UNIVERSITE PARIS-SUD – UFR des Sciences

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DU VEGETAL (ED 145)

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD

Par

Luana Olinda TACUATIÁ

La variabilité génétique et cytogénétique et les aspects de la biologie de la reproduction chez *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae) dans le sud du Brésil

Soutenance le 28 septembre 2012 devant le juri d´examen :

Fernanda BERED	**Professeur, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**	**Examinateur**
Olivier CHAUVEAU	**Docteur, Université de Paris Sud**	**Examinateur**
Eliana FORNI- MARTINS	**Professeur, Universidade Estadual de Campinas**	**Rapporteur**
Tatiana Teixeira de SOUZA- CHIES	**Professeur, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**	**Directeur de thèse**
Sonja SILJAK-YAKOVLEV	**Professeur, Université de Paris Sud**	**Directeur de thèse**
Joan VALLES	**Professeur, Universitat de Barcelona**	**Rapporteur**
Maria Imaculada ZUCCHI	**Professeur, Universidade Estadual de Campinas**	**Examinateur**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

VARIABILIDADE GENÉTICA E CITOGENÉTICA E ASPECTOS DA BIOLOGIA REPRODUTIVA DE *SISYRINCHIUM MICRANTHUM* CAV. (IRIDACEAE) NO SUL DO BRASIL

Luana Olinda Tacuatiá

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Teixeira de Souza Chies
Co-orientadora: Prof. Dra. Sonja Siljak Yakovlev
Co-orientadora: Prof. Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos

Porto Alegre, setembro de 2012

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Citogenética Vegetal do Departamento de Genética e Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, BR, no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, BR, e no laboratório de *Ecologie, Systématique et Evolution* da *Université Paris XI*, Orsay, FR. O projeto foi subvencionado pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Projeto no. 477533/2009-4), pelo programa de cooperação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e Comité Français d'Evaluation de La Cooperation Universitaire avec le Brésil (CAPES-COFECUB, Projeto no. 550/07). A doutoranda obteve bolsa do CNPq (30 meses) e do CAPES-COFECUB (18 meses).

Dedico este trabalho à minha família e aos amigos que me ajudaram a rir dos devaneios de doutoranda.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Tatiana Teixeira de Souza Chies, que me orienta desde 2006, quando iniciei no programa de Pós-Gradução em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como aluna de Mestrado. Agradeço pela orientação, pelas várias oportunidades de pesquisa disponibilizadas ao longo do Mestrado e do Doutorado e pela credibilidade e confiança em meu trabalho. Também não poderia deixar de agradecer pela paciência e pela compreensão. Sou muito grata e feliz por ter tido a possibilidade de trabalhar com uma pessoa com tamanho profissionalismo.

A Profa. Dra. Sonja Siljak Yakovlev, por me aceitar como sua aluna de Doutorado na *Université Paris XI* e me receber de forma tão acolhedora em seu laboratório. Pelos ensinamentos de citogenética molecular, assim como de francês. Sua dedicação ao trabalho é realmente surpreendente, sendo admirável sua disposição para resolver de forma rápida e eficaz as questões de trabalho diárias, assim como qualquer eventualidade. Admiro sua personalidade serena mesmo em meio à correria das atividades profissionais. Sigo com esse exemplo a ser seguido. Agradeço pelos conselhos profissionais e também pessoais que me foram dados durante os 18 meses que estive sob sua tutela em seu laboratório.

A Profa. Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos, afinal se completam oito anos desde que comecei meus trabalhos em seu laboratório de Citgonética Vegetal, na época como estudante de Iniciação Científica. Seu entusiasmo e energia são contagiantes e foram os grandes determinantes para eu iniciar minha vida acadêmica no grupo da Genética Vegetal. Durante todos esses anos, eu a vi atuando dentro da Universidade, um ambiente de trabalho, muitas vezes exaustivo e altamente competitivo, como orientadora, pesquisadora, professora, educadora, colega, amiga, mãe. Sua multiplicidade é sua marca, agradeço por ter sido sua aluna por todos esses anos e ter tido esse exemplo de profissional na minha vida acadêmica.

À Profa. Dra. Lilian Eggers, pesquisadora integrante do grupo de pesquisa ao qual faço parte desde o Mestrado. Sem meias palavras, uma pessoa crítica e extremamente profissional. Peça chave nos trabalhos do grupo, pois sem Lilian – nossa grande taxonomista – não haveria estudos em Iridaceae. Afinal, é preciso autoridade para dizer "quem é quem" em meio à tantos complexos morfológicos. Não foi minha orientadora,

nem co-orientadora em nenhum dos momentos acadêmicos. Mas apresentou-me meu objeto de estudo e sua problemática no campo de batalha, o campo, de tal forma agradeço pela orientação.

É, eu tive na verdade, quatro orientadoras, quatro grande exemplos de profissionais. Agradeço a todas pela confiança, compreensão e paciência. Há alguns anos, uma amiga comentou como era típico e engraçado, como os alunos ficavam parecidos com seus orientadores com o tempo, tanto na forma de trabalhar, quanto nos trejeitos. Observei ao longo dos anos como isso se repetia nos colegas. Bom, tive quatro orientadoras... Já me perguntei com qual eu teria ficado mais parecida. Espero levar comigo todas elas. Tatiana, Sonja, Eliane e Lilian, agradeço a todas pela minha formação, pela oportunidade de fazer parte de um grupo cuja marca registrada é a multidisciplinaridade e cujo foco e prioridade é o trabalho em equipe.

Aos queridos colegas iridólogos e associados, agradeço pelas conversas, bate-papos e discussões. Por toda forma de compartilhamento, de ideias, elucubrações, sentimentos, empatias, gargalhadas, choradeiras, cafés, chocolates, etc. Um obrigada especial à Eudes pela ajuda singular, inclusive via Skype! Por me aturar ao telefone reclamando da falta de energia na UFRGS, ..., reclamando, reclamando... Afinal não é fácil aguentar uma doutoranda no final da tese.

À Profa. Dra. Mardiore Pinheiro e à Malvina, pelo ótimo trabalho em equipe.

Aos alunos de iniciação científica que ajudaram na execução dos projetos do grupo e que já não fazem mais parte do grupo dos iridólogos

Ao pessoal da Genética Vegetal da UFRGS, obrigada! Muitas vezes, pequenas trocas fazem uma grande diferença no trabalho ou mesmo no humor diário. Agradeço ao Ricardo pelos momentos de incentivo e à Silvia por tudo que ela representa no laboratório de Genética Vegetal.

Agradeço à todos os funcionários da UFRGS e do Departamento de Genética. Em especial ao Elmo pela atenção e dedicação.

Aos colegas, funcionários, pesquisadores e professores do laboratório *d'Ecologie, Systematic & Evolution (ESE), Université Paris XI*, Orsay/FR, obrigada pela acolhida. Um

agradecimento especial ao Professor Thierry Robert, Christian, Olivier, Marina, Ghaias e Alodie.

Aos colegas do laboratório de citogenética do ESE, muito obrigada pela convivência amigável. Um agradecimento especial à Odile, pela sensibilidade, compreensão e paciência. A Fatima, um agradecimento especial por todos os ensinamentos de laboratório, técnicas e métodos.

À Professora Anete Pereira de Souza do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, BR, muito obrigada pela acolhida e oportunidade de pesquisa em seu laboratório. Da mesma forma, agradeço aos colegas e funcionários do mesmo. Um agradecimento especial à Fernanda, ao Danilo e a Patricia, pois foram essenciais no aprendizado das técnicas para o uso de microssatélites. Agradeço a eles também pela paciência e amizade. Janete, Maisa e Cristina, obrigada pela ajuda e pela amizade.

A Ana, Talita, Caroline, Katia e Mariana pela acolhida na república durante os períodos que fiquei em Campinas. Ana, muito obrigada pela amizade em vários momentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de Mestrado e Doutorado, e pelo suporte financeiro desse período.

Ao Programa de cooperação entre a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Desenvolvimento de Nível Superior e o Comité Français d'Evaluation de La Cooperation Universitaire avec le Brésil (CAPES-COFECUB) pela bolsa de Doutorado sanduíche e também pelo suporte financeiro.

A Aline e a Vanessa, pelos momentos memoráveis no aprendizado do Francês e também pela amizade.

Aos amigos que fiz na Cité *International Universitaire de Paris* e na *Maison du Brésil*. Em especial ao pessoal do primeiro andar que conviveu comigo um longo período. Agradeço pela amizade e pelo carinho.

Um agradecimento especial à Ana F., Ana B., Daniela A., Denise, Letícia G., Letícia L., Fernanda C., Márcia, Michele, Daniela B., Idete, Elizia, Paula e Luiza, pela amizade. Vocês foram essenciais em vários momentos, cada uma de forma singular.

Luiza e Elizia, e "o trio"? Paula, a pessoa mais cheia de disposição que conheço! Idete, super detinha! Adoro vocês! Vocês tornaram a minha estadia em Paris ainda mais especial.

Ao Fabricio, muito obrigada pelo suporte emocional e pela participação praticamente ativa no projeto nos primeiros anos do doutorado.

Um agradecimento especial ao amigo Marcio N. pela ajuda fundamental em momentos decisivos.

Ao Davi, obrigada pelo incentivo, pelo carinho e muita paciência!

Ao meu pai José, meu irmão Luthiero e a Gabriela, muito obrigada pelo carinho e paciência! Pai, mano, adoro vocês!

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier Prof Dr Tatiana Teixeira de Souza Chies, qui me guide depuis 2006 quand j'ai commencé mes études dans l'Ecole Doctorale Génétique et Biologie Moléculaire, à l'Université *Universidade Federal de Rio Grande do Sul* comme une étudiante de Master. Je vous remercie pour l'orientation, les possibilités de recherche et disponibilités pendant le Master et le Doctorat ainsi que pour la confiance que vous m'avez fait sur mon travail. Merci aussi pour votre patience et compréhension. Je suis très reconnaissante et heureuse d'avoir eu l'occasion de travailler avec une personne avec si grand professionnalisme.

Merci à Prof. Dr. Sonja Siljak Yakovlev, pour m'avoir accepté comme son élève au doctorat à l'Université Paris XI, et pour m'avoir accueilli de manière si hospitalière dans son laboratoire. Merci pour les enseignements de la cytogénétique, ainsi que de Français. Son dévouement au travail est vraiment étonnant, ainsi que sa disponibilité pour résoudre rapidement et efficacement des questions de travail quotidien, ainsi que toute autre éventualité. J'admire son calme même dans la ruée des activités professionnelles. Je suis avec cet exemple à suivre. J'apprécie les conseils professionnels et aussi personnels qu'elle m'a donné au cours des 18 mois que j'ai passé sous sa tutelle dans son laboratoire.

Merci à Prof Dr Eliane Kaltchuk dos Santos, voici déjà huit ans depuis que j'ai commencé mon travail dans son laboratoire *Citgonética Vegetal*, à l'époque comme une étudiante de l'initiation scientifique. Son enthousiasme et son énergie sont contagieuses et ont été les principaux facteurs déterminants pour moi de commencer ma vie universitaire dans le groupe de génétique végétale. Pendant toutes ces années, elle était conseilleur, chercheuse, enseignante, éducatrice, collègue, amie, mère. La multiplicité est sa marque, je suis heureuse d'avoir été son élève pendant toutes ces années et d'avoir eu cet exemple dans ma vie professionnelle universitaire.

Merci à Prof Dr Lilian Eggers, un membre du groupe de recherche au quel j'appartiens depuis le Master. Sans demi-mots, elle est une personne critique et extrêmement professionnelle. Elle est une pièce fondamentale dans le travail du groupe, parce que sans Lilian - notre grande taxonomiste - il n'y aurait pas d'études des Iridaceae… Après tout, elle a le pouvoir de dire «qui est qui » parmi ses nombreux complexes

morphologiques. Elle n'était pas ma directrice de thèse ni co-directrice, dans aucun des moments académiques, mais c'était Lilian qui m'a montré mon objet d'étude et de ses problèmes sur « le champ de bataille », le terrain, alors je vous remercie de m'avoir bien orienté.

Oui, j'ai effectivement eu quatre directrices de thèse, quatre grands exemples de professionnalisme. Merci à toutes pour la confiance, la compréhension et la patience. Il y a quelques années, une amie a commenté ce qui était typique et drôle, que les élèves étaient comme leurs mentors au fil du temps, à la fois dans la façon de travailler, comme dans le maniérisme. J'ai regardé au cours des années comme cela se répétait chez mes collègues. Eh bien, j'en avais quatre directrices ... Je me suis déjà demandé à qui je ressemblerais le plus. J'espère que je porte un petit peu de chacune. Tatiana, Sonja, Eliane et Lilian, merci à toutes pour ma formation, la possibilité de faire partie d'un groupe dont la marque est sa nature multidisciplinaire et dont la priorité est de se concentrer et de travailler en équipe.

Merci aux iridologues, chers collègues et associés, je suis reconnaissante pour les conversations, les causeries et des discussions. Pour toute forme de partage d'idées, d'élucubrations, de sentiments, d'empathie, d'éclats de rire, de gémissements, de cafés, de chocolats, etc. Un merci spécial à Eudes pour l'aide singulière, y compris via Skype! Merci pour me supporter au téléphone en me plaignant du manque d'énergie à l'*UFRGS*, ..., me plaignant, me plaignant... Ce n'est pas facile de supporter une doctorante à la fin de la thèse.

Merci à Prof. Dr. Mardiore Pinheiro et à Malvina pour le travail en équipe.

Aux élèves d'initiation scientifique qui ont aidé dans l'exécution des projets du groupe et qui ne font plus partis du groupe des iridologues.

Merci à tous de la *Genética Vegetal* de l'*UFRGS*, je vous remercie! Souvent, de petits échanges font une grande différence dans le lieu de travail ou de l'humeur quotidienne. Merci à Ricardo pour les moments d'encouragement et Silvia pour tout ce qu'elle représente dans le laboratoire de *Genética Vegetal*.

Je remercie tous les fonctionnaires de l'*UFRGS* et du Département de Génétique. Je suis extrêmement reconnaissant à l'Elmo pour l'attention et le dévouement.

Merci aux collègues, fonctionnaires, chercheurs et enseignants du laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution (ESE), Université Paris XI, Orsay / FR, merci pour l'accueil. Un merci particulier à Thierry Robert, Christian, Olivier, Marina, Ghaias et Alodie.

Merci aux collègues du laboratoire de cytogénétique de l'ESE, je vous remercie pour la convivialité amicale. Un remerciement spécial à Odile, pour la sensibilité, la compréhension et la patience. À Fatima, un merci tout spécial pour tous les enseignements de laboratoire, de techniques et de méthodes.

À Prof Anete Pereira de Souza du Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) de l'Université *Universidade Estadual de Campinas*, Campinas / SP, BR, je vous remercie pour l'accueil et la possibilité de recherche dans votre laboratoire. De même, je remercie les collègues et les fonctionnaires du laboratoire. Un merci spécial à Fernanda, Danilo et Patricia, car ils étaient essentiels dans l'apprentissage des techniques pour l'utilisation de microsatellites. Je les remercie aussi pour leur patience et leur amitié. Janete, Maisa et Cristina, merci pour votre aide et l'amitié.

Je remercie Ana, Talita, Caroline, Mariana et Katia pour m'avoir accueilli dans la maison d'étudiants pendant les périodes où j'étais à Campinas. Ana, un merci spécial pour l'amitié.

Merci au *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), pour les bourses de Master et de Doctorat et le soutien financier de cette période.

Je remercie le programme de coopération entre la *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Desenvolvimento de Nível Superior* et le Comité Français d'Evaluation de La Coopération Universitaire avec le Brésil (CAPES-COFECUB) pour la bourse et aussi pour le soutien financier.

Merci à Aline et Vanessa, pour les moments mémorables dans l'apprentissage du français et aussi pour l'amitié.

Merci aux amis et amies que j'ai fait à la Cité Internationale Universitaire de Paris et à la Maison du Brésil. Un merci spécial aux amis et amies du premier étage qui ont vécu avec moi pendant une longue période. Merci pour l'amitié et l'affection.

Un merci spécial à Daniela A. Denise, Leticia G., Leticia L., Fernanda C., Márcia, Michele, Danielle B., Idete, Elizia, Paula et Luiza, pour leur amitié. Vous avez été indispensables à plusieurs reprises, chacune de manière singulière.

Luiza et Elizia, et "o trio"? Paula, la personne la plus pleine de disposition que je connais ! Idete, super Detinha! Je vous adore! Vous avez fait mon séjour à Paris encore plus agréable.

Fabricio, un remerciement spécial pour le soutien affectif et pour participer presque activement au projet dans les premières années du doctorat.

Un merci tout spécial à mon ami Marcio N. pour l'aide fondamentale dans les moments décisifs.

Un merci tout particulier à Davi, pour l'encouragement, par l'affection et la patience !

Un merci tout spécial à mon père José, mon frère Luthiero et Gabriela, merci pour l'affection et la patience ! José et Luthiero, je vous adore !

SUMÁRIO/SOMMAIRE

RESUMO **15**

RESUME **17**

ABSTRACT **19**

INTRODUÇÃO GERAL **21**

1 A Família Iridaceae 21
1.1 A família Iridaceae no Brasil 22
2 Biologia Reprodutiva: Aspectos Gerais 22
2.1 Aspectos gerais da biologia reprodutiva da família Iridaceae 24
2.2 Biologia da polinização da família Iridaceae 25
3 Acesso à Variabilidade Genética 25
4 Estudos Citogenéticos 28
4.1 Poliploidia: um fenômeno importante na evolução da família Iridaceae 30
5 Biologia, Sistemática e Evolução do Gênero *Sisyrinchium* 32
5.1 A espécie em estudo: *Sisyrinchium micranthum* Cav. 37

OBJETIVOS **47**

Objetivos específicos 47

INTRODUCTION GÉNÉRALE **49**

1 La Famille des Iridaceae 49
1.1 La famille des Iridaceae au Brésil 50
2 Biologie de la Reproduction : Aspects Généraux 50
2.1 Aspects particuliers de la biologie de la reproduction au sein des Iridaceae 52
2.2 Biologie de la pollinisation de la famille des Iridaceae 53
3 Etude de la Variabilité Génétique 53
4 Etudes Cytogénétiques 57
4.1 La Polyploïdie : un phénomène important dans l'evolution de la famille des Iridaceae 58
5 Biologie, Systématique et Évolution du genre *Sisyrinchium* 60
5.1 *Sisyrinchium micranthum* Cav. 66

OBJECTIFS **76**

Objeticfs spécifiques 76

CAPÍTULO I/CHAPITRE I **78**

Development and characterization of nine microsatellite loci for Sisyrinchium micranthum (Iridaceae) 79
Abstract 80
Introduction 80
Methods and Results 81

Conclusions 83
Literature cited 84

CAPÍTULO II/CHAPITRE II 87

Genetic structure of Sisyrinchium micranthum (Iridaceae) revealed by microsatellites 88
Abstract 89
Introduction 90
Material and Methods 93
Results 96
Discussion 98
Literature Cited 104

CAPÍTULO III/CHAPITRE III 119

Physical mapping of rRNA genes and genome size variation in polyploid series of *Sisyrinchium micranthum* and its closely related species *S. laxum* and *S. rosulatum* (Iridaceae) 120
Abstract 121
Introduction 122
Material and Methods 124
Results 128
Discussion 130
References 137

CAPÍTULO IV/CHAPITRE IV 151

Aspectos reprodutivos de *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) 152
Introdução 152
Material e Métodos 152
Resultados e Discussão 157
Aspcetos Gerais e Perspectivas 166
Referências Bibliográficas 166

DISCUSSÃO GERAL 168

DISCUSSION GENERALE 174

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES BIBLIOGRAFIQUES 180

RESUMO

Sisyrinchium micranthum Cav. é uma planta herbácea, sendo uma das raras espécies do gênero que são descritas como anuais. No Brasil, sua distribuição ocorre ao longo dos estados do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (RJ). A espécie apresenta ampla variabilidade morfológica relatada em vários trabalhos, sendo que diferentes combinações de aspectos morfológicos podem ser observadas na natureza. Baseando-se nessas combinações que caracterizam diversos perfis vegetais, três tipos morfológicos foram descritos, CI, CII e CIII. *Sisyrinchium micranthum* tem três níveis de ploidia descritos na literatura a partir do número básico $x = 8$, sendo eles $2n = 2x = 16$, $2n = 4x = 32$ e $2n = 6x = 48$. A fim de contribuir para o conhecimento taxonômico, reprodutivo e evolutivo da espécie, neste trabalho foram investigadas características genéticas e citogenéticas de *S. micranthum*, assim como aspectos da biologia reprodutiva. Para estudar a estrutura populacional de *S. micranthum* no sul do Brasil, primeiramente, nove marcadores microssatélites foram isolados usando uma biblioteca genômica enriquecida, e caracterizados em uma população diploide. Posteriormente, a partir da análise da variabilidade genética com sete marcadores para 583 plantas de 14 localidades amostradas nos estados do RS, SC e PR observou-se a existência de populações com indivíduos de diferentes níveis de ploidia, e uma possível origem autopoliploide para os poliploides. As diversidades gênica e alélica foram aproximadamente semelhantes para a maioria dos acessos. O coeficiente de endogamia sobre todos os locos mostrou que *S. micranthum* apresentou um excesso médio de heterozigotos (valor de coeficiente de endogamia negativo), mas os valores F_{IS} das populações individuais variaram de -0,273 a 0,454. O excesso de heterozigotos poderia ser esperado uma vez que autopoliploides apresentam herança polissômica, o que contribui substancialmente com uma heterozigosidade elevada. Além disso, as populações mostraram-se altamente estruturadas. Os resultados provenientes das análises citogenéticas, mostram que a variabilidade de *S. micranthum* está presente também em termos de organização do genoma. Considerando *S. micranthum* e as espécies relacionadas *S. laxum* Otto ex Sims e *S. rosulatum* E.P. Bicknell, foi possível verificar que o rDNA 18S-26S varia em número de locos, com notável redução dos mesmos em poliploides em comparação com os diploides, enquanto o loco 5S mostrou aumento proporcional no número de sinais conforme o aumento no nível de ploidia. Os dados relativos ao tamanho

do genoma (Cx) para as três espécies estudadas mostraram uma tendência de redução do genoma de diploides para poliploides; e também uma pequena variação inter e intraespecífica com relação ao valor C. Em termos de biologia reprodutiva, foi registrada a ocorrência de autofecundação e fecundação cruzada para a espécie. Além disso, foi verificado que cruzamentos entre as diferentes categorias morfológicas de *S. micranthum* são compatíveis uma vez que resultaram na formação de frutos. Da mesma forma, os dados obtidos sugerem que *S. micranthum* e *S. laxum* não representam táxons totalmente isolados reprodutivamente. A variabilidade genética de *S. micranthum* encontrada no presente estudo em termos de divergência genética entre populações e de variação do número de locos de rDNA, possivelmente, reflete a complexa relação existente entre a poliploidia e os aspectos reprodutivos da espécie.

RESUME

Sisyrinchium micranthum Cav. est une espèce herbacée, l'une des rares du genre qui est décrite comme annuelle. On la trouve au Brésil dans les états du Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP) et Rio de Janeiro (RJ). Cette espèce montre une grande variabilité morphologique signalée dans plusieurs études, et différentes combinaisons de caractères morphologiques peuvent être observées dans la nature. Sur la base de ces combinaisons qui caractérisent les profils de plantes différentes, trois types morphologiques ont été décrits, CI, CII et CIII. *Sisyrinchium micranthum* a trois niveaux de ploïdie décrits dans la littérature à partir du nombre de base $x = 8$, $2n = 2x = 16$, $2n = 4x = 32$ et $2n = 6x = 48$. Pour contribuer à la connaissance taxonomique, reproductive et évolutive de l'espèce, cette étude a considéré des caractéristiques génétiques et cytogénétiques de *S. micranthum*, ainsi que les aspects de la biologie de la reproduction. Pour étudier la structure des populations de *S. micranthum* dans le sud du Brésil, neuf marqueurs microsatellites ont été isolés à l'aide d'une banque génomique enrichie, et caractérisés dans une population diploïde. A partir de l'analyse de la variabilité génétique avec sept marqueurs pour 583 plantes de 14 localités d'échantillonnage de RS, SC et PR nous avons observé l'existence de populations possédant des individus à différents niveaux de ploïdie. Une origine autopolyploïde a été présumé pour ces polyploïdes. La diversité génique et allélique était à peu près similaire dans la plupart des populations. Le coefficient de consanguinité sur tous les loci a montré que les populations de *S. micranthum* ont présenté un excès des hétérozygotes (coefficient de consanguinité négative), mais les valeurs de F_{IS} de populations individuelles variaient de -0,273 à 0,454. L'excès d'hétérozygotes peut être dû à un héritage polysomique des autopolyploïdes, ce qui contribue sensiblement à une hétérozygotie élevée. En outre, les populations sont très structurées. Les résultats de l'analyse cytogénétique montrent que la variabilité chez *S. micranthum* s'exprime aussi en termes d'organisation du génome. En ce qui concerne *S. micranthum* et les espèces proches *S. laxum* Otto ex Sims et *S. rosulatum* E.P. Bicknell, il a été démontré que l'ADNr 18S-26S varie en nombre de loci, avec une réduction importante chez les polyploïdes par rapport aux diploïdes, tandis que le locus 5S a montré une augmentation du nombre de signaux proportionnelle au niveau de ploïdie. Les données sur la taille du génome pour les trois espèces étudiées ont montré une tendance à la baisse du génome monoploïde (1Cx) chez les polyploïdes (« genome downsizing »), ainsi qu'une

faible variation inter et intraspécifique de la valeur C. En termes de la biologie de reproduction, l'autofécondation et l'allofécondation ont été observées chez cette espèce. En outre, il a été constaté que des croisements entre différentes catégories morphologiques de *S. micranthum* ont été possibles puisqu'ils ont abouti à la formation des fruits. De même, les données obtenues suggèrent aussi qu'il n'existe pas une barrière reproductive complète entre *S. micranthum* et *S. laxum*. La variabilité génétique de *S. micranthum* mise en évidence dans cette étude en termes de divergence génétique entre les populations et variation dans le nombre de loci d'ADNr probablement reflètent une relation complexe existante entre la polyploïdie et les aspects de la reproduction de l'espèce.

ABSTRACT

Sisyrinchium micranthum Cav. is an herbaceous plant, one of the rare species of the genus which is described as annual. In Brazil, its distribution occurs throughout the states of Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP), and Rio de Janeiro (RJ). The species has a wide morphological variability reported in several studies, and different combinations of morphological features can be observed in the wild. Based on these combinations that characterize various plant profiles, three morphological types have been described as CI, CII and CIII. *Sisyrinchium micranthum* has three ploidy levels described in the literature whose basic number is $x = 8$, $2n = 2x = 16$, $2n = 4x = 32$, and $2n = 6x = 48$. To contribute to the knowledge on the taxonomy, reproduction and evolution of the species, this study investigated genetic and cytogenetic characteristics of *S. micranthum*, as well as aspects of reproductive biology. To study the population genetic structure of *S. micranthum* in southern Brazil, firstly, nine microsatellite markers were isolated using an enriched genomic library, and characterized in a diploid population. Later, from the analysis of genetic variability with seven markers for 583 plants of 14 sampled sites in the states of RS, SC and PR, populations with individuals of different ploidy levels were observed. An autopolyploid origin was presumed for these polyploids. The gene and allelic diversities were rather similar for most of the accessions. The inbreeding coefficient over all loci showed that *S. micranthum* exhibited an average excess of heterozygotes (negative inbreeding coefficient value), but the F_{IS} values of individual populations ranged from -0.273 to 0.454. The heterozygote excess could be expected since autopolyploids present polysomic inheritance, which contributes substantially for a high heterozygosity. In addition, the populations were highly structured. The results from the cytogenetic analyses, demonstrated that the variability of *S. micranthum* is also present in terms of genome organization. Regarding *S. micranthum* and related species *S. laxum* Otto ex Sims and *S. rosulatum* E.P. Bicknell, it was verified that the 18S-26S rDNA varies in number of loci, with a notable reduction of the same in polyploids in relation to diploids, while 5S locus showed a proportional increase in the number of signals as increased ploidy level. The data on genome size (Cx) for the three species studied showed a genome downsizing from diploids to polyploids, and also a small inter and intraspecific variation with respect to the C-value. In terms of reproductive biology, selfing and outcrossing were recorded for the species. Furthermore, crossing between different morphological categories

of *S. micranthum* are compatible as resulted in the formation of fruits. Likewise, the data suggest that *S. micranthum* and *S. laxum* do not present complete reproductive isolation. The genetic variability of *S. micranthum* demonstrated in this study in terms of genetic divergence between populations and variation in rDNA loci number possibly reflect the complex relationship between polyploidy and reproductive aspects of the species.

INTRODUÇÃO GERAL

1 A Família Iridaceae

A família Iridaceae pertence à ordem Asparagales (APG III, 2009) e é uma família relativamente grande dentre as plantas monocotiledôneas, com mais de 2030 espécies compreendidas entre 65 a 75 gêneros (Goldblatt *et al*., 2008). As espécies representantes da família Iridaceae ocorrem preferencialmente em ambientes abertos, como campos, baixadas úmidas e áreas ruderais. São ervas perenes, às vezes anuais, sendo frequentes os gêneros bulbosos.

As iridáceas podem ser reconhecidas por seu perianto ou corola petaloide, de maneira que as pétalas e as sépalas são semelhantes na forma e na textura e, frequentemente, na coloração. Dentre as características que distinguem Iridaceae dentro da ordem Asparagales, destaca-se a presença de três estames no androceu, enquanto na maioria das outras famílias relacionadas, o androceu apresenta seis estames (Goldblatt & Manning, 2008). Considerando o aspecto vegetativo, espécies da família Iridaceae apresentam folhas basais em número variado, cilíndricas ou planas, lineares ou ensiformes, muitas vezes inconspícuas na cobertura herbácea.

A família possui representantes de grande relevância econômica e ornamental tais como *Gladiolus* L., *Iris* L., *Freesia* Klatt, *Crocus* L. e *Watsonia* Miller (Goldblatt e*t al.*, 1998). Dentre estas, *Gladiolus* possui várias espécies conhecidas popularmente no Brasil como palma-de-santa-rita. *Crocus sativus* L. é conhecido pela produção do açafrão a partir dos estigmas das flores, um condimento de coloração vermelha muito apreciado na culinária.

A família Iridaceae possui um longo histórico de tentativas de classificação infrafamiliar, de forma que os primeiros estudos baseados em caracteres morfológicos começaram no século XIX (Goldblatt & Manning, 2008). Goldblatt (1990) a partir de uma análise cladística da família, englobando caracteres morfológicos, anatômicos, embriológicos, de ultraestrutura de pólen, de citologia e fitoquímica, sugere a divisão da família em quatro subfamílias: Isophysidoideae, Nivenioideae, Iridoideae e Ixioideae. Sendo Iridoideae dividida em quatro tribos (Sisyrinchieae, Irideae, Mariceae e Tigridieae) e Ixioideae em três (Watsonieae, Ixieae e Pillansieae).

Uma série de estudos moleculares empregando sequências de DNA começaram no final do século XX, sendo o estudo de Souza-Chies *et al*. (1997) usando o gene plastidial *rps*4, o pioneiro em reconstruções filogenéticas moleculares da família. Um recente estudo filogenético realizado por Goldblatt *et al*. (2008) a partir de sequências de cinco regiões de DNA plastidial, propõe o reconhecimento de novas subfamílias. Desta forma, a família Iridaceae é, atualmente, subdividida em sete subfamílias: Isophysidoideae, Nivenioideae, Iridoideae, Crocoideae, Aristeoideae, Geosiridoideae e Patersonioideae. A subfamília Iridoideae compreende cinco tribos: Tigridieae, Trimezieae, Sisyrinchieae, Irideae e Diplarreneae, enquanto a subfamília Crocoideae compreende as tribos Croceae, Freesieae, Gladioleae, Watsonieae e Tritoniopsideae (**Figura 1**).

Estima-se que a divergência da família tenha ocorrido há cerca de 82 m.a. (milhões de anos), ou seja, durante o Cretáceo Superior (Campaniano), no qual a Antártida e Austrália formavam um super continente. Iridaceae apresenta distribuição quase cosmopolita, ocorrendo em regiões temperadas e tropicais. Sua origem seria fundalmentalmente, no Hemisfério Sul, principalemente África Subsahariana, juntamente com a América do Sul e Central, as áreas de maior diversificação (Goldbaltt *et al*., 2008).

1.1 A família Iridaceae no Brasil

No Brasil, a família está representada por 18 gêneros (12 são encontrados no sul do Brasil) e 160 espécies, das quais 64 ocorrem de forma endêmica. Em termos de diversidade e abundância, os gêneros mais importantes são *Sisyrinchium* L. (58 espécies), *Neomarica* Sprague (21 espécies), *Pseudotrimezia* R.C. Foster (21 espécies), *Trimezia* Salisb. ex Herb. (14 espécies) e *Cypella* Herb. (14 espécies) (Eggers *et al*., 2010).

2 Biologia Reprodutiva: Aspectos Gerais

A reprodução vegetal pode ocorrer de duas formas: via reprodução assexual e/ou via reprodução sexual. A reprodução assexual é caracterizada pela ausência de gametas na geração da progênie, podendo ser classificada em reprodução vegetativa e reprodução apomítica (Cavalli, 2003). Na reprodução vegetativa, novos indivíduos são originados a partir de diferentes estratégias, tais como produção de estolões; rizomas ou caules subterrâneos; cormos, bulbos ou tubérculos; raízes ou rebentos; e, folhas (Karasawa,

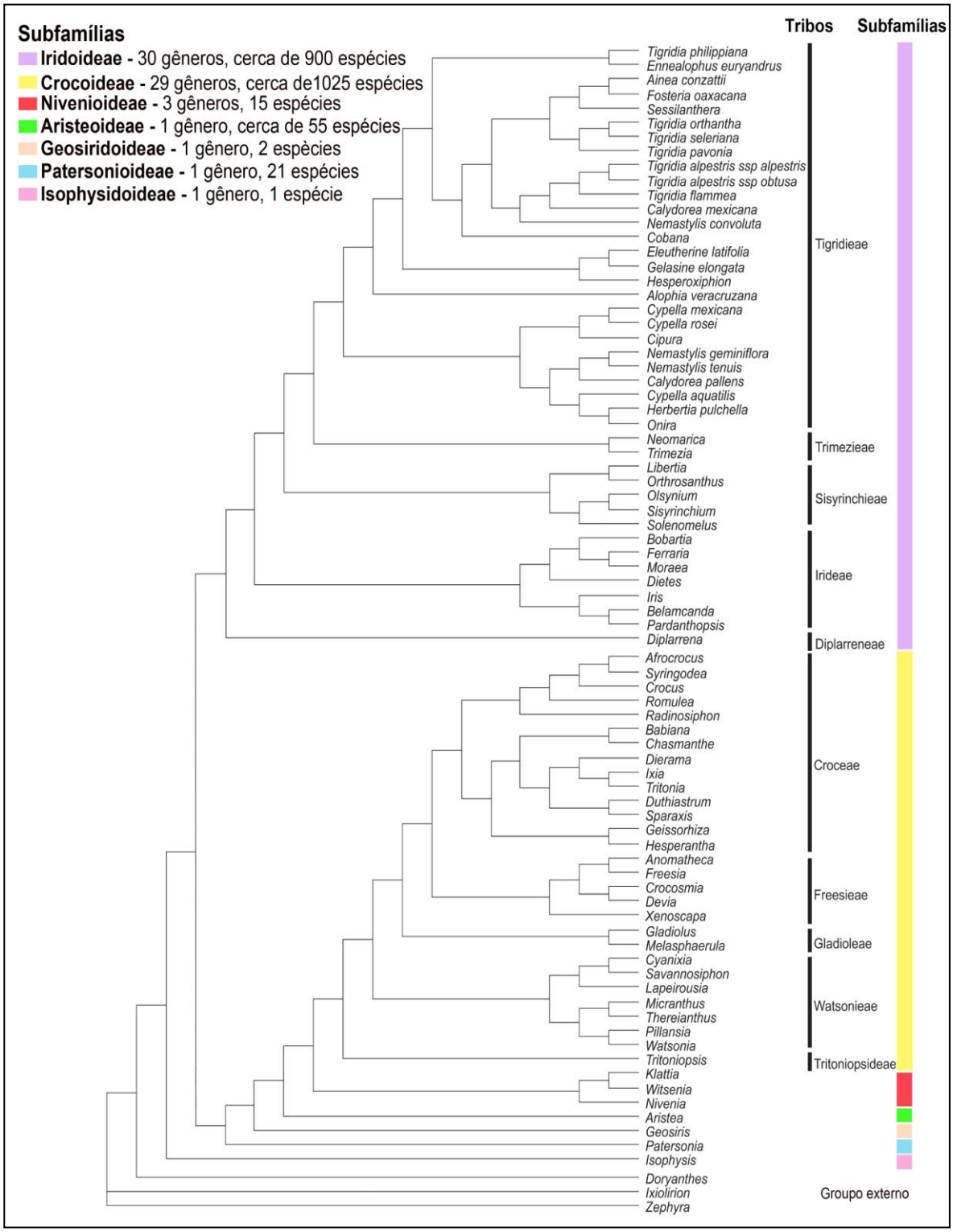


Figura 1. Filogenia molecular de Iridaceae. As subfamílias e suas respectivas tribos estão indicadas pelas barras verticais. Na legenda constam o nome das subfamílias; e, o número de gêneros e de espécies correspondentes (de acordo com Goldblatt *et al*., 2008).

2009). Na reprodução apomítica ocorre a formação de embrião a partir de uma célula somática do rudimento seminal, de maneira que sementes férteis são formadas com constituição genética materna, sem contribuição de gametas masculinos (Cavalli, 2003; Karasawa, 2009).

Ambos os modos de reprodução (assexual e sexual) estão presentes na família Iridaceae. Com relação à reprodução assexual por propagação vegetativa, a formação de bulbos é comum em espécies da tribo Tigridieae e em algumas espécies de *Iris* (Iridoideae: Irideae), enquanto cormos ocorrem em espécies das subfamílias Crocoideae e Iridoideae (tribo Irideae) (Goldblatt & Manning, 2008). A reprodução apomítica não foi observada para a família Iridaceae até o momento.

A reprodução sexual pode ser subdividida em três classes de acordo com a forma de cruzamento: autogamia (autofecundação), alogamia (fecundação cruzada) e misto (sistema autógamo e alógamo simultaneamente) (Karasawa, 2009).

Dentre os mecanismos que facilitam a fecundação cruzada, destacam-se sistemas de autoincompatibilidade, sistemas de distanciamento físico e sistemas temporais que alternam a receptividade do estigma e a maturação do pólen (Karasawa, 2009). espontânea, pois a fecundação cruzada pode ser promovida pelos sistemas de distanciamento físico como os citados acima. Fatores ecológicos como densidade vegetal das populações, números de flores por planta, síndrome de polinização e variações na disponibilidade e comportamento de polinizadores influenciam diretamente as taxas de fecundação cruzada (Franceschinelli & Bawa, 1999).

2.1 Aspectos gerais da biologia reprodutiva da família Iridaceae

O sistema de cruzamento preponderante nas espécies de Iridaceae é a fecundação cruzada. Esta é facilitada, na maioria das espécies de Iridaceae, pela protrandria (maturação das anteras antes que o estigma esteja receptivo), na qual a receptividade do estigma ocorre de algumas horas a 1-3 dias após a liberação do pólen; assim como, pela separação espacial das anteras e dos estigmas. Não obstante, a família Iridaceae possui tanto espécies autoincompatíveis como autocompatíveis, de maneira que dentre as autocompatíveis ocorrem espécies autógamas, alógamas, ou com sistema misto de cruzamento. Nas espécies autoincompatíveis, o sistema de incompatibilidade é

gametofítico podendo ser expresso dentro do ovário ou mesmo no rudimento seminal, dependendo da espécie (Goldblatt & Manning, 2008).

2.2 Biologia da polinização da família Iridaceae

A família Iridaceae tem flores com uma ampla variedade de formas e cores, caracterizando-se por possuir uma ampla gama de síndromes de polinização (Rudall *et al*., 2003), podendo apresentar relações altamente especializadas com seus polinizadores (África Subsahariana) (Goldblatt & Manning, 2006). Deste modo, 95% das espécies são polinizadas por uma ou poucas espécies de insetos e outros animais, enquanto apenas 3% são visitadas por uma gama maior de polinizadores (Goldblatt & Manning, 2008).

Os recursos florais ofertados são néctar, pólen ou lipídeos florais, dependendo da espécie. Dentre os polinizadores já observados para espécies da família Iridaceae, ocorrem abelhas, moscas, mariposas, besouros, grandes borboletas, pássaros e vespas. A polinização por abelhas é relatada para toda a família, no entanto, a subfamília Crocoideae é a única que possui uma ampla variedade de polinizadores tais como moscas de probóscide longa, mariposas, besouros, grandes borboletas e pequenos pássaros (Goldblatt & Manning, 2008).

A família Iridaceae é particularmente interessante quanto aos recursos florais ofertados aos polinizadores, pois é uma das 11 famílias de Angiospermas para as quais se tem registro de lipídeos florais como recompensa (Renner & Schaeffer, 2010). Estima-se que tal caráter tenha evoluído independentemente 28 vezes (Renner & Schaeffer, 2010). Para a maioria das famílias, possivelmente, o surgimento intrafamiliar de glândulas secretoras de lipídeo tenha ocorrido uma única vez, com exceção das famílias Orchidaceae e Iridaceae, que apresentam múltiplas origens (Goldblatt *et al*., 2008; Chase *et al*., 2009; Renner & Schaeffer, 2010).

3 Acesso à Variabilidade Genética

Marcadores de DNA têm sido utilizados com sucesso em estudos de diversidade genética, mapeamento genético e biologia evolutiva. Dentre os vários sistemas baseados em reações de polimerase em cadeia (“Polymerase Chain Reaction” – PCR), destacam-se marcadores tais como: polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (“Randomly Amplified Polymorphic DNA markers” - RAPD); polimorfismo de tamanho do fragmento amplificado (“Amplified Fragment Length Polymorphism” – AFLP)

polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição ("Restriction Fragment Length Polymorphism" – RFLP); polimorfismos de sequências de DNA amplificadas e clivadas ("Cleaved Amplified Polymorphism Sequence" – CAPS ou PCR-RFLP); e microssatélites ("Simple Sequence Repeats" – SSRs).

Os microsatélites consistem de pequenos motivos (1 a 6 nucleotídeos) repetidos lado a lado que ocorrem nos genomas de eucariotos e procariotos. Tais regiões possuem taxas de mutação bastante altas (10^{-2} – 10^{-6} eventos por loco por geração) (Li *et al*., 2002) se comparadas com as taxas de mutação de ponto em regiões gênicas codificantes (10^{-8} – 10^{-9}) (Brumfield *et al*., 2003), de maneira que sua instabilidade manifesta-se principalmente nas mudanças do número de repetições (Li *et al*., 2002). Os mecanismos mutacionais envolvidos correspondem ao escorregamento da DNA polimerase ("DNA slippage") durante o processo de replicação (Tachida & Iizuka, 1992) e recombinação desigual ou alinhamento incorreto das fitas de DNA (Harding *et al*., 1992). Dessa forma, sua instabilidade manisfesta-se principalmente, como mudanças no número de repetições dos microssatélites (Li *et al*., 2002).

As vantagens em utilizar os microssatélites como marcadores moleculares advém da sua natureza multialélica; relativa abundância; hipervariabilidade; transmissão codominante, possibilitando, para um determinado loco, a distinção entre indivíduos homozigotos e heterozigotos (no caso de indivíduos diploides); fácil detecção através de reações de polimerase em cadeia; alta reprodutibilidade e necessidade de uma pequena quantidade de DNA para iniciar as reações de PCR (Powell *et al*., 1996).

Dentre as técnicas existentes para o desenvolvimento de tais marcadores, o método de bibliotecas genômicas enriquecidas de microssatélites (Karagyozov *et al*., 1993; Armour *et al*., 1994; Kijas *et al*., 1994) é amplamente difundido e apresenta altas taxas de eficiência no isolamento de microssatélites tanto para organismos vegetais quanto animais (Zane *et al*., 2002).

O protocolo básico inclui a obtenção de fragmentos de DNA a partir de digestão do DNA genômico com enzimas de restrição ou por sonificação; ligação dos fragmentos a vetores ou adaptadores específicos; hibridização dos mesmos com sondas (contendo di, tri ou tetranucleotídeos) ligadas à membranas de nylon (Karagyozov *et al*., 1993; Armour *et al*., 1994), ou tais sondas podem ser 5' biotiniladas e aderidas a contas magnéticas

revestidas por estreptavidina (Kandpal *et al*., 1994; Kijas *et al*., 1994); lavagem, eluição e recuperação por PCR do DNA selecionado; purificação dos fragmentos amplificados; clonagem do DNA enriquecido; e por último, pode-se fazer o sequenciamento direto dos clones, ou realizar uma pré-seleção através de PCR ou "Southern Blot" antes do sequenciamento. Ao fazer uso de hibridização seletiva com sondas de oligonucleotídeos repetidos lado a lado, esse método dispensa a varredura laboriosa e de alto custo através de sequenciamento de milhares de clones (Billote *et al*., 1999).

Por serem altamente polimórficos e espécie-específicos, o uso de marcadores microssatélites difundiu-se rapidamente em estudos de mapeamento, de genética de populações e de áreas correlatas (Zane *et al*., 2002; Ellegren, 2004; Schlötterer, 2004).

Apesar da utilização de SSRs estar amplamente difundida, o uso desses marcadores para organismos poliploides é limitado devido ao fato de que, independentemente da origem ser por auto ou alopoliploidia, de forma geral, não é possível estimar o número exato de cópias de cada alelo (ambiguidade genotípica). Por exemplo, um indivíduo tetraploide cujo perfil eletroforético seja *AB*, pode ser *ABBB*, *AABB* ou *AAAB*. Por esse motivo, muitos estudos acabam realizando a análise como se fossem marcadores dominantes, considerando a presença ou ausência das bandas. Atualmente, existe uma série de programas que viabilizam algumas análises populacionais com organimos poliploides. Segundo Clark & Jasieniuk (2011), os programas TETRASAT (Markwith *et al*., 2006), TETRA (Liao *et al*., 2008) e ATETRA (Van Puyvelde *et al*., 2010) são adequados para organismos alopoliploides com herança dissômica ou intermediária, no entanto, nenhum destes programas disponibiliza análises para organismos com nível de ploidia superior a 4*x*. Para organismos autopoliploides, os seguintes programas seriam adequados: SPAGeDi (Hardy & Vekemans, 2002), GENODIVE (Meirmans & Van Tienderen, 2004), POPDIST (Guldbrandtsen *et al*., 2000; Tomiuk *et al*., 2009) e STRUCTURE (Pritchard *et al*., 2000). Todavia, somente os programas SPAGeDi e STRUCTURE suportam análises de organismos autopoliploides com populações com nível de ploidia misto, e principalmente, com organimos com nível de ploidia além de 4*x*.

Clark & Jasieniuk (2011) desenvolveram um pacote para o programa *R* chamado *polysat* com o qual é possível realizar uma série de análises tanto para organismos auto quanto alopoliploides através de diferentes funções, algumas compartilhadas entre modos

de herança dominante e codominante, e outras funções específicas para cada tipo. Dentre suas principais vantagens, destacam-se a capacidade para trabalhar com qualquer nível de ploidia, incluindo populações de ploidia mista, e assume que o número de cópias alélicas é sempre ambíguo em poliploides com perfil de heterozigotos parciais (por exemplo, um tetraploide com perfil *AB*). Além disso, possibilita interface com vários outros programas, sendo possível importar e exportar dados em diferentes formatos. No entanto, sua capacidade é limitada quando se trata de um grande volume de dados, pois sua arquitetura não possibilita multiprocessamento, ou seja, não redistribui tarefas entre diferentes processadores. Além disso, projetado para economizar tempo de processamento, o programa não possui mecanismo de ponto de verificação ("checkpoint"), ou seja, o programa não salva os dados automaticamente durante o processamento, de maneira que toda vez que ocorra alguma interrupção dos cálculos computacionais, perde-se os resultados sem possibilidade de recuperação.

Considerando-se marcadores codominantes, dentre as epécies de Iridaceae contempladas com estudos utilizando microssatélites constam *Iris hexagona* Walter. (Meerow *et al.*, 2005; Meerow *et al*., 2007; Pathikonda *et al*., 2010), *Gladiolus longicoliis* Baker (Rymer *et al*., 2010) e *Hesperantha coccinea* (Backh. & Harv.) Goldblatt & J.C. Manning (Wolff *et al*., 2009).

Atualmente, várias espécies da família Iridaceae com ocorrência no sul do Brasil vêm sendo investigadas em termos de diversidade genética e genética de populações utilizando marcadores do tipo ISSR (Souza-Chies *et al*., 2012). Esses estudos podem contribuir de forma significativa quanto ao conhecimento em biossistemática das espécies endêmicas ou de ocorrência restrita ao sul da América do Sul, pois representam estudos pioneiros na investigação da distribuição da variabilidade genética no continente sul-americano, o qual representa um dos grandes centros de diversificação de espécies da família Iridaceae (Goldblatt *et al*., 2008).

4 Estudos Citogenéticos

A citogenética tradicional é constituída por análises como determinação do número cromossômico, cariotipagem, observação do comportamento meiótico e avaliação polínica, as quais possibilitam ampliar a visão sobre a diferenciação das espécies.

As técnicas de bandamento permitem a visualização de blocos de coloração diferenciada. Portanto, possibilitam a identificação da distribuição e da quantidade de heterocromatina (bandas C, G, N), a diferenciação dos tipos de heterocromatina (AT e GC) utilizando fluorocromos como DAPI ou Hoechst e CMA, e a localização de regiões organizadoras do nucléolo (Ag-NOR). Estas são importantes para a identificação de cromossomos homólogos e homeólogos e para a caracterização de polimorfismos ou de relações de parentesco, podendo distinguir possíveis rearranjos cromossômicos (Cerrados Embrapa).

Já a citogenética molecular, compreende as técnicas de hibridização *in situ,* que consistem basicamente no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA com uma sequência de nucleotídeos complementar situada dentro da célula, visando verificar se a célula possui essa sequência e qual a sua exata localização. Para visualizar o segmento de DNA ou RNA hibridizado é necessário que ele esteja marcado com alguma molécula de fácil identificação, funcionando como uma sonda para detectar a sequência complementar de nucleotídeos – sequência alvo. O híbrido sonda/alvo pode ser DNA/DNA, DNA/RNA ou RNA/RNA. Enquanto na técnica de GISH ("Genomic *in situ* hybridization") a sonda corresponde ao genoma total de um organismo, na técnica de FISH ("Fluorescent *in situ* hybridization") a sonda corresponde a sequências gênicas (Guerra, 2004).

A utilização da FISH, para localização de sequências de DNA específicas, a fim de comparar cariótipos configura uma grande contribuição em estudos de citotaxonomia. Por outro lado, a técnica de GISH é extremamente útil para avaliação da composição genômica de uma espécie, sendo muito importante em estudos evolutivos de poliploides.

Análises citogenéticas tradicionais e moleculares são empregadas com sucesso para várias espécies de diferentes famílas, em estudos como caracterização cariotípica (Klamt & Schifino-Wittmann, 2000; Siljak-Yakovlev *et al*., 2002; Ortolani *et al*., 2007), investigação da organização do genoma (Maluszynska & Heslop-Harrison, 1993; Castilho & Heslop-Harrison, 1994; Badaeva *et al*., 1996; Frello & Heslop-Harrison, 2000; Snowdon, 2007; Wan *et al*., 2012), também sendo útil para investigar relações inter (Cerbah *et al*., 1998; Torell *et al*., 2003; Garnatje *et al*., 2004a; Muratović *et al*., 2005; Pellicer *et al*., 2008; Garcia *et al*., 2009; Pellicer *et al*., 2010) e intraespecíficas (Cerbah *et al*., 1999; Bogunić *et al*., 2011; Chalup *et al*., 2012).

O método de citometria de fluxo tornou-se um dos mais empregados na estimativa do nível de ploidia e tamanho do genoma em plantas. O processo básico envolve o isolamento de núcleos do material vegetal (folhas, caule e raízes), coloração do DNA com fluorocromo, seguido pela análise da emissão de sua fluorescência. Este método tem a vantagem de avaliar num grande número de células em um curto espaço de tempo, podendo-se avaliar amostras representativas do organismo em estudo (Doležel *et al*., 2007). A estimativa do conteúdo de DNA tem sido utilizada como uma ferramenta importante em estudos de biossistemática, podendo prover informações úteis com propósitos filogenéticos e taxonômicos, provando ser útil na delimitação e/ou diferenciação de espécies (Garnatje *et al*., 2004b; Mahelka *et al*., 2005; Loureiro *et al*., 2007; Suda *et al*., 2007; Perný *et al*., 2008; Ekrt *et al*., 2010), na caracterização da variabilidade intraespecífica (Bogunić *et al*., 2007; Leong-Škorničková *et al*., 2007; Siljak-Yakovlev *et al*., 2008; Slovák *et al*., 2009) e como método seguro para estimar o nível de ploidia para táxons com contagens cromossômicas prévias (Siljak-Yakovlev *et al*., 2008; Roberts *et al*., 2009).

4.1 Poliploidia: um fenômeno importante na evolução da família Iridaceae

A poliploidia (multiplicação do genoma) é classificada em paleopoliploidia e neopoliploidia dependendo do evento de poliploidização ser antigo ou recente, respectivamente. No entanto, a delimitação entre estes dois conceitos ainda é confusa entre diferentes autores. Guerra (2008) expõe diferentes conceitos relacionados com número cromossômico e suas implicações em citotaxonomia vegetal. O mesmo discute que embora alguns autores considerem neopoliploides como poliploides sintéticos (Comai, 2005), ou poliploides intraespecíficos (Ramsey & Schemske, 2002), ou ainda que, na maioria dos casos, são poliploides gerados a partir de hibridações interespecíficas ou intergenéricas (Levy & Feldman, 2002), o termo neopoliploidia deveria ser utilizado nos casos em que os diploides relacionados ainda são existentes, enquanto paleopoliploides deveria ser atribuído aos poliploides restantes.

Para Schubert & Lysak (2011), a neopoliploidia refere-se a eventos de poliploidização recentes no tempo evolutivo, nos quais ainda é possível reconhecer a multiplicação dos cromossomos. A poliploidização seguida de diploidização incluindo redução do número cromossômico, mas ainda detectável por técnicas de genômica

comparativa e pintura cromossômica, corresponde a mesopoliploidia. Para tais autores, a paleopoliploidia envolve eventos antigos de poliploidização mascarados por subsequentes alterações genômicas, cuja detecção é possível em táxons diploides somente via bioinformática através da busca de sequências de DNA ortólogas e parálogas.

A poliploidização é considerada como um dos processos mais marcantes na evolução das Angiospermas, de maneira que eventos de duplicação podem ser rastreados em 70-100% das espécies diploides atuais (Masterson, 1994; Simillion *et al*., 2002; Blanc & Wolfe, 2004; Leitch & Leitch, 2008; Soltis *et al*., 2009; Jiao *et al*., 2011) e por essa razão o termo paleopoliploides vem sendo empregado para tais espécies. Também representa um processo contínuo na evolução de espécies vegetais. Wood *et al*. (2009), seguindo a definição de neopoliploidia como poliploidia intragenérica (poliploides formados desde o surgimento de seus respectivos gêneros), estimaram que eventos de duplicação tem acompanhado 15% dos eventos de especiação em Angiospermas, com uma ocorrência de ~35% de neopoliploides em gêneros de plantas vasculares.

A poliploidização é um fator importante na evolução da família Iridaceae, de maneira que Goldblatt & Takei (1997) estimaram que 60% das espécies representantes da família no Hemisfério Norte são neopoliploides (considerando poliploidia intragenérica). Para as espécies que ocorrem no continente africano, no entanto, 5% das espécies de Crocoideae (até então chamada de Ixioideae) e 10% de Iridoideae são neopoliploides. Nas Américas Central e do Sul, a poliploidia parece exercer um papel mais pronunciado na evolução das Iridáceas, sendo que quase todas as espécies de Tigridieae são tetra ou hexaploides e dentro de Sisyrinchieae, mais de 75% das espécies de *Sisyrinchium* são poliploides (Goldblatt & Takei, 1997).

Estudos citológicos têm mostrado que a família é bastante diversa em termos de cariótipo, número cromossômico básico, nível de ploidia e conteúdo de DNA (Goldblat, 1982; Goldblat *et al*., 1984; Kenton & Heywood, 1984; Goldblat & Takei, 1997). Dessa forma, além da poliploidia, Sharma & Talukdar (1960) ressaltam diferentes processos citológicos exercendo papéis importantes no surgimento de novas espécies, tais como aneuploidia, disploidia (alteração do número cromossômico devido a rearranjos estruturais sem ganho ou perda quantitativa ou qualitativa no material genético) e alterações estruturais dos cromossomos. Outro aspecto interessante e frequente na família é a

bimodalidade cariotípica (presença de dois grupos distintos de cromossomos), particularmente comum em Iridoideae (Kenton *et al.*, 1990).

Estudos citogenéticos recentes para espécies brasileiras de Iridaceae têm confirmado números cromossômicos básicos para uma série de espécies de Tigridieae (Alves *et al*., 2011; Souza-Chies *et al*., 2012) e de Trimezieae (Alves *et al*., 2011). Da mesma forma, variação no tamanho dos cromossomos e no conteúdo de DNA também vem sendo observados (Souza-Chies *et al*., 2012); assim como variações cromossômicas numéricas intra e interespecíficas (Alves *et al*., 2011).

5 Biologia, Sistemática e Evolução do Gênero *Sisyrinchium*

Sisyrinchium pertence à subfamília Iridoideae, tribo Sisyrinchieae (Goldblatt & Manning, 2008). Compreende espécies de porte pequeno a médio, perenes ou raramente anuais. As raízes são geralmente densas e grossas, na forma de tubérculos, ou fibrosas. Dentre as características que distinguem as diferentes espécies, destacam-se o formato das folhas e caracteres florais, particularmente, aspectos da organização do androceu. As folhas são lanceoladas a lineares ou do tipo terete. As flores são actinomorfas, de coloração variada como creme, amarelo, violáceo e também azul com o centro amarelo e possuem tépalas livres. Os filamentos podem ser parcialmente conectados ou completamente fusionados formando uma coluna estaminal, podendo apresentar tricomas de diferentes tipos (Goldblatt & Manning, 2008; Chukr & Capellari Jr., 2003).

Sisyrinchium é o maior gênero em número de espécies da família Iridaceae no Novo Mundo e compreende cerca de 140 espécies. Com ampla diversidade morfológica, o gênero corresponde a um grupo diverso de espécies, cuja taxonomia é extremamente complexa. Por essa razão, vem sendo alvo de trabalhos que avaliam diferentes aspectos biológicos na busca de uma melhor resolução taxonômica (Goldblatt & Manning, 2008). A análise de caracteres morfológicos está compreendida na maioria dos estudos (Klatt, 1861; Baker, 1878; Bentham & Hooker, 1883; Ravenna, 2000, 2001, 2002a,b, 2003a,b, 2005, 2007), mas destacam-se também outras abordagens tais como anatomia foliar (Rudall *et al*., 1986; Goldblatt *et al*., 1990), citogenética (Cholewa & Henderson, 1984; Rudall *et al*., 1986; Goldblatt *et al*., 1990), biologia reprodutiva e cruzamentos intra e interespecíficos (Ingram, 1968; Cholewa & Henderson, 1984) aliados à taxonomia.

Os trabalhos de Chauveau *et al*. (2011) e Karst *et al*. (2011) são os mais recentes sobre o gênero, ambos utilizando análises filogenéticas. Chauveau *et al*. (2011) realizaram a primeira e mais extensa análise filogenética do grupo, com 85 espécies amostradas num total de 101 acessos. O estudo baseou-se na análise de oito sequências de DNA de regiões dos genomas plastidial, mitocondrial e nuclear. A partir deste estudo, foi confirmada a monofilia do gênero e novas relações infragenéricas foram propostas através dos nove clados resultantes que pouco se assemelham com as classificações taxonômicas precedentes.

O gênero abrange todo continente americano ocorrendo desde a Groelândia e norte do Canadá até Tierra del Fuego e Ilhas Falkland (Rudall *et al*., 1986). Johnston (1938), a partir de uma análise taxômica de espécies de *Sisyrinchium* provenientes do Brasil, Uruguai e Paraguai, enfatizou a América do Sul como provável centro de origem e dispersão do gênero. Outros estudos vêm sustentando essa hipótese (Goldblatt *et al*., 1990; Cocucci & Vogel, 2001; Goldblatt *et al*., 2008; Chauveau *et al*., 2011), de maneira que o gênero possivelmente tenha surgido entre a Bolívia e o sudoeste dos EUA (Chauveau *et al*., 2011).

Estudos citológicos sobre o gênero começaram a ganhar atenção nos anos de 1940 (Cholewa & Henderson, 1984), no entanto, a maior parte dos estudos trata principalmente de epécies norte-americanas (Ingram, 1968; Henderson, 1976; Cholewa & Henderson, 1984). De maneira geral, a poliploida é considerada um fator de extrema importância na evolução do gênero (Goldblatt, 1982). *Sisyrinchium* possui números cromossômicos altamente variáveis, devido à poliploidia, assim como possíveis eventos de hibridação; e, cromossomos de tamanho geralmente pequeno (Henderson, 1976; Cholewa & Henderson, 1984; Kenton *et al*., 1986; Rudall *et al*., 1986).

Diferentes números cromossômicos básicos ocorrem dentro do gênero (x = 8, 9, 17, 6, 5), mas os mais frequentemente descritos são x = 8 e x = 9. Goldblatt (1982) sugeriu que x = 9 seria o número básico ancestral e x = 8 seria derivado. A reconstrução filogenética do gênero realizada por Chauveau *et al*. (2011) sustenta essa hipótese uma vez que as espécies com número cromossômico básico x = 9 pertencem aos clados que divergiram mais precocemente do ancestral comum.

A determinação do número cromossômico para espécies brasileiras de *Sisyrinchium* tem corroborado a hipótese de que o número básico mais frequente para o gênero na América do Sul seria $x = 9$ (Souza-Chies *et al*., 2012), enquanto na América do Norte seria $x = 8$ (Kenton & Heywood, 1984).

Rudall *et al*. (1986) fazendo referência a trabalhos anteriores que citam a existência de prováveis alopoliploides, achou mais adequado que para espécies com citótipos intermediários tais como *S. elmeri* Greene ($2n = 34$), *S. longipes* (E.P. Bicknell) Kearney & Peebles ($2n = 34$) e *S. jamesonii* Baker ($2n = 68$), cujo número cromossômico básico seria $x = 17$, fosse adotado $x = 8 + 9$, ou $x_2 = 17$ para indicar sua natureza derivada e sua origem poliploide.

Os estudos que englobam espécies sul-americanas apontam para duas tendências, (i) ocorrência de um número considerável de espécies poliploides e (ii) uma presença maior de poliploides com níveis de ploida menores do que aqueles encontrados nas espécies do Hemisfério Norte (Kenton & Heywood, 1984). Uma correlação positiva entre nível de ploidia e latitude tem sido reportada para Iridaceas do Hemisfério Norte, de maneira que plantas com altos níveis de ploidia ($6x$ - $12x$) ocorrem em latitudes maiores (Goldblatt, 1982; Kenton *et al*., 1986; Rudall *et al*., 1986).

Com relação à variação no tamanho do genoma, a partir da análise do banco de dados disponível no "Plant DNA C-values" (http://www.rbgkew.org.uk/cval/homepage.html; Bennett & Leitch, 2010), é possível verificar que aproximadamente 6% das espécies de Iridaceae têm a quantidade de DNA estimada, sendo que para *Sisyrinchium*, as estimativas são para aproximadamente 31% das espécies, sendo a maioria originária do Hemisfério Norte.

Pressuporía-se que a quantidade de DNA de um núcleo gamético não replicado, ou tamanho holoploide do genoma, independente do nível de ploidia (valor de 1C) aumentaria de forma direta e proporcional com o nível de ploidia (Leitch & Bennett, 2004). No entanto, tem sido observado para muitos táxons que o valor 1C não aumenta de forma direta e proporcional conforme ocorrem incrementos no nível de ploidia. Da mesma forma, existe uma tendência de redução no tamanho monoploide do genoma (1Cx) de poliploides em relação aos diploides (Leitch & Bennett, 2004). Kenton *et al*. (1986) mencionam que para *Sisyrinchium*, Cx é praticamente constante entre poliploides de nível de ploidia

superior (6*x* - 12*x*), mas muito menor do que em diploides. Da mesma forma, Leitch & Bennet (2004) através de revisão de valores disponíves na literatura, relacionam *Sisyrinchium* entre os vários gêneros para os quais descrevem uma tendência de redução em Cx em poliploides.

Kenton *et al*. (1986) mencionam forte correlação positiva entre Cx e latitude para espécies diploides de *Sisyrinchium* com $x = 9$ no Hemisfério Sul. No entanto, não encontraram correlação entre Cx e latitude quando espécies com outros valores básicos de *x* e poliploides foram inclusos na análise de regressão.

Te Best *et al*. (2012) ressaltam que enquanto espécies vegetais herbáceas com pequenos genomas podem apresentar diferentes modos de vida, os representantes correlatos com genomas maiores são obrigatoriamente perenes. Para *Sisyrinchium*, Kenton *et al*. (1986) relatam que apesar da dificuldade de correlacionar perenidade e anualidade com tamanho do genoma (Cx) devido à rara ocorrência de espécies anuais, dados sugerem que tais espécies tendem a ter genomas pequenos.

Considerando aspectos reprodutivos do gênero, a maior parte dos estudos existentes data de 30 a 50 anos atrás e englobam complexos de espécies do Hemisfério Norte (Ingram, 1968; Henderson, 1976; Cholewa & Henderson, 1984). De forma geral, esses trabalhos buscam elucidar as relações taxonômicas do gênero frente à ampla complexidade morfológica do mesmo avaliando aspectos relacionados com os modos de reprodução e sistemas de cruzamento das espécies, assim como a compatibilidade genética existente entre populações conspecíficas e interspecíficas.

A respeito da reprodução vegetativa no gênero, Cholewa & Henderson (1984) a partir de um estudo biossistemático de populações de várias espécies do gênero *Sisyrinchium* coletadas na região das Rocky Mountains no Canadá, mencionaram a formação de plântulas férteis a partir do eixo das duas brácteas florais em plantas coletadas e mantidas em casa de vegetação.

Acerca da reprodução sexual, muitas espécies são autocompatíveis, sendo a autofertilização variável conforme a expressão de sistemas de distanciamento físico e temporal dos estames em relação ao estigma.

Apesar de que algumas espécies de *Sisyrinchium* pareçam não possuir diferença no tempo de maturação dos estigmas e das anteras (*S. minus* Engelm. & A. Gray, *S.*

minutiflorum Klatt e *S. platense* I.M. Johnst.) (Devoto & Medan, 2008), muitas espécies de *Sisyrinchium* são protrândricas, de maneira que as anteras maturam antes mesmo que a flor abra e algumas horas antes do estigma estar receptivo, promovendo a fecundação cruzada em detrimento da autofertilização. Esse fenômeno já foi descrito para *S. idahoense* E.P. Bicknell, que mesmo apresentando autocompatibilidade, possui dois sistemas que facilitam a fecundação cruzada, separação física (heterostilia) e distanciamento temporal de 24 h entre a maturação das anteras e do estigma (protrandria). A heterostilia é um polimorfismo sexual controlado geneticamente no qual diferentes variantes morfológicas de uma determinada espécie diferem em relação ao comprimento dos estames e do estilete (Ganders, 1979). Além de *S. idahoense*, esse fenômeno também foi descrito para *S. bermudianum* L. No caso de *S. bermudianum*, Ingram (1968) menciona a ocorrência de populações expressando diferentes graus de longistilia (distilia na qual as flores apresentam estiletes longos e estames curtos) e que essa variação poderia estar relacionada com mudanças ambientais.

A distilia tem registro para 26 famílias vegetais, dentre elas Iridaceae, mas a presença de correlação entre essa característica e nível de ploidia parece estar limitada às Primulaceae e Rubiaceae segundo Naiki (2012). No entanto, o processo de poliploidia não parece ser responsável pela quebra da heterostilia de diploides para poliploides (Naiki, 2012).

Henderson (1976) observou que apesar da protrandria ocorrer de forma preponderante em espécies de *Sisyrinchium* do Noroeste do Pacífico, ela é muito mais pronunciada em táxons octoploides (8*x*) do que em tetraploides (4*x*). No entanto, em dodecaploides (12*x*) a expressão da protrandria se assemelha a de espécies tetraploides.

Henderson (1976) e Cholewa & Henderson (1984) sugerem uma associação entre sistema de cruzamento e nível de ploidia, de maneira que a autocompatibilidade e a ocorrência de autofecundação juntas constituem uma característica frequente em táxons com altos níveis de ploidia (superior a 4*x*), enquanto tetraploides tendem a ser autoincompatíveis ou realizam alogamia mesmo sendo autocompatíveis. Barringer (2007) mostra que independentemente do modo de vida da espécie vegetal (anual, perene herbácea e perene arbórea), as taxas de autofecundação são maiores em poliploides do que em seus correlatos diploides. Para *Sisyrinchium*, Henderson (1976) partindo do exposto por

Grant (1971) de que em geral, espécies herbáceas perenes e diploides apresentam maiores taxas de autoincompatibilidade e de fecundação cruzada do que seus correspondentes poliploides, sugere que os tetraploides investigados em seu estudo tenderiam a apresentar um padrão semelhante ao de outros grupos de plantas herbáceas perenes e diploides.

Trinta e cinco por cento das espécies possui flores com estruturas secretoras de lipídeo chamadas de elaióforos, distribuídas principalmente na América do Sul. Tais estruturas são tricomas glandulares que podem localizar-se tanto na coluna estaminal quanto na face adaxial das tépalas, ou mesmo em ambas as partes (Cocucci & Vogel, 2001). Os lipídeos secretados são coletados essencialmente por fêmeas de algumas espécies de abelhas da tribo Tapinotaspidini (Hymenoptera: Apidae) equipadas com estruturas especializadas na coleta de lipídeos florais (Cocucci & Vogel, 2001; Alves-dos-Santos *et al*., 2007). Chauveau *et al*. (2011) a partir da reconstrução filogenética do gênero e da análise da distribuição das espécies secretoras de lipídeos florais através da mesma, sugerem que tais tricomas glandulares podem ter exercido um papel fundamental na diversificação de *Sisyrinchium.*

Para espécies de *Sisyrinchium* cujo único recurso floral é o pólen, existe registro de forrageamento para pólen por abelhas solitárias do gênero *Lasioglossum* Curtis, 1833 (Hymenoptera: Apoidea: Halictidae: Halictinae) (Cholewa & Henderson, 1984); e da família Megachilidae (Henderson, 1976) para espécies da América do Norte. Para as espécies sul-americanas, abelhas da família Halictidae e Apidae têm sido observadas como visitantes florais de *S. palmifolium* L. (Cocucci & Vogel, 2001). Para *S. vaginatum* Spreng., a prevalência de abelhas da família Halictidae ou de sirfídeos como visitantes florais parece estar diretamente relacionada com padrões climáticos, pois a abundância e diversidade de abelhas é reduzida durante períodos de frio e seca (Freitas & Sazima, 2003).

5.1 A espécie em estudo: *Sisyrinchium micranthum* Cav.

Sisyrinchium micranthum é uma das raras espécies do gênero que são descritas como anuais (Goldblatt & Manning, 2008). A espécie caracteriza-se por possuir folhas planas e lineares; hastes florais achatadas e inflorescências do tipo ripídio, inseridas em pedúnculos evidentes e terminais; flores delicadas, trímeras, de coloração azul violáceo, amarela, creme ou rosada, com perigônio em forma de taça e tépalas patentes (Chukr & Capellari Jr, 2003); filetes unidos na metade a dois terços de seu comprimento, com tubo

estaminal inflado em direção à base (Johnston, 1938); elaióforos distribuídos na parte inferior mais espessa do tubo estaminal e ao longo da nervura mediana de cada tépala (Cocucci & Vogel, 2001; Chauveau *et al*., 2011). Na **Figura 2** é possível observar algumas das características relatadas para a espécie.

A espécie ocorre entre México e Argentina e, provavelmente, de forma naturalizada na Austrália, Malásia e Ilhas Fiji (Innes, 1985). No Brasil, a espécie habita diferentes ambientes, tais como campos, bosques abertos e locais antropizados. Sua distribuição ocorre ao longo dos estados do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP) e Rio de Janeiro (RJ) (Johnston, 1938; Schlindwein, 1995; Santos, 1996; Harter, 1999; Truylio *et al*., 2002). *Sisyrinchium micranthum* ocupa regiões correspondentes a dois Biomas, Mata Atlântica e Pampa, sendo o último mais representativo da sua distribuição geográfica no RS.

A espécie apresenta ampla variabilidade morfológica relatada em vários trabalhos (Chukr & Capellari, 2003; Chauveau *et al*., 2011; Indrusiak, 2012; Tacuatiá *et al*., 2012a,b). Essa acentuada variação é facilmente observada em expedições a campo, de maneira que diferentes combinações de aspectos morfológicos podem ser observadas na natureza. Baseando-se nessas combinações de caracteres que caracterizam diversos perfis vegetais, três tipos morfológicos podem ser identificados e categorizados em CI, CII e CIII (Tacuatiá *et al*., 2012b) (**Figuras 3** e **4**).

Tendo em vista a ampla variabilidade fenotípica observada e a escassez de dados citogenéticos para a espécie, Tacuatiá *et al*. (2012b) avaliaram diferentes populações de *S. micranthum* ao longo do RS quanto a diferenças morfológicas, aspectos citogenéticos e de agrupamento genético. Em tal estudo, foram avaliados os diferentes padrões morfológicos associados com tamanho da planta, como o número de entrenós da haste floral; e, comprimentos da haste floral, do entrenó basal, do pedúnculo, das brácteas internas e externas e da coluna estaminal. As análises citogenéticas englobaram determinação do número cromossômico haploide, análise do comportamento meiótico, estimativas da viabilidade polínica e do tamanho do grão de pólen. As análises moleculares compreenderam avaliação da diversificação genética a partir de marcadores moleculares do tipo "Inter Simple Sequence Repeats" (ISSR).

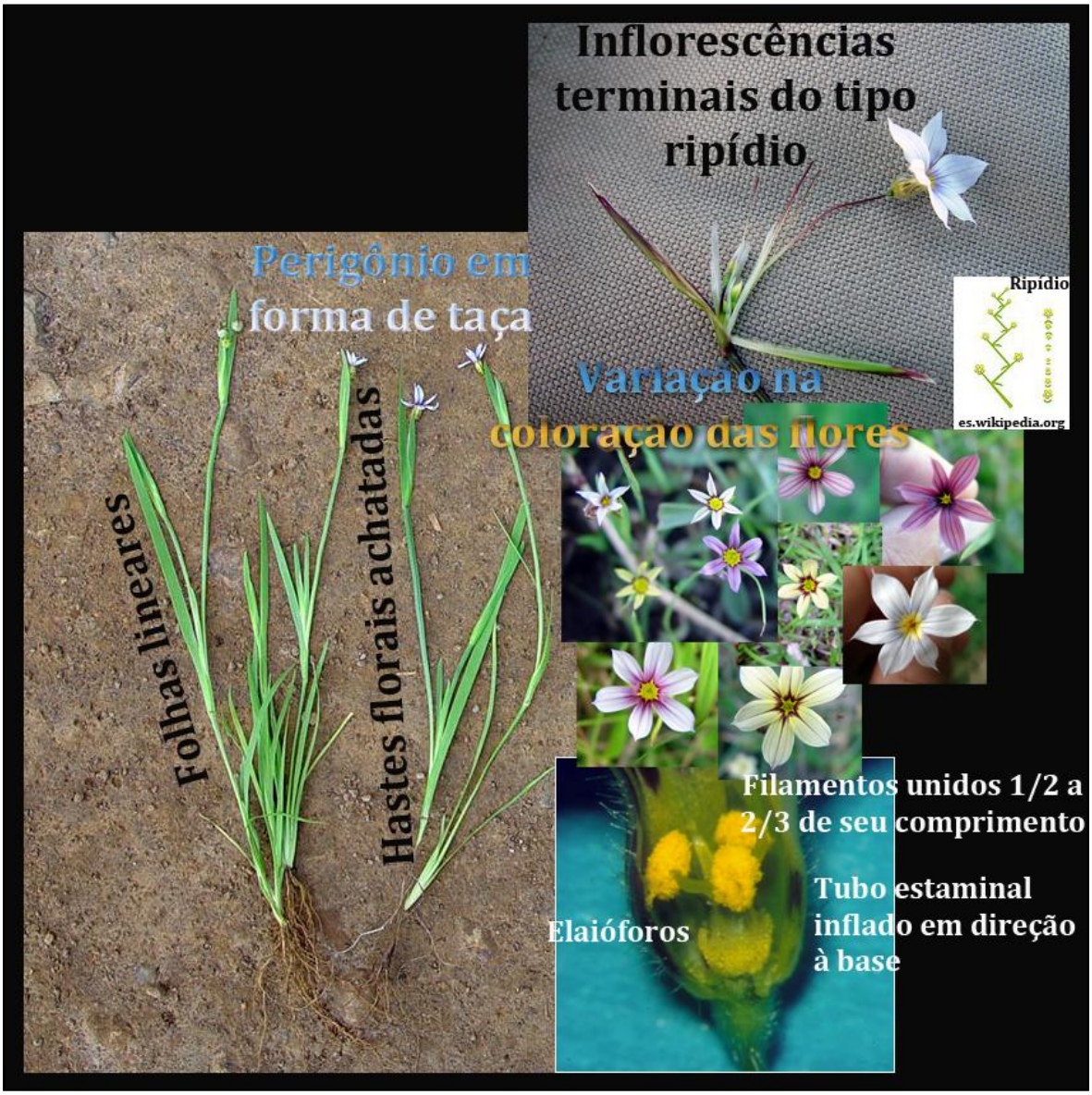


Figura 2. Principais características morfológicas de *Sisyrinchium micranthum*.

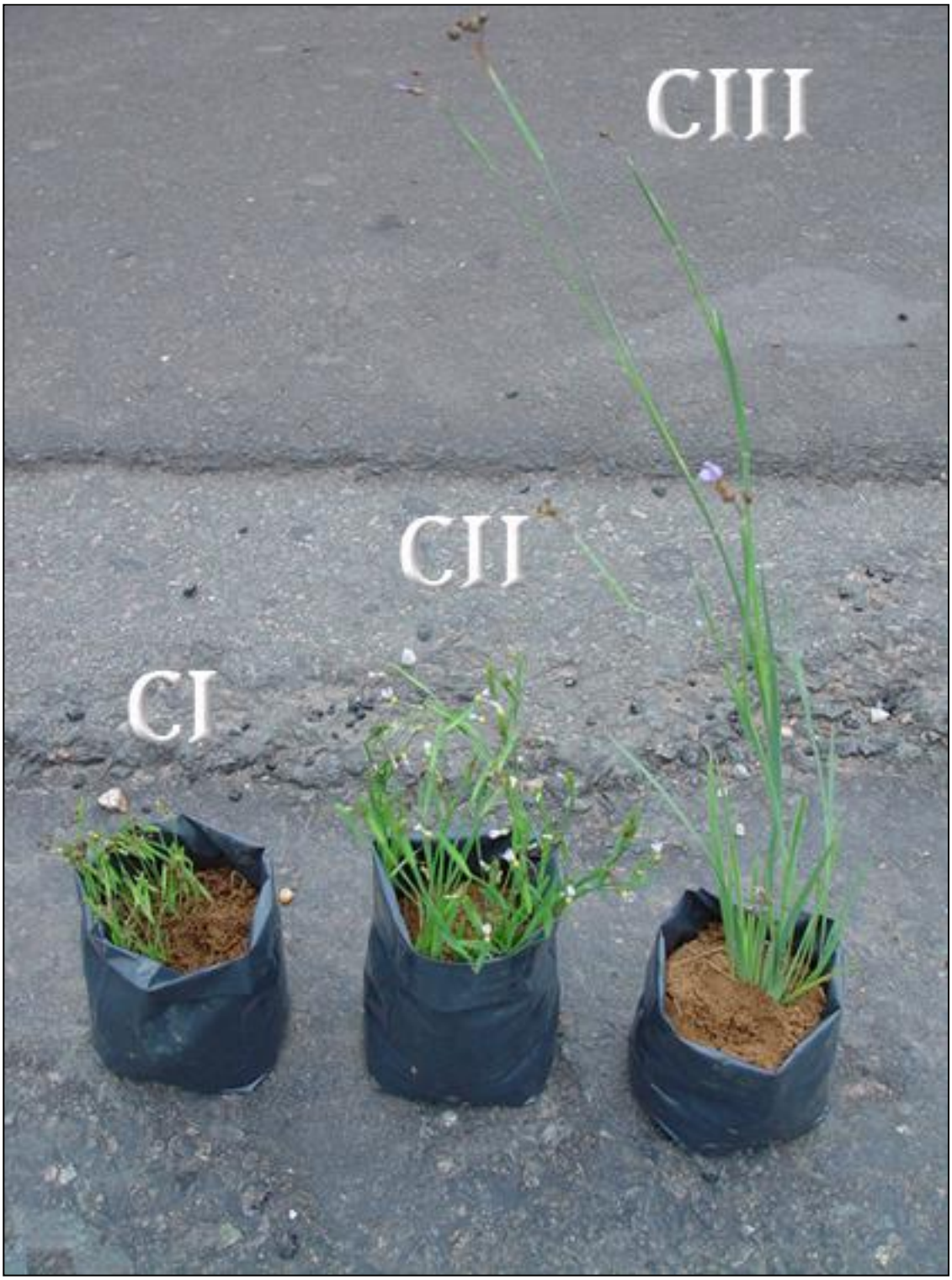


Figura 3. Detalhe do porte dos três tipos morfológicos identificados para *Sisyrinchium micranthum* e categorizados em CI, CII e CIII.

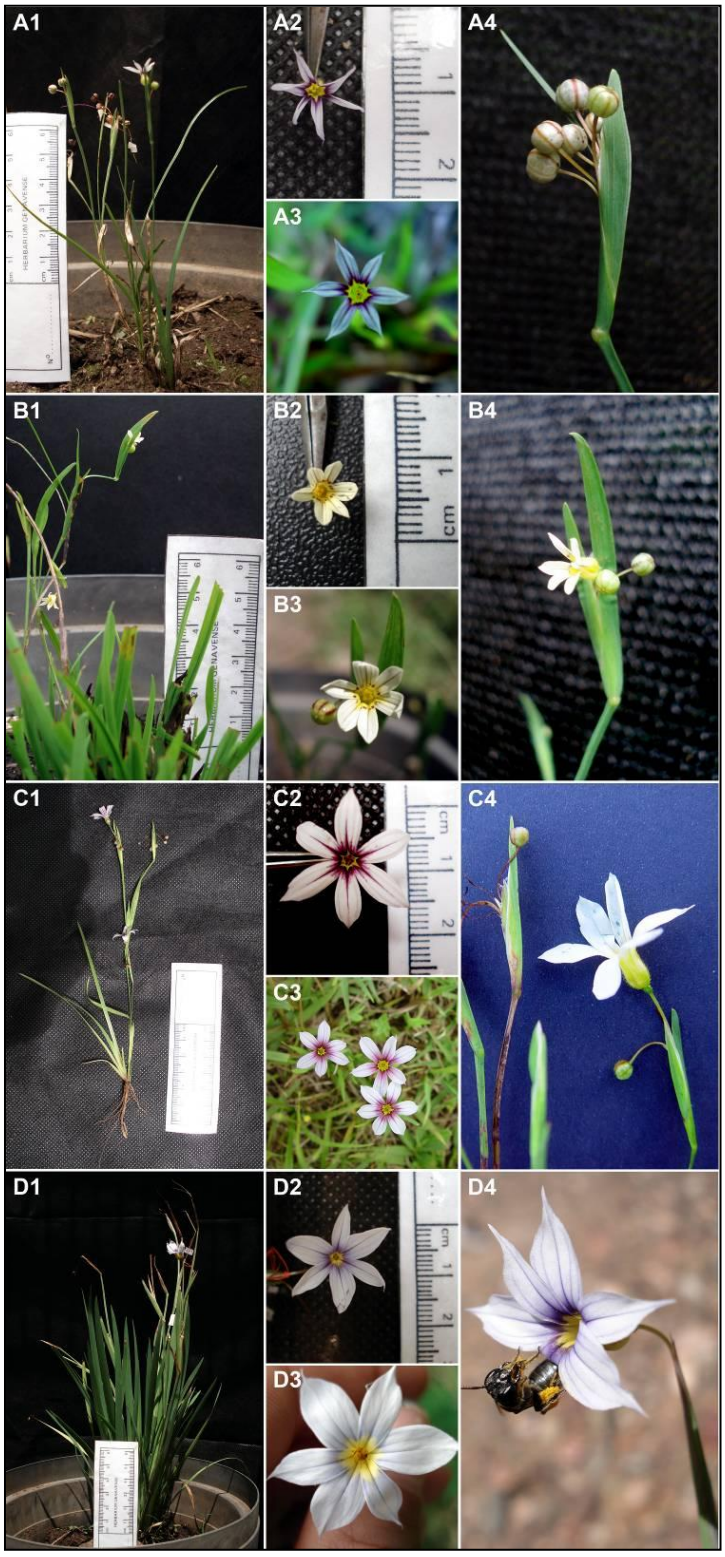


Figura 4. A-D. Categorias morfológicas de *Sisyrinchium micranthum*. **1.** Planta. **2-3.** Detalhes da flor. **4.** Detalhe da flor e/ou bráctea, e/ou frutos. **A.** Categoria CI com flores violáceas (CI-V). **B.** Categoria CI com flores brancas (CI-W). **C.** Categoria CII. **D.** Categoria CIII.

A partir dessas análises foi observado que as categorias CI e CII não diferiram estatisticamente para maioria dos caracteres morfológicos avaliados, com diferença apenas no número de entrenós, sendo maior em plantas CII do que em CI. No entanto, as categorias diferiram em relação ao diâmetro floral total e da fauce, características florais importantes que não foram mensuradas e incluídas nas análises devido ao fato de que quando herborizadas, as flores perdem essa informação (**Figura 5**). Com relação aos dados citogenéticos, dois números cromossômicos que já haviam sido descritos na literatura para outros países (Goldblatt, 1982; Kenton & Heywood, 1984; Goldblatt & Takei, 1997), foram confirmados (n = 16, $2n = 4x = 32$; n = 24, $2n = 6x = 48$), e plantas diploides (n = 8; $2n = 2x = 16$) foram descritas pela primeira vez, mostrando a existência de uma série poliploide para a espécie (**Figura 6B-D**). Altos índices de comportamento meiótico e de vialidade de pólen foram encontrados com poucas anormalidades (**Figura 6E-I**) observadas tanto para diploides quanto para poliploides, indicando que os poliploides são citogeneticamente diploidizados. Além disso, os resultados desses estudos sugeriram correlação positiva entre o comprimento da antera e as categorias morfológicas, assim como entre nível de ploidia e tamanho do grão de pólen (a **Figura 6A** ilustra as medidas dos eixos do grão de pólen). Apesar das plantas de porte menor (CI) terem apresentado grãos de pólen e níveis de ploidia maiores, não foi encontrada relação direta quanto às categorias morfológicas, números cromossômicos e variação genética, salientando a complexidade da espécie. Além disso, com altos índices de viabilidade de pólen e comportamento meiótico normal, a origem da poliploidia permaneceu incerta (Tacuatiá *et al*., 2012b). Os autores relatam ainda dois números cromossômicos distintos para uma mesma população, indicando que algumas populações podem na verdade ser compostas por espécimes com diferentes níveis de ploidia (Tacuatiá *et al*., 2012b). Dessa forma, os autores concluíram que os diferentes tipos morfológicos categorizados em CI, CII e CIII correspodem realmente a um mesmo táxon, cuja complexidade deve estar relacionada a um contínuo processo de especiação fortemente associado com processos de poliploidização.

Devido à ampla variabilidade fenotípica da espécie, na análise filogenética do gênero *Sisyrinchium* realizada por Chauveau *et al*. (2011), foram incluídos espécimes de *S. micranthum* de diferentes tipos morfológicos e de diferentes regiões. Na árvore filogenética obtida, o complexo de *S. micranthum* forma um grupo monofilético contido no Clado VII juntamente com outras duas espécies relacionadas, *S. laxum* Otto ex Sims e *S.*



Figura 5. Diferenças morfológicas entre os três tipos morfológicos de *Sisyrinhium micranthum* - CI, CII e CIII.

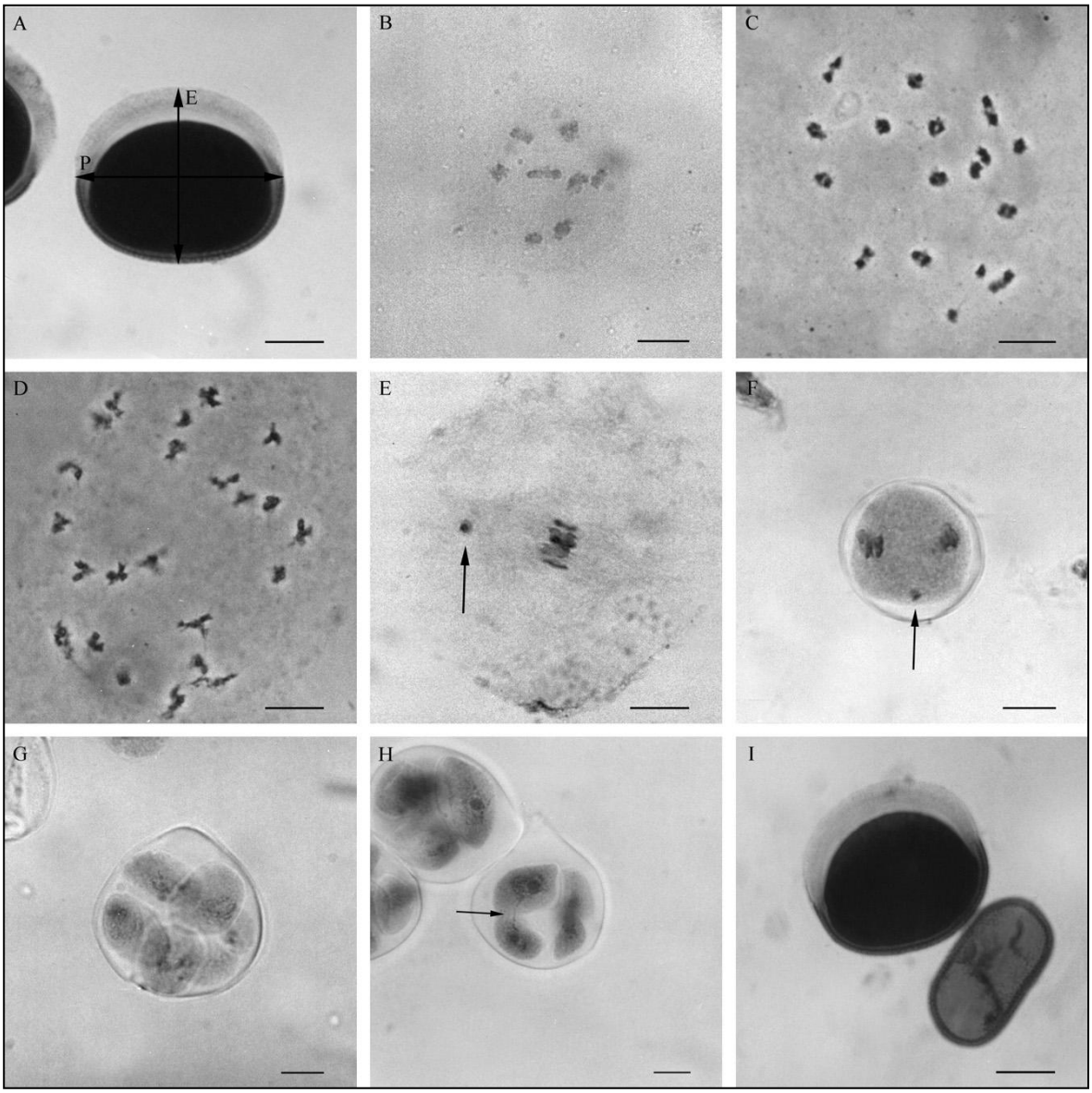


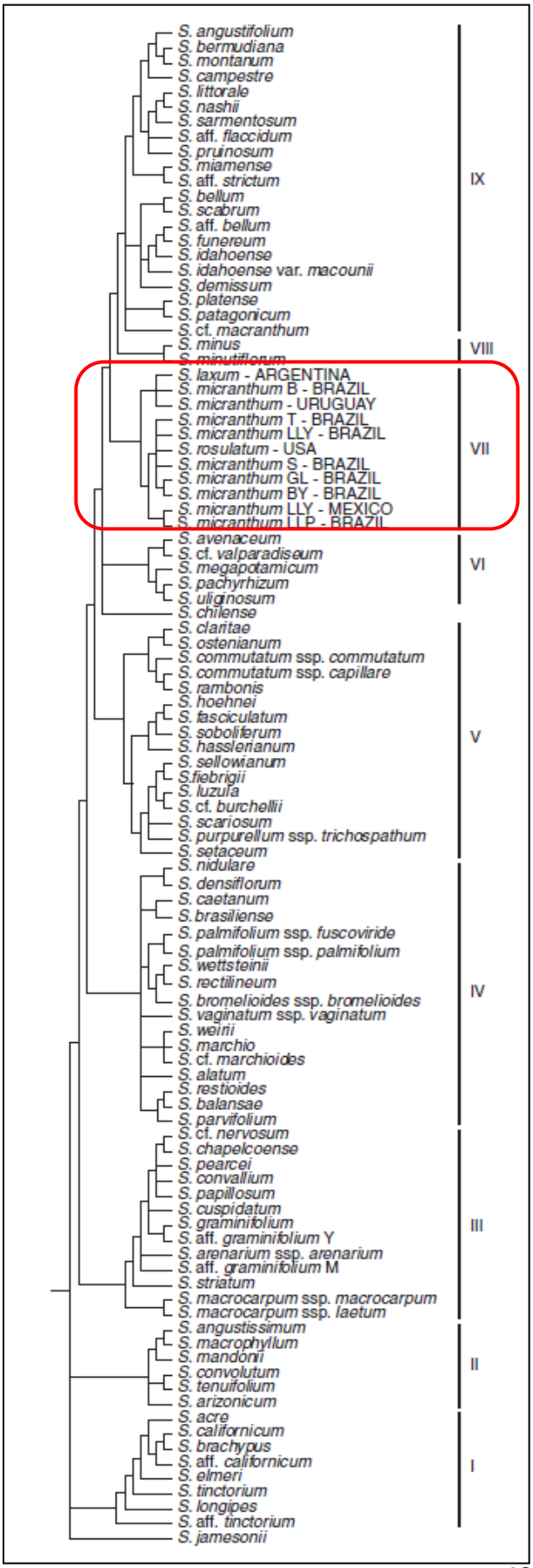
Figura 6. Análises citogenéticas para acessos (pontos de coleta) de *Sisyrinchium micranthum* do Rio Grande do Sul, Brasil. **A.** Medidas do grão de pólen (P, eixo polar; E, diâmetro equatorial). **B-D.** Três citótipos encontrados; células-mãe-de-pólen em diacinese. **B.** *n* = 8. **C.** *n* = 16. **D.** *n* = 24. **E-I.** Algumas irregularidades meióticas encontradas e análise polínica. **E.** Metáfase I com cromossomo desalinhado. **F.** Telófase I com um cromossomo retardatário. **G.** "Tétrade" com seis microspores. **H.** Tétrade com ponte cromossômica. **I.** Grãos-de-pólen viável (escuro e maior) e inviável (claro e menor). Escala = 10 µm (Tacuatiá *et al*., 2012b).

rosulatum E.P. Bicknell, espécies já previamente consideradas como sinonímias a *S. micranthum* (**Figura 7**).

Um estudo recente quanto à genética de populações de *S. micranthum* aponta para populações altamente estruturadas (Tacuatiá *et al*., 2012a). Tal estudo priorizou a coleta de populações dentro do Parque Estadual de Itapuã no município de Viamão, Brasil, e baseou-se na análise de marcadores moleculares de DNA do tipo ISSR. Pôde-se obervar que apesar do número de populações estudadas restringir-se a cinco, tal estudo traz grandes contribuições a repeito da biologia da espécie. A partir da análise molecular da variância (AMOVA) foi possível verificar altos níveis de estruturação genética populacional (ϕ_{ST} = 0.3372). Um dos fatores que podem contribuir para tal é o fato da espécie ser polinizada por abelhas coletoras de lipídeo da tribo Tapinotaspidini. Essas abelhas possuem hábito solitário e costumam nidificar no solo (Aguiar *et al*., 2004) próximo à área onde forrageiam. Esse hábito pode resultar num baixo fluxo gênico entre diferentes populações e consequentemente, na diferenciação genética entre as mesmas. Além de abelhas especializadas na coleta de lipídeos florais, sirfídeos e pequenas abelhas coletoras de pólen também constam como visitantes florais de *S. micranthum* (Truylio *et al.*, 2002; Freitas & Sazima, 2006).

O período de floração de *S. micranthum* inclui os meses de outubro a janeiro (Truylio *et al*., 2002), podendo haver variações conforme a intensidade do verão. De acordo com o trabalho realizado por Truylio *et al*. (2002) sobre biologia floral e polinização de *S. micranthum*, a espécie é autoincompatível e apresenta flores protogínicas (os estigmas tornam-se receptivos antes do oferecimento de pólen). Nesse estudo, as flores de *S. micranthum* foram visitadas por seis espécies de abelhas, sendo *Lanthanomelissa betinae* Urban, 1995 (Hymenoptera: Apidae: Tapinotaspidini) a espécie que apresentou maior frequência de visitas e constitui, portanto, o principal polinizador de *S. micranthum* (Truylio *et al*., 2002). Também foi observada a presença de lipídeo nas cargas de fêmeas de *L. betinae*, provavelmente coletado das flores de *S. micranthum.* Outros trabalhos descreveram também interações semelhantes entre *S. micranthum* e *L. betinae* (Rozen Jr. *et al*., 2006) e entre outras espécies de *Lanthanomelissa* Holmberg, 1903 (Cocucci & Vogel, 2001).

Figura 7. Posição filogenética de *Sisyrinchium micranthum*, *S. laxum* et *S. rosulatum* (Clado VII) na árvore filogenética consenso do gênero *Sisyrinchium* (de acordo com Chauveau *et al*., 2011).



OBJETIVOS

O presente estudo está agregado a um projeto mais amplo que visa contribuir para o conhecimento da biologia e evolução das espécies brasileiras de *Sisyrinchium* (Iridaceae). Frente à complexidade inerente ao gênero *Sisyrinchium*, bastante presente na espécie em estudo, *Sisyirinchium micranthum*, este projeto visa investigar características genéticas e citogenéticas de *S. micranthum*, assim como aspectos da biologia reprodutiva, a fim de contribuir para o conhecimento taxonômico, reprodutivo e evolutivo da espécie. Tais informações serão também importantes para futuros estudos relacionados ao gênero *Sisyrinchium*.

Objetivos específicos:

- Desenvolver um grupo de marcadores moleculares do tipo microssatélites para *Sisyrincium micranthum*;
- A partir do emprego de tais marcadores, avaliar a variabilidade genética intra e interpopulacional de populações de *S. micranthum* na região sul do Brasil (SC, PR, RS);
- Determinar o número cromossômico para novos acessos no RS e realizar contagens cromossômicas para amostras dos estados de SC e PR. Como num mesmo local de coleta é possível encontrar diferentes categorias morfológicas de *S. micranthum*, a palavra **acesso** será utilizada para definir um agrupamento de indivíduos de um mesmo ponto geográfico, com semelhantes características morfológicas, que possivelmente constituem uma população;
- Estimar o conteúdo de DNA e o tamanho do genoma para os diferentes níveis de ploidia de *S. micranthum*;
- Avaliar a variabilidade intraespecífica quanto à localização de locos de genes de DNA ribossomal em cromossomos mitóticos de *S. micranthum*. Da mesma forma, avaliar tais aspectos de maneira comparativa entre *S. micranthum* e duas outras espécies relacionadas *S. laxum* e *S. rosulatum*, que compõe o Clado VII da filogenia de Chauveau *et al*. (2011);
- Avaliar diferentes categorias morfológicas em relação à presença de autocompatibilidade e capacidade de autofertilização; assim como investigar

a capacidade de formação de frutos através de cruzamentos artificiais entre diferentes categorias morfológicas de *S. micranthum*. Considerando que *S. micranthum* e *S. laxum* ocorrem simpatricamente em algumas regiões do RS e o fato de que já foram consideradas espécies sinonímias, avaliar a autocompatibilidade e capacidade de autofertilização em *S. laxum*, assim como investigar a capacidade de formação de frutos a partir de cruzamentos artificiais entre as duas espécies.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1 La Famille des Iridaceae

La famille des Iridaceae appartient à l'ordre des Asparagales (APG III, 2009). C'est une famille relativement importante au sein des monocotylédones, avec plus de 2030 espèces réparties en 65 à 75 genres (Goldblatt *et al*., 2008). Les espèces représentatives de la famille des Iridacées se retrouvent préférentiellement dans des environnements ouverts comme les champs, les plaines humides et les zones rudérales. Ce sont des plantes herbacées vivaces, rarement annuelles, avec de nombreux genres bulbeux.

Les Iridacées peuvent être reconnues par leur périanthe ou corolle pétaloïde, de sorte que les pétales et les sépales sont semblables dans la forme et la texture et, souvent, en couleur. Parmi les caractères distinctifs des Iridacées au sein des Asparagales, une androcée réduite à trois étamines constitue une singularité majeure, alors que dans la plupart des autres familles apparentées, l'androcée a six étamines (Goldblatt & Manning, 2008). Considérant l'aspect végétatif, les espèces de la famille des Iridaceae présentent des feuilles basales en nombre variable, de forme cylindrique ou plat, linéaire ou ensiformes, souvent inaperçues dans la couverture herbacée.

La famille possède des représentants de grande importance économique et ornementale tels que *Gladiolus* L., *Iris* L., *Freesia* Klatt, *Crocus* L. et *Watsonia* Miller (Goldblatt *et al*., 1998). Parmi celles-ci, le genre *Gladiolus* possède plusieurs espèces connues au Brésil comme « palma-de-santa-rita », de leur nom populaire. Le safran, produit à partir des stigmates des fleurs de *Crocus sativus* L., constitue un condiment de coloration rouge très apprécié dans l'art culinaire.

La famille des Iridaceae possède une longue histoire de tentatives de classement infrafamilial, ainsi que les premières études basées sur des caractères morphologiques ont commencé au XIXe siècle (Goldblatt & Manning, 2008). Goldblatt (1990) a proposé une analyse cladistique de la famille en englobant l'observation de caractères morphologiques, anatomiques, embryologiques, d'ultrastructure de pollen, de cytologie et de phytochimie. Cette étude a abouti à la division de la famille en quatre sous-familles : Isophysidoideae, Nivenioideae, Iridoideae et Ixioideae. Quatre tribus ont été egalement identifiées parmi les Iridoideae (Sisyrinchieae, Irideae, Mariceae et Tigridieae) et trois (Watsonieae, Ixieae et Pillansieae) parmi les Ixioideae.

Une série d'études moléculaires en utilisant des séquences d'ADN a commencé à la fin du XXe siècle, de manière que l'étude de Souza-Chies *et al*. (1997), en utilisant le gène chloroplastique *rps*4, était pionnière dans les reconstructions phylogénétiques moléculaires de la famille. Une étude phylogénétique récente menée par Goldblatt *et al.* (2008) basée sur le séquençage de cinq régions de l'ADN chloroplastique, propose la reconnaissance des nouvelles sous-familles. La famille des Iridaceae est, actuellement, subdivisée en sept sous-familles : Isophysidoideae, Nivenioideae, Iridoideae, Crocoideae, Aristeoideae, Geosiridoideae et Patersonioideae. La sous-famille des Iridoideae comprend cinq tribus : Tigridieae, Trimezieae, Sisyrinchieae, Irideae et Diplarreneae, tandis que la sous-famille Crocoideae comprend les tribus Croceae, Freesieae, Gladioleae, Watsonieae et Tritoniopsideae (**Figure 1**).

Les Iridaceae auraient divergés il y a environ 82 millions d'années, durant le Crétacé supérieur (Campanien), dans lequel l'Antarctique et l'Australie formaient un super continent. La famille des Iridaceae a une distribution presque cosmopolite, se produisant dans les régions tempérées et tropicales. Elle a pour origine l'hémisphère Sud, et se trouve principalement en Afrique subsaharienne, Amérique du Sud et Centrale, ces zones abritant la majeure partie de la diversité observée (Goldbaltt *et al*., 2008).

1.1 La famille des Iridaceae au Brésil

Au Brésil, la famille est représentée par 18 genres (12 se trouvent dans le sud du Brésil) et 160 espèces, dont 64 sont endémiques. En termes de diversité et d'abondance, les genres les plus importants sont *Sisyrinchium* L. (58 espèces), *Neomarica* Sprague (21 specèces, *Pseudotrimezia* RC Foster (21 espèces), *Trimezia* Salisb. ex. Herb (14 spèces) et *Cypella* Herb. (14 espèces) (Eggers *et al*., 2010).

2 Biologie de la Reproduction : Aspects Généraux

La multiplication asexuée et / ou la multiplication sexuée constituent les deux modes de reproduction que l'on peut observer dans le monde végétal. La multiplication asexuée est elle même subdivisée en deux catégories : la reproduction végétative et l'apomixie (Cavalli, 2003). Dans la reproduction végétative, de nouveaux individus sont formés à partir de la divisin d'organes particuliers comme les stolons, les rhizomes ou les tiges souterraines ; les oignons, les bulbes ou les tubercules ; les racines ou des pousses ; et, les feuilles (Karasawa, 2009). La reproduction apomictique se caracterise

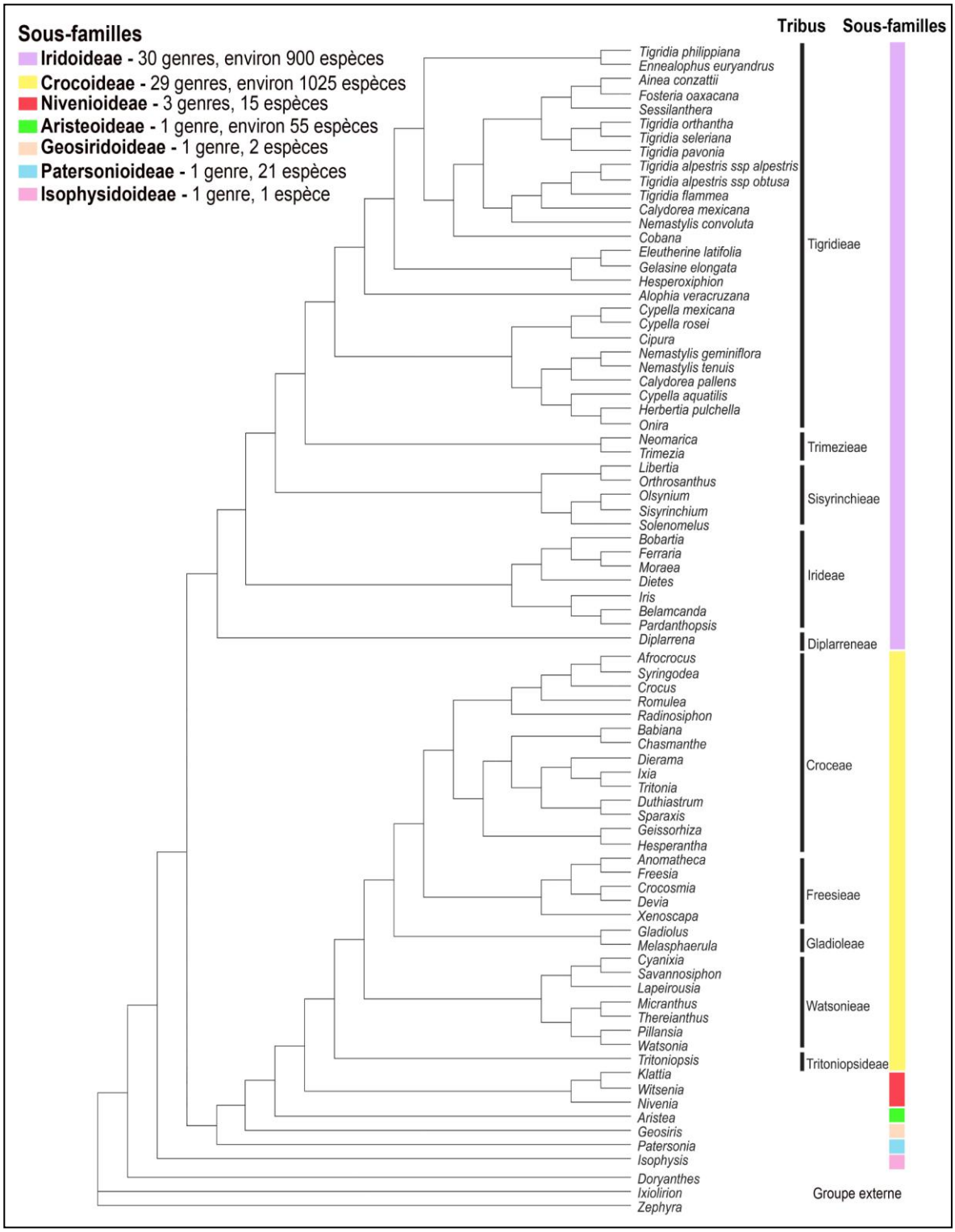


Figure 1. Phylogénie moléculaire des Iridaceae. Les sous-familles et leurs tribus sont indiquées par les barres verticales. La légende contient le nom des sous-familles, le nombre de genres et d'espèces correspondants (d'après Goldblatt *et al*., 2008).

par la formation de l'embryon à partir d'une cellule somatique de l'ovule, de sorte que les graines fertiles sont formés uniquement à partir de cellules maternelles sans apport de gamètes mâles (Cavalli, 2003; Karasawa, 2009).

Les deux modes de reproduction (sexuée et asexuée) peuvent être observés dans la famille des Iridaceae. En ce qui concerne la reproduction asexuée par multiplication végétative, la formation des bulbes est fréquente chez les espèces de la tribu des Tigridieae et chez certaines espèces d'iris (Iridoideae: Irideae), tandis que les cormes se produisent dans les espèces des sous-familles Crocoideae et Iridoideae (tribu Irideae) (Goldblatt & Manning, 2008). La reproduction apomictique n'a pas été observée parmi les Iridaceae jusqu'a présent.

La reproduction sexuée peut être subdivisé en trois catégories selon la forme de croisement : autogamie (l'autofécondation), allogamie (la fécondation croisée) et système mixte (d'autogamie et d'allogamie) (Karasawa, 2009).

Parmi les mécanismes qui facilitent la fertilisation croisée, se distinguent les systèmes d'auto-incompatibilité et les systèmes de disjonction des sexes dans l'espace et dans le temps, qui alternent la réceptivité du stigmate et la maturation du pollen (Karasawa, 2009). L'autopollinisation se produit seulement chez les espèces végétales autocompatibles. Mais toutes les espèces autocompatibles n'effectuent pas forcément l'autofécondation de façon spontanée, la fécondation croisée pouvant être favorisée par les systèmes de disjonction des sexes mentionnés ci-dessus. Les facteurs écologiques tels que la densité des populations de plantes, le nombre des fleurs par plante, le syndrome de pollinisation et de variations dans la disponibilité et le comportement des pollinisateurs influencent directement les taux de fécondation croisée (Franceschinelli & Bawa, 1999).

2.1 Aspects particuliers de la biologie de la reproduction au sein des Iridaceae

Le système de reproduction prépondérant parmi les espèces d'Iridaceae est la fécondation croisée. Celle-ci est facilitée, dans la majorité des espèces d'Iridaceae, par protandrie (maturation des anthères avant que le stigmate soit réceptif), les stigmates devenant réceptifs de quelques heures à 1-3 jours après la libération du pollen. La séparation spatiale des anthères et des stigmates joue aussi un rôle prépondérant dans ce mécanisme. Néanmoins, il existe des espèces auto-incompatibles et des espèces

autocompatibles. Parmi les espèces autocompatibles il existe des espèces autogames, mais aussi des allogames, ou avec un système mixte de reproduction. Chez les espèces auto-incompatibles, le système d'auto-incompatibilité est gamétophytique, et peut être exprimé dans l'ovaire, ou même dans l'ovule, en fonction de l'espèce (Goldblatt & Manning, 2008).

2.2 Biologie de la pollinisation de la famille des Iridaceae

La famille Iridaceae a de fleurs avec une grande variété de formes et de couleurs. Elle se caractérise par un large éventail de syndromes de pollinisation (Rudall *et al*., 2003) et des relations hautement spécialisées avec leur pollinisateurs en Afrique subsaharienne (Goldblatt & Manning, 2006). En effet, 95% des espèces sont pollinisées par une ou quelques espèces d'insectes et d'autres animaux, alors que seulement 3% sont visités par une plus large gamme de pollinisateurs (en Afrique subsaharienne) (Goldblatt & Manning, 2008).

Les resources florales offertes sont constituées de nectar, de pollen ou de lipides floraux, selon les espèces. Parmi les pollinisateurs déjà observés pour les espèces de la famille des Iridaceae, il y a des abeilles, des mouches, des papillons de nuit, des Coléoptères, des grands papillons et des petits oiseaux. La pollinisation par les abeilles est signalée pour toute la famille, cependant, la sous-famille des Crocoideae est celle qui a une grande variété de pollinisateurs tels que les mouches à longue trompes, les papillons, les Coléoptères, les petits oiseaux et les papillons de grande taille (Goldblatt & Manning, 2008) .

La famille des Iridaceae est particulièrement intéressante en ce qui concerne des ressources florales offertes, car elle est l'une des 11 familles d'Angiospermes pour laquelle on trouve le plus grand registre d'huiles florales comme récompense aux pollinisateurs (Renner & Schaeffer, 2010). Ce caractère aurait evolué 28 fois indépendamment (Renner & Schaeffer, 2010). Pour la plupart des familles, probablement, l'émergence intra-familiale des glandes qui secrètent d'huile non-volatile a eu lieu qu'une seule fois, à l'exception des familles des Orchidaceae et des Iridaceae qui ont des origines multiples (Goldblatt *et al*, 2008; Chase *et al*, 2009; Renner & Schaeffer, 2010).

3 Etude de la Variabilité Génétique

Les marqueurs d'ADN sont utilisés avec succès dans les études de diversité génétique, de cartographie génétique et de biologie évolutive. Parmi les différentes

stratégies d'éstude basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (« Polymerase Chain Reaction » - PCR), on peut citer l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (« Randomly Amplified Polymorphic DNA markers » - RAPD), le polymorphisme de la taille des fragments amplifiés (« Amplified Fragment Length Polymorphism » - AFLP), le polymorphisme de la taille des fragments de restriction (« Restriction Fragment Length Polymorphism » - RFLP), le polymorphisme de séquences d'ADN amplifiées ey clivées (« Cleaved Amplified Polymorphism Sequence » - CAPS ou PCR-RFLP) et les microsatellites (« Simple Sequence Repeats » - SSR).

Les microsatellites sont de petits motifs (1-6 nucléotides) répétés en tandem présents dans les génomes des eucaryotes et des procaryotes. Ces régions possèdent des taux de mutation très élevés (10^{-2} – 10^{-6} par locus par génération) (Li *et al*., 2002) par rapport aux taux de mutation ponctuelle dans les régions de gènes codant (10^{-8} – 10^{-9}) (Brumfield *et al*., 2003), de sorte que l'instabilité se manifeste principalement par des changements dans le nombre de répétitions (Li *et al*., 2002). Les mécanismes mutationnels impliqués correspondent à des glissements de l'ADN polymérase (« DNA slippage ») pendant le processus de réplication (Tachida & Iizuka, 1992) et la recombinaison inégale ou d'alignement incorrect des brins d'ADN (Harding *et al*., 1992). Ainsi, l'instabilité se manifeste principalement, par des changements dans le nombre des répétions des microsatellites (Li *et al*., 2002).

Les avantages de l'utilisation des microsatellites sont liés à plusieurs paramètres : nature multiallélique, abondance relative, hypervariabilité, transmission codominante qui permet pour un locus donné de distinguer entre homozygotes et hétérozygotes (dans le cas des individus diploïdes). Ces distinctions sont aisément observables à travers l'étude des profils de PCR qui nécessitent de petites quantités d'ADN et sont facilement reproductibles (Powell *et al*., 1996).

Parmi les techniques existantes pour le développement de ces marqueurs, la méthode de banques génomiques enrichies de microsatellites (Karagyozov *et al*., 1993; Armour *et al*., 1994; Kijas *et al*., 1994) est largement utilisé et présente des taux élevés d'efficacité dans l'isolement des microsatellites pour des organismes végétaux et animaux (Zane *et al*., 2002).

Le protocole de base comprend l'obtention de fragments d'ADN à partir de la digestion d'ADN génomique avec des enzymes de restriction ou par sonication; liaison des fragments à des vecteurs ou adaptateurs spécifiques; hybridation des fragments avec des sondes (contenant di-, tri et tétranucléotides) liées à des membranes en nylon (Karagyozov *et al*., 1993; Armour *et al*., 1994), ou ces sondes peuvent être 5'biotinylées et attachées à des comptes magnétiques enduites de streptavidine (Kandpal *et al*., 1994; Kijas *et al*., 1994); lavage puis élution et récupération par PCR de l'ADN sélectionné; purification des fragments amplifiés; clonage de l'ADN enrichi; et finalement, le séquençage direct des clones, ou réaliser un dépistage par PCR ou « Southern blot » avant le séquençage. En faisant l'usage de l'hybridation sélective avec des sondes d'oligonucléotides répétés côte a côte, cette méthode élimine la prospection de microsatellites laborieuse et coûteuse à travers le séquençage des milliers de clones (Billote *et al*., 1999).

Comme ils sont très polymorphes et spécifique à l'espèce, l'utilisation de marqueurs microsatellites s'est rapidement répandue dans les études de la cartographie génétique, de la génétique des populations et dans des domaines annexes (Zane *et al*., 2002; Ellegren, 2004; Schlötterer, 2004).

Néanmoins l'utilisation de ces marqueurs pour les organismes polyploïdes est limitée en raison du fait que, indépendamment de leur origine auto ou allopolyploïdie, en général, il n'est généralement pas possible d'estimer le nombre exact de copies de chaque allèle (ambiguïté génotypique). Par exemple, un individu dont le profil électrophorétique est tétraploïde *AB*, peut être *ABBB*, *AABB* ou *AAAB*. Par conséquent, de nombreuses études analysent les résultats comme pour les marqueurs dominants, en tenant compte uniquement de la présence ou de l'absence des bandes. Actuellement, il existe un certain nombre de programmes qui permettent des analyses de génétique des populations pour des organismes polyploïdes. Selon Clark & Jasieniuk (2011), les programmes TETRASAT (Markwith *et al*., 2006), TETRA (Liao *et al*., 2008) et ATETRA (Van Puyvelde *et al*., 2010) sont adaptés pour les organismes allopolyploïdes avec un héritage disomique ou intermédiaire, mais aucun de ces programmes ne réalise des analyses de populations pour les organismes avec un niveau de ploïdie supérieur à 4*x*. Pour les organismes autopolyploïdes, les programmes suivants sont appropriés : SPAGeDi (Hardy & Vekemans, 2002), GENODIVE (Meirmans & Van Tienderen, 2004), POPDIST (Guldbrandtsen *et al*., 2000; Tomiuk *et al*., 2009) et STRUCTURE (Pritchard *et al*., 2000). Toutefois, seuls les

programmes SPAGeDi et STRUCTURE réalisent des analyses pour les organismes autopolyploïdes dont les populations présentent un niveau de ploïdie mixte, et surtout, avec des organimes avec un niveau de ploïdie superieur à 4*x*.

Clark & Jasieniuk (2011) ont développé un package pour le programme *R* appelé *polysat* avec lequel il est possible de réaliser une série d'analyses pour des organismes auto et allopolyploïdes à travers différentes fonctions, quelques-unes partagées entre les modes d'héritage dominante et codominante, et d'autres fonctions spécifiques pour chaque type. Ses principaux avantages comprennent la capacité à travailler avec n'importe quel niveau de ploïdie, y compris les populations de ploïdie mixte, et suppose que le nombre de copies de l'allèle est toujours ambigu chez les polyploïdes avec profil d'hétérozygote partiel (par exemple, un tétraploïde avec un profil *AB*). En outre, il permet l'interface avec plusieurs d'autres programmes, en permettant d'importer et d'exporter des données dans différents formats. Toutefois, sa capacité est limitée quand il s'agit d'un grand volume de données, car son architecture ne rend pas possible le traitement de certaines activités en parallele (« multithreading »), c'est-à dire de redistribuer les tâches entre différents processeurs. En outre, conçu pour gagner du temps de traitement, le programme ne possède pas de mécanisme de point de vérification (« checkpoint »). En effet le programme n'enregistre pas automatiquement les données au cours du traitement, de sorte que chaque fois que se produit une interruption des calculs informatiques, les résultats sont perdus sans possibilité de récupération.

En tenant compte les marqueurs codominants, parmi les epèces d'Iridaceae étudiées avec des marqueurs microsatellites, on trouve l'*Iris hexagona* Walter. (Meerow *et al*., 2005; Meerow *et al*., 2007; Pathikonda *et al*., 2010), *Gladiolus longicoliis* Baker (Rymer *et al*., 2010) et *Hesperantha coccinea* (Backh. & Harv.) Goldblatt & JC Manning (Wolff *et al*., 2009).

Actuellement, de nombreuses espèces de la famille des Iridaceae présentes dans le sud du Brésil sont étudiées en termes de diversité génétique et de génétiques de populations en utilisant des marqueurs du type ISSR (Souza-Chies *et al*., 2012). Telles études peuvent contribuer de manière significative à la connaissance de la biosystématique des espèces endémiques ou avec distribution restreinte dans le sud de l'Amérique du Sud, étant donné qu'elles constituent des approches pionnières dans l'étude de la distribution de

la variabilité génétique en Amérique du Sud, qui représente l'un des grands centres de diversification des espèces de la famille Iridaceae (Goldblatt *et al*., 2008).

4 Etudes Cytogénétiques

L'analyse cytogénétique traditionnelle est constituée par la détermination du nombre chromosomique, l'analyse du caryotype, l'observation du comportement méiotique et l'évaluation de la viabilité du pollen, qui permettent d'élargir la vision sur la différenciation des espèces.

Les techniques de marquage des chromosomes permettent la visualisation des portions d'ADN de coloration différenciée. Par conséquent, il est possible d'identifier la distribution et la quantité de l'hétérochromatine (bande C, L, N), la différenciation des types d'hétérochromatine (riche en AT ou GC) en utilisant des fluorochromes comme DAPI ou Hoechst et CMA, et la localisation de régions des organisateurs nucléolaires (Ag-NOR). Elles sont essentielles pour identifier les chromosomes homologues et homeologues, pour caractériser le polymorphisme ou les relations de parenté et distinguer des possibles réarrangements chromosomiques (Cerrados Embrapa).

La cytogénétique moléculaire comprend les techniques d'hybridation *in situ*, qui consistent à hybrider un segment particulier d'ADN ou d'ARN avec une séquence de nucléotides complémentaire situés à l'intérieur de la cellule afin de determiner la présence et la localisation de cette séquence. Pour mettre en évidence le segment d'ADN ou d'ARN hybridé il est nécessaire qu'il soit marqué avec une molécule d'identification facile, fonctionnant comme une sonde pour détecter la séquence complémentaire de nucléotides - séquence cible. La sonde hybride / cible peut être l'ADN / ADN, ADN / ARN ou ARN / ARN. Dans le cas de la technique de GISH (« Genomic *in situ* hybridisation») la sonde correspond au génome total d'un organisme, alors que dans la technique de FISH (« Fluorescent *in situ* hybridization ») la sonde correspond à des séquences de gènes (Guerra, 2004).

L'utilisation du FISH, pour la localisation de séquences spécifiques d'ADN afin de comparer des caryotypes est particulierement utile dans les études cytotaxonomiques. La technique de GISH permetd'évaluer la composition génomique d'une espèce, contribuant ainsi à l'étude de l'évolution des allopolyploïdes.

Les analyses cytogénétiques traditionnelles et moléculaires sont utilisées avec succès pour des nombreuses espèces chez différentes familles des plantes, dans des études telles que la caractérisation des chromosomes (Klamt & Schifino-Wittmann, 2000; Siljak-Yakovlev *et al*., 2002; Ortolani *et al*., 2007) et l'organisation du génome (Maluszynska & Heslop-Harrison, 1993; Castilho & Heslop-Harrison, 1994; Badaeva *et al*., 1996; Frello & Heslop-Harrison, 2000; Snowdon, 2007; Wan *et al*., 2012). Elles sont également utile pour étudier les relations interspécifiques (Cerbah *et al*., 1998; Torell *et al*., 2003; Garnatje *et al*., 2004a; Muratović *et al*., 2005; Pellicer *et al*., 2008; Garcia *et al*., 2009; Pellicer *et al*., 2010) et intraspécifiques (Cerbah *et al*., 1999; Bogunić *et al*., 2011; Chalup *et al*., 2012).

La méthode de cytométrie en flux est devenue la plus utilisée pour estimer la taille du génome chez les plantes et determiner le niveau de ploïdie. Le protocole de base implique l'isolement de noyaux de la matière végétale (feuilles, tiges, racines), coloration de l'ADN avec fluorochrome, suivie par l'analyse de l'émission de sa fluorescence. Cette méthode a l'avantage de permettre de mesurer un grand nombre de noyaux dans un court espace de temps et d'évaluer plusieurs échantillons de l'organisme étudié (Doležel *et al*., 2007). L'estimation du contenu de l'ADN est utilisé comme un outil important dans les études de biosystématique, permettant de fournir des informations utiles à des fins phylogénétiques et taxonomiques, dans la définition et / ou la différenciation des espèces (Garnatje *et al*., 2004b; Mahelka *et al*., 2005; Loureiro *et al*., 2007; Suda *et al*., 2007; Perný *et al*., 2008; Ekrt *et al*., 2010), la caractérisation de la variabilité intraspécifique (Bogunić *et al*., 2007; Leong-Škorničková *et al*., 2007; Siljak-Yakovlev *et al*., 2008; Slovák *et al*., 2009) et estimation du niveau de ploïdie pour les taxons avec les comptages chromosomiques préalables (Siljak-Yakovlev *et al*., 2008; Roberts *et al*., 2009).

4.1 La Polyploïdie : un phénomène important dans l'evolution de la famille des Iridaceae

La polyploïdisation (multiplication du génome) est classée en paléopolyploïdie et néopolyploïdie en fonction de l'événement de polyploïdisation, ancien ou recent, respectivement. Cependant, la distinction entre ces deux concepts est encore confuse entre les différents auteurs. Guerra (2008) expose différents concepts liés au nombre des chromosomes et ses implications dans la cytotaxonomie végétale. Il affirme que bien que certains auteurs considèrent les néopolyploïdes comme des polyploïdes synthétiques

(Comai, 2005), ou polyploïdes intraespécifiques (Ramsey & Schemske, 2002), ou même, dans la plupart des cas, comme des polyploïdes originés par des hybridations interespécifiques ou intergénériques (Levy & Feldman, 2002), le terme néopolyploïdes devrait être utilisé dans les cas où les diploïdes apparentés soient encore vivants, alors que le terme paleopolyploïdes devrait être utilisé aux autres polyploïdes qui restent.

Pour Schubert & Lysak (2011), la néopolyploïdie est référée à des événements de polyploïdisation récents évolutivement, dans lesquels il est encore possible de reconnaître la multiplication des chromosomes. La polyploïdisation suivie par la diploïdisation y compris la réduction du nombre des chromosomes, mais toujours détéctable par des techniques de génomique comparative et de peinture chromosomique, correspond à la mésopolyploïdie. Pour ces auteurs, la paléopolyploïdie implique des événements de polyploïdisation anciens masqués par la suite des changements génomiques dont la détection chez les táxons diploïdes n'est possible que par l'intérmediaire de la bioinformatique en cherchant des séquences d'ADN ortholoques et paralogues.

La polyploïdisation est considéré comme l'un des plus fréquents processus d'évolution des angiospermes, de sorte que des duplications peuvent être observées dans 70-100% des espèces diploïdes actuels (Masterson, 1994; Simillion *et al*., 2002; Blanc & Wolfe, 2004; Leitch & Leitch, 2008; Soltis *et al*., 2009; Jiao *et al*., 2011). Le terme de paléopolyploïdes est employé pour des très anciens polyploïdes. La polyploïdie résulte d'un processus continu au cours de l'évolution des espèces végétales. Wood *et al*. (2009), selon la définition de néopolyploïdie comme la polyploïdie intragénérique (polyploïdes qui sont formés depuis l'origine de leurs genres respectifs), estime que les événements de duplication ont accompagné 15% des évènements de spéciation chez les angiospermes, les genres de plantes vasculaires totalisant environ 35% de néopolyploïdes.

La polyploïdie joue un rôle important dans l'évolution de la famille des Iridaceae, et Goldblatt & Takei (1997) ont estimé que 60% des espèces de la famille répresentées dans le hémisphere Nord sont néopolyploïdes (polyploïdie intragénérique). Pour les espèces distribuées en Afrique, seulement 5% des espèces des Crocoideae (qui s'appelait alors Ixioideae) et 10% d'Iridoideae sont néopolyploïdes. En Amérique Centrale et du Sud, la polyploïdie semble tenir un rôle plus important dans l'évolution des Iridaceae, la majorité

des espèces de Tigridieae étant tétra ou hexaploïdes et au seins de Sisyrinchieae, plus de 75% des espèces de *Sisyrinchium* sont polyploïdes (Goldblatt & Takei, 1997).

Les études cytologiques ont montré une grande diversité en termes de caryotype, nombres chromosomiques de base, de niveau de ploïdie et de contenu d'ADN (Goldblat, 1982; Goldblat *et al*., 1984; Kenton & Heywood, 1984; Goldblat & Takei, 1997) au seins des Iridaceae. Ainsi, au-delà de la polyploïdie, Sharma & Talukdar (1960) soulignent différents processus cytologiques exerçant des rôles importants dans l'apparition de nouvelles espèces tels que l'aneuploïdie et la dysploïdie (changements de nombre de chromosomes en raison de réarrangements structuraux des chromosomes). Un autre aspect remarquable est l'existence de caryotypes bimodals (présence de deux groupes distincts de chromosomes de longueur différent), particulièrement fréquents chez les Iridoideae (Kenton *et al.*, 1990).

Les études cytogénétiques récentes des différentes espèces brésiliennes d'Iridaceae ont confirmé des nombres chromosomiques de base (x = 8 et 9) pour un certain nombre d'espèces de Tigridieae (Alves *et al*., 2011; Souza-Chies *et al*., 2012) et de Trimezieae (Alves *et al*., 2011). De même, une variation de la taille des chromosomes et du contenu en ADN a également été observé (Souza-Chies *et al*., 2012), ainsi que des variations intra et interspécifiques du nombre chromosomique (Alves *et al*., 2011).

5 Biologie, Systématique et Évolution du genre *Sisyrinchium*

Le genre *Sisyrinchium* appartient à la sous-famille des Iridoideae, et à la tribu des Sisyrinchieae (Goldblatt & Manning, 2008). Il comprend des espèces de taille petite à moyenne, vivaces ou rarement annuelles. Les racines sont généralement épaisses, denses sous forme de tubercules, ou fibreuses. Parmi les caractéres qui distinguent les différentes espèces, on trouve surtout la forme des feuilles et des caractères floraux, particulièrement les aspects de l'organisation de l'androcée. Les feuilles sont lancéolées à linéaires ou cylindriques (« terete »). Les fleurs sont actinomorphes, avec des couleurs variée comme crème, jaune, violet et bleu, avec un centre jaune; les tépales sont libres. Les filets des étamines peuvent être partiellement libres ou complètement fusionnés formant une colonne staminal, et peuvent présenter différents types de trichomes (Goldblatt & Manning, 2008; Chukr & Capellari Jr, 2003).

Sisyrinchium est le genre de la famille des Iridaceae dans le Nouveau Monde en termes de nombre d'espèces (environ 140 espèces). Le genre représente un groupe extrêmement diversifié d'un point de vue morphologique dont la taxonomie est extrêmement complexe. Pour cette raison, le genre est l'objet d'études qui comportent différents aspects biologiques à la recherche d'une meilleure résolution taxonomique (Goldblatt & Manning, 2008). L'analyse des caractères morphologiques est inclus dans la plupart des études (Klatt, 1861; Baker, 1878; Bentham & Hooker, 1883; Ravenna, 2000, 2001, 2002a,b, 2003a,b, 2005, 2007), mais aussi d'autres approches sont utilisés tels que l'anatomie des feuilles (Rudall *et al*., 1986; Goldblatt *et al*., 1990), cytogénétique (Cholewa & Henderson, 1984; Rudall *et al*., 1986; Goldblatt *et al*., 1990), biologie de la reproduction et croisements intra et interspécifiques (Ingram, 1968; Cholewa & Henderson, 1984) couplé à la taxonomie.

Les plus récentes études sur le genre (Chauveau *et al*., 2011; Karst *et al*., 2011), comportent des analyses phylogénétiques. Chauveau *et al*. (2011) ont realisée la première et la plus étendue analyse phylogénétique du groupe, avec 85 espèces échantillonnées, totalisant 101 accesssions. L'étude a été basée sur l'analyse de séquences d'ADN à partir des huit régions des génomes chloroplastique, mitochondrial et nucléaire. A partir de cette étude, la monophylie du genre a été confirmé et de nouvelles relations infragénériques ont été proposées avec neuf clades mettant en cause les classifications taxonomiques antérieures.

Le genre s'étend sur le continent américain depuis le Groenland et le nord du Canada jusqu'à la Terre de Feu et les îles Falklands (Rudall *et al*., 1986). A partir d'une d'analyse taxonomique des espèces du genre *Sisyrinchium* en provenance du Brésil, d'Uruguay et de Paraguay, Johnston (1938) a proposé l'Amérique du Sud comme le probable centre d'origine et de dispersion du genre. D'autres études ont soutenu cette hypothèse (Goldblatt *et al*., 1990; Cocucci & Vogel, 2001; Goldblatt *et al*., 2008; Chauveau *et al*., 2011), de sorte que le genre est probablement apparue entre la Bolivie et le sud-ouest des États-Unis (Chauveau *et al*., 2011).

Des études cytologiques du genre ont ont été menées depuis les années 1940 (Cholewa & Henderson, 1984), mais la plupart traitaient principalement des epèces nord-américaines (Ingram, 1968; Henderson, 1976; Cholewa & Henderson, 1984). En général,

la polyploïdie est considéré comme un facteur extrêmement important dans l'évolution du genre (Goldblatt, 1982). Les chromosomes sont généralement de petite taille et leur nombre est très variable, en raison de la polyploïdie, ainsi que des possibles événements d'hybridation (Henderson, 1976; Cholewa & Henderson, 1984; Kenton *et al*., 1986; Rudall *et al*., 1986).

Le genre présente des nombres chromosomiques de base différents (x = 8, 9, 17, 6, 5), mais les plus fréquents sont x = 8 et x = 9. Goldblatt (1982) a suggéré que x = 9 est le nombre de base ancestrale et x = 8 dérivé. La reconstruction phylogénétique du genre menée par Chauveau *et al*. (2011) appuie cette hypothèse puisque les espèces avec un nombre chromosomique de base x = 9 correspondent aux espèces appartenant aux clades ayant divergé le plus precocement de l'ancêtre commum.

La détermination du nombre chromosomique des espèces brésiliennes de *Sisyrinchium* a corroboré l'hypothèse que le nombre de base le plus fréquent pour le genre en Amérique du Sud serait x = 9 (Souza-Chies *et al*., 2012), tandis que dans l'Amérique du Nord serait x = 8 (Kenton & Heywood, 1984).

Faisant référance aux travaux antérieurs qui mentionnent l'existence de probables allopolyploïdes, Rudall *et al*. (1986) ont trouvé plus approprié que, pour les espèces à cytotypes intermédiaires tels que *S. elmeri* Greene ($2n$ = 34), *S. longipes* (E.P. Bicknell) Kearney & Peebles ($2n$ = 34) et *S. jamesonii* Baker ($2n$ = 68), dont le nombre de chromosomes de base est x = 17, soient adoptés la formule de x = 8 + 9, ou x_2 = 17 pour indiquer sa nature et son origine polyploïde dérivée.

Les études qui englobent des espèces sud-américaines indiquent deux tendances : (i) la présence d'un nombre considérable d'espèces polyploïdes et (ii) une présence plus grande de polyploïdes avec des niveaux de ploïdie moindres que ceux trouvés chez les espèces de l'hémisphère Nord (Kenton & Heywood, 1984). Une corrélation positive entre le niveau de ploïdie et la latitude a été mise en évidence pour les Iridacées de l'hémisphère Nord, les plantes avec des niveaux de ploïdie plus élevés ($6x$ - $12x$) étant distribuées à des latitudes plus importantes (Goldblatt, 1982; Kenton *et al*., 1986; Rudall *et al*., 1986).

En ce qui concerne la variation de la taille du génome, à partir de l'analyse des données disponibles au sein de la banque « Plant DNA C-values » (http://www.rbgkew.org.uk/cval/homepage.html, Bennett & Leitch, 2010), la quantité

d’ADN a été estimé pour environ 6 % des espèces d’Iridaceae. Pour *Sisyrinchium*, les estimations existent approximativement pour 31% des espèces, la plupart originaires de l'hémisphère Nord.

Il est présumé que la quantité d'ADN dans un noyau gamétique avant réplication, ou la taille holoploïde du génome, indépendamment du niveau de ploïdie (valeur 1C) augmente de manière directe et proportionnelle avec le niveau de ploïdie (Leitch & Bennett, 2004). Toutefois, il a été observé pour plusieurs taxa que la valeur 1C n'augmente pas de manière directe et proportionnel à mesure qu’il y a augmentation du niveau de ploïdie. Ainsi, il y a une tendance à la réduction de la taille monoploïde du génome (1Cx) des diploïdes vers les polyploïdes (Leitch & Bennett, 2004). Kenton *et al*. (1986) ont mentionné que pour *Sisyrinchium*, Cx est pratiquement constante entre les polyploïdes avec des niveaux de ploïdie supérieurs (6*x* à 12*x*), mais il est beaucoup plus petit que chez les diploïdes. De la même manière, Leitch & Bennet (2004), à travers une évaluation des valeurs disponibles dans la littérature, décrivent une tendance à la réduction de Cx chez les polyploïdes au sein du genre.

Kenton *et al*. (1986) rapportent une forte corrélation positive entre Cx et latitude pour les espèces diploïdes de *Sisyrinchium* avec $x = 9$ dans l'hémisphère Sud. Cependant, ils n’ont trouvé aucune corrélation entre Cx et latitude quand les espèces avec d'autres valeurs de base (*x*) et polyploïdies ont été incluses dans l'analyse de régression.

Te Best *et al*. (2012) font remarquer lorsque des espèces végétales herbacées avec de petits génomes présentent différents modes de vie, les représentants avec des plus grands génomes ne sont pas nécessairement vivaces. Pour le *Sisyrinchium*, Kenton *et al*. (1986) rapportent que malgré la difficulté de tester la corrélation entre annualité et pérennité avec la taille du génome (Cx) du à la rareté des espèces annuelles, les données suggèrent que ces espèces ont tendance à avoir de petits génomes.

Concerant la biologie de la reproduction au sein du genre, la plupart des études existantes datent de 30 à 50 ans et englobent des complexes d’espèces de l'hémisphère Nord (Ingram, 1968; Henderson, 1976; Cholewa & Henderson, 1984). D’une manière générale, ces études cherchent à élucider les relations taxonomiques au sein du genre dont la complexité s’exprime à travers une grande diversité morphologique, en évaluant

l’impact des modes de reproductions, les possibilités de croisement entre les espèces, ainsi que la compatibilité génétique entre des populations conspécifiques et interspecifiques.

En ce qui concerne la reproduction végétative dans le genre Cholewa & Henderson (1984) ont, à partir d'une étude biosystématique des populations de plusieurs espèces du genre *Sisyrinchium* réalisée dans la région des Montagnes Rocheuses au Canada, rapporté la formation de jeunes plants fertiles à partir de l'axe des deux bractées florales dans les plantes collectées et maintenues dans une serre.

Par rapport à la reproduction sexuée, de nombreuses espèces sont autocompatibles, de façon que l’autofécondation varie en fonction d’éloignement physique et temporelle des étamines par rapport le stigmate.

Bien que certaines espèces de *Sisyrinchium* semblent ne pas présenter de différences temporelles entre la maturation des stigmates et des anthères (*S. minus* Engelm. & A. Gray, *S. minutiflorum* Klatt et *S. platense* I.M. Johnst.) (Devoto & Medan, 2008), de nombreuses espèces de *Sisyrinchium* sont protandriques, de sorte que les anthères mûrissent avant que la fleur s'ouvre et quelques heures avant que le stigmate devient réceptif, de manière a promouvoir la fertilisation croisée au détriment de l'autofécondation. Ce phénomène a été décrit pour *S. idahoense* E.P. Bicknell, qui bien q’autocompatible, dispose de deux systèmes qui facilitent la fertilisation croisée : la séparation physique (hétérostylie) et la distance temporelle de 24 h entre la maturation des anthères et la réceptivité du stigmate (protandrie). L‘hétérostylie est un polymorphisme sexuel génétiquement contrôlé pour lequel différentes variables morphologiques entrainant une différence de la longueur des étamines et du style pour une espèce donnée (Ganders, 1979). En dehors le *S. idahoense*, ce phénomène a également été décrit pour *S. bermudianum* L. Pour ce dernier, Ingram (1968) a observé, au sein de la population etudiée, différents niveaux de longistylie (distylie dans laquelle les fleurs présentent des stylets longs et des étamines courts) et que cette variation pourrait être liée à des modifications environnementales.

La distylie est connue dans 26 familles de plantes, parmi lesquelles les Iridacées, mais la présence de corrélation entre ce caractère et le niveau de ploïdie semble être limitée aux Primulaceae et Rubiaceae selon Naiki (2012). Néanmoins, la polyploïdie ne semble

pas être liée à la disparition de l'hétérostylie des diploïdes vers les polyploïdes (Naiki, 2012).

Henderson (1976) a mis en évidence l'existence prépondérante de la protandrie chez les espèces de *Sisyrinchium* distribuées au nord-ouest des USA, montrant que celle-ci est plus prononcée chez les taxons octoploïdes (8*x*) que chez les tétraploïdes (4*x*). Toutefois, chez les dodecaploïdes (12*x*) l'expression de la protandrie se rapproche de celle des espèces tétraploïdes.

Henderson (1976) et Cholewa & Henderson (1984) suggèrent une correlation entre le système de croisement et le niveau de ploïdie, de sorte que l'autocompatibilité et l'apparition d'autofécondation jointes, constituent une caractéristique commune aux taxons avec des niveaux de ploïdie élevés (supérieure à 4*x*), tandis que les tétraploïdes ont tendance à être auto-incompatibles, ou réalisent l'allofécondation même en étant autocompatibles. Barringer (2007) montre que, indépendamment du mode de vie des espèces végétales (herbacée annuelle, vivace et plante ligneuse vivace), les taux d'autofécondation sont plus élevés chez les polyploïdes que chez leurs diploïdes correspondants. Pour *Sisyrinchium*, Henderson (1976), à partir de ce qui était exposé par Grant (1971), que, en général, les diploïdes herbacées vivaces ont des taux plus élevés d'auto-incompatibilité et d'allofécondaton que leur polyploïdes correspondants, suggère que les tétraploïdes évalués dans leur étude tendent à montrer une norme similaire à d'autres groupes de plantes herbacées vivaces et diploïdes.

Trente-cinq pour cent des espèces de ce genre, distribués principalement dans l'Amérique du Sud, possédent des fleurs avec des structures sécrétrices des lipides appelées élaiophores. Ces structures sont constitués de trichomes qui peuvent être situés sur la colonne staminal et/ou sur la surface adaxiale des tépales (Cocucci & Vogel, 2001). Les lipides sécrétées sont collectées essentiellement par les femelles de certaines espèces des abeilles de la tribu Tapinotaspidini (Hymenoptera: Apidae) dotés des structures spécialisées dans la collecte des lipides floraux (Cocucci & Vogel, 2001; Alves-dos-Santos *et al*., 2007). Chauveau *et al*. (2011) à partir de l'analyse phylogénétique du genre et de la distribution des espèces sécrétant les lipides au sein de la phylogénie, suggèrent que ces trichomes pourraient avoir joué un rôle clé dans la diversification de *Sisyrinchium*.

Pour les espèces de *Sisyrinchium* dont le seule resource floral est le pollen, il existe un registre de comportement de butinage par des abeilles solitaires du genre *Lasioglossum* Curtis, 1833 (Hymenoptera: Apoidea: Halictidae: Halictinae) (Cholewa & Henderson, 1984); et de la famille Megachilidae (Henderson, 1976) pour les espèces de l'Amérique du Nord. Pour les espèces d'Amérique du Sud, les familles des Halictidae et des Apidae d'abeilles ont été observés en tant que visiteurs de fleurs de *S. palmifolium* L. (Cocucci & Vogel, 2001). Pour *S. vaginatum* Spreng., la plus grande fréquence d'abeilles de la famille des Halictidae ou des syrphes comme des visiteurs de fleurs semblent être directement liées aux conditions climatiques, en raison que l'abondance et la diversité des abeilles est réduite pendant les périodes de froid et de sécheresse (Freitas & Sazima, 2003).

5.1 *Sisyrinchium micranthum* Cav.

Sisyrinchium micranthum est l'une des rares espèces du genre décrite comme annuelle (Goldblatt & Manning, 2008). L'espèce se caractérise par des feuilles linéaires et plates; hampes florales aplaties et inflorescences de type rhipidium, insérées sur des pédoncules déterminés et terminaux; fleurs délicates, trimère, de coloration bleu violacée, jaune, rose ou crème, le périgone hypocrateriforme et tépales évidentes (Chukr & Capellari Jr, 2003); filets fusionnés dans la moitié aux deux tiers de leur longueur, tube staminal renflé vers la base (Johnston, 1938); élaiophores distribués sur la partie renflée du tube staminal et le long de la nervure médiane de chaque tépale (Cocucci & Vogel, 2001; Chauveau *et al*., 2011). Dans la **Figure 2**, certaines caractéristiques sont indiquées pour cette espèce.

L'espèce est distribuée du Mexique à l'Argentine, et probablement naturalisée en Australie, Malaisie et dans les îles Fidji (Innes, 1985). Au Brésil, cette espèce colonise différents environnements, tels que les champs, les forêts ouvertes et les habitats anthropisés. Elle est répandue dans tous les états de Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP) et Rio de Janeiro (RJ) (Johnston, 1938; Schlindwein, 1995; Santos, 1996; Harter, 1999; Truylio *et al*., 2002). *Sisyrinchium micranthum* occupe les régions correspondant à deux biomes, de la Forêt Atlantique et la Pampa, ce dernier constituant l'essentiel de sa distribution géographique dans RS.

L'espèce présente une grande variabilité morphologique signalés dans plusieurs études (Chukr & Capellari, 2003; Chauveau *et al*., 2011; Indrusiak, 2012; Tacuatiá *et al*.,

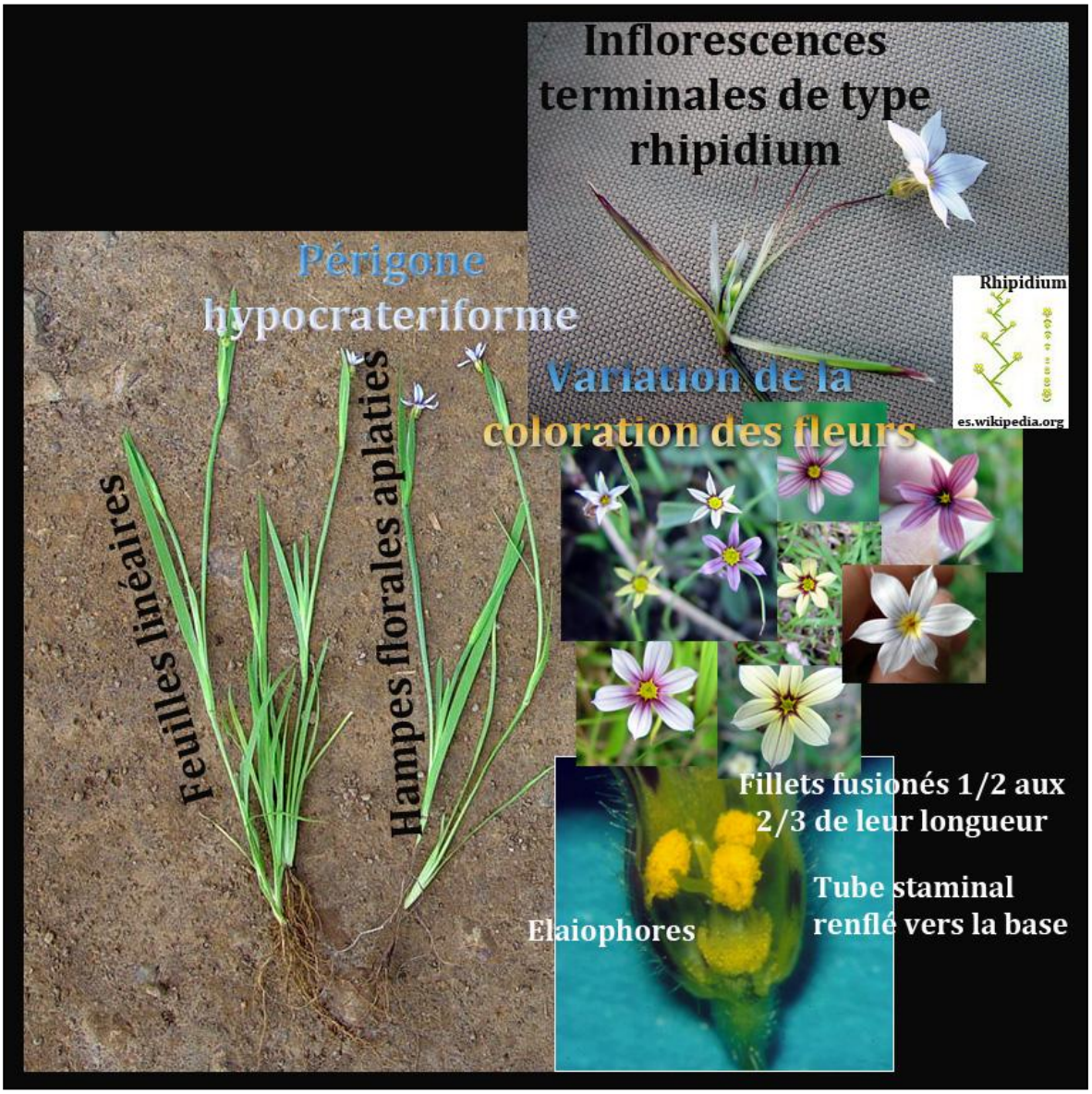


Figure 2. Les principales caractéristiques morphologiques de *Sisyrinchium micranthum*.

2012a,b). Cette plasticité morphologique est facilement observée lors des expéditions sur le terrain, de sorte que différentes combinaisons de caractéristiques morphologiques peuvent être observées dans la nature. Sur la base de ces combinaisons de caractères qui caractérisent des profils de plantes différentes, trois types morphologiques peuvent être identifiés et classés en CI, CII et CIII (Tacuatiá *et al*., 2012b) (**Figures 3** et **4**).

Face à la grande variabilité phénotypique observée et à la rareté des données cytogénétiques pour l'espèce, Tacuatiá *et al*. (2012b) ont étudié les aspects morphologiques, cytogénétiques et de regroupement génétique des différentes populations de *S. micranthum* distribuées au RS. Dans cette étude, ont été évalués les différents profils morphologiques associés à la taille des plantes, telles que le nombre de nœuds de la hampe florale et la taille de la hampe florale, du entre-nœud basal, du pédoncule, des bractées internes et externes et de la colonne staminale. Les analyses cytogénétiques ont englobé la détermination du nombre haploïde de chromosomes, l'analyse du comportement méiotique, les estimations de la viabilité du pollen et la taille des grains de pollen. L'analyse moléculaire a consisté à évaluer la diversité génétique à partir de marqueurs moléculaires du type « Inter Simple Sequence Repeats » (ISSR) (Tacuatiá *et al*., 2012b).

A partir de ces analyses, il a été observé que les catégories de plantes CI et CII ne diffèrent pas statistiquement pour la majorité des caractères morphologiques évalués, se distinguant uniquement par le nombre plus élevé de nœuds parmi les plantes CII. Toutefois, les catégories diffèrent concernant le diamètre floral total et le diamètre de la partie de rétrécissement des tépales, caractéristiques florales importantes qui n'ont pas été mesurées et incluses dans l'analyse en raison du fait que lorsque les fleurs sont séchées, ce caractère n'est plus mesurable (**Figure 5**). En ce qui concerne les données cytogénétiques, deux nombre chromosomiques qui avaient déjà été décrits dans la littérature pour d'autres pays (Goldblatt, 1982; Kenton & Heywood, 1984; Goldblatt & Takei, 1997), ont été confirmés (n = 16, $2n = 4x = 32$; n = 24, $2n = 6x = 48$), et plantes diploïdes (n = 8, $2n = 2x = 16$) ont été décrites pour la première fois, en montrant l'existence d'une série polyploïde pour l'espèce (**Figure 6B-D**). De haute indices de comportement méiotique et de grande viabilité du pollen ont été trouvés, avec peu d'anomalies observées (**Figure 6E-I)**, à la fois pour les diploïdes et les polyploïdes, en indiquant que les polyploïdes présentent un comportement méiotique disomique. En outre, les résultats suggèrent une corrélation

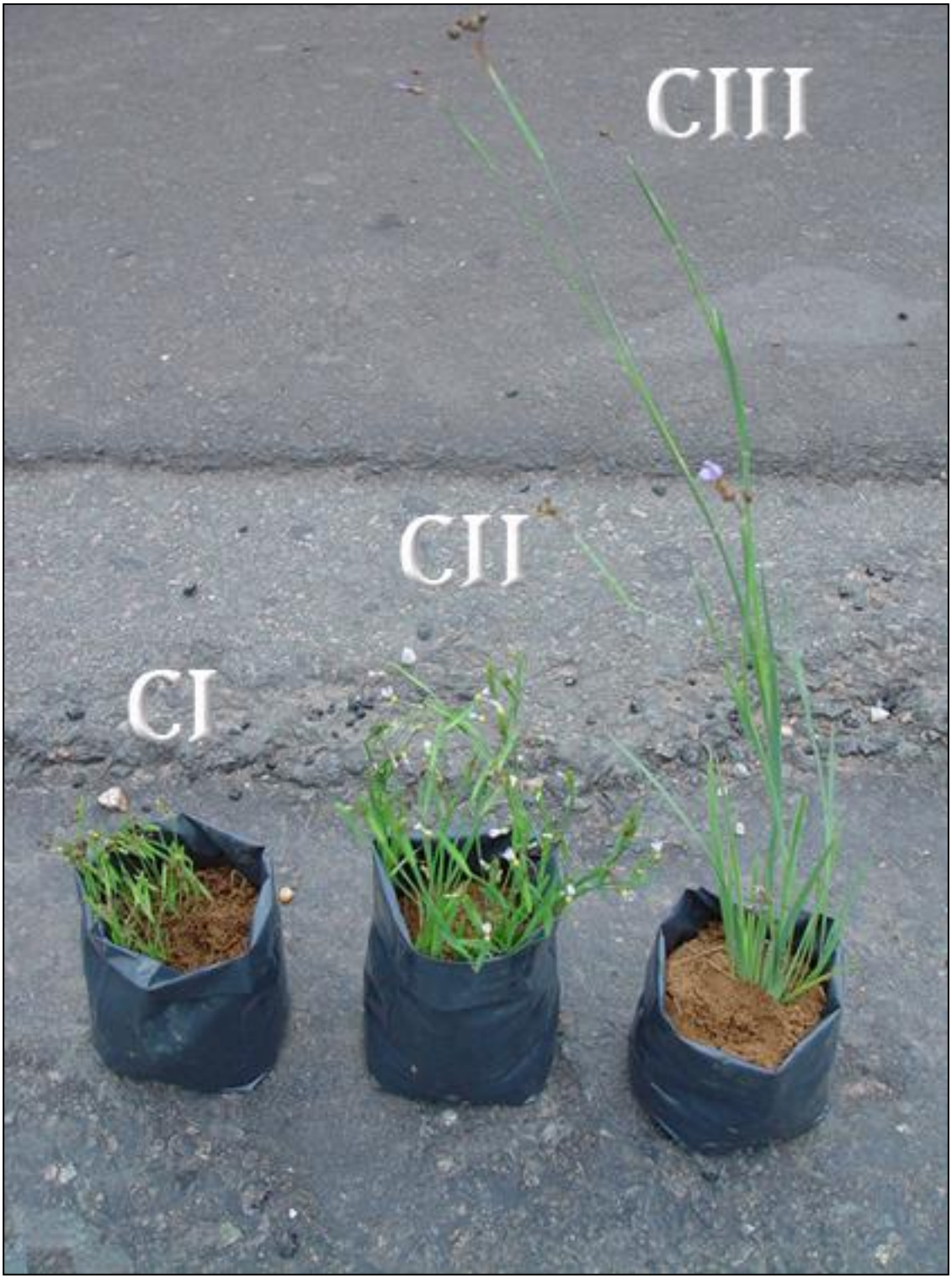


Figure 3. Les trois types morphologiques identifiés pour *Sisyrinchium micranthum* et classés en CI, CII et CIII.

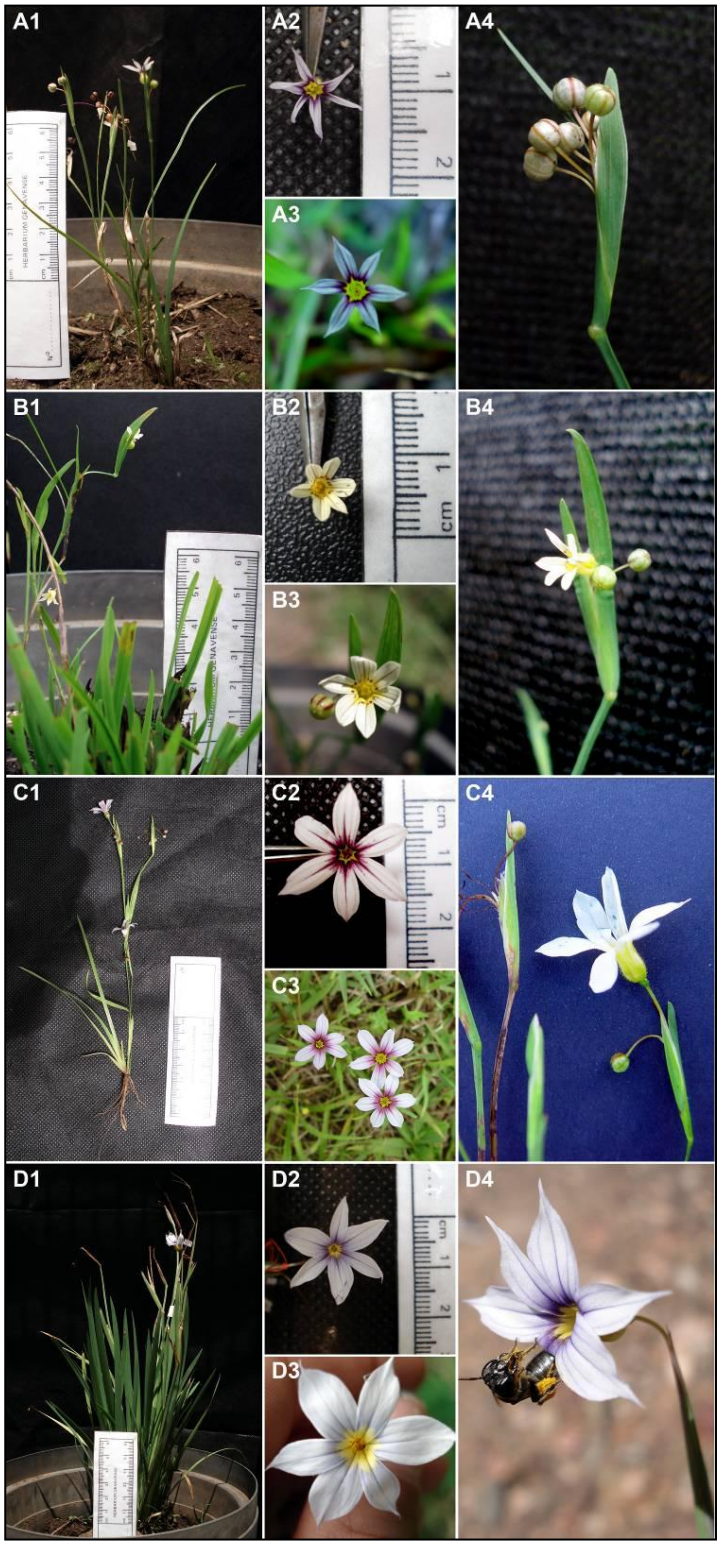


Figure 4. A-D. Categories morphologiques de *Sisyrinchium micranthum*. **1.** Plante. **2-3.** Details de la fleur. **4.** Detail de la fleur et/ou bractée, et./ou graines. **A.** Categorie CI avec fleurs violacées (CI-V). **B.** Categorie CI avec fleurs blanches (CI-W). **C.** Categorie CII. **D.** Categorie CIII.

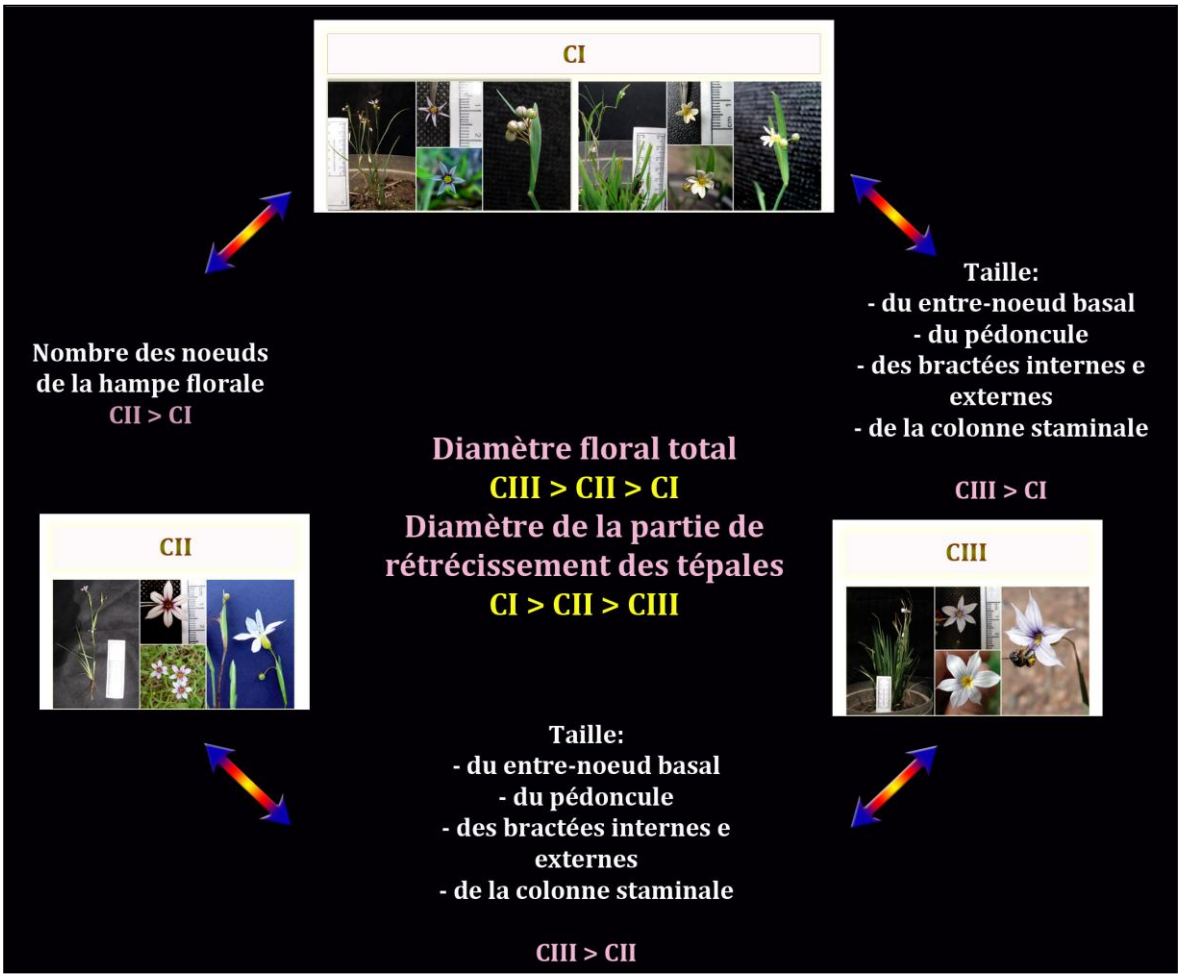


Figure 5. Les différences morphologiques entre les trois types morphologiques de *Sisyrinhium micranthum* - CI, CII et CIII.

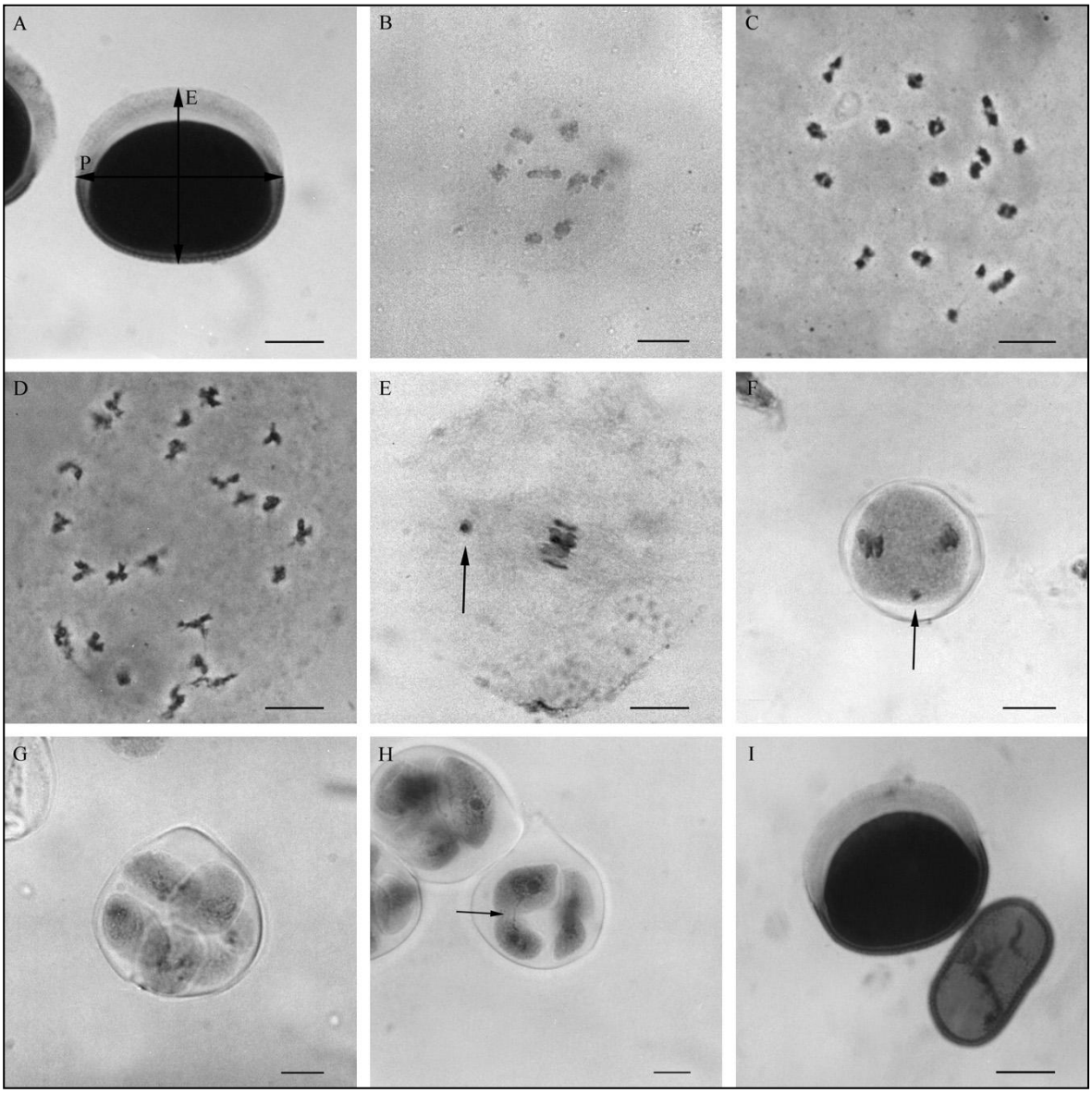


Figure 6. Analyses cytogénétiques des accessions de *Sisyrinchium micranthum* du Rio Grande do Sul, au Brésil. **A.** Les mesures de grain de pollen (P, l'axe polaire, E, diamètre équatorial). **B-D.** Trois cytotypes trouvé; cellules-mère de pollen en diacinèse. **B.** *n* = 8. **C.** *n* = 16. **D.** *n* = 24. **E-I**. Certaines irrégularités méiotiques trouvé et l'analyse des pollens. **E.** Métaphase I avec le chromosome mal aligné. **F.** Télophase avec un retardataire. **G.** «Tétrade» avec six microspores. **H.** Tétrade avec pont chromatique. **I.** Grain-de-pollen viable (sombre et plus grand) et inviable (claire et plus petit). Échelle = 10 μm (Tacuatiá *et al*., 2012b).

positive entre les catégories morphologiques et la longueur de l'anthère, ainsi qu'entre le niveau de ploïdie et la taille du grain de pollen (la **Figure 6A** représente les mesures de l'axe du grain de pollen). Bien que les plantes de petite taille (CI) présentent les grains de pollen plus grands et des niveaux de ploïdie plus élevés, il n'y avait pas de relation directe entre les catégories morphologiques, le nombre de chromosomes et la diversité génétique, soulignant la complexité de l'espèce. D'autre part, avec une viabilité du pollen élevée et un comportement normal de la méiose, l'origine de la polyploïdie peut être considérée comme étant ancienne, mais toutefois reste incertaine (Tacuatiá *et al*., 2012b). Les mêmes auteurs rapportent aussi l'existence de nombres chromosomiques différents dans la même population, ce qui indique que certaines populations peuvent en fait être composées de spécimens avec différents niveaux de ploïdie. Ainsi, ils ont conclu que les différents types morphologiques classés en CI, CII et CIII correspondent en fait àun seul taxon, dont la complexité doit être liée à un processus continu de spéciation fortement associée à des processus de polyploïdisation.

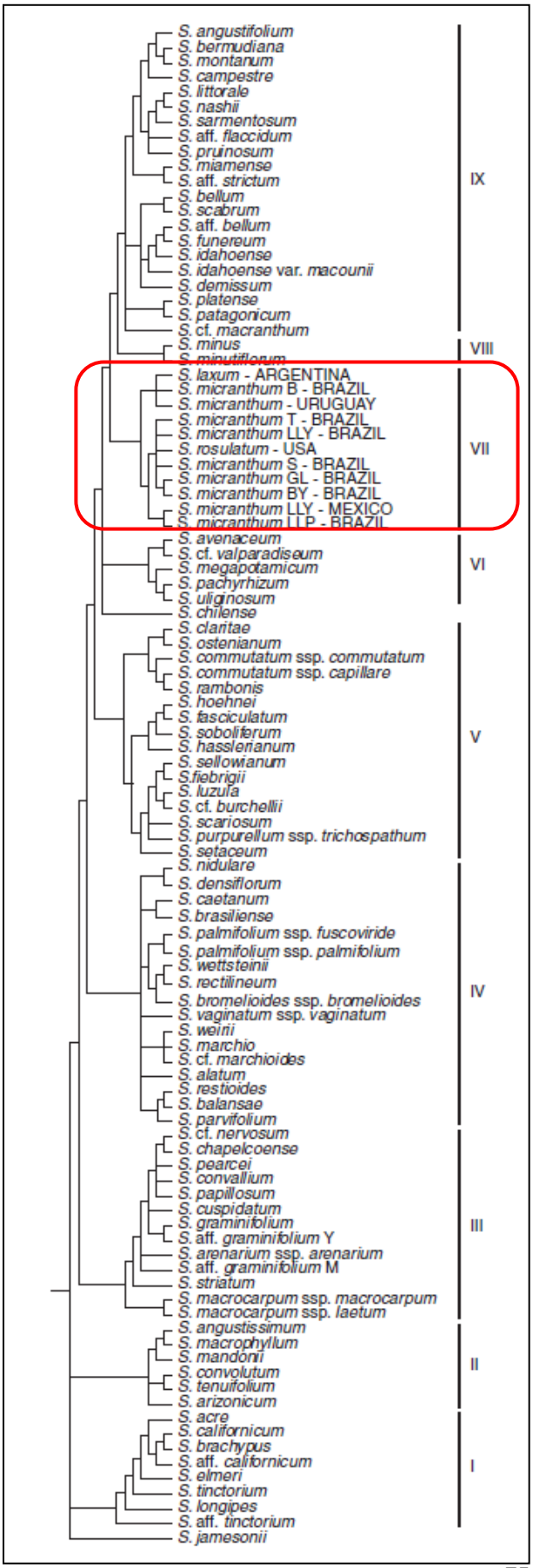
En raison de la large variabilité phénotypique de l'espèce, dans l'analyse phylogénétique effectuée sur le genre *Sisyrinchium* par Chauveau *et al*. (2011), ont été inclus des spécimens de *S. micranthum* de différents types morphologiques et des différentes régions. Dans l'arbre phylogénétique obtenu, le complexe de *S. micranthum* forme un groupe monophylétique contenu dans le Clade VII avec deux autres espèces apparentées, *S. laxum* Otto ex Sims et *S. rosulatum* E.P. Bicknell, des espèces auparavant considérés comme des synonymes de *S. micranthum* (**Figure 7**).

Une étude récente concernant la génétique des populations de *S. micranthum* indique des populations hautement structurées (Tacuatiá *et al*., 2012a). Cette étude englobant la collecte de populations au sein du *Parque Estadual de Viamão* dans la ville de Viamão, RS, Brésil, a été basée sur l'analyse des marqueurs moléculaires d'ADN du type ISSR. Malgré le nombre restreint de populations à cinq, cette étude apporte des contributions importantes sur la biologie de l'espèce. A partir d'analyse de la variance (AMOVA) a été demontré des niveaux éléves de structure génétique des populations (ϕ_{ST} = 0.3372). Un des facteurs qui peuvent contribuer à cela est que l'espèce est pollinisée par les abeilles collectrices de lipides de la tribu des Tapinotaspidini. Ce sont des abeilles solitaire qui habituellement nichent en terre (Aguiar *et al*., 2004) près de la zone de butinage. Cette habitude peut entraîner un faible flux de gènes entre les populations et en

conséquence, résulter en la différenciation génétique entre eux. A part des abeilles spécialisées dans la collecte des lipides floraux, les syrphes et les petites abeilles de collecte de pollen apparaissent aussi comme des visiteurs de fleurs de *S. micranthum* (Truylio *et al*., 2002; Freitas & Sazima, 2006).

La période de floraison de *S. micranthum* s'étend d'octobre à janvier (Truylio *et al*., 2002), mais il peut y avoir des variations en fonction de l'intensité de l'été. Selon le travail effectué par Truylio *et al*. (2002) sur la biologie florale et la pollinisation de *S. micranthum*, l'espèce est auto-incompatible avec des fleurs protogynes (stigmates deviennent réceptifs avant la maturation de pollen). Dans cette étude, il a été rapporté que les fleurs de *S. micranthum* ont été visités par six espèces d'abeilles, l'abeille *Lanthanomelissa betinae* Urbain, 1995 (Hymenoptera: Apidae: Tapinotaspidini) a présenté la plus grande fréquence des visites, et était designé, donc, comme le principal pollinisateur de *S. micranthum* (Truylio *et al*., 2002). Ils ont aussi observé les femmes des abeilles *L. betinae* chargées d'huile, probablement, recueillies à partir des fleurs de *S. micranthum*. D'autres études ont également signalé des interactions similaires entre *S. micranthum* et *L. betinae* (Rozen Jr. *et al*., 2006) et aussi avec d'autres espèces du genre *Lanthanomelissa* Holmberg, 1903 (Cocucci & Vogel, 2001).

Figure 7. Position phylogénétique de *Sisyrinchium micranthum*, *S. laxum* et *S. rosulatum* (Clade VII) dans l'arbre phylogénétique consensus du genre *Sisyrinchium* (d'après Chauveau *et al.*, 2011).



OBJECTIFS

La présente étude fait partie d'un projet plus vaste qui vise à contribuer à la connaissance de la biologie et de l'évolution des espèces brésiliennes du genre *Sisyrinchium* (Iridaceae). Devant la complexité du genre *Sisyrinchium*, très présent dans les espèces étudiées comme *S. micranthum*, ce projet vise à étudier les caractéristiques génétiques et cytogénétiques de cette espèce, ainsi que les aspects de la biologie de la reproduction en vue de contribuer à la connaissance taxonomique, reproductive et évolutive de l'espèce. Ces informations seront également importantes pour des futures études relatives au genre *Sisyrinchium*.

Objeticfs spécifiques :

- Développer un groupe de marqueurs microsatellites pour *S. micranthum*;
- A partir de l'emploi de ces marqueurs, évaluer la variabilité génétique intra et inter populations de *S. micranthum* dans le sud du Brésil (SC, PR et RS);
- Déterminer le nombre de chromosomes pour des nouvelles accessions du RS et d'effectuer les comptages chromosomiques pour les échantillons des États de SC et PR. En considerant que dans chaque point d'échantillonnage il est possible de trouver les différentes catégories morphologiques de *S. micranthum*, le mot **accession** sera utilisé pour définir un groupe de plantes du même point géographique avec les mêmes caractéristiques morphologiques qui possiblement constituent une population;
- Estimer le contenu d'ADN ou la taille du génome pour différents niveaux de ploïdie de *S. micranthum*;
- Evaluer la variabilité intra-spécifique du nombre et de l'emplacement des loci des gènes d'ADN ribosomique sur les chromosomes mitotiques de *S. micranthum*. De même, évaluer ces caractéristiques de manière comparative entre *S. micranthum* et deux espèces apparentées *S. laxum* et *S.*

rosulatum, qui forment le Clade VII de la phylogénie de Chauveau *et al*. (2011);

- Évaluer différentes catégories morphologiques par rapport à la présence d'autocompatibilité et la capacité d'autofécondation, de manière à étudier la capacité de formation de graines à travers de croisements artificiels entre les différentes catégories morphologiques de *S. micranthum*. Alors que *S. micranthum* et *S. laxum* se retrouvent en sympatrie dans certaines régions du RS et le fait que ces deux espèces ont déjà été considérés comme des synonymes, évaluer la capacité d'autofécondation et d'autocompatibilité de *S. laxum*, ainsi que d'étudier la capacité de formation des graines à partir de croisements artificiels entre les deux espèces.

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF NINE MICROSATELLITE LOCI FOR *SISYRINCHIUM MICRANTHUM* (IRIDACEAE)

Artigo publicado na revista/

Article publié dans la revue

American Journal of Botany –

Primer Notes & Protocols in Plant Sciences

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF NINE MICROSATELLITE LOCI FOR *SISYRINCHIUM MICRANTHUM* (IRIDACEAE)[1]

LUANA O. TACUATIÁ[2,3], FERNANDA W. CIDADE[4], ANETE P. SOUZA[4,5], AND TATIANA T. SOUZA-CHIES[6]

[2]Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43312, CP 15053, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 91501-970; [4]Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), Universidade Estadual de Campinas, CP 6010, Campinas, SP, Brazil, CEP 13083-970; [5]Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas, SP, Brazil, CEP 13083-970; [6]Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43433, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 91501-970

Number of words: 1186

1 Manuscript received _____; revision accepted _____.

The authors thank Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Project No. 477533/2009-4), for the graduate fellowship (141900/2008-3) awarded to L. O. Tacuatiá, cooperation program between Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Comité Français d'Evaluation de La Cooperation Universitaire avec le Brésil (CAPES-COFECUB, 550/07), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for graduate fellowship (2006/61242-8) awarded to F. W. Cidade.

3 Corresponding author: tacuatia@yahoo.com.br

ABSTRACT

***Premise of the study*:** *Sisyrinchium micranthum* Cav. is an herb with wide distribution and morphological variation, presenting three known cytotypes (2*x*, 4*x* and 6*x*), naturally occurring from Mexico to Argentina. The development of microsatellite markers for this species is important to provide molecular tools to investigate polyploidy origin, besides its relationship with phenotypic and genetic variability.

***Methods and Results*:** Nine microsatellite markers were isolated using an enriched genomic library, and characterized in a diploid population. Eight markers generated polymorphic loci in 27 plants of a population from southern Brazil. The number of alleles per locus ranged from two to nine, and the observed and expected heterozygosities varied from 0.192 to 0.741 and from 0.370 to 0.884, respectively.

***Conclusions*:** These species-specific DNA markers may be useful for further investigations of the involved polyploidization process and the population genetics of *S. micranthum*.

Key words: genetic variability; Iridaceae; microsatellite markers; plant populations; polyploidy; *Sisyrinchium micranthum*.

INTRODUCTION

Sisyrinchium micranthum Cav. (Iridaceae) is an herb that is widely distributed geographically, occurring naturally from Mexico to Argentina (Innes, 1985). Ecologically, the species is a member of a genus possessing flowers with oil-producing trichomes that are associated with plant–pollinator interactions, which may have played an important role in the diversification of *Sisyrinchium* species (Chauveau et al., 2011). Reports on the morphological variation in *S. micranthum* (Chukr & Capellari Jr., 2003; Tacuatiá et al., 2012a,b) and the occurrence of three different ploidy levels (2*x*, 4*x*, and 6*x*; Tacuatiá et al., 2012a,b) have raised questions about the relationship among polyploidy, phenotypic

variation, and genetic variability in the species (Tacuatiá et al., 2012a,b). Preliminary investigations on the genetic variability of the species using six ISSR markers showed some differences in the genetic differentiation of the diploid and polyploid populations analyzed (Tacuatiá et al., 2012a).

Thus, regarding the wide morphological variation of the species, the existence of three ploidy levels, and, since the polyploidization mechanism (allo- or autopolyploidyzation) involved in its diversification remains unclear, the development of microsatellite markers for *S. micranthum* constitutes an important effort to address these questions in further studies of population genetics. The present study reports the isolation and characterization of nine microsatellite loci in a diploid population, of which eight were polymorphic.

METHODS AND RESULTS

A population of *S. micranthum* was sampled in the municipality of Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brazil (accession ESC175; coordinates: 29°43'47.6" S, 51°03'55.7"W). One voucher specimen was deposited at the ICN Herbarium, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Total genomic DNA of 27 plants was extracted from 10–50 mg silica gel-dried leaves, according to the method described by Doyle and Doyle (1987) modified taken into account the reduced quantity of dried leaves and adapted to microcentrifuge tubes. A microsatellite-enriched genomic library was obtained from the DNA of a single individual, following the microsatellite-enriched library method of Billote et al. (1999). Total DNA was digested with *Rsa*I (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and ligated to the adaptors 5′-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3′ and 5′-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3′. The enrichment was done using hybridization-based capture with $(GT)_8$ and $(CT)_8$

biotin-linked probes and streptavidin magnetic-coated beads (Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles, Promega, Madison, Wisconsin, USA). The enriched fragments were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and the product was cloned into a pGEM T-Easy vector (Promega, Madison, Wisconsin, USA), before being transformed into Epicurian Coli XL1-blue *Escherichia coli* competent cells (Promega, Madison, Wisconsin, USA). A total of 96 recombinant colonies were obtained, and 48 were sequenced in an automated ABI PRISM 377 sequencer (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Foster City, California, USA) using T7 and SP6 primers and the BigDye terminator version 3.1 Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Foster City, California, USA). The sequences were edited and aligned using SeqMan software (DNAStar, Inc., Madison, Wisconsin, USA). MICROSAT software developed by A. M. Risterucci at Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD, France; not published) was used to eliminate adaptors and restriction sites on the sequences. Of the selected clones, 22 contained microsatellite sequences, of which 15 presented proper flanking regions for primer design. Oligonucleotides complementary to the genomic sequences flanking the microsatellite region were designed using Primer Select software (DNAStar, Inc., Madison, Wisconsin, USA) according to the following criteria: 1) size of primers preferably between 18 and 22 bp; 2) melting temperature (T_m) between 45 and 60 °C; 3) T_m difference between primer pairs no higher than 3 °C; 4) GC content between 40 and 60%; 5) no complementarity between primer pairs; and, 6) amplified product length between 100 and 300 bp.

PCR amplifications were performed on a PTC-200 thermocycler (MJ Research, Waltham, Massachusetts, USA) in a 20 µl reaction: 1 × PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.15 mM each dNTP, 0.8 mM each primer, 1 U *Taq* DNA polymerase, and 10 ng genomic

DNA. The PCR cycling conditions were as follows: initial denaturation for 3 min at 94°C, 30 cycles of denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 1 min at a primer-specific temperature (Table 1), elongation for 1 min at 72°C, and a final extension for 2 min at 72°C. The amplification products were checked with 3% agarose gels, then separated in 6% denaturing polyacrylamide gels and visualized by silver-staining according to Creste et al. (2001). A 10 base pair (bp) DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) was used as a size standard for allele scoring. The number of alleles per locus (A), observed and expected heterozygosities (H_O and H_E), and polymorphism information content (PIC) were calculated using CERVUS ver. 3.0.3 (Kalinowski et al., 2007).

Of the 15 evaluated primer pairs, 8 were polymorphic, 1 was monomorphic, 6 did not show satisfactory amplification, and 1 was amplified in less than half of the population. Among the polymorphic microsatellites, the number of alleles ranged from 2 for locus SM-C12 to 9 for loci SM-A6 and SM-A10, with an average of 5.33 alleles per locus (Table 1; considering all loci: AL). Observed heterozygosities ranged from 0.192 (locus SM-A8) to 0.741 (locus SM-C12), with an average of 0.434 (AL), and expected heterozygosities ranged from 0.255 (locus SM-D1) to 0.884 (locus SM-A10), with an average of 0.484 (AL). PIC values varied from 0.234 (locus SM-D1) to 0.849 (locus SM-A10), with an average of 0.442 (AL; Table 1).

CONCLUSIONS

The molecular markers described here are the first microsatellite loci isolated from *S. micranthum* and for the genus as a whole. The generation of these molecular markers was made across a diploid population, and may possibly be suitable in population genetic analyses involving the three known ploidy levels of the species (2*x*, 4*x*, and 6*x*). Since, to date, the polyploidy origin (allo- or autopolyploidy)of these cytotypes is not known, the

microsatellite markers for the species will be useful to make inferences about the type of polyploidization process, and to investigate the occurrence of mixed ploidy populations .Hence, the developed microsatellite markers may constitute new tools for studying genetic diversity and genetic structure of *S. micranthum*, as well for exploring issues related to the plant-pollinator interactions, thus achieving new avenues for the generation of knowledge about the relationship between genetic variability, polyploidy, and reproductive biology of the species.

LITERATURE CITED

BILLOTE, N., P. J. L. LAGODA, A.-M. RISTERUCCI, AND F.-C. BAURENS. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277–288.

CHAUVEAU, O., L. EGGERS, C. RAQUIN, A. SILVÉRIO, S. BROWN, A. COULOUX, C. CRUAUD, E. KALTCHUK-SANTOS, R. YOCKTENG, T. T. SOUZA-CHIES, AND S. NADOT. 2011. Evolution of oil-producing trichomes in Sisyrinchium (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Annals of Botany* 107: 1287–1312.

CHUKR, N. S., AND L. CAPELLARI JR. 2003. Iridaceae. *In* M. G. L. WANDERLEY, G. J. SHEPERD, T. S. MELHEM, A. M. GIULIETTI, AND M. KIRIZAWA [Eds.] 2003. *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*, vol. 3, 127–147. FAPESP/RiMa, São Paulo, Brazil.

CRESTE, S., A. TULMANN NETO, AND A. FIGUEIRA. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 299–306.

143 DOYLE J. J., AND J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities
144 of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
145 INNES C. 1985. *The world of Iridaceae - a comprehensive record*. Holly Gate International
146 Ltd., Ashington, UK.
147 KALINOWSKI, S. T., M. L. TAPER, AND T. C. MARSHALL. 2007. Revising how the computer
148 program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity
149 assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099–1006.
150 TACUATIÁ, L. O., L. EGGERS, E. KALTCHUK-SANTOS, AND T. T. SOUZA-CHIES. 2012a.
151 Population genetic structure of *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae) in
152 Itapuã State Park, Southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 35: 99–105.
153 TACUATIÁ, L. O., T. T. SOUZA-CHIES, A. M. FLORES, L. EGGERS, S. SILJACK-YAKOVLEV,
154 AND E. KALTCHUK-SANTOS. 2012b. Cytogenetic and molecular characterization of
155 morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil.
156 *Botanical Journal of the Linnean Society*: 169: 350–364.

TABLE 1. Characterization of nine microsatellite loci developed for *S.micranthum*. For each locus, the forward (F) and reverse (R) primer sequence, repeat motif, optimal annealing temperature (T_a), size range of fragments, number of alleles (A), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, polymorphism information content (PIC), and GenBank accession number are shown.

Locus	Primer Sequence (5' - 3')	Repeat Motif	T_a (°C)	Size Range (bp)	A	H_O	H_E	PIC	GenBank Accession No.
SM-A6	F: GCTAGTTCAAGGCTGTATG	$(CA)_7(A)_5$	48	198–214	9	0.481	0.644	0.595	JQ739148
	R: TATGGTTTTTGGGGTTTC								
SM-A8	F: CAATCATGGACAAGGTAAAT	$(TA)_2(CA)_4TG(CA)_3$	48	258–274	6	0.192	0.370	0.343	JQ739149
	R: ATAAGCAGGCGGAATAGACT								
SM-A10	F: TATTTGCTGATTTCTTGTTTTA	$(GT)_{12}$	55	239–257	9	0.636	0.884	0.849	JQ739150
	R: TCTGTATGAATAGCCTCTTTTT								
SM-B5	F: TTATCAGCCAAAACAAAGAAGG	$(AT)_2(AC)_6(AT)_3$	60	202–220	7	0.739	0.763	0.719	JQ739151
	R: TAGCCGGTGCAATAGGTAAAG								
SM-C12	F: TGAAGGTACTGCAAGGGAGGAA	$(GA)_3(GTA)_2(TC)_2$	60	221–231	2	0.741	0.475	0.358	JQ739153
	R: GAGCATAGCCACGGGAGAAC								
SM-D1	F: CTGGCCCCTTGGACTCACAT	$(TC)_6(TA)_4CCCAAA(CA)_9$	60	270–300	4	0.280	0.255	0.234	JQ739154
	R: AACTTGCCTCGCCATTTTCA								
SM-D8	F: CATATCTTAATCCATTCTGTGAG	$(AC)_7$	55	160–172	3	0.292	0.263	0.239	JQ739155
	R: CATAGTTCTAGCGCAAAAGTG								
SM-D11	F: GTCAAACAAAACTCAATCAAAC	$(GT)_{10}$	60	185–197	7	0.542	0.703	0.643	JQ739156
	R: ATCATCAGTCATATCCAGTCAC								
SM-C7	F: GCAATCCATTTTCCTAACATA	$(TG)_7$	60	261	1	0.000	0.000	0.000	JQ739152
	R: TGCTCACATTCACGACTT								
Average					5.33	0.434	0.484	0.442	



GENETIC STRUCTURE OF *SISYRINCHIUM MICRANTHUM* (IRIDACEAE) REVEALED BY MICROSATELLITES

Artigo a ser submetido na revista/

Cet article sera soumis à la revue

American Journal of Botany

GENETIC STRUCTURE OF SISYRINCHIUM MICRANTHUM (IRIDACEAE) REVEALED BY MICROSATELLITES[1]

LUANA O. TACUATIÁ[2,3], ELIANE KALTCHUK-SANTOS[4], LILIAN EGGERS[5], FERNANDA W. CIDADE[6], ANETE P. SOUZA[6]; TATIANA T. SOUZA-CHIES[4,5]

[2]Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43312, CP 15053, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 91501-970; [4]Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43312, CP 15053, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 91501-970; [5]Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43433, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 91501-970;[6]Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, CP 6109, Campinas, SP, Brazil, CEP 13083-970

[1] Manuscript received _____; revision accepted _____.

The authors thank T Robert, O. Chauveau, A. Snirc, and G. Lakis for suggestions. Authors are also grateful to Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Comité Français d'Evaluation de La Cooperation Universitaire avec le Brésil (CAPES-COFECUB), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

[3] Corresponding author: tacuatia@yahoo.com.br

ABSTRACT

Premise of the study: *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae: Iridoideae: Sisyrinchieae) is an annual herbaceous plant with complex phenotypical variation, and wide distribution in South Brazil. The species possess three different chromosome numbers ($2n$ = 16, 32, 48) described to date, and also may have some populations with mixed ploidy level. The current study aims to investigate the population genetic structure of the species in its southern distribution range in Brazil.

Methods: Twenty accessions of *S. micranthum* were collected over three states of Southern Brazil, and Polymerase Chain Reactions were performed by using specific microsatellite DNA loci.

Key Results: The results corroborate the occurrence of three ploidy levels for *S. micranthum*, and also indicate the presence of individuals with different ploidies in the same population. The inbreeding coefficient over all loci showed that *S. micranthum* exhibited an average excess of heterozygotes (F_{IS} = -0.247), with F_{IS} values of single populations ranging from -0.273 to 0.454, suggesting a mixed-mating system for the species varying across populations. Populations were highly structured, considering total F_{ST} value (F_{ST} = 0.343) and genetic divergence between pairs of populations.

Conclusions: These findings indicate that polyploidy and mixed-ploidy populations might be associated with the high differentiation between pairs of populations, and mostly with the wide phenotypical variability of *S. micranthum*. And, both possibly represent evolutionary advantages for this annual herb species.

Key words: genetic divergence; mating system; mixed-ploidy populations; microsatellite markers; polyploidy; population structure.

INTRODUCTION

Studies based on population genetics emerged as a fascinating area over the years providing data for inferences regarding gene flow, introgression, mating system, genetic structure and differentiation, migration, and reproductive biology of plant species. A repertoire of molecular markers as RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), microsatellite markers and others has been applied to identify genetic variation at different loci. Microsatellites are short tandem repeats, highly polymorphic and abundant throughout the genomes. The microsatellite markers, also known as SSR (Simple Sequence Repeat) or STR (Short Tandem Repeat) markers, are very attractive to studies at the population level because of the codominant inheritance and species-specificity; hence, microsatellite technology quickly became one of the most popular methods in population genetics (Ellegren, 2004).

Despite the broad interest by using SSR markers, analyses of genetic distance for polyploid organisms performed through microsatellites are usually compromised since these markers do not reveal dosage of alleles. Thus, for partial heterozygotes and populations with mixed ploidy level, allelic frequence calculations constitute one of the incomplete data, making genetic distance calculations based on these methods unsuitable (Bruvo et al., 2004; De Silva et al., 2005; Clark and Jasieniuk, 2011). Several softwares for population genetic analyses are available nowadays, but just few handle with polyploid microsatellite analysis. Furthermore, microsatellite data with genotype ambiguity, ploidy level higher than 4*x*, and mixed ploidy level may constitute restrictions for some of these softwares (Clark and Jasieniuk, 2011).

Such situation is controversial, since polyploidy has been reported as a widespread feature of plant diversification. Besides the fact that 70-100% of angiosperms can be traced to an ancient polyploid event (Masterson, 1994; Simillion et al., 2002; Blanc and Wolfe, 2004; Leitch and Leitch, 2008; Soltis et al., 2009; Jiao et al., 2011), in relation to polyploidy as an ongoing process, it was recently estimated that polyploidy has accompanied 15% of angiosperm speciation, with an occurrence of approximately 35% of neopolyploid species (recent polyploids, that have been formed since the arising of their genus) within genera of vascular plants (Wood et al., 2009). Additionally, several studies have been performed showing the existence of species whose populations consist of mixed-ploidy, with different levels of co-distribution of cytotypes (for example, see Thompson et al., 2004; Kenedy et al., 2006, and references therein; Cires et al., 2009; Kolář et al., 2009; Treier et al., 2009; Duchoslav et al., 2010; Marhold et al., 2010, and references therein; Trávníček et al., 2011a,b; Kim et al., 2012).

Sisyrinchium micranthum Cav. possess three different chromosome numbers (2*n* = 16, 32, 48) described to date, and also may have some populations with mixed ploidy level (Tacuatiá et al., 2012b). The species belongs to family Iridaceae, one of the larger families of Monocots (Goldblatt and Manning, 2008), exceeding 2030 species (Goldblatt et al., 2008). The genus *Sisyrinchium* L., remarkably complex and diverse, recently was investigated in terms of phylogenetic analysis performed through eight molecular markers that resulted in nine natural groups or clades (Chauveau et al., 2011). As the species exhibits a wide phenotypical variation which has been reported elsewhere (Chukr and Capellari Jr, 2003; Chauveau et al., 2011; Tacuatiá et al., 2012a,b), the study included specimens of *S. micranthum* with different morphologies and from diverse regions. In the consensus phylogenetic tree, the complex of *S. micranthum* is a well supported

93 monophyletic group, which is nested in the clade VII with *S. laxum* Otto ex Sims and *S.*
94 *rosulatum* E.P. Bicknell as the closest related species (Chauveau et al., 2011).

95 With such a phenotypical plasticity, the relationship between morphological types,
96 ploidy level and genetic variation was already investigated by means of ISSR markers and
97 cytogenetic analyses, comprising meiotic behavior, haploid chromosome number
98 countings, and pollen measurements and viability (Tacuatiá et al., 2012b). The results
99 suggested positive correlation between anther size and plant morphological profiles, as
100 well as between ploidy level and pollen size. In spite of shorter plants had presented larger
101 pollen grains and higher ploidy level, no evident direct relationship was verified to
102 morphological classification, chromosome numbers and genetic variation, highlighting the
103 complexity of such species. Besides, the high indexes of pollen viability and normal
104 meiotic behavior makes the origin of polyploidy (auto or allopolyploidy) uncertain
105 (Tacuatiá et al., 2012b).

106 Moreover, a previous analysis of population genetics of *S. micranthum* was also
107 performed with ISSR markers to evaluate the genetic variability of five populations inside
108 a conservation park in Rio Grande do Sul (RS), Brazil. The study detected a high
109 population differentiation, with minor variability in a polyploid population (Tacuatiá et al.,
110 2012a).

111 The current study aims to investigate the population genetic structure of 20
112 accessions of *S. micranthum* collected throughout three states of Southern Brazil, by using
113 seven microsatellite DNA loci developed by Tacuatiá et al. (in press). Specifically, this
114 paper seeks to (i) infer what type of polyploidy (auto- or allopolyploidy) is present in
115 *Sisyrinchium micranthum* by means of SSR markers; and (II) verify if there are differences
116 in the genetic divergence throughout the three states in Southern Brazil.

MATERIAL AND METHODS

***Population sampling*—**Five-hundred eighty-three plants of 20 accessions were sampled in the states of Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) and Paraná (PR), Brazil (Fig. 1), over the years 2007 and 2008. As every sampling site may present different morphological categories of *Sisyrinchium micranthum*, every group of individuals from the same geographical location with similar morphological characteristics which possibly constitute a population will be named as accession. Plants were collected and classified in the field according to main morphological features as described in Tacuatiá et al. (2012b). As some of the sampled sites presented plants with different morphologies, the collection of populations was made attempting to avoid mixture of plants with different ploidies, just in those situations in which one morphology could comprise more than one ploidy level. This way, the 20 accessions corresponds to 14 geographical locations. Collection sites, coordinates and numbers of collected individuals per population are shown in Table 1. Voucher specimens were deposited in the ICN Herbarium, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

***DNA extraction and microsatellite genotyping*—**Total genomic DNA was extracted from 10 to 50 mg silica gel-dried leaves according to the method described by Doyle and Doyle (1987) with few modifications. Seven microsatellite loci previously described by Tacuatiá et al. (in press) were used for Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifications. For five pair primers (SM-A8, SM-A10, SM-C7, SM-C12 and SM-D1), PCR amplifications were performed and the products treated as described by Tacuatiá et al. (in press). For the other two primer pairs (SM-B5 and SM-D11), the forward sequences were 5'-tailed with a 19-base pair (bp) M13 universal sequence (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'). These M13 universal sequence primers were 5'-

tagged with VIC and PET fluorescent dyes (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), respectively, in order to facilitate post-PCR multiplexing. For these primers, PCR amplifications were made on a Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a 12.5-µl multiplex reaction: 4 × Qiagen PCR buffer, 0.08 µM of each non-labeled forward and reverse primers, 0.05 µM of each labeled forward primer, and 30 ng of genomic DNA. The PCR cycling conditions were performed following recommendation of the Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen, Valencia, California, USA), and annealing temperature at 60°C. The amplification products were checked with 1.5% agarose gels. Fragment analysis was performed in an ABI 3730XL sequencer (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Allele sizes were determined by means of an internal GeneScan 500-LIZ size standard and genotypes were scored using Peak scanner Software v 1.0 (Perkin Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

***Genetic data analyses*—**Considering the possibility of the existence of different ploidy levels in the same population, ploidy of each individual was estimated based on allele number. Thus, it was considered the even ploidy relative to the maximum number of alleles over the seven loci. The following diversity parameters were calculated for each population: total number of alleles over loci (A), allelic richness (A'), gene diversity corrected for sample size (H_e) (Nei, 1978), gene diversity with unordered alleles (h) (Pons and Petit, 1996), and inbreeding coefficient (F_{IS}); and, for each microsatellite locus: A', H_e, h, and also departures of genotype frequencies from Hardy-Weinberg expectations relative to the entire population (F_{IT}) and within populations (F_{IS}), as well the proportion of genetic diversity due to allele frequency differences among populations (F_{ST}) were calculated. Adittionally, genetic differentiation among populations was estimated using F_{ST} pairwise

index (Weir and Cocherham, 1984), which is based on a nested ANOVA, where populations are weighted according to their sample size. Twenty-thousand random permutations of spatial locations, individuals and genes were made to statistically test the population differentiation.

The relationship between the matrix of pairwise genetic distance [$F_{ST}/(1 - F_{ST})$] and the matrix of parwise spatial distance (linear distance and its natural logarithm) was analyzed to investigate spatial genetic structure. For this, Euclidian distances were determined from the spatial coordinates, and 20 000 random permutations were computed. All analyses were carried out using the software SPAGeDi version 1.3 (Hardy and Vekemans, 2002) which supports analysis of autopolyploid organisms, with populations of mixed ploidy, and mostly, ploidy level superior than 4*x*.

Clustering patterns of individuals and accessions were analyzed using a Bayesian analysis implemented in the software STRUCTURE version 2.3.3 (Pritchard et al., 2000) and the method developed by Falush et al. (2003, 2007) which handles genotype ambiguity of polyploids. The program makes an assignment of each individual to genetic clusters (K) based on the estimate of membership coefficients. The genetic clustering and the estimate of the most likely number of populations (K) were performed under the admixture and independent alelle frequencies model, without consideration of the geographical locations of the accessions. Analyses were carried out with a burn-in period of 100 000 iterations, further run length of 100 000 Markov Chain Monte Carlo steps, testing population subdivision from K = 1 to 20. Twenty independent simulations were performed for each K to identify the optimal K value based on the method proposed by Evanno et al. (2005) and implemented in the software STRUCTURE HARVESTER version 0.6.7 (Earl, 2011). This

188 method uses an *ad hoc* statistic ΔK, which takes into account the rate of change in the log
189 probability of data between successive K values.

190 RESULTS

191 ***Polyploidy and mixed ploidy in* Sisyrinchium micranthum *populations*—**Among
192 the 583 individuals, 162 showed one to two alleles (2*x*), 353 showed a tetraploid pattern
193 (4*x*), and 68 showed an hexaploid pattern (6*x*). Most of the collected accessions presented
194 plants of different ploidy with exception of accessions ESC282H (only 4*x*), ESC233 (4*x*),
195 ESC312 (4*x*), ESC409 (4*x*), and ESC244D (4*x*) (Table 1). Globally, individuals showed
196 from one to six alleles per locus indicating that polyploids present an autopolyploid origin.

197 ***Genetic diversity and population structure*—**With a total of 124 alleles over loci,
198 the number of amplified alleles per locus ranged from 11 (SM-A8 and SM-C12) to 25
199 (SM-A10 and SM-D1) with an average of 17.71 alleles per locus (Table 2). Gene diversity
200 averaged over loci ranged from 0.178 (ESC371) to 0.768 (ESC266) for both estimates, H_e
201 and *h* (Table 1).

202 The number of alleles over loci (A) varied from 13 (ESC401) to 78 (ESC266)
203 alleles per population (Table 1). The allelic richness (A') ranged from 1.857 (ESC401) to
204 11.143 (ESC266) alleles per locus (Table 1). Gene diversity estimates based on Nei (1978)
205 and Pons and Petit (1996) were rather similar ranging from 0.397 (H_e), and 0.404 (*h*), to
206 0.893 (H_e), and 0.902 (*h*), for loci SM-C12 and SM-A10, respectively.

207 Results of global *F*-statistics over all loci (F_{IT} = 0.180, F_{IS} = -0.247, F_{ST} = 0.343;
208 Table 2) were all significant after permutation tests ($P < 0.001$). The mean inbreeding
209 coefficient (F_{IS} = -0.247) estimated as an average across loci and populations, indicated a
210 significant excess of heterozygotes ($P < 0.001$). Considering single populations, ten of the

20 accessions showed significant negative values of inbreeding coefficient, while seven populations presented significant positive values indicating an excess of homozygotes; one population showed no departures of HW genotypic frequencies, and two populations presented positive, but no significant values of inbreeding (Table 1). A high level of genetic differentiation among populations (F_{ST} = 0.343; Table 2) was verified, and the pairwise F_{ST} estimates varied from 0.018 to 0.704 (Table 3).

Considering spatial genetic structure analysis, the slope (b) of linear regression between pairwise genetic distance [$F_{ST}/(1 - F_{ST})$] and pairwise spatial linear distance was found to be significantly negative (b = -1.839, P = 0.022), and it was found a weak coefficient of correlation between genetic and geographic distances (r = 0.18). Thus, there is some spatial genetic structure, in which 18% of genetic structuring among populations is correlated with the geographic distances among them.

***Bayesian and clustering analyses*—**Bayesian analysis revealed that the model of K = 3 populations was the most adequate for elucidating the genetic structure of *S. micranthum* (Fig. 2). Cluster I gathers populations of CI and CII plants with violet flowers (CI-V and CII-V; ESC233 – CII-V, ESC242A – CII-V, ESC244C – CI-V, ESC345 – CI-V, ESC432 – CI-V, and ESC439 – CI-V). Cluster II grouped almost all CIII plants with violet, pink, or yellow flowers (ESC244D – CIII-V, ESC409 – CIII-V, ESC386 – CIII-Y, ESC371 – CIII-P, ESC401 – CIII-P), with exception of ESC266 – CIII-Y, that was clustered with plants of populations of categories CI and CII with violet, yellow, or white flowers (ESC282A – CII-V, ESC282H – CI-Y, ESC282L – CII-W, ESC314 – CI-Y; Cluster III); and, ESC315 – CIII-V, that was grouped with CI-W plants (ESC312, ESC342 and ESC433; Cluster III; Fig. 3). Thus, clustering into three groups put together plants and

populations irrespectively of geographical locations in exception of the accessions ESC282A, ESC282H, and ESC282L, which were all in the same cluster.

DISCUSSION

***Polyploidy and mixed ploidy in Sisyrinchium micranthum populations*—**Previous studies based on the cytogenetics of *Sisyrinchium micranthum* reported three chromosome counts $2n = 16$, 32, and 48 (Goldblatt, 1982; Kenton and Heywood, 1984; Goldblatt and Takei, 1997; Tacuatiá et al., 2012b). Besides that, a recent study presented two different countings for individuals of the same collected accession of *S. micranthum* in RS (Tacuatiá et al., 2012a). Cytological studies indicate that polyploidy represents an important factor in the evolution of Iridaceae (Sharma and Talukdar, 1960; Goldblatt and Takei, 1997), being pronounced in *Sisyrinchium* (Goldblatt, 1982; Kenton and Heywood, 1984; Kenton et al., 1986; Rudall et al., 1986) and which seems to trigger diversification in *S. micranthum* (Tacuatiá et al., 2012b). Presently, cytotypic variation has been evidenced in plant species and it is more widespread than previously anticipated (Fehlberg and Ferguson, 2012).

Thus, the results of the present study corroborate the existence of three ploidy levels for *S. micranthum*, and also the presence of individuals with different ploidies in the same population, since it was verified individuals with 1 - 2 (diploids), 1 - 4 (tetraploids) and 1 - 6 alleles (hexaploids). Our results suggest that the presence of different ploidies in the same population is rather common, with 75% of the surveyed populations possessing individuals with different number of alleles over loci. Moreover, it was verified up to six alleles per locus per individual, which indicates an autopolyploid origin for the polyploids of the species. Polyploidy is characterized by the presence of multiple sets of chromosomes, and the distinction in autopolyploids and allopolyploids is based on the mode of origin. While autopolyploidy is considered to be the genome multiplication within

a single species, allopolyploidy is the result of genome doubling linked to interspecific hybridization. Autopolyploidy was recurrently considered uncommon in plants in opposition to allopolyploidy, but this concept have been reconsidered, and is possibly more frequent than previously presumed (Ramsey and Schemske, 1998; Soltis et al., 2003, 2007). Usually, autopolyploidy presents polysomic inheritance and allopolyploidy exhibits disomic inheritance. For *Sisyrinchium* it was estimated that more than 70% of the already cytogenetically studied species are polyploids (Goldblatt and Takei, 1997), and an allopolyploid origin was suggested for some cytotypes of the genus (Kenton et al., 1986) although no consistent data is available. Cytogenetic data for *S. micranthum* were already investigated in a precedent study, whose results showed high indexes of meiotic behavior and pollen viability; also, some abnormalities were observed but with low frequencies (Tacuatiá et al., 2012b). Consequently, up to date, there was no hint about the polyploid origin for *S. micranthum*.

***Genetic diversity and population structure*—**Gene and allelic diversity were more pronounced in populations ESC266 and ESC282A. Regardless such populations, differences in gene and allelic diversity among the other accessions were less evident. Besides that, the inbreeding coefficient showed that *S. micranthum* exhibits an average excess of heterozygotes, suggesting that the species is predominantly allogamous, which is in line to a previous study of reproductive biology in *S. micranthum*, whose results indicated self-incompatibility in the surveyed plants (Truylio et al., 2002). Nonetheless, preliminary observations indicate that some *S. micranthum* specimes are self-compatible and capable of autonomous, but not exclusive selfing (Tacuatiá et al., in prep). Gathering both informations and the fact that in the present study, the F_{IS} values of single populations

varied from -0.273 (ESC233) to 0.454 (ESC314; Table 1), it is possible that a mixed mating system for *S. micranthum* better conforms the results.

Moreover, excess of heterozygotes (negative inbreeding coefficients) could be expected since autopolyploids present polysomic inheritance, which contributes substantially for a high heterozygosity (presence of partial and complete heterozygotes) (Parisod et al., 2010).

Sisyrinchium micranthum populations were highly structured, considering total F_{ST} value and genetic divergence between pairs of populations, as was also reported in a previous study for five *S. micranthum* populations using ISSR markers (Φ_{ST} = 0.3372, θ^{B} = 0.49; Tacuatiá et al., 2012a) and for other studied species of the genus like *S. palmifolium* L., *S. sellowianum* Klatt, and *S. vaginatum* Spreng., whose preliminary results indicated strong differentiation among populations (Souza-Chies et al., 2012). Genetic drift may be also considered for the whole panorama of the present study, since some populations presented significant homozygote excess (positive inbreeding coefficients), explaining also the high genetic divergence between populations, and consequently, high genetic structure.

Sisyrinchium micranthum is usually classified as an annual herb (Johnston, 1938; Innes, 1985; Goldblatt, 2003), and has seed dispersal by gravity mechanism (Harvey, 2000). Thus, the estimated value for genetic divergence among populations is consonant with G_{ST} values summarized for species with annual life cycle and mixed mating system, as well as, for annuals with gravity-dipersal mode of seeds (Hamrick and Godt, 1996).

Besides that, *S. micranthum* inhabits different environments in Southern Brazil, such as grasslands, open woods and, mostly anthropogenic sites, characterized by fragmented populations over cattle fields, field borders and roadsides. Areas with intense

environmental changes caused by human activities can hinder population maintenance, mostly in the case of an annual herbaceous plant. Under such disturbing conditions, polyploidy and mixed ploidy populations in addition with mixed mating systems may represent evolutionary advantages for the species.

Autopolyploidy may sustain heterozygosity (Parisod et al., 2010), also keeping a diversified gene pool (Husband, 2004). Moreover, individuals with different ploidy levels in the same population may possibly represent different modes of mating system, since polyploidy can break self-incompatilibility systems, facilitating reproduction through self-fertilization (Ramsey and Schemske, 1998). Selfing by itself may be disadvantageous contributing for high indices of inbreeding, but in the absence of pollinators (as a result of disturbed environment conditions, for example) should be a favorable response for the maintenance of populations.

Co-existence of different cytotypes have been described for a series of species (for some examples, see Cires et al., 2009; Kim et al., 2012; Trávníček et al., 2011b and many others in Introduction) reinforcing the assumption that it is still unknown the time and the means for ecological divergences take place between polyploids and diploids in natural populations (Parisod et al., 2010). And possibly, for that reason it was observed populations with different ploidies in sympatry.

Recurrent formation for polyploids has been described as of high frequency in auto- and allopolyploids (Soltis and Soltis, 1993, 1999), and possibly represents a strong source of morphological complexity in interbreeding polyploidy lineages, through gene exchange between diploid and established polyploids (Soltis and Soltis, 1999; Soltis et al., 2003). Thus, multiple polypoid origins are possibly the case for *S. micranthum*, as the species

presents populations with mixed-ploidy and is characterized by wide morphological variability.

***Bayesian analysis*—**Despite the high genetic divergence among populations (global F_{ST} value), the clustering based on Bayesian analysis grouped populations into three clusters (K = 3), with no strict relationship with spatial locations. Cluster I presented an interesting group of specimens, gathering together plants of populations from CI-V and CII-V categories, which represent the most difficult plants to be differentiated in the field due to some overlapping in morphological features and sympatry occurrence.

Additionaly, the analysis showed little admixture among the three clusters obtained. Notwithstanding, members of Cluster III presented genetic traces in all the other clusters, which might be related to the fact that populations with greater number of alleles and gene diversity, ESC266 and ESC282A, are grouped in this cluster, and possibly, they are major representatives of the variability of *S. micranthum*.

Regarding life history characteristics other than seed dispersal and life cycle, *S. micranthum* makes part of a restrict group of *Sisyrinchium* species that bears dense oil-producing trichomes on the staminal column of the flowers, presenting a functional association with its pollinators (Renner and Schaefer, 2010; Chauveau et al., 2011), usually described as oil-foraging bees from the family Apidae, of the tribe Tapinotaspidini (Cocucci and Vogel, 2001; Truylio et al., 2002). Regarding that (1) the foraging activities of these bees occur close to nesting areas, (2) the limited seed dispersal capacity of *S. micranthum*, (3) the possible existence of populations with mixed mating systems, and (4) the fact that most clusters resulted from the Bayesian analysis presented populations of distant regions and/or States, it is possible that the clustering may be not representative of gene flow, but mostly of common genetic origin. Otherwise, it is important to note that

anthropic activities possibly play important role to disseminate seeds, due to the use of machinery commonly used by roadside and field managers, acting as efficient seed dispersal agents.

FINAL REMARKS

This work represents the first attempt to find clues about the polyploid origin for *S. micranthum* by means of molecular markers developed for the species. Despite the use of a specific molecular marker, there are few availabe softwares to date, which handle data of polyploid organisms with different ploidy levels, mixed ploidy, ploidy higher than 4*x*, and essentially, the so called genotype ambiguity characteristic of polyploid organisms. Even so, these softwares have limitations on account of the peculiar difficulty in working with polyploids, as most analyses and consequent predictions are devised for diploid organisms, since this is one of the conditions to Hardy-Weinberg equilibrium model and its derivative equations in population genetics.

Notwithstanding, the present study showed high divergence among populations and different degrees of excess/deficiency heterozygotes across the surveyed populations. *S. micranthum* with all its morphological variability representes one natural taxon (Chauveau et al., 2011), and presents accessions with different ploidy levels and high indexes of meiotic behavior and pollen viability (Tacuatiá et al., 2012b). With the present study we have more evidences about the occurrence of different ploidy levels in *S. micranthum* populations, and the high divergence among populations. These findings were an outcome of studies based on a great effort of collection throughout the three States of Southern Brazil, since we have intensively worked on Iridaceae species from 2006. Before that, no information was available on the distribution and richness of the species.

375 LITERATURE CITED

376 BLANC, G., AND K. H. WOLFE. 2004. Widespread paleopolyploidy in model plant species
377 inferred from age distributions of duplicate genes. *The Plant Cell* 16: 1667–1678.

378 BRUVO, R., N. K. MICHIELS, T. G. D'SOUZA, AND H. SCHULENBURG. 2004. A simple
379 method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of
380 ploidy level. *Molecular Ecology* 13: 2101–2106.

381 CHAUVEAU, O., L. EGGERS, C. RAQUIN, A. SILVÉRIO, S. BROWN, A. COULOUX, C. CRUAUD,
382 ET AL. 2011. Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae):
383 insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Annals of*
384 *Botany* 107: 1287–1312.

385 CHUKR, N. S., AND L. CAPELLARI JR. 2003. Iridaceae. *In* M. G. L. Wanderley, G. J.
386 Sheperd, A. M. Giukietti, T. S. Melhem [coords.], Flora Fanerogâmica do Estado de
387 São Paulo, 127–147. FAPESP RiMa, São Paulo, BR.

388 CIRES, E., C. CUESTA, E. L. PEREDO, M. A. REVILLA, AND J. A. F. PRIETO. 2009. Genome
389 size variation and morphological differentiation within *Ranunculus parnassifolius*
390 group (Ranunculaceae) from calcareous screes in the Northwest of Spain. *Plant*
391 *Systematics and Evolution* 281: 193–208.

392 CLARK, L. Y. V., AND M. JASIENIUK. 2011. POLYSAT: an R package for polyploid
393 microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources* 11: 562–566.

394 COCUCCI, A. R., AND S. VOGEL. 2001. Oil-producing of *Sisyrinchium* species (Iridaceae)
395 and their pollinators in southern South America. *Flora* 196: 26–46.

396 DE SILVA, H. N., A. J. HALL, E. RIKKERINK, M. A. MCNEILAGE, AND L. G. FRASER. 2005.
397 Estimation of allele frequencies in polyploids under certain patterns of inheritance.
398 *Heredity* 95: 327–334.

399 DOYLE J. J., AND J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities
400 of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.

401 DUCHOSLAV, M., L. ŠAFÁŘOVÁ, AND F. KRAHULEC. 2010. Complex distribution patterns,
402 ecology and coexistence of ploidy levels of *Allium oleraceum* (Alliaceae) in the
403 Czech Republic. *Annals of Botany* 105: 719–735.

404 EARL, D. A. 2011. Structure harvester, version 0.6.1. [online] Website
405 http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/ [accessed 5 January 2012].

406 ELLEGREN, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature*
407 *Reviews* 5: 435–445.

408 EVANNO, G., S. REGNAUT, AND J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of
409 individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. Molecular
410 Ecology 14: 2611–2620.

411 FALUSH, D., M. STEPHENS, J. K. PRITCHARD. 2003. Inference of population structure using
412 multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*
413 164: 1567–1587.

414 FALUSH, D., M. STEPHENS, J. K. PRITCHARD. 2007. Inference of population structure using
415 multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology*
416 *Notes* 7: 574–578.

417 FEHLBERG, S. D., AND C. J. FERGUSON. 2012. Intraspecific cytotypic variation and
418 complicated genetic structure in the *Phlox amabilis-P.woodhousei* (Polemoniaceae)
419 complex. *American Journal of Botany* 99: 865–874.

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

422 GOLDBLATT, P. 2003. Iridaceae *In* B. E. Hammel, M. H. Grayum, C. Herrera, and N.
423 Zamora [eds.], Manual de plantas de Costa Rica, Systematic botany monographs
424 92: 603–612.

425 GOLDBLATT, P., AND J. C. MANNING. 2008. The Iris Family: Natural History and
426 Evolution. Timber Press, Portland, Oregon.

427 GOLDBLATT, P., AND M. TAKEI. 1997. Chromosome cytology of Iridaceae – patterns of
428 variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype
429 change. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 84: 285–304.

430 GOLDBLATT, P., A. RODRIGUEZ, M. P. POWELL, D. T. JONATHAN, J. C. MANNING, M. VAN
431 DER BANK, AND V. SAVOLAINEN. 2008. Iridaceae 'Out of Australasia'? Phylogeny,
432 biogeography, and divergence time based on blastid DNA sequences. *Systematic*
433 *Botany* 33: 495–508.

434 HAMRICK, J. L., AND M. J. W. GODT. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity
435 in plant species. *Philosophical Trasactions of the Royal Society of London . Serie*
436 *B. Biological Sciences* 351: 1291–1298.

437 HARDY, O. J., AND X. VEKEMANS. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to
438 analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular*
439 *Ecology Notes* 2: 618–620.

440 HARVEY, C. A. 2000. Windbreaks enhance seed dispersal into agricultural landscapes in
441 Monteverde, Costa Rica. *Ecological Applications* 10: 155–173.

442 HUSBAND, B. C. 2004. The role of triploid hybrids in the evolutionary dynamics of mixed-
443 ploidy populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 537–546.

444 INNES, C. 1985. The world of Iridaceae - a comprehensive record. Holly Gate Internacional
445 Ltd., England, Ashington Sussex RH20 3BA.

446 JIAO, Y., N. J. WICKETT, S. AYYAMPALAYA S, A. S. CHANDERBALI, L. LANDHERR, P. E.
447 RALPH, L. P. TOMSHO, ET AL. 2011. Ancestral polyploidy in seed plants and
448 angiosperms. *Nature* 473: 97–100.

449 JOHNSTON, I. M. 1938. The species of *Sisyrinchium* in Uruguay, Paraguay and Brazil.
450 *Journal of the Arnold Arboretum* 19: 376–401.

451 KENNEDY, B. F., H. A. SABARA, D. HAYDON, B. C. HUSBAND. 2006. Pollinator-mediated
452 assortative mating in mixed ploidy populations of *Chamerion angustifolium*
453 (Onagraceae). *Oecologia* 150: 398–408.

454 KENTON, A., AND C. A. HEYWOOD. 1984. Cytological studies in South American *Iridaceae*.
455 *Plant Systematics and Evolution* 146: 87–104.

456 KENTON, A. Y., P. J. RUDALL, AND A. R. JOHNSON. 1986. Genome size variation in
457 *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) and its relationship to phenotype and habitat. *Botanical*
458 *Gazette* 147: 342–354.

459 KIM, S., A. L. RAYBURN, A. PARRISH, AND D. K. LEE. 2012. Cytogeographic distribution
460 and genome size variation in prairie cordgrass (*Spartina pectinata* Bosc ex Link).
461 *Plant Molecular Biology Reporter*.

462 KOLÁŘ, F., M. ŠTECH, P. TRÁVNÍČEK, J. RAUCHOVÁ, T. URFUS, P. VÍT, M. KUBEŠOVÁ, AND
463 J. SUDA. 2009. Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (Dipsacaceae) puzzle:
464 primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and
465 microgeographic scales. *Annals of Botany* 103: 963–974.

466 LEITCH, A. R., AND I. J. LEITCH. 2008. Genomic plasticity and the diversity of polyploid
467 plants. *Science* 320: 481–483.

468 MARHOLD, K., H. KUDOH, J.-H. PAK, K. WATANABE, S. ŠPANIEL, AND J. LIHOVÁ. 2010.
469 Cytotype diversity and genome size variation in eastern Asian polyploid
470 *Cardamine* (Brassicaceae) species. *Annals of Botany* 105: 249–264.

471 MASTERSON, J. 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of
472 angiosperms. *Science* 264: 421–424.

473 NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance for small number
474 of individuals. *Genetics* 89: 583–590.

475 PARISOD, C., R. HOLDEREGGER, AND C. BROCHMANN. 2010. Evolutionary consequences of
476 autopolyploidy. *New Phytologist* 186: 5–17.

477 PONS, O., R. J. PETIT. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered
478 versus unordered alleles. *Genetics* 144: 1237–1245.

479 PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS, AND P. DONNELLY. 2000. Inference of population
480 structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.

481 RAMSEY, J., AND D. W. SCHEMSKE. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid
482 formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and*
483 *Systematics* 29: 467–501.

RENNER, S. S., AND H. SCHAEFER. 2010. The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. *Philosophical Trasactions of the Royal Society of London . Serie B. Biological Sciences* 365: 423–435.

RUDALL, P., A. Y. KENTON, AND T. J. LAWRENCE. 1986. An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied genera. *Botanical Gazette* 147: 466–477.

SHARMA, A. K., AND C. TALUKDAR. 1960. Chromosome studies in members of the Iridaceae and their mechanism of speciation. *Genetica* XXXI: 385–409.

SIMILLION, C., K. VANDEPOELE, M. C. E. VAN MONTAGU, M. ZABEAU, AND Y. VAN DE PEER. 2002. The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 13627–13632.

SOLTIS, D. E., AND P. S. SOLTIS. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences* 12: 243–273.

SOLTIS, D. E., AND P. S. SOLTIS. 1999. Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Tree* 14: 348–352.

SOLTIS, D. E., P. S. SOLTIS, AND J. A. TATE. 2003. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist* 161: 173–191.

SOLTIS, D. E., P. S. SOLTIS, D. W. SCHEMSKE, J. F. HANCOCK, J. N. THOMPSON, B. C. HUSBAND, AND W. S. JUDD. 2007. Autopolyploidy in angiosperms: have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* 56: 13–30.

SOLTIS, D. E., V. A. ALBERT, J. LEEBENS-MACK, C. D. BELL, A. H. PATERSON, C. ZHENG, D. SANKOFF, C. W. DEPAMPHILIS, P. K. WALL, AND P. S. SOLTIS. 2009. Polyploidy and angiosperm diversification**.** *American Journal of Botany* 96: 336–348.

SOUZA-CHIES, T. T., E. KALTCHUK-SANTOS, L. EGGERS, A. M. FLORES, E. M. STIEHL-ALVES, J. FACHINETTO, J. LUSTOSA, ET AL. 2012. Studies on diversity and evolution of Iridaceae species of southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*: *in press*.

TACUATIÁ, L. O., L. EGGERS, E. KALTCHUK-SANTOS, AND T. T. SOUZA-CHIES. 2012a. Population genetic structure of *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae) in Itapuã State Park, Southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 35: 99–105.

TACUATIÁ, L. O., T. T. SOUZA-CHIES, A. M. FLORES, L. EGGERS, S. SILJAK-YAKOVLEV S, AND E. KALTCHUK-SANTOS. 2012b. Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 350–364.

THOMPSON, J. N., S. L. NUISMER, AND K. MERG. 2004. Plant polyploidy and the evolutionary ecology of plant/animal interactions. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 511–519.

TRÁVNÍČEK, P., B. KUBÁTOVÁ, V. ČURN, J. RAUCHOVÁ, E. KRAJNÍKOVÁ, J. JERSÁKOVÁ, AND J. SUDA. 2011a. Remarkable coexistence of multiple cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* aggregate (the fragrant orchid): evidence from flow cytometry. *Annals of Botany* 107: 77–87.

TRÁVNÍČEK, P., Z. DOČKALOVÁ, R. ROSENBAUMOVÁ, B. KUBÁTOVÁ, Z. SZELAG, AND J. CHRTEK. 2011b. Bridging global and microregional scales: ploidy distribution in *Pilosella echioides* (Asteraceae) in central Europe. *Annals of Botany* 107: 443–454.

TREIER, U. A., O. BROENNIMANN, S. NORMAND, A. GUISAN, U. SCHAFFNER, T. STEINGER, AND H. MÜLLER-SCHÄRER. 2009. Shift in cytotype frequency and niche space in the invasive plant *Centaurea maculosa*. *Ecology* 90: 1366–1377.

TRUYLIO, B., B. HARTER-MARQUES, AND W. ENGELS. 2002. Biologia floral e polinização de *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) na região do planalto das araucárias do Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* 10: 11–24.

WEIR, B. S., AND C. C. COCKERHAM. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.

WOOD, T. E., N. TAKEBAYASHIC, M. S. BARKER, I. MAYROSEE, P. B. GREENSPOOND, AND L. H. RIESEBERG. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 13875–13879.

.

Tables

TABLE 1. Accessions of *Sisyrinchium micranthum*, with geographical location, morphological description, and genetic parameters for seven analyzed loci.

Accession	State	Municipality	Latitute S	Longitude W	Morphological description		N	Ploidy level (*x*)	A	A'	H_e	*h*	F_{IS}
					Category[a]	Flower color							
ESC266	RS	Tavares	31° 23’ 58.3”	51° 09’ 47.7”	CIII	yellow	26	4, 6	78	11.143	0.768	0.768	-0.045*
ESC282A	RS	São Lourenço do Sul	31° 22’ 22.2”	52° 05’ 56.1”	CII	violet	30	4, 6	74	10.571	0.747	0.747	-0.108*
ESC282H	RS	São Lourenço do Sul	31° 22’ 22.2”	52° 05’ 56.1”	CI	yellow	31	4	16	2.286	0.470	0.470	-0.039*
ESC282L	RS	São Lourenço do Sul	31° 22’ 22.2”	52° 05’ 56.1”	CII	white	12	4, 6	33	4.714	0.524	0.524	0.108*
ESC432	RS	Caçapava do Sul	30° 41’ 37.3”	53° 23’ 35.9”	CI	violet	39	2, 4	38	5.429	0.547	0.547	0.000*
ESC433	RS	Caçapava do Sul	30° 41’ 37.3”	53° 23’ 35.9”	CI	white	39	4, 6	31	4.429	0.520	0.520	0.076*
ESC439	RS	Bagé	30° 47’ 23.3”	53° 34’ 46.5”	CI	violet	32	2, 4, 6	39	5.571	0.594	0.594	-0.098*
ESC233	SC	Ipumirim	26° 59’ 56.6”	52° 10’ 12.4”	CII	violet	29	4	25	3.571	0.539	0.539	-0.273*
ESC312	SC	Jaraguá do Sul	26° 31’ 34.7”	49° 12’ 47.2”	CI	white	31	4	16	2.286	0.482	0.482	0.024*
ESC314	SC	Jaraguá do Sul	26° 31’ 34.7”	49° 12’ 47.2”	CI	yellow	11	4, 6	17	2.429	0.349	0.349	0.454*
ESC315	SC	São Bento do Sul	26° 22’ 32.3”	49° 19’ 31.0”	CIII	violet	31	2, 4	21	3.000	0.302	0.302	0.277*
ESC401	SC	Itaiópolis	26° 20’ 16.1”	50° 04’ 21.9”	CIII	pink	46	2, 4	13	1.857	0.214	0.214	0.373*
ESC409	SC	Campo Belo do Sul	28° 01’ 05.7”	50° 33’ 16.6”	CIII	violet	15	4	36	5.143	0.513	0.513	-0.060*
ESC242A	PR	Teixeira Soares	25° 27’ 14.5”	50° 27’ 20.4”	CII	violet	31	2, 4, 6	32	4.571	0.502	0.502	-0.076*
ESC244C	PR	Palmeira	25° 26’ 10.5”	49° 58’ 40.7”	CI	violet	31	4, 6	24	3.429	0.551	0.551	-0.268*
ESC244D	PR	Palmeira	25° 26’ 10.5”	49° 58’ 40.7”	CIII	violet	29	4	28	4.000	0.330	0.330	0.157*
ESC342	PR	Jaguariaíva	24° 21’ 17.4”	49° 48’ 22.1”	CI	white	30	2, 4	22	3.143	0.455	0.455	-0.046*
ESC345	PR	Jaguariaíva	24° 21’ 17.4”	49° 48’ 22.1”	CI	violet	24	4, 6	34	4.857	0.572	0.572	-0.109*
ESC371	PR	Guarapuava	25° 22’ 45.7”	51° 30’ 29.2”	CIII	pink	34	4, 6	19	2.714	0.178	0.178	0.460
ESC386	PR	Palmas	26° 31’ 55.2”	51° 58’ 20.6”	CII	yellow	32	2, 4	32	4.571	0.354	0.354	0.349

550 *Note*: N = number of sampled plants; A = total number of alleles over loci in each population; A' = allelic richness; H_e = gene

551 diversity according to Nei (1978); *h* = gene diversity according to Pons and Petit (1996); F_{IS} = inbreeding coefficient .

552 [a]ESC indicates collectors Eggers and Souza-Chies and is followed by the number of the collection.

553 [b]Morphological classification according to Tacuatiá et al. (2012b).

554 * Significant inbreeding coefficient (F_{IS}) values at $P = 0.05$.

555 TABLE 2. Characterization of seven microsatellite loci in twenty accessions of *Sisyrinchium*

556 *micranthum.*

Locus	A’	H_e	*h*	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}
SM-A8	11	0.507	0.541	0.220	-0.357	0.425
SM-A10	25	0.893	0.902	0.075	-0.164	0.205
SM-B5	14	0.733	0.753	0.098	-0.447	0.377
SM-C7	16	0.632	0.634	0.011	-0.291	0.234
SM-C12	11	0.397	0.404	0.192	-0.223	0.339
SM-D1	25	0.854	0.879	0.281	-0.218	0.410
SM-D11	22	0.779	0.812	0.380	-0.103	0.438
Mean	17.714	0.685	0.704	0.180	-0.247	0.343

557 *Note*: A’ = allelic richness; H_e = gene diversity according to Nei (1978); *h* = gene diversity

558 according to Pons and Petit (1996); F_{IT} = overall inbreeding coefficient; F_{IS} = inbreeding

559 coefficient; F_{ST} = fixation index.

560 TABLE 3. Pairwise genetic divergence (F_{ST}) among twenty populations of *Sisyrinchium micranthum*.

	ESC266	ESC282A	ESC282H	ESC282L	ESC432	ESC433	ESC439	ESC233	ESC312	ESC314	ESC315	ESC401	ESC409	ESC242A	ESC244C	ESC244D	ESC342	ESC345	ESC371
ESC282A	0.018																		
ESC282H	0.252	0.198																	
ESC282L	0.118	0.133	0.406																
ESC432	0.178	0.147	0.278	0.292															
ESC433	0.274	0.238	0.385	0.440	0.341														
ESC439	0.142	0.118	0.277	0.242	0.022	0.323													
ESC233	0.164	0.148	0.297	0.255	0.155	0.354	0.127												
ESC312	0.288	0.253	0.392	0.458	0.365	0.058	0.346	0.368											
ESC314	0.323	0.289	0.227	0.513	0.445	0.493	0.418	0.420	0.526										
ESC315	0.241	0.232	0.450	0.414	0.436	0.486	0.427	0.404	0.493	0.541									
ESC401	0.320	0.320	0.587	0.375	0.478	0.609	0.443	0.470	0.655	0.704	0.633								
ESC409	0.116	0.120	0.323	0.213	0.264	0.414	0.229	0.226	0.433	0.386	0.376	0.374							
ESC242A	0.150	0.130	0.357	0.207	0.142	0.334	0.108	0.112	0.348	0.475	0.394	0.416	0.205						
ESC244C	0.159	0.142	0.300	0.264	0.146	0.351	0.115	0.039	0.379	0.416	0.416	0.459	0.234	0.112					
ESC244D	0.244	0.256	0.448	0.351	0.372	0.502	0.341	0.354	0.517	0.532	0.493	0.460	0.159	0.335	0.353				
ESC342	0.266	0.236	0.371	0.412	0.337	0.094	0.311	0.346	0.048	0.506	0.491	0.632	0.393	0.316	0.353	0.498			
ESC345	0.116	0.111	0.318	0.204	0.097	0.323	0.065	0.104	0.360	0.447	0.412	0.404	0.193	0.073	0.073	0.313	0.316		
ESC371	0.276	0.281	0.554	0.335	0.451	0.584	0.411	0.445	0.625	0.658	0.585	0.428	0.366	0.392	0.438	0.430	0.600	0.383	
ESC386	0.183	0.194	0.468	0.213	0.335	0.507	0.291	0.328	0.536	0.566	0.459	0.165	0.247	0.286	0.303	0.338	0.500	0.246	0.274

Figures

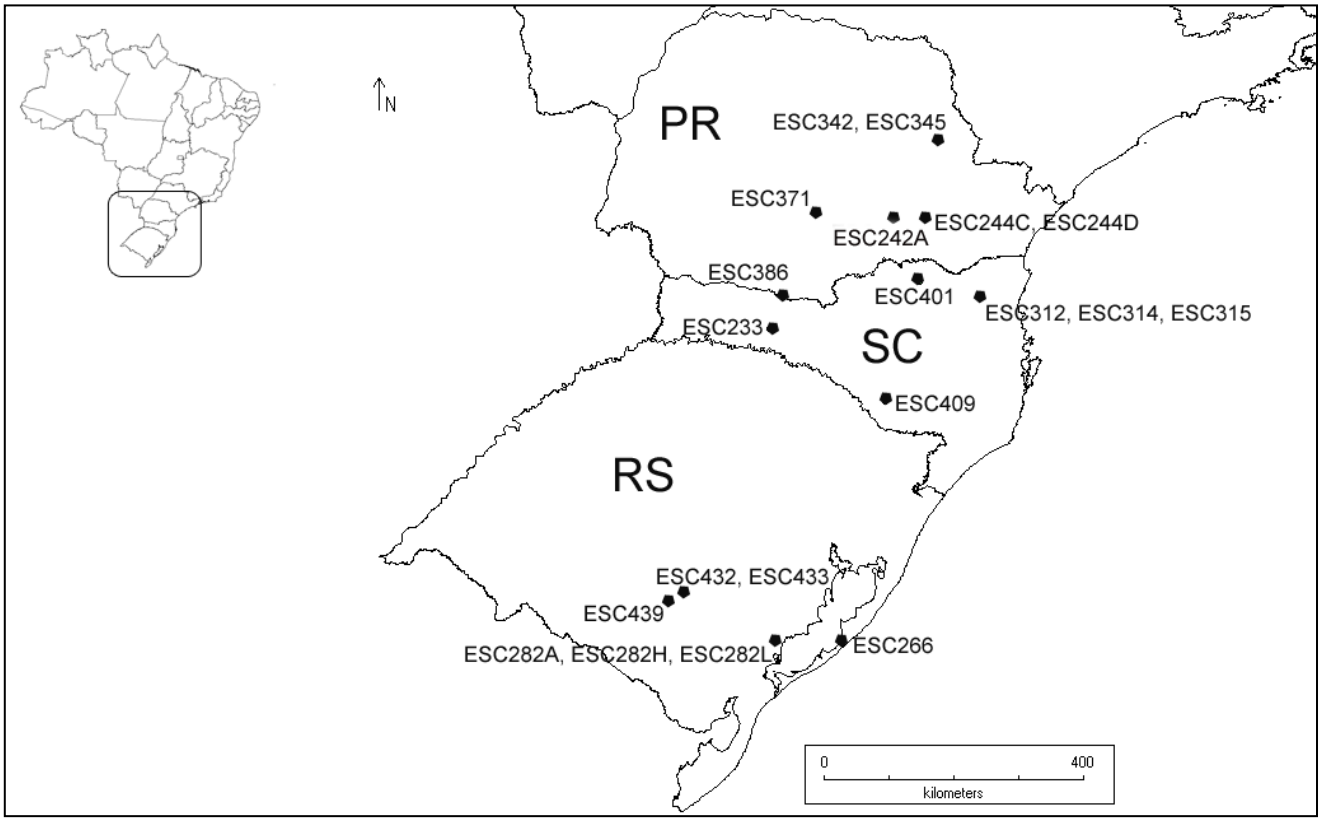
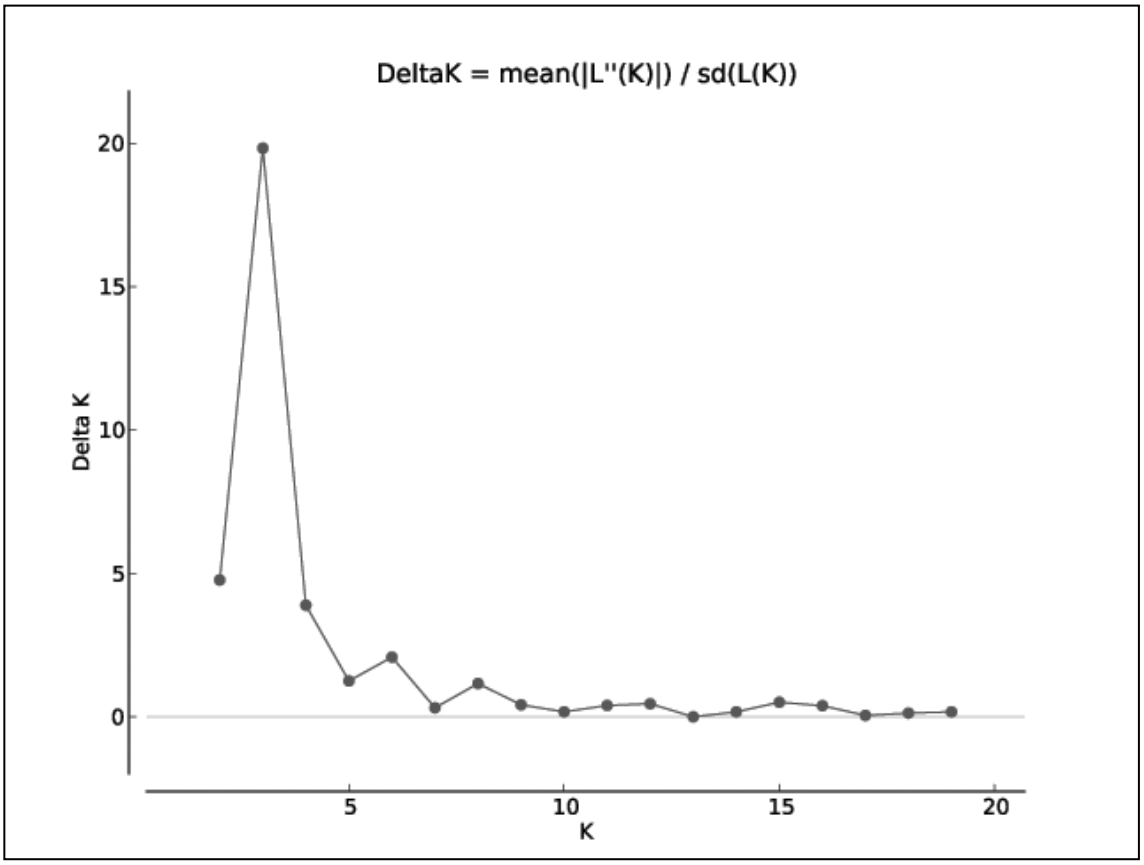


Fig. 1. Map of the Southern Brazil showing the surveyed accessions and the studied area: states of Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) and Paraná (PR).

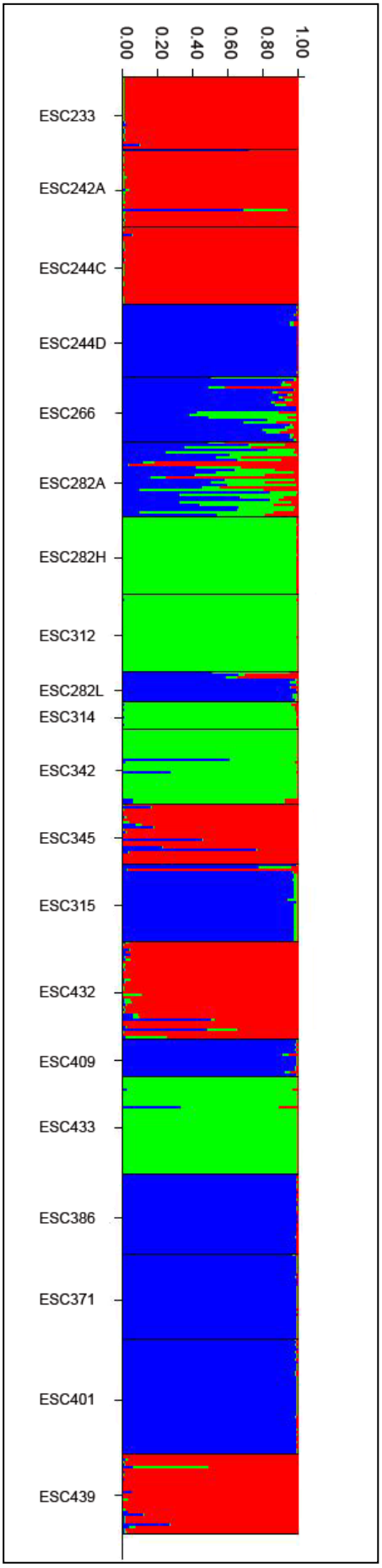


573

574 Fig. 2. Magnitude of the modal value of K for *Sisyrinchium micranthum*
575 microsatellite data. The modal value was calculated as a function of K (mean ± SD over 20
576 replicates), according to Evanno et al. (2005).

577

Fig. 3. Bayesian admixture proportions (Q) of individual plants of *Sisyrinchium micranthum* for K = 3 genetic clusters, individual is represented by a single vertical line broken into K colored segments, with lengths proportional to each of the K-inferred clusters. Cluster I – red color; cluster II – blue; and cluster III – green.



Physical mapping of rRNA genes and genome size variation in polyploid series of *Sisyrinchium micranthum* and its closely related species *S. laxum* and *S. rosulatum* (Iridaceae)

Artigo a ser submetido na revista/
Cet article sera soumis à la revue
Botanical Journal of the Linnean Society

Physical mapping of rRNA genes and genome size variation in polyploid series of *Sisyrinchium micranthum* and its closely related species *S. laxum* and *S. rosulatum* (Iridaceae)

LUANA O. TACUATIÁ[1,4*]; ELIANE KALTCHUK-SANTOS[1,2]; TATIANA T. SOUZA-CHIES[2,3]; LILIAN EGGERS[3]; ODILE ROBIN[4]; FATIMA PUSTAHIJA[4,5]; CHRISTIAN RAQUIN[4]; SONJA SILJAK-YAKOVLEV[4]

[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, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43312, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil*

[3]*Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Botânica, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*

[4]*Université Paris-Sud, Ecologie, Systématique, Evolution, UMR 8079 CNRS-UPS-AgroParisTech,Bâtiment 360, 91450 Orsay, France*

[5]*Faculty of Forestry, University of Sarajevo, Zagrebacka 20, 71000 Sarajevo, Bosnia and Herzegovina*

[*] Corresponding author. Email: tacuatia@yahoo.com.br

CYTOGENETIC CHARACTERIZATION OF *S. MICRANTHUM, S. LAXUM* AND *S. ROSULATUM*

ABSTRACT

Sisyrinchium micranthum Cav. (Iridaceae) is an annual herb with three ploidy levels, 2*n* = 2*x* = 16, 2*n* = 4*x* = 32, 2*n* = 6*x* = 48, while the closely related species *S. laxum* Otto ex Sims and *S. rosulatum* E.P. Bicknell have only one ploidy level, 2*n* = 2*x* = 16 and 2*n* = 4*x* = 32, respectively. Here we investigated cytogenetic aspects and genome size variation among the three species. Interspecific and intraspecific variation in the numbers of G-C rich heterochromatin regions, and 18S-26S rDNA loci were observed. The polyploids presented a remarkable reduction in the number of 18S-26S rDNA loci in comparison to the diploids, while 5S locus had a proportional increase in the number of signals as increased ploidy level. The data on genome size for the three species showed a genome downsizing from diploids to polyploids, and also a small inter- and intraspecific variation in the DNA content. This variability in terms of number of CMA positive bands and rDNA loci, and genome size could indicate that the polyploids present an origin from different recurring chromosomal duplication events in which a high genome restructuring occurred followed by DNA loss.

ADDITIONAL KEYWORDS: Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) - fluorochrome banding, monoploid genome size - nuclear DNA content – polyploidy - rDNA

INTRODUCTION

Sisyrinchium L. (Iridaceae: Iridoideae: Sisyrinchieae) is a medium-sized genus comprising about 140 mostly perennial species (Goldblatt *et al*., 2008; Goldblatt & Manning, 2008). Displaying a great morphological variability and a complex taxonomy, the genus was recently investigated by means of phylogenetic analyses based on eight molecular markers that resulted in nine clades. *Sisyrinchium micranthum* Cav. was nested with two closely related species *S. laxum* Otto ex Sims and *S. rosulatum* E.P. Bicknell in the clade VII, resulting in a well supported monophyletic group (Chauveau *et al*., 2011).

Sisyrinchium micranthum is an annual herbaceous plant with distribution range from Mexico to Northern Argentina (Johnston, 1938). The species present complex phenotypical variation (Chukr & Capellari Jr, 2003; Chauveau *et al*., 2011; Tacuatiá *et al*., 2012b), and wide distribution over the south region of Brazil. The species is cytogenetically characterized by a polyploid series with three ploidy levels, $2n = 2x = 16$ (Tacuatiá *et al*., 2012b), $2n = 4x = 32$ (Oliver & Lewis, 1962; Goldblatt, 1982; Tacuatiá *et al*., 2012b), $2n = 6x = 48$ (Kenton & Heywood, 1984; Kenton, Rudall & Johnson, 1986; Rudall, Kenton & Lawrence, 1986; Goldblatt & Takei, 1997; Tacuatiá *et al*., 2012b). *Sisyrinchium laxum,* with same basic chromosome number $x = 8$ ($n = 16$; Oliver & Lewis, 1962), occurs from Brazil to Argentina, so that the range of both species overlaps in some regions (Johnston, 1938). *Sisyrinchium rosulatum* is distributed from Southeast United States of America (USA) to Northeast of Mexico and studies have reported a tetraploid number for this species ($n = 16$; Hornberger, 1991; $2n = 4x = 32$; Cholewa & Henderson, 2002). Despite the morphological similarity among the three species, all of them have been accepted according to Barker (2011).

Among cytogenetic studies, estimation of DNA amount has been used: (I) to clarify taxonomic issues by assessing genome size differences between closely related species, helping to differentiate them, e.g. *Elytrigia repens* Desv. ex Nevski (Poaceae), *E. intermedia* (Host) Nevski and their hybrids (Mahelka *et al*., 2005); (II) to delimitate species as in the case of *Dryopteris carthusiana* complex (Dryopteridaceae; Ekrt *et al*., 2010); (III) also, seems to offer an alternative for delineating closely related taxa as in the case of *Hieracium* L. sub-genus *Pilosella* Hill (Asteraceae; Suda *et al*., 2007); (IV) to depict the complexity of some intraspecific variation (Leong-Škorničková *et al*., 2007; Slovák *et al*., 2009); and (V) may be an alternative and reliable method to predict ploidy level as for roses (Roberts, Gladis & Brumme, 2009) or for *Ramonda* species (Siljak-Yakovlev *et al*., 2008).

Following this trend, molecular cytogenetic methods are successfully applied for plant biosystematic studies, for karyotype characterization (Siljak-Yakovlev *et al*., 2002), and investigation of genome organization (Frello & Heslop-Harrison, 2000). It is also being an efficient tool to address interspecific relationships (Muratović *et al*., 2005) and intraspecific diversification (Bogunić *et al*., 2011; Chalup *et al*., 2012).

Regarding that the amount of DNA, or holoploid genome size irrespective of ploidy level (also referred to 1C-value; Greilhuber *et al*., 2005), Soltis, Soltis & Tate (2003) reported that Iridaceae contains C-values ranging from very small to large. This designation was based on the classification of Leitch, Chase & Bennett (1998), in which it was assigned species with respectively 1C-values of ≤ 1.4 pg, ≤ 3.5 pg, ≥ 3.5 pg, ≥ 14.0 pg, and ≥ 35.0 pg, as possessing very small, small, intermediate, large and very large genomes. One-hundred thirteen Iridaceae species have the C-value already estimated. Among these species, one measurement was done (1C = 1.45 pg) for *S. micranthum* hexaploid

specimens ($2n = 6x = 48$) from Colombia, but any for *S. laxum* and *S. rosulatum* (data from http://www.rbgkew.org.uk/cval/homepage.html; Bennett & Leitch, 2010).

Despite the great number of species investigated by means of DNA content assessment, Iridaceae species investigated by molecular cytogenetics belong mostly to *Crocus* L. (Ørgaard, Jacobsen & Heslop-Harrison, 1995; Frello & Heslop-Harrison, 2000; Frello *et al*., 2004), and *Iris* L. (Martínez *et al*., 2010) genera, with no investigation for *Sisyrinchium* genus. The goals of this study were (I) to investigate the variation of DNA content among three species (*S. micranthum*, *S. laxum* and *S. rosulatum*), and within *S. micranthum* complex (II) to evaluate the occurrence of genome downsizing from diploids to polyploids; and (III) to determine the number and location of rRNA genes loci among species and different ploidy levels.

MATERIAL AND METHODS

PLANT MATERIAL

A total of 22 accessions of the three closely related taxa were collected between years 2006 and 2008. As every sampling site may present different morphological categories of *Sisyrinchium micranthum*, every group of individuals from the same geographical location with similar morphological characteristics which possibly constitute a population will be named as accession. For other two species analyzed, accession means plants from the same geographical location. Most samples were collected at field and after cultivated in botanical gardens or green houses. Material from Brazil was collected in the states of Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) and Paraná (PR). The provenance and morphological classification of the studied material is shown in Table 1. Voucher specimens are deposited in the following herbaria: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN), Université Paris-Sud (UPS).

NUCLEAR DNA CONTENT ASSESSMENT

About 1 cm^2 of leaves of one sample and an internal standard were co-chopped using a razor blade in a Petri dish containing 600 µl of cold Galbraith buffer (Galbraith *et al*., 1983) supplemented with 1% polyvinylpyrrolidone 10 000 and 50 µg/ml RNAse A (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA). The internal standard was *Petunia hybrida* (Hook) Vilm. cv. PxPC6 (2C = 2.85 pg) or *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Roma (2C = 1.99 pg; Marie & Brown, 1993) depending on the investigated ploidy level. The nuclei suspension was filtered through nylon mesh (pore size 48 µm) to remove the tissue debris and stained with 50 µg/ml propidium iodide (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA). A total of 184 samples were analysed on a flow cytometer (CyFlow SL3, Partec, Munster, Germany), and 5 000 to 10 000 nuclei were analysed for each sample. Accessions with at least 5 individuals analyzed (two replicates each) were used to obtain the mean DNA content. The 2C DNA value was calculated using the linear relationship between the fluorescent signals from stained nuclei of the unknown specimen and the known internal standard.

CHROMOSOME PREPARATION

The root tips meristems were obtained by seed germination on moist filter paper in Petri dishes or from plants in pots. For some populations the roots were obtained by in vitro culture (Racquin, unplubl. data). The meristems were pre-treated with 8-hydroxyquinoline solution for 3 h at 16°C and subsequently fixed in fresh ethanol:acetic acid (3:1). For determination of chromosome number, the classical squash technique was applied. For fluorochrome banding and FISH experiments the air-drying technique of Geber & Schweizer (1987), with slight modifications, was used. After 24h-48h of fixation, root tips were washed in 0.01 M citrate buffer pH 4.6 for 10 min and then incubated in an enzyme mixture: 4% R10 cellulase (Yakult Honsha Co. Tokyo, Japan), 1% pectolyase Y23

(Seishin Co., Tokyo, Japan), 4% hemicellulase (Sigma Aldrich Co., Steinheim, Germany) for about 10 min at 37°C, depending on the root size. The obtained protoplast suspension was washed twice with the same buffer, centrifuged (12 000 rpm for 3 min) and finally re-fixed in ethanol:acetic acid (3:1). The final pellet was resuspended in 30 µl of fixative solution. Protoplasts were dropped on a clean slide and kept at room temperature.

CHROMOMYCIN AND FISH EXPERIMENTS

Fluorochrome banding with chromomycin A_3 (CMA_3; Sigma Aldrich Co., Steinheim, Germany), which stain GC-rich heterochromatin was performed following Schweizer (1976) with minor modifications as described by Siljak-Yakovlev *et al*. (2002). After incubation in McIlvain buffer pH 7 (with 5 mM $MgSO_4$,) during 15 min and staining with CMA_3 (0.2 mg/ml in same buffer) for 60 min in dark, the slides were rinsed in the same buffer and counterstained with methyl green (0.5 % in McIlvain buffer pH 5.5) for 7 min and finally were rinsed in McIlvaine buffer pH 5.5. The slides were mounted in the Citifluor, AF1 anti-fade agent (Agar Scientific, Stansted Essex, UK).

The double FISH experiment was carried out with two different specific probes of ribosomal DNA (rDNA) according to the protocol of Heslop-Harrison *et al*. (1991) with minor modification as described by Siljak-Yakovlev *et al*. (2002). The 18S-26S and 5S rDNA probes were labelled with direct Cy3 (Amersham, Saclay, France) and digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics, Meylan, France), respectively. Slides were counterstained and mounted in Vectashield medium containing DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Vector laboratories, Peterborough, UK) and observed with an epifluorescence Zeiss Axiophot microscope (filter sets 01, 07, 15 and triple 25). The acquisition and treatment of images were performed using a highly sensitive CCD camera (RETIGA 2000R, Princeton Instruments, Evry, France) and an image analyzer (MetaVue, Evry, France).

STATISTICAL ANALYSES

Distinction among species was firstly evaluated in relation to DNA C-value and monoploid genome size (1Cx) considering all ploidy levels. Further, analyses were performed regarding pairs of species including only accessions of the same ploidy to verify if differences are distorted by contrasting ploidy levels. Differences in terms of genome size were also statistically tested among ploidy levels, as well as among accessions within each ploidy level.

To address differences among species, ploidy levels, and accessions within the same ploidy level in relation to DNA C-value and the monoploid genome size, statistical analyses were carried out using the program R version 2.14.1 (R Development Core Team, 2011). Before comparisons among ploidy levels, species, or accessions in relation to 1C and 1Cx values, Bartlett's test was applied with the *bartlett.test* function for each analysis to determine whether parametric tests should be used. In negative cases, data transformations were applied. When homocedasticity was not reached, the Kruskal-Wallis nonparametric test was performed with the *kruskal.test* function and multiple comparisons were computed with the *kruskalmc* function. For data with homogeneity of variances, an analysis of variance (ANOVA) was applied using the *aov* function and a Tukey Honest Significant Differences (Tukey HSD) test was subsequently performed with the *TukeyHSD* function. Most tests were computed using the *stats* package, with the exception of the Kruskal-Wallis post hoc multiple comparisons that were performed using the *pgirmess* package.

RESULTS

CHROMOSOME COUNTING

Among the analyzed accessions, three chromosome numbers (Tab. 2), corresponding to three different ploidy levels, were found for *S. micranthum* (2*n* = 16, 32, 48), one for *S. laxum* (2*n* = 16) and one for *S. rosulatum* (2*n* = 32). All species and accessions showed small chromosomes.

HETEROCHROMATIN CHARACTERIZATION AND RDNA MAPPING (CMA AND FISH)

The number of CMA positive bands ranged from 2 to 14, 18S-26S rDNA loci from 1 to 8, and 5S rDNA from 1 to 3. The variation in number of signals was observed among species and within different ploidy levels, even for *S. micranthum* (Table 2). A remarkable reduction in the number of 18S-26S rDNA loci were observed from diploid (2 loci) to tetraploid (1-4 loci) and hexaploid (5-8 loci) *S. micranthum*. In the contrary the 5S rDNA showed stability in number (1, 2 and 3 loci for 2*x*, 4*x*, and 6*x*, respectively) and interstitial position on chromosomes. Co-localization of GC-rich heterochromatin and 18S-26S rDNA sites were found for most of analyzed accessions, with the exception of ESC198, ESC221, and ESC266 (*S. micranthum*) (Figure 2). Owing to the small size and indistinct morphology of chromosomes, it was difficult to establish a karyotype for the three species, and determine the right position of fluorescent signals. However, signals for GC-rich sites and 18S-26S rDNA loci seems to be localized in the telomeric region of the shorter arms of chromosomes. The 5S rDNA signals presented intercalary position on chromosomes without CMA and 18S-26S signals.

GENOME SIZE

Analyses of DNA content of 184 plants from 22 accessions resulted in the following data: for *S. micranthum*, 1C-DNA value ranged from 0.51 (ESC261A) to 1.47 pg (ESC266), and

the monoploid genome size (1Cx) from 0.42 (ESC234) to 0.58 pg (ESC198). For the two analyzed accessions of *S. laxum*, as the species is diploid, both 1C and 1Cx values were 0.56 pg (ESC451) and 0.55 pg (ESC452). *Sisyrinchium rosulatum* (SP085) presented 1C-value of 0.98 pg, and 1Cx of 0.49 pg (Table 2).

When all accessions of each species are grouped regardless of their ploidy level, species were significantly different in relation to C-DNA value at $P = 0.001$. For the monoploid genome size, differences were significant at $P = 0.05$ when comparing *S. micranthum* and *S. laxum*, and *S. laxum* and *S. rosulatum*. However, there was no difference between mean values of tetraploid *S. micranthum* and *S. rosulatum* ($P > 0.05$) (Table 3). When comparing pairs of species taking into account only accessions with the same ploidy, there was no difference between species ($P > 0.05$), showing that the formerly mentioned differences between de C-values of the species occurred because *S. micranthum* accessions comprise three ploidy levels, while samples of *S. laxum* and *S. rosulatum* had only one ploidy level each (2*x* and 4*x*, respectively).

In comparisons among ploidy levels (Table 3), as expected, the diploids presented smaller 1C-value (0.55 pg) followed by tetraploids (0.95 pg) and hexaploids (1.45 pg; $P < 0.001$). Noticeably, DNA amount did not increase in direct proportion with ploidy (Table 3). In addition, the 1Cx-value was significantly smaller in polyploids. However, while diploids presented larger 1Cx (0.55 pg) when compared to tetra- (0.47 pg) and hexaploids (0.48 pg), there was no difference in 1Cx between tetra- and hexaploids ($P > 0.05$; Table 3). Thus, the genome downsizing was detected between diploids and polyploids, but not between tetraploids and hexaploids. Figure 1 shows the distribution of 1C (A) and 1Cx (B) values among ploidy levels.

Besides, within each ploidy level, it was verified significant differences for 1C and 1Cx values among some accessions ($P < 0.05$). Along with this, for diploids, smaller values were found for one *S. micranthum* accession (ESC261A), while all others presented similar means. For tetraploids, accessions ESC433 and ESC234 (*S. micranthum*) presented significant smaller values when compared to accessions ESC261H, ESC229A (*S. micranthum*), and SP085 (*S. rosulatum*), while accessions ESC432, ESC233, and ESC282M (*S. micranthum*) were not differentiated in relation to the smaller and higher values. The two hexaploid accessions (ESC221 and ESC266; *S. micranthum*) also presented different means at $P = 0.001$ (Table 2).

Moreover, neither morphological categories, nor geographical location of the accessions indicated correlation with genome size.

DISCUSSION

Our study represents the first characterization of three closely related species (*S. micranthum, S. laxum* and *S. rosulatum*) by means of genome size assessment and molecular cytogenetic. The ancestral base number for *Sisyrinchium* is probably $x = 9$ (Goldblatt, 1982; Goldblatt & Manning, 2008; Chauveau *et al*., 2011), but other base numbers ($x = 5, 6, 8, 17$) occurs within the genus (Goldblatt & Manning, 2008), with the most frequent $x = 8$ and $x = 9$. The results of the present study confirm previous counts for the three species and the base chromosome number of $x = 8$.

CHROMOSOME NUMBER, G-C RICH HETEROCHROMATIN AND RDNA

The chromosome numbers found for each species studied here are in agreement with those reported previously (Goldblatt, 1982; Kenton & Heywood, 1984; Goldblatt & Takei, 1997; Tacuatiá *et al*., 2012b). The polyploid complex in *Sisyrinchium micranthum* was confirmed

once again. The diploids are most common in the RS state, comprising six of the twelve accessions analyzed. On the other hand, in SC state, five of the six populations are tetraploids. The only two hexaploid samples are from RS. Despite of the great morphological resemblance between *S. micranthum*, *S. laxum* and *S. rosulatum* species, just the first one includes more than one ploidy level.

Despite the small size and similar chromosome morphology this study reported some chromosomal markers aiming to better characterization of karyotypes. The different numbers of G-C rich heterochromatin regions (CMA positive bands) and 18S-26S rDNA loci among distinct accessions and within ploidy levels (Table 2, Fig. 2) indicated interspecific and intraspecific variation possibly related to an ongoing process of genome rearrangement associated with the polyploidy phenomenon, and probably multiple origins of polyploids. As autopolyploidy is the probable mode of genome doubling for *S. micranthum* (Tacuatiá *et al*., unpubl. data), it would be expected the double and the triple number of 18S-26S rDNA loci in the tetraploids and hexaploids, respectively, in relation to the diploid ones. However, number of signals was mostly variable and drastically reduced within tetraploids and hexaploids (Table 2, Figure 2C-G). The smaller number of signals (two) was observed in one tetraploid accession (ESC282M; Figure D) that presented smaller genome size (Table 2), corroborating the idea of DNA loss after polyploidy. Although, some species have no pronounced genome polyploid restructuring, e.g. autotriploid *Arachis pintoi* Krapov. & W.C. Greg. (Lavia *et al*., 2011), DNA decrease and/or reduction of rDNA loci number have already been observed in other autopolyploid plant taxa, e.g. *Ipomoea* L. (Srisuwan, Sihachakr & Siljak-Yakovlev, 2006), *Hepatica* Mill. (Weiss-Schneeweiss *et al*., 2007), and *Bellevalia* Lapeyr. (Bareka, Siljak-Yakovlev & Kamari, 2012).

Iridaceae comprises more than 2030 species (Goldblatt *et al*., 2008), and DNA amount was already estimated for 113 species (data from http://www.rbgkew.org.uk/cval/homepage.html), which represents approximately 6% of the total Iridaceae. Within *Sisyrinchium*, a genus with about 140 species (Goldblatt *et al*., 2008), 31 species, or ~ 22% (data from http://www.rbgkew.org.uk/cval/homepage.html), have DNA amount estimations reported in a pioneer study performed by Kenton *et al*. (1986). Among these estimations, an hexaploid specimen of *S. micranthum* from Colombia was analyzed and presented the 1C value of 1.45 pg, similar to those found in the present study (1.44 and 1.47 pg). Data concerning *S. laxum* or *S. rosulatum* were not reported in such study. Thus, the present study presented the first DNA measurements for *S. laxum* and *S. rosulatum*, and also for diploid and tetraploid specimens of *S. micranthum*.

According to previously reported data for *Sisyrinchium* genus (Kenton *et al*., 1986) the DNA 1C-value varies between 0.50 and 4.20 pg. Thus, the species surveyed in the present study have genome size among the smallest ones in the genus. These data are quite different from the pattern of Asparagales (Leitch *et al*., 2010) where the mean C-value corresponds to 12.81 pg and a minimum C-value of 0.33 pg, near of that presented by our study. These authors showed that within Asparagales there is the greatest variation of C-value (0.33 to 82.15 pg) among all other Monocots. This huge variation concerning C-value is also evident by the species richness, chromosome number ($2n$ = 4–228), karyotype structure (many genera show bimodal karyotype), and modes of chromosome evolution. Phylogenetic approaches for Iridaceae (Goldblatt *et al*., 2008) show that *Sisyrinchium* is not a very recent genus (divergence time estimated as 27 mya against 14 mya of the major

radiation of Crocoideae) and the small genome size can suggest an ancestral position in the family.

Considering the different ploidy levels of the analyzed species, the estimation of the 1Cx would be more informative as it takes into account the DNA content of a non-replicated monoploid genome with chromosome number *x*, and, consequently, it would express similarities/dissimilarities in the DNA content not biased by the multiple sets of genomes. Thus, *S. micranthum* versus *S. laxum*, and *S. laxum* versus *S. rosulatum* presented significant differences when compared in relation to the 1Cx-value, but no differences were found between *S. micranthum* and *S. rosulatum* (Table 3).

Notwithstanding, the comparison of genome size per ploidy level (2*x*, 4*x*, and 6*x*) shows a reduction from diploids to polyploids, what could explain the differences found among mean C-values of species. For this reason, another evaluation of species differences was made analyzing pairs of species in relation to 1C and 1C*x* values, comparing only accessions with the same ploidy level. The results pointed that there was no difference in 1Cx values between *S. micranthum* and its allies.

GENOME DOWNSIZING IN POLYPLOIDS

Polyploidy is an important factor in the evolution of plants, with polyploid species arising since the origin of their genus in a continuing process, so that approximately 35% of neopolyploid species occurs within genera of vascular plants (Wood *et al*., 2009). It would be expected a proportional increase in C-value as ploidy level increases (Leitch & Bennett, 2004). The monoploid genome size, or 1Cx-value, which is the amount of DNA in the unreplicated monoploid chromosome set (according to Greilhuber *et al*., 2005), represents an appropriate value to evaluate the genome size of an organism, and could correspond to

an unambiguous way to compare different taxa in relation to this trait, as it should be the same at all levels of ploidy. However, it has been shown for many taxa that the mean 1C value did not increase in direct proportion with ploidy level, and a reduction in the 1Cx-value is observed from diploids to polyploids (Leitch & Bennett, 2004). For our samples, these trends were also observed: the 1C-value of tetraploids was 1.73 fold (instead of two-fold) the diploid C-DNA content, as well as, from diploids to hexaploids it was verified an increase of 2.64 fold instead of three-fold. Besides that, the DNA amount per basic genome presented a reduction of about 14% from diploids to tetraploids, and approximately 13% from diploids to hexaploids. Statistically, diploids presented greater monoploid genome size in relation to both polyploids. This is in line with the study performed by Leitch & Bennett (2004) through surveying literature, which reported a tendency of genome downsizing for many plants including genus *Sisyrinchium*. However, between tetra- and hexaploids, the same pattern was not observed, so that both presented similar mean values of 1Cx.

The reduction in DNA content per basic genome constitutes a genome restructuring frequently reported for polyploid plants in relation to the diploid progenitors. Nevertheless, depending on the species and the polyploid origin (via auto- or allopolyploidization), the genome size reduction may or may not occur, and in different proportions. Structural rearrangements have been reported as a more frequent trend in allopolyploids than in autopolyploids being a strategy to surpass genomic incompatibilities in the former (Parisod, Holderegger & Brochmann, 2010). However, a previous study on population genetics using DNA specific Simple Sequence Repeat (SSR) molecular markers has indicated an autopolyploid origin for *S. micranthum* (Tacuatiá *et al*., unpubl. data). The literature related to polyploidy have pointed out that major reductions in DNA content are

sometimes observed in autopolyploids with diploidized meiotic behavior, while some autopolyploids with multivalent pairing in meiosis present monoploid genome size similar to the diploid ones (Eilam *et al*., 2010; Parisod *et al*., 2010). Earlier cytogenetic analyses on *S. micranthum* showed high meiotic stability and pollen viability with few abnormalities observed for diploid and polyploid plants, indicating polyploids are cytogenetically diploidized (Tacuatiá *et al*., 2012b). These data suggest that the genome reduction observed for *S. micranthum* polyploids, whose origin is probably by intraspecific genome doubling, may be associated with the elimination of sequences in a manner of bearing the diploid-like meiotic behavior.

INTRASPECIFIC VARIATION IN GENOME SIZE

A small intraspecific variation was found for *S. micranthum* considering both 1C and 1C*x* values. For *S. laxum* (two sampling sites analyzed) there was no difference between means. Within ploidy levels, it was also observed variation among accessions considering holoploid and monoploid genome size. For diploids, one accession (ESC261A) showed a significant difference in genome size, but of less than 0.10 pg in relation to the other diploid accessions analyzed. Bigger differences were found for tetraploids, about 0.15 pg for 1C-value, but hexaploids had minor differences, around 0.03 pg for 1C-value, between the two accessions analyzed. Despite the fact that genomic plasticity have been debated as of doubtful occurrence (Greilhuber, 2005), sometimes remarkable differences in genome size are found within species and correlated with other traits as morphological variation, being considered as an important taxonomic character (Murray, 2005). The present study certainly includes an important part of the variability sampled within the clade (see analysis of phylogeny by Chauveau *et al*. (2011) as well as the morphological variability of *S. micranthum*. But, possibly, the total variation within some populations was not surveyed

since estimations were made mostly of plants from seeds of few parents. Previous studies on cytogenetics and population genetics of *S. micranthum* have shown the occurrence of individuals with different ploidy levels within populations (Tacuatiá *et al*., 2012b; Tacuatiá *et al*., unpubl. data). Thus, estimation of more samples of *S. laxum* and *S. rosulatum* are clearly desirable, to make correlation with morphological and ecological aspects.

CONCLUDING REMARKS

This work reports the first data on rDNA physical mapping in *Sisyrinchium* genus and reveals that 18S-26S rDNA varies in number of loci but present exclusively terminal position. A remarkable reduction in the number of 18S-26S rDNA loci were observed in *S. micranthum* from diploids (2 loci) to tetraploids (1-4 loci) and hexaploids (5-8 loci). In the contrary the 5S rDNA showed stability in number (1, 2 and 3 loci for 2*x*, 4*x*, and 6*x*, respectively) and interstitial position on chromosomes. DNA amount varied both at inter and intraspecific levels and mostly in *S. micranthum* which presents three ploidy levels (2*x*, 4*x*, and 6*x*). This study constitutes the first step to a better understanding of genome evolution of three *Sisyrinchium* species from the perspective of molecular cytogenetics and genome size assessment. However, more research is required in this field to infer possible evolutionary patterns of the entire genus.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Comité Français d'Evaluation de La Cooperation Universitaire avec le Brésil (CAPES-COFECUB).

REFERENCES

Bareka P, Siljak-Yakovlev S, Kamari G. 2012. Molecular cytogenetics of *Bellevalia* (Hyacinthaceae) species occurring in Greece. *Plant Systematics and Evolution* **298:** 421–430.

Barker C. 2011. World Checklist of Iridaceae. *The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens*, Kew. Published on the Internet; http://www.kew.org/wcsp/

Bennett MD, Leitch IJ. 2010. Plant DNA C-values database (Release 5.0, Dec. 2010). Published on the internet, http://www.rbgkew.org.uk/cval/database1.html

Bogunić F, Siljak-Yakovlev S, Muratović E, Pustahija F, Medjedović S. 2011. Molecular cytogenetics and flow cytometry reveal conserved genome organization in *Pinus mugo* and *P. uncinata*. *Annals of Forest Science* **68:** 179–187.

Botta S, Brandham PE. 1993. The taxonomic significance of chromosome number in *Junellia* (Verbenaceae). *Kew Bulletin* **48:** 143–150.

Chalup L, Grabiele M, Neffa VS, Seijo G. 2012. Structural karyotypic variability and polyploidy in natural populations of the South American *Lathyrus nervosus* Lam. (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution* **298:** 761–773.

Chauveau O, Eggers L, Raquin C, Silvério A, Brown S, Couloux A, Cruaud C, Kaltchuk-Santos E, Yockteng R, Souza-Chies TT, Nadot S. 2011. Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Annals of Botany* **107:** 1287–1312.

Cholewa AF, Henderson DM. 2002. *Sisyrinchium* Linnaeus. In*: Flora of North America.* Editorial Committee, eds. Flora of North America North of Mexico. Oxford University Press, New York, NY, 26: 351–371.

Chukr NS, Capellari L Jr. 2003. Iridaceae. In: Wanderley MGL, Sheperd GJ, Giulietti AM, Melhem TS, coords. *Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo*. São Paulo: FAPESP, Rima, 127–147.

Doležel J, Bartoš J, Voglmayr H, Greilhuber J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. Cytometry **51:** 127–128.

Eilam E, Anikster Y, Millet E, Manisterski J, Feldman M. 2010. Genome size in diploids, allopolyploids, and autopolyploids of Mediterranean Triticeae. *Journal of Botany* **2010:** 12 pp.

Ekrt L, Holubová R, Trávníček P, Suda J. 2010. Species boundaries and frequency of hybridization in the *Dryopteris carthusiana* (Dryopteridaceae) complex: a taxonomic puzzle resolved using genome size data. *American Journal of Botany* **97:** 1208–1219.

Frello S, Heslop-Harrison JS. 2000. Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill (Iridaceae) investigated by *in situ* hybridization of rDNA and a tandemly repeated sequence. *Annals of Botany* **86:** 317–322.

Frello S, Ørgaard M, Jacobsen N, Heslop-Harrison JS. 2004. The genomic organization and evolutionary distribution of a tandemly repeated DNA sequence family in the genus Crocus (Iridaceae). *Hereditas* **141:** 81–88.

Galbraith D, Harkins K, Maddox J, Ayres N, Sharma D, Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* **220:** 1049–1051.

Geber G, Schweizer D. 1987. Cytochemical hetero-1 chromatin differentiation in *Sinapis alba* (Cruciferae) using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. *Plant Systematics and Evolution* **158:** 97–106.

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

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

Goldblatt P, Manning JC. 2008. *The Iris Family: Natural History and Evolution.* Portland, Oregon: Timber Press.

Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, Jonathan DT, Manning JC, Van der Bank M, Savolainen V. 2008. Iridaceae 'Out of Australasia'? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. *Systematic Botany* **33:** 495–508.

Greilhuber J. 2005. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: Identifying its existence. *Annals of Botany* **95:** 91–98.

Heslop-Harrison JS, Schwarzacher T, Anamthawat-Jonsson K, Leitch AR, Shi M, Leitch J. 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique: A journal of methods in cell and molecular biology* **3:** 109–116.

Hornberger KL. 1991. The blue-eyed-grasses (*Sisyrinchium*: Iridaceae) of Arkansas. *Sida* **14:** 597–60.

Johnston IM. 1938. The species of *Sisyrinchium* in Uruguay, Paraguay and Brazil. *Journal of the Arnold Arboretum* **19:** 376–401.

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

Kenton AY, Rudall PJ, Johnson AR. 1986. Genome size variation in *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) and its relationship to phenotype and habitat. *Botanical Gazette* **147:** 342-345.

Lavia GI, Ortiz AM, Robledo G, Fernández A, Seijo G. 2011. Origin of triploid *Arachis pintoi* (Leguminosae) by autopolyploidy evidenced by FISH and meiotic behaviour. *Annals of Botany* **108:** 103–111.

Leitch IJ, Bennett MD. 2004. Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society* **82:** 651–663.

Leitch IJ, Chase MW, Bennett MD. 1998. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany* **82:** 85–94.

Leitch IJ, Beaulieu JM, Chase MW, Leitch AR, Fay MF. 2010. Genome size dynamics and evolution in Monocots. *Journal of Botany* **2010:** 18 pp.

Leong-Škorničová J, Šída O, Jarolímová V, Sabu M, Fér T, Trávníček P, Suda J. 2007. Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae). *Annals of Botany* **100:** 505–526.

Mahelka V, Suda J, Jarolímová J, Trávníček P, Krahulec F. 2005. Genome size discriminates between closely related taxa *Elytrigia repens* and *E. intermedia* (Poaceae: Triticeae) and their hybrid. *Folia Geobotanica* **40:** 367–384.

Marie D, Brown SC. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell* **78:** 41–51.

Martínez J, Vargas P, Luceño M, Cuadrado A. 2010. Evolution of *Iris* subgenus *Xiphium* based on chromosome numbers, FISH of nrDNA (5S, 45S) and *trn*L–*trn*F sequence analysis. *Plant Systematics and Evolution* **289:** 223–235.

Muratović E, Bogunić F, Šoljan D, Siljak-Yakovlev S. 2005. Does *Lilium bosniacum* merit species rank? A classical and molecular-cytogenetic analysis. *Plant Systematics and Evolution* **252:** 97–109.

Murray BG. 2005. When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? *Annals of Botany* **95:** 119–125.

Oliver RL, Lewis WH. 1962. Chromosome numbers of *Sisyrinchium* (Iridaceae) in eastern North America. *Sida* **1:** 43–48.

Ørgaard M, Jacobsen N, Heslop-Harrison JS. 1995. The hybrid origin of two cultivars of *Crocus* (Iridaceae) analysed by molecular cytogenetics including genomic southern and *in situ* hybridization. *Annals of Botany* **76:** 253–262.

Parisod C, Holderegger R, Brochmann C. 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist* **186:** 5–17.

Roberts AV, Gladis T, Brumme H. 2009. DNA amounts of roses (*Rosa* L.) and their use in attributing ploidy levels. *Plant Cell Reports* **28:** 61–71.

Rudall P, Kenton AY, Lawrence TJ. 1986. An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied genera. *Botanical Gazette* **147:** 466–477.

Schweizer D. 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* **58:** 307–324.

Siljak-Yakovlev S, Cerbah M, Coulaud J, Stoian V, Brown SC, Jelenic S, Papes D. 2002. Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. *Theoretical and Applied Genetics* **104:** 505–512.

Siljak-Yakovlev S, Stevanovic V, Tomasevic M, Brown S, Stevanovic B. 2008. Genome size variation and polyploidy in the resurrection plant genus *Ramonda*: cytogeography of living fossils. *Environmental and Experimental Botany* **62:** 101–112.

Slovák M, Vít P, Urfus T, Suda J. 2009. Complex pattern of genome size variation in a polymorphic member of the Asteraceae. *Journal of Biogeography* **36:** 372–384.

Soltis DE, Soltis PS, Tate JA. 2003. Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist* **161:** 173–191.

Srisuwan S, Sihachakr D, Siljak-Yakovlev S. 2006. Origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. *Plant Science* **171:** 424–433.

Stace CA. 2000. Cytology and cytogenetics as a fundamental taxonomic resource for the 20th and 21st centuries. *Taxon* **49:** 451–477.

Suda J, Krahulcová A, Trávníček P, Rosenbaumová R, Peckert T, Krahulec F. 2007. Genome size variation and species relationships in *Hieracium* sub-genus *Pilosella* (Asteraceae) as inferred by flow cytometry. *Annals of Botany* **100:** 1323–1335.

Tacuatiá LO, Eggers L, Kaltchuk-Santos E, Souza-Chies TT. 2012a. Population genetic structure of *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae) in Itapuã State Park, Southern Brazil. *Genetic and Molecular Biology* **35:** 99–105.

Tacuatiá LO, Souza-Chies TT, Flores AM, Eggers L, Siljak-Yakovlev S, Kaltchuk-Santos E. 2012b. Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* **169:** 350–364.

Weiss-Schneeweiss H, Schneeweiss GM, Stuessy TF, Mabuchi T, Park JM, Jang C-G, Sun BY. 2007. Chromosomal stasis in diploids contrasts with genome restructuring in auto- and allopolyploid taxa of *Hepatica* (Ranunculaceae)**.** *New Phytologist* **174:** 669–682.

Wood TE, Takebayashic N, Barker MS, Mayrosee I, Greenspoond PB, Rieseberg LH. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106:** 13875–13879.

Tables

Table 1. Localities of the accessions sampled for *Sisyrinchium micranthum*, *S. laxum* and *S. rosulatum*, and morphological characterization for *S. micranthum* accessions

Species	Accessions[1]	Location[2]		Latitude S	Longitude W	Morphological description[3]	
		State	Municipality			Category	Flower color
Sisyrinchium micranthum	ESC198	RS	São Francisco de Paula	29° 27’ 00.5”	50° 36’ 14.1”	CII	violet
S. micranthum	ESC221	RS	São José dos Ausentes	28° 48’ 06.0”	50° 57’ 10.0”	CIII	violet
S. micranthum	ESC261A	RS	Capivari do Sul	30° 11’ 06.2”	50° 30’ 17.1”	CII	violet
S. micranthum	ESC261H	RS	Capivari do Sul	30° 11’ 06.2”	50° 30’ 17.1”	CI	yellow
S. micranthum	ESC266	RS	Tavares	31° 23’ 58.3”	51° 09’ 47.7”	CIII	yellow
S. micranthum	ESC282M	RS	São Lourenço do Sul	31° 22’ 22.2”	52° 05’ 56.1”	CIII	pink
S. micranthum	ESC296	RS	Viamão	30° 21’ 46.9”	51° 01’ 16.6”	CII	violet
S. micranthum	ESC431	RS	Caçapava do Sul	30° 41’ 37.3”	53° 23’ 35.9”	CIII	white
S. micranthum	ESC432	RS	Caçapava do Sul	30° 41’ 37.3”	53° 23’ 35.9”	CI	violet
S. micranthum	ESC433	RS	Caçapava do Sul	30° 41’ 37.3”	53° 23’ 35.9”	CI	white
S. micranthum	ESC450	RS	São Francisco de Paula	29° 26’ 16.2”	50° 35’ 55.6”	CII	violet
S. micranthum	MP	RS	Porto Alegre	30° 04’ 13.7”	51° 07’ 07.8”	CII	violet
S. micranthum	ESC229A	SC	Lages	27° 43’ 35.2”	50° 20’ 07.6”	CI	violet
S. micranthum	ESC233	SC	Ipumirim	26° 59’ 56.6”	52° 10’ 12.4”	CII	violet
S. micranthum	ESC234	SC	Ipumirim	26° 59’ 56.6”	52° 10’ 12.4”	CIII	pink
S. micranthum	ESC315	SC	São Bento do Sul	26° 22’ 32.3”	49° 19’ 30.0”	CIII	violet
S. micranthum	ESC401	SC	Itaiópolis	26° 20’ 16.1”	50° 04’ 21.9”	CIII	pink
S. micranthum	ESC389	PR	Palmas	26° 31’ 55.2”	51° 58’ 20.6”	CII	violet
S. micranthum	ESC394	PR	União da Vitória	26° 16’ 22.2”	51° 10’ 41.1”	CII	violet
S. laxum	ESC451	RS	São Francisco de Paula	29° 26’ 16.2”	50° 35’ 55.6”	--	--
S. laxum	ESC452	RS	São Francisco de Paula	29° 26’ 49.8”	50° 36’ 19.0”	--	--
S. rosulatum	SP085		USA, Georgia			--	--

[1] All accessions are from Brazil, but SP085 (*S. rosulatum*).

[2] ESC indicates collectors Eggers and Souza-Chies and is followed by the number of the collection. States from Brazil: RS – Rio Grande do Sul, SC – Santa Catarina, PR – Paraná.

[3] Morphological characterization according to Tacuatiá *et al*. (2012b).

Table 2. Cytogenetic analyses for *Sisyrinchium micranthum*, *S. laxum* and *S. rosulatum*, concerning somatic chromosome number (2*n*), ploidy level (*x*), nuclear DNA content, 2C and 1C values, monoploid genome size (1Cx), number of pairs of chromomycin (CMA_3)-positive bands, and number of 18S-26S and 5S rDNA loci

Species	Accessions	Morphological description*		2*n*	*x*†	2C (pg)[X]		1C (pg)[X]		1Cx (pg)[X]		1Cx (Mbp)§	CMA_3	18S-26S
		Category	Flower color			Mean	SD	Mean‡	SD	Mean‡	SD			
Diploids[1]														
Sisyrinchium micranthum	ESC296	CII	violet	--	2	1.03	--	0.52	--	0.52	--	509	--	--
S. micranthum	ESC401	CIII	pink	--	2	1.03	--	0.52	--	0.52	--	509	--	--
S. micranthum	ESC394	CII	violet	--	2	1.02	--	0.51	--	0.51	--	499	--	--
S. micranthum	ESC198	CII	violet	16	2	1.16	0.05	0.58[a]	0.03	0.58[a]	0.03	567	2	4
S. micranthum	ESC431	CIII	white	16	2	1.11	0.05	0.56[a]	0.02	0.56[a]	0.02	567	--	--
S. micranthum	ESC450	CII	violet	16	2	1.10	0.06	0.55[a]	0.03	0.55[a]	0.03	538	--	--
S. micranthum	MP	CII	violet	16	2	1.09	0.05	0.55[a]	0.03	0.55[a]	0.03	538	--	--
S. micranthum	ESC261A	CII	violet	16	2	1.02	0.06	0.51[b]	0.03	0.51[b]	0.03	499	3-4	4
S. laxum	ESC451	--	--	16	2	1.12	0.03	0.56[a]	0.01	0.56[a]	0.01	548	--	--
S. laxum	ESC452	--	--	16	2	1.10	0.04	0.55[a]	0.02	0.55[a]	0.02	538	--	--
Tetraploids[2]														
S. micranthum	ESC389	CII	violet	--	4	2.13	--	1.07	--	0.53	--	518	--	----
S. micranthum	ESC315	CIII	violet	32	4	1.85	--	0.93	--	0.46	--	450	--	--
S. micranthum	ESC261H	CI	yellow	32	4	1.96	0.04	0.98[a]	0.02	0.49[a]	0.01	479	2	2
S. micranthum	ESC229A	CI	violet	32	4	1.93	0.05	0.97[a]	0.02	0.48[a]	0.01	469	2-4	2-4
S. micranthum	ESC432	CI	violet	32	4	1.89	0.03	0.95[ab]	0.02	0.47[ab]	0.01	460	--	--
S. micranthum	ESC233	CII	violet	32	4	1.88	0.02	0.94[ab]	0.01	0.47[ab]	< 0.01	460	--	--
S. micranthum	ESC282M	CIII	pink	32	4	1.83	0.03	0.92[ab]	0.01	0.46[ab]	0.01	450	1	1
S. micranthum	ESC433	CI	white	32	4	1.73	0.04	0.86[b]	0.02	0.43[b]	0.01	421	--	--
S. micranthum	ESC234	CIII	pink	32	4	1.66	0.07	0.83[b]	0.03	0.42[b]	0.02	411	--	--
S. rosulatum	SP085	--	violet	32	4	1.95	0.04	0.98[a]	0.02	0.49[a]	0.01	479	2-5	2-5
Hexaploids[3]														
S. micranthum	ESC221	CIII	violet	48	6	2.87	0.11	1.44[a]	0.06	0.48[a]	0.02	469	1-2	5
S. micranthum	ESC266	CIII	yellow	48	6	2.94	0.05	1.47[b]	0.02	0.49[b]	0.01	479	5-7	5-8

* Morphological characterization according to Tacuatiá *et al.* (2012b).

† For accessions with no chromosome counting, ploidy level was inferred based on the 2C value.

x Accessions whose DNA content and genome size estimation was based on one individual have no standard deviation (SD), and were not included in the statistical analyses regarding ploidy level.

‡ Means with different letters are different at $P = 0.05$.

§1 pg = 978 Mbp according to Doležel *et al*. (2003)

[1]Statistical analyses performed through analysis of variance (ANOVA) and Tukey Honest Significant Differences (Tukey HSD) among accessions.

[2] Statistical analyses performed through Kruskal-Wallis nonparametric test and ad hoc multiple comparisons among accessions.

[3] For 1C DNA content, values were firstly transformed to sin(1C); after, statistical analyses were performed through analysis of variance (ANOVA) and Tukey Honest Significant Differences (Tukey HSD) of sin (1C) among accessions. For the monoploid genome size, statistical analyses were performed through Kruskal-Wallis nonparametric test and ad hoc multiple comparisons among accessions.

Table 3. Means of DNA content of the unreplicated reduced chromosome complement (1C-value) and monoploid genome size (1Cx) for the species and the ploidy levels analyzed

Species[1]	1C (pg)		1Cx (pg)	
	Mean*	SD	Mean‡	SD
Sisyrinchium micranthum	0.88[a]	0.31	0.50[a]	0.05
S. laxum	0.55[b]	0.02	0.55[b]	0.02
S. rosulatum	0.98[c]	0.02	0.49[a]	0.01
Ploidy level[2]				
Diploid	0.55[a]	0.03	0.55[a]	0.03
Tetraploid	0.95[b]	0.05	0.47[b]	0.02
Hexaploid	1.45[c]	0.05	0.48[b]	0.01

[1]Statistical comparisons among species were performed through Kruskal-Wallis nonparametric test and ad hoc multiple comparisons.

[2] Comparison of ploidy level with all species included. For 1C-value, 1C-values were firstly transformed to sin(√1C); after, statistical comparisons among ploidy levels were performed through analysis of variance (ANOVA) and Tukey Honest Significant Differences (Tukey HSD). For 1C*x*-value, statistical comparisons among ploidy levels were performed through Kruskal-Wallis nonparametric test and ad hoc multiple comparisons.

* Means with different letters are different at $P = 0.001$.

‡ Means with different letters are different at $P = 0.05$.

Figures

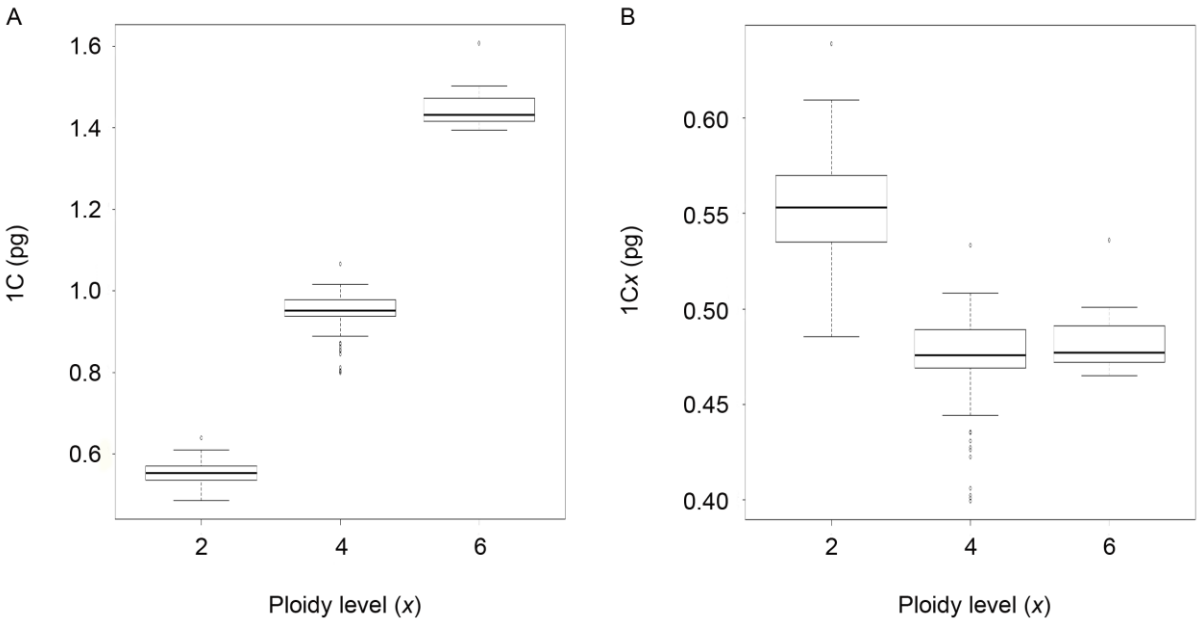


Figure 1. Distribution of DNA content of the unreplicated reduced chromosome complement (1C-value) (A), and the monoploid genome size (1Cx) (B) among ploidy levels (2*x*, 4*x*, 6*x*).

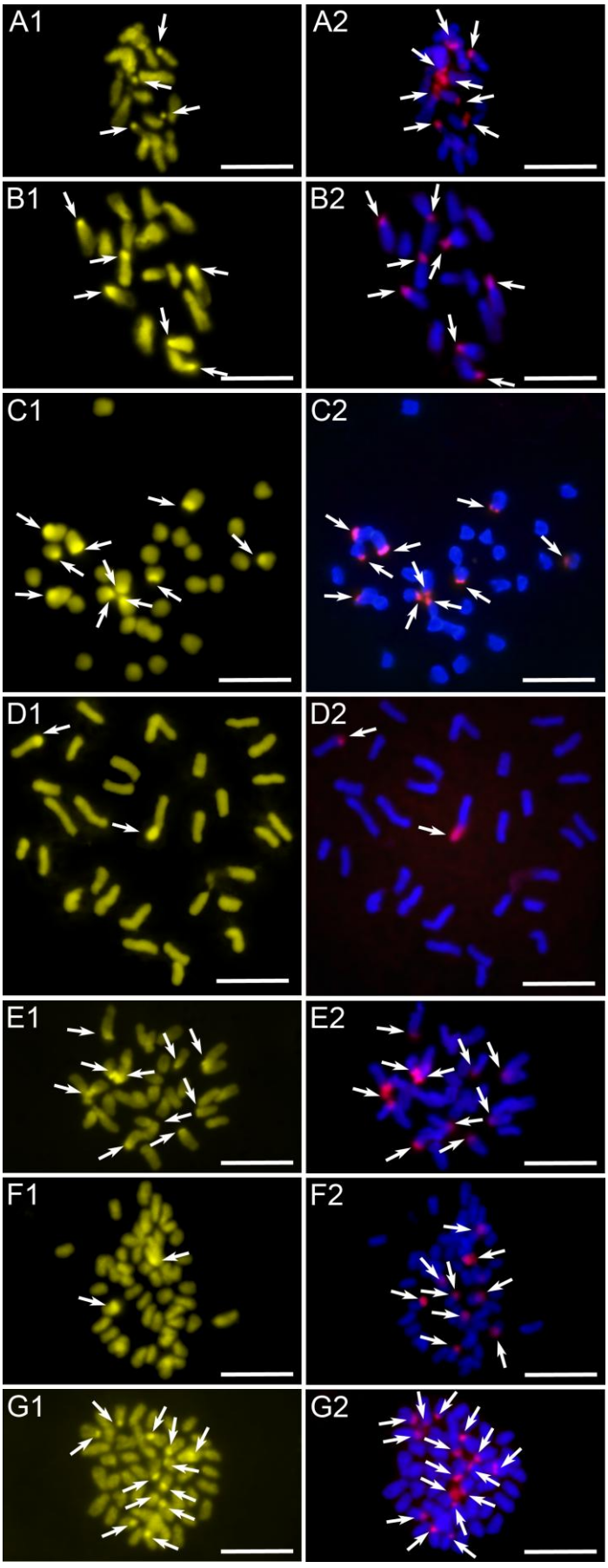


Figure 2. Metaphase chromosome plates of *Sisyrinchium micranthum* and *S. rosulatum* after CMA staining and in situ hybridization with 18S-26S rDNA probe. CMA/FISH: diploids, A – ESC198, B – ESC261A (both *S. micranthum*); tetraploids, C – ESC229A, D – ESC282M (both *S. micranthum*), E – SP085 (*S. rosulatum*); hexaploids, F – ESC221, G – ESC266 (both *S. micranthum*). Scale bar = 10 µm. Arrows indicate the position of CMA-positive marks, and 18S-26S rDNA signals.



Aspectos reprodutivos de *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae)

Artigo em fase de preparação/Cet article est en préparation

ASPECTOS REPRODUTIVOS DE *SISYRINCHIUM MICRANTHUM* (IRIDACEAE)

INTRODUÇÃO

O sistema de cruzamento no gênero *Sisyrinchium* L. pode incluir tanto a ocorrência de fecundação cruzada quanto de autofecundação. As espéscies do Hemisfério Norte são as mais estudadas quanto aos aspectos reprodutivos, sendo descrita uma frequência de autofecundação maior nas espécies com altos níveis de ploidia (superior à 4*x*) (Henderson, 1976; Cholewa & Henderson, 1984). A maior parte destes trabalhos faz uso de análises da biologia reprodutiva e de experimentos de cruzamentos intra e interespecíficos com fins de delimitação taxonômica (Ingram, 1968; Henderson, 1976; Cholewa & Henderson, 1984).

Para *Sisyrinchium micranthum*, cujas flores são perfeitas, alguns aspectos tais como protoginia e autoincompatibilidade já foram descritos (Truylio *et al*., 2002). Com relação à biologia da polinização, o estudo realizado por Truylio *et al*. (2002) registrou a ocorrência de visitantes florais como moscas da família Syrphidae e abelhas das famílias Apidae, Adrenidae e Halictidae. As fêmeas de abelhas *Lanthomelissa betinae* Urban, 1995 e operárias de *Plebeia emerina* Friese, 1900 são consideradas os polinizadores efetivos para a espécie.

Este trabalho teve por objetivo observar aspectos da biologia reprodutiva e da polinização de *S. micranthum* frente à ampla variabilidade morfológica e a ocorrência de poliploidia na espécie. Tendo em vista a sua relação próxima com outra espécie do gênero, *Sisyrinchium laxum* Otto ex Sims, cuja ocorrência natural se soprepõe em algumas regiões à de *S. micranthum*, buscou-se também realizar cruzamentos entre as duas espécies a fim de avaliar a possibilidade de isolamento reprodutivo entre as mesmas.

MATERIAL E MÉTODOS

A biologia floral e da polinização foi estudada em populações naturais ocorrentes em áreas campestres localizadas nos municípios de Caçapava do Sul, região da Serra do Sudeste, e de Cambará do Sul, região da Serra Geral, no estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil.

Os testes da biologia reprodutiva foram realizados em indivíduos pertencentes a populações naturais e transportados para a casa de vegetação do Departamento de Genética

da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. Para seleção dos indivíduos, utilizou-se os seguintes critérios: plantas saudáveis e plantas no início da emissão de inflorescências. A classificação das plantas foi feita de acordo com Tacuatiá *et al*. (2012), como consta descrita na **INTRODUÇÃO GERAL** dessa tese. Para as cores das flores foram adotados os seguintes símbolos: branco – W e violeta – V. Dessa forma, segue a seguinte classificação, plantas CI-V – categoria CI e flores de coloração violácea; CI-W – categoria CI com flores brancas; e, CIII-W – categoria CIII e flores brancas.

Para os experimentos de biologia reprodutiva das diferentes categorias morfológicas de *S. micranthum* e de *S. laxum*; e, de cruzamentos entre as categorias morfológicas de *S. micranthum*, assim como entre as duas espécies em estudo, espécimes de *S. micranthum* coletadas em Caçapava do Sul e em Porto Alegre, e espécimes de duas populações de *S. laxum* coletadas em São Francisco de Paula, foram utilizadas. A identificação das espécies e das categorias morfológicas analisadas, e das localidades para cada aspecto da biologia reprodutiva, da polinização e de cruzamentos, assim como análises citogenéticas realizadas, constam na **Tabela 1**.

Tabela 1. Espécies estudadas, categorias morfológicas segundo Tacuatiá *et al*. (2012), acessos (voucher), origem das plantas e aspectos avaliados para as mesmas.

Acesso (voucher)	Município	Categoria morfológica	Biologia floral	Biologia da polinização	Cruzamentos intraespecíficos	Cruzamentos interespecificos	Citogenética
Sisyrinchium micranthum							
ESC431	Caçapava do Sul	CIII-W	X	X	X	X	X
ESC432	Caçapava do Sul	CI-V			X	X	X
ESC433	Caçapava do Sul	CI-W			X	X	X
MP	Porto Alegre	CII-V			X	X	X
ESC450	São Franciso de Paula	CII-V			X	X	X
SM-M1	Cambará do Sul	CI-V		X			
SM-M2	Cambará do Sul	CII-V		X			
SM-M3	Cambará do Sul	CIII-V	X	X			
S. laxum							
ESC451	São Francisco de Paula				X	X	X
ESC452	São Francisco de Paula				X	X	X

Biologia floral

O padrão diário de abertura e fechamento das flores foi observado para duas populações de *S. micranthum* de tipo morfológico CIII. Para tal, foram selecionados aleatoriamente 20 indivíduos de cada população e o número de flores abertas/fechadas foi registrado em intervalos de uma hora, durante o período de abertura até o fechamento de todas as flores.

Biologia da polinização

O comportamento dos visitantes nas flores foi registrado, diretamente em campo, através de observações focais realizadas em dias não consecutivos durante o período de antese de cada população analisada, sendo realizadas de 6 a 20 horas de observações. Os visitantes florais que durante as visitas às flores entraram em contato com o estigma e as anteras foram considerados polinizadores. Além disso, foram feitas análises através de registros fotográficos dos visitantes durante as visitas. Visitantes florais também foram capturados com rede entomológica e armazenados em frascos mortíferos, etiquetados e identificados através de chaves de identificação e comparação com material depositado na coleção de abelhas do Museu de Ciência e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil (MCT-PUCRS). A análise polínica foi realizada segundo Radford *et al*. (1974). Para tal, grãos de pólen localizados nas escopas das abelhas, foram utilizados para a confecção das lâminas. Os tipos de grãos de pólen presentes nas escopas foram contados e comparados com os grãos de pólen do gênero *Sisyrinchium*.

Biologia da reprodução

A biologia reprodutiva foi estudada através de testes de autopolinização espontânea (marcando-se flores antes da antese), autopolinização manual (colocando o pólen da própria flor em seu estigma) e polinização manual cruzada (colocando pólen oriundo de outra planta em seu estigma). Em todos os tratamentos, os botões florais não foram previamente emasculados, devido ao fato das flores de *S. micranthum* e de *S. laxum* serem extremamente frágeis. Pela mesma razão, a ocorrência de apomixia não pode ser testada no estudo em questão. As flores utilizadas em cada tratamento foram previamente ensacadas em botão e reensacadas após os tratamentos.

Compatibilidade entre as categorias de *S. micranthum* e interespecífica

Para os testes de cruzamentos entre as categorias morfológicas de *S. micranthum*, bem como entre *S. micranthum* e *S. laxum*, foram feitos os tratamentos semelhantes àqueles empregados nos testes de fecundação cruzada, colocando-se pólen da planta doadora no estigma da planta receptora. Sempre que possível, procurou-se testar a formação de frutos utilizando-se dentro do mesmo tratamento os diferentes acessos de plantas como doadores de pólen e como receptores de pólen.

Determinação do número cromossômico e estimativa do nível de ploidia

Para os acessos utilizados nos experimentos de biologia reprodutiva e de cruzamentos entre as diferentes categorias morfológicas de *S. micranthum*, e, entre *S. micranthum* e *S. laxum*, procurou-se determinar o número cromossômico somático ou estimar o nível de ploidia através de citometria de fluxo, conforme descrito no **CAPÍTULO III**. As plantas analisadas quanto ao número cromossômico e/ou nível de ploidia serão discutidas neste capítulo com relação à categoria morfológica a qual pertencem.

Formação de frutos e germinação de sementes

Tanto para as análises de biologia da reprodução quanto de cruzamentos, o desenvolvimento dos frutos foi acompanhado até a maturidade, tendo sido coletados antes da dispersão das sementes. Além da coleta de frutos dos tratamentos especificados, também foi feita coleta de frutos dos respectivos acessos a campo, ou seja, sem tratamentos. Os frutos resultantes dos tratamentos e coletados a campo foram pesados para comparação da eficiência dos tratamentos em relação à formação natural de frutos. A viabilidade das sementes foi testada a partir da análise de germinação em meio de cultura *in vitro*. Dessa forma, para germinação das sementes, as mesmas foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 0,5%, acrescido de uma gota de Tween-80 e, posteriormente, enxaguadas quatro vezes em água estéril. A cultura foi feita em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) acrescido de vitaminas do meio B5 (Gamborg *et al*., 1968), 3% de sacarose e 0,25% de Phytagel®. As placas com as sementes em cultura foram mantidas sob temperatura de 26ºC e fotoperíodo de 16h durante 30 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biologia floral

Para a população de Caçapava do Sul, considerando o padrão total, com flores de primeiro e de segundo dia, a antese iniciou em torno das 9h, com a abertura gradativa dos botões e fechamento/senescência às 19h. Para a população de Cambará do Sul, o padrão da antese foi de 8h-16h30.

Apesar das análises de padrão de abertura e fechamento das flores terem sido avaliadas somente para duas populações de *S. micranthum* de morfotipo CIII-W, foi possível observar antese floral com duração de dois dias durante as atividades a campo e durante os experimentos de cruzamentos na casa de vegetação para os acessos de *S. micranthum*, ESC431 (CIII-W), ESC450 (CII-V), MP (CII-V), e de *S. laxum*, ESC451 e ESC452. Tais resultados são similares ao encontrado por Truylio *et al*. (2002), no qual para flores de primeiro dia, a abertura iniciou entre 9-10h e o fechamento entre 16-17h, enquanto que para flores de segundo dia, a abertura iniciou entre 7h30min-8h. Ao longo da antese, foi observado que apesar dos estiletes e estames apresentarem um comprimento semelhante, estes ficam dispostos de forma distanciada, num arranjo espacial que sugere dificultar a autofecundação. Diferentemente, para os outros acessos de *S. micranthum*, ESC432 (CI-V) e ESC433 (CI-W), foi observada antese com duração de apenas um dia. O período entre a abertura e a senescência das flores também é menor, de maneira que as flores abriam mais tarde (em torno de 10h) e senesciam mais cedo (em torno de 16h). Além disso, estiletes e estames ficam proximamente dispostos. Flores com curta longevidade são comuns em espécies que apresentam flores pequenas (Primack 1985; Stratton 1989), podendo também estar relacionadas ao fato das espécies se autopolinizarem (Primack, 1985; Sato, 2002) e/ou com a ausência de polinizadores específicos (Micheneau *et al*., 2008).

Biologia da polinização

Considerando as populações de Cambará do Sul e de Caçapava do Sul avaliadas, foram registradas oito espécies de abelhas e uma de sirfídeo visitando flores de *S. micranthum* (**Tabela 2, Figura 1**). A população de *S. micranthum* de Caçapava do Sul (plantas CIII) foi a que apresentou um maior número de visitantes florais, seguida pela população SM-M2 de Cambará do Sul (plantas CII-V) (**Tabela 2**). A população de plantas

CI-W (ESC433) não recebeu nenhuma espécie de visitante floral após seis horas de observação. Os resultados obtidos corroboram os estudos de Truylio *et al*. (2002) que descreve a ocorrência tanto de visitantes florais especialiados, em geral abelhas da família Apidae, como também por abelhas generalistas das famílias Andrenidae e Halictidae. Além disso, parece ocorrer uma preferência dos polinizadores por plantas de porte maior, o que pode estar relacionado com diferenças na quantidade e qualidade da oferta dos recursos florais como pólen e lipídeos não voláteis.

Biologia da reprodução

Os resultados referentes aos tratamentos de biologia rerprodutiva constam na **Tabela 3**. A partir dos tratamentos foi possível verificar que somente a categoria CI dos acessos estudados realiza autofecundação, pois apresentou formação espontânea de frutos. Essa cararacterística pode estar associada com o tamanho das flores e longevidade das mesmas, como citado anteriormente, pois de acordo com alguns estudos, fenologia e autocompatibilidade são aspectos correlacionados (Primack 1985; Sato, 2002). Todas as categorias de plantas de *S. micranthum* analisadas foram capazes de formar fruto a partir de autopolinização induzida, o que sugere que *S. micranthum* é autocompatível. No entanto, os percentuais de formação de frutos foram superiores à 81% para os acessos de categoria CI, enquanto que pra CII foi de 18% e para CIII foi de 28.6%. O tratamento correspondente à fecundação cruzada mostrou que todos os acessos analisados foram capazes de formar fruto a partir da indução de alogamia. Nesse tratamento, os acessos de categorias CII e CIII, apresentaram altos percentuais de formação de frutos, 65 e 94.6%, respectivamente.

A formação de frutos para os tratamentos sugere que *S. micranthum* não possui sistema de autoincompatibilidade gametofítico, nem esporofítico. No entanto, a formação de frutos não garante que as sementes dos mesmos sejam viáveis. Por essa razão, procurou-se realizar testes de germinação para as sementes formadas a partir dos tratamentos e do controle (sementes de frutos coletadas a campo).

Sisyrinchium laxum apresentou baixos percentuais de formação de frutos nos tratamentos de autopolinização (inferiores a 3%), enquanto que para fecundação cruzada 84.2 % da flores tratadas resultaram na formação de frutos. Esses resultados indicam que *S. laxum* é autoincompatível, e/ou realiza fecundação cruzada preferencialmente.

Tabela 2. Visitantes florais e polinizadores observados em populações de *Sisyrinchium micranthum* dos municípios de Caçapava do Sul e de Cambará do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.

Visitantes florais	ESC431 (CIII-W) Caçapava do Sul	SM-M3 (CIII-W) Cambará do Sul	SM-M2 (CII-V) Cambará do Sul	SM-M1 (CI-V) Cambará do Sul
Hymenoptera				
Apidae				
Lanthanomelissa betinae		X	X	
Lanthanomelissa clementis	X		X	
Lanthanomelissa discrepans	X			
Chalepogenus sp.1	X			
Chalepogenus sp.2	X			
Plebeia sp.	X			
Andrenidae				
Anthrenoides sp.			X	X
Halictidae				
Augochlora semiramis	X		X	
Diptera: Shirphidae				
Toxomerus sp.				X



Figura 1. Flores e visitantes florais de quatro morfotipos simpátricos de *Sisyrinchium micranthum* no município de Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. **A.** Planta de categoria CI-W. **B.** Flor de *S. micranthum* categoria CI-V sendo visitada por *Toxomerus* sp. **C.** Flor de *S. micrantum* categoria CII-V sendo visitada por fêmea de *Lanthanomelissa* sp. **D.** Flor de *S. micranthum* categoria CIII-W sendo visitada por fêmea de *Arhysoceble picta*.

Para a maioria dos tratamentos realizados cuja germinação de sementes foi testada, obteve-se baixos percentuais de germinação, ou mesmo nenhuma germinação, com exceção dos tratamentos realizados para categoria CIII. No entanto, as taxas de germinação foram baixas também para o controle (sementes de frutos coletados a campo), novamente com exceção da categoria CIII. Isso pode ser um indício de que o meio de cultura utilizado não é adequado para a germinação de sementes da maioria das categorias testadas, ou ainda, que há uma alta taxa de formação de sementes inviáveis na natureza.

Considerando-se o peso das sementes coletados a campo, os dados indicam que os frutos analisados de plantas CI-V e CI-Y de *S. micranthum* são semelhantes ao redor de 2-3 mg, enquanto frutos da CIII de *S. micranthum* e de *S. laxum* possuem valores próximos a 8.0 mg. Comparando-se o peso dos frutos obtidos através dos tratamentos de biologia reprodutiva com os do controle percebe-se que para plantas da categoria CIII o peso dos frutos parece diferir entre o controle e o tratamento para fecundação cruzada. Além disso, pode-se sugerir que para plantas analisadas da categoria CI-V, a ação dos polinizadores pode ser importante na formação de maior número de sementes, pois os frutos resultantes de autopolinização induzida apresentaram peso médio de 8.0 mg, equanto o peso para os frutos do controle apresentaram valor médio de 3.3 mg. O peso dos frutos para plantas de CI-Y analisadas parece não diferir entre tratamentos e em relação ao controle. Kenton *et al*. (1986) a partir da análise do peso de 26 espécies diferentes de *Sisyrinchium*, relatam que o peso varia entre 8 mg para *S. micranthum*, a 159 mg para *S. filifolium* Gaudich. O valor encontrado no presente estudo para sementes de *S. micranthum* de categoria CIII estão em acordo com os valores previamente encontrados, assim como o peso de sementes de plantas CI-V provenientes do tratamento de autopolinização induzida. No entanto, a única diferença existente é que as plantas avaliadas por Kenton *et al*. (1986) eram hexaploides, enquanto no presente estudo não foi registrado tal nível de ploidia.

Compatibilidade entre as categorias de *S. micranthum* e interespecífica

Todos os tratamentos testando a compatibilidade entre as diferentes categorias morfológicas de *S. micranthum* resultaram na formação de frutos (**Tabela 4**). Todas as categorias utilizadas nos cruzamentos foram doadoras de pólen, no entanto somente plantas das categorias CII e CIII foram receptoras de pólen. Isso se deve ao fato de que apesar do grande esforço de coleta, muitas plantas foram perdidas, pois plantas de tal categoria mostraram-se mais frágeis ao transplante para vasos e ao ataque de insetos como cochonilha, larvas de mariposas e de borboletas, assim como ao ataque de fungos. Também foi possível observar que a categoria CI produz menor número de flores em comparação as outras categorias. Outro fator relevante é que por possuírem flores com estames e estigmas muito próximos, corría-se o risco de realizar autopolinização ao invés do tratamento desejado.

Tabela 3. Tratamentos de autopolinização espontânea, autopolinização induzida e fecundação cruzada manual para categorias morfológicas de *Sisyrinchium micranthum* e para *S. laxum*; formação de frutos e percentual de germinação das sementes formados a partir dos tratamentos e coletados a campo (ambiente natural).

Autopolinização espontânea						
	Formação de frutos		Peso dos frutos		Germinação das sementes	
Espécies/categorias morfológicas	N[1]	Percentual de frutos formados	N[2]	Peso médio (mg)	N[2]	Percentual de germinação
Sisyrinchium micranthum						
CI-V	21 (33)	75,8	--	--	1 (7)	0,0
CI-Y	15 (45)	62,0	4 (74)	2,4	4 (72)	0,0
CII-V	23 (131)	0,0	--	--	--	--
CIII-B	11 (32)	0,0	--	--	--	--
S. laxum	21 (139)	0,7	--	--	--	--
Autopolinização induzida						
	Formação de frutos		Peso dos frutos		Germinação das sementes	
Espécies/categorias morfológicas	N[1]	Percentual de frutos formados	N[2]	Peso médio (mg)	N[2]	Percentual de germinação
S. micranthum						
CI-V	19 (32)	81,3	4 (103)	8,0	3 (91)	0,0
CI-Y	9 (29)	82,8	8 (95)	1,9	8 (95)	0,0
CII-V	18 (50)	18,0	--	--	--	--
CIII-W	12 (35)	28,6	8 (60)	5,4	3 (39)	97,4
S. laxum	21 (165)	2,4	--	--	3 (5)	0,0
Fecundação cruzada						
	Formação de frutos		Peso dos frutos		Germinação das sementes	
Espécies/categorias morfológicas	N[1]	Percentual de frutos formados	N[2]	Peso médio (mg)	N[2]	Percentual de germinação
S. micranthum						
CI-V	3 (6)	100,0	--	--	--	--
CI-Y	2 (2)	50,0	1 (21)	2,7	1 (21)	0,0
CII-V	11 (40)	65,0	3 (29)	2,9	4 (51)	0,0
CIII-W	10 (37)	94,6	8 (400)	21,3	12 (588)	32,0
S. laxum	18 (38)	84,2	6 (61)	5,3	10 (155)	3,2
Frutos coletados a campo						
	Peso dos frutos			Germinação dos sementes		
Espécies/categorias morfológicas	N[2]		Peso médio (mg)	N[2]		Percentual de germinação
S. micranthum						
CI-V	13 (212)		3,3	9 (168)		9,0
CI-Y	30 (466)		2,0	26 (448)		0,2
CIII-W	27 (1008)		7,9	25 (1008)		59,0
S. laxum	25 (336)		7,7	22 (335)		5,9

[1] N corresponde ao número de indivíduos e entre parênteses, o número de flores.

[2] N corresponde ao número de frutos analisados e entre parênteses, o número total de sementes.

Considerando as plantas receptoras de pólen, a categoria CII apresentou baixos percentuais quando cruzada com as categorias CI-Y (33.3%) e CIII-W (21.0%), enquanto que o cruzamento manual com a categoria CI-V resultou em 62.5%. Para a categoria CIII-W como receptora de pólen, os percentuais de frutos formados foram inferiores a 8% quando cruzadas com plantas da categoria CI, mas tendo a categoria CII como doadora de pólen, a formação de frutos foi de 75% (**Tabela 4**).

Os resultados referentes à formação de frutos e germinação de sementes indicam que entre as plantas de categorias CII e CIII de *S. micranthum* e entre as mesmas e *S. laxum* não há isolamento reprodutivo em se tratando de sistema de incompatibilidade.

Determinação do número cromossômico e estimativa do nível de ploidia

Como consta no **CAPÍTULO IV** e na **Tabela 5**, a categoria CI apresentou número cromossômico somático e nível de ploidia de $2n = 4x = 32$, enquanto as categorias CII e CIII apresentaram $2n = 2x = 16$.

Tabela 4. Cruzamentos entre as categorias de *Sisyrinchium micranthum* e interespecíficos (*S. micranthum* versus *S. laxum*); formação de frutos; e, germinação das sementes.

Compatibilidade entre categorias morfológicas de *Sisyrinchium micranthum*					
Cruzamentos		Formação de frutos		Germinação dos frutos	
Planta receptora do pólen	Planta doadora do pólen	N[1]	Percentual de frutos formados	N[2]	Percentual de germinação
S. micranthum	***S. micranthum***				
CII-V	CI-V	14 (40)	62,5	5 (90)	2,7
	CI-Y	6 (12)	33,3	1 (3)	0,0
	CIII-W	15 (37)	21,0	9 (114)	0,0
CIII-W	CI-V	5 (13)	7,7	--	--
	CI-Y	7 (16)	6,3	--	--
	CII-V	6 (16)	75,0	7 (78)	19,7
Compatibilidade interespecífica					
Cruzamentos		Formação de frutos		Germinação dos frutos	
Planta receptora do pólen	Planta doadora do pólen	N[1]	Percentual de frutos formados	N[2]	Percentual de germinação
S. laxum	***S. micranthum***				
S. laxum	CI-V	12 (32)	68,0	5 (33)	0,0
S. laxum	CI-Y	1 (4)	25,0	--	--
S. laxum	CII-V	16 (44)	62,5	4 (153)	14,7
S. laxum	CIII-W	9 (32)	50,0	7 (246)	3,6
S. micranthum	***S. laxum***				
CII-V	*S. laxum*	18 (63)	3,2	2 (4)	66,7
CIII-W	*S. laxum*	11 (31)	33,0	8 (50)	30,3

[1] N corresponde ao número de indivíduos e entre parênteses, o número de flores.

[2] N corresponde ao número de frutos analisados e entre parênteses, o número total de sementes.

Tabela 5. Análises citogenéticas de acessos de *Sisyrinchium micranthum* e *S. laxum* que foram investigados em relação aos aspectos de intra e intercruzamentos.

Espécie	Acesso	Categoria morfológica	2*n*	*x*	2C (pg)		1C (pg)		1Cx (pg)	
					Média	SD	Média	SD	Média	SD
Diploides										
Sisyrinchium micranthum	ESC431	CIII-W	16	2	1,11	0,05	0,56	0,02	0,56	0,02
S. micranthum	ESC450	CII-V	16	2	1,10	0,06	0,55	0,03	0,55	0,03
S. micranthum	MP	CII-V	16	2	1,09	0,05	0,55	0,03	0,55	0,03
S. laxum	ESC451	--	16	2	1,12	0,03	0,56	0,01	0,56	0,01
S. laxum	ESC452	--	16	2	1,10	0,04	0,55	0,02	0,55	0,02
Tetraploides										
S. micranthum	ESC432	CI-V	32	4	1,89	0,03	0,95	0,02	0,47	0,01
S. micranthum	ESC433	CI-W	32	4	1,73	0,04	0,86	0,02	0,43	0,01

ASPECTOS GERAIS E PERSPECTIVAS

Os resultados do presente estudo constituem uma análise preliminar a respeito dos aspectos da biologia da reprodução de *S. micranthum* e ainda precisam de análises de um maior número de acessos, principalmente para aspectos da biologia da polinização. No entanto, trazem registros importantes como a capacidade de autofecundação que ainda não havia sido descrita para a espécie, além de sugerir que *S. micranthum* e *S. laxum* não representam táxons totalmente isolados reprodutivamente. Considerando que possam existir diferenças no nível de ploidia entre as populações, é possível que a poliploidia seja um importante fator de diversificação da espécie na sua relação com os visitantes florais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cholewa AF and Henderson DM (1984) Biosystematics of *Sisyrinchium* section Bermudiana (Iridaceae) of the Rocky Mountains. Brittonia 36:342-363.

Gamborg OL, Miller RA and Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50:151-158.

Henderson DM (1976) A biosystematic study of Pacific Northwestern blue-eyed grasses (*Sisyrinchium*, Iridaceae). Brittonia 28:149-176.

Ingram R (1968) Breeding barriers in some species of *Sisyrinchium micranthum*. New Phytologist 67:197-204.

Micheneau C, Fournel J, Gauvin-Bialecki and Pailler T (2008) Auto-pollination in a long-spurred endemic orchid (*Jumellea stenophylla*) on Reunion Island (Mascarene Archipleago, Indian Ocean). Plant Syst Evol 272:11-22.

Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497.

Primack RB (1985) Longevity of individual flowers. Ann Rev Ecol Syst 16:15-37.

Radford AE, Dickinson WC, Massey JR and Bell CR (1974) Vascular plant systematics. Harper and Row Publishers, New York.

Sato H (2002) The role of autonomous self-pollination in floral longevity in varieties of *Impatiens hyphophylla* (Balsaminaceae). Am J Bot 89:263-269.

Stratton DA (1989) Longevity of individual flowers in a Costa Rican cloud forest: ecological correlates and phylogenetic constraints. Biotropica 21:308-318.

Tacuatiá LO, Souza-Chies TT, Flores AM, Eggers L, Siljak-Yakovlev S and Kaltchuk-Santos E (2012) Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. Bot J Linn Soc 169:350-364.

Truylio B, Harter-Marques B and Engels W (2002) Biologia floral e polinização de *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) na região do planalto das araucárias do Rio Grande do Sul, Brasil. Biociencias 10:11-24.

DISCUSSÃO GERAL

Frente à beleza e ampla diversidade da família Iridaceae, o gênero *Sisyrinchium* destaca-se por ser alvo de estudos que buscam investigar a sua complexidade e relações taxonômicas, evolutivas e ecológicas. Os trabalhos que têm como enfoque as espécies sul-americanas do gênero foram iniciados por pesquisadores e estudantes da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e da Université de Paris XI em 2006, com dois projetos "Diversidade genética e evolução das espécies sul-brasileiras de *Sisyrinchium* L. (Iridaceae)" e "Estudos citogenéticos em espécies brasileiras do gênero *Sisyrinchium* L. (Iridaceae)". Dentre as espécies do gênero, *Sisyrinchium micranthum* foi uma das primeiras espécies a ser investigada devido a sua conspícua variabilidade morfológica e ampla distribuição no sul do Brasil; esses estudos buscaram através de diferentes abordagens caracterizar a espécie.

Nos primeiros trabalhos com enfoque em *S. micranthum* foi possível identificar a campo três perfis morfológicos que têm sido identificados como três categorias relacionadas com o tamanho da planta CI, CII e CIII (Tacuatiá *et al*., 2012b). Três números cromossômicos já foram descritos para a espécie, $2n = 2x = 16$, $2n = 4x = 32$ e $2n = 6x = 48$, além de comportamento meiótico regular e altas taxas de viabilidade polínica para acessos de plantas coletadas no RS. A hipótese inicial era de que as categorias morfológicas estivessem relacionadas com os três níveis de ploidia existentes. O desenvolvimento desta tese ao caracterizar um grande número de populações de *S. micranthum* ao longo do sul do Brasil, permitiu evidenciar que na realidade não existe uma relação direta entre o tipo morfológico e o nível de ploidia, uma vez que podemos encontrar diferentes ploidias em uma única população (Tacuatiá *et al*., 2012b). No entanto, a poliploidia parece estar diretamente relacionada com a diversificação da espécie.

Ao longo do desenvolvimento do presente trabalho, várias hipóteses surgiram e diferentes estratégias foram empregadas com o objetivo de caracterizar a variabilidade da espécie e investigar sua relação com a poliploidia, visto que a mesma parece ser intrinsecamente relacionada com a complexidade da espécie.

Os **CAPÍTULOS I** e **II** da tese abordam o estudo da variabilidade genética de *S. micranthum* ao longo da região sul do Brasil. Dentro da família Iridaceae, algumas espécies já foram investigadas quanto à variabilidade genética mediante o uso de marcadores microssatélites, sendo elas *Iris hexagona* Walter (Meerow *et al.*, 2005,

Meerow *et al*., 2007; Pathikonda *et al*., 2010), *Gladiolus longicoliis* Baker (Rymer *et al*., 2010) e *Hesperantha coccinea* (Backh. & Harv.) Goldblatt & J.C. Manning (Wolff *et al*., 2009). *Iris* pertence à mesma subfamília de *S. micranthum* (Iridoideae), porém a uma tribo diferente (Irideae), enquanto *Gladiolus* e *Hesperantha* pertencem à subfamília Crocoideae. Portanto, não haviam marcadores SSR desenvolvidos para nenhuma espécie relacionada à *S. micranthum.* Dessa maneira, o desenvolvimento de marcadores específicos do tipo microssatélites no presente trabalho se reveste de importância, pois além de possibilitar a obtenção de dados relativos à variabilidade genética de *S. micranthum*, também permitirá ensaios de trasnferabilidade desses iniciadores em espécies próximas e/ou do mesmo gênero.

Estudos com diferentes espécies têm feito uso de marcadores codominantes para sugerir a via de formação de plantas poliploides (Soltis & Rieseberg, 1986; Soltis & Soltis, 1989; Mahy *et al.*, 2000; López-Pujol *et al*., 2007; Palop-Esteban *et al*., 2011; Zanella *et al*., 2011). Nesse sentido, a utilização de marcadores microssatélites foi importante para elucidar questões a respeito da poliploidia na espécie. A partir do padrão de amplificação dos locos analisados foi possível sugerir uma origem autopoliploide para os poliploides de *S. micranthum*, uma vez que até seis alelos por loco por indivíduo foram identificados. Além disso, os resultados sugerem que as populações estudadas eram compostas por indivíduos com diferentes níveis de ploidia, o que corrobora os resultados encontrados no estudo de Tacuatiá *et al*. (2012b) no qual, a partir da contagem de cromossomos meióticos, foi encontrado mais de um nível de ploidia dentro de uma mesma população.

Dois conceitos amplamente difundidos a respeito da poliploidia vem sendo revistos nas últimas décadas, de que a autopoliploidia e de que a existência de populações com ploidia mista são incomuns na natureza. Recentes trabalhos e revisões a respeito da poliploidia tem concluído que a autopoliploidia é uma rota de formação de poliploides mais comum do que previamente proposto em populações naturais (Ramsey & Schemske, 1998; Soltis *et al*., 2003, 2007). Além disso, o número de trabalhos descrevendo populações vegetais com codistribuição de citótipos vem aumentando (Thompson *et al*., 2004; Kenedy *et al*., 2006; Cires *et al*., 2009; Kolář *et al*., 2009; Treier *et al*., 2009; Duchoslav *et al*., 2010; Marhold *et al*., 2010; Trávníček *et al*., 2011a,b; Kim *et al*., 2012) indicando que tal fenômeno é bastante recorrente (Cires *et al*., 2009).

A partir da análise da estrutura populacional ao longo dos estados do RS, SC e PR foi possível observar que as populações são altamente estruturadas com elevados índices de divergência genética entre as mesmas. Esse resultado corrobora resultados anteriores encontrados para populações de *S. micranthum* estudadas dentro do Parque Estadual de Itapuã utilizando marcadores moleculares do tipo ISSR (Tacuatiá *et al*., 2012a). Da mesma forma, tal padrão tem sido encontrado para outras espécies de *Sisyrinchium* estudadas no sul do Brasil, como *S. palmifolium*, *S. sellowianum* Klatt e *S. vaginatum*, cujos resultados preliminares têm mostrado altos índices de estruturação para as populações avaliadas (Souza-Chies *et al*., 2012). Ao contrário de *S. palmifolium* e *S. vaginatum*, mas semelhantemente a *S. sellowianum*, as flores de *S. micranthum* possuem dois recursos florais, pólen e lipídeos não voláteis, sendo que os lipídeos florais são coletados por abelhas especializadas da tribo Tapinotaspidini. Considerando que são abelhas que costumam nidificar no solo (Aguiar *et al*., 2004) próximo à área onde forrageiam, tal comportamento pode resultar num baixo fluxo gênico entre diferentes populações e consequentemente, na divergência genética entre as mesmas. Da mesma forma, outros insetos que costumam visitar as flores de *S. micranthum*, sirfídeos e pequenas abelhas coletoras de pólen (Truylio *et al.*, 2002; Freitas & Sazima, 2006), podem contribuir para esse mesmo padrão.

No **CAPÍTULO III**, foi possível comprovar que a variabilidade de *S. micranthum* está presente também em termos de organização do genoma. Considerando *S. micranthum* e as espécies relacionadas *S. laxum* e *S. rosulatum*, foi possível verificar que o rDNA 18S-26S varia em número de locos, com notável redução dos mesmos em poliploides em comparação com os diploides, enquanto o loco 5S mostrou aumento proporcional no número de sinais conforme o aumento no nível de ploidia.

Os dados relativos ao tamanho do genoma para as três espécies estudadas seguem a tendência de redução do genoma de diploides para poliploides apresentada por Leitch & Bennett (2004). Além disso, foi observada uma pequena variação inter e intraespecífica com relação ao valor de Cx, o que poderia indicar que tais poliploides teriam sua origem a partir de diferentes e recorrentes eventos de duplicação cromossômica. Considerando que a formação recorrente de poliploides pode ser uma importante fonte de variação (Soltis *et al*., 2003), a evidente variabilidade morfológica de *S. micranthum*, verificada também em termos genéticos, possivelmente está relacionada com múltiplas origens dos poliploides.

Dentre as ca. 2030 espécies de Iridaceae (Goldblatt *et al*., 2008), o tamanho holoploide (1C) e monoploide (1Cx) do genoma já foi estimado para aproximadamente 6% das espécies, sendo que aproximadamente 31% das espécies do gênero *Sisyrinchium* já foram avaliadas com relação à este caráter (dados disponíveis em http://www.rbgkew.org.uk/cval/homepage.html; Bennett & Leitch, 2010). Dentre estas, ainda não haviam sido feitas estimativas para diploides e tetraploides de *S. micranthum*, nem para as espécies próximas *S. laxum* e *S. rosulatum*. Desta forma, a análise citogenética deste grupo de espécies corresponde ao primeiro estudo da evolução do genoma para espécies de *Sisyrinchium* utilizando contagem cromossômica, citometria de fluxo e citogenética molecular.

A ocorrência de diferentes sistemas de cruzamento é bastante comum ao gênero *Sisyrinchium* (Henderson, 1976; Cholewa & Henderson, 1984). Em *S. micranthum* as diferenças existentes entre diferentes categorias morfológicas apresentadas no **CAPÍTULO IV**, parecem na verdade associadas à ocorrência de poliploidia, enquadrando-se dentro dos resultados mostrados por Barringer (2007) e Husband *et al*. (2008), nos quais as taxas de autofecundação são maiores em táxons poliploides do que em seus correlatos diploides. Nos trabalhos de Henderson (1976) e Cholewa & Henderson (1984) com espécies de *Sisyrinchium* do Hemisfério Norte, também foi observada associação entre sistema de cruzamento e nível de ploidia, de maneira que a autocompatibilidade e a autofecundação eram mais frequentes em espécies com altos níveis de ploidia (superior a 4*x*), enquanto tetraploides mostravam-se autoincompatíveis ou com maior tendência à alogamia. A auto-fecundação em poliploides pode ser favorecida evolutivamente pois viabiliza a manutenção dos poliploides, aumentando sua frequência de formação (Ramsey & Schemke, 1998) e suas chances de estabelecimento (Rausch & Morgan, 2005). Barringer & Gender (2008), ao compararem a influência do nível de ploidia e do sistema de cruzamento em citótipos diploides e tetraploides (alotetraploides) de *Clarkia* (Onagraceae), concluíram que o sistema de cruzamento (autogamia) é mais importante do que a ploidia na determinação da depressão endogâmica. No entanto, apesar da autofertilização ser mais comum em organismos vegetais poliploides (Barringer, 2007; Husband *et al*., 2008), Husband *et al*. (2008) demonstraram que em angiospermas, os táxons alopoliploides são predominantemente autógamos, enquanto autopoliploides realizam alogamia ou possuem sistema misto de cruzamento. Da mesma forma, Ozimec &

Husband (2011) encontraram taxas semelhantes de autofecundação e de fecundação cruzada entre populações diploides e autotetraploides de *Chamerion angustifolium* (L.) Holub. Nesse mesmo estudo, os autores sugerem a partir de seus experimentos e de dados da literatura, que a fecundação cruzada e o sistema misto de cruzamento sejam favorecidos em detrimento da autogamia devido a uma possível correlação entre autofecundação e depressão endogâmica. Dessa forma, apesar da autofecundação representar um mecanismo importante para o estabelecimento dos poliploides nas gerações iniciais (Husband *et al*., 2008), pois mascara alelos recessivos deletérios após repetidas gerações realizando autofecundação, o valor adaptativo decairia (enquanto a depressão endogâmica aumentaria) de maneira que o sistema misto de cruzamento seria favorecido em detrimento da autofecundação. Desta forma, como *S. micranthum* pode apresentar populações com ploidia mista, é provável que tais populações utilizem diferentes estratégias de reprodução, com espécimes exclusivamente de fecundação cruzada, e outros com sistema misto de cruzamento.

Dados preliminares indicam que cruzamentos entre as diferentes categorias morfológicas de *S. micranthum* bem como, entre os diferentes níveis de ploidia, não são totalmente incompatíveis, ou seja, não há um isolamento reprodutivo total. No entanto, já foi verificado em outras espécies vegetais que a poliploidia pode estar relacionada com alterações nas interações ecológicas entre plantas, herbívoros e polinizadores (Husband, 2000; Thompson *et al*., 2004; Thompson & Merg, 2008; Arvanitis *et al*., 2010). Os dados resultantes da observação dos morfotipos sugerem que existe preferência dos polinizadores por plantas de porte maior, o que pode estar relacionado com diferenças na quantidade e qualidade da oferta dos recursos florais como pólen e lipídeos não voláteis. Considerando que possam existir diferenças no nível de ploidia entre as populações, é possível que a poliploidia seja um importante fator de diversificação da espécie na sua relação com os visitantes florais. No entanto, estudos mais aprofundados ainda são necessários para avaliar de forma precisa as diferenças existentes entre as diferentes categorias morfológicas e níveis de ploidia com relação à oferta de recursos florais.

A variabilidade genética de *S. micranthum* encontrada no presente estudo em termos de divergência genética entre populações e de organização do genoma, possivelmente, reflete a teia de relações existente entre a poliploidia e os aspectos reprodutivos da espécie. Com base no exposto, *S. micranthum* é uma potencial espécie

modelo para estudos evolutivos que busquem investigar as relações existentes entre poliploidia, reorganização do genoma, sistema de cruzamento e associações com polinizadores. Num amplo panorama, estudos futuros poderão englobar análises da importância da poliploidia em *S. micranthum* e espécies correlatas na estrutura e diversificação de interações ecológicas em comunidades terrestres.

DISCUSSION GENERALE

Face à la beauté et la diversité de la famille des Iridaceae, le genre *Sisyrinchium* se distingue pour être l'objet d'études qui cherche à enquêter sur sa complexité et les relations taxonomiques, évolutifs et écologiques. Les travaux qui se concentrent sur les espèces d'Amérique du Sud du genre ont été lancées par des chercheurs et des étudiants de l'*Universidade Federal do Rio Grande do Sul* et de l'Université de Paris XI en 2006, avec deux projets « La diversité génétique et évolution des espèces du genre *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) dans le sud du Brésil» et « Les études cytogénétiques chez les espèces brésiliennes du genre *Sisyrinchium* L. (Iridaceae) ». Parmi les espèces du genre, *Sisyrinchium micranthum* a été l'une des premières espèces à être étudiée en raison de sa variabilité morphologique remarquable et une large distribution dans le sud du Brésil; ces études ont cherché à caractériser cette espèce en utilisant différentes approches.

Dans les premiers études sur *S. micranthum* il était possible d'identifier sur le terrain trois profils morphologiques comme trois catégories liées à la taille des plantes, CI, CII et CIII (Tacuatiá *et al*., 2012b). En ce qui concerne la cytogénétique, trois nombres chromosomiques ont été décrits pour cette espèce, $2n = 2x = 16$, $2n = 4x = 32$ et $2n = 6x = 48$, en plus de régularité du comportement méiotique et des taux élevés de viabilité du pollen pour des accessions de plantes collectées dans le RS. L'hypothèse de départ était que les catégories morphologiques ont été liées aux trois niveaux de ploïdie existants. En caractérisant un grand nombre de populations de *S. micranthum* à travers du sud du Brésil pendant la préparation de cette thèse, il a été montré qu'en réalité, il n'existe pas une corrélation entre le type morphologique et le niveau de ploïdie, vu que c'est possible de trouver de ploïdies différents dans une même population et un même type morphologique (Tacuatiá *et al*., 2012b). Ainsi, la polyploïdie semble être directement liée à la diversification de l'espèce.

Tout au long de l'élaboration du présent travail, plusieurs hypothèses ont émergées et des stratégies différentes ont été utilisées afin de caractériser la variabilité de l'espèce et d'étudier sa relation avec la polyploïdie, car elle semble être fondamentalement liée à la complexité de l'espèce.

Les **CHAPITRES I** et **II** abordent l'étude de la variabilité génétique chez *S. micranthum* le long du Brésil méridional. Dans la famille des Iridaceae, certaines espèces ont été étudiées pour la variabilité génétique à l'aide de marqueurs microsatellites, telles

qu'*Iris hexagona* (Meerow *et al.*, 2005; Meerow *et al*., 2007; Pathikonda *et al*., 2010), *Gladiolus longicoliis* (Rymer *et al*., 2010) et *Hesperantha coccinea* (Wolff *et al*., 2009). *Iris* appartient à la même sous-famille que *S. micranthum* (Iridoideae), néanmoins l'espèce est incluse dans une tribu différente (Irideae), tandis que *Gladiolus* et *Hesperantha* appartiennent à la sous-famille des Crocoideae. Par conséquent, les marqueurs SSR n'ont pas été développés pour aucune espèce proche de *S. micranthum*. Ainsi, le développement de marqueurs microsatellites spécifiques dans la présente étude était important pour qu'on puisse obtenir des données concernant la variabilité génétique chez *S. micranthum*, mais également pour des futurs essais de transfert des amorces à des espèces proches ou du même genre.

Plusieurs autres études ont fait usage de marqueurs codominants a fin d'identifier l'origine des polyploïdes (Rieseberg & Soltis, 1986; Soltis & Soltis, 1989; Mahy *et al*., 2000; López-Pujol *et al*., 2007; Palop-Esteban *et al*., 2011; Zanella *et al*., 2011). Dans ce sens, l'utilisation de marqueurs microsatellites a été importante pour élucider des questions concernant la polyploïdie chez *S. micranthum*. A travers le profil de l'amplification des amorces analysées il a été possible d'en déduire que les polyploïdes chez *S. micranthum* sont des autopolyploïdes, vu que jusqu'à six allèles ont été identifiés par locus et par individu. En outre, les résultats suggèrent que les populations étudiées étaient composés de plantes avec différents niveaux de ploïdie, ce qui confirme les résultats présentés dans l'étude de Tacuatiá *et al*. (2012b) dans laquelle, à partir des comptages de chromosomes méiotiques, différents niveaux de ploïdies ont été identifiés au sein d'une même population.

Deux concepts largement diffusés sur la polyploïdie dans les dernières décennies concernant l'autopolyploïdie et l'existence de populations avec ploïdie mixte comme des phénomènes rares dans la nature, viennent d'être révisé. Des études et des révisions récentes sur la polyploïdie ont rapporté que l'autopolyploïdie est la voie de la formation des polyploïdes plus commune que précédemment proposé chez les populations naturelles (Ramsey & Schemske, 1998; Soltis *et al*, 2003, 2007). De plus, le nombre de travaux décrivant des populations de plantes avec coexistence de différents cytotypes est en augmentation (Thompson *et al*., 2004; Kennedy *et al*., 2006; Cires *et al*., 2009; Kolár *et al*., 2009; Treier *et al*., 2009; Duchoslav *et al*., 2010; Marhold *et al*., 2010; Trávníček *et al*., 2011a,b; Kim *et al*., 2012) indiquant que ce phénomène est très fréquent (Cires *et al*., 2009).

À partir de l'analyse de la structure génétique des populations sur les états de RS, SC et PR, on observe que les populations sont très structurées avec des niveaux élevés de divergence génétique entre eux. Ce résultat confirme les résultats antérieurs trouvés pour des populations de *S. micranthum* étudiées dans le *Parque Estadual de Itapuã* au sud du Brésil à l'aide de marqueurs moléculaires du type ISSR (Tacuatiá *et al*., 2012a). De même, les résultats préliminaires pour d'autres espèces de *Sisyrinchium* étudiées dans le sud du Brésil, comme *S. palmifolium*, *S. sellowianum* Klatt et *S. vaginatum*, montrent aussi des niveaux élevés de la structuration génétique (Souza-Chies *et al*., 2012). Contrairement à *S. palmifolium* et *S. vaginatum*, mais semblable à *S. sellowianum*, les fleurs de *S. micranthum* présentent deux ressources florales, du pollen et des huiles non-volatiles, de manière que les lipides floraux sont recueillies par des abeilles spécialisées de la tribu Tapinotaspidini. Considérant que ces abeilles nichent habituellement dans le sol (Aguiar *et al*., 2004) près de la zone où elles butinent, un tel comportement peut entraîner un faible flux de gènes entre les populations et donc la divergence génétique entre eux. De même, d'autres insectes qui visitent habituellement les fleurs de *S. micranthum*, comme les syrphes et les petites abeilles collectrice de pollen (Truylio *et al*., 2002; Freitas & Sazima, 2006), peuvent contribuer à ce modèle.

Dans **CHAPITRE III**, on observe que la variabilité de *S. micranthum* est présente aussi en termes d'organisation du génome. En considérant *S. micranthum* et les espèces proches *S. laxum* et *S. rosulatum*, il a été démontré que l'ADNr 18S-26S varie en nombre de loci, avec une réduction importante des mêmes chez les polyploïdes par rapport aux diploïdes, tandis que le locus 5S a montré une augmentation proportionnelle du nombre de signaux conforme à l'augmentation du niveau de ploïdie.

Les données relatifs à la taille du génome pour les trois espèces étudiées suivent la tendance de réduction du génome de base des diploïdes vers les polyploïdes comme présentée par Leitch & Bennett (2004). En outre, nous avons observé une petite variation inter et intraspécifique par rapport à la valeur de Cx, ce qui pourrait indiquer l'origine multiple des polyploïdes à partir de différents événements de la duplication chromosomique. Tandis que la formation récurrente des polyploïdes peut être une source importante de variation (Soltis *et al*., 2003), la variabilité morphologique évidente de *S. micranthum*, également vu en termes génétiques, est peut-être liée aux origines multiples de la polyploïdie. Parmi environ 2030 espèces des Iridaceae (Goldblatt *et al*., 2008), la

taille holoploïde (1C) et monoploïde (1Cx) du génome a déjà été estimée pour approximativement 6% d'espèces, de manière qu'environ 31% des espèces du genre *Sisyrinchium* ont été évalués concernant ce caractère (disponible en http://www.rbgkew.org.uk/cval/homepage.html; Bennett & Leitch, 2010). Parmi celles-ci, il n'y avait pas encore des estimations pour diploïdes et tétraploïdes de *S. micranthum*, ou pour les espèces apparentées *S. laxum* et *S. rosulatum*. Ainsi, notre analyse cytogénétique de ce groupe d'espèces correspond à la première étude de l'évolution du génome des espèces du genre *Sisyrinchium* en utilisant les outils comme le comptage chromosomique, la cytométrie en flux et la cytogénétique moléculaire.

La présence des différents systèmes de reproduction est assez fréquente dans le genre *Sisyrinchium* (Henderson, 1976; Cholewa & Henderson, 1984). Dans *S. micranthum* les différences entre les catégories morphologiques présentées dans le **CHAPITRE IV**, semblent en faite associées à l'apparition de la polyploïdie et suivent les résultats rapportés par Barringer (2007) et Husband *et al*. (2008), dans lesquels ils montrent que les taux d'autofécondation sont plus élevés dans des taxons polyploïdes que dans les diploïdes correspondants. Les espèces de *Sisyrinchium* de l'hémisphère Nord, étudiées par Henderson (1976) et Cholewa & Henderson (1984), ont aussi montré une corrélation entre le système de croisement et le niveau de ploïdie, de sorte que l'autocompatibilité et l'autofécondation étaient plus fréquentes chez les espèces à des niveaux de ploïdie élevés (supérieure à 4*x*), tandis que les tétraploïdes était auto-incompatibles ou ont montré une tendance plus grande à la pollinisation croisée.

L'autofécondation chez les polyploïdes peut, dans certain cas, avoir un avantage évolutive car elle permet l'entretien de la polyploïdie, en augmentant la fréquence de sa formation (Ramsey & Schemke, 1998) et la chance de leur établissement (Rausch & Morgan, 2005). Barringer & Gender (2008), en faisant la comparaison de l'influence du système de ploïdie et de croisement sur des cytotypes diploïdes et tétraploïdes (alotétraploïdes) de *Clarkia* (Onagraceae), ont conclu que le système de reproduction (autogamie) est plus important que la ploïdie dans la détermination de la dépression de consanguinité. Néanmoins, malgré que l'autofécondation soit plus fréquente au sein des plantes polyploïdes (Barringer, 2007; Husband *et al*, 2008), Husband *et al*. (2008) ont démontré que chez les angiospermes, les taxons allopolyploïdes sont majoritairement des autogames, tandis qu'autopolyploïdes réalisent l'allofécondation ou possèdent un système

mixte de reproduction. De même, Ozimec & Husband (2011) ont trouvé des taux similaires d'autofécondation et d'allofécondation au sein des populations diploïdes et autotétraploïdes de *Chamerion angustifolium* (L.) Holub. Dans la même étude, les auteurs suggèrent à partir de leurs expériences et de données de la littérature, que la fertilisation croisée et le système mixte de reproduction sont favorisés au détriment de l'autogamie en raison d'une corrélation possible entre l'autofécondation et la dépression de consanguinité. Ainsi, en dépit de l'autofécondation représenter un mécanisme important pour l'établissement des polyploïdes dans les premières générations (Husband *et al*., 2008), dû le fait de masquer les allèles récessifs délétères, après répétées générations en réalisant l'autofécondation, la valeur adaptative diminue (tandis que la dépression de consanguinité augmente), de sorte que le système mixte de croisement soit favorisé au détriment de l'autofécondation. Ainsi, comme *S. micranthum* peut présenter des populations avec de la ploïdie mixte, il est probable que ces populations utilisent des stratégies différentes de la reproduction, avec certains individus avec seulement de la fertilisation croisée, et d'autres avec le système de reproduction mixte.

Les données préliminaires sur la biologie de reproduction qui ont résulté de cette thèse indiquent que les croisements entre différentes catégories morphologiques de *S. micranthum* ainsi qu'entre différents niveaux de ploïdie, ne sont pas totalement incompatibles, c'est-à-dire, il n'y a pas un isolement reproductif total entre eux. Toutefois, il a été observé dans d'autres espèces végétales que la polyploïdie peut être liée à des changements dans les interactions écologiques entre les plantes, les herbivores et les pollinisateurs (Husband, 2000; Thompson *et al*., 2004; Thompson & Merg, 2008; Arvanitis *et al*., 2010). Les données de l'observation des pollinisateurs de différents morphotypes suggèrent qu'il existe une préférence des pollinisateurs pour des plantes à plus grande taille. Cela peut être lié à des différences dans la quantité et la qualité de l'approvisionnement des ressources florales telles que de pollen et des huiles non-volatiles. Considérant qu'il peut y avoir des différences dans le niveau de ploïdie entre les populations, il est possible que la polyploïdie soit aussi un important facteur de diversification de l'espèce dans sa relation avec les visiteurs floraux. Cependant, des études complémentaires sont encore nécessaires pour évaluer avec précision les différences entre les différentes catégories morphologiques et des niveaux de ploïdie en ce qui concerne la fourniture de ressources florales.

La variabilité génétique de *S. micranthum* démontrée dans cette étude en termes de divergence génétique entre les populations et de l'organisation du génome, reflète probablement des relations existantes entre la polyploïdie et les aspects de la reproduction de l’espèce. A la lumière de ce qui précède, *S. micranthum* présente une espèce modèle potentielle pour des études évolutives qui cherchent à mettre en évidence la relation entre la polyploïdie, le réarrangement du génome, le système de croisement et des associations avec pollinisateurs. Dans une vue d'ensemble, les études futures peuvent inclure des analyses sur l'importance de la polyploïdie chez *S. micranthum* et les espèces proches dans la structure et la diversification des interactions écologiques au sein des communautés terrestres.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES BIBLIOGRAFIQUES

Aguiar AJC, Melo GAR, Rozen Jr. J and Alves-dos-Santos I (2004) Synopses of Tapinotaspidini nesting biology. In: Hartfelder KH, Jong D, Pereira RA, Santos-Cristino A, Morais MM, Tanaka ED, Lourenco AP, Silva JEB, Almeida GF and Nascimento AM (eds) Proceedings of the 8th IBRA Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas. Ribeirão Preto.

Alves LI, Lima SAA and Felix LP (2011) Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil. Genet Mol Biol 34:259-267.

Alves-dos-Santos I, Machado IC and Gaglianone MC (2007) História natural das abelhas coletoras de óleo. Oecol Bras 11:544-557.

Armour JA, Neumann R, Gobert S and Jeffreys AJ (1994) Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. Hum Mol Genet 3:599-565.

Arvanitis L, Wiklund C, Münzbergova Z, Dahlgren JP and Ehrlén J (2010) Novel antagonistic interactions associated with plant polyploidization influence trait selection and habitat preference. Ecol Lett 13:330-337.

Badaeva ED, Amosova AV, Samatadze TE, Zoshchuk SA, Shostak NG, Chikida NN, Zelenin AV, Raupp WJ, Friebe B and Gill BS (2004) Genome differentiation in Aegilops. 4. Evolution of the U-genome cluster. Plant Syst Evol 246:45-76.

Baker JG (1878) Systema Iridaceanum. Bot J Linn Soc 16:61-180.

Barringer BC (2007) Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. Am J Bot 94:1527-1533.

Barringer BC and Geber MA (2008) Mating system and ploidy influence levels of inbreeding depression in *Clarkia* (Onagraceae). Evolution 62:1040-1051.

Bentham G and Hooker JD (1883) Irideae: no.29. *Sisyrinchium*. In: Bentham G and Hooker JD (eds) Genera plantarum, Vol. 3(2). L. Reeve and Co., London, pp 698-699.

Billote N, Lagoda PJL, Risterucci AM and Baurens FC (1999) Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. Fruits 54:277-288.

Blanc G and Wolfe KH (2004) Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. The Plant Cell 16:1667-1678.

Bogunić F, Muratović E, Ballian D, Siljak-Yakovlev S and Brown S (2007) Genome size stability among five subspecies of *Pinus nigra* Arnold *s.l.* Enviro Exp Bot 59:354-360.

Bogunić F, Siljak-Yakovlev S, Muratović E, Pustahija F and Medjedović S (2011) Molecular cytogenetics and flow cytometry reveal conserved genome organization in *Pinus mugo* and *P. uncinata*. Ann For Sci 68:179-187.

Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA and Edwards SV (2003) The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. Trends Ecol Evol 18:249-256.

Castilho A and Heslop-Harrison JS (1994) Physical mapping of 5S and 18S–25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata*. Genome 38:91-96.

Cavalli SS (2003) Apomixia: um método de reprodução sexual. In: Freitas LB and Bered F (orgs) Genética e Evolução Vegetal. Editora da UFRGS, Porto Alegre, pp 41-55.

Cerbah M, Coulaud J and Siljak-Yakovlev S (1998) rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). J of Heredity 89:312-318.

Cerbah M, Kevei Z, Siljak-Yakovlev S, Kondorosi E, Kondorosi and Trinh TH (1999) FISH chromosome mapping allowing karyotype analysis in *Medicago truncatula* lines Jemalong J5 and R 108-1. Mol Plant Microbe Interact 12:947-950.

Chalup L, Grabiele M, Neffa VS and Seijo G (2012) Structural karyotypic variability and polyploidy in natural populations of the South American *Lathyrus nervosus* Lam. (Fabaceae). Plant Syst Evol 298:761-773.

Chase MW, Williams NH, de Faria AD, Neubig KM, Amaral MCE and Whitten WM (2009) Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. Ann Bot 104:387-402.

Chauveau O, Eggers L, Raquin C, Silvério A, Brown S, Couloux A, Cruaud C, Kaltchuk-Santos E, Yockteng R, Souza-Chies TT and Nadot S (2011) Evolution of oil-

producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. Ann Bot 107:1287-1312.

Cholewa AF and Henderson DM (1984) Biosystematics of *Sisyrinchium* section Bermudiana (Iridaceae) of the Rocky Mountains. Brittonia 36:342-363.

Chukr NS and Capellari Jr L (2003) Iridaceae. In: Wanderley MGL, Sheperd GJ, Giukietti AM and Melhem TS (coords) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo FAPESP RiMa, São Paulo, pp 127-147.

Cires E, Cuesta C, Peredo EL, Revilla MA and Prieto JAF (2009) Genome size variation and morphological differentiation within *Ranunculus parnassifolius* group (Ranunculaceae) from calcareous screes in the Northwest of Spain. Plant Syst Evol 281:193-208.

Clark LYV and Jasieniuk M (2011) POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis. Mol Ecol Resour 11:562-566.

Cocucci AR and Vogel S (2001) Oil-producing of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. Flora 196:26-46.

Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploidy. Nat Rev Genet 6:836-846.

Devoto M and Medan D (2008) Expected mating system, floral diversity and flower visitors of five species of Iridaceae of the Argentine Pampas. Acta Bot Venez 31:425-434.

Duchoslav M, Šafářová L and Krahulec F (2010) Complex distribution patterns, ecology and coexistence of ploidy levels of *Allium oleraceum* (Alliaceae) in the Czech Republic. Ann Bot 105:719-735.

Eggers L, Chukr N, Lovo J and Gil A (2010) Iridaceae. In: Forzza RC, Baumgratz JFA, Bicudo CEM, Carvalho Jr AA, Costa A, Costa DP, Hopkins M, Leitman PM, Lohmann LG, Maia LC, *et al*. (eds) Catálogo de fungos e plantas do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp 1122-1128.

Ekrt L, Holubová R, Trávníček P and Suda J (2010) Species boundaries and frequency of hybridization in the *Dryopteris carthusiana* (Dryopteridaceae) complex: a taxonomic puzzle resolved using genome size data. Am J Bot 97:1208-1219.

Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nat Rev Genet 5:435-445.

Franceschinelli EV and Bawa KS (1999) The effect of ecological factors on the mating system of a South American shrub species (*Helicteres brevispira*). Heredity 84:116-123.

Freitas L and Sazima M (2003) Daily blooming pattern and pollination by syrphids in *Sisyrinchium vaginatum* (Iridaceae) in southeastern Brazil. J Torrey Bot Soc 130:55-61.

Freitas L and Sazima M (2006) Pollination biology in tropical high-altitude grassland in Brazil: interactions at the community level. Ann Mo Bot Gard 93:465-516.

Frello S and Heslop-Harrison JS (2000) Chromosomal variation in *Crocus vernus* Hill (Iridaceae) investigated by *in situ* hybridization of rDNA and a tandemly repeated sequence. Ann Bot 86:317-322.

Ganders (1979) The biology of heterostyly. N Z J Bot 17:607-635.

Garcia S, Garnatje T, Pellicer J, Durant Mcarthur ED, Siljak–Yakovlev S and Valles J (2009) Ribosomal DNA, heterochromatin and correlation with genome size in diploid and polyploid North American endemic sagebrushes (*Artemisia,* Asteraceae). Genome 52:1012-1024.

Garnatje T, Vallès J, Garcia S, Hidalgo O, Sanz M and Siljak-Yakovlev S (2004a) Genome size in *Echinops* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae): karyological, ecological and phylogenetic implications. Biol Cell 96:117-124.

Garnatje T, Vallès J, Vilatersana R, Susanna A, Garcia-Jacas N and Siljak-Yakovlev S (2004b) Molecular cytogenetics of *Xeranthemum* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae). Plant Biol 6:140-146.

Goldblatt P (1982) Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of Neotropical Iridaceae. Syst Bot 7:186-198.

Goldblatt P (1990) Phylogeny and classification of Iridaceae. Ann Mo Bot Gard 77:607–627.

Goldblatt P and Manning JC (2006) Radiation of pollination systems in the Iridaceae of sub-Saharan Africa. Ann Bot 97:317-344.

Goldblatt P and Manning JC (2008) The Iris Family: Natural History and Evolution. Timber Press, Portland, Oregon, 290 pp.

Goldblatt P and Takei M (1997) Chromosome cytology of Iridaceae – patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. Ann Mo Bot Gard 84:285-304.

Goldblatt P, Manning JC and Rudall P (1998) Iridaceae. In: Kubitzki K (ed) The families and fenera of vascular plants. Springer, Berlin, pp 295-314.

Goldblatt P, Rodriguez A, Powell MP, Jonathan DT, Manning JC, Van der Bank M and Savolainen V (2008) Iridaceae 'Out of Australasia'? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on blastid DNA sequences. Syst Bot 33:495-508.

Goldblatt P, Walbot V and Zimmer E (1984) Estimation of genome size (C-value) in Iridaceae by cytophotometry. Ann Mo Bot Gard 71:176-180.

Grant V (1971) Plant speciation. Columbia Univ. Press, New York, 436 pp.

Guerra M (2004) Hibridização *in situ*: princípios básicos. In: Guerra M (org) Fish – conceitos e aplicações na citogenética**.** Sociedade Brasileira de Genética, São Paulo, pp 1-27.

Guerra M (2008) Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. Cytogenet Genome Res 120:339-350.

Guldbrandtsen B, Tomiuk J and Loeschcke V (2000) POPDIST, version 1.1.1: a program to calculate population genetic distance and identity measures. J Hered 91:178-179.

Harding RM, Boyce AJ and Clegg JB (1992) The Evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. Genetics 132:847-859.

Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. Mol Ecol Notes 2:618-620.

Harter B (1999) Bienen und ihre Trachpflanzen im Araukrien-Hochland von Rio Grande do Sul, mit Fallstudien zur Bestäubung von Pioneirpflanzen. 185 f. Tese (Doktor der Natuwissenschaften) – Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

Henderson DM (1976) A biosystematic study of Pacific Northwestern blue-eyed grasses (*Sisyrinchium*, Iridaceae). Brittonia 28:149-176.

Husband BC (2000) Constraints on polyploid evolution: a test of the minority cytotype exclusion principle. Proc R Soc B 267:217-223.

Husband BC, Ozimec B, Martin SL and Pollock L (2008) Mating consequences of polyploidy evolution in flowering plants: current trends and insights from synthetic polyploids. Int J Plant Sci 169:195-206.

Indrusiak MS (2010) Caracterização química e morfometria em *Sisyrinchium micranthum* Ca. (Iridaceae). Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 61 pp.

Ingram R (1968) Breeding barriers in some species of *Sisyrinchium micranthum*. New Phytol 67:197-204.

Innes C (1985) The world of Iridaceae - a comprehensive record. Holly Gate Internacional Ltd., England, Ashington Sussex RH20 3BA.

Jiao Y, Wickett NJ, Ayyampalayam S, Chanderbali AS, Landherr L, Ralph PE, Tomsho LP, Hu Y, Liang H, Soltis PM *et al.* (2011) Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. Nature 473:97-100.

Johnston IM (1938) The species of *Sisyrinchium* in Uruguay, Paraguay and Brazil. J Arnold Arbor 19:376-401.

Kandpal RP, Kandpal G and Weissman SM (1994) Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. Proc Natl Acad Sci USA 91:88-92.

Karagyozov L, Kalcheva ID and Chapman VM (1993) Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. Nucleic Acids Res 21:3911-3912.

Karasawa MMG (2009) Diversidade reprodutiva de plantas. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo, 113 pp.

Karst L and Wilson CA (2012) Phylogeny of the New World genus *Sisyrinchium* (Iridaceae) based on analyses of plastid and nuclear DNA sequence data. Syst Bot 37:87-95.

Kennedy BF, Sabara HA, Haydon D and Husband BC (2006) Pollinator-mediated assortative mating in mixed ploidy populations of *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). Oecologia 150:398-408.

Kenton A and Heywood CA (1984) Cytological studies in South American Iridaceae. Plant Syst Evol 146:87-104.

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

Kenton A, Dickie JB, Langton DH and Bennett MD (1990) Nuclear DNA amount and karyotype symmetry in *Cypella* and *Hesperoxiphion* (Tigridieae: Iridaceae). Evol Trend Plant 4:59-69.

Kijas JM, Fowler JC, Garbett CA and Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. Biotechniques 16:656-662.

Kim S, Rayburn AL, Parrish A and Lee DK (2012) Cytogeographic distribution and genome size variation in prairie cordgrass (*Spartina pectinata* Bosc ex Link). Plant Mol Biol Rep.

Klamt A and Schifino-Wittmann MT (2000) Karyotype morphology and evolution in some *Lathyrus* (Fabaceae) species of southern Brazil. Genet Mol Biol 23:463–467.

Klatt FW (1861) Monographia generis *Sisyrinchium*. Linnaea 31:61-100.

Kolář F, Štech M, Trávníček P, Rauchová J, Urfus T, Vít P, Kubešová M and Suda J (2009) Towards resolving the *Knautia arvensis* agg. (Dipsacaceae) puzzle: primary and secondary contact zones and ploidy segregation at landscape and microgeographic scales. Ann Bot 103:963-974.

Leitch IJ and Bennett MD (2004) Genome downsizing in polyploid plants. Biol J Linn Soc 82:651-663.

Leitch AR and Leitch IJ (2008) Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. Science 320:481-483.

Leong-Škorničová J, Šída, Jarolímová V, Sabu M, Fér T, Trávníček P and Suda J (2007) Chromosome numbers and genome size variation in Indian species of *Curcuma* (Zingiberaceae). Ann Bot 100:505-526.

Levy AA and Feldman M (2002) The impact of polyploidy on grass genome evolution. Plant Physiol 130:1587-1593.

Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beilles A and Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Mol Ecol 11:2453-2465.

Liao W-J, Zhu B-R, Zeng Y-F and Zhang D-Y (2008) TETRA: an improved program for population genetic analysis of allotetraploid microsatellite data. Mol Ecol Resour 8:1260-1262.

Loureiro J, Rodriguez E, Gomes Â and Santos C (2007) Genome size estimations on *Ulmus minor* Mill., *Ulmus glabra* Huds., and *Celtis australis* L. using flow cytometry. Plant Biol 9:541-544.

López-Pujol J, Orellana MR, Bosch M, Simon J and Blanché C (2007) Low genetic diversity and allozymic evidence for autopolyploidy in the tetraploid Pyrenean endemic larkspur *Delphinium montanum* (Ranunculaceae). Bot J Linn Soc 155:211-222.

Mahelka V, Suda J, Jarolímová J, Trávníček P and Krahulec F (2005) Genome size discriminates between closely related taxa *Elytrigia repens* and *E. intermedia* (Poaceae: Triticeae) and their hybrid. Folia Geobot 40:367-384.

Mahy G, Bruederle LP, Connors B, Van Hofwegen M and Vorsa N (2000) Allozyme evidence for genetic autopolyploidy and high genetic diversity in tetraploid cranberry, *Vaccinium oxycoccos* (Ericaceae). Am J Bot 87:1882-1889.

Maluszynska JM and Heslop-Harrison JS (1993) Molecular cytogenetics of the genus *Arabidopsis*: *In situ* localization of rDNA sites, chromosome numbers and diversity in centromeric heterochromatin. Ann Bot 71:479-484.

Marhold K, Kudoh H, Pak J-H, Watanabe K, Španiel S and Lihová J (2010) Cytotype diversity and genome size variation in eastern Asian polyploid *Cardamine* (Brassicaceae) species. Ann Bot 105:249-264.

Markwith SH, Stewart DJ and Dyer JL (2006) TETRASAT: a program for the population analysis of allotetraploid microsatellite data. Mol Ecol Notes 6:586-589.

Masterson J (1994) Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. Science 264:421-424.

Meirmans PG and Van Tienderen PH (2004) GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. Mol Ecol Notes 4:792-794.

Meerow AW, Gideon M, Kuhn DN and Schnell RJ (2005) Isolation and characterization of 10 microsatellite loci from *Iris hexagona* (Iridaceae). Mol Ecol Notes 5:410-412.

Meerow AW, Gideon M, Kuhn DN, Motamayor JC and Nakamura K (2007) Genetic structure and gene flow among south Florida populations of Iris hexagona Walt. (Iridaceae) assessed with 19 microsatellite DNA loci. Int J Plant Sci 168:1291-1309.

Muratović E, Bogunić F, Šoljan D and S. Siljak-Yakovlev (2005) Does Lilium bosniacum merit species rank? A classical and molecular-cytogenetic analysis. Plant Syst Evol 252:97-109.

Naiki A (2012) Heterostyly and the possibility of its breakdown by polyploidization. Plant Species Biol 27:3-29.

Ortolani FA, Mataqueiro MF and Moro JR (2007) Caracterização citogenética em *Schlumbergera truncata* (Haworth) Moran e *Schlumbergera* × *buckleyi* (T. Moore) Tjaden (Cactaceae). Acta Bot Bras 21:361-367.

Ozimec B and Husband BC (2010) Effect of recurrent selfing on inbreeding depression and mating system evolution in an autopolyploid plant. Evolution 65:2038-2049.

Palop-Esteban M, Segarra-Moragues JG and González-Candelas F (2011) Polyploid origin, genetic diversity and population structure in the tetraploid sea lavender *Limonium narbonense* Miller (Plumbaginaceae) from eastern Spain. Genetica 139:1309-1322.

Pathikonda S, Meerow A, Zhenxiang H and Mopper S (2010) Salinity tolerance and genetic variability in freshwater and brackish Iris hexagona colonies. Am J Bot 97:1438-1443.

Pellicer J, García S, Garnatje T, Hidalgo O, Siljak-Yakovlev S and Vallès J (2008) Molecular cytogenetic characterization of some representatives of the subgenera *Artemisia* and *Absinthium* (genus *Artemisia*, Asteraceae). Collect Bot 27:19-27.

Pellicer J, Garnatje T, Molero J, Pustahija F, Siljak-Yakovlev S and Vallès J (2010) Origin and evolution of the South American endemic *Artemisia* species (Asteraceae): evidence from molecular phylogeny, ribosomal DNA and genome size data. Aust J Bot 58:605-616.

Perný M, Kolarčik V, Majeský L and Mártonfi P (2008) Cytogeography of the *Phleum pratense* group (Poaceae) in the Carpathians and Pannonia. Bot J Linn Soc 157:475-485.

Powell W, Gordon CM and Provan J (1996) Polymorphism revealead by simple sequence repeats. Trends Plant Sci 1:215-222.

Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945-959.

Ramsey J and Schemske DW (1998) Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Annu Rev Ecol Evol Syst 29:467-501.

Ramsey J and Schemske DW (2002) Neopolyploidy in flowering plants. Annu Rev Ecol Syst 33:589-639.

Ravenna P (2000) Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* (Iridaceae) VI. Onira Leaflets 5:13-19.

Ravenna P (2001) *S. megapotamicum*. Onira, Botanical Leaflets 6:7-8.

Ravenna P (2002a) Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* – VIII. Onira, Botanical Leaflets 6:48-58.

Ravenna P (2002b) Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* – IX. Onira, Botanical Leaflets 7:20-29.

Ravenna P (2003a) Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* (Iridaceae) X. Onira Leaflets 8:20-24.

Ravenna P (2003b) Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* (Iridaceae) XI. Onira Leaflets 8:48-54.

Ravenna P (2005) Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* (Iridaceae) XIV (Iridaceae). Onira, Botanical Leaflets 10:65-70.

Ravenna P (2007) Revisional studies in the genus *Sisyrinchium* (Iridaceae) XV (Iridaceae). Onira, Botanical Leaflets 11:5-13.

Rausch JH and Morgan MT (2005) The effect of self-fertilization, inbreeding depression, and population size on autopolyploid establishment. Evolution 59:1867-1875.

Renner SS and Schaefer H (2010) The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. Philos Trans R Soc London B Biol Sci 365:423-435.

Roberts AV, Gladis T and Brumme H (2009) DNA amounts of roses (*Rosa* L.) and their use in attributing ploidy levels. Plant Cell Rep 28:61-71.

Robinson JP and Grégori G (2007) Principles of flow cytometry. In: Doležel J, Greilhuber J and Suda J (eds). Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, pp 19-39.

Rozen Jr JG, Melo GAR, Aguiar AJC and Alves-dos-Santos I (2006) Nesting biologies and immature stages of the Tapinotaspidine bee genera *Monoeca* and *Lanthanomelissa* and of their osirine cleptoparasites *Protosiris* and *Parepeolus* (Hymenoptera: Apidae: Apinae). Am Mus Novit 3501:1-60.

Rudall P, Kenton AY and Lawrence TJ (1986) An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied genera. Bot Gaz 147:466-477.

Rudall PJ, Manning JC and Goldblatt P (2003) Evolution of floral nectaries in Iridaceae. Ann Mo Bot Gard 90:613-631.

Rymer PD, Johnson SD and Savolainen V (2010) Pollinator behaviour and plant speciation: can assortative mating and disruptive selection maintain distinct floral morphs in sympatry? New Phytol 188:426-436.

Santos IA (1996) Bienen und melittophile Blütenpflanzen in der Küsternregion und im Atlantischen Regenwald von Rio Grande do Sul (Brasilien), mit einer Fallstudie zu Langzungenbienen und tristylen Wasserhyazinthen. 149 f. Tese (Doktor der Naturwissenschaften) – Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.

Schlindwein C (1995) Wildbienen und ihre Trachpflazen in einer südbrasilianischen Buschlandschaft: Fallstudie Guaritas, Bestäubung bei Kakteen und Loasaceen. Ulrich E. Grauer, Stuttgart, 148 pp.

Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? Nat Rev Genet 5:63-69.

Schubert I and Lysak MA (2011) Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. Trends Genet 27:207-216.

Sharma AK and Talukdar C (1960) Chromosome studies in members of the Irdaceae and their mechanism of speciation. Genetica XXXI:385-409.

Siljak-Yakovlev S, Cerbah M, Coulaud J, Stoian V, Brown SC, Zoldos V, Jelenic S and Papes D (2002) Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. Theor Appl Genet 104:505-512.

Siljak-Yakovlev S, Stevanovic V, Tomasevic M, Brown S and Stevanovic B (2008) Genome size variation and polyploidy in the resurrection plant genus *Ramonda*: cytogeography of living fossils. Environ Exp Bot 62:101-112.

Simillion C, Vandepoele K, Van Montagu MCE, Zabeau M and Van de Peer Y (2002) The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. PNAS 99:13627-13632

Slovák M, Vít P, Urfus T and Suda J (2009) Complex pattern of genome size variation in a polymorphic member of the Asteraceae. J Biogeogr 36:372-384.

Snowdon RJ (2007) Cytogenetics and genome analysis in Brassica crops. Chromosome Res 15:85-95.

Soltis DE and Rieseberg LH (1986) Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): genetic insights from enzyme electrophoresis. Am J Bot 73:310-318.

Soltis DE and Soltis PS (1989) Genetic consequence of autopolyploidy in *Tolmiea* (Saxifragaceae). Evolution 43:586-594.

Soltis DE, Soltis PS and Tate JA (2003) Advances in the study of polyploidy since plant speciation. New Phytol 161:173-191.

Soltis DE, Soltis PS, Schemske DW, Hancock JF, Thompson JN, Husband BC and Judd WS (2007) Autopolyploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species? Taxon 56:13-30.

Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, dePamphilis CW, Wall PK and Soltis PS (2009) Polyploidy and angiosperm diversification**.** Am J Bot 96:336-348.

Souza-Chies TT, Kaltchuk-Santos E, Eggers L, Flores AM, Stiehl-Alves EM, Fachinetto J, Lustosa J, Brisolara-Corrêa L, Tacuatiá LO, Piccoli P and Miz RB (2012) Studies on diversity and evolution of Iridaceae species of southern Brazil. Genet Mol Biol: *in press*.

Suda J, Krahulcová A, Trávníček P, Rosenbaumová R, Peckert T and Krahulec F (2007) Genome size variation and species relationships in *Hieracium* sub-genus *Pilosella* (Asteraceae) as inferred by flow cytometry. Ann Bot 100:1323-1335.

Tachida H and Iizuka M (1992) Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. Genetics 131:471-478.

Tacuatiá LO, Eggers L, Kaltchuk-Santos E and Souza-Chies TT (2012a) Population genetic structure of *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae) in Itapuã State Park, Southern Brazil. Genet Mol Biol 35:99-105.

Tacuatiá LO, Souza-Chies TT, Flores AM, Eggers L, Siljak-Yakovlev S and Kaltchuk-Santos E (2012b) Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. Bot J Linn Soc 169:350-364.

Te Beest M, Roux JJL, Richardson DM, Brysting AK, Suda J, Kubešová M and Pyšek P (2012) The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. Ann Bot 109:19-45.

Thompson JN, Nuismer SL and Merg K (2004) Plant polyploidy and the evolutionary ecology of plant/animal interactions. Biol J Linn Soc 82:511-519.

Tomiuk J, Guldbrandtsen B and Loeschcke V (2009) Genetic similarity of polyploids: a new version of the computer program POPDIST (version 1.2.0) considers intraspecific genetic differentiation. Mol Ecol Resour 9:1364-1368.

Torrell M, Cerbah M, Siljak-Yakovlev S, Vallès J (2003) Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): fluorochrome banding and fluorescence *in situ* hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. Plant Syst Evol 239:141-153.

Trávníček P, Kubátová B, Čurn V, Rauchová J, Krajníková E, Jersáková J and Suda J (2011a) Remarkable coexistence of multiple cytotypes of the *Gymnadenia conopsea* aggregate (the fragrant orchid): evidence from flow cytometry. Ann Bot 107:77-87.

Trávníček P, Dočkalová Z, Rosenbaumová R, Kubátová B, Szelag Z and Chrtek J (2011b) Bridging global and microregional scales: ploidy distribution in *Pilosella echioides* (Asteraceae) in central Europe. Ann Bot 107:443-454.

Treier UA, Broennimann O, Normand S, Guisan A, Schaffner U, Steinger T and Müller-Schärer H (2009) Shift in cytotype frequency and niche space in the invasive plant *Centaurea maculosa*. Ecology 90:1366-1377.

Truylio B, Harter-Marques B and Engels W (2002) Biologia floral e polinização de *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) na região do planalto das araucárias do Rio Grande do Sul, Brasil. Biociencias 10:11-24.

Van Puyvelde K, Van Geert A and Triest L (2010) ATETRA, a new software program to analyse tetraploid microsatellite data: comparison with TETRA and TETRASAT. Mol Ecol Resour 10:331-334.

Wan T, Zhang X-l, Gregan J, Zhang Y, Guo P and Guo Y-H (2012) A dynamic evolution of chromosome in subgenus *Potamogeton* revealed by physical mapping of rDNA loci detection. Plant Syst Evol 298:1195-1210.

Wolff K, Knees S and Cubey S (2009) Genetic relatedness and cultivar identification in a valuable garden species, *Hesperantha coccinea* (*Schizostylis coccinea*). Plant Genet Resour 7:281-290.

Wood TE, Takebayashic N, Barker MS, Mayrosee I, Greenspoond PB and Rieseberg LH (2009) The frequency of polyploid speciation in vascular plants. PNAS 106:13875-13879.

Zane L, Bargelloni L and Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. Mol Ecol 11:1-6.

Zanella CM, Bruxel M, Paggi GM, Goetze M, Buttow MV, Cidade FW and Bered F (2011) Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). Am J Bot 98:1511-1519.

Sítios consultados:

Bennett MD and Leitch IJ (2010) Plant DNA C-values database (Release 5.0, Dec. 2010), http://www.rbgkew.org.uk/cval/database1.html (17 de fevereiro de 2012)

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuáira, Cerrados – EMBRAPA Cerrados, http://www.cpac.embrapa.br (22 de janeiro de 2012)