

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Caracterização cromossômica de espécies de *Cipura* Aubl.
(Iridaceae) do Cerrado (Goiás, Brasil)**

Trabalho de Conclusão de Curso

Kelli Cristina Oliveira das Neves Lopes

Porto Alegre, Janeiro de 2018.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Kelli Cristina Oliveira das Neves Lopes

Trabalho de conclusão de curso
submetido ao curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul como
requisito para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas

ORIENTADORA: Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos

Porto Alegre, Janeiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, pois sem Ele eu não sou nada. Sua misericórdia dura para sempre e é fiel para comigo mesmo quando eu não sou.

À minha família, meu querido pai Claudionor, minhas irmãs Keyla e Keysi, meu marido Cristiel que aguentou meus mau humores pré-exames e especialmente a minha melhor amiga e amada mãe, Sionara, que me incentivou e me dizia que eu poderia ser o que eu quisesse desde que estudasse.

A Dra. Eliane Kaltchuk dos Santos, minha orientadora pela paciência em me ensinar tudo desde o começo não só orientações acadêmicas, mas lições de vida também. Nunca esquecerei.

Aos colaboradores Dra. Tatiana Teixeira de Souza Chies e Dr. Olivier Chauveau que cederam o material do trabalho em questão.

Aos meus colegas de curso Watuzi, Cibele, Leliane, Jéssica, Michele, Dandara, Ingrid e tantos outros que tornaram essa trajetória divertida em que sofriamos e sorriamos juntos. Também aos colegas de laboratório Luana e Alexandre por me auxiliar também nas análises.

À UFRGS por me proporcionar a oportunidade de ter um ensino superior e a PRAE porque sem ela eu jamais teria conseguido concluir o curso.

Aos meus professores por sempre me proporcionarem uma segunda chance de melhorar o meu aprendizado.

A mim por não ter desistido quando as coisas pareciam difíceis.

SUMÁRIO

RESUMO	5.
INTRODUÇÃO GERAL	7.
1. A família Iridaceae	7.
2. Tribo Tigridieae	8.
3. Gênero <i>Cipura</i> Aubl.	9.
4. Estudos citogenéticos	11.
JUSTIFICATIVA	15.
OBJETIVOS GERAIS	17.
Objetivos específicos	17.
MATERIAIS E MÉTODOS	18.
1. Coleta do material vegetal	18.
2. Análises citogenéticas	18.
2.1. Coleta de raízes	18.
2.3. Determinação do número cromossômico	19.
2.4. Visualização e análise dos dados citológicos	20.
2.6. Análise de tamanho de genoma	20.
RESULTADOS	22.
DISCUSSÃO	28.
CONCLUSÃO	33.
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34.

RESUMO

Cipura Aubl., gênero pertencente à família Iridaceae (tribo Tigridieae) é constituída por cerca de oito espécies cujas plantas são herbáceas com presença de bulbos. Ocorre no Novo Mundo desde o sul do Brasil e Paraguai até o México.

Espécies de *Cipura* ocorrem na região de Cerrado do Estado de Góias e no Nordeste do Brasil. Embora estudos de espécies do Cerrado sejam especialmente relevantes devido à vulnerabilidade desse bioma, inexistem dados citogenéticos para as espécies de *Cipura* ali presentes. Populações de *Cipura xanthomelas* coletadas no Cerrado exibem uma acentuada variação fenotípica. Em Iridaceae, grande parte da variabilidade morfológica intraespecífica e intragenérica se deve à diversidade cariotípica resultante de eventos de poliploidia e disploidia. Assim, é possível que a caracterização cariotípica de *C. xanthomelas* contribua para uma melhor resolução taxonômica. Contudo, estudos citogenéticos em *Cipura* são limitados a quatro espécies.

O presente estudo tem por objetivo caracterizar citogeneticamente espécies de *Cipura* ocorrentes no Cerrado (estado de Góias).

Bulbos de *Cipura formosa* e de *C. xanthomelas* foram coletados a partir de três populações do Cerrado e mantidos em cultivo. Para a contagem cromossômica e análise da arquitetura cariotípica foram analisados cromossomos metafásicos a partir de meristemas radiculares. No preparo das lâminas foi empregada a técnica de gotejamento e coloração com Giemsa. As análises foram realizadas em fotomicroscópio óptico Zeiss Axioplan. As medições cromossômicas foram feitas pelo programa Karyotype Analysis 2.0, sendo determinados a fórmula cariotípica (FC), o número de cromossomos com satélite, a razão entre os cromossomos maior e menor (L/S), índice de assimetria intercromossômica (A2), categoria de assimetria de Stebbins (Steb) e comprimento cromossômico total (CCT). Estimou-se também a quantidade de DNA por citometria de fluxo.

Os resultados obtidos para *Cipura formosa* são inéditos e evidenciam ser esta uma espécie diploide com $2n = 14$. *Cipura xanthomelas* apresenta $2n = 28$, sendo tetraploide e corroborando dados anteriores para populações do Nordeste. Assim, as duas espécies apresentam o número básico descrito para o gênero $x = 7$, sendo esse altamente conservado na tribo Tigridaeae.

As duas espécies têm cariótipos assimétricos e bimodais, característicos do clado A de Tigridaeae. *Cipura formosa* apresenta dois pares de cromossomos maiores e cinco pares consideravelmente menores, sendo um par satelitado. *Cipura xanthomelas* possui quatro pares grandes e os demais pequenos, com quatro satélites.

O heteromorfismo cromossômico também foi evidenciado nas duas espécies, caráter esse recorrente em espécies dessa tribo.

Estimativas de tamanho de genoma mostram que *C. xanthomelas* possui maior quantidade de DNA (2C) do que *C. formosa*, fato esse esperado considerando seus níveis de ploidia tetraploide e diploide, respectivamente. Porém, o valor monoploide Cx maior em *C. formosa* sugere “Genome Downsizing”.

A dificuldade de se obter cromossomos com espalhamento adequado e com boa condensação da cromatina impossibilitou realização das medidas cariotípicas nos diferentes morfotipos coletados (“antera amarela” X “antera preta”) de *C. xanthomelas*. Contudo, os números cromossômicos de ambos morfotipos são o mesmo.

Palavras-chave: assimetria cromossômica, *Cipura*, citogenética, cariótipo, heteromorfismo cromossômico, Iridaceae, tamanho de genoma.

INTRODUÇÃO GERAL

1-Iridaceae

Integrante da ordem Asparagales (APG III, 2009) do clado de monocotiledôneas, a família Iridaceae é considerada a segunda maior família desta ordem segundo Goldblatt & Manning (2008).

Encontrada em todo o globo, Iridaceae é constituída por cerca de 2030 espécies distribuídas entre 65-75 gêneros sendo dividida em sete subfamílias: Isophysidoideae, Patersonioideae, Geosiridoideae, Aristeoideae, Nivenioideae, Crocoideae e Iridoideae. A partir de dados de sequências plastidiais, Iridoideae foi subdividida em cinco tribos: Diplarreneae, Irideae, Sisyrinchieae, Trimezieae e Tigrídieae (Goldblatt *et al.*, 2008).

No Brasil, há ocorrência de apenas uma subfamília, Iridoideae, embora represente cerca de 40% do total de espécies de Iridaceae, com 23 gêneros e 190 espécies, principalmente distribuídos na Floresta Atlântica, Cerrado e bioma Pampa (Eggers *et al.*, 2016).

Alguns gêneros de Iridaceae possuem grande valor econômico em diversos países da Europa, bem como na Índia e Estados Unidos; sua importância se deve principalmente ao potencial ornamental e uso em paisagismo. Além disso, é empregada como fonte de alimentação, mediante o consumo de cormos ou pela utilização de seus estiletos e estigmas como especiarias (Goldblatt *et al.*, 1998; Goldblatt & Manning, 2008). No gênero *Cipura* apenas a *C. paludosa* Aubl. é usada como ornamental e medicinal.

As plantas dessa família podem ser anuais ou perenes; dispõem de um caule frequentemente subterrâneo, do tipo bulbo, corno ou rizoma, sendo o caule aéreo presente ou não. Contêm folhas caulinares ou basais em número variado, cilíndricas ou laminares, lineares ou ensiformes, planas ou plicadas, paralelinérveas, equitantes ou não, bi ou

unifaciais (Judd *et al.*, 2007; Goldblatt *et al.*, 2008). A enorme variação morfológica observada em alguns grupos de Iridaceae torna os seus relacionamentos internos complexos (Chies *et al.*, 2014).

As flores são dispostas em inflorescências determinadas do tipo ripídio, frequentemente modificada e às vezes reduzidas a uma flor solitária terminal. Flores bissexuadas possuem simetria bilateral ou radial. Apresentam seis tépalas, as externas às vezes diferenciadas das internas, livres ou conadas, petaloides (Judd *et al.*, 2007; Goldblatt *et al.*, 2008).

As análises dos caracteres morfológicos e anatômicos foram essenciais para a classificação, bem como a construção das primeiras árvores filogenéticas de Iridaceae, sendo posteriormente empregados dados moleculares o que gerou pontos de discussão por diversos autores, em vista da complexa taxonomia da família (Goldblatt, 1990; Souza-Chies *et al.*, 1997; Reeves *et al.*, 2001; Goldblatt, *et al.*, 2008).

2- Tribo Tigridieae

A tribo Tigridieae inclui de 15 a 20 gêneros e 172 espécies, é estritamente distribuída no Novo Mundo, com centros de diversidade na América do Sul e áreas no México e Guatemala (Rodriguez & Sytsma, 2006; Goldblatt *et al.*, 2008).

Após o estudo de Goldblatt *et al.* (2008) que subdividiu Iridoideae em cinco tribos, constatou-se que Tigridieae é taxonomicamente complexa já que apresenta uma grande variação morfológica, de difícil preservação de material em herbário (Rodriguez & Sytsma, 2006).

Um estudo filogenético realizado por Chauveau *et al.* (2012), evidenciou que as duas subtribos (Cipurinae e Tigridiinae) propostas por Goldblatt (1990) não são monofiléticas. Assim, os autores sugerem a divisão da tribo em dois clados: o clado A, que compreende somente espécies da subtribo Cipurinae, e o clado B que inclui

tanto espécies de Cipurinae quanto de Tigridiinae. A subtribo Cipurinae inclui: *Calydorea* Herb., *Cipura*, *Cypella* Herb. e *Nemastylis* Nutt., o segundo inclui todos os gêneros tradicionalmente dispostos na subtribo Trigridiinae, além de *Eleutherine* Herb., *Ennealophus* N. E. Br., *Cardiostigma* e *Nemastylis* anteriormente dispostos em Cipurinae (Rodriguez & Sytsma, 2006).

3- O Gênero *Cipura* Aubl.

Cipura é um gênero composto por cerca de oito espécies distribuídas nas Américas do Sul e Central (Dantas-Queiroz *et al.*, 2016). Possuem raízes em forma de bulbos, folhas plicadas e flores de cores variadas (amarelas, lilases, roxas, azuis ou brancas). As tépalas internas são menores que as externas, os estames podem ser livres ou fusionados.

Cipura formosa Ravena

Segundo Dantas-Queiroz *et al.* (2016), as plantas de *C. formosa* possuem de 30 a 45 cm de altura com um bulbo resinífero, geralmente com rochas incrustadas em sua superfície e folhas eretas rígidas. Suas flores são vistosas, lilás ou violeta. As tépalas exteriores são repletas de pequenos pontos roxos, enquanto as tépalas interiores têm uma linha branca (porção inferior) com a porção superior apresentando uma mancha amarela e curvando-se para a frente (Figura 1A). Esta espécie é encontrada em populações médias e grandes, raramente isoladas. Tem floração na estação chuvosa (Janeiro a Maio) emitindo uma flor por vez por planta.

Cipura formosa é endêmica do Brasil, sendo encontrada em domínios fitogeográficos do tipo Cerrado. Tem sua ocorrência confirmada nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste (Gil & Damasceno, 2018).

Cipura xanthomelas Maxim. ex Klatt

Apresenta plantas com altura bastante variável de 10 a 60 cm (Dantas-Queiroz *et al.*, 2016). As folhas são eretas, assemelhando-se às primeiras folhas de algumas *Arecaceae*. Suas flores são amarelas, com tépalas externas e pétalas internas eretas, com marcas escuras em seu ápice (Figura 1B).

As plantas dessa espécie muitas vezes encontram-se isoladas ou constituindo populações com poucos indivíduos próximos uns dos outros. É encontrada em pastagens e perto de habitações humanas. Floresce na estação chuvosa (Novembro a Março), geralmente com uma ou duas flores ao mesmo tempo por planta. (Dantas-Queiroz, *et al.*, 2016).

De acordo com a Flora do Brasil (Gil & Damasceno, 2018), tem sua ocorrência confirmada apenas na região Norte. Contudo, há trabalhos que reportam sua coleta no Nordeste e Centro-Oeste (Alves *et al.*, 2011; Dantas-Queiroz *et al.*, 2016).

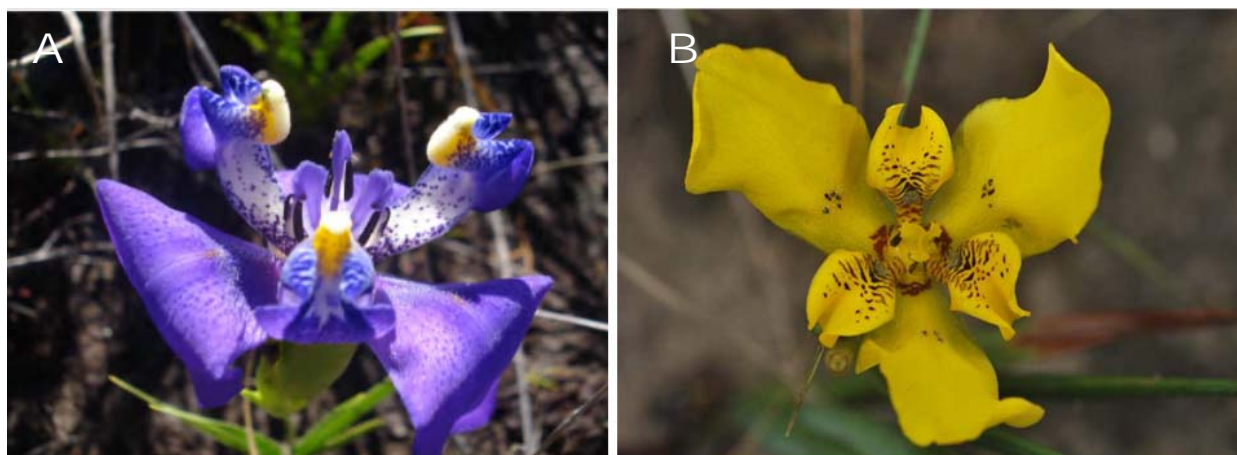


Figura 1– **A**- *C. formosa.*; **B** - *Cipura xanthomelas* Fotos: A- Dantas-Queiroz *et al.* (2016). B - RBG Kew;

4- Estudos citogenéticos

Análises citogenéticas fornecem informações que podem ser usadas para diferentes propósitos no campo da biologia como: definições taxonômicas, estudos de evolução vegetal, caracterização de germoplasmas, análises clínicas e melhoramento genético (Guerra, 1988).

O número cromossômico é o parâmetro mais utilizado na citogenética vegetal para o entendimento de variações genéticas envolvidas na evolução de um grupo, como também na delimitação taxonômica de espécies (Guerra, 2000; Pedrosa *et al.*, 1999), assim como para a reconstrução de filogenias (Stebbins, 1971; Goldblatt, 1990, 2000, 2006).

A investigação quanto à morfologia cromossômica (comprimento cromossômico, localização da constrição primária e secundária), permite a caracterização cariotípica e assim, a inferência da evolução daquele genoma.

Muitos dos estudos citogenéticos em Iridaceae foram desenvolvidos por Peter Goldblatt, que trabalha com esta família desde a década de 1960. Os trabalhos de Goldblatt (1982) e de Goldblatt & Takei (1993) apresentam um grande volume de dados citogenéticos de diversas espécies dessa família.

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

A ocorrência de eventos recorrentes de poliploidia e disploidia em Iridaceae é bastante comum. Assim, é possível encontrar na família desde $2n = 6$ até $2n = 230$ (Alves *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2015). A poliploidia parece ser o evento mais importante na evolução das espécies de Iridaceae da América do Sul e Central.

O número básico para Iridaceae é ainda incerto, mas considerando a distribuição dos números básicos dentro dos gêneros menos especializados, o provável número básico

é $x = 10$ do qual teriam derivado os números 9, 8, 7 e 5 por disploidia decrescente (Goldblatt, 1990; Goldblatt & Takei, 1993; Moraes *et al.*, 2015). Na verdade, uma imensa variação quanto ao número básico é verificada dentro de cada tribo, e mesmo gênero.

De acordo com Moraes *et al.* (2015) o número cromossômico básico ancestral para a subfamília Iridoideae é $x = 8$, porém dentre as tribos é observada uma variação no número, sendo atribuído $x = 7$ para Tigridaeae, $x = 14$ para Trimezieae e $x = 9$ para Sisyrinchieae. Tal diversidade evidencia a complexa evolução do genoma nessa família.

A ocorrência de séries poliploides interespecíficas é bastante frequente em espécies do clado A de Tigridaeae. Por outro lado, para as espécies clado B e para Trimezieae, eventos de disploidia parecem ter tipo um papel importante. Em Tigridaeae, acredita-se que o número básico $x=7$ teve origem por disploidias reducionais por translocações Robertsonianas.

A arquitetura cromossômica é também bastante diversa em Iridaceae com grande variação no tamanho e forma dos cromossomos. Assimetria cariotípica e bimodalidade são frequentes principalmente em Iridoideae (Alves *et al.*, 2011; Souza-Chies *et al.*, 2012). Os cariótipos bimodais geralmente envolvem pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntrico (Goldblatt, 1982), exceto em *Gelasine azurea* Herb., onde os pares maiores são acrocêntricos (Kenton & Rudall, 1987).

Cariótipos assimétricos do tipo bimodal são ditos como sendo de evolução recente, resultado de fusões cêntricas entre cromossomos do provável genoma ancestral (Goldblatt & Takei, 1993). Goldblatt *et al.* (2008), a partir de dados filogenéticos, indicaram que o aumento da bimodalidade ocorreu diversas vezes em diferentes linhagens. A morfologia cromossômica variável e cariótipo bimodal têm sido utilizados na delimitação da tribo Tigridaeae (Kenton *et al.*, 1990; Goldblatt & Takei 1997; Reeves *et al.*, 2001).

Também a presença de heteromorfismo cromossômico tem sido verificada em algumas espécies sendo resultantes de translocações recíprocas desiguais (Souza-Chies *et al.*, 2012).

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

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

Moraes *et al.* (2015) apresentam um levantamento dos dados de conteúdo de DNA já publicados para espécies das tribos Tigridaeae, Trimezieae e Sisyrinchieae, além de apresentar dados inéditos para 11 espécies. Neste estudo, os dados citogenéticos (número cromossômico e tamanho de genoma) são analisados dentro de uma perspectiva filogenética a partir da árvore de Iridoideae reportada por Chauveau *et al.* (2012), a fim de melhor compreender a evolução cromossômica e buscar o número básico ancestral, com especial atenção para Tigridaeae e Trimezieae.

As informações citogenéticas encontradas para o gênero *Cipura* são escassas com números cromossômicos determinados para apenas quatro espécies. Os poucos registros disponíveis indicam um número básico $x = 7$, com a ocorrência de poliploidia intragenérica. Goldblatt & Johnson (1990) apresentam os números cromossômicos para *C. campanulata* Ravenna ($2n=4x=28$) e *C. rupicola* Goldblatt & Henrich ($2n=4x=28$).

Para *Cipura paludosa* foram reportados citótipos diploides e tetraploides ($2n = 14$, 28) e presença de cariótipo bimodal (Goldblatt, 1982; Alves *et al.*, 2011).

Com relação à *Cipura xanthomelas* a literatura refere ser tetraploide com $2n = 28$, apresentando assimetria intercromossômica bastante significativa (Alves *et al*, 2011).

Para *Cipura formosa* não há determinação de número cromossômico na literatura.

JUSTIFICATIVA

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil com cerca de dois milhões de quilômetros quadrados, o que representa 21% do território brasileiro. Possui a mais rica flora dentre as savanas do mundo com mais de 7.000 espécies, sendo 40% delas endêmicas. Embora seja um dos biomas de maior biodiversidade mundial, o Cerrado já perdeu metade de sua área original pela introdução de pastagens plantadas, culturas anuais e outros tipos de uso. Estudos recentes indicam que estes ambientes naturais são muito susceptíveis à degradação (Klink e Machado 2005; Rocha *et al.*, 2011).

Particularmente no estado de Goiás, vegetação nativa diminuiu consideravelmente (Dantas-Queiroz *et al.*, 2016). Mais de 30 espécies vegetais nativas consideradas ornamentais encontram-se ameaçadas e uma espécie extinta devido ao comércio extrativista. Portanto, o estudo da biodiversidade do Cerrado é fundamental para a adoção de medidas urgentes para sua conservação (Klink & Machado, 2005).

Dentre as famílias de plantas ocorrentes no Cerrado está Iridaceae com representantes dos gêneros *Cipura*, *Sisyrinchium* L. e *Trimezia* Salib. ex Herb., sendo largamente encontrados (Dantas-Queiroz *et al.*, 2016).

O gênero *Cipura* ainda é pouco estudado, com a maior parte dos trabalhos sendo de descrição de espécies. Trabalhos com *C. paludosa* são mais frequentes tendo em vista suas propriedades medicinais. Embora dados citogenéticos em Iridaceae sejam extremamente úteis na taxonomia e em estudos evolutivos, estes são escassos para o gênero. Na última filogenia publicada para a subfamília Iridoideae (Chauveau *et al.*, 2012) apenas duas espécies de *Cipura* foram contempladas. Estudos de diversidade genética inexistem para espécies desse gênero.

Cipura possui espécies com grande semelhança vegetativa, porém algumas apresentam elevado polimorfismo floral. Uma ampla variabilidade fenotípica intraespecífica tem sido observada em campo (O. Chauveau, comunicação pessoal)

dificultando a delimitação das espécies. Em coletas recentes de Iridaceae na região do Cerrado pela equipe do Dr. Olivier Chauveau, foi verificada uma notável variação em caracteres morfológicos para *C. xanthomelas*, principalmente quanto a aspectos florais como a coloração das anteras. Além de plantas com a coloração usual das anteras amarelas, foi encontrada uma população com um morfotipo distinto de anteras com coloração escura.

Considerando que os estudos taxonômicos têm sido realizados baseados principalmente na morfologia, é recomendável a busca por outros caracteres que auxiliem no reconhecimento das espécies. Nesse sentido, a caracterização citogenética surge como uma estratégia adicional para agregar informações que permitam a caracterização dessas espécies. Assim, o presente estudo se propõe a obter dados citogenéticos para duas espécies de *Cipura* da região do Cerrado, de maneira a contribuir para o conhecimento relativo à flora dessa região ameaçada.

OBJETIVO GERAL

Caracterizar citogeneticamente espécies de *Cipura* ocorrentes no Cerrado (estado de Goiás).

Objetivos Específicos

- ❖ Determinar o número cromossômico das espécies e investigar a ocorrência de citotipos intra-específicos;
- ❖ Realizar medidas cromossômicas visando a determinação de diversos parâmetros cariológicos;
- ❖ Construção de idiogramas;
- ❖ Estimar índices de assimetria;
- ❖ Analisar comparativamente os cariótipos das populações de *C. xanthomelas* do Nordeste e do Cerrado.
- ❖ Estimar o conteúdo de DNA de cada uma das espécies de *Cipura*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

As coletas do material utilizado nas análises citogenéticas foram realizadas no estado de Goiás (Tabela 1). Os vouchers foram depositados no herbário ICN da UFRGS. Os bulbos foram plantados e mantidos em viveiro, sendo coletadas raízes e folhas para análises citológicas e de citometria de fluxo, respectivamente.

Tabela 1: Localidades das coletas de *Cipura* em Goiás

Espécie	Acesso (Voucher)	Município	Latitude (s)	Latitude
<i>C. xanthomelas</i> antera amarela	O.Chauveau & A.Aguiar 909	Alto Paraíso, São Jorge	S 14°11'10.6"	W 47°47'26.4"
<i>C. xanthomelas</i> antera preta	O.Chauveau & A.Aguiar 909	Alto Paraíso, São Jorge	S 14°08'55.00"	W 47°44'47.00"
<i>C. formosa</i>	Báez M. 224	Cavalcante	S 13°36'14.1"	W 47°31'38.2"

Análises citogenéticas

2.1. Coleta de raízes

As raízes velhas dos bulbos coletados a campo foram removidas com ajuda de uma gilete e posteriormente acondicionadas em frascos contendo água destilada para que ocorresse o estímulo de crescimento de novas raízes. No laboratório foram recolocadas em vermiculita, onde raramente havia emissão de raízes. Passado alguns meses de dormência foi feita substituição nos copos plásticos de uma mistura de terra preta com vermiculita, e realocados em uma sala de crescimento a 24,6 °C com fotoperíodo de 16h.

As raízes novas, emitidas foram coletadas e submetidas a um pré-tratamento com uma solução anti-mitótica de 8-Hidroxiquinoleína *overnight*. Após essa etapa, as raízes foram fixadas em Carnoy (3 etanol:1 ácido acético), em temperatura ambiente por 4 a 10 horas, sob agitação. O material permaneceu estocado em freezer até o momento da análise (Figura 2).

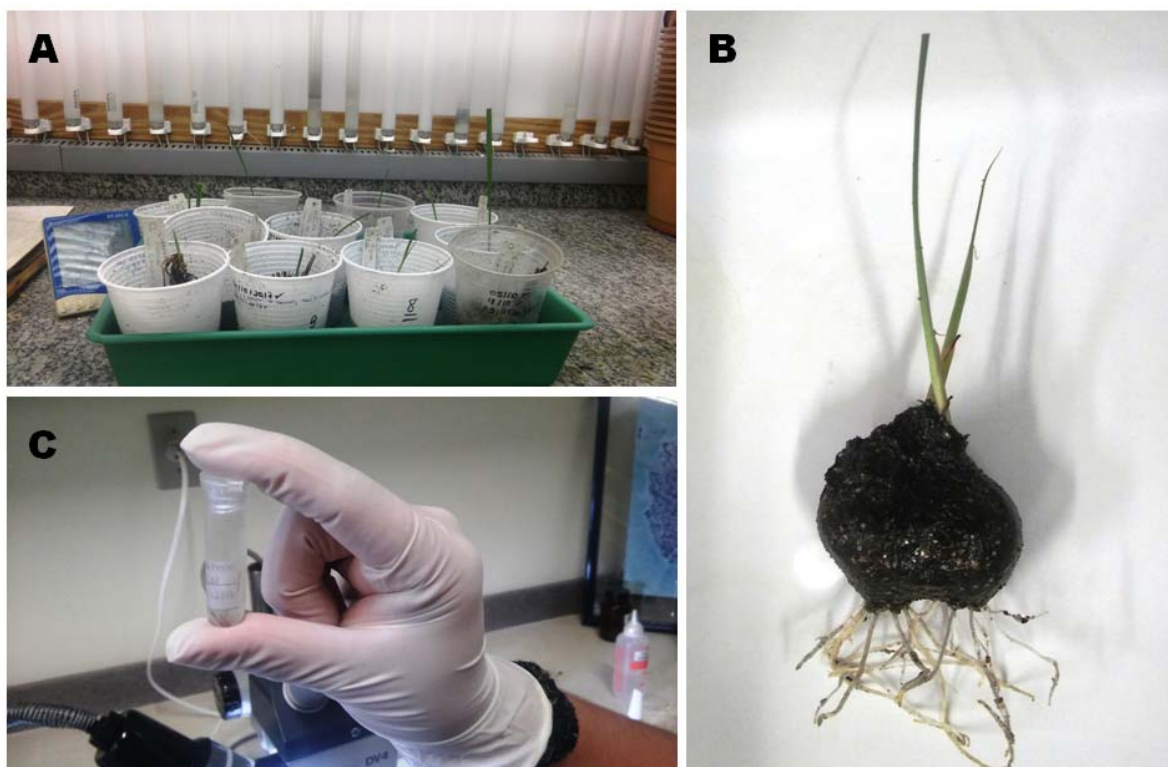


Figura 2. A- Os bulbos na sala de crescimento; B- Emissão de raízes do bulbo; C- eppendorf contendo material no fixador.

2.2. Determinação do número cromossômico

Para a observação de cromossomos foi empregada a técnica de gotejamento. As raízes foram lavadas em água destilada por três vezes de 6 min e submetidas à digestão enzimática em 30µl de solução de celulase 2% e pectinase 20% à 37°C em câmara úmida por 4 h. O material já digerido foi homogeneizado com uma micropipeta e centrifugado

por 4 min a 12.000 rpm. Depois da centrifugação, a enzima foi retirada do eppendorf e adicionado 20µl de água destilada, homogeneizado novamente e centrifugado a 3min. Essa operação foi repetida duas ou três vezes. Após a lavagem das raízes com a água foi adicionado 20µl de 3:1 e novamente homogeneizado. Esse processo também se repetiu duas ou três vezes.

Para o preparo da lâmina, a solução de protoplastos foi gotejada com uma micropipeta a uma distância de aproximadamente 50 cm a fim de melhorar o espalhamento dos cromossomos.

Depois de prontas, as lâminas foram secas à temperatura ambiente e posteriormente coradas com Giemsa 2%.

2.3. Visualização e análise dos dados citológicos

As células contendo cromossomos com boa condensação e um bom espalhamento foram analisadas e fotografadas no fotomicroscópio Zeiss Axioplan com o uso do programa AxioVision. Para as análises de morfologia cromossômica, foram analisadas de três a seis metáfases para cada espécie.

Para a análise da arquitetura cariotípica, foi utilizado o programa *Karyotype Analysis 2.0*, através do qual foram determinados os seguintes parâmetros: fórmula cariotípica (FC), a razão entre os cromossomos maior e menor (L/S), o índice de assimetria intercromossômica (A2) proposto por Romero-Zarco (1986), a assimetria de acordo com Stebbins (Steb) e o comprimento cromossômico total (CCT).

2.4. Análise de tamanho de genoma

Para a estimativa de quantidade de DNA, foram realizadas análises por citometria de fluxo de dois indivíduos de *C. formosa* e cinco indivíduos de *C. xanthomelas*.

Para cada amostra a ser analisada, foi macerado cerca de 20 a 30 mg de tecido foliar da espécie e aproximadamente a mesma quantidade de material foliar da planta-padrão de referência *Pisum sativum* cv. Ctirad (2C = 9,09 pg).

Com auxílio de um bisturi, as folhas foram trituradas em placa de Petri na presença do tampão LB01 (1 mL) para liberar os núcleos (Dolezel *et al.*, 1989). A solução proveniente desta maceração foi filtrada através de tubo contendo um filtro de 30 µm. Os núcleos foram corados com 25 µL de uma solução composta por iodeto de propídio 1 mg/mL⁻¹ e 5 µL de RNase.

Pelo menos 10.000 núcleos foram analisados para cada amostra usando um citômetro FACS-Aria (Becton-Dickinson).

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

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

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

RESULTADOS

O presente estudo apresenta os números cromossômicos e a caracterização cariotípica das espécies *Cipura formosa* e *C. xanthomelas*. Esta é a primeira descrição de dados citogenéticos para tais espécies de *Cipura* do Cerrado no estado de Goiás.

Para *Cipura formosa* não há informações citogenéticas anteriores, sendo os dados aqui apresentados inéditos.

Os dados cariotípicos e de tamanho de genoma obtidos estão apresentados na Tabela 2. As Figuras 3 e 4 mostram as metáfases mitóticas das espécies analisadas e os respectivos idiogramas estão ilustrados nas Figuras 5 e 6. As análises mostram que ambas as espécies possuem o número básico da tribo $x = 7$, sendo *C. formosa* diploide ($2n = 14$) e *C. xantomelas* tetraploide ($2n = 28$).

Cipura formosa apresenta cromossomos de médios a grandes (Figuras 3 e 5) tendo o menor cromossomo $2,87 \mu\text{m}$ e o maior $7,79 \mu\text{m}$ com a razão entre eles de $2,71 \mu\text{m}$. O comprimento cromossômico total é de $66,20 \mu\text{m}$ (Tabela 2). A fórmula cariotípica para essa espécie é $8M + 6SM$, com dois satélites localizados no par 4. O par satelitado exibe um moderado heteromorfismo quanto ao tamanho dos cromossomos e quanto à posição do centrômero, sendo um metacêntrico e o outro submetacêntrico. Foi ainda observado heteromorfismo nos pares 1 e 3, sendo bastante pronunciado no par 1. A diferença no tamanho dos cromossomos evidencia a assimetria cariotípica da espécie. O índice de assimetria intercromossômica foi $A_2 = 0,32$. Foi classificada na categoria 2B de Stebbins (Tabela 2).

Estimativas de conteúdo de DNA através de citometria de fluxo mostram que *C. formosa* possui $2C = 7,15\text{pg}$, com o tamanho monoploide de $Cx = 3,57$ (Tabela 2).

Com relação à espécie *Cipura xantomelas*, pretendia-se averiguar possíveis diferenças cariotípicas entre os morfotipos “antera amarela” e “antera preta”. Ambos os morfotipos apresentaram cariótipo tetraploide com $2n = 28$. Contudo, a dificuldade na obtenção de cromossomos com espalhamento adequado e com igual condensação da cromatina (Figura 7) inviabilizou a realização das medidas cariotípicas do morfotipo “antera preta”. Embora para o morfotipo “amarelo” também tenham sido encontradas

as mesmas dificuldades (Figura 7), foi possível a obtenção de placas metafásicas de ótima qualidade.

A análise cariotípica do morfotipo “antera amarela” de *C. xanthomelas* evidencia que essa espécie possui os cromossomos maiores do que *C. formosa*, com o menor e maior cromossomos medindo respectivamente 3,72 e 8,73 μm . Porém, a razão entre o maior e o menor cromossomo do complemento é de 2,34 μm , mostrando que tal diferença é menos pronunciada do que em *C. formosa*. O comprimento total foi de 156,78 μm . A fórmula cariotípica para *C. xanthomelas* é 12M + 16SM, mostrando claramente a presença de quatro satélites (Pares 6 e 10; Figuras 4 e 6). Heteromorfismo cromossômico foi evidenciado nos Pares 1, 3, 8 e 9.

Assim como *C. formosa*, essa espécie apresenta uma clara assimetria cariotípica. O índice de assimetria intercromossômica foi $A_2=0.30$, sendo incluída na categoria 3B de Stebbins.

Cipura xanthomelas possui um conteúdo de DNA 2C de 7,15 pg, com o tamanho monoploide de $C_x= 3,57$ pg (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros cariotípicos de espécies de *Cipura*: número cromossômico somático (2n) e nível de ploidia, fórmula cariotípica (FC), número de cromossomos com satélite, variação entre o tamanho do menor e do maior cromossomo do cariótipo (Var), razão entre os cromossomos maior e menor (L/S), índice de assimetria intercromossômica (A2), categoria de assimetria de Stebbins (Steb), comprimento cromossômico total (CCT), quantidade de DNA em picogramas (2C), tamanho monoploide do genoma (Cx) e coeficiente de variação para análises de citometria (CV).

Espécies	2n	FC	Nº sat	Var (µm)	L/S	A2	Steb	CCT (µm)	2C (pg)	Cx (pg)	CV
<i>C. formosa</i>	2n=2x=14	8M + 6SM	2	2,87 - 7,79	2,71	0,32	2B	66,20	7,15	3,57	3,20
<i>C. xanthomelas</i>	2n=2x=28	12M + 16SM	4	3,72 - 8,73	2,34	0,30	3B	156,78	12,74	3,18	4,55

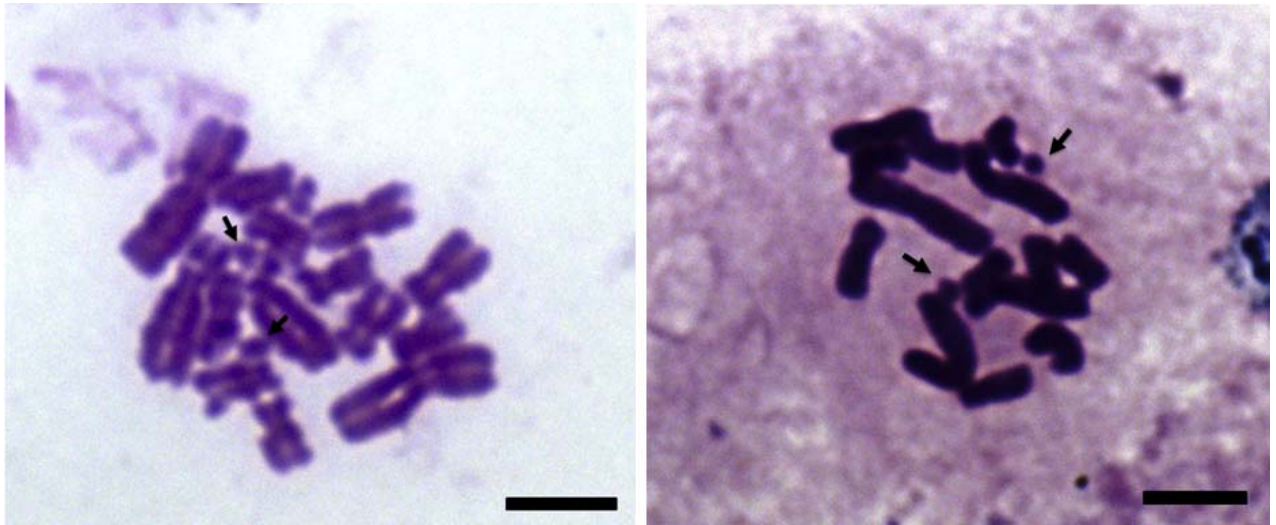


Figura 3. Células metafásicas de *Cipura formosa* - $2x=2n=14$. Setas indicando os satélites. Escala $5\mu\text{m}$.

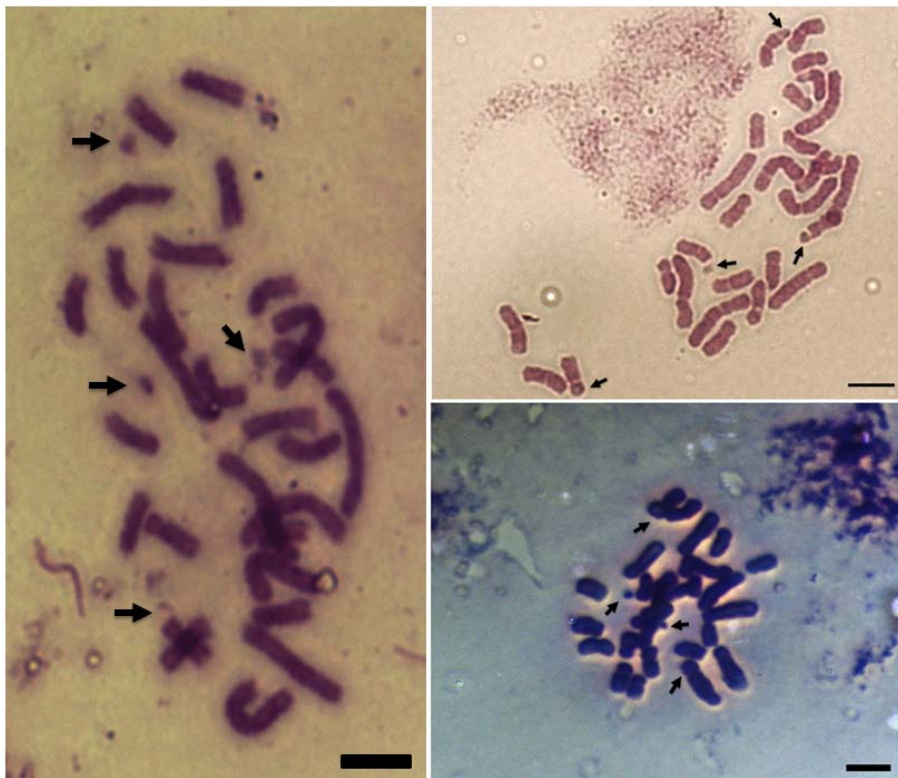


Figura 4. Células metafásicas *Cipura xanthomelas* - $2n=4x=28$. Setas indicando os satélites. Escala $5\mu\text{m}$.

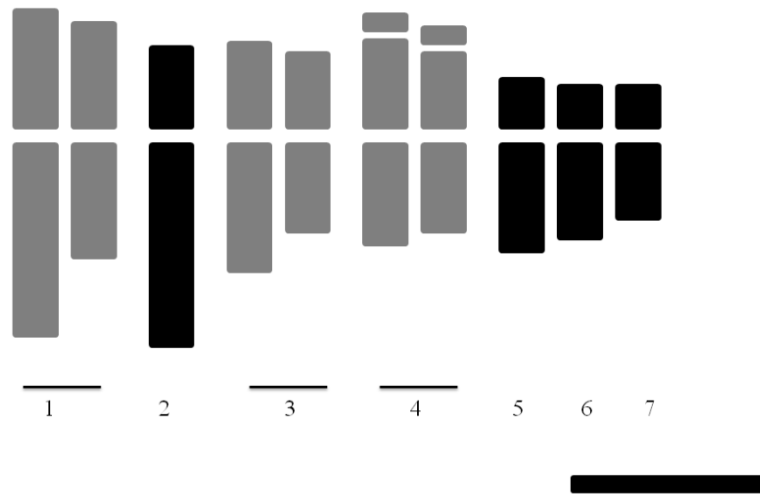


Figura 5. Idiograma de *Cipura formosa* - Pares 1, 3 e 4 heteromórficos. Escala 5 μ m.

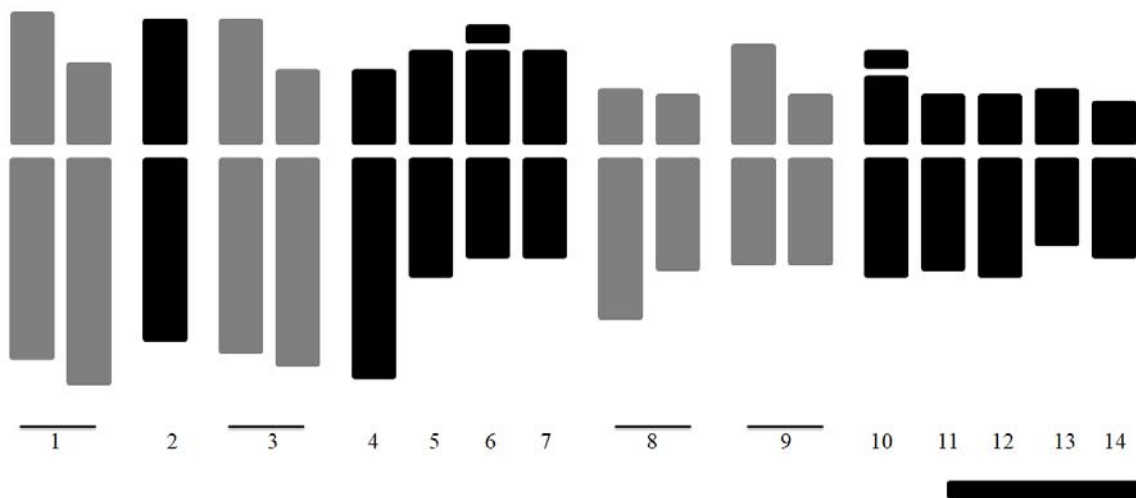


Figura 6. Idiograma de *Cipura xanthomelas* - Pares 1, 3, 8 e 9 heteromórficos. Escala 5 μ m.

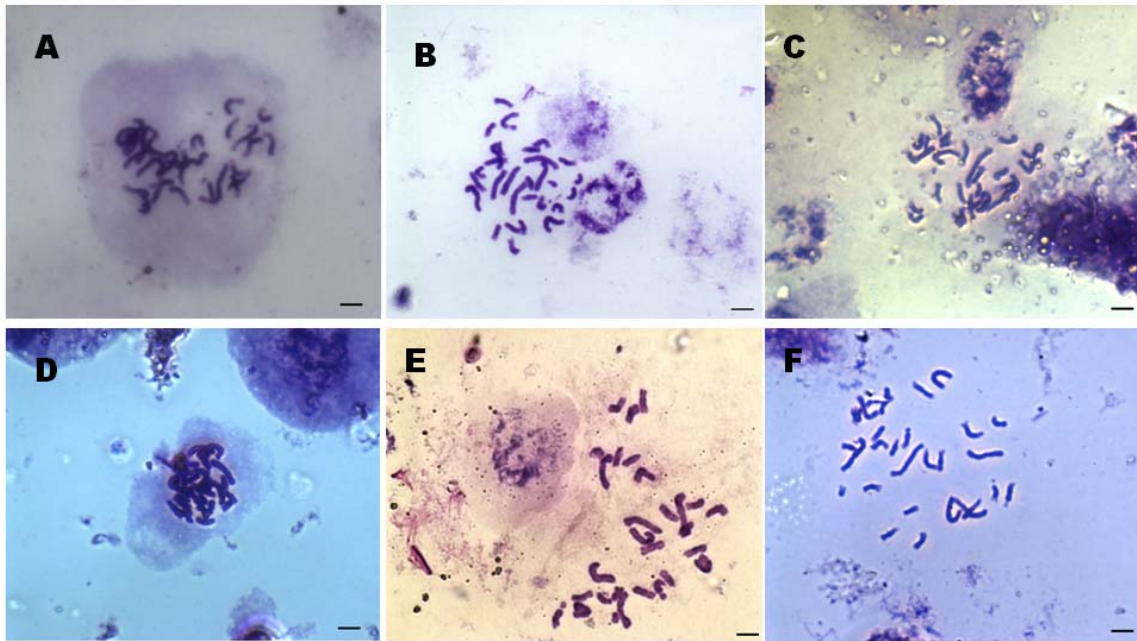


Figura 7. **A** - *Cipura xanthomelas* morfotipo “antera preta” ($2n= 4x= 28$) com os cromossomos descondensados. **B, C, E e F** – *C. xanthomelas* de antera amarela ($2n= 4x= 28$) com difícil visualização do centrômero e com cromossomos descondensados; **D** - *C. xanthomelas* “antera amarela” com cromossomos não espalhados. Escala de $5\mu\text{m}$.

DISCUSSÃO

Cipura é um pequeno gênero constituído por oito a nove espécies distribuídas do centro do México ao Sudeste do Brasil (Celis *et al.*, 2003). Como mencionado anteriormente, há dados citogenéticos disponíveis para apenas quatro de suas espécies. Com relação às duas espécies analisadas no presente estudo, há dados citológicos publicados apenas para *C. xanthomelas*, contudo tais informações são referentes a populações coletadas no Nordeste do Brasil (Alves *et al.*, 2011). Para *C. formosa* não há análises anteriores reportadas na literatura.

As espécies investigadas nesse estudo, assim como as demais do gênero, apresentaram número cromossômico básico $x = 7$ (Goldblatt, 1982; Goldblatt & Takei, 1993; Alves *et al.*, 2011). Para a tribo Tigridae esse é considerado o número ancestral, sendo altamente conservado entre seus gêneros (Goldblatt & Manning, 2008; Moraes *et al.*, 2015).

Para o clado A de Tigridae é frequente a ocorrência de series poliploides intraespecíficas como em *Herbertia lahue* (Molina) Goldblatt ($2x$, $4x$, $6x$, e $8x$). Dentro de *Cipura*, a maior parte das espécies estudadas até o momento apresenta apenas um nível de ploidia; somente em *C. paludosa* foram observados dois citótipos ($2n = 14$, 28 ; Goldblatt, 1982). Os níveis de ploidia descritos para o gênero são diploide e tetraploide, não havendo ploidias elevadas.

Quanto às espécies aqui investigadas foi encontrado o nível diploide para *C. formosa* ($2n = 14$) e tetraploide para *C. xanthomelas* ($2n = 28$), não sendo observada a existência de citótipos intraespecíficos como relatado para o clado.

Assimetria cariotípica e bimodalidade têm sido amplamente observadas em espécies dos gêneros *Alophia* Herb., *Calydorea*, *Cipura* e *Eleutherine* (Guerra, 1988; Alencar, 2012; Alves *et al.*, 2011). Segundo Goldblatt (1982) tais variações cariotípicas se devem principalmente a eventos de translocação e inversão.

A avaliação da simetria permite inferências quanto à evolução cromossômica, especialmente em grupos taxonômicos onde há ocorrência de rearranjos cromossômicos. A bimodalidade ocorre em muitas plantas sendo considerada uma forma cariotípica altamente especializada e derivada, podendo ser utilizada para caracterizar grupos de gêneros ou espécies (Moreno *et al.*, 2009; Kenton *et al.*, 1990; Goldblatt & Takei, 1997).

Cipura formosa apresenta um cariótipo assimétrico com dois pares maiores de cromossomos e os demais pares visivelmente menores; o padrão bimodal com dois pares longos mais cinco pares curtos é considerado também um caráter conservado que reforça a monofiletismo da tribo (Goldblatt, 1982; Moraes *et al.*, 2015). O cariótipo dessa espécie apresenta apenas cromossomos meta e submetacêntricos (8M + 6SM). Para populações de *Cipura paludosa* do Nordeste, espécie também diploide, são encontrados oito acrocêntricos, além dos quatro meta e dois submetacêntricos (Alves *et al.*, 2011) evidenciando uma clara diferenciação cariotípica entre essas duas espécies.

A assimetria em *C. formosa* pode ser claramente constatada pela diferença de tamanho entre os pares maior e o menor (7,79 e 2,87, respectivamente), sendo esse último quase três vezes menor ($L/S = 2,71$). O índice de assimetria intercromossomal ($A_2 = 0,32$) confirma a bimodalidade cariotípica e a classificação de Stebbins (Steb = 2A) evidencia ainda uma assimetria quanto à morfologia cromossômica (posição do centrômero).

Quanto à *C. xanthomelas*, foi encontrado para ambas as populações e para ambos os morfotipos o mesmo número cromossômico já reportado por Alves *et al.* (2011) em espécimes coletados no Piauí ($2n = 28$). Embora tenham sido observadas diferenças marcantes quanto alguns aspectos morfológicos nas plantas coletadas no Cerrado, como a coloração das anteras (amarelas X pretas), tais variantes não refletem alterações quanto ao número cromossômico.

Por outro lado, a análise da arquitetura cariotípica, traz diferenças substanciais quanto à fórmula cariotípica das populações das duas regiões. No presente estudo, foram observados apenas cromossomos meta e submetacêntricos (12M + 16SM),

enquanto Alves *et al.* (2011) reportam 10M + 8SM + 10A. Tal discrepância possivelmente se deve a artefatos da técnica, como grau de condensação dos cromossomos. Um indício de que essa seja uma explicação plausível para nossos dados é a confirmação da presença das constrições secundárias e dos satélites. Enquanto naquele trabalho os autores mencionam não terem visualizado satélites, as metáfases da Figura 4 mostram claramente a ocorrência de quatro satélites (Pares 6 e 10 – Figura 6). Da mesma forma, Alencar *et al.*, (no prelo) encontraram resultados para *Calydorea crocoides* Ravenna quanto à morfologia cromossômica que discordam daqueles reportados por Moraes *et al.* (2015), tendo esse segundo estudo encontrado além de metacêntricos e submetacêntricos, um par telocêntrico.

Cipura xanthomelas segue o padrão assimétrico e bimodal do gênero com quatro pares grandes e 10 menores, também observado nas populações do Nordeste (Alves *et al.*, 2011). Embora ambos os estudos confirmem a assimetria nessa espécie, os índices estimados diferem. No presente estudo os índices foram $A_2 = 0,30$ e $Steb = 3B$, e no artigo referido, $A_2 = 0,55$ e $Steb = 3C$. Possivelmente, tais diferenças sejam resultantes dos diferentes programas de análise cariotípica empregados em cada estudo e também ao grau de condensação cromossômica, como já mencionado anteriormente.

As espécies de *Cipura* possuem cromossomos de tamanho médio a grande. Avaliando as duas espécies comparativamente, pode ser verificado que *C. formosa* apresenta cromossomos menores (2,87 – 7,79 μm) do que *C. xanthomelas* (3,72- 8,73 μm). Por outro lado, *C. formosa* possui um cariótipo ligeiramente mais assimétrico ($L/S = 2,71$ e $A_2 = 0,32$) do que *C. xanthomelas* ($L/S = 2,34$ e $A_2 = 0,30$). A análise cariotípica de *C. xanthomelas* para as populações do Nordeste reporta tamanhos cromossômicos menores, variando de 2,64 – 6,02 μm ; porém o L/S foi semelhante ao encontrado no presente estudo (2,28). Muito provavelmente as diferenças se devem apenas a questões metodológicas. Alves *et al.* (2011) verificaram para a espécie *C. paludosa* uma maior variação no tamanho dos cromossomos (2,21 – 9,48 μm) e conseqüentemente, uma bimodalidade mais pronunciada ($L/S = 4,24$ e $A_2 = 4,28$) do que as espécies aqui analisadas. Narayan & Durrant (1983) sugerem que genomas maiores tendem a estar correlacionados com cariótipos mais simétricos. Considerando

os dados disponíveis para *Cipura* acima relatados, a espécie tetraploide *C. xanthomelas* apresenta o cariótipo ligeiramente mais simétrico do que as duas espécies diploides *C. formosa* e *C. paludosa*. O mesmo pode ser observado nos resultados de Alves *et al.* (2011).

O gênero *Cipura*, assim como os demais gêneros da tribo Tigridaeae, exibe uma pronunciada assimetria diferentemente das outras duas tribos da subfamília Iridoideae, Trimezieae e Sisyrinchieae (Alves *et al.*, 2011; Moraes *et al.*, 2015). Segundo Stebbins (1971) existe uma tendência de espécies com cariótipos mais simétricos serem mais ancestrais e aquelas com maior assimetria serem mais derivadas. As filogenias da família Iridaceae e da subfamília Iridoideae (Goldblatt *et al.*, 2008; Chauveau *et al.*, 2012) baseadas em marcadores moleculares corroboram tais dados cariotípicos, sendo Tigridaeae mais derivada que as duas outras tribos .

Em ambas as espécies analisadas foi observado heteromorfismo quanto ao tamanho ou à morfologia dos cromossomos. Em *Cipura formosa* foi observado três pares heteromórficos (1, 3 e 4) enquanto *C. xanthomelas* apresentou quatro pares (1, 3, 8 e 9) (Figuras 5 e 6). Em *C. paludosa* foi encontrado heteromorfismo para dois pares (1 e 2) em todas as populações analisadas, sugerindo translocações recíprocas (Alves *et al.*, 2011).

A ocorrência de heteromorfismo cromossômico é frequentemente relatada na família Iridaceae, especialmente nesta tribo, com registros anteriores para *Eleutherine bulbosa* (Mill) Urb., *Gelasine elongata* (R. Graham) Ravenna, *Calydorea crocoides* e *Cipura paludosa* (Kenton & Rudal, 1987; Guerra, 1988, 1991; Alves *et al.*, 2011; Alencar *et al.*, no prelo). Tais heteromorfismos normalmente são resultantes de inversões seguidas de duplicação em tandem ou de translocações. A confirmação da condição heteromórfica de todos os pares observados, bem como a compreensão de sua origem requer análises cariotípicas envolvendo um maior tamanho amostral, o uso de coloração diferencial e também uma avaliação do comportamento meiótico.

Os dados referentes ao comprimento cromossômico total (CCT) e à quantidade de DNA (valor 2C) refletem o esperado para as duas espécies investigadas considerando

seus níveis de ploidia. *Cipura formosa* (diploide) tem menor tamanho de genoma que a tetraploide *Cipura xanthomelas* (CCT = 66,20 μm e 2C= 7,15pg; CCT = 156,78 μm ; 2C=12,74 pg, respectivamente).

Estimativas de conteúdo de DNA para *Cipura* se restringem ao trabalho de Goldblatt *et al.* (1984) com *C. paludosa* cujo valor 2C foi de 16,9 pg. Analisando comparativamente essa informação e aquelas obtidas para *C. formosa* e para *C. xanthomelas*, esse valor é maior do que o esperado. *Cipura paludosa* é diploide e tem um CCT de 67,81 μm ; *C. formosa* semelhantemente é diploide e tem um CCT de 66,20 μm , contudo seu tamanho de genoma é de apenas 7,15 pg nessa última. Mesmo a tetraploide *C. xanthomelas* teve um conteúdo de DNA de 12,74 pg. A aparente contradição é muito provavelmente resultado da metodologia empregada, que no trabalho com *C. paludosa* foi por citofotometria (microdensitometria) enquanto nossas análises foram por citometria de fluxo. A microdensitometria é uma técnica praticamente em desuso nos dias atuais devido à baixa confiabilidade.

Considerando o tamanho monoploide do genoma (Cx), *C. formosa* possui maior quantidade de DNA (3,57 μm) do que *C. xanthomelas* (3,18 μm). Esses dados indicam uma ligeira redução do genoma diploide para o tetraploide, sugerindo o fenômeno conhecido como “Genome Downsizing”, o qual já foi amplamente reportado para diferentes taxa com representantes poliploides. A poliploidia via auto ou aloploidia pode levar à reorganização do genoma através de rearranjos que levam à redução no conteúdo de DNA (Leitch & Bennett 2004; Parisod *et al.*, 2010). Tacuatiá *et al.* (2016) reportaram “genome downsizing” em Iridaceae para a espécie *Sisyrinchium micranthum* Cav., na qual existe uma série poliploide (2x, 4x e 6x); os autores descreveram não só a diminuição no tamanho do genoma dos poliploides como também uma redução no número de bandas heterocromáticas e de sítios de DNAr.

CONCLUSÃO

Os resultados sobre caracterização cromossômica obtidos neste trabalho são os primeiros reportados para as espécies de *Cipura* do Cerrado no estado de Goiás. Os estudos citogenéticos anteriores para *C. xanthomelas* são relativos a populações do Nordeste.

Para *C. formosa* os dados obtidos são inéditos, sendo esse o primeiro trabalho descrevendo o número cromossômico e o cariótipo para essa espécie.

Cipura formosa é diploide com $2n = 14$ e *C. xanthomelas* tetraploide ($2n = 28$), portanto ambas com o número básico $x=7$.

As medições dos cromossomos constaram que ambas as espécies possuem cromossomos de médio a grandes, sendo, porém maiores em *Cipura xanthomelas*.

A assimetria cariotípica está presente nas duas espécies, seguindo o padrão bimodal do clado A de Tidridieae.

O heteromorfismo também foi relatado aqui para diversos pares cromossômicos nas duas espécies. Em *C. formosa*, o par de satelitado é heteromórfico.

A quantidade de DNA para cada uma das espécies aumenta de acordo com o nível de ploidia; contudo, considerando o tamanho monoploide do genoma observa-se uma redução para a espécie poliploide *C. xanthomelas* sugerindo *genome downsizing*.

A comparação dos dados cariotípicos de *C. xanthomelas* de populações do Cerrado com àquelas do Nordeste investigadas por Alves *et al.* (2011) mostra uma constância no padrão geral, sendo ambos assimétricos. Pequenas diferenças observadas possivelmente se devam a questões metodológicas.

As diferenças fenotípicas observadas entre os morfotipos “antera amarela” e “antera preta” de *C. xanthomelas* não refletem diferenças quanto ao número cromossômico ou cariótipo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, L.I.F. Citogenética de Espécies de Iridaceae Ocorrentes no Nordeste do Brasil. 2008. 106 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade Federal da Paraíba Centro de Ciências Agrárias, Areia, 2008.
- ALENCAR, JULIANA L. M.; KALTCHUK-SANTOS, ELIANE; FACHINETTO, JULIANA ; TACUATIÁ, LUANA OLINDA ; FORNI-MARTINS, E. R.; ALVES, EUDES M. S.; SOUZA-CHIES, T. T. Genetic and ecological niche modeling of *Calydorea crocoides* (Iridaceae): an endemic species of Subtropical Highland Grasslands. GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY (no prelo)
- ALVES, L.I.F.; LIMA,S. A. A.; FELIX, P. L. Chromosome characterization and variability in some Iridaceae from Northeastern Brazil. Genet Mol Biol, v. 34, p. 259-267, 2011.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group) III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Bot J Linn Soc 161:105-121, 2009.
- BENNETT, M. D. and Leitch, I.J. Plant DNA C-values database. Kew: Royal Botanic Gardens. Available at: [http:// data.kew.org/cvalues/](http://data.kew.org/cvalues/). Accessed 1 April 2014, 2012.
- CAPELLARI JR, L. Iridaceae da planície litorânea de Picinguaba. Ubatuba, São Paulo, Brasil. Hoehnea. 32(2): 207-213, 2005.
- CELIS, M.; GOLDBLAT, P. & BETANCUR, J. A New Species of *Cipura* (Iridaceae) from Colombia and Venezuela. Novon, 13(4), 419–422, 2003.
- CHIES, T. T. S.; BURCHARDT, P.; ALVES, E. M. S.; ESSI, L. and SANTOS, E. K. O estudo da biodiversidade e evolução vegetal através de marcadores de DNA e citogenética: exemplos em Iridaceae e Poaceae. Ciência e Natura 36: 279- 293, 2014.

- CHAUVEAU, O.; EGGERS, L.; SOUZA-CHIES, T. T. and NADOT, S. Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera. *Ann Botany* 110:713-729, 2012.
- DANTAS-QUEIROZ, M. V.; COELHO, N.; GOMES-KLEIN, V. L. Iridaceae from Serra dos Pireneus. Goiás, Brazil. *Check List*, v. 12(3), p. 1902, 2016.
- DOLEZEL, J.; BINAROVA, P.; LUCRETTI, S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biol Plantarum* 31:113-112. 1989
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A* 51:127–128. 2003
- EGGERS, L. A família Iridaceae no Parque Estadual de Itapuã Viamão. Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Biol*, v. 6, p. 167-175, 2008.
- EGGERS, L.; CHUKR, N.S.; LOVO, J.; GIL, A.S.B. Iridaceae in Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Accessed at <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB136>, 28 March 2016.
- FOCCHIZATTO, J. Caracterização citogenética e molecular de três espécies de *Gelasine* (Iridaceae) ocorrentes no sul do Brasil: *Gelasine elongata*, *G. coerulea* e *G. uruguayensis*. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, 2015.
- GIL, A.S.B.; DAMASCENO, R.G.L. *Cipura* in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB30043>>. Acesso em: 04 Jan. 2018.
- GOLDBLATT, P. Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of Neotropical Iridaceae. *Syst Bot*, v. 7, p. 186-198, 1982
- GOLDBLATT, P. Phylogeny and classification of Iridaceae. *Ann Mo Bot Gard*, v. 77, p. 607-627, 1990.

- GOLDBLATT, P.; JOHNSON, D. E. Index to plant chromosome numbers 1986-1987. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. 30: 1–243, 1990.
- GOLDBLATT, P.; MANNING, J. C. and RUDALL, P. Iridaceae. In: Kubitzki K (ed) The families and genera of vascular plants. Springer, Berlin, pp 295-314, 1998.
- GOLDBLATT, P. and MANNING, J. C. The Iris Family: natural history and classification. Timber Press, Portland, 290 pp, 2008.
- GOLDBLATT, P.; TAKEI, M. Chromosome cytology of Iridaceae – patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. Ann Mo Bot Gard , v. 84, p. 285–304, 1997.
- GOLDBLATT, P.; RODRIGUEZ, A.; POWELL, M.P.; JONATHAN DAVIES, T.; MANNING, J.C.; VAN DER BANK, M.; SAVOLAINEN, V. Iridaceae ‘Out of Australasia?’ Phylogeny, Biogeography, and Divergence Time Based on Plastid DNA sequences. Systematic Botany, v. 33(3), p. 495-508, 2008.
- GOLDBLATT, P.; WALBOT, V.; ZIMMER, E. A. Estimation of genome size (C-value) in Iridaceae by cytophotometry. Ann. Missouri Bot. Gard. 71:176-180, 1984.
- GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; LYSÁK, M. A. and BENNETT, M. D. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms ‘genome size’ and ‘C-value’ to describe nuclear DNA contents. Ann Bot 95:255–260, 2005.
- GUERRA, M. Introdução a Citogenética Geral. In: Guerra M. (eds.) Heterocromatina e Bandeamento Cromossômico. Guanabara, Rio de Janeiro, pp. 24-35, 1988.
- GUERRA, M. Cis-acting regulation of the NOR cistrons in *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). Gênica 83:235–241, 1991.
- GUERRA, M. Chromosome number variation and evolution in Monocots. Pp. 127-136. In: K. L. Wilson & D. A. Morrison (Eds.). Monocots: systematics and evolution. CSIRO, Melbourne, 2000.

- GUERRA, M.; SOUZA, M.J. Como Observar Cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana. 1º Edição. São Paulo, FUNPEC, p. 131, 2002.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. Plant systematics: a phylogenetic approach. Massachusetts: Sinauer Associates, p. 464, 2007.
- KENTON, A. and RUDALL, P. An unusual case of complex-heterozygosity in *Gelasine azurea* (Iridaceae), and ITS implications for reproductive biology. *Evol Trends Plants* 1:95-103, 1987.
- KENTON, A.; DICKIE, J. B.; LANGTON, D.H.; BENNETT, M. D. Nuclear DNA amount and karyotype symmetry in *Cypella* and *Hesperoxiphion* (Tigridieae: Iridaceae). *Evolutionary Trends in Plants*, v. 4, p. 59-69, 1990.
- KLINK, C. A. and MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. *Conservation Biology* 19(3): 707–713. doi: 10.1111/j. 1523-1739.2005.00702.x, 2005.
- LEITCH IJ, BENNETT MD. Genome downsizing in polyploid plants. *Biol J Linn Soc Lond* 82: 651–663, 2004.
- MORAES, A. P.; SOUZA-CHIES, T. T.; STIEHL-ALVES, E. M.; BURCHARDT, P.; EGGERS, L.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BROWN, S. C.; CHAUVEAU, O. NADOT, S.; BOURGE, M.; VICCINI, L. F.; KALTCHUK-SANTO, E. Evolutionary trends in Iridaceae: new cytogenetic findings from the New World. *Bot J Linn So*, v. 177, p. 27–49, 2015.
- MORENO N, PEÑAS ML, BERNARDELLO G and ROITMAN G. Cytogenetic studies in *Herbertia* Sw. (Iridaceae). *Caryologia* 62:37-42, 2009.
- NARAYAN, R. K. J.; DURRANT, A. DNA distribution in chromosomes of *Lathyrus* species. *Genetica* 61:47-53, 1983.

- PARISOD, C.; HOLDEREGGER, R.; BROCHMANN, C. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytol* 186: 5–17, 2010.
- PEDROSA, A.; GITAÍ, J.; SILVA, A. E. B.; FELIX, L. P.; Guerra, M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco – V. *Acta Bot. Bras.* 13: 49-60, 1999.
- REEVES, G., CHASE, M. K., GOLDBLATT, P., RUALL, P., FAY, M. F., COX, A. V., LEJEUNE, B., SOUZA-CHIES, T. Molecular Systematics of Iridaceae: Evidence from four plastid DNA regions. *Amer. J. Bot.* 88:2074-2087, 2001.
- ROCHA, G.F.; FERREIRA, L.G.; FERREIRA, N.C. and FERREIRA, M.E. Detecção de desmatamentos no bioma cerrado entre 2002 e 2009: padrões, tendências e impactos. *Revista Brasileira de Cartografia* 63(3): 341–349. <http://www.lsie.unb.br/rbc/index.php/rbc/article/view/385>, 2011.
- RODRIGUEZ, A. and SYTSMA, K. J. Phylogenetics of the “tiger-flower” group (Tigridieae, Iridaceae): molecular and morphological evidence. *Aliso* 22:412-424, 2006.
- ROMERO- ZARCO C. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35:526-530,1986.
- SOUZA-CHIES, T. T.; BITTAR, G. NADOT, S. *et al.* Phylogenetic analysis of Iridaceae with parsimony and distance methods using the plastid gene rps4. *Plant Systematics and Evolution* 204: 109–123, 1997.
- SOUZA-CHIES, T. T.; SANTOS, E.K.; EGGERS, L.; FLORES, A. M.; STIEHLALVES, E. M.; FACHINETO, J.; LUSTOSA, J.; CORRÊA, L. B.; TACUATIÁ, L. O.; PICCOLI, P.; MIZI, R. Studies on diversity and evolution of Iridaceae species in southern Brazil. *Genet Mol Biol*, v. 35, p. 1027-1035, 2012.
- STEBBINS, G. L. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Edward Arnold, London, 1971.
- TACUATIÁ, LUANA OLINDA; KALTCHUK-SANTOS, ELIANE; SOUZA-CHIES, TATIANA T.; EGGERS, LILIAN; FORNI-MARTINS, E. R.; PUSTAHIJA, F.;

ROBIN, O.; SILJAK-YAKOVLEV, SONJA. Physical mapping of 35S rRNA genes and genome size variation in polyploid series of *Sisyrinchium micranthum* and *S. rosulatum* (Iridaceae: Iridoideae). *Plant Biosystems* (Firenze. Testo Stampato), v. xx, p. 1-31, 2016.

ZONNEVELD, B. J. M.; LEITCH, I. J. and BENNETT, M. D. First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. *Ann Bot* 96:229–244, 2005.