assistência e apoio em todos os momentos em que precisei.

À professora Tatiana Chies, por toda disponibilidade e disposição em sempre ajudar.

Aos queridos amigos Aléxia, Carol e João, que não apenas me apoiaram emocionalmente, mas também formaram o melhor quarteto de 'rolezeiros do café'. Suas risadas e amizade tornaram essa jornada mais leve e significativa para mim.

Aos queridos amigos José e Drielli por todo apoio e companheirismo durante essa jornada, principalmente durante a pandemia em que achamos que íamos pirar. Longe da nossa família no ES, nós formamos uma família aqui no RS. Obrigada por tudo.

Às minhas amigas Carol e Luana, por todos os momentos no laboratório (e fora dele também), nossas músicas, risadas, histórias, e apoio nessa caminhada que tornou o dia a dia de trabalho e estudo mais leve e divertido.

Aos colegas de campo, Luana, Eudes, Mabel, Alexandre, Japa, Léo, Igor, que me ajudaram nas viagens de campo coletando *Herbertia lahue*, na chuva e no sol quente, assim como nos experimentos de biologia reprodutiva, obrigada por toda ajuda. Ao motorista, Márcio, sempre querido e divertido em nossas viagens de campo.

Aos meus amigos do grupo “Dorime em quarentena”, Ossman, José, João, Aléxia e Drielli, que compartilhamos momentos bons, de sofrência da pós-graduação, risadas, memes, obrigada por vocês estarem comigo nessa jornada.

Às minhas amigas Carol e Mari, um dos melhores presentes foi a amizade de vocês. E por mais distantes fisicamente parece que sempre estamos perto. Obrigada por dividir momentos difíceis e alegres, apoiar umas às outras, e principalmente, os insights que sempre estouram minha cabeça com boas ideias.

À técnica Letícia, porque sempre estive disposta a ajudar e a preparar reagentes, molhar e cuidar bem das plantinhas.

A todos os outros amigos e familiares, cujos nomes são numerosos demais para serem mencionados individualmente. Cada um de vocês teve um papel significativo em minha jornada, e são uma bênção em minha vida.

Às agências financiadoras (FUNBIO, CAPES, CNPq e FAPERGS) e à UFRGS, expresso minha imensa gratidão por fornecerem os recursos necessários para a realização desta tese, demonstrando o compromisso com a formação em uma instituição pública de ensino superior, que é reconhecida por sua excelência em nível nacional.

*“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

*(Albert Einstein)*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO GERAL.....	3
REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
Poliploidia nos Campos Sulinos: implicações evolutivas.....	6
Variabilidade cariotípica e relações evolutivas na família Iridaceae.....	8
O gênero <i>Herbertia</i> Sweet (Tigridieae) como um modelo para o estudo da poliploidia ...	9
Modelagem de nicho.....	11
OBJETIVOS.....	13
OBJETIVO GERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
CAPÍTULO 1.....	14
CAPÍTULO 2.....	22
CAPÍTULO 3.....	62
CAPÍTULO 4.....	93
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	102



## RESUMO

A poliploidia, condição que envolve a presença de mais de dois conjuntos completos de cromossomos no núcleo, é um importante mecanismo na evolução das plantas. Este estudo aborda o papel da poliploidia na variação intraespecífica de *Herbertia lahue* (Iridaceae), uma espécie que exibe diferentes níveis de ploidia (2x, 6x e 8x). Inicialmente, apresentamos, no primeiro capítulo, dados sobre números cromossômicos e tamanho de genoma de *H. lahue*, confirmando a presença dos três citótipos em diversas populações ao longo de sua distribuição geográfica. Esses achados motivaram a investigação das implicações da poliploidia na diversidade morfológica de *H. lahue*, abordada no segundo capítulo, onde estimativas morfométricas baseadas em características florais e de bulbo revelam distintos grupos morfológicos correlacionados aos diferentes níveis de ploidia. No terceiro capítulo, a influência da poliploidia na distribuição geográfica e nas adaptações ecológicas dos citótipos é explorada por meio de modelagem de nicho climático. Os resultados mostram que os citótipos de *H. lahue* exibem nichos semelhantes e equivalentes, com distribuição espacial não aleatória, o que pode ser por influência das variáveis climáticas. Tais variáveis, como temperatura mínima do mês mais frio, temperatura média mensal e precipitação do mês mais chuvoso, desempenham papéis cruciais nas preferências de nicho. Esses achados ressaltam como a poliploidia pode moldar a distribuição ecológica das plantas. No quarto capítulo, dados preliminares sobre os mecanismos reprodutivos entre os citótipos, com intuito de caracterizar o sistema reprodutivo das plantas diploides de *H. lahue* e avaliar a existência de isolamento reprodutivo entre os citótipos. Os diploides mostram ser autoincompatíveis, dependendo da polinização cruzada para reprodução. Em contraste, os poliploides são autocompatíveis, e realizam autopolinização. Os experimentos de polinização manual demonstram que os cruzamentos entre citótipos poliploides resultam em frutos e sementes viáveis, enquanto os cruzamentos entre diploides e poliploides produzem frutos estéreis ou sem sementes. Esses resultados indicam uma barreira reprodutiva entre os citótipos, que podem facilitar sua coexistência em populações naturais simpátricas. Em conclusão, este estudo destaca a relevância da poliploidia na diversificação intraespecífica de *H. lahue*, evidenciando como diferentes níveis de ploidia podem impactar aspectos morfológicos, ecológicos e reprodutivos.

## ABSTRACT

Polyploidy, a condition that involves the presence of more than two complete sets of chromosomes in the nucleus, is an important mechanism in plant evolution. This study addresses the role of polyploidy in the intraspecific variation of *Herbertia lahue* (Iridaceae), a species that exhibits different levels of ploidy (2x, 6x, and 8x). Initially, in the first chapter, we present data on chromosome numbers and genome size of *H. lahue*, confirming the presence of the three cytotypes in different populations throughout its geographic distribution. These findings motivated the investigation of the implications of polyploidy on the morphological diversity of *H. lahue*, covered in the second chapter, where morphometric estimates based on floral and bulb characteristics reveal distinct morphological groups correlated to different ploidy levels. In the third chapter, the influence of polyploidy on the geographic distribution and ecological adaptations of cytotypes is explored through climatic niche modeling. The results show that *H. lahue* cytotypes exhibit similar and equivalent niches, with non-random spatial distribution, which may be due to the influence of climatic variables. Such variables as minimum temperature of the coldest month, average monthly temperature and precipitation of the wettest month play crucial roles in niche preferences. These findings highlight how polyploidy can shape the ecological distribution of plants. In the fourth chapter, preliminary data on the reproductive mechanisms between the cytotypes, to characterize the reproductive system of diploid *H. lahue* plants and evaluate the existence of reproductive isolation between the cytotypes. Diploids are shown to be self-incompatible, depending on cross-pollination for reproduction. In contrast, polyploids are self-compatible and perform self-pollination. Hand pollination experiments demonstrate that crosses between polyploid cytotypes result in viable fruits and seeds, while crosses between diploids and polyploids produce sterile or seedless fruits. These results indicate a reproductive barrier between cytotypes, which may facilitate their coexistence in sympatric natural populations. In conclusion, this study highlights the relevance of polyploidy in the intraspecific diversification of *H. lahue*, highlighting how different ploidy levels can impact morphological, ecological, and reproductive aspects.

## INTRODUÇÃO GERAL

A poliploidia, caracterizada pela presença de mais de dois conjuntos completos de cromossomos por núcleo celular, desempenha um papel significativo na evolução das plantas, sendo um fenômeno onipresente (Soltis et al., 2009). Este fenômeno impacta a dinâmica do genoma em uma única geração, gerando alterações em características morfológicas, fisiológicas, reprodutivas e ecológicas (Ramsey e Schemske, 2002; Van de Peer et al., 2016; Van der Peer et al., 2017; Rice et al., 2019; Rezende et al., 2020). Nas Angiospermas, a poliploidia é evidenciada por diversas duplicações do genoma, indicando sua contribuição para a diversificação (Kellogg, 2016).

A diversidade no nível de ploidia ocorre tanto entre espécies de um mesmo gênero quanto dentro de uma única espécie, formando séries poliploides intraespecíficas (Soltis et al., 2010). Estudos recentes apontaram que mais de 22% das espécies de plantas apresentam polimorfismo citotípico (Rice et al., 2015). Neste contexto destaca-se Iridaceae, uma família de monocotiledôneas da ordem Asparagales extremamente diversa em termos morfológicos e cariológicos e cuja evolução envolveu múltiplos eventos de poliploidia e disploidia (Goldblatt e Takei, 1993; Moraes et al., 2015; Choi et al., 2020).

As espécies de Iridaceae possuem dois centros de diversificação (Goldblatt e Manning 2008), onde o principal está localizado no sul da África, seguido pela região Neotropical. As espécies neotropicais estão representadas por três tribos (Sisyrinchieae, Trimezieae e Tigridieae) das cinco que constituem a subfamília Iridoideae, compreendendo cerca de 42% da riqueza de espécies (Rodriguez e Sytsma 2006; Goldblatt e Manning 2008). No Brasil, a família tem grande representatividade na flora dos biomas Pampa, Mata Atlântica (nos Campos Sulinos) e Cerrado com espécies concentradas especialmente nas regiões Sul e Sudeste.

De acordo com Goldblatt e Manning (2008) a diversidade em termos de número cromossômico, arquitetura cariotípica e conteúdo de DNA, faz com que caracteres citogenéticos sejam especialmente úteis para a delimitação de taxa em Iridaceae (Goldblatt, 1982; Goldblatt e Takei, 1997; Goldblatt e Manning, 2008; De Tulio et al., 2008; Alves et al., 2011; Souza-Chies et al., 2012; Moraes et al., 2015). Dentre os gêneros de Iridaceae, *Herbertia* Sweet (Tigridieae,

Iridaceae) se mostra um modelo bastante interessante para o estudo da poliploidia como um mecanismo evolutivo em ecossistemas campestres, visto que as espécies do gênero são sazonais, perenes, bulbosas e se propagam clonalmente, além de possuírem distintos modos de reprodução e quatro níveis de ploidia documentados na literatura:  $2x$ ,  $4x$ ,  $6x$  e  $8x$  (Winge, 1959; Goldblatt and Takei, 1997; Moreno et al., 2009). O número cromossômico básico em *Herbertia* é  $x = 7$ , e dentre as espécies do gênero, séries poliploides já foram reportadas para *Herbertia lahue* (Molina) Goldblatt ( $2n = 2x = 14$ ,  $2n = 6x = 42$  e  $2n = 8x = 56$ ) e *Herbertia pulchella* Sweet ( $2n = 2x = 14$ ,  $2n = 4x = 28$  e  $2n = 6x = 42$ ), o que desperta um grande interesse nos estudos evolutivos e taxonômicos destas espécies (Goldblatt e Takei, 1997; Moreno et al, 2008; Moraes et al., 2015, Stiehl-Alves et al., 2016).

*Herbertia lahue* apresenta grande semelhança vegetativa com as demais espécies do gênero, sendo possível o reconhecimento das taxa somente pela flor. Por outro lado, em *H. lahue* os caracteres florais tipicamente utilizados para sua diagnose apresentam grande variação (Stiehl-Alves et al., 2016). Esta situação é agravada por descrições antigas, superficiais e pouco informativas das características de *H. lahue*, baseadas em material de herbário (Herbert, 1841). A combinação desses fatores resultou em incertezas taxonômicas e um longo histórico de sinonimização em *H. lahue*, gerando controvérsias. Goldblatt (1977) reconheceu *H. lahue* como três subespécies: *H. lahue* subsp. *lahue*, *H. lahue* subsp. *amoena* (Griseb.) Goldbl. e *H. lahue* subsp. *caerulea* (Herb.) Goldbl. Entretanto, atualmente essa classificação não é mais aceita. Recentemente, Deble (2021) reconheceu *H. lahue* como três espécies segregadas com base na descrição taxonômica de caracteres vegetativos e florais. Por outro lado, esse reconhecimento é questionável, pois ele carece de evidência estatística legitimando a segregação em três espécies. Situações em que a caracterização das taxa é baseada unicamente em morfologia têm tido repercussões importantes na delimitação de *Herbertia*. Assim, é primordial distinguir outras fontes de caracteres que permitam compreender melhor os relacionamentos evolutivos, favorecendo delimitações confiáveis dos limites de espécie.

Ao longo dos anos, intensos esforços de coleta têm sido empregados pelo nosso Grupo de Pesquisas em Iridaceae da Universidade Federal do Rio Grande do Sul a fim de investigar populações das espécies de *Herbertia*. Quanto à *H. lahue*, a ocorrência de plantas diploides foi referida unicamente por Winge (1959), mas nossa equipe identificou populações de plantas morfologicamente afins a *H. lahue*, preliminarmente caracterizadas como diploides ( $2n = 2x = 14$ ) e de polinização cruzada. Este achado reforçou ainda mais a necessidade de análises mais

detalhadas de cada um dos citótipos existentes, caracterizando-os citogeneticamente e morfológicamente. Em vista disso, o primeiro capítulo desta tese tem como objetivo principal apresentar os números cromossômicos de *Herbertia*, especialmente para *H. lahue* em diversas populações visando cobrir a área de distribuição geográfica da espécie.

Além dos esforços de coleta e da determinação dos números cromossômicos foi necessário investigar os caracteres morfológicos que definem os citótipos de *H. lahue*, visto que as populações desta espécie podem incluir indivíduos com ampla variabilidade fenotípica, que presumivelmente compreendem dois ou mais citótipos vivendo em simpatria. Embora os caracteres vegetativos de *H. lahue* sejam muito semelhantes, um estudo anterior demonstrou que os citótipos haploides e octaploides diferem em oito características florais, incluindo comprimento do ovário, tépalas externas e internas, coluna estaminal, anteras e a porção livre dos braços do estilete, bem como largura do estilete externo e tépalas internas (Stiehl-Alves et al., 2016). Embora estes caracteres florais dos citótipos 6x e 8x tenham sido investigados, era necessária uma análise morfométrica com um maior número de caracteres vegetativos e florais de todos os citótipos (2x, 6x e 8x), e assim compreender a extensão da variabilidade morfológica floral e sua possível relação com o nível de ploidia nesta espécie. Nesse sentido, o segundo capítulo desta tese tem como objetivo principal investigar a existência de grupos morfológicos distintos em *H. lahue*, e se tais grupos correspondem aos três citótipos diploide, hexaploide e octaploide.

Após a análise dos caracteres morfológicos e níveis de ploidia em *H. lahue* discutidos no segundo capítulo, surgiu a necessidade de compreender o impacto da poliploidia nos citótipos de *H. lahue*. Além disso, estudos mostraram que as diferenças entre linhagens diploides e poliploides resultam em um cenário evolutivo onde há um diferencial no sucesso dos poliploides em certos contextos ecológicos, geográficos, edáficos e climáticos (Levin, 1975; Glennon et al., 2014; Muñoz-Pajares et al., 2018). Diante do exposto, no terceiro capítulo desta tese busca-se compreender se e como a poliploidia afeta a distribuição geográfica e as preferências de nicho climático dos citótipos de *H. lahue*. Para isso, foram realizadas análises de modelagem de nicho climática.

No quarto capítulo, são apresentados dados preliminares sobre a biologia reprodutiva de *H. lahue* e teve como objetivo responder às perguntas-chaves relacionadas ao isolamento reprodutivo entre os citótipos em áreas de simpatria.

## REFERENCIAL TEÓRICO

## **Poliploidia nos Campos Sulinos: implicações evolutivas**

O termo poliploidia foi cunhado por Winkler em 1916, quando ele gerou os primeiros poliploides artificiais conhecidos a partir de duas espécies da família Solanaceae: *Solanum lycopersicum* L. (tomate) e *Solanum nigrum* L. (erva-moura). No entanto, em 1911, Kuwada sugeriu que a evolução do milho (*Zea mays* L.), uma espécie vegetal de grande interesse econômico e conhecida popularmente, estava ligada à duplicação cromossômica. Essas descobertas marcaram o início do estudo da poliploidia, que continua até os dias atuais. Pesquisadores como Hugo de Vries (1901-1903), Øjvind Winge (1915), Cyril Darlington (1937) e G. Ledyard Stebbins Jr. (1940, 1947) realizaram trabalhos clássicos que estabeleceram os fundamentos do estudo dos poliploides.

Nas angiospermas, a poliploidia desempenhou um papel fundamental na evolução do grupo, sendo considerada um dos principais mecanismos evolutivos envolvidos na diversificação das plantas com flores (Ramsey e Schemske, 2002; Rice et al., 2019). Um evento de poliploidização tem efeitos imediatos e maciços em todo o genoma, resultando em variações como novas combinações alélicas, complexas alterações genéticas e epigenéticas, rearranjos cromossômicos, perda de regiões de DNA, mudanças nos padrões de metilação e ativação de elementos transponíveis (Otto, 2007). Essas mudanças podem levar à neofuncionalização ou subfuncionalização de genes, aumentando a variabilidade fenotípica dos organismos poliploides. Alguns desses novos atributos podem conferir vantagens adaptativas, permitindo a colonização de novos nichos ecológicos e aumentando o potencial invasivo em ambientes extremos (Ramsey e Schemske, 1998, Soltis e Soltis, 2016).

Portanto, a poliploidia é considerada um mecanismo de especiação imediata e simpátrica, uma vez que os poliploides recém-formados podem desenvolver barreiras reprodutivas em relação aos parentais diploides, impedindo o fluxo gênico entre eles (Ramsey e Schemske, 1998; Otto e Whitton, 2000; Ramsey e Schemske, 2002; Rieseberg e Willis, 2007). A formação e o estabelecimento dos poliploides são pontos críticos em sua evolução (Ramsey e Schemske, 1998). Barreiras reprodutivas pós-zigóticas entre indivíduos com diferentes níveis de ploidia podem levar à extinção natural dos poliploides recém-formados, dificultando seu estabelecimento nas comunidades vegetais (Rice et al., 2019). No entanto, linhagens poliploides que apresentam certos atributos reprodutivos, como quebra da autoincompatibilidade resultando em autogamia ou

transição para reprodução assexuada, têm maior facilidade de estabelecimento e manutenção (Otto e Whitton, 2000; Ramsey e Schemske, 2002).

As diferenças fenotípicas entre linhagens diploides e poliploides criam um cenário evolutivo no qual os poliploides podem ter um maior sucesso em certos contextos ecológicos, geográficos, edáficos e climáticos, como aqueles encontrados em ambientes campestres (Rice et al., 2019). Por exemplo, estudos recentes têm mostrado que espécies poliploides são mais comuns em ambientes localizados em altas latitudes, especialmente nas zonas temperadas do hemisfério Norte, bem como em ambientes campestres de altitudes elevadas, como os Andes (Rice et al., 2019). A distribuição espacial dos diferentes citótipos é influenciada por uma série de processos interativos complexos que ocorrem nas populações naturais. Esses processos incluem a origem dos citótipos, taxas de formação, preferências ecológicas, propagação vegetativa, apomixia, habilidades competitivas, dispersão e interações reprodutivas entre os citótipos (Levin, 2002). Para que um poliploide se estabeleça na natureza, é necessário que ele apresente características reprodutivas e competitivas distintas que o ajudem a superar a desvantagem numérica em relação à população progenitora, resultando na exclusão do citótipo minoritário (Levin, 1975; Fowler e Levin, 1984; Husband, 2000; Levin, 2002). Em muitos complexos poliploides, as diferenças nas características permitem que os indivíduos poliploides cresçam e/ou colonizem habitats diferentes dos seus parentais, levando à segregação espacial (Balao et al., 2009; Kolář et al., 2009; Glennon et al., 2012). Uma das características que desempenha um papel significativo nessa segregação espacial é a capacidade dos poliploides lidarem com condições mais estressantes. Estudos sugerem que os poliploides possuem maior tolerância a baixos níveis de nutrientes, seca e temperaturas frias (Levin, 2002; Maherali et al., 2009; Hao et al., 2013; Thompson et al., 2014). Assim, o estabelecimento bem-sucedido de linhagens poliploides está associado à divergência de nicho ou ao particionamento de nicho, ou seja, eles ocupam nichos ecológicos diferentes dos seus parentais (Levin, 1975; Glennon et al., 2014; Thompson et al., 2014; Muñoz-Pajares et al., 2018).

Os Campos Sulinos são formações campestres localizadas em regiões de clima subtropical e possuem características peculiares. Embora a presença de espécies poliploides seja menos expressiva em comparação com as zonas temperadas, ela ainda é relevante nesses ecossistemas (Iganci et al., 2011; Fregonezi et al., 2013; Iganci et al., 2013; Barros et al., 2015; Andrade et al., 2019). Essa região é conhecida mundialmente pela sua extraordinária biodiversidade, abrigando uma flora única e apresentando muito endemismo de espécies vegetais (Iganci et al., 2011). Os Campos Sulinos são predominantemente compostos por vastas áreas abertas dominadas por

gramíneas e englobam duas ecorregiões distintas: o Pampa e a Mata Atlântica (Overbeck et al., 2007). O Pampa faz parte de uma ampla região de pastagens que se estende até o Uruguai e o centro-leste da Argentina (Soriano et al., 1992; Andrade et al., 2018). Por sua vez, a Mata Atlântica contribui para os Campos Sulinos com a porção sul de seu território, formando um mosaico com as florestas de Araucária presentes na metade norte do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (Overbeck et al., 2007). Essa complexidade da diversidade dos Campos Sulinos tem despertado o interesse dos pesquisadores, que têm buscado compreender a evolução desses ambientes e sua relação com a poliploidia (Iganci et al., 2011). No entanto, até o momento, não existem estudos específicos sobre o papel da poliploidia na biogeografia, adaptação e evolução das plantas nessas regiões.

Uma família de plantas especialmente representativa nos Campos Sulinos é Iridaceae, que é bem representada por espécies poliploides nessa região (Eggers et al., 2015). Investigar a presença e os efeitos da poliploidia nessa família e em outras plantas dos Campos Sulinos seria de grande relevância para a compreensão da evolução desses ecossistemas e para a conservação da diversidade biológica. Assim, apesar da importância das informações sobre a poliploidia no contexto da biogeografia, adaptação e evolução das plantas, ainda são necessárias investigações específicas nas espécies dos Campos Sulinos. Estudos que abordam a viabilidade e fertilidade dos poliploides, o isolamento reprodutivo entre diferentes níveis de ploidia e a caracterização do nicho ecológico desses poliploides contribuirão para um melhor entendimento desse fenômeno e seus efeitos na diversidade vegetal desses ecossistemas únicos. Ademais, é importante considerar que os Campos Sulinos são ecossistemas ameaçados pela conversão de áreas para atividades agrícolas e urbanização. A compreensão dos padrões de poliploidia nessas regiões pode auxiliar na identificação de áreas de alta diversidade genética e endemismo, subsidiando ações de conservação e preservação dessas áreas.

### **Variabilidade cariotípica e relações evolutivas na família Iridaceae**

Iridaceae é uma das famílias de monocotiledôneas mais diversificadas de Asparagales (Angiosperm Phylogeny Group et al., 2016). Esta família inclui cerca de 2.030 espécies de plantas herbáceas de ampla distribuição geográfica. As espécies possuem dois centros de diversificação (Goldblatt e Manning 2008), onde o principal está localizado no sul da África, e a região Neotropical representa o segundo maior. Apesar dos esforços em compreender as relações



evolutivas das tribos da subfamília Iridoideae (Chauveau et al., 2011; 2012; Lovo et al., 2012; Karst e Wilson, 2012; Alves et al., 2011; Inácio et al., 2017; Lovo et al., 2018), as relações filogenéticas dentro de tribos permanecem pouco resolvidas. Existem indícios de que uma parcela substancial das principais subdivisões identificadas dentro de cada tribo de Iridoideae se diversificou rapidamente por influência de alterações na morfologia floral em resultado a adaptações aos polinizadores (Chauveau et al., 2011; 2012). Em Tigridieae, que reúne plantas herbáceas, geófitas e com folhas plicadas, duas linhagens foram identificadas através da análise de caracteres moleculares e foram denominadas de clados A e B (Chauveau et al., 2012). Os principais gêneros do clado A, *Calydorea* Herb. e *Cypella* Herb., não são monofiléticos e estão relacionados a *Herbertia* Sweet, *Nemastylis* Nutt. e aos gêneros monoespecíficos *Onira* Ravenna, *Kelissa* Ravenna, *Catila* Ravenna e *Ainea* Ravenna. A taxonomia deste conjunto é complexa, pois são compartilhadas características semelhantes no hábito vegetativo e diferenças triviais localizadas nas peças florais são utilizadas no estabelecimento de espécies (Chauveau et al. 2012).

A ampla variabilidade cariotípica observada na família, cujos números cromossômicos variam de  $2n = 6$  até  $2n = 230$ , retratam o papel da poliploidia e da disploidia na evolução de Iridaceae e no surgimento de novas espécies. O número básico descrito para a família é  $x = 10$ , entretanto, diversos números cromossômicos secundários são descritos  $x_2 = 9, 8, 7$  e  $5$  (Goldblatt, 1982; Goldblat e Takei, 1997; Goldblatt e Manning, 2008; Alves et al., 2011; Souza-Chies et al., 2012; Moraes et al., 2015). Segundo Goldblatt e Takei (1997), a neopoliploidia é comum nos membros da família ocorrentes no Hemisfério Norte, sendo estimada em torno de 60%. Cerca de 10% das espécies de Iridoideae são poliploides e 10% das demais espécies apresentam tanto populações diploides como poliploides. Neste âmbito, a poliploidia foi importante também na evolução das Iridáceas das Américas do Sul e Central, onde, por exemplo, grande parte das espécies já investigadas da tribo Tigridieae são tetraploides e hexaploides (Goldblatt e Takei, 1997).

### **O gênero *Herbertia* Sweet (Tigridieae) como um modelo para o estudo da poliploidia**

Dentre os gêneros de Iridaceae, *Herbertia* Sweet compreende oito espécies *Herbertia lahue* (Molina) Goldblatt; *Herbertia amabilis* Deble & F. S. Alves; *Herbertia darwinii* Roitman & J.A.Castillo; *Herbertia furcata* (Klatt) Ravenna; *Herbertia pulchella* Sweet; *Herbertia quareimana* Ravenna; *Herbertia tigridioides* (Hicken) Goldblatt; *Herbertia zebrina* Deble.)

(Deble e Alves, 2013) de plantas herbáceas, geófitas, polinizadas por insetos, perenes e sazonais, com poucas folhas, sendo a maioria delas com flores violeta. As espécies apresentam grande semelhança vegetativa, viabilizando o reconhecimento das taxa somente pela flor. Entretanto, *H. darwinii*, *H. lahue*, *H. pulchella* e *H. quareimana* exibem um amplo polimorfismo floral e, apesar dos caracteres florais serem empregados como diagnósticos dentro do gênero, os limites tênues de diferenciação interespecíficas somado ao polimorfismo floral intraespecífico resulta em incertezas taxonômicas (Chauveau et al., 2012).

Situações em que a caracterização das taxa é baseada unicamente em morfologia têm tido repercussões importantes na delimitação de *Herbertia*. Assim, é primordial distinguir outras fontes de caracteres que permitam compreender melhor os relacionamentos evolutivos, favorecendo delimitações confiáveis dos limites de espécies. Essas condições são primordiais para a resolução taxonômica e, conseqüentemente, a conservação das taxa. Nesse sentido, caracteres cariotípicos de *Herbertia* precisam ser investigados, uma vez que estes também têm sido úteis para a elucidação das relações de várias taxa de plantas (Bareka et al., 2008) e são potencialmente informativos em Iridaceae (Goldblatt e Takei, 1997). Tanto as análises cromossômicas tradicionais (coloração convencional e bandeamento) como moleculares (hibridização *in situ* fluorescente) têm sido empregadas com sucesso em várias espécies para investigar relações inter e intraespecíficas e nos estudos evolutivos (Goldblatt e Manning 2008; Tacuatiá et al., 2012, 2016; Burchardt et al., 2018).

A polinização cruzada é bastante comum em Iridaceae, sendo favorecida pela morfologia reprodutiva, com a existência de dicogamia e hercogamia e a presença de elaióforos (estruturas secretoras de óleos para atração de polinizadores) em várias espécies. Em *Herbertia* os tricomas produtores de óleo estão presentes na porção adaxial das tépalas externas e comumente recebem visitas de insetos, principalmente abelhas especializadas na coleta deste recurso (Chauveau et al. 2012). Apesar da representatividade do grupo, poucas são as informações acerca dos aspectos ecológicos do sistema reprodutivo, tais como características florais, experimentos de polinização e identificação de polinizadores. Destacam-se os estudos que avaliaram a radiação dos sistemas de polinização em Iridaceae (Goldblatt e Manning 2006), a evolução das estruturas florais glandulares em tribos da subfamília Iridoideae (Chauveau et al., 2012), caracterização da diversidade genética e fenotípica em plantas 6x e 8x de *H. lahue* por meio de marcadores moleculares e morfometria floral (Stiehl-Alves et al., 2016), e a diversidade de polinizadores, sendo espécies de abelhas coletoras de óleo e abelhas generalistas (Tese Mabel Rocio Báez Lizarazo, 2019 – dados não publicados).

A relação entre poliploidia e biologia reprodutiva é relevante para compreender o estabelecimento de uma linhagem poliploide, uma vez que a duplicação do genoma, como já mencionado brevemente, pode impactar na reprodução de plantas. Comumente, as mudanças incluem: alteração da reprodução sexuada para reprodução assexuada e alterações nos períodos de floração (Levin, 2002). Por isso é relevante compreender os efeitos desses fatores sobre possíveis isolamentos reprodutivos e a manutenção dos poliploides nas populações naturais. Considerando que os citótipos de *H. lahue* se encontram em simpatria em diversas áreas de ocorrência, é importante avaliar a presença de isolamento reprodutivo entre os citótipos.

### **Modelagem de nicho**

O estudo da distribuição geográfica dos citótipos pode fornecer informações importantes sobre a origem e manutenção dos diferentes níveis de ploidia, assim como auxiliar nas questões de diferenciação de nicho ou coexistência (Muñoz-Pajares et al., 2017). A modelagem de nicho ecológico permite uma avaliação quantitativa da divergência ecológica de espécies baseadas nas distribuições geográficas. As abordagens dessa ferramenta também permitem quantificar a sobreposição de nichos e testar hipóteses de divergência ou conservadorismo de nichos ocupados por diferentes taxa com o uso de testes de similaridade e equivalência de nicho (Warren et al. 2008). Uma estratégia integrativa que combina análises citogenéticas e de citometria de fluxo, caracterização do sistema reprodutivo e da morfologia externa dos poliploides, interpretados sob um contexto citogeográfico utilizando técnicas de modelagem de nicho, são potencialmente interessantes para compreender a organização e a evolução destas linhagens em ambientes complexos, como é o caso dos ecossistemas campestres do Sul da América do Sul.

Adicionalmente, o conhecimento quanto à distribuição geográfica de diferentes citótipos diploides e poliploides ocupando nichos ecológicos distintos pode ser útil para inferir mecanismos de evolução poliploide, coexistência e/ou divergência (Castro et al., 2018). As zonas de contato, isto é, áreas contendo dois ou mais citótipos, podem ser considerados laboratórios naturais para se estudar a poliploidia (Castro et al., 2018). Uma série de estudos recentes relacionaram a presença de citótipos poliploides à maior capacidade de expansão geográfica em diversas espécies, associado ou não a mudanças de características reprodutivas funcionais (Visger et al., 2016; Mendonza et al., 2018). No entanto, pouco se sabe sobre como a diversidade de ploidia contribui

para a adaptação e a diferenciação das populações em regiões complexas, como os campos sul-americanos.

Considerando as informações reportadas, fica evidente que *H. lahue* apresenta uma série de características que a tornam um interessante modelo para estudos multidisciplinares focando em análises citogenéticas combinadas a estratégias de modelagem de nicho e estudos reprodutivos.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta tese visa estabelecer um panorama mais claro sobre a poliploidia e seus impactos na diversidade morfológica, reprodutiva e ecológica de *H. lahue*, com investigação centrada na dinâmica evolutiva dos citótipos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Ampliar a amostragem de populações de *H. lahue* ao longo da distribuição nos campos do Sul do Brasil, contribuindo assim para o conhecimento mais abrangente sobre a dimensão da amplitude geográfica;
- b) Identificar e caracterizar e os citótipos de *H. lahue* mediante análises de citogenética convencional e de tamanho de genoma;
- c) Caracterizar *H. lahue* a partir de análises morfométricas, a fim de delimitar os morfotipos e verificar sua relação com os diferentes níveis de ploidia;
- d) Avaliar a diversidade e distribuição de citótipos de *H. lahue* por análise de nicho climático, usando modelagem de nicho ecológico.
- e) Investigar sobre a existência de isolamento reprodutivo entre os três citótipos de *H. lahue*, e compreender sobre a dinâmica de populações simpátricas, por meio de experimentos de biologia reprodutiva.

## **CAPÍTULO 1**

Número cromossômico de espécies do gênero *Herbertia* Sweet

Artigo aceito para publicação na revista **IAPT Chromosome Data in The  
Journal TAXON**

Ariane Tonetto Vieira,<sup>1</sup> Eudes Maria Stiehl-Alves<sup>2</sup>, Caroline Trevelin<sup>3</sup>, Luana Crestani Carvalho<sup>4</sup>, Tatiana T. Souza-Chies<sup>2,4</sup> & Eliane Kaltchuk-Santos<sup>1,3\*</sup>

*1 Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43312, C.P.15053, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil*

*2 Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43433, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil*

*3 Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil*

*4 Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil*

\* Author for correspondence: [eliane.kaltchuk@ufrgs.br](mailto:eliane.kaltchuk@ufrgs.br)

\*New chromosome number (cytotype) for the species.

\*\* First chromosome count from an unexplored part of the distribution area of the taxon.

This research was partially supported by FUNBIO (Fundo Brasileiro Para A Biodiversidade) number 044/2021, and received funding from the CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil). This research also was supported by PROTAX 2020-Chamada CNPq/MCTI/CONFAP-FAPS, FAPERGS number 151211/2021-3, and CNPq numbers 425650/2018-9 and 441412/2020-3. ATV thanks to FUNBIO and CAPES (finance code 001) for the scholarship received. EMSA thanks to CAPES/PNPD for scholarships and Neotropical Grassland Conservancy for grants received. LCC thanks to CAPES for her scholarship. CT thanks to FAPERGS and PROPESQ/UFRGS for her scholarships.

We acknowledge the valuable collaboration of Anderson Melo and Igor Hedlund in field collections. We are also thankful to the laboratory technician Letícia Gal for her help in preparation of reagents for cytogenetic analysis.

## **IRIDACEAE**

**Subfamily:** Iridoideae

**Tribe:** Tigridieae

\*\**Herbertia darwinii* Roitman & J.A.Castillo

2n = 14, CHN. Brazil, Rio Grande do Sul, Alegrete, 29°8'51.0" S 56°01'49.7" W, 131 m, 2 Nov 2021, Tonetto-Vieira A; Nogueira L 5 (ICN).

\*\**Herbertia* aff. *lahue* (Molina) Goldblatt

$2n = 14$ ; Brazil, Rio Grande do Sul, São Jerônimo do Sul, 30° 7'43.03" S 51°51'20.38" W, 38 m, 8 Nov 2018, E. Kaltchuk, E.M. Stiehl-Alves & A. Vieira 5 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, São Jerônimo do Sul, 30°10'48.40" S 51°23'33.29" W, 38m, 16 Nov 2018, E. Kaltchuk, E.M. Stiehl-Alves & A. Vieira 17 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Canguçu, 31°17'0.6" S 53° 2'60.0" W, 376 m, 8 Nov 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira A, L. Carvalho & I. Hedlund 137 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Canguçu, 30°41'37.0" S 53°23'35.0", 376 m, 9 Nov 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira A, L. Carvalho & I. Hedlund 145 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Santana da Boa Vista, 30°45'20.3" S 53°9'15.2" W, 190 m, 10 Nov 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira A, L. Carvalho & I. Hedlund 162 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Lavras do Sul, 30°46'6.1" S 53°55'26.8" W, 418 m, 11 Nov 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira A, L. Carvalho & I. Hedlund 171 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Caçapava do Sul, 30°41'34" S 53°23'32" W, 26 Oct 2018, A.M. Cristante, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira & R. Becker 1 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Caçapava do Sul, 30°53'42" S 53°25'48" W, 27 Oct 2018, A.M. Cristante, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira & R. Becker 2 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Caçapava do Sul, 30°47'58" S 53°11'23" W, 03 Dec 2017, A.M. Cristante, E.M. Stiehl-Alves & R.M. Marchioretto 12 (ICN) [Fig. 1A]

**\*\**Herbertia lahue* (Molina) Goldblatt**

$2n = 42$ , CHN. Brazil, Rio Grande do Sul, São Jerônimo do Sul, 30°7'43.03" S 51°51'20.38", 38 m, 8 Nov 2018, E. Kaltchuk, E.M. Stiehl-Alves & A. Vieira 6 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Santo Antonio das Missões, 28°32'42.17" S 54°33'19.39", 284 m, 23 Oct 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira, L. Carvalho & A. Mello 105 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Santo Antonio das Missões, 28°33'44.4" S 55°9'37.3" W, 284 m, 24 Oct 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira, L. Carvalho & A. Mello 110 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Itaquí, 29°0'22.7" S 56°3'38.7" W, 105 m, 25 Oct 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira, L. Carvalho & A. Mello 117 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Lavras do Sul, 30°46'6.1" S 53°55'26.8" W, 418 m, 11 Nov 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira A, L. Carvalho & I. Hedlund 172 (ICN). [Fig. 1B]

**\*\**Herbertia lahue* (Molina) Goldblatt**

$2n = 56$ , CHN. Brazil, Rio Grande do Sul, São Miguel das Missões, 28°32'42.24" S 54°33'18.93" W, 291 m, 23 Oct 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira, L. Carvalho & A. Mello 104 (ICN).

Brazil, Rio Grande do Sul, São Jerônimo do Sul, 30° 8'55.32" S 51°54'19.94" W, 38 m, 8 Nov 2018, E. Kaltchuk, E.M. Stiehl-Alves & A. Vieira 3 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Santo Antonio das Missões, 28°33'44.4" S 55°9'37.3" W, 284 m, 24 Oct 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira, L. Carvalho & A. Mello 111 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Itaquí, 28°59'50.6" S 56°05'50.00" W, 105 m, 25 Oct 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira, L. Carvalho & A. Mello 115 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Alegrete, 29°50'50.7" S 55°52'12.2" W, 195 m, 26 Oct 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira, L. Carvalho & A. Mello 123 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Cristal, 30°54'35.4" S 52°4'22.4" W, 93 m, 7 Nov 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira A, L. Carvalho & I. Hedlund 129 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Canguçu, 31°21'44.1" S 52°48'25.8" W, 8 Nov 2019, 423 m, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira A, L. Carvalho & I. Hedlund 134 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Caçapava do Sul, 30°49'58.80" S 53°30'14.40" W, 255 m, 9 Nov 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira A, L. Carvalho & I. Hedlund 148 (ICN). Brazil, Rio Grande



do Sul, Santana da Boa Vista, 30°45'20.3" S 53°9'15.2" W, 190 m, 10 Nov 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira A, L. Carvalho & I. Hedlund 161 (ICN) [Fig. 1C].

**\*\**Herbertia pulchella* Sweet**

2n = 28; CHN. Brazil, Rio Grande do Sul, Canguçu, 31°21'48.0" S 52°44'48.0" W, 376 m, 8 Nov 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira A, L. Carvalho & I. Hedlund 133 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Canguçu, 31°16'49.0" S 52°42'04.0" W, 376 m, 8 Nov 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira A, L. Carvalho & I. Hedlund 143 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Caçapava do Sul, 30°49'58.80" S 53°30'14.40" W, 255 m, 9 Nov 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira A, L. Carvalho & I. Hedlund 150 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Santana da Boa Vista, 30°47'58.02" S 53°11'23.96" W, 190 m, 10 Nov 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira A, L. Carvalho & I. Hedlund 165 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Santana do Livramento, 30°46'40.70" S 53°08'27.7" W, 26 Nov 2019, Tonetto-Vieira A; Eggers L; Chauveau O 7 (ICN). [Fig. 1D]

**\**Herbertia* aff. *quareimana* Ravenna**

2n = 14, CHN. Brazil, Rio Grande do Sul, São Nicolau, 28°12'29.52" S 55°19'13.80" W, 95 m, 23 Oct 2019, E.M. Stiehl-Alves, C. Forgiarini & F.S. Silveira 51 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, São Miguel das Missões, 28°32'44.04" S 54°33'14.01" W, 284 m, 23 Oct 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira, L. Carvalho & A. Mello 106 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Santo Antonio das Missões, 28°31'24.01" S 55°14'2.11" W, 24 Oct 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira, L. Carvalho & A. Mello 109 (ICN) [Fig. 1E]

**\*\**Herbertia quareimana* Ravenna**

2n = 28, CHN. Brazil, Rio Grande do Sul, Santana do Livramento, 30°47'16.1" S 55°38'02.8" W, 6 Nov 2012, L. Eggers, O. Chauveau & T. Pastori 1103 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Uruguaiana, 29°53'22.2" S 57°07'16.5" W, 5 Nov 2012, L. Eggers, O. Chauveau & T. Pastori 733A (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Alegrete, 29°51'27.6" S 55°53'6.6" W, 140 m, 26 Oct 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira, L. Carvalho & A. Mello 125 (ICN). Brazil, Rio Grande do Sul, Alegrete, 29°59'2.79" S 55°58'31.6" W, 195 m, 26 Oct 2019, E.M. Stiehl-Alves, A. Tonetto-Vieira, L. Carvalho & A. Mello 126 (ICN). [Fig. 1F].

*Herbertia* is a small genus (eight species) belonging to the Clade A of Tigridaeae (Chauveau et al., 2012), that comprises perennial, herbaceous and bulbous geophytic plants, generally with violet flowers (Goldblatt & Manning, 2008). *Herbertia* species show great vegetative similarity, on the other hand, some have high floral polymorphism. Although floral characters have been used as diagnostics within the genus, tenuous limits of interspecific differentiation and a large intraspecific polymorphism result in taxonomic uncertainties (Chauveau et al., 2012; Stiehl-Alves et al., 2016; Stiehl-Alves et al., 2017). In this sense, karyotypic characters of *Herbertia* need to be investigated, since they have also been useful for elucidating the relationships of various taxa being potentially informative in Iridaceae (Goldblatt & Takei, 1997).

According to literature, Clade A presents as base chromosome number  $x = 7$  and ploidy series in several species (Moraes et al., 2015). Six of the eight recognized *Herbertia* species have chromosome counts with four ploidy levels reported: 2x, 4x, 6x and 8x. Intraspecific polyploid series have been found for *H. lahue* and *H. pulchella* (Winge, 1959; Kenton & Heywood, 1984; Goldblatt & Takei, 1997; Roitman & Castillo, 2004; Moreno et al., 2009; Moraes et al., 2015).

*Herbertia* occurs naturally in grasslands in the south of the Neotropical region (Goldblatt & Manning, 2008), with seven species endemics to the northeast of Pampean province. The Pampean province (hereafter Pampas) is part of the Chacoan biogeographical domain (Morrone, 2017) and is a species-rich ecosystem characterized by a predominance of grassland vegetation, with Poaceae, Asteraceae, Fabaceae, and Cyperaceae as the most dominant families (Andrade et al., 2019).

Efforts have been made by our team to delineate a clearer picture of the patterns of geographic distribution and evolutionary relationships of *Herbertia* species and thus understand the impact of polyploidy on the genus evolution. Therefore, cytogenetic data for *Herbertia* have been obtained for several populations throughout the distribution area. For chromosome counting, root tips were pretreated with 8-hydroxyquinoline for 24 hours at 8°C and fixed with 3 : 1 ethanol : glacial acetic acid. Slides were prepared according to Moraes et al. (2015) and Alencar et al. (2018). Chromosomes obtained for the *Herbertia* populations in the present study are represented by the image of the flower of each *Herbertia* species (Fig. 1 A-F).

In the present study, chromosome numbers are presented for 38 populations of four *Herbertia* species: *H. darwinii*, *H. lahue*, *H. pulchella* and *H. quareimana*. Chromosome numbers have been described in the literature for the four species investigated, however such data are ancient and, moreover, taxonomic changes occurred in the genus. Furthermore, the chromosome counts are restricted to a few points of occurrence, most of them outside Brazil. In view of the existence of intraspecific cytotypes for the genus, evaluations of a greater number of populations are necessary.

*Herbertia darwinii* is an endemic species of the Pampas distributed along the triple border of Brazil, Argentina, and Uruguay, in an area of less than 40,000km<sup>2</sup>. The chromosome number  $2n = 14$  found here for one population of *H. darwinii* is the same reported previously in samples from another four populations of this species (Roitman & Castillo, 2004; Moreno et al., 2009; Moraes et al., 2015). So far, only diploid plants have been found for this species, even in populations located outermost of the geographic distribution of the species.

*Herbertia lahue* is the only one with a wide distribution, occurring throughout the Pampas and on the borders with Chaco province (Chacoan dominion), Araucaria Forest province (Paraná dominion), and Atacama province (part of South American transition zone). There are also records of populations of *H. lahue* in the southern USA, Australia, and Japan, but it seems to represent recent introductions (Goldblatt & Manning, 2008). Twenty-three populations of *H. lahue* sampled in southern Brazil were investigated. The cytotype ( $2n = 2x = 14$ ) was found in samples from nine populations named *H. aff. lahue*. Other cytotypes previously reported for *H. lahue* were also observed in the present study, and hexaploids ( $2n = 6x = 42$ ) and octoploids ( $2n = 8x = 56$ ) were recorded respectively in five and nine populations. The chromosome number  $2n = 42$  was previously reported in samples from Argentina (Moreno et al., 2009), Brazil (Moraes et al., 2015), Chile (Kenton & Heywood, 1984; Goldblatt & Takei, 1997), and Uruguay (Moreno et al., 2009), whereas the chromosome number  $2n = 56$  was also previously reported in populations from Argentina (Moreno et al., 2009) and Brazil (Moraes et al., 2015). The spatial distribution of *H. lahue* populations in the Pampas is complex, ranging from mixed populations, where the three ploidy levels are found in sympatry, as well as parapatric and allopatric distributed populations (Stiehl-Alves et al., 2016; Martins et al., 2020).

*Herbertia pulchella* is a species that is distributed in an area of about 100,000 km<sup>2</sup> located in southern Brazil and Uruguay, in the Pampas. In this study, seven populations of *H. pulchella* were studied and a chromosome number  $2n = 28$  was recorded for all samples. Chromosome number  $2n = 28$  was also described by Moraes et al. (2015) in samples from four populations from Rio Grande do Sul (Brazil). Older studies (Winge, 1956; Kenton & Heywood, 1984; Goldblatt & Takey, 1997) reported other chromosome numbers for this species ( $2n = 14$  and  $2n = 42$ ), which has motivated us to expand the sampling of this species to search for populations unequivocally identified as *H. pulchella*. Despite the effort, only tetraploid plants are being registered.

*Herbertia quareimana* is a species endemic to the Pampas, near the border of Brazil with Argentina and Uruguay, covering an area of about 48,000 km<sup>2</sup>. Seven populations of *H. quareimana* sampled in Rio Grande do Sul (Brazil) were investigated here, and three of them presented chromosome number  $2n = 2x = 14$ . This is the first report of diploid cytotype for *H. quareimana*. The remaining four populations had  $2n = 4x = 28$ . Tetraploid *H. quareimana* was also reported for other Brazilian populations by Ravenna (1989) and Moraes et al. (2015), as well as for populations located in Argentina and Uruguay (Moreno et al., 2009). Geographic data obtained through collection expeditions carried out by our time since 2006 indicate that diploid and tetraploid populations are geographically isolated from each other.

## LITERATURE CITED

- Alencar, J.M.L., Kaltchuk-Santos, E., Fachinetto, J., Tacuatiá, L.O., Forni-Martins, E.R., Stiehl-Alves, E.M., Souza-Chies, T.T. 2018. Genetic and ecological niche modeling of *Calydorea crocoides* (Iridaceae): An endemic species of Subtropical Highland Grasslands. *Genetics and Molecular Biology* 41: 327–340. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0078>
- Andrade, B.O., Bonilha, C.L., Overbeck, G.E., Vélez-Martin, E., Rolim, R.G., Bordignon, S.A.L., Schneider, A.A., Vogel-Ely, C., Lucas, D.B., Garcia, E.N., Santos, E.D., Torchelsen, F.P., Vieira, M.S., Silva-Filho, P.J.S., Ferreira, P.M.A., Trevisan, R., Hollas, R., Campestrini, S., Pillar, V.D., Boldrini, I.I. 2019. Classification of South Brazilian grasslands: Implications for conservation. *Applied Vegetation Science* 22: 168–184. <https://doi.org/10.1111/avsc.12413>
- Chauveau, O., Eggers, L., Souza-Chies, T.T., Nadot, S. 2012. Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera. *Annals of Botany* 110: 713–729. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs134>
- Goldblatt, P., Manning, J.C. 2008. The Iris family: natural history and classification. *Timber Press*.
- Goldblatt, P., Manning, J.C. 2008. *Sisyrinchium* Linnaeus. The Iris family – natural history and classification. *Portland: Timber Press* 1: 221–224

- Goldblatt, P., Takei, M.** 1997. Chromosome cytology of Iridaceae – patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 285–204. <https://doi.org/10.2307/2400005>
- Kenton, A., Heywood, C.A.** 1984. Cytological studies in South American Iridaceae. *Plant Systematics and Evolution* 146: 87–104. <https://doi.org/10.1007/BF00984056>
- Martins, A.C., Marchioretto, R.M., Vieira, A.T., Stiehl-Alves, E.M., Santos, E.K.D., Souza-Chies, T.T.** 2020. Seed traits of species from South Brazilian grasslands with contrasting distribution. *Acta Botanica Brasilica*, 34: 730-745. <https://doi.org/10.1590/0102-33062020abb0012>
- Moraes, A.P., Souza-Chies, T.T., Stiehl-Alves, E.M., Burchardt, P., Eggers, L., Siljak-Yakovlev, S., Brown, S.C., Chauveau, O., Nadot, S., Bourge, M., Viccini, L.F., Kaltchuk-Santos, E.** 2015. Evolution trends in Iridaceae: new cytogenetic findings from the New World. *Bot J Linn Soc* 177: 27–49. <http://dx.doi.org/10.1111/boj.12232>
- Moreno, N.M., Peñas, L.L., Bernardello, G., Roitman, G.** 2009. Cytogenetic studies in *Herbertia* Sw. (Iridaceae). *Caryologia* 62: 37–42. <https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589664>
- Morrone, J. J.** 2017. Neotropical biogeography: regionalization and evolution. *CRC Press*. <https://doi.org/10.1201/b21824>
- Roitman, G.G.; Castillo, A.** (2004). A new species, *Herbertia crosae* (Iridaceae), from Uruguay. *Brittonia*, 56: 361–364. [https://doi.org/10.1663/0007-196X\(2004\)056\[0361:ANSHCI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0007-196X(2004)056[0361:ANSHCI]2.0.CO;2)
- Stiehl-Alves E.M.; Flores A.M.; Silvério A., Heck J.; Eggers L.; Kaltchuk-Santos E.; Mariath J.E.A.; Souza-Chies T.T.** 2016. Differentiation between two self-compatible cytotypes of *Herbertia lahue* (Iridaceae): evidence from genotypic and phenotypic variation. *Plant Syst Evol* 302:669–682. doi: [10.1007/s00606-016-1297-3](https://doi.org/10.1007/s00606-016-1297-3)
- Stiehl-Alves E.M.; Kaltchuk-Santos E.; Eggers L.; Souza-Chies T.T.** 2017. Using a population genetics approach for a preliminary investigation concerning species boundaries in *Herbertia* (Iridaceae). *Int J Plant Sci* 178: 439–449. doi: [10.1086/692014](https://doi.org/10.1086/692014)
- Winge, H.** 1959. Studies on cytotaxonomy and polymorphism of the genus *Alophia* (Iridaceae). *Revista Brasileira de Biologia* 19: 195–201.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo central deste estudo foi proporcionar uma compreensão mais aprofundada sobre a poliploidia e seus efeitos na diversidade morfológica, reprodutiva e ecológica de *Herbertia lahue*, com ênfase na dinâmica evolutiva dos citótipos.

Conduzimos uma análise detalhada dos aspectos citogenéticos, morfológicos e ecológicos dos citótipos de *H. lahue*. Confirmamos a existência de três níveis de ploidia na espécie (diploide, hexaploide e octaploide) por meio de análises citogenéticas e de tamanho de genoma. Além disso, identificamos diferenças significativas na morfologia floral e no nicho ecológico entre esses citótipos, demonstrando que a poliploidia desempenha um papel crucial na determinação das preferências de nicho ecológico. exploramos os mecanismos de isolamento reprodutivo e as estratégias de reprodução dos citótipos de *H. lahue*. Constatamos que os diploides são de polinização cruzada e autoincompatíveis, enquanto os poliploides são autocompatíveis e podem realizar autofecundação.

Com base nos resultados, fica claro que a poliploidia desempenha um papel importante na diversidade ecológica e morfológica de *H. lahue*. A existência de múltiplos citótipos com preferências de nicho distintas sugere que a poliploidia é um fator-chave na adaptação da espécie a diferentes ambientes ecológicos. Dentre as análises realizadas, notamos que os diploides exibem um cariótipo bimodal, ao passo que os poliploides apresentam uma redução gradual no tamanho dos cromossomos. A Análise de Componentes Principais (PCA) destaca que o diploide está mais distante em relação ao hexa e octaploides, sendo que o tamanho do genoma mostra uma maior similaridade entre hexa e octaploides do que com o diploide. A sobreposição de nicho também é mais acentuada entre hexa e octaploide, contrastando com o diploide. Resultados de cruzamentos reforçam a tendência, indicando que sempre que os indivíduos diploides estavam envolvidos, não ocorria a formação de frutos, ao passo que entre os citótipos poliploides, hexa e octaploides, o processo ocorria normalmente.

A ausência de frutos nos cruzamentos envolvendo diploides sugere a existência de barreiras reprodutivas, levantando questionamentos sobre a natureza dessas diferenças. Esses resultados são consistentes com a expectativa para poliploides, visto que a formação de híbridos entre diferentes níveis de ploidia pode ser dificultada. A formação de poliploides pode ocorrer por eventos como a duplicação cromossômica, e sua persistência na população pode ser influenciada por fatores como competição e adaptação a diferentes nichos ecológicos.

Um fator que intriga é o fato de não ter sido encontrada plantas tetraploides em *H. Lahue*. A análise da tetraploide, excluindo possibilidade de aloploiploides (cruzamentos interespecíficos), sugere a possibilidade de citótipos minoritários que podem surgir e desaparecer ao longo do tempo.

Considerando a diploide como possivelmente outra espécie, focando exclusivamente no autopoliplóide, o desaparecimento desses citótipos pode ser atribuído à menor competitividade em comparação com os poliploides. Este é um assunto que precisa ser explorado em estudos futuros.

Considerando esses resultados, emerge a possibilidade de duas espécies diferentes ou uma única espécie em estágio avançado de especiação em *H. lahue*. Estudos futuros envolvendo conceitos de espécie, como morfoespécie e biológico, bem como incorporar análises de DNA, poderia enriquecer a discussão, explorando a literatura pertinente para embasar essas ponderações.

Em resumo, esta pesquisa avança nosso entendimento sobre os efeitos da poliploidia na diversidade biológica e fornece informações valiosas sobre a dinâmica evolutiva de *H. lahue*. Ao revelar como a poliploidia molda a morfologia, a ecologia e os mecanismos reprodutivos desta espécie, nossa pesquisa destaca a importância de considerar a poliploidia como um fator central na evolução das plantas. Esperamos que este estudo estimule novas pesquisas e promova uma apreciação mais profunda das complexidades da biologia evolutiva.