

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

**Recursos florais, Filogenia e Evolução no Clado A de
Tigridieae (Iridoideae: Iridaceae)**

Dissertação de Mestrado

Tamara Pastori

Porto Alegre, março de 2014.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

Recursos florais, Filogenia e Evolução no Clado A de Tigridaeae (Iridoideae: Iridaceae)

Tamara Pastori

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Botânica.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Tatiana Teixeira de Souza-Chies

Coorientador: Dr. Olivier Chauveau

Porto Alegre, março de 2014.

“Lutam melhor os que têm belos sonhos”

Che Guevara.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer do fundo do meu coração três pessoas maravilhosas, sem as quais esse trabalho não seria possível:

À minha querida orientadora Dr. Tatiana Teixeira de Souza-Chies que me aceitou como sua mestranda e apostou suas fichas em mim. Durante dois anos de convivência foi mais que uma orientadora, uma grande amiga, oferecendo apoio e conselhos além de todos os seus ensinamentos.

Ao meu coorientador Dr. Olivier Chauveau, uma pessoa admirável. Obrigada por investir tanto o seu tempo, sua dedicação e paciência em mim, serei eternamente grata por tudo. Admiro muito o seu trabalho e sua visão de cientista que considero.

À minha querida colaboradora e futura orientadora de Doutorado Dra. Lilian Eggers, que com toda a sua paixão pelas plantas me encantou e me motiva a seguir em frente diariamente. Obrigada por me apresentar as Iridáceas e pela sua amizade, companheirismo e seus conselhos. Admiro muito seu trabalho e a pessoa maravilhosa que és.

Obrigada, tenho muito orgulho de ter sido orientada e por conviver diariamente com vocês.

Agradeço a minha inspiradora, minha mãe por tudo que fez por mim e todo o apoio que ofereceu, mesmo que muitas vezes nem imaginava o que eu estava falando ou sentindo, ela sempre me amou incondicionalmente e sempre teve orgulho de mim. Obrigada pelo carinho, pelas orações, pela fé. Agradeço a minha família toda, meu pai Adriano Pastori, meus irmãos Mateus Pastori e Erick Pastori por tornarem minha vida mais feliz. Amo muito vocês. Essa conquista é dedicada a vocês.

Aos meus amigos que tornaram essa jornada mais divertida, Joana Fochezatto, Jaqueline Durigon, Priscila P.A. Ferreira, Márcio Verdi, Cassiano Welker, Larissa T. Pereira, Juliano Baltazar, Lisa Soenh, Camila Inácio, Adriana Aita, Eudes S.Alves, Paula Burchardt, Juliana Heck, Daniela Grandi, Cristiane Forgiarini, Eduardo Pasini, Camila Carneiro, Cássia Plá Batista, Marcelo Malyz,

Ronaldo dos Santos Júnior, Rodrigo Leonel Orihuela, Marlon G. Facco, João Iganci, Luisa Deragon Garcia, Cristine Horn e Guilherme Rucks. Obrigada pelos conselhos, risadas e também pelos incontáveis almoços divertidos. Adoro muito todos vocês.

Agradeço em ao amigo Eduardo Pasini pelo apoio com a redação do inglês.

Agradeço aos colegas do PPG-Botânica e aos colegas do laboratório de Anatomia Vegetal pelo apoio técnico: Natividade Fagundes, Juca Martin, Daniel Ayub, Sofia Kuhn, Fernanda Nogueira, Marcos Gaeta e Adriano Silvério.

Ao Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas e ao Laboratório de Anatomia Vegetal por todo o suporte para a realização dos experimentos.

Aos professores do PPG – Botânica da UFRGS pelos ensinamentos e pela convivência. Em especial: a Professora Alexandra Mastroberti, por todo o suporte como anatomista; a Professora Hilda Wagner, por distribuir sua paixão pela Botânica; ao Professor Jorge E. Mariath pela possibilidade de utilização do laboratório e pelo suporte técnico e teórico. Obrigada professora Eliane Kalthuck pelos momentos de discussão de artigos.

Agradeço funcionários por toda a ajuda, principalmente a Juliana Troleis pela paciência com as técnicas de anatomia. À Gabriele por todas as risadas e toda a companhia. Aos funcionários da secretaria do PPG-Botânica, Milene e Vitor e à Secretaria do Instituto de Biociências e ao Instituto de Biociências.

Agradeço à Bolsa PROTAX/CAPES/CNPQ.

Ao PPG- Botânica da UFRGS.

Agradeço a Prefeitura de Carlos Barbosa, pela ajuda de custo com as passagens intermunicipais que tornou possível a realização do mestrado.

Enfim, muito obrigada a todos aqueles que um dia acreditaram em mim e me incentivaram a seguir sempre em frente.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
SUMÁRIO	6
RESUMO	10
ABSTRACT	11
APRESENTAÇÃO	12
CAPÍTULO I	13
INTRODUÇÃO GERAL	14
1 - A família Iridaceae Juss.	15
Figura 1 - Árvore filogenética das subfamílias de Iridaceae.	16
Figura 2 - Árvore filogenética da subfamília Iridoideae, mostrando as cinco tribos. Adaptada de Goldblatt et al (2008).	17
Figura 3 - A) Representante da Tribo Sisyrinchieae: <i>Sisyrinchium scariosum</i> . B) Representante da Tribo Trimezieae: <i>Neomarica candida</i> . C-I) Representantes da Tribo Tigridieae: C) <i>Tigridia chiapensis</i> ; D) <i>Phalocallis coelestis</i> ; E) <i>Herbertia crosae</i> ; F) <i>Calydorea approximata</i> ; G) <i>Onira unguiculata</i> ; H) <i>Cypella aquatilis</i> ; I) <i>Kelissa brasiliensis</i> . (Fotos L. Eggers & O. Chauveau).	19
Figura 4 - Filogenia evidenciando a organização da tribo Tigridieae nos dois clados, A e B. (Chauveau <i>et al.</i> , 2012).	20
1.1 - O gênero <i>Cypella</i> Herb.	21
Figura 5 - Algumas espécies de <i>Cypella</i> encontradas no estado do Rio Grande do Sul. A) <i>Cypella herbertii</i> ; B) <i>Cypella aquatilis</i> ; C) <i>Cypella hauthalii</i> ssp. <i>opalina</i> ; D) <i>Cypella pusilla</i> ; Fotos L. Eggers & O. Chauveau.	22
2. Recursos florais aos polinizadores	23
2.1 Pólen	23
2.2 Néctar	24
2.3 Óleos florais	26
3. Evolução das recursos florais	27
Figura 6 - Filogenia publicada por Renner and Schaefer	30
OBJETIVOS	31
Objetivos específicos	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

Disregarded diversity of floral rewards in *Cypella* Herb. (Iridoideae: Tigridieae) reveals uncommon development of bimodal pollination strategy in Iridaceae? _____ 38

MATERIALS AND METHODS _____	42
Plant material _____	42
Microscopic analyses _____	42
Nectar analysis _____	43
Table 1: Study sampling, with the elaiophores and nectaries distribution, sources of plant material and voucher informations. _____	44
RESULTS _____	46
A) Elaiophores: distribution and morphological features _____	46
Figure 1: Region with presence/absence of elaiophores in the inner tepals: _____	47
Figure 2: State 1.1. Tepal not distinctly unguiculate. Inner tepal of <i>Cypella herbertii</i> . DP: Distal Part; PP: Proximal Part. _____	50
Figure 3: State 1.2. Tepal shortly unguiculate. Inner tepal of <i>Cypella aquatilis</i> . DP: Distal Part; PP: Proximal Part. _____	50
Figure 4: State 1.4. Tepal shortly unguiculate. Inner tepal of <i>Cypella discolor</i> . DP: Distal Part; PP: Proximal Part. _____	50
Figure 5: State 1.5. Tepal conspicuously unguiculate. _____	50
Figure 6 – Trichomes and elaiophores. _____	52
Tabel 2: Species analysed, tepals shape, and elaiophores shape, distribution and colour. _____	53
Figure 7: A) Flower of <i>Calydorea alba</i> Roitman & A. Castillo; _____	55
Figure 8: A) Flower of <i>Catila amabilis</i> Ravenna; _____	56
Figure 9: A) Flower of the <i>Kelissa brasiliensis</i> (Baker) Ravenna; _____	57
Figure 10: A) Flower of <i>Herbertia pulchella</i> Sweet; _____	58
Figure 12: A) Flower of <i>Cypella hauthalii</i> subsp. <i>Opalina</i> Ravenna; _____	60
Figure 14: A) Flower of <i>Cypella luteogibbosa</i> Deble; _____	62
Figure 15: A) Flower of <i>Cypella magnicristata</i> Deble; _____	63
Figure 16: A) Flower of <i>Cypella pabstiana</i> Ravenna; _____	64
Figure 17: A) Flower of <i>Cypella</i> sp. AITA 049; _____	65
Figure 18: A) Flower of <i>Cypella pusilla</i> (Link & Otto) Benth. & Hook. f. ex B.D. Jacks.; _____	66
Figure 19: A) Flower of <i>Cypella discolor</i> Ravenna; _____	67
Figure 20: A) Flower of <i>Onira unguiculata</i> (Baker) Ravenna; _____	68
B) Staminal nectaries _____	69
Figure 21: Staminal nectaries in <i>C. herbertii</i> (Lindl.) Herb. _____	71
Table 3: Measurements of nectar species of <i>Cypella</i> and <i>Onira</i> obtained by refractometer (%) and also using the glucotest ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$); _____	72
DISCUSSION _____	74
Perigonal elaiophores _____	75
Staminal Nectaries _____	76

LITERATURE CITED _____	78
CAPÍTULO III _____	82
Relações Filogenéticas do clado A da tribo Tigridieae (Iridoideae: Iridaceae): testando a monofilia do gênero <i>Cypella</i> Herb. _____	82
Relações filogenéticas e evolução dos recursos florais no clado A de Tigridieae (Iridoideae: Iridaceae): testando a monofilia do gênero <i>Cypella</i> Herb. _____	83
RESUMO _____	83
Phylogenetic relationships and evolution of floral rewards in clade A of Tigridieae (Iridoideae: Iridaceae): testing the monophyly of the genus <i>Cypella</i> Herb. _____	84
ABSTRACT _____	84
INTRODUÇÃO _____	85
MATERIAL E MÉTODOS _____	87
Amostragem _____	87
Extração, amplificação e sequenciamento de DNA _____	87
Análises Filogenéticas _____	88
Máxima Parcimônia _____	88
Máxima Verossimilhança _____	89
Inferência Bayesiana _____	89
Análise combinada de dados _____	89
Otimização dos caracteres morfológicos _____	90
Figura 1: Elaióforos de <i>Cypella herbertii</i> e <i>Herbertia zebrina</i> Deble. _____	91
RESULTADOS _____	92
Análise filogenética _____	92
Evolução de elaióforos e nectários _____	93
Figura 2: Análise de Máxima Parcimônia. _____	96
Figura 3: Melhor árvore obtida a partir da análise de Máxima Verossimilhança. _____	96
Figura 4: Melhor árvore obtida a partir da análise de Inferência Bayesiana _____	99
Figura 5: Melhor árvore obtida a partir da análise de Máxima Verossimilhança a partir do conjunto de dados combinados. _____	99
Figura 6: Árvores espelhadas ilustrando a otimização do estado ancestral do caráter Elaióforos Perigonais _____	102
Figura 7: Árvores espelhadas ilustrando a otimização do caráter Elaióforos Perigonais _____	102
DISCUSSÃO _____	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	109
APÊNDICE A _____	112
Tabela 1: Lista da amostragem utilizada, número do Voucher e Herbário e local de coleta. _____	113
Tabela 2: Condições de amplificação por PCR, padrão utilizado para as amplificações/tubo. _____	117

Tabela 3: Primers utilizados para as ampliações. _____	118
Tabela 4: Condições de amplificação do DNA por PCR: (1) desnaturação inicial, (2) número de ciclos, (3), desnaturação, anelamento e etapa de alongamento de cada ciclo e (4) etapa final de alongamento. A temperatura e a duração estão indicadas em cada etapa. _____	119
Tabela 5: Dados obtidos durante a Análise de Máxima Parcimônia, evidenciando o número total de caracteres de cada matriz, o número total de caracteres informativos e a porcentagem de caracteres informativos para cada marcador. _____	120
Tabela 6: Índices obtidos durante a análise de Máxima Parcimônia para cada marcador, sendo Índice de Consistência (IC), Índice de retenção (IR) e Índice de homoplasia (IH). _____	120
Tabela 7: Dados das sequências, partições das sequências e Modelos evolutivos utilizados para análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. _____	121
APÊNDICE B _____	122
Figura 1 – Mapa de distribuição geográfica do gênero <i>Cypella</i> na América do Sul. _____	123
Figura 2: Bacia Hidrográfica do Rio da Prata e seus afluentes. Possível centro de diversificação do gênero <i>Cypella</i> na América do Sul. (Programa: Arcgis versão 10.1). Mapa internet: http://global.britannica.com/EBchecked/topic/463804/Rio-de-la-Plata . _____	124
CAPÍTULO IV _____	125
CONSIDERAÇÕES FINAIS _____	125

RESUMO

Iridaceae é uma das poucas famílias de angiospermas que oferece três tipos de recursos aos polinizadores: pólen, néctar e os óleos florais. Iridaceae se destaca dentre as 11 famílias de angiospermas onde as glândulas secretoras de óleos florais (elaióforos) ocorrem. Os elaióforos evoluíram somente uma única vez ao longo da diversificação das angiospermas, com exceção de Orchidaceae e Iridaceae, onde ocorreram várias transições para a presença destas estruturas. Em Iridaceae, os elaióforos são observados unicamente nas espécies americanas da subfamília Iridoideae, com exceção da espécie sul-africana da subfamília Crocoideae, *Tritoniopsis parviflora*, que secreta óleos e néctar. Em relação à presença de elaióforos, a maioria das transições observadas em Iridoideae ocorre na tribo Tigridieae. Tigridieae é considerada taxonomicamente complexa em que os principais gêneros não são monofiléticos, e as relações filogenéticas dentro da tribo necessitam ser melhor esclarecidas. *Cypella* se destaca em Tigridieae por ser um dos maiores gêneros da tribo. Além disso, o registro de pelo menos uma espécie que oferece pólen, néctar e óleos florais torna essa estratégia única em Iridoideae. Este trabalho tem como objetivo caracterizar recursos florais oferecidos no clado A da tribo Tigridieae, com foco em *Cypella*, e estudar sua evolução em um contexto filogenético mais amplo. Observações estruturais e testes histoquímicos foram realizados para descrever recursos florais nos gêneros *Cypella*, *Kelissa*, *Calydorea*, *Catila*, *Onira* e *Herbertia*. Foram realizadas análises baseadas em cinco marcadores plastidiais (cpDNA) para investigar as relações filogenéticas. A filogenia molecular foi utilizada para inferir a história evolutiva de recursos florais em Tigridieae. Os resultados sugerem que duas grandes mudanças de sistemas de polinização ocorreram no clado A da tribo Tigridieae. Nectários estaminais e elaióforos perigonais evoluíram uma única vez na base do gênero *Cypella*, incluindo o gênero monotípico *Onira*. Espécies de *Herbertia* e *Kelissa* caracterizam-se pela perda da capacidade do tecido conjuntivo para produzir néctar, sendo elaióforos únicas estruturas presentes. Este estudo sugere que um sistema de polinização bimodal, ou seja, que combina características de dois sistemas de polinização evoluiu em *Cypella* e *Onira*. Este sistema de polinização é único entre as espécies de Iridaceae ocorrentes no continente

americano, o que pode ter desempenhado um papel fundamental na diversificação do gênero.

ABSTRACT

Iridaceae is one of the few families of angiosperms that offer nectar and floral oils to pollinators. Among the 11 families of angiosperms where glandular trichomes (elaiophores) secreting floral oils occur, stands out Iridaceae. The elaiophores evolved only once along the diversification of these families, except for Orchidaceae and Iridaceae, characterized by having multiple transitions for the presence of these structures. In Iridaceae, the elaiophores are observed exclusively in the American species of the subfamily Iridoideae, the only exception is a South African species of the subfamily Crocoideae, *Tritoniopsis parviflora*, which secretes oil and nectar. Concerning the presence of elaiophores, most transitions observed in Iridoideae occur in the tribe Tigridieae. Tigridieae is a taxonomically complex tribe in which the main genera are not monophyletic, and the phylogenetic relationships within the tribe need to be better clarified. *Cypella* stands out in Tigridieae because is one of the largest genera of the tribe and the only member of Iridoideae which provides pollen, nectar and floral oils. This study aims to characterize floral rewards offered in *Cypella* and related genera, in order to study their evolution in a larger phylogenetic context. Structural observations and histochemical tests were performed to describe floral rewards in the genera *Cypella*, *Kelissa*, *Calydorea*, *Catila*, *Onira* and *Herbertia*. Furthermore, analyzes based on five cpDNA markers were conducted to investigate the phylogenetic relationships. The molecular phylogeny was used to infer the evolutionary history of floral rewards in Tigridieae. The results suggest that two major changes occurred in pollination systems of Tigridieae. Staminal nectaries and perigonal elaiophores evolved once at the base of the genus *Cypella*, including the monotypic genera *Kelissa* and *Onira*. Furthermore, *Herbertia* was characterized by the loss of the ability of connective tissue to produce nectar. This study suggests a bimodal pollination system, a system that combines features of both pollination strategies evolved in *Cypella*. This pollination strategy is unique among species of Iridaceae occurring in the American continent, which could have played a major role in the diversification of the genus.

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação está organizada em quatro capítulos: o primeiro fornece uma introdução geral sobre a família Iridaceae, assuntos abordados na dissertação e os objetivos do trabalho. O segundo capítulo servirá como base para o artigo a ser submetido à revista *American Journal of Botany*, onde são descritas estruturas anatômicas de elaióforos e nectários presentes em espécies do gênero *Cypella* e gêneros relacionados como *Kelissa*, *Onira*, *Herbertia*, *Catila* e *Calydorea*. O terceiro capítulo trata da evolução dos recursos florais em *Cypella* inferidos a partir de evidências filogenéticas, também uma base para artigo a ser publicado na revista *Annals of Botany*. O quarto capítulo consiste das considerações finais desta dissertação.

CAPÍTULO I



INTRODUÇÃO GERAL

Foto: Eggers, L (2012)

INTRODUÇÃO GERAL

A compreensão dos mecanismos que conduzem a ampla diversidade biológica existente mundialmente é um dos maiores desafios dos cientistas. Entender quais são os fatores biológicos e ambientais e como estes interagem gerando diversos padrões de diversidade são questões frequentemente abordadas. Alguns modelos de diversidade são baseados na interação existente entre plantas e polinizadores. Adaptações a diferentes agentes polinizadores adicionados a fatores evolutivos seriam responsáveis por padrões de diversidade encontrados em algumas espécies de plantas com flores (Givnish, 2012), isto porque mais de 70% das angiospermas são dependentes de polinizadores para a reprodução sexuada (Waser & Ollerton, 2006). Em consequência desta dependência, existe um alto grau de interações entre angiospermas e polinizadores cumprindo provavelmente um papel importante na diversificação das plantas (Herrera *et. al*, 2006; Rieseberg & Willis, 2007). Nesse sentido, a produção de recursos oferecidos pelas espécies de angiospermas aos polinizadores cumpre um papel fundamental e o estudo das interações resultantes pode contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na diversificação das espécies de plantas com flores.

Durante a evolução das angiospermas, várias estratégias foram desenvolvidas para atrair os vetores bióticos de polinização, dentre estas, a oferta de recursos florais. Os recursos florais mais comumente oferecidos são o pólen e o néctar. Além destes, os óleos florais constituem um terceiro tipo de recurso oferecido por um conjunto restrito de famílias botânicas (Renner & Schaefer, 2010). Nesse contexto Iridaceae Juss. se destaca das demais famílias de angiospermas por ser uma das poucas que incluem espécies produtoras de néctar e de óleo florais, às vezes oferecidos em conjunto (Manning & Goldblatt, 2005; Devoto & Medan, 2008; Goldblatt & Manning, 2008). A oferta de três tipos de recursos florais torna esta família importante para a compreensão da possível influência da polinização nos processos de diversificação.

1 - A família Iridaceae Juss.

Iridaceae apresenta distribuição cosmopolita e constitui uma das famílias mais diversas pertencentes à ordem Asparagales (APGIII, 2009). Atualmente estima-se que existam cerca de 2000 espécies, tornando Iridaceae uma das maiores no grupo das monocotiledôneas (Goldblatt & Manning, 2008). No entanto, a família agrupa um conjunto de gêneros cujo número é controverso, alguns autores reconhecem até 75 gêneros em Iridaceae, porém a referência mais utilizada para fins de classificação é a de Goldblatt & Manning (2008), que inclui 205 espécies distribuídas em 66 gêneros. A África subsaariana e a área neotropical são consideradas prováveis centros de diversidade da família (Goldblatt, 1990; Goldblatt *et al.*, 1998; Rodriguez & Sytsma, 2006; Goldblatt & Manning, 2008). No Brasil, Iridaceae está representada por 19 gêneros e 165 espécies, das quais 70 são endêmicas do país, distribuídas da região Amazônica ao Pampa Gaúcho (Eggers *et al.*, 2013).

As Iridáceas são, em sua maioria, plantas herbáceas, e podem possuir rizomas, cormo, bulbo, ou caule lenhoso quando arbustivas (*Klattia* Baker, *Nivenia* Vent. e *Witsenia* Thunb.) (Goldblatt *et al.*, 1998). Os estados de caracteres diagnósticos para Iridaceae são: folhas alternas, dísticas, presença de cristais prismáticos de oxalato de cálcio (estiloides) nas bainhas dos feixes vasculares, inflorescência determinada tipo ripídio, flores actinomorfas, ovário ínfero, tépalas livres, três estames, e grãos de pólen com exina reticulada (Goldblatt, 1990; Goldblatt & Manning, 2008).

Iridaceae é dividida em sete subfamílias: Isophysidoideae, Patersonioideae, Geosiridoideae, Aristeoideae, Nivenioideae, Crocoideae e Iridoideae (Figura 1) e 10 tribos. Crocoideae e Iridoideae são as subfamílias mais diversas, compreendendo 95% da riqueza de espécies em Iridaceae (Goldblatt *et al.*, 2008). A subfamília Iridoideae representa 40% do total de espécies da família Iridaceae e é subdividida em cinco tribos: Diplarreneae, Iridaeae, Sisyrinchieae, Trimezieae e Tigridieae (Goldblatt & Manning, 2008) (Figura 2). A tribo Sisyrinchieae é o grupo irmão das tribos Trimezieae e Tigridieae e formam uma linhagem monofilética

definida por sinapomorfias moleculares e morfológicas (Goldblatt *et al.*, 2008; Goldblatt & Manning, 2008).

A tribo Trimezieae possui quatro gêneros e aproximadamente 60 espécies: *Neomarica* Sprague (cerca de 23 espécies) (Figura 2B) e *Trimezia* Salisb. ex Herb. (cerca de 18 espécies) são amplamente distribuídos na América do Sul (Chukr & Giulietti, 2008; Gil, 2012) e Central. Já outros dois gêneros são endêmicos, *Pseudiris* Chukr & A.Gil (monotípico) é restrito à região da Chapada Diamantina, (Bahia, Brasil) e *Pseudotrimezia* Foster (17 espécies) é restrito à Serra do Espinhaço (Minas Gerais, Brasil) (Gil *et al.*, 2008, Lovo, 2012). O estudo publicado por Lovo *et al.* (2012) onde foram analisadas as relações filogenéticas na tribo Trimezieae, evidenciou através de caracteres moleculares a existência de quatro clados, sendo que três dos quatro gêneros analisados foram considerados parafiléticos (*Neomarica*, *Pseudotrimezia* e *Trimezia*).

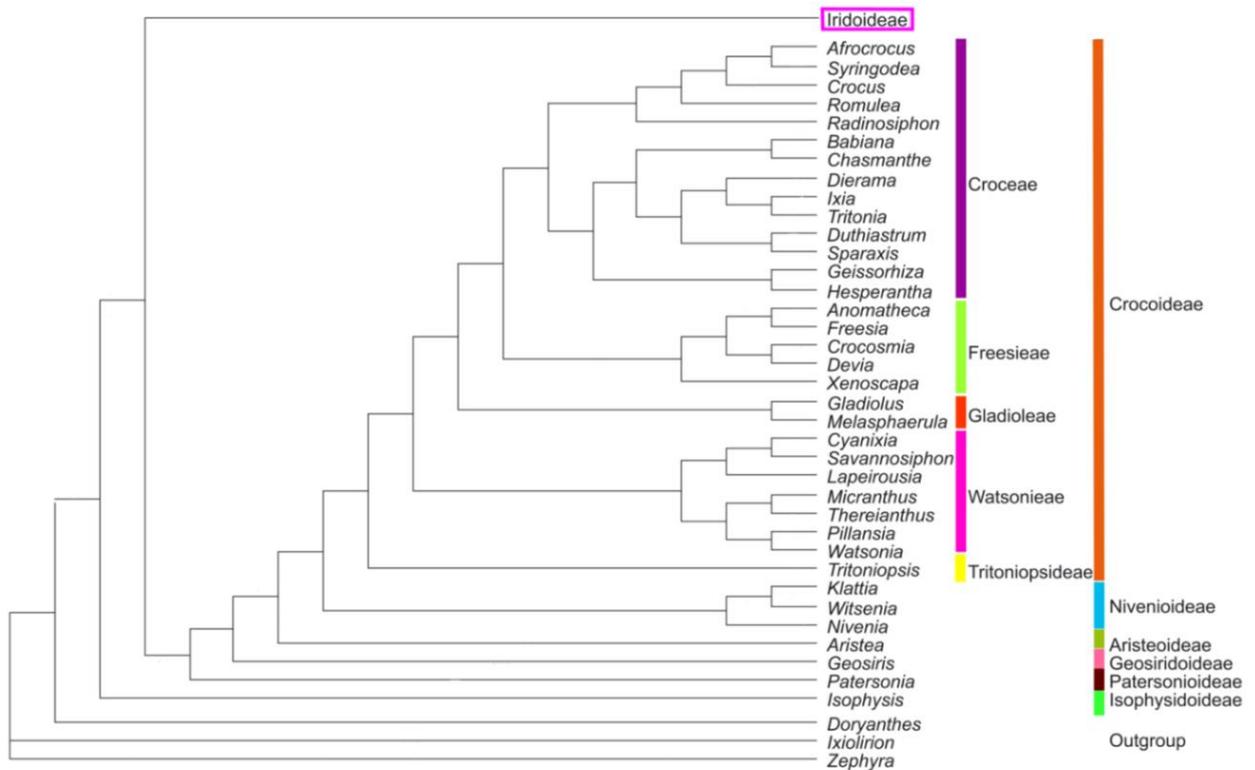


Figura 1 - Árvore filogenética das subfamílias de Iridaceae. Adaptada de Goldblatt *et. al* (2008).

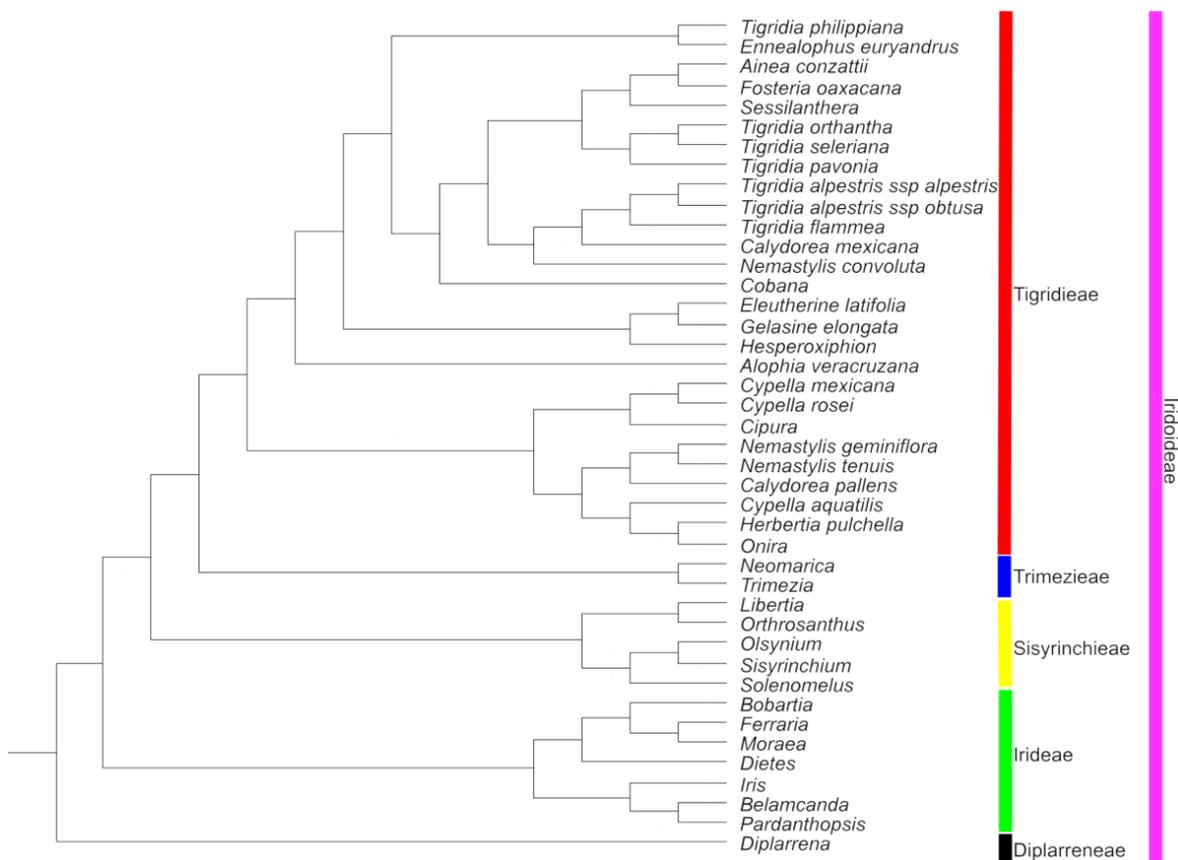


Figura 2 – Árvore filogenética da subfamília Iridoideae, mostrando as cinco tribos. Adaptada de Goldblatt et al (2008).

A tribo Tigridaeae compreende de 15 a 20 gêneros e 172 espécies, que ocorrem no Sul da América do Norte, América Central e América do Sul (Rodriguez & Sytsma, 2006; Goldblatt *et al.* 2008). Tigridaeae é considerada uma tribo taxonomicamente complexa já que apresenta uma grande variação morfológica e a duração das flores é efêmera, difíceis de serem preservadas em material herborizado (Rodriguez & Sytsma, 2006). O número exato de gêneros e espécies ainda deve ser revisto, já que dentro desta tribo existem problemas de circunscrição (Rodriguez & Sytsma, 2006; Goldblatt & Manning, 2008). Para a tribo Tigridaeae são considerados os seguintes gêneros: *Alophia* Herb., *Calydorea* Herb. (Figura 3F) (incluindo *Itysa* Ravenna e *Tamia* Ravenna), *Catila* Ravenna, *Cardenanthus* R.C.Foster, *Cipura* Aubl., *Cobana* Ravenna, *Cypella* Herb. (Figura 3H), *Kelissa* Ravenna (Figura 3I), *Onira* Ravenna (Figura 3G), *Phalocallis* Herb. (Figura 3D), *Eleutherine* Herb., *Ennealophus* N.E.Br. (incluindo *Tucma* Ravenna), *Gelasine* Herb., *Herbertia* Sweet. (Figura 3E), *Hesperoxiphion* Baker, *Larentia* Klatt, *Mastigostyla* I.M. Johnst., *Nemastylis* Nutt. e *Tigridia* Juss. (Figura 3C)

(incluindo *Ainea* Ravenna, *Cardiostigma* Baker, *Colima* (Ravenna) Aarón Rod. & Ortiz-Cat., *Fosteria* Molseed, *Rigidella* Lindl. e *Sessilanthera* Molseed & Cruden) (Goldblatt & Manning, 2008).

A filogenia publicada por Chauveau *et al.* (2012) propôs a divisão de Tigridaeae em dois clados (Figura 4), e confirmou que as duas subtribos (*Cipurinae* Benth.& Hook.f e *Tigridiinae* Pax) propostas por Goldblatt, (1990) não são monofiléticas. Tigridaeae ficou organizada da seguinte forma: o clado A é composto por : *Calydorea*, *Catila*, *Cipura*, *Cypella*, *Herbertia*, *Nemastylis*, *Larentia*, *Kelissa* e *Onira*, enquanto o clado B compreende os gêneros restantes da subtribo *Cipurinae* (*Cardenanthus*, *Eleutherine*, *Ennealophus*, *Gelasine* e *Mastigostyla*) e todos da subtribo *Tigridiinae*.

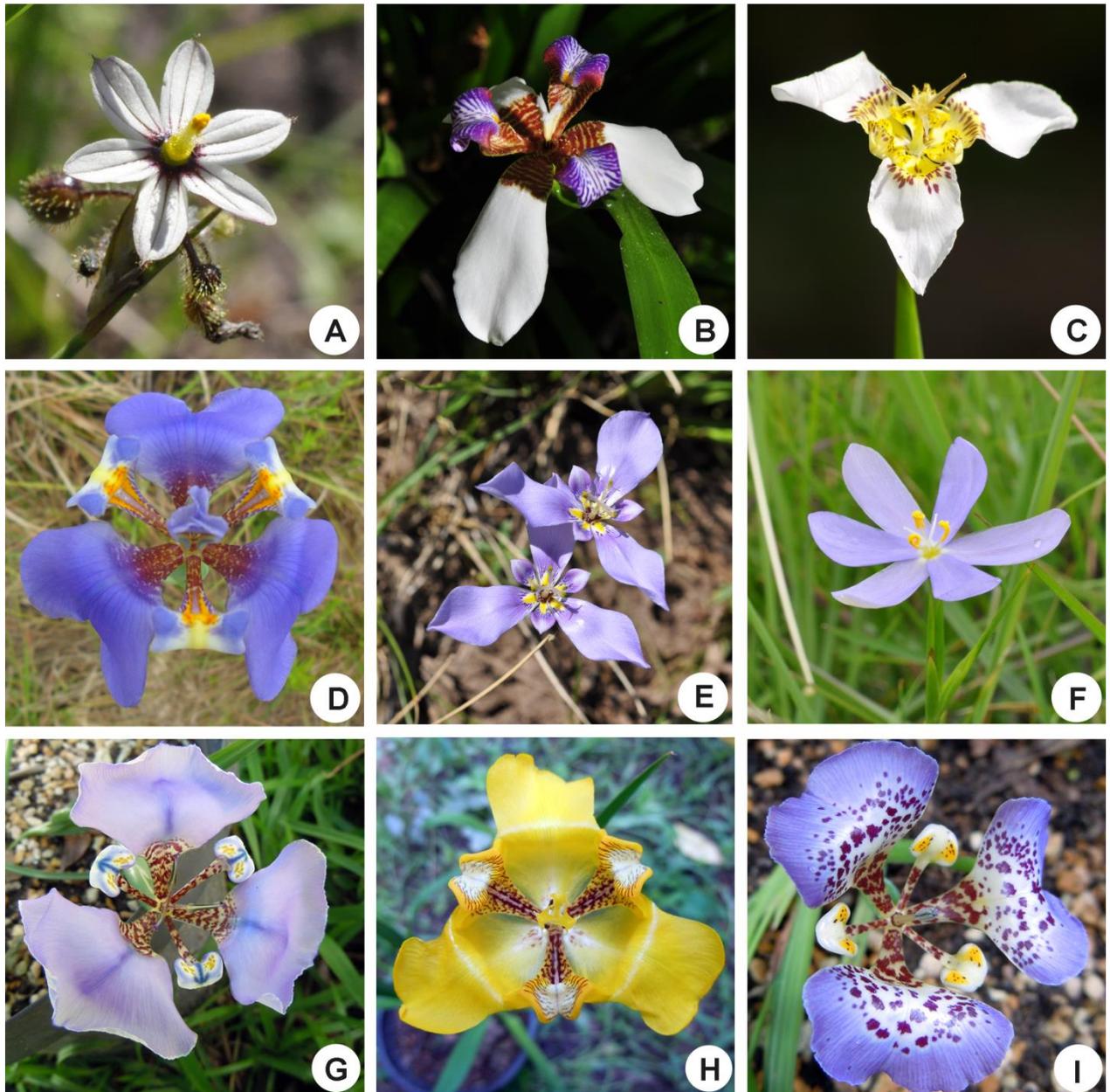


Figura 3 – A) Representante da Tribo Sisyrinchieae: *Sisyrinchium scariosum*. B) Representante da Tribo Trimezieae: *Neomarica candida*. C-I) Representantes da Tribo Tigridieae: C) *Tigridia chiapensis*; D) *Phalocallis coelestis*; E) *Herbertia crosae*; F) *Calydorea approximata*; G) *Onira unguiculata*; H) *Cypella aquatilis*; I) *Kelissa brasiliensis*. (Fotos L. Eggers & O. Chauveau).

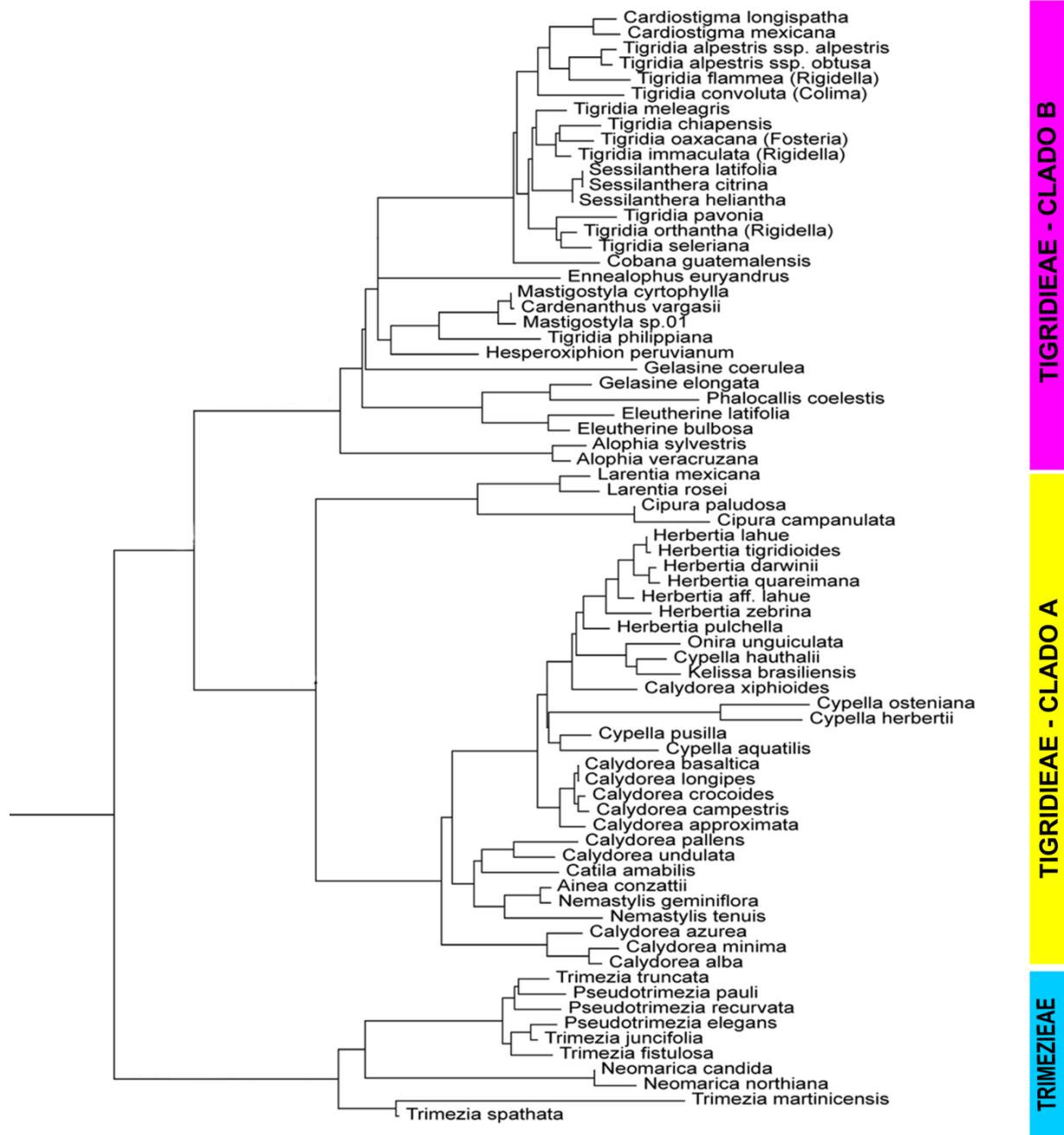


Figura 4 – Filogenia evidenciando a organização da tribo Tigridae nos dois clados, A e B. (Chauveau *et al.*, 2012).

1.1 - O gênero *Cypella* Herb.

Cypella é um gênero de plantas perenes, com bulbos revestidos de túnicas membranosas de coloração marrom escura. As folhas são pouco numerosas, lineares e com lâminas pregueadas. As inflorescências são ripídios, com espatas verdes, membranáceas a coriáceas, envolvendo firmemente os botões florais. As tépalas são diferenciadas, as do verticilo externo são maiores, patentes ou reflexas, já as tépalas do verticilo interno são menores, mais estreitas e revolutas no ápice. Os estames são simetricamente arranjados, os filetes são frequentemente livres ou unidos na base e com anteras suberetas ou divergentes, frequentemente adpressas ao estilete ou aos ramos deste, quando dividido. O estilete excede as anteras e pode ser dividido em três ramos curtos a longos, delgados, provido de três cristas na parte distal, sendo duas adaxiais, agudas no ápice e uma abaxial, mais curta. As cápsulas são obovoides a cilíndricas, truncadas no ápice, contendo sementes angulares. O número cromossômico básico é $x = 7$ (Goldblatt & Manning, 2008).

Algumas divergências são encontradas na literatura sobre o número de espécies, *Cypella* é o segundo maior gênero da tribo Tigridaeae possuindo cerca de 30 espécies (Goldblatt & Manning, 2008). As espécies pertencentes a esse gênero estão distribuídas entre Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia, Peru e Brasil. No Brasil ocorrem 15 espécies, sendo quatro endêmicas (Eggers, 2013) ocorrentes entre os estados de Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, nos biomas Cerrado, Mata Atlântica e Pampa.

Cypella geralmente está presente em solos secos, rochosos e em áreas abertas como os campos. No bioma Pampa, a espécie mais comumente encontrada, *Cypella herbertii* (Lindl.) Herb. (Fig. 5-A), frequente em banhados e campos pouco drenados na Campanha e Depressão Central. *Cypella laxa* Ravenna também é encontrada em campos alagados, já *Cypella aquatilis* Ravenna (Fig. 5-B) é encontrada em pequenos rios ou riachos (Howard, 2001; Ravenna, 1981a). *Cypella fucata* Ravenna é mais frequentemente encontrada em campos e regiões pedregosas e assim como *Cypella hauthalii* ssp. *opalina* Ravenna (Fig. 5-C). Algumas espécies, são endêmicas do Rio Grande do Sul,

como é o caso de *Cypella pusilla* (Link & Otto) Benth. & Hook. f. ex B.D. Jacks. (Fig. 5-D) (Eggers, 2013).

Cypella foi descrita no ano de 1826 pelo botânico britânico William Herbert e desde esta data alguns problemas são encontrados quanto à circunscrição desse gênero (Goldblatt & Manning, 2008; Ravenna, 2009; Eggers, 2013). Trabalhos publicados buscando evidências filogenéticas mostraram que *Cypella* é um gênero parafilético (Goldblatt *et al.*, 2008; Chauveau *et al.*, 2012). Além disso, gêneros relacionados como *Kelissa* e *Onira* foram incluídos em *Cypella* por Roitman & J.A. Castillo (2007) e posteriormente por Goldblatt & Manning, (2008). No entanto, estes gêneros continuam a ser utilizados por Ravenna (2009) e Eggers (2013). O reconhecimento de *Kelissa* e *Onira* tem como base, principalmente, as diferenças encontradas na morfologia floral dos mesmos, com relação as características morfológicas do androceu e gineceu.

Na filogenia publicada por Chauveau *et al.* (2012), *C. hauthalii* se destacou do restante do gênero *Cypella* e formou um clado fortemente sustentado, juntamente com *Onira unguiculata* (Baker) Ravenna e *Kelissa brasiliensis* (Baker) Ravenna. Goldblatt & Manning (2008) consideraram que *Kelissa* e *Onira* são realmente pouco diferenciados morfológicamente de *Cypella*, e que as diferenças nos estames e nos ramos do estilete que discriminam espécies destes três gêneros são consideradas insuficientes para separá-los.



Figura 5 – Algumas espécies de *Cypella* encontradas no estado do Rio Grande do Sul. A) *Cypella herbertii*; B) *Cypella aquatilis*; C) *Cypella hauthalii* ssp. *opalina*; D) *Cypella pusilla*; Fotos L. Eggers & O. Chauveau.

2. Recursos florais aos polinizadores

Abelhas são agentes polinizadores úteis ou verdadeiramente essenciais para a polinização e conseqüentemente para a reprodução sexual em grande parte da vegetação natural do mundo (Michener, 2007). A oferta de recursos florais aos polinizadores é uma estratégia importante utilizada pelas espécies vegetais a fim de promover a polinização cruzada. Diversas colorações e formas, assim como a presença de odores florais, são estratégias de atração aos polinizadores, comumente observadas nas angiospermas. Entretanto, a razão mais frequente pela qual os animais visitam as flores, é a busca de recursos. A natureza dos recursos oferecidos é muito variável entre espécies, normalmente entre estes estão presentes o pólen e o néctar. Iridaceae é umas das poucas famílias que apresenta um terceiro tipo de recurso: óleos florais (Goldblatt & Manning, 2008; Renner & Schaefer, 2010). A oferta de recursos adicionada à grande variedade de formas e colorações das flores torna a família muito importante para estudos da biologia da polinização, principalmente por apresentar uma ampla gama de síndromes de polinização (Rudall *et al.*, 2003).

Iridaceae apresenta inúmeras variações morfológicas e no caso das espécies africanas, a diversidade dos sistemas de polinização é relacionada com a complexidade floral das espécies (Goldblatt & Manning, 2006). Na maioria dos representantes da família Iridaceae, a fecundação cruzada é considerada o sistema de cruzamento preponderante. A presença do polinizador é essencial para algumas espécies, principalmente para aquelas que possuem relações altamente especializadas. De acordo com Goldblatt & Manning (2006), 95% das espécies de Iridaceae ocorrentes na África são polinizadas por uma, ou por poucas espécies de insetos e somente 3% são visitadas por polinizadores generalistas, sendo esta uma consideração muito importante na expansão e radiação da família nesse local.

2.1 Pólen

O grão de pólen constitui um recurso não renovável e mesmo que sirva como alimento, o pólen remanescente no corpo dos insetos é viável para a polinização cruzada. Este recurso é nutritivo, rico em proteínas e óleos, e possui

uma concentração significativa de açúcares, fosfato e outros minerais (Pacini & Hesse, 2005).

Iridaceae se caracteriza por possuir grãos de pólen com aberturas monossulcadas, exceto alguns casos como no gênero *Aristea* Aiton onde os grãos de pólen são trissulcados. No que se trata de recursos aos polinizadores, a característica mais importante dos grãos de pólen de Iridaceae é a presença de *pollenkitt*, como na maioria das angiospermas entomófilas estudadas, com exceção da família Brassicaceae (Pacini & Hesse, 2005).

Pollenkitt pode ser definido como uma mistura complexa de lípidios (incluindo os carotenoides, além de outras substâncias), produzido por plastídios do tapete da antera e depositado sobre a superfície do pólen e/ou nas cavidades da exina dos grãos de pólen das angiospermas (Pacini & Hesse, 1981). O *pollenkitt* facilita não só a coesão dos grãos de pólen, após a deiscência da antera, mas também a fixação destes no corpo do inseto que visita a flor. Além disso, fornece proteção contra a desidratação do pólen e atua como um armazenador para as substâncias que atuam no reconhecimento estigmático desempenhando um papel importante na ecologia da polinização de espécies entomófilas (Dickinson & Lewis, 1973).

2.2 Néctar

Os nectários florais são estruturas relativamente simples envolvidas no processo de polinização, ocorrem em diversas partes das flores e produzem uma grande variedade de exsudatos de açúcar. As secreções produzidas servem como fonte importante de alimento para insetos, sendo o recurso mais oferecido pelas plantas aos polinizadores (Faegri & Van der Pijl, 1980). Os nectários possuem origens diferentes e estão presentes na maior parte das famílias de angiospermas (Bernardello, 2007).

Açúcares do néctar constituem a principal fonte de carboidratos na dieta das abelhas. Néctar é consumido por adultos como fonte de energia e é misturado com o pólen para fazer o alimento larval.

Na maioria das angiospermas, o néctar é exsudado via células epidérmicas, tricomas, poros, por ruptura ou cutículas permeáveis, ou por tecidos nectaríferos como estômatos (Fahn, 1979). Na maioria dos casos, o néctar é liberado onde é produzido (Pacini *et al.*, 2003).

Em geral, os nectários consistem de três componentes: 1) epiderme, que pode apresentar estômatos ou tricomas, por onde o néctar é liberado; 2) parênquima especializado que produz ou armazena os solutos do néctar; 3) feixe vascular composto majoritariamente por floema (Fahn, 2000, Paccini *et al.*, 2003).

Convencionalmente, propõe-se que o néctar é originado a partir do floema e modificado pelo parênquima secretor (Fahn, 1979); entretanto, esta é uma versão simplificada e controversa (Nicolson, 2007). Outros estudos evidenciam que o açúcar provém da fotossíntese realizada pelo próprio nectário ou, provavelmente, em outros órgãos da planta, em que o amido pode ser um produto intermediário de armazenamento (Nicolson, 2007).

Em alguns casos, o tecido nectarífero não difere dos tecidos adjacentes e apenas o néctar é detectado, estes são chamados nectários não estruturados (Zimmerman, 1932; Fahn, 1979; Castro & Machado, 2006). Os nectários deste tipo são principalmente extra-florais, mas existem descrições na literatura de nectários não estruturais presentes nas flores, no entanto são difíceis de serem detectados e poucos casos são descritos na literatura. Um exemplo ocorre na família Melastomataceae, na qual nectários não estruturados estão localizados nas anteras em alguns gêneros (Stein & Tobe, 1989).

Em Iridaceae, o néctar é o recurso mais comumente oferecido, sendo uma valiosa fonte de carboidratos para vários animais. O néctar é muito variável quanto ao local, quantidade de produção, volume, concentração de açúcar e no tipo de açúcar contido. O volume de néctar é frequentemente relacionado com o tamanho do polinizador, em Iridaceae pode variar de menos de cinco microlitros em muitas flores polinizadas por abelhas até cem microlitros em flores polinizadas por beija-flores como *Watsonia* e *Witsenia* (Goldblatt & Manning, 2008).

Nas subfamílias Crocoideae e Nivenioideae o néctar é produzido por células especializadas, localizadas entre as paredes ou septos no ovário e são chamados

nectários septais (Goldblatt & Manning, 2008). Em Iridoideae, em contraste, o néctar é produzido em glândulas na superfície das tépalas (ex. *Tigridia*) ou dentro do tubo floral (exceto em *Diplarrena*, a qual possui nectários septais, evidentemente um estado ancestral na família). O néctar produzido por flores de Iridoideae é tipicamente dominado por açúcares do tipo hexoses, frutose e glucose (Goldblatt & Manning, 2008).

A presença de néctar em espécies não africanas de Iridaceae é pouco estudada. Um estudo publicado por Chauveau *et al.* (2012) mostrou que dentro das tribos americanas da subfamília Iridoideae, Trimezieae e Tigridieae, poucos gêneros apresentam néctar como recurso aos polinizadores, entre estes *Neomarica* e *Tigridia*.

2.3 Óleos florais

Os óleos florais são um terceiro tipo de recurso oferecido pelas angiospermas, produzidos em regiões complexas denominadas elaióforos. Os elaióforos são áreas glandulares localizadas no interior da flor e podem ser anatomicamente separadas em duas categorias: I) Elaióforos epiteliais: consistem de células glandulares epiteliais ou epidérmicas e a secreção de óleo é armazenada abaixo de uma cutícula protetora, formando pequenas bolsas. II) Elaióforos tricomáticos: consistem de centenas a milhares de tricomas glandulares produtores de óleo (Vogel, 1974; Buchmann, 1987; Machado, 2004).

Em Iridaceae, os elaióforos estão localizados principalmente nas tépalas e são exclusivamente observados em representantes das tribos americanas de Iridoideae, especialmente nos gêneros *Herbertia* e *Cypella* da tribo Tigridieae (Chauveau *et al.* 2012), e também no tubo estaminal de espécies do gênero *Sisyrinchium* (Vogel, 1974, Chauveau *et al.*, 2011, Silvério *et al.*, 2012). Somente uma espécie africana de Iridaceae, *Tritoniopsis parviflora* (Jacq.) G.J. Lewis, pertencente à tribo Crocoideae é conhecida como produtora de óleos (Manning & Goldblatt, 2002; Goldblatt & Manning, 2008).

Segundo Buchmann (1987), possuem elaióforos os gêneros *Alophia*, *Cypella*, *Ennealophus*, *Sisyrinchium*, *Sphenostigma*, *Tigridia* e *Trimezia*. No

entanto, Chauveau *et al.* (2012) mostrou que elaióforos estão presentes também nas espécies *Cardenanthus vargasii* R.C. Foster, *Catila amabilis* Ravenna, *Cipura paludosa* Aubl., *Ennealophus euryandrus* (Griseb.) Ravenna, *Hesperoxiphion* Baker, *Mastigostyla* I.M. Johnst e nos gêneros monotípicos *Kelissa* e *Onira*.

Vogel (1974) realizou estudos com a espécie *Cypella herbertii* (Lindl.) Herb. e concluiu que os elaióforos nesta espécie são do tipo tricomáticos, formado por tricomas unicelulares. Outros estudos também comprovaram a presença de elaióforos nas tépalas internas de espécies do gênero *Cypella* (Ravenna, 1981a, 1981b; Goldblatt & Manning, 2008; Chauveau *et al.*, 2012).

São poucas as espécies de abelhas que utilizam os óleos florais. Existem 16 mil espécies de abelhas conhecidas no mundo e, dentre estas, cerca de 330 espécies coletam óleos florais. As abelhas especializadas em coletar óleos florais pertencem às tribos Macropidini e Redivivini (família Melittidae) e Ctenoplectrini, Centridini, Tapinostapidini e Tetrapediini (família Apidae) (Michener, 2007).

Algumas destas abelhas desenvolveram adaptações, como pentes especiais localizados nas pernas ou metasomas, com a finalidade de coletar, armazenar e carregar óleos (Cocucci *et al.*, 2000; Vogel, 2009), como é o caso dos gêneros *Rediviva* (Melittidae) no Sul da África; *Macropus*, no velho e no novo mundo, e *Centris*, *Chalepogenus* e *Tapinotaspis* (Apidae) nas Américas do Norte e Sul. Os lipídeos florais são utilizados pelas abelhas na construção de ninhos (Vinson *et al.*, 1996) e, principalmente, como alimento larval, misturados ao pólen (Vogel, 1974; Simpson & Neff 1981; Rêgo *et al.*, 2006) e, possivelmente, na nutrição de adultos (Buchmann, 1987).

3. Evolução das recursos florais

Inferir a evolução de um caractere a fim de avaliar seu papel na história evolutiva de um grupo taxonômico é importante para a compreensão da sua diversificação, principalmente quando se trata de caracteres de recompensas florais. Na família Iridaceae os caracteres implicados nas relações plantas-polinizadores têm um papel central na diversificação, assim como em diversos outros grupos vegetais.

Uma das áreas mais estudadas atualmente é a interação entre plantas e animais utilizando filogenias, e trabalhos importantes têm sido realizados nessa área (Renner & Schaefer, 2010). Em Iridaceae, especialmente para a subfamília Iridoideae (Chauveau *et al.*, 2011, Chauveau *et al.*, 2012). As relações entre as flores secretoras de óleo e abelhas coletoras constituem um exemplo de uma especialização funcional e de uma interação incomum entre plantas e polinizadores (Minckley e Roulston, 2006). Renner & Schaefer (2010) mostraram, através de uma reconstrução filogenética (Figura 6), que a oferta de óleos florais evoluiu 28 vezes independentemente dentro das angiospermas. Essa oferta está concentrada em 11 famílias que ocorrem nos trópicos e subtropicais. Na maioria destas, as glândulas de óleo (elaióforos) evoluíram apenas uma vez, exceto em duas famílias, Iridaceae e Orchidaceae, onde a oferta evoluiu múltiplas vezes.

Trabalhos publicados mostram a importância do estudo da evolução de um caractere para a compreensão da diversificação de um grupo vegetal. Os nectários, segundo Bernardello (2007) são vistos como especializações das flores e podem evidenciar tendências evolutivas nos grupos de plantas baseadas em suas semelhanças e/ou diferenças. Dentro da família Iridaceae, a presença de nectários septais é considerada plesiomórfica, este tipo de nectário é especialmente prevalente em duas subfamílias: Crocoideae e Nivenioideae (Daumann, 1970; Goldblatt, 1993; Rudall *et al.*, 2003). Na subfamília Iridoideae, os nectários septais são ausentes, exceto na tribo Diplarreneae. Na tribo Irideae nectários septais são ausentes, mas os gêneros *Moraea*, *Ferraria* e *Iris* apresentam nectários perigonais. Na tribo Trimezieae os nectários são do tipo tricomáticos, presentes nas tépalas internas do gênero *Neomarica* (Rudall, 2003) e em Sisyrinchieae o único registro de nectários é no gênero *Olsynium*. Já em Tigridieae, no clado B, o complexo do gênero *Tigridia* possui nectários tricomáticos nas tépalas internas e no clado A, a espécie *Cypella herbertii* provavelmente possui nectários estaminais no conectivo das anteras (Vogel, 1974; Devoto & Medan, 2008).

Chauveau *et al.* (2012) mostraram que, em Iridoideae (Iridaceae), provavelmente os elaióforos evoluíram independentemente em três tribos, Sisyrinchieae, Trimezieae e Tigridieae. Adicionado a isso, Chauveau *et al.* (2011),

mostraram que dentro da tribo Sisyrinchieae os elaióforos tricomáticos evoluíram duas vezes independentemente dentro do gênero *Sisyrinchium*, seguido por uma reversão em *Olsynium* e na tribo Trimezieae. Já os elaióforos evoluíram independentemente apenas uma vez na base da tribo, seguido por uma transição para nectários tricomáticos (em *Neomarica*) e várias reversões (em *Pseudotrimezia*). No entanto, segundo Chauveau *et al.* (2012), a maioria das transições de ausência de estruturas glandulares no sentido elaióforos tricomáticos e nectários ocorreram dentro de Tigridieae. Elaióforos tricomáticos e nectários tricomáticos são caracteres derivados dentro dos clados A e B de Tigridieae. Neste trabalho, foram registradas pelo menos sete transições independentes de flores desprovidas de estruturas secretoras em direção a flores com elaióforos tricomáticos. Os nectários tricomáticos evoluíram apenas no clado B, sendo ausentes do clado A. Dentro do clado A de Tigridieae, os tricomas secretores estão distribuídos principalmente nas tépalas internas em gêneros como *Cypella*, *Kelissa* e *Onira*, exceto no caso do gênero *Herbertia*, onde os elaióforos ocorrem em ambas as tépalas, internas e externas. A otimização dos caracteres para o clado A de Tigridieae sugere que o estado ancestral é a presença de elaióforos tricomáticos apenas nas tépalas internas (Chauveau *et al.*, 2012).

Cypella se destaca dos demais gêneros americanos de Iridoideae por apresentar três tipos de recursos aos polinizadores, ao menos para a espécie *Cypella herbertii* (Vogel, 1974; Devoto & Medan, 2008). Este padrão de oferta de recursos somente foi identificado em Iridaceae na espécie sul-africana *Tritoniopsis parviflora*, da subfamília Crocoideae, que secreta óleos florais em elaióforos epiteliais adicionado à secreção de néctar em nectários septais (Manning & Goldblatt, 2002). O gênero *Cypella* é filogeneticamente próximo de gêneros que oferecem somente pólen, como por exemplo, *Calydorea*, e gêneros que oferecem pólen e óleos, como o gênero *Herbertia* (Goldblatt *et al.*, 2008; Chauveau *et al.* 2012). Um conjunto amplo de observações permite a avaliação do papel destes caracteres na diversificação do grupo, já que existem mudanças e transições de ofertas de recursos dentro do clado A de Tigridieae.

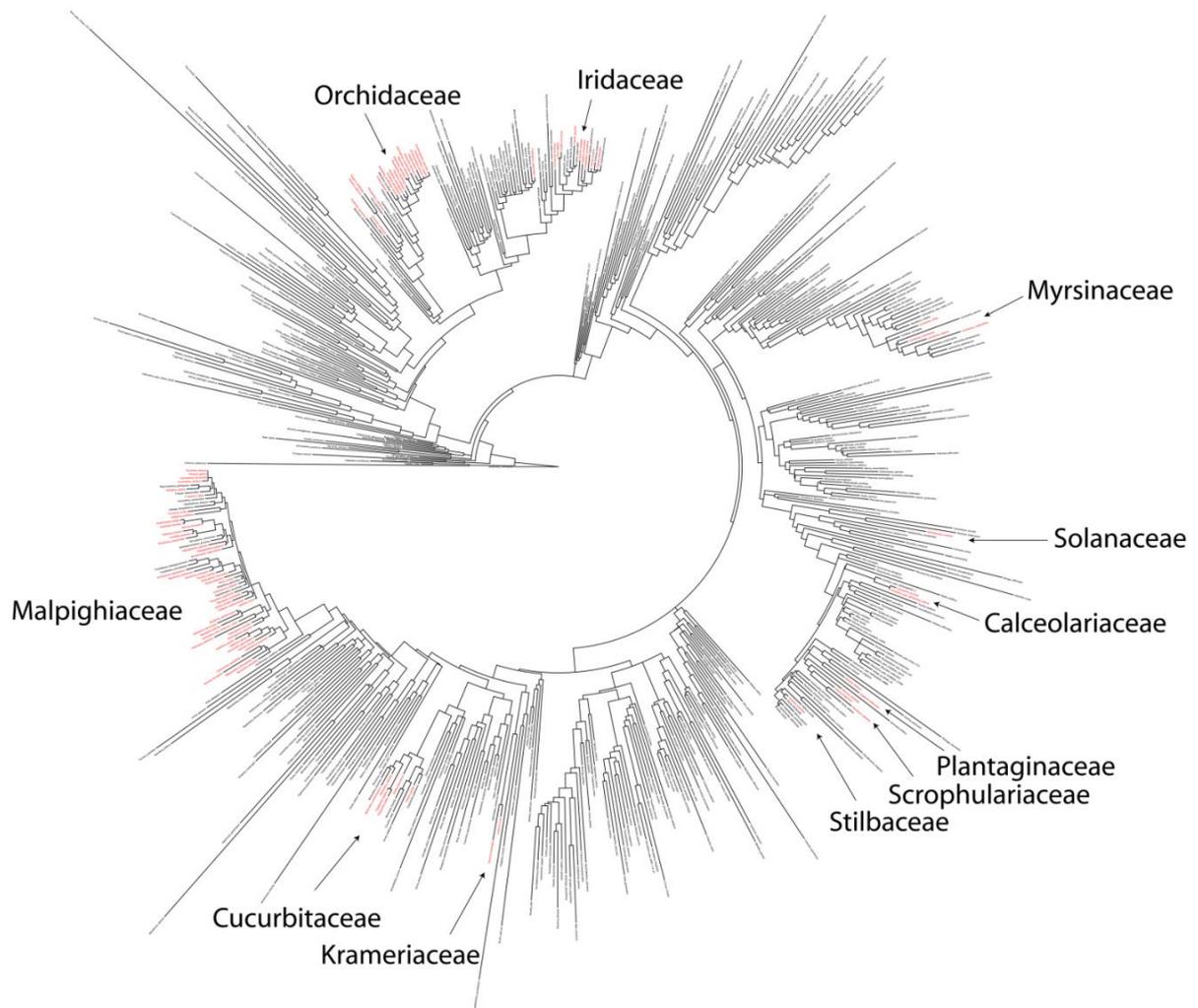


Figura 6 – Filogenia publicada por Renner and Schaefer (2010) evidenciando a evolução dos óleos florais oferecidos aos polinizadores, destacando os ramos em vermelhos.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é fornecer dados para elucidar questões referentes à evolução de recursos florais aos polinizadores ocorrentes no gênero *Cypella* e no Clado A de Tigridieae, contribuindo para o entendimento de determinados padrões de biodiversidade ocorrentes na região Sul do Brasil.

Objetivos específicos

- 1) Caracterizar sistematicamente os diferentes recursos florais produzidos no clado A de Tigridieae, especialmente no gênero *Cypella* e em espécies relacionadas, como *Kelissa brasiliensis* e *Onira unguiculata* e comparar os dados com os gêneros estreitamente relacionados: *Herbertia*, *Calydorea* e *Catila*;
- 2) Gerar uma filogenia para o clado A de Tigridieae baseada em marcadores plastidiais, focada especialmente no gênero *Cypella* e utilizar uma ampla amostragem, a fim de testar sua monofilia, pois a filogenia mais completa deste clado (Chauveau *et al.*, 2012) inclui poucas espécies de *Cypella*;
- 3) Inferir a evolução dos recursos florais no Clado A de Tigridieae a partir da filogenia obtida com marcadores moleculares;
- 4) Contribuir, com caracteres morfológicos e moleculares, para a circunscrição das espécies do gênero *Cypella*;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APGIII 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 161:105-121.

BERNARDELLO, G. 2007. A systematic survey of floral nectaries. In: Nicolson, S. W., Nepi, N. & Pacini, E. (eds.), **Nectaries and Nectar**. Springer, Dordrecht 19-128.

BUCHMANN, S.L. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. **Annual Review of Ecology and Systematics**, 18: 343–369.

CASTRO, M.M. & MACHADO, S.R. 2006. Células e Tecidos Secretores. Pp. 179-203. In: Appezato-da-Glória, B. & Carmello-Guerreiro, S.M. (eds). **Anatomia Vegetal**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa.

CHAUVEAU, O., EGGERS, L., RAQUIN, C., SILVÉRIO, A., BROWN, S., COULOUX, A., CRUAUD, C., KALTCHUK-SANTOS, E., YOCKTENG, R., SOUZA-CHIES, T.T., NADOT, S. 2011. Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. **Ann Bot.** 107(8): 1287–1312.

CHAUVEAU, O., EGGERS, L., SOUZA-CHIES, T.T., NADOT, S. 2012. Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera. **Ann Bot.** 110: 713–729.

CHUKR NS, GIULIETTI AM. 2008. Revisão de *Trimezia* Salisb. ex Herb. (Iridaceae) para o Brasil. **Sitentibus série Ciências Biológicas**. 8: 15–58.

COCUCCI, A.A, SÉRSIC, A, ROIG-ALSINA, A. 2000. Oil-collecting structures in Tapinotaspidini: their diversity, function and probable origin. **Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft**. 90: 51-74.

DAUMANN E. 1970. Das Blütennektarium der monocotyledonen unter besonderer berücksichtigung seiner systematischen und phylogenetischen bedeutung. **Feddes Repertorium** 80(7-8): 463-590.

DEVOTO, M., MEDAN, D. 2008. Expected mating system, floral diversity and flower visitors of five species of Iridaceae of the Argentine pampa. **Acta Botanica Venezuelica**. 31: 425-434.

DICKINSON, H. G. & LEWIS, D. 1973. The formation of the tryphine coating the pollen grains of *Raphanus*, and its properties relating to the self-incompatibility system. *Proc. R. Soc. Lond. B* 184, 149-165

EGGERS, L.; CHUKR, N.; LOVO, J.; GIL, A. Iridaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB136>>. Acesso em: 20 de novembro 2014.

EGGERS, L. 2013. *Cypella*: Iridaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000136>). Acesso em 20 de novembro de 2013.

FAEGRI, K. & L. VAN DER PIJL. 1980. The principles of pollination ecology. **Pergamon Press**, New York.

FAHN A. 1979. Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. **Am J Bot.** 55:977–985.

FAHN, A. 2000. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research*. 31: 37-75.

GIL, A. 2012. *Neomarica*. Lista de espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB008052> (acesso 19 julho 2013).

GIL, A.S.B, CHUKR, N.S, GIULIETTI, A.M, AMARAL, M.C.E. 2008. *Pseudiris speciosa*, a new genus and species of Trimezieae (Iridoideae, Iridaceae) from Chapada Diamantina, Brazil. **Proceedings of the California Academy of Sciences**. 59: 723–729.

GIVNISH, T.J. Ecology of plant speciation. 2012. **Taxon** 59 (5) 1326:1366.

GOLDBLATT, P. 1990. Phylogeny and classification of Iridaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 77(4): 607-627.

GOLDBLATT, P. 1993. The woody Iridaceae: systematics, biology and evolution of *Nivenia*, *Klattia* and *Witsenia*. Timber Press, Portland, Oregon, USA.

GOLDBLATT, P., BERNHARDT, P. E MANNING, J.C. 1998. Pollination of petaloid geophytes by monkey beetles (Scarabaeidae: Ruteliinae: Hopliini) in southern Africa. **Ann Mo Bot Gard**. 85: 215–230.

GOLDBLATT, P., MANNING, JC. 2006. Radiation of pollination systems in the Iridaceae of sub-Saharan Africa. **Annals of Botany**. 97: 317-344.

GOLDBLATT, P., MANNING, J.C. 2008. The Iris family - natural history and classification. **Timber Press**. Portland, Oregon, USA, 290p.

GOLDBLATT, P., RODRIGUEZ, A., POWELL, M. P., DAVIES, T. J., MANNING, J.C., 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.

HERRERA, C.M., CASTELLANOS, M.C., MEDRANO, M. 2006. Geographical context of floral evolution: towards an improved research programme in floral diversification. In: Harder LD, Barrett SCH. eds. **Ecology and evolution of flowers**. Oxford University Press. 278-294.

HOWARD, T.M. 2001. Bulbs for warm climates. **Austin: University of Texas**. Press: 175-195.

LOVO, J. 2012. *Pseudotrimezia*. Lista de espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB025589> (acesso 17 Agosto 2013).

LOVO, J., WINKWORTH, R. C. & MELLO-SILVA, R. 2012. New insights into Trimezieae (Iridaceae) phylogeny: what do molecular data tell us? **Ann Bot**. 110 (3): 689-702.

MACHADO, I.C. 2004. Oil-collecting bees and related plants: a review of the studies in the last twenty years and case histories of plants occurring in NE Brazil. In: Freitas B, Pereira JOP. eds. Solitary bees, conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza, BR: **Editora Universitária**, 255–280.

MANNING, J.C., GOLDBLATT, P. 2002. The pollination of *Tritionopsis parviflora* (Iridaceae) by the oil-collecting bee *Rediviva gigas* (Hymenoptera: Melittidae): the first record of oil-secretion in African Iridaceae. **South African Journal of Botany**. 68: 171-176.

MANNING, J.C., GOLDBLATT, P., 2005. Radiation of pollination systems in the Cape genus *Tritionopsis* (Iridaceae: Corcoideae) and the development of bimodal pollination strategies. **International Journal of Plant Sciences**. 166(3): 459-474.

MICHENER, C.D. 2007. The bees of the World. **Johns Hopkins**. University Press, Baltimore, Maryland, USA.

MINCKLEY RL, ROULSTON TH. 2006. Incidental mutualisms and pollen specialization among bees. In: Waser NM, Ollerton J. eds. **Plant-Pollinator**

Interactions: from Specialisation to Generalisation. University of Chicago Press, London, UK. Pp: 69-98.

NICOLSON, S.W. 2007. Nectar consumers. In: S.W. Nicolson, M. Nepi, & E. Pacini (Eds.), **Nectaries and nectar** (pp. 293–346). Dordrecht: Springer.

PACINI, E., NEPI, M., VESPRINI, J. 2003. Nectar biodiversity: a short review. **Plant Syst Evol.** 238: 7–21.

PACINI, E. & HESSE, M. 2005. Pollenkitt – its composition, forms and functions. **Flora.** 200: 399-415

RAVENNA, P. 1981a. A submerged new species of *Cypella* (Iridaceae), and a new section for the genus (s.str). **Nordic Journal of Botany.** 1: 489-492.

RAVENNA, P. 1981b. *Kelissa*, a new genus of Iridaceae from South Brazil. 'histoire naturelle. Section B, **Adansonia.** 3(1): 105–110.

RAVENNA, P. 2009. A survey in the genus *Cypella* and its allies (Iridaceae). *Onira Leaflets* 12(1): 1-10.

RÊGO, M.M.C.; ALBUQUERQUE, P.M.C.; RAMOS, M.C. & CARREIRA, L.M. 2006. Aspectos da biologia de nidificação de *Centris flavifrons* (Friese) (Hymenoptera: Apidae, Centridini), um dos principais polinizadores do murici (*Byrsonima crassifolia* L. Kunth, Malpighiaceae), no Maranhão. **Neotropical Entomology.** 35: 579-587.

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

RIESEBERG, L.H., WILLIS, J.H. 2007. **Plant speciation.** *Science.* 317: 910–914.

RODRÍGUEZ, A., SYTSMA, K.J. 2006. Phylogenetics of the “Tiger-flower” group (Tigridieae: Iridaceae) based on molecular and morphological evidence. **Aliso.** 22: 412:424.

ROITMAN, G., CASTILLO, J.A. 2007. *Cypella brasiliensis*, *Cypella unguiculata* (Baker) Roitman & J.A.Castillo. *Darwiniana* 45(2): 238.

RUDALL, P. 2003. Homologies of inferior ovaries and septal nectaries in Monocotyledons. **International Journal of Plant Sciences.** 163: 261–276.

SILVÉRIO, A. NADOT, SOUZA-CHIES, T.T, CHAUVEAU, O. 2012. Floral rewards in the tribe Sisyrinchieae (Iridaceae): oil as an alternative to pollen and nectar? *Sexual Plant Reproduction* 25:267–279

SIMPSON, B.B., NEFF JL. 1981 Floral rewards: Alternatives to pollen and nectar. In: NEFF JL. 1981. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 68: 301-322.

STEIN, B.A., TOBE, H., 1989. Floral nectaries in Melastomataceae and their systematic and evolutionary implications. **Ann. Miss. Bot. Garden**. 76(2): 519-531.

VINSON SB, Frankie GW, Williams HJ. 1996. Chemical ecology of bees of the genus *Centris* (Hymenoptera: Apidae). **Florida Entomologist**. 79(2): 109-129.

VOGEL, S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. Abhandlungen Akademie Wissenschaften Mathematisch-Naturwissenschaften Klasse, **Tropische und Subtropische Pflanzenwelt**. 7: 1–267.

Vogel S. 2009. The non-African oil-flowers and their bees: A brief survey. SAAB Annual Meeting Abstract. South African Journal of Botany 75(2): 389-390.

WASER NM, OLLERTON J. 2006. **Plant–pollinator interactions: from specialisation to generalisation**. London: University of Chicago Press. 3–17.

ZIMMERMAN J. 1932. Über die extrafloralen Nektarien der Angiospermen. Beihefte zum Botanischen Centralblatt Abt I 49: 99–196.

CAPÍTULO II



Disregarded diversity of floral rewards in *Cypella* Herb. (Iridoideae: Tigridieae) reveals uncommon development of bimodal pollination strategy in Iridaceae?

Disregarded diversity of floral rewards in *Cypella* Herb. (Iridoideae: Tigridieae) reveals uncommon development of bimodal pollination strategy in Iridaceae?

Tamara Pastori^{1*}, Lilian Eggers^{1,2}, Tatiana Teixeira de Souza-Chies^{1,2},
Alexandra Antunes Mastroberti^{1,2}, Olivier Chauveau²

¹Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43433, Brazil.

²Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43433, Brazil.

* Corresponding author (e-mail: tamarapastori@gmail.com)

Premise of the study: Iridaceae is one of the few angiosperm families where both nectar and floral oils evolved to reward pollinators. Oil-producing structures called trichomal elaiophores are a major innovation among the American tribes of Iridoideae. *Cypella herbertii* is unique in the American Iridaceae because it is the only known species where floral oils, as well as sugar nectar, are produced. Pollination rewards and associated glandular structures were investigated among species of *Cypella* and related genera, and their evolution examined in a phylogenetic context.

Methods: Analysis in fresh material and structural observations in floral rewards were made by mean of light microscopy.

Key results: Staminal nectaries and perigonal elaiophores are common among the genera *Cypella* and *Onira*. Three combinations of floral rewards were observed in South American Tigridieae: flowers that offer only pollen; Flowers with pollen and oils and flowers with pollen, nectar and oils.

Conclusions: Staminal nectaries among *Cypella* and *Onira* is unique in Iridaceae and is probably derived in the family. The unusual combination of nectaries and elaiophores in these genera may suggest the development of an uncommon bimodal pollination strategy.

Key words: staminal nectaries, perigonal elaiophores, lipids, *Calydorea*, *Catila*, *Herbertia*, *Kelissa*, *Onira*

In order to promote gene flow through pollinators, a great variety of rewards is offered by the flowering plants, including, nectar, pollen, resin, lipids, and waxes (Buchmann, 1987). Pollen is the primary reward; however, for animal-pollinated angiosperms, nectar is the most important one (Simpson and Neff, 1983). Recently, the studies of Michener, 2007; Renner and Schaefer, 2010; Chauveau et al., 2011; Silvério et al., 2012, showed that floral rewards are more than just nectar and pollen. They have identified a third important reward: floral oil. The floral oils are secreted by elaiophores, and collected by specialized bees, which use these lipids to feed their larvae and probably waterproof their nests (Michener, 2007; Renner and Schaefer, 2010). Iridaceae is one of the few families that features floral oils as a third type of resource (Goldblatt & Manning, 2008).

Nectar and pollen are usual rewards offered by flowers in many families of angiosperms, including in monocotyledons. In the family Iridaceae, the nectar is produced by septal or perigonal nectaries, this pattern is unusual and possibly unique in monocotyledons, because both types of nectaries occur in different genera within the family (Rudall et al. 2003). Septal nectaries are considered an ancestral state in Iridaceae and are especially prevalent in some species of subfamily Nivenioideae and in all species of Crocoideae (Daumann, 1970; Goldblatt, 1993; Rudall et al, 2003, Goldblatt and Manning, 2008). In the subfamily Iridoideae, the septal nectaries are present only in the tribe Diplarreneae, in genus *Diplarrhena* (Rudall, 2003). The other tribes of Iridoideae are characterized by the presence of nectar glands on the surface of the tepals or perianth tube, called perigonal nectaries. In the predominantly Old World tribe Irideae, nectaries are located at the base of outer tepals and sometimes in the base of the inner tepals. In *Iris* the nectary is present in perianth tube, and in the base of the tepals in most species of *Moraea* and *Ferraria* (Rudall et al. 2003). In the New World tribe Tigridieae and Trimezieae, the nectaries are predominantly located in the inner tepals (Goldblatt and Manning, 2008). In the Silyrinchieae tribe, the nectar is secreted from filament column in *Olsynium* (--).

In addition to pollen and nectar, flowers of Iridaceae offering a third rewards to pollinators, the floral oil (Goldblatt & Manning, 2008). In angiosperms, studies about the oil-producing flowers have documented the presence in 11 families (Vogel 1969; Buchmann 1987; Vogel 2009; Renner and Schaefer, 2010) and at

least twenty-eight evolutionary origins of these rewards (Renner and Schaefer, 2010). In the majority of these families the evolution occurs only one time, with the exception of Orchidaceae and Iridaceae, where the transition to the presence of elaiophores occurred multiple times (Goldblatt et al., 2008; Renner and Schaefer, 2010; Chauveau et al., 2011; Chauveau et al., 2012). The actual number of transitions for oil-bee pollination in Iridaceae is unknown due to phylogenetic uncertainties, but the latest comprehensive phylogeny of the subfamily Iridoideae (Iridaceae) (Chauveau et al., 2012) allowed to identify at least nine independent transitions.

All transitions of oil-offering flowers concern strictly American taxa of the Iridoideae (Renner & Schaefer, 2010), with the exception of the South African species *Tritoniopsis parviflora* (Jacq.) G.J.Lewis (Crocoideae), which secretes floral oils in epithelial elaiophores (Manning and Goldblatt, 2002). Furthermore, *T. parviflora* secretes nectar in septal nectaries, the unusual strategy in Iridaceae. The genus *Tritoniopsis* have a great diversity of strategy of the pollination added a high morphological variation. Studies about pollination biology (Manning and Goldblatt, 2002; Manning and Goldblatt, 2005; Manning and Goldblatt, 2006) showed the occurrence of bimodal pollination system in this genus. According Manning and Goldblatt (2005), the bimodal pollination system are morphologically intermediate between two syndromes and share two sets of pollination adapted to different specialized pollination systems. In *Tritoniopsis* two or possibly three bimodal system can be observed. An example is system present in *T. parviflora*, which secretes both nectar and oil, and can be pollinated by the oil-collecting bee *Rediviva gigas*, but in the same time may also visited by other species that not collecting oil, for example bees of the genus *Amegilla*.

Surprisingly *Cypella* is a South America genus of Tigridieae, subfamily Iridoideae, and displays an unusual system of pollination within the Iridaceae. This genus presents three types of rewards to pollinators, at least for the species *Cypella herberti* (Vogel, 1974; Devoto & Medan, 2008), as described for the species *T. parviflora* (Manning and Goldblatt, 2002). In opposed with what was registered in only one species of *Tritoniopsis*, offer of three types of resources, in the genus *Cypella* appears to offer these resources in most species. The presence of three types of rewards in *Cypella* is based on previous studies, which indicated

the location of the elaiophores in the inner tepals of *Cypella* (Vogel, 1969; Goldblatt and Manning, 2008) in addition the presence of nectaries in the connective of the anthers (Devoto & Medan, 2008). This system where three types of rewards is offering to attract the pollinators for an complete genus, could represent a unique system in the Iridaceae, mainly in the subfamily Iridoideae in the American continent.

In this context, the confirmation of the offering of three types of rewards in *Cypella* would constitute an innovation in the Iridaceae family. However, this rewards would be present in all species of *Cypella* and in the related genera like *Herbertia*, *Kelissa*, *Onira*, *Calydorea* and *Catila*, will these structures would be present. Therefore, this study aims to identify and characterize the pollination rewards among the species of *Cypella*, a unique genus that includes the only known example of both nectar and oil secretion among the american Iridoideae. In addition, we aim to clarify how many species inside the clade A, produce both rewards. This unusual combination of rewards and the morphological variation and changes in pollination strategies, could be related to the tribe's diversification in South America, therefore, suggesting an uncommon evolutionary path in the family.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Taxa sampled, sources of plant material and voucher information are listed in Table 1. A total of 33 *Cypella* accessions, representing 19 species and three subspecies, were sampled from Northern Argentina, Southern Brazil and Uruguay. Samples from the closely related genera *Calydorea* (1 sp.), *Catila* (1 sp.), *Herbertia* (2 spp.), *Kelissa* (1 sp.) and *Onira* (1 sp.) were selected for suprageneric comparisons.

Fresh flowers were observed and collected one day before anthesis (pre-anthesis stage) and at the beginning of pollen presentation (anthesis stage) from field specimen and from plants grown in the living collection of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brazil) and obtained from bulbs collected in the wild.

Microscopic analyses

Fresh flowers were photographed and dissected under a Leica M165 FC stereomicroscope. Histochemical tests for floral oils were performed on fresh flowers at anthesis and pre-anthesis with Sudan Red 7B according to Brundrett *et al.* (1991). A negative control test was performed for each sample and elaiophores were pre-treated with a solution of Methanol/ Chloroform/ Water/ Hydrochloric Acid (66:33:4:1) for 3 hours at room temperature environment. Then, the test with Sudan Red 7B was applied on both pre-treated and original materials (Brundrett *et al.*, 1991; Ascensão, 2003).

For anatomical observations, samples were fixed with 1 % glutaraldehyde and 4 % formaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2 (McDowell and Trump 1976), at room temperature for 24 hours. Fresh inner tepals and floral reproductive whorls were washed, dehydrated and embedded using a technique adapted from Webster (2007) in Microwave Bio Wave Pro Pelco. Samples were washed for 3 minutes in 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 and dehydrated using a graded ethanol series for 3 minutes (10°GL, 30°GL, 50°GL, 70°GL, 90°GL, 100°GL, 100 °GL) at 150W, then embedded for five series in the pre-resin at 250 W and embedded in 2-hydroxyethyl methacrylate-based resin (Technovit 7100, Heraeus Kulzer) for sectioning. Semi-thin transverse and longitudinal sections of

2-5 µm were obtained using a LEICA 2245 microtome (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) with a steel blade. Then, two histochemical tests were performed: Lugol's Iodine (IKI) 1% to detect starch (Johansen 1940) and periodic acid-Schiff (PAS reaction) for total polysaccharides (O'Brien and McCully 1981). The metachromatic Toluidine Blue 0.05%, pH 4.4 (O'Brien and McCully 1981) was used to reveal the structure, Toluidine blue reacts with different phenolic and polysaccharide compounds in the tissue and into their component cell types, by coloring various types of wall strikingly different colors. All observations and photomicrography were carried out using a Leica DMR-HC bright field microscope equipped with a Leica DFC 500.

Nectar analysis

Nectar measurements were obtained from flowers collected in the field or in the living collection. The percentage of sucrose equivalents in fresh nectar was measured with Eclipse 45-81 handheld refractometer for low volume of nectar (Bellingham & Stanley, London, UK) (°Brix), from five or more randomly selected flowering individuals per population, unless five plants were available. In addition, sugar concentration has been estimated with Glucotest (Accu-Chek Active - Roche).

Table 1: Study sampling, with the elaiophores and nectaries distribution, sources of plant material and voucher informations. The number (1) indicates the presence of the glandular structure and (0) indicates the absence.

Taxon	Elaiophores		Nectaries	Source of plant Material	Voucher
	Outer tepals	Inner tepals			
<i>Calydorea alba</i> Roitman & A. Castillo	0	0	0	BRA, RS, Quaraí	ESC ⁽⁸⁾ 516 (ICN)
<i>Catila amabilis</i> Ravenna	0	0	0	BRA, RS, Barra do Quaraí	ECP ⁽³⁾ 742 (ICN)
<i>Cypella aquatilis</i> Ravenna	0	1	1	BRA, RS, Muitos Capões	EC ⁽¹⁾ 714 (ICN)
<i>Cypella armosa</i> Ravenna	0	1	1	BRA, RS, São Borja	ECP ⁽³⁾ 761 (ICN)
<i>Cypella discolor</i> Ravenna	0	1	1	BRA, RS, Quaraí	A ⁽²⁾ 75 (ICN)
<i>Cypella aff. discolor</i>	0	1	1	BRA, RS, Quaraí	ECP ⁽³⁾ 745 (ICN)
<i>Cypella fucata</i> Ravenna	0	1	1	BRA, RS, Uruguaiana	ECP ⁽³⁾ 746 (ICN)
<i>Cypella fucata</i> Ravenna	0	1	1	BRA, RS, Capão do Leão	P ⁽⁴⁾ 101 (ICN)
<i>Cypella fucata</i> Ravenna	0	1	1	URU, Paysandú	ECIP ⁽⁵⁾ 847 (ICN)
<i>Cypella fucata</i> Ravenna	0	1	1	URU, Florida	ECIP ⁽⁵⁾ 860 (ICN)
<i>Cypella hauthalii</i> (Kuntze) R.C.Foster subsp. <i>hauthalii</i>	0	1	1	ARG, Misiones, Posadas	ECSCIP ⁽⁶⁾ 820 (ICN)
<i>Cypella hauthalii</i> subsp. <i>opalina</i> Ravenna	0	1	1	BRA, RS, São Borja	ECP ⁽³⁾ 764 (ICN)
<i>Cypella hauthalii</i> subsp. ECP 728	0	1	1	BRA, RS, Salto do Jacuí	ECP ⁽³⁾ 728 (ICN)
<i>Cypella hauthalii</i> subsp. ECPI 827	0	1	1	BRA, RS, Salto do Jacuí	ECIP ⁽⁵⁾ 827 (ICN)
<i>Cypella hauthalii</i> subsp. ECP 833	0	1	1	BRA, RS, Soledade	ECP ⁽³⁾ 833 (ICN)
<i>Cypella herbertii</i> (Lindl.) Herb.	0	1	1	BRA, RS, Itaqui	ECP ⁽³⁾ 752 (ICN)
<i>Cypella herbertii</i> (Lindl.) Herb.	0	1	1	BRA, RS, São Gabriel	ESC ⁽⁸⁾ 490 (ICN)
<i>Cypella herbertii</i> (Lindl.) Herb.	0	1	1	BRA, SC, Caçador	T.A ⁽⁷⁾ , 260 (ICN)
<i>Cypella herbertii</i> (Lindl.) Herb.	0	1	1	URU, Cerro Largo	ECIP ⁽⁵⁾ 862 (ICN)
<i>Cypella herbertii</i> (Lindl.) Herb.	0	1	1	BRA, RS	ECIP ⁽⁵⁾ 867 (ICN)

<i>Cypella herbertii</i> (Lindl.) Herb.	0	1	1	BRA, RS, Alegrete	ECIP ⁽⁵⁾ 875 (ICN)
<i>Cypella herbertii</i> (Lindl.) Herb.	0	1	1	BRA, RS, Alegrete	ECIP ⁽⁵⁾ 876 (ICN)
<i>Cypella herbertii</i> cf. subsp. <i>brevicristata</i> Ravenna	0	1	1	URU, Artigas, Serqueira	ECIP ⁽⁵⁾ 839 (ICN)
<i>Cypella laeta</i> Ravenna	0	1	1	URU, Paysandú, Chapicuy	ECIP ⁽⁵⁾ 843 (ICN)
<i>Cypella laxa</i> Ravenna	0	1	1	BRA, RS, Soledade	ECP ⁽³⁾ 830 (ICN)
<i>Cypella luteogibbosa</i> Deble	0	1	1	BRA, RS, Quaraí	ECPSA ⁽⁹⁾ 791(ICN)
<i>Cypella magnicristata</i> Deble	0	1	1	BRA, RS, Quaraí	ECPSA ⁽⁹⁾ 792(ICN)
<i>Cypella osteniana</i> Beauverd	0	1	1	URU, Lavaljeja, Minas	ECIP ⁽⁵⁾ 851 (ICN)
<i>Cypella pabstiana</i> Ravenna	0	1	1	BRA,RS,Barra do Quaraí	ECP ⁽³⁾ 741 (ICN)
<i>Cypella pusilla</i> (Link&Otto)Benth.&Hook.f.ex B.D. Jacks.	0	1	1	BRA, RS, Porto Alegre	ECIP ⁽⁵⁾ 818 (ICN)
<i>Cypella</i> sp. EPCPSA 778	0	1	1	BRA, RS, Lavras do Sul	ECPSA ⁽⁹⁾ 778(ICN)
<i>Cypella</i> sp. EC 716	0	1	1	BRA,RS, Trindade do Sul	EC ⁽¹⁾ 716 (ICN)
<i>Cypella</i> sp. AITA 049	0	1	1	BRA, RS, Pelotas	A ⁽²⁾ 049 (ICN)
<i>Cypella</i> sp. ECP 757	0	1	1	BRA, RS, São Borja	ECP ⁽³⁾ 757 (ICN)
<i>Cypella</i> sp. ECPSA 800	0	1	1	BRA, RS, Alegrete	ECPSA ⁽⁹⁾ 800
<i>Herbertia pulchella</i> Sweet	1	1	0	BRA, RS, Cristal	ESC ⁽⁸⁾ 671 (ICN)
<i>Herbertia zebrina</i> Sweet	1	1	0	BRA,RS,Encruzilhada do Sul	ESC ⁽⁸⁾ 179 (ICN)
<i>Kelissa brasiliensis</i> (Baker) Ravenna	0	1	0	BRA, RS, Lavras do Sul	ECPSA ⁽⁹⁾ 777(ICN)
<i>Onira unguiculata</i> (Baker) Ravenna	0	1	1	BRA, RS, Quaraí	A ⁽²⁾ 73 (ICN)

BRA*:Brazil; RS*: Rio Grande do Sul; *ARG: Argentina; URU*: Uruguai; ⁽¹⁾ L. Eggers & Chauveau; ⁽²⁾ A. M. Aita; ⁽³⁾ L. Eggers, O. Chauveau & T. Pastori; ⁽⁴⁾ T. Pastori; ⁽⁵⁾ L. Eggers, O. Chauveau, C. Inácio & T. Pastori; ⁽⁶⁾ L. Eggers, O. Chauveau, C. Inácio, T. Pastori & T.T. Souza-Chies, ⁽⁷⁾ T. Alves, ⁽⁸⁾ L. Eggers & T.T. Souza-Chies; ⁽⁹⁾ L. Eggers, O. Chauveau, T. Pastori & E. Stiehl-Alves;

RESULTS

The results are shown in table 1. Three patterns of floral rewards were observed in clade A of Tigridae in South America: 1) flowers that offer only pollen (e.g., *Calydorea alba* and *Catila amabilis*); 2) flowers that provide pollen and lipids (e.g., *Herbertia* and *Kelissa*); and 3) flowers that provide pollen, nectar and lipids (e.g., *Cypella* and the monotypic *Onira*). The presence of elaiophores was identified in the inner tepals of *Cypella*, *Kelissa* and *Onira*, and in the inner and outer tepals of *Herbertia*. The presence of secretion was identified in the anther's connective surface of all the species of *Cypella* and *Onira*.

A) Elaiophores: distribution and morphological features

The results showed that *Calydorea alba* and *Catila amabilis* are distinguished by the absence of elaiophores. *Calydorea* is characterized by the absence of specialized glandular structures in the flower; observations did not reveal trichomes on both series of tepals (Figure 1A). In *Catila*, the trichomal elaiophores are also absent (Figure 1B). However, few trichomes were detected on the apex of the inner tepals, but without lipid production or secretion.

The structural observations and histochemical tests showed that the elaiophores are present in all analysed species of *Cypella*, *Kelissa*, *Onira* and *Herbertia*. The elaiophores in these genera consist of a dense glandular field of unicellular trichomes.

The secretory activity in elaiophores begins at the anthesis stage. In anatomical observations it was detected the presence of accumulation of starch grains. The histochemical tests with PAS-Schiff and Lugol were used to confirm these results in the pre-anthesis (Fig. 6-H) stage and in the anthesis this accumulation disappears (Fig. 6-I). This accumulation is involved in oil production, but it was not possible to state with certainty its composition, since there are many components in floral oils.

Oil accumulation within the subcuticular space of oil-producing trichomes was detected with Sudan Red 7B. Although a blister of secretion was not present in the majority of the species, a subcuticular space at the tip of the trichomes were observed.

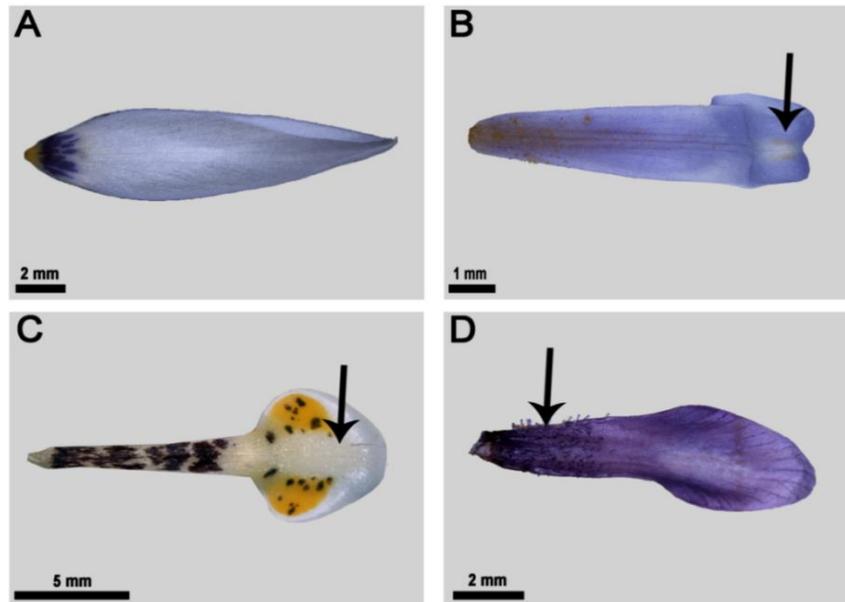


Figure 1: Region indicate the presence/absence of elaiophores in the inner tepals: A) Absence of elaiophores in *Calydorea alba*; B) Absence of elaiophores in *Catila amabilis*, the position of the trichomes is indicated by the black arrow; C) Elaiophores in *Kelissa brasiliensis* the position of the elaiophore trichomes is indicated by the black arrow; and D) Presence of elaiophores in *Herbertia pulchella* indicated by the black arrow.

Among the species of clade A of Tigridieae, trichomal elaiophores are exclusively located on the mid or proximal part of the adaxial side of the inner tepals, and are usually covered by folds or pockets of the tepal surface. The only exception is *Herbertia* where small areas of oil-producing trichomes occur also on the adaxial side of the outer tepals. In *Herbertia*, the elaiophores are located on the proximal half of the inner and outer tepals, on the other side, these are always distributed on the distal half of the inner tepal in *Cypella*, *Kelissa* and *Onira*. The species included in these genera could be divided in categories according to morphological features of the inner tepals (Table 2). In addition, variations in the shape and colour of elaiophores were observed and are described below (Figure 2 to 5).

1- Tepals shape

Inner tepals can be divided into two parts: the proximal one spread at the base from the flower axis and is curved upward to become more or less parallel to

the flower axis from which it springs. The angle spread may range from 30° (ex: *C. hauthalii*) to 90° (ex: *C. herbertii*). The distal part of the inner tepals is always abruptly and strongly reclinate (curved downwards), longitudinally depressed except at the distal end of the tepal. The two parts of the inner tepals can be easily distinguished by the way the margins are transversely bent. They are curved upward along the proximal part and always revolute along the distal one.

- **State 1.1:** tepal not distinctly unguiculate (not clawed at the base, the proximal part cuneate, widened at the junction with the distal part, sometimes abruptly). The proximal part assurgent (spreading almost at right angle, then curved upward, the distal end strongly incurved), usually about the same length than the distal part in adaxial view. The max-width of the tepal at the junction between the proximal and distal parts. Species: *Cypella* sp. EC 716, *Cypella* sp. AITA 049, *C. fucata*, *C. herbertii*, *C. luteogibbosa*, *C. magnicristata*, *C. osteniana* and *C. pabstiana*. (Figure 2)

- **State 1.2:** shortly unguiculate (shortly clawed at the base, then the proximal part distinctly cuneate, widened at the junction with the distal part). The proximal part ascending (spreading at an angle between 60 and 75° relative to the flower axis, then curved upward), at least two times longer than the distal part in adaxial view. The max-width of the tepal at the junction between the proximal and distal parts. Species: *C. aquatilis*, *C. laxa*. (Figure 3)

- **State 1.3:** unguiculate (long clawed at the base, the proximal part abruptly widened towards the junction with the distal one, the claw attenuate towards the axis from which it springs). The proximal part slightly ascending (spreading at an angle of about 75° relative to the flower axis, then curved upward, the distal end strongly incurved), longer than the distal part in adaxial view. The max-width of the tepal at the junction between the proximal and distal parts. Species: *C. armosa*.

- **State 1.4:** shortly unguiculate (shortly clawed, with the proximal part distinctly cuneate, then slightly constricted towards the junction with the distal part). The proximal part erecto-patent (spreading at an angle of about 45° relative to the flower axis, then curved upward), about two times longer than the distal part in adaxial view. The max-width of the tepal at the widened area of the proximal part. Species: *C. discolor*, *C. pusilla*, *C. laeta*, *C. aff. suffusa*.(Figure 4)

- **State 1.5:** conspicuously unguiculate (long clawed, the proximal part, almost ligulate). The claw (proximal part) porrect (pointing upward at an angle of about 60° relative to the flower axis), at least two times longer than the blade (distal part) in adaxial view and distinctly narrower. The max-width of the tepal at distal part. Species: *C. hauthalii* subsp. *hauthalii*, *C. hauthalii* subsp. *opalina*, *K. brasiliensis*, *O. unguiculata*. (Figure 5)

2- Elaiophores shape

- State 2.1: oblong. Species: *C. aquatilis*, *C. fucata*, *C. herbertii*, *C. laxa*, *C. magnicristata*, *C. pabstiana*, *K. brasiliensis*, *O. unguiculata*.

- State 2.2: obtriangular to obovate. Species: *C. luteogibbosa*, *C. osteniana*.

- State 2.3: lanceolate. Species: *C. laeta*;

- State 2.4: ovate to cordate. Species: *C. discolor*, *C. hauthalii* subsp. *hauthalii*, *C. hauthalii* subsp. *opalina*, *C. pusilla*.

3- Elaiophores distribution

- State 3.1: distal part of the inner tepals. All the species studied, except *C. osteniana*.

- State 3.2: proximal part of the inner tepals, close to the junction with the distal part. Species: *C. osteniana*.

4- Elaiophores colour

- State 4.1: orange-yellow

- State 4.2: yellow

- State 4.3: cream

- State 4.4: brownish to ochraceous

- State 4.5: white

- State 4.6: blue



Figure 2: State 1.1. Tepal not distinctly unguiculate. Inner tepal of *Cypella herbertii*. DP: Distal Part; PP: Proximal Part.



Figure 3: State 1.2. Tepal shortly unguiculate. Inner tepal of *Cypella aquatilis*. DP: Distal Part; PP: Proximal Part.



Figure 4: State 1.4. Tepal shortly unguiculate. Inner tepal of *Cypella discolor*. DP: Distal Part; PP: Proximal Part.



Figure 5: State 1.5. Tepal conspicuously unguiculate. Inner tepal of *Cypella hauthalii* subsp. *opalina*. DP: Distal Part; PP: Proximal Part.

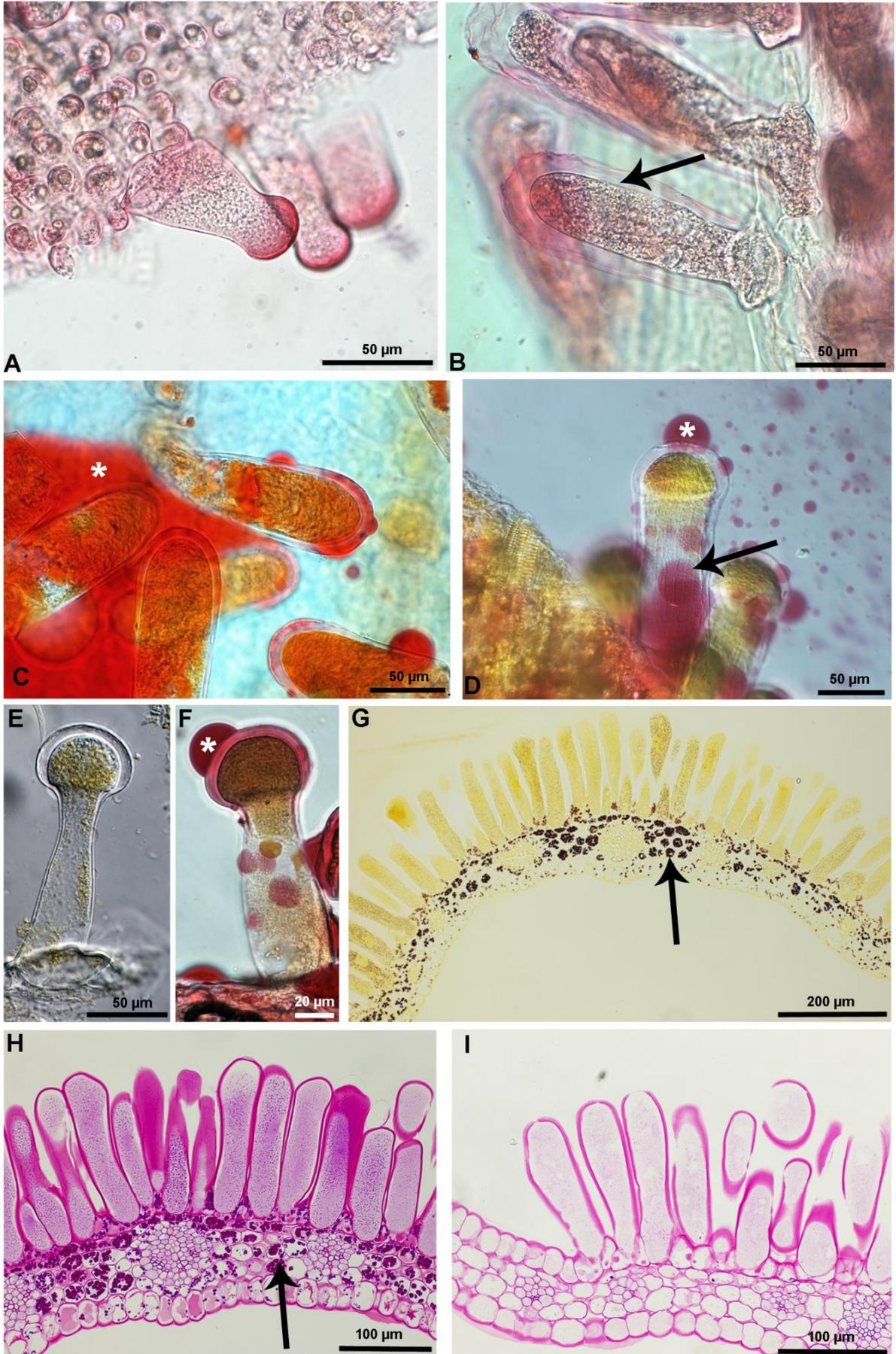


Figure 6 – Trichomes and elaiophores. A) Trichomes of inner tepal of *Catila amabilis* showing the Sudan Red 7B negative test. B) Negative control performed in *Herbertia zebrina*, showing the absence of lipids. C) Sudan Red 7B test in *Herbertia zebrina*. The secretion of lipids is highlighted. D) Sudan Red 7B test in *Cypella* sp. ECP 800, asterisk showing the presence of lipids and arrow indicating the presence of striations in the trichome cuticle with DIC (differential interference contrast) E) Trichomes in species *Cypella discolor* with DIC. F) Sudan Red 7B, asterisk showing the presence of lipids; G) Longitudinal section in the elaiophores on the inner tepal *C. magnicristata* showing the starch storage in the pre-anthesis with Lugol test and the accumulation of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis (H) showing the accumulation of starch that disappears after anthesis (I). G, H e I: Section with 5 μ m.

Tabel 2: Species analysed, tepals shape, and elaiophores shape, distribution and colour.

Taxon	Tepals shape		Elaiophores shape		Elaiophores distribution		Elaiophores colour	
	State 1	Classification	State 2	Classification	State 3	Classification	State 4	Classification
<i>Cypella aquatilis</i>	1.2	shortly unguiculate	2.1	Oblong	3.1	distal part	4.5	white
<i>Cypella armosa</i>	1.3	unguiculate	2.1	Oblong	3.1	distal part	4.1	orange-yellow
<i>Cypella discolor</i>	1.4	shortly unguiculate	2.4	ovate to cordate	3.1	distal part	4.4	brownish to ochraceous
<i>Cypella aff. discolor</i>	1.4	shortly unguiculate	2.4	ovate to cordate	3.1	distal part	4.5	brownish to ochraceous
<i>Cypella fucata</i>	1.1	not distinctly unguiculate	2.1	Oblong	3.1	distal part	4.1	orange-yellow
<i>Cypella hauthalii</i> ssp. <i>hauthalii</i>	1.5	conspicuously unguiculate	2.4	ovate to cordate	3.1	distal part	4.2	yellow
<i>Cypella hauthalii</i> ssp. <i>opalina</i>	1.5	conspicuously unguiculate	2.4	ovate to cordate	3.1	distal part	4.2	yellow
<i>Cypella hauthalii</i>	1.5	conspicuously unguiculate	2.4	ovate to cordate	3.1	distal part	4.2	yellow
<i>Cypella herbertii</i> ECS 490	1.1	not distinctly unguiculate	2.1	Oblong	3.1	distal part	4.1	orange-yellow
<i>Cypella herbertii</i> ECP 752	1.1	not distinctly unguiculate	2.1	Oblong	3.1	distal part	4.1	orange-yellow
<i>Cypella laeta</i>	1.4	shortly unguiculate	2.3	Lanceolate	3.1	distal part	4.2	yellow
<i>Cypella laxa</i>	1.2	shortly unguiculate	2.1	Oblong	3.1	distal part	4.2	yellow

<i>Cypella luteogibbosa</i>	1.1	not distinctly unguiculate	2.2	obtriangular obovate	to 3.1	distal part	4.4	Yellow
<i>Cypella magnicristata</i>	1.1	not distinctly unguiculate	2.1	Oblong	3.1	distal part	4.1	orange-yellow
<i>Cypella osteniana</i>	1.1	not distinctly unguiculate	2.2	obtriangular obovate	to 3.2	proximal part	4.2	Yellow
<i>Cypella pabstiana</i>	1.1	not distinctly unguiculate	2.1	Oblong	3.1	distal part	4.2	Yellow
<i>Cypella pusilla</i>	1.4	shortly unguiculate	2.4	ovate to cordate	3.1	distal part	4.3	Cream
<i>Cypella</i> sp. EPCPSA 778	1.4	shortly unguiculate	2.3	Lanceolate	3.1	distal part	4.3	Cream
<i>Cypella</i> sp. EC 716	1.1	not distinctly unguiculate	2.1	Oblong	3.1	distal part	4.2	Yellow
<i>Cypella</i> sp. AITA 049	1.1	not distinctly unguiculate	2.1	Oblong	3.1	distal part	4.1	orange-yellow
<i>Cypella</i> sp. ECP 757	1.4	shortly unguiculate	2.3	Lanceolate	3.1	distal part	4.2	Yellow
<i>Cypella</i> sp. ECPSA 800	1.4	shortly unguiculate	2.4	ovate to cordate	3.1	distal part	4.2	Yellow
<i>Kelissa brasiliensis</i>	1.5	conspicuously unguiculate	2.1	Oblong	3.1	distal part	4.5	White
<i>Onira unguiculata</i>	1.5	conspicuously unguiculate	2.1	Oblong	3.1	distal part	4.6	Blue

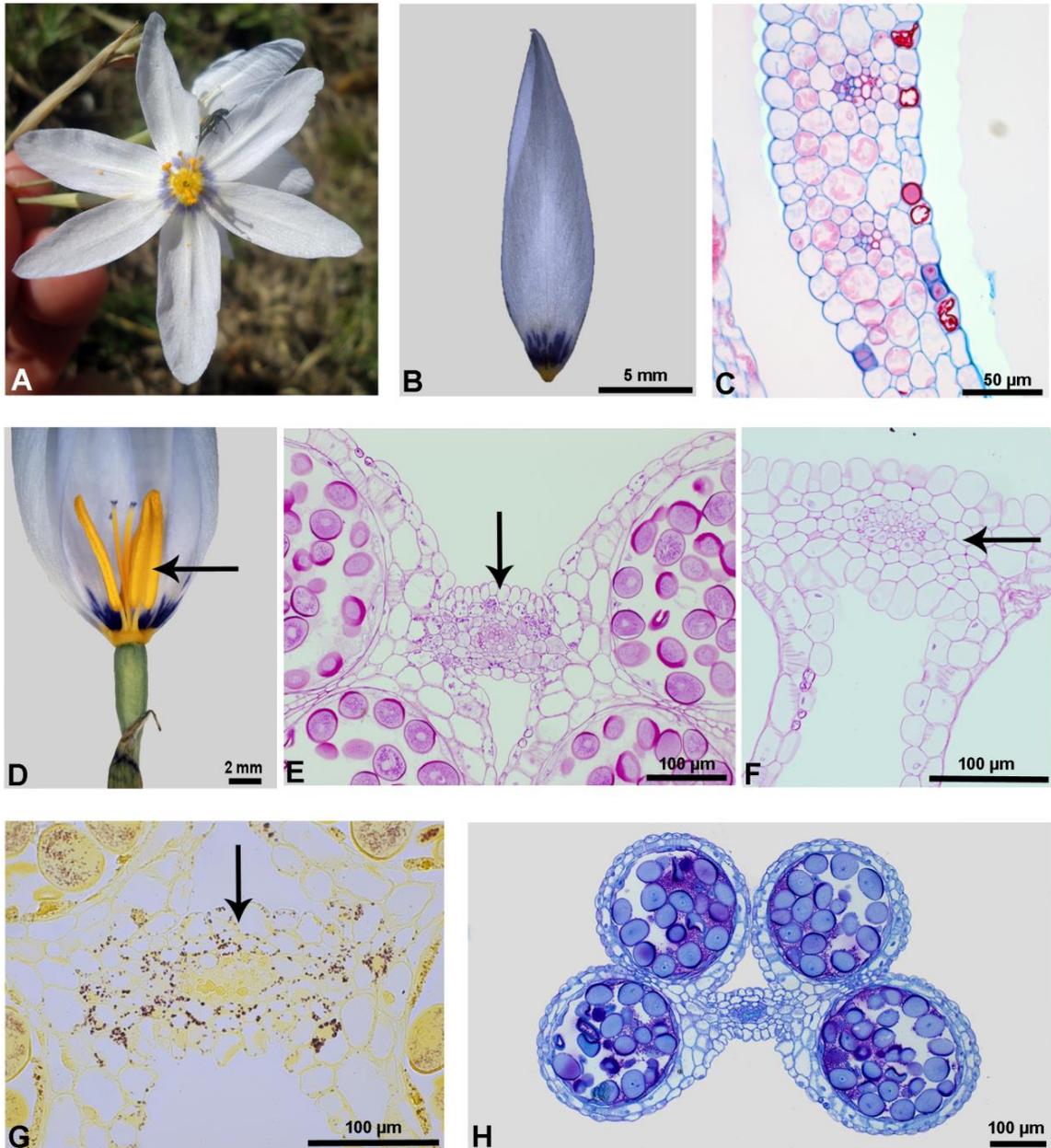


Figure 7: A) Flower of *Calydorea alba* Roitman & A. Castillo; B) Inner tepal; C) Transversal section in the inner tepal, showing the absence of trichomes; D) Anther, with an arrow indicating the connective of the anther and lack of secretion. E) Transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis and and the disappearance anthesis (F). G) Test Lugol in pre-anthesis, transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue of the anther and the presence of starch. H) Structure of anther stained with toluidine blue. C,E,F,G,H: Section with 5µm.

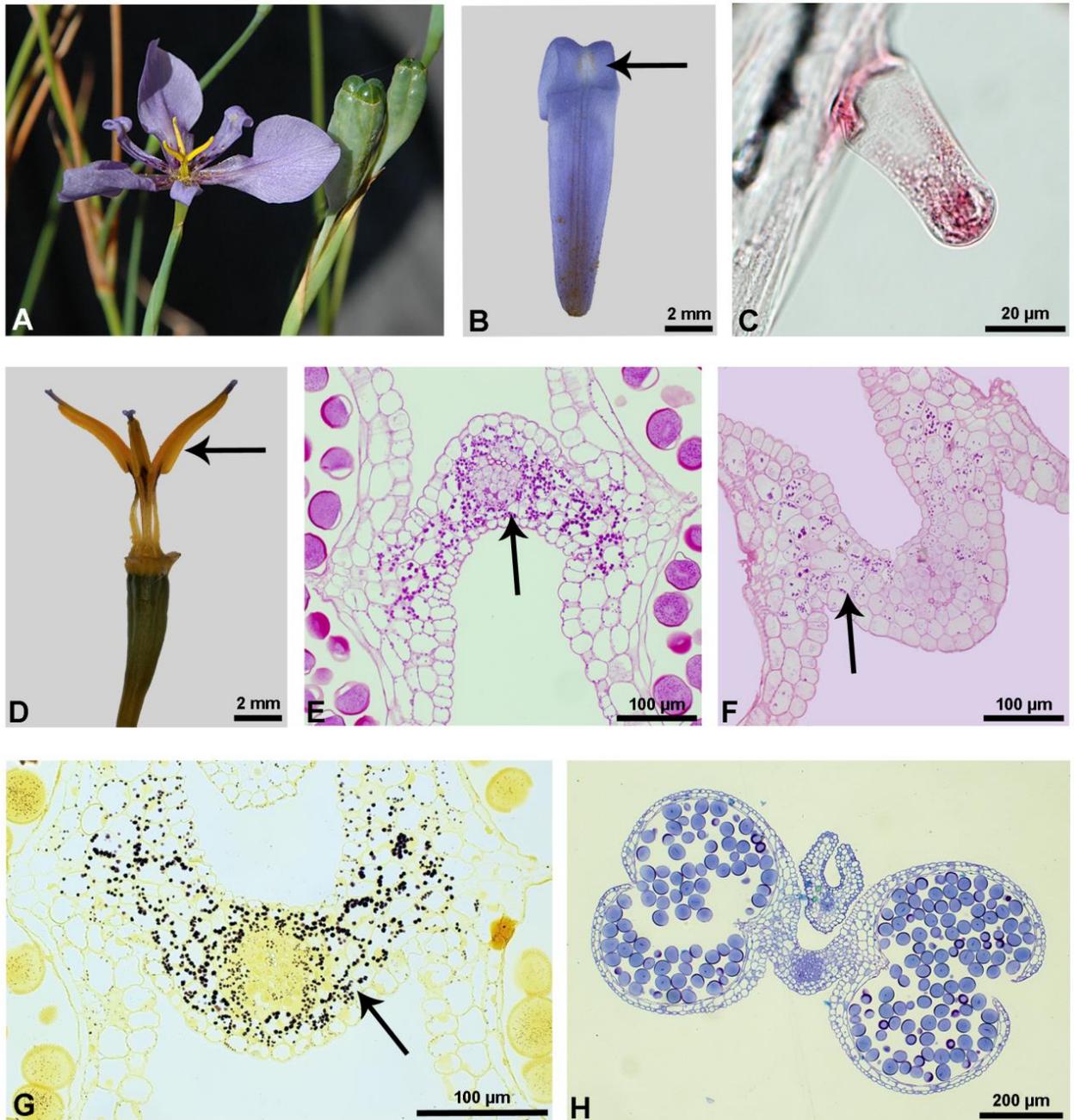


Figure 8: A) Flower of *Catila amabilis* Ravenna; B) Inner tepal with an black arrow indicating where trichomes are present; C) Transversal section in the inner tepal in fresh material, showing the presence the trichomes and the absence of lipids with Sudan Red 7B test; D) Anther, with an arrow indicating the anther connective and lack of secretion. E) Transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis and and the decrease in anthesis (F). G) Test Lugol in pre-anthesis, Transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue accumulation in the presence of starch. H) Structure of anther stained with toluidine blue. C,E,F,G,H: Section with 5µm.

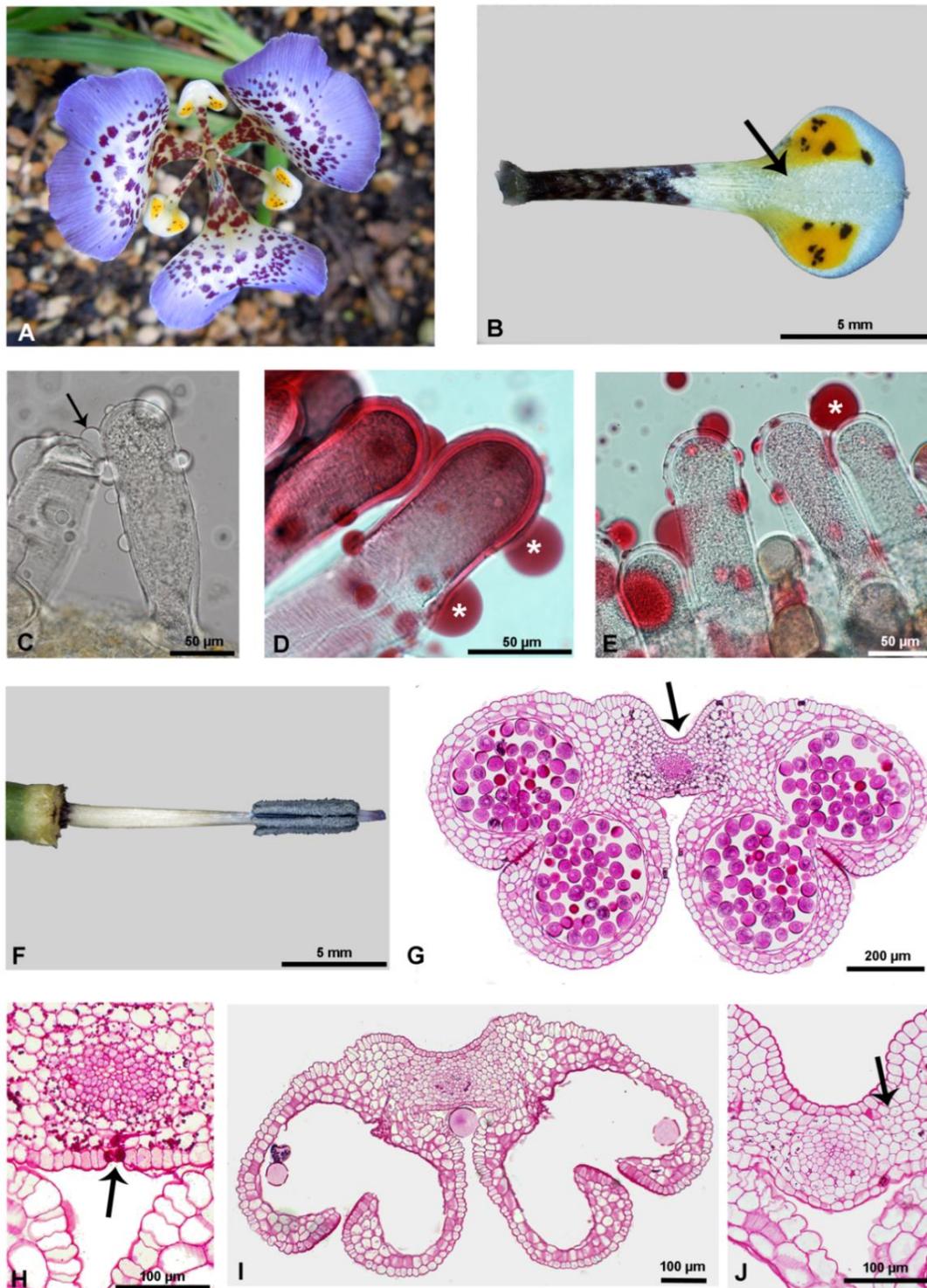


Figure 9: A) Flower of the *Kelissa brasiliensis* (Baker) Ravenna; B) Inner tepal with an arrow indicating the elaiophore position; C) Transversal section in the inner tepal in fresh material, showing the presence of the trichomes with floral oil in pre-anthesis (D) and anthesis (E) asterisk showing the secretion; F) Anther, with an arrow indicating the anther connective and lack of secretion. G) Transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis, with arrow indicating the presence of the stomata, and the decrease in anthesis (I) and G) a little accumulation in the connective tissue. G,H, I, J: Section with 5µm.

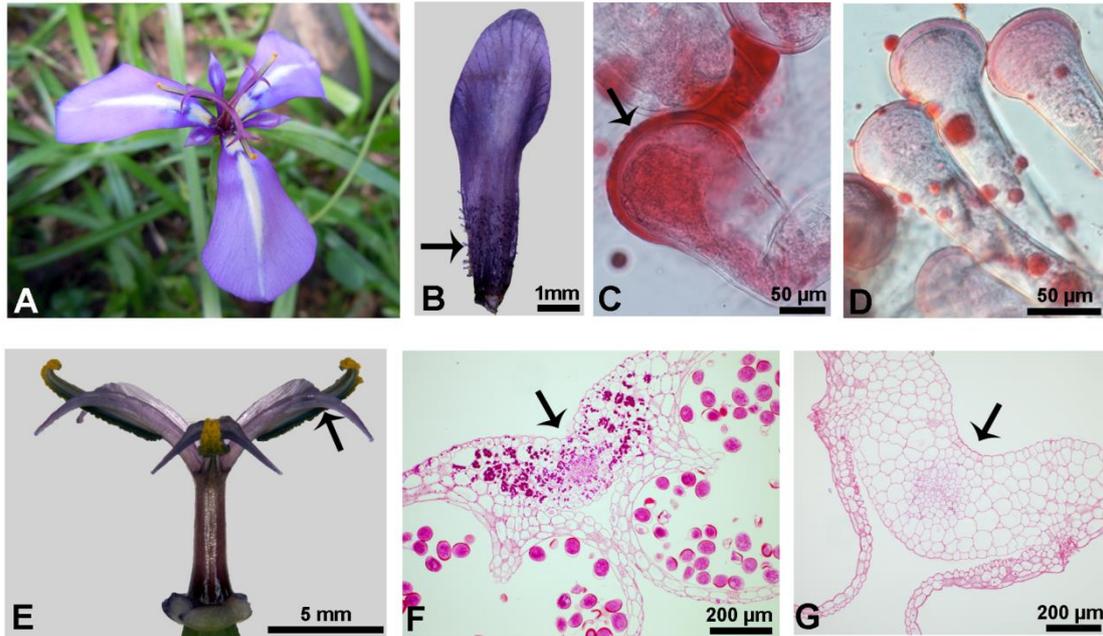


Figure 10: A) Flower of *Herbertia pulchella* Sweet; B) Inner tepal with an arrow indicating the elaiophore position; C) and D) Transversal section in the inner tepal in fresh material, showing the presence of the trichomes with lipids in anthesis. E) Anther; F) Transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis and the disappearance in anthesis (I). F and G: Section with 5 μ m.

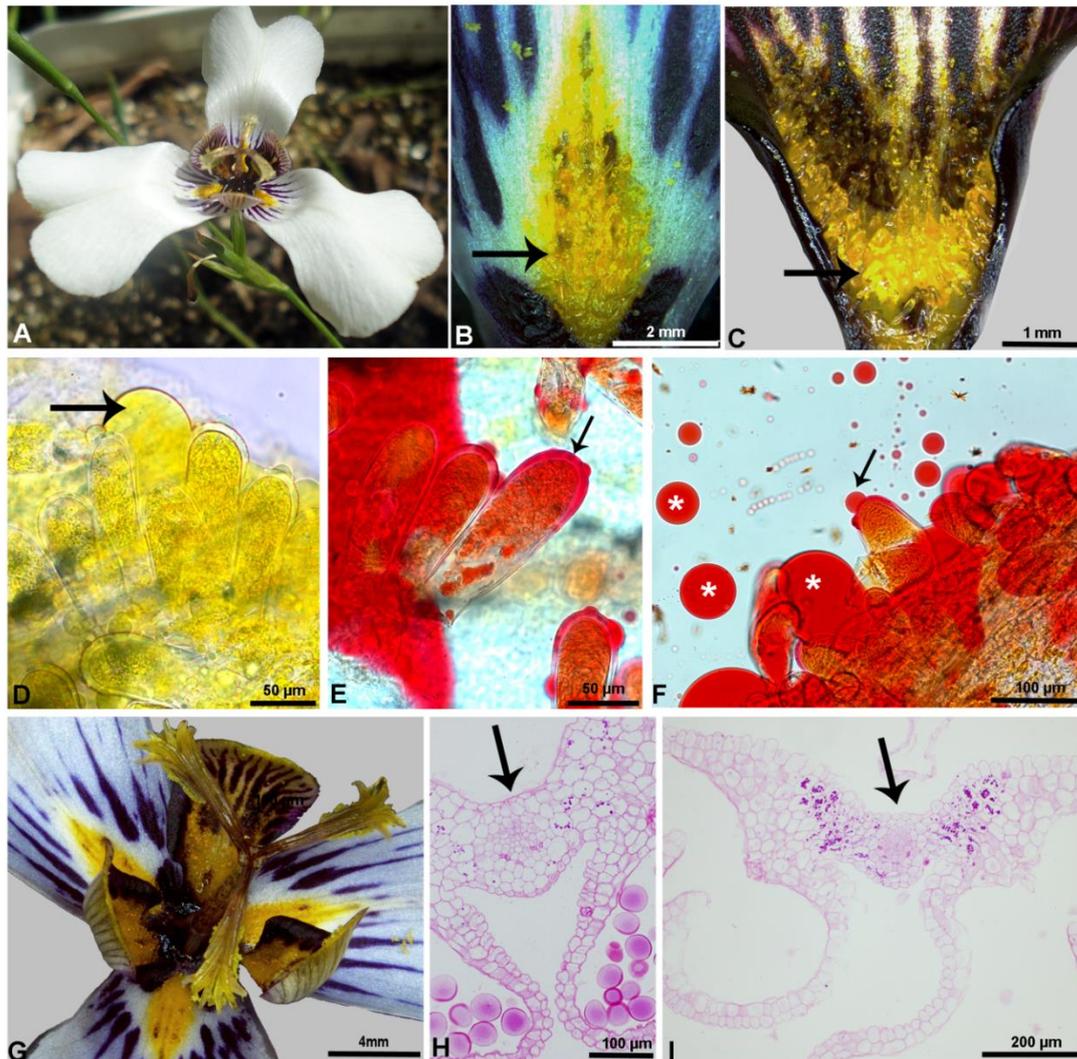


Figure 11: A) Flower of *Herbertia zebrina* Deble; Outer (B) and Inner (C) tepal with an arrow indicating the elaiophore position; D) Transversal section in the inner tepal in fresh material, showing the presence the trichomes with lipids pure and in (E) pre-anthesis and anthesis (F) with Sudan Red 7B test, asterisk showing the secretion. G) Anther; H) Transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis, but these accumulations not decrease in anthesis(I).H, I: Section with 5 μ m.

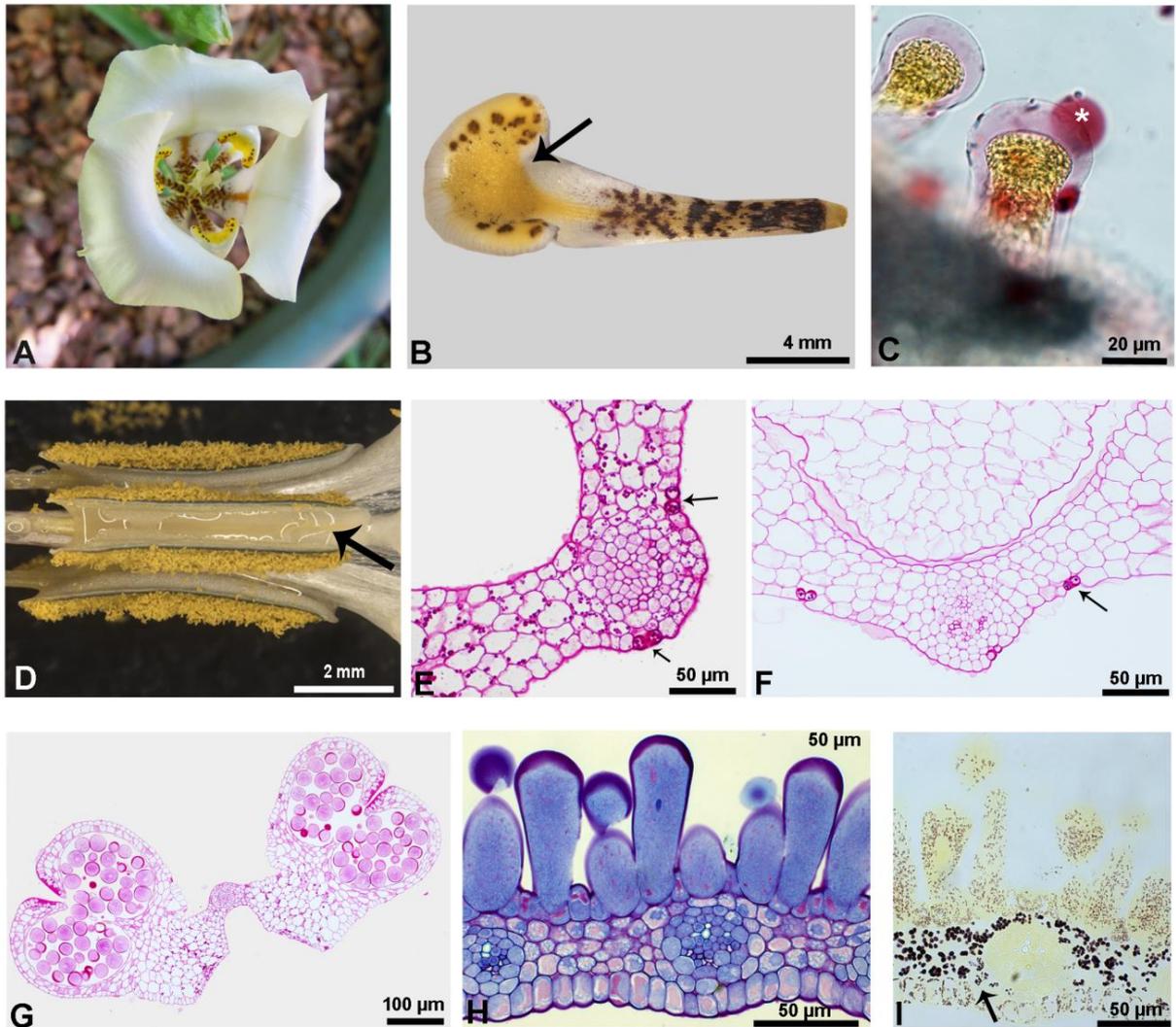


Figure 12: A) Flower of *Cypella hauthalii* subsp. *Opalina* Ravenna; B) Inner tepal with an arrow indicating the elaiophore position; C) Transversal section in the inner tepal in fresh material, showing the presence the trichomes with lipids in anthesis, asterisk showing the secretion, with the Sudan Red 7B test; D) Anther, with an arrow indicating the connective of the anther and secretion. E) Transversal section in the anther, connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis, with arrow indicating the presence of the stomata, and the desapare in anthesis (F) and G) Anther with a little accumulation in the connective tissue. H) Unicellular trichomes stained with toluidine blue and Lugol. (I) E, F, G,H, I: Sections with 5µm.

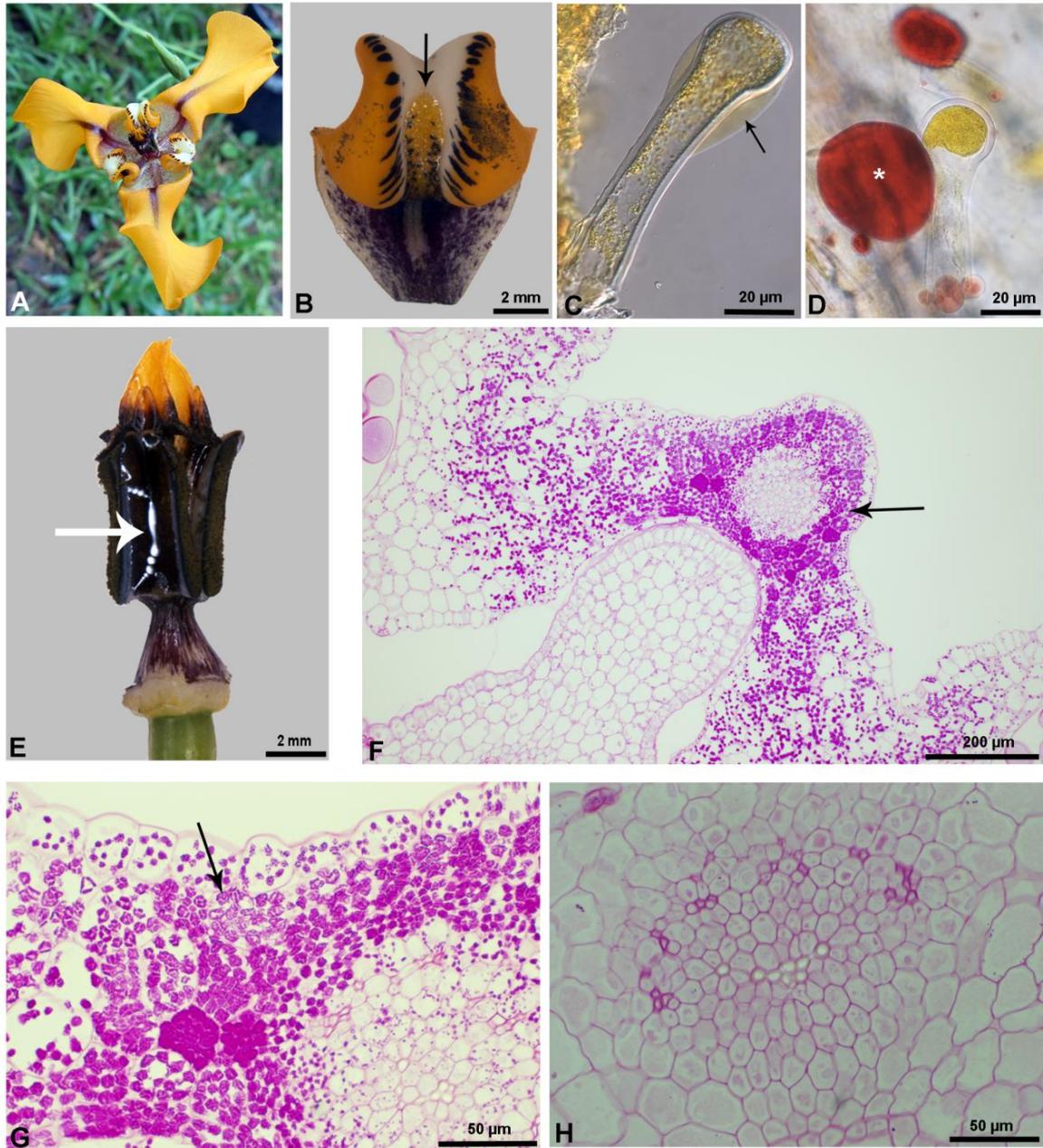


Figure 13: A) Flower of *Cypella herbertii* (Lindl.) Herb.; (B) Inner tepal with an arrow indicating the elaiophore position; (C) Transversal section in the inner tepal in fresh material, showing the presence of the trichomes with lipid secretion (black arrow) and in (D) anthesis stage with Sudan Red 7B test, asterisk showing the secretion. (E) Anther; indicating the secretion of nectar; (F) Transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis (G), and the disappearance of the starch (starch) in the anthesis (H). F, G, H: Section with 5µm.

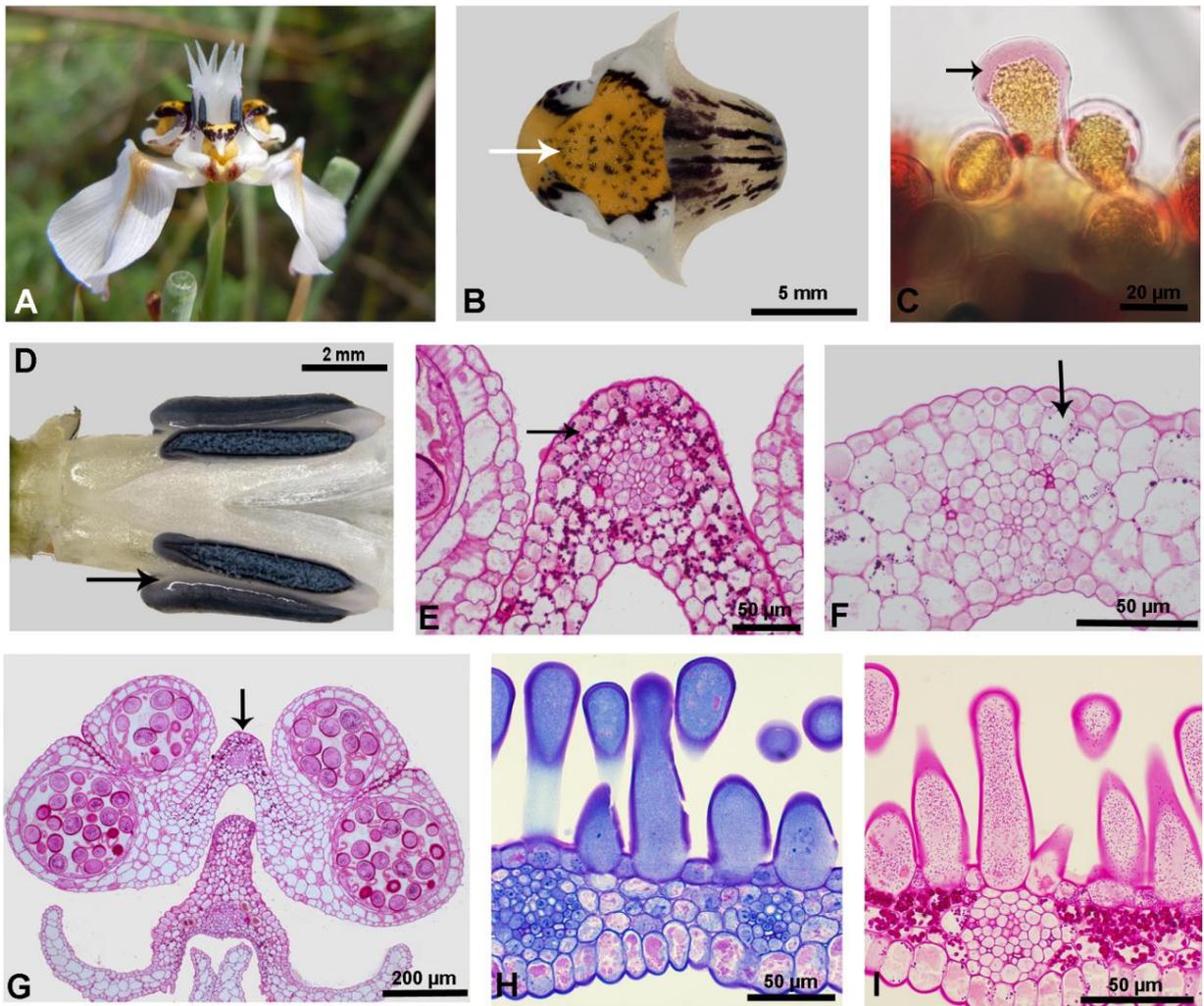


Figure 14: A) Flower of *Cypella luteogibbosa* Deble; (B) Inner tepal with an arrow indicating the elaiophore position; (C) Transversal section in the inner tepal in fresh material, showing the presence of the trichomes with lipids in anthesis stage with Sudan Red 7B test; (D) Anther; with an arrow indicating the secretion of nectar; (E) Transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis (F) and the disappearance of the accumulation in the anthesis. (G) arrow indicating the position of the accumulation of starch in the pre-anthesis stage, with PAS-Schiff test; (H) longitudinal section in elaiophore, showing the unicellular trichome with staining with toluidine blue, and with PAS-Schiff test showing the accumulation of the starch; (E, F, G, H, I): Section with 5µm.

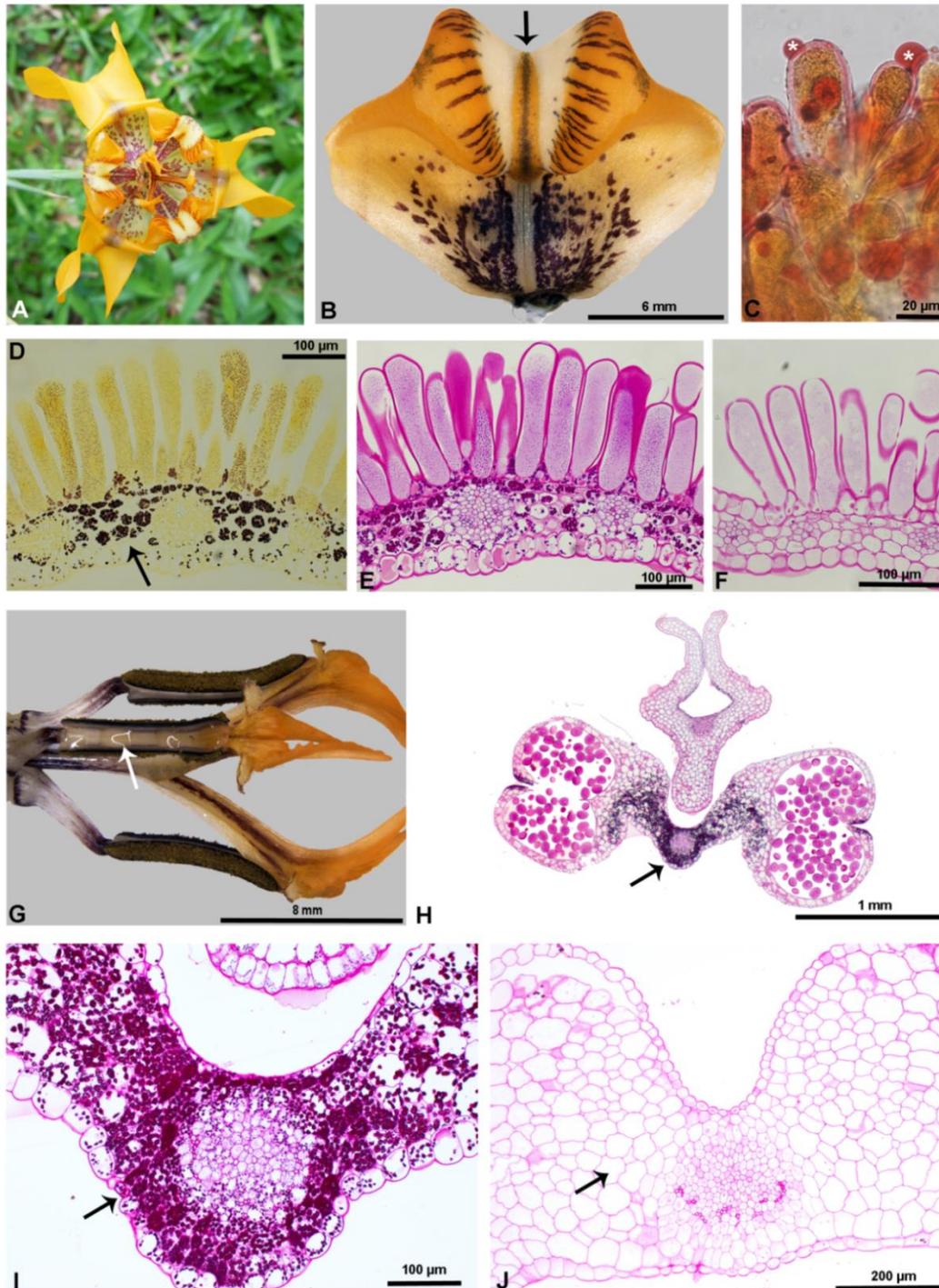


Figure 15: A) Flower of *Cypella magnicristata* Deble; (B) Inner tepal with an arrow indicating the elaiophore position; (C) Transversal section in the inner tepal in fresh material, showing the presence of the trichomes with floral oil in anthesis stage with Sudan Red 7B test, indicated by white asterisk; (D) longitudinal section in elaiophore, showing the unicellular trichome with staining with Lugol, (E) PAS-Schiff test showing the accumulation of starch in pre-anthesis and anthesis (F); (G) Anther; with an arrow indicating the secretion of nectar; (H) Transversal section in the anther with arrow indicating the position of the accumulation in the pre-anthesis stage, with PAS-Schiff test; (I) Transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis, arrow indicating the presence of the stomata (J) and the disappearance of the accumulation in the anthesis. D, E, F, H, I, J: Section with 5µm.

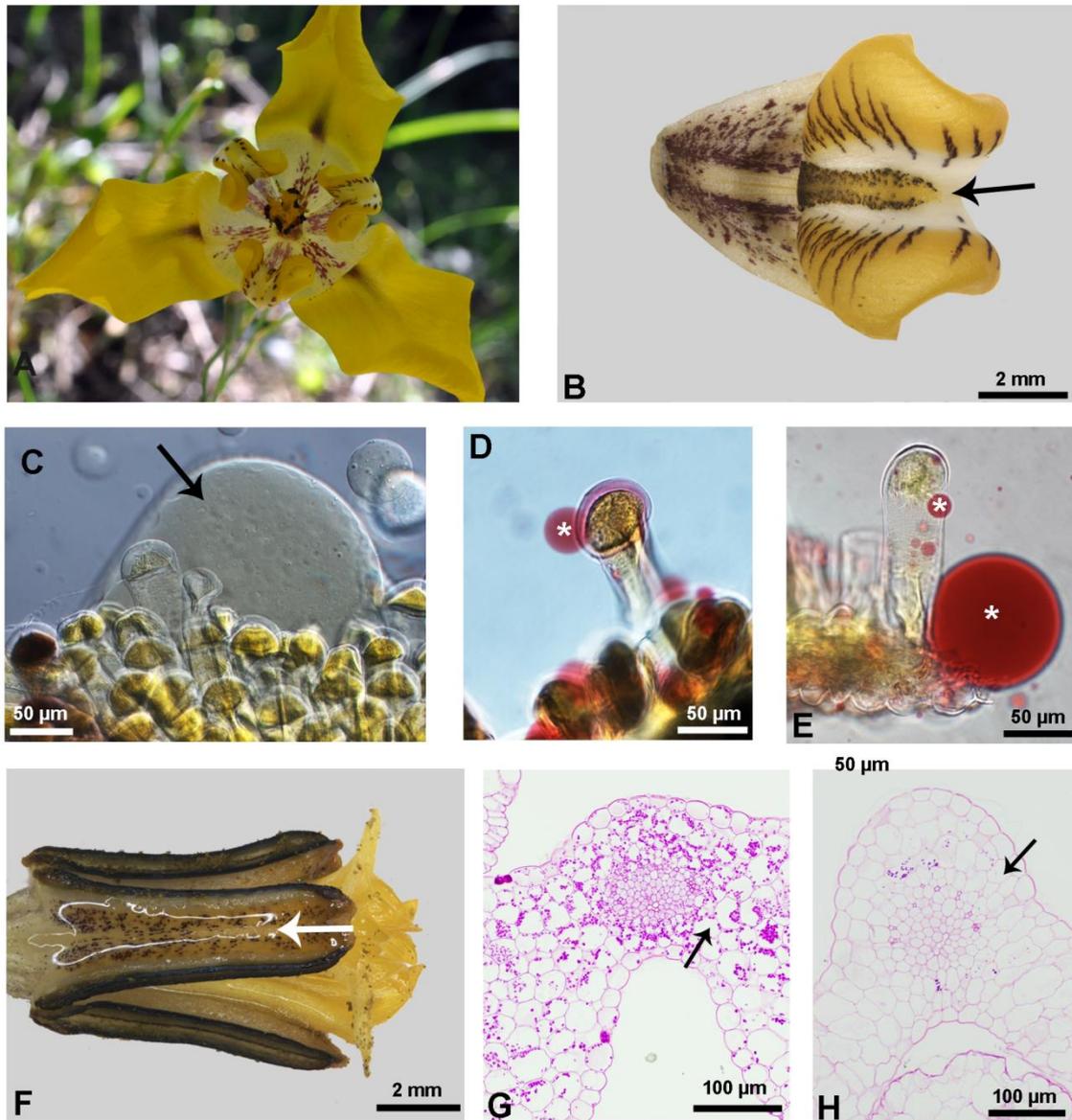


Figure 16: A) Flower of *Cypella pabstiana* Ravenna; (B) Inner tepal with an arrow indicating the elaiophore position; (C) Transversal section in the inner tepal in fresh material, showing the presence of the trichomes with lipids in natural colour (black arrow) and in (D and E) anthesis stage with Sudan Red 7B test, asterisk showing the secretion. (F) Anther; with an arrow indicating the secretion of nectar; (G) Transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis (G), and the accumulation disappears during anthesis (H). F, G, H: Section with 5µm.

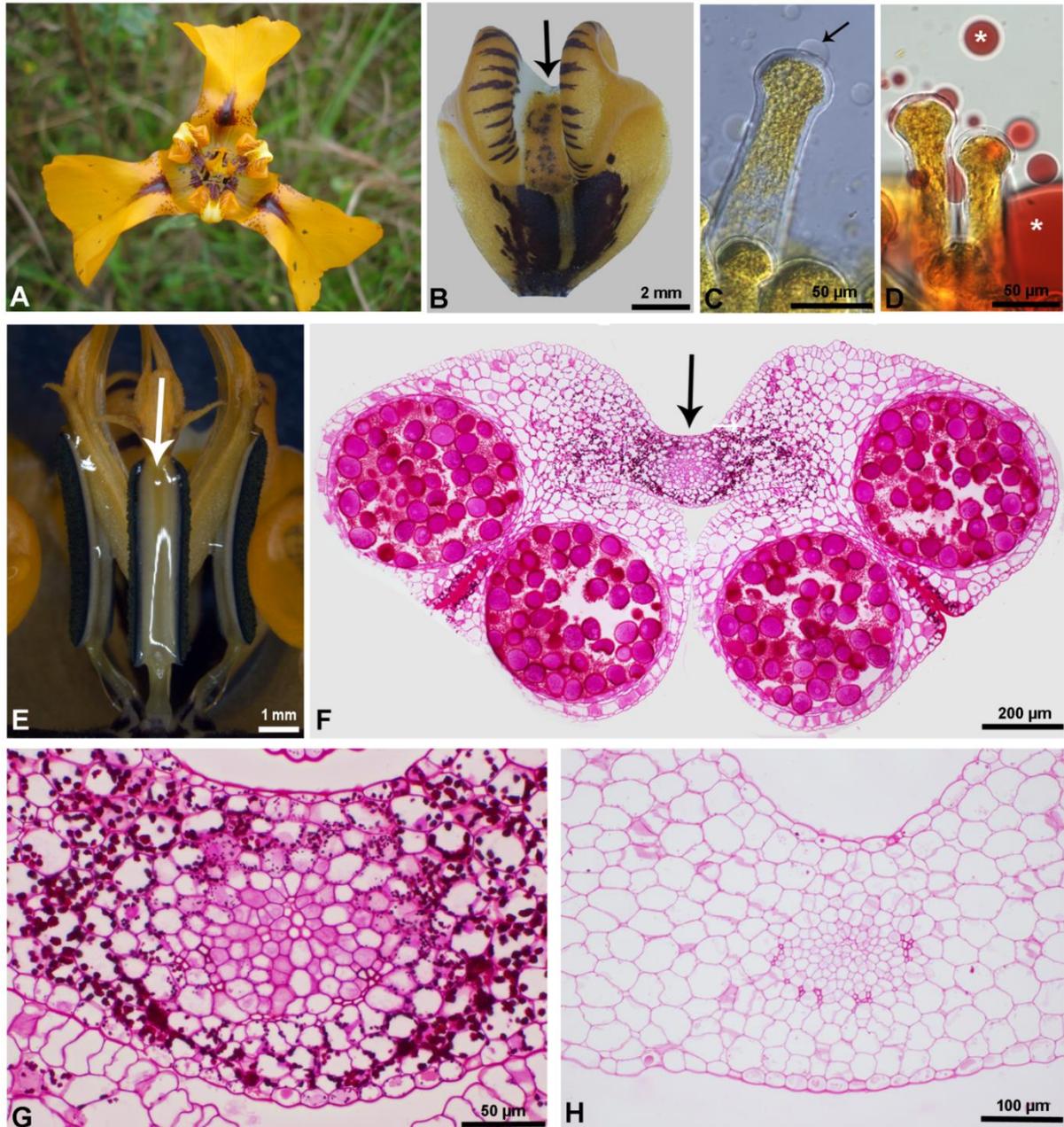


Figure 17: A) Flower of *Cypella* sp. AITA 049; (B) Inner tepal with an arrow indicating the elaiophore position; (C) Transversal section in the inner tepal in fresh material, showing the presence of the trichomes with lipids pure (black arrow) and in (D) anthesis stage with Sudan Red 7B test, asterisk showing the secretion. (E) Anther; with an arrow indicating the secretion of nectar; (E) Anther; with an arrow indicating the secretion of nectar; (F) arrow indicating the position of the accumulation in the pre-anthesis stage, with PAS-Schiff test; (G) Transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis, (H) and the accumulation disappears during anthesis. (F, G, H: Section with 5 μ m).

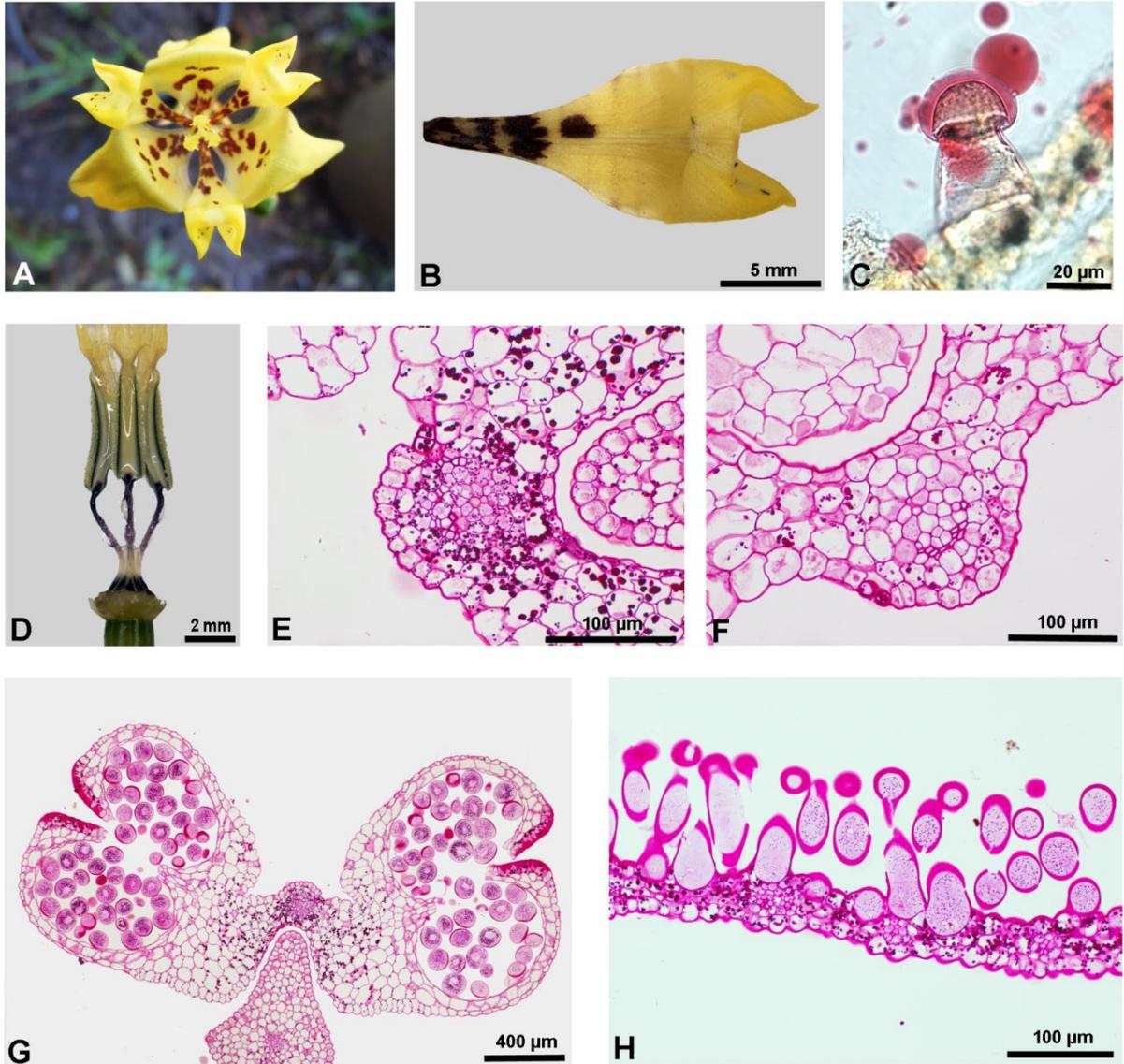


Figure 18: A) Flower of *Cypella pusilla* (Link & Otto) Benth. & Hook. f. ex B.D. Jacks.; (B) Inner tepal with the elaiophore; (C) Transversal section in the inner tepal in fresh material, showing the presence the trichomes in anthesis stage with Sudan Red 7B test. D) Anther; with secretion of nectar; E) Transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis, (F) and the disappearance of the accumulation in the anthesis. G) arrow the position of the accumulation in the pre-anthesis stage, with PAS-Schiff test; G) Transversal section in the anther, the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis, (H) trichomes in pre-anthesis show the accumulation of starch. E, F, G, H: Section with 5μm.

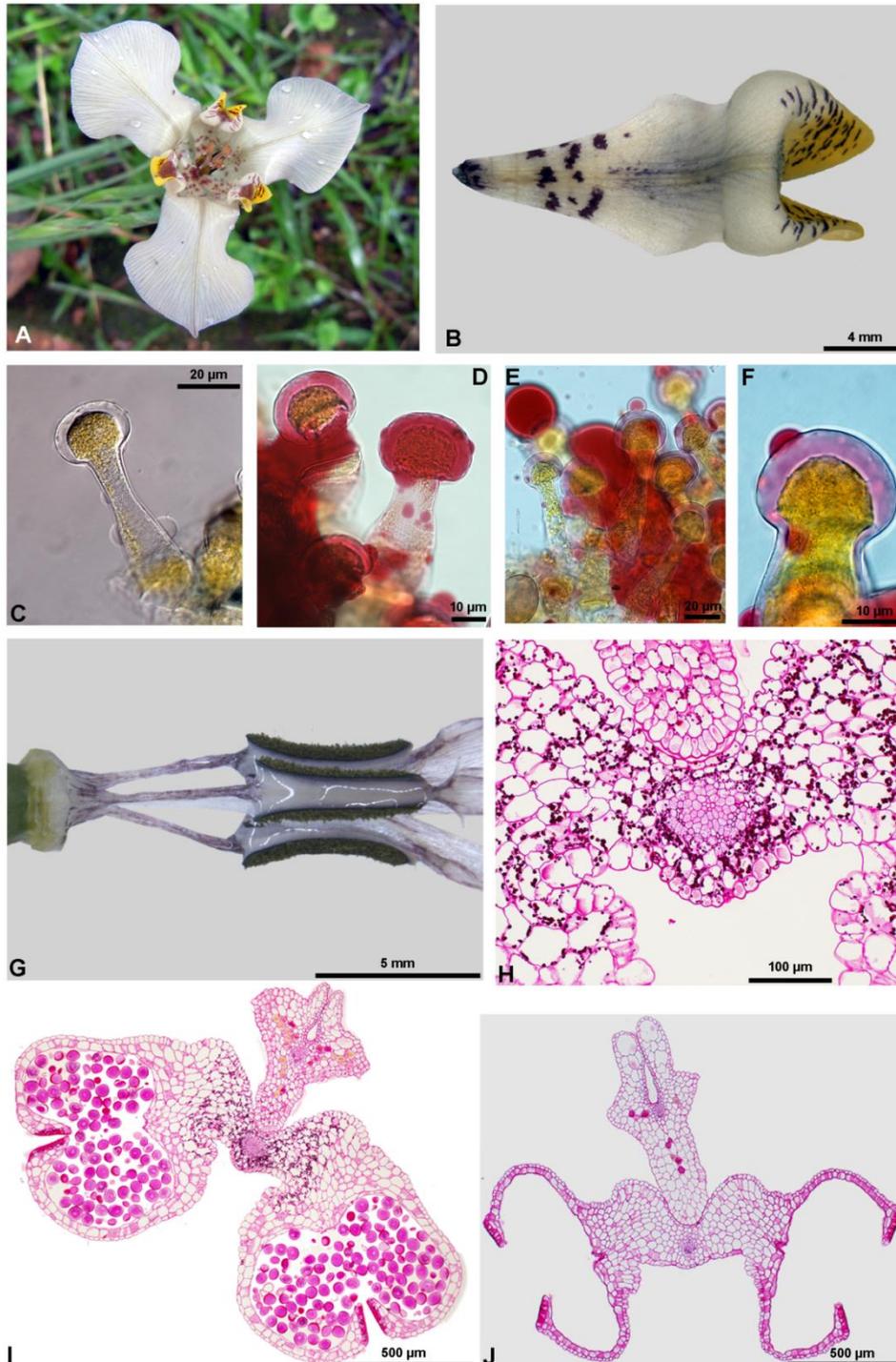


Figure 19: A) Flower of *Cypella discolor* Ravenna; (B) Inner tepal with the elaiophore; (C) Transversal section in the inner tepal in fresh material, with lipids in natural colour, showing the presence the trichomes in pre-anthesis stage (D) and (E and F) anthesis stage with Sudan Red 7B test. G) Anther; with secretion of nectar; H) Transversal section in the anther, the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis (I), (J) and the accumulation disappear during anthesis. H, I, J: Section with 5 μ m.

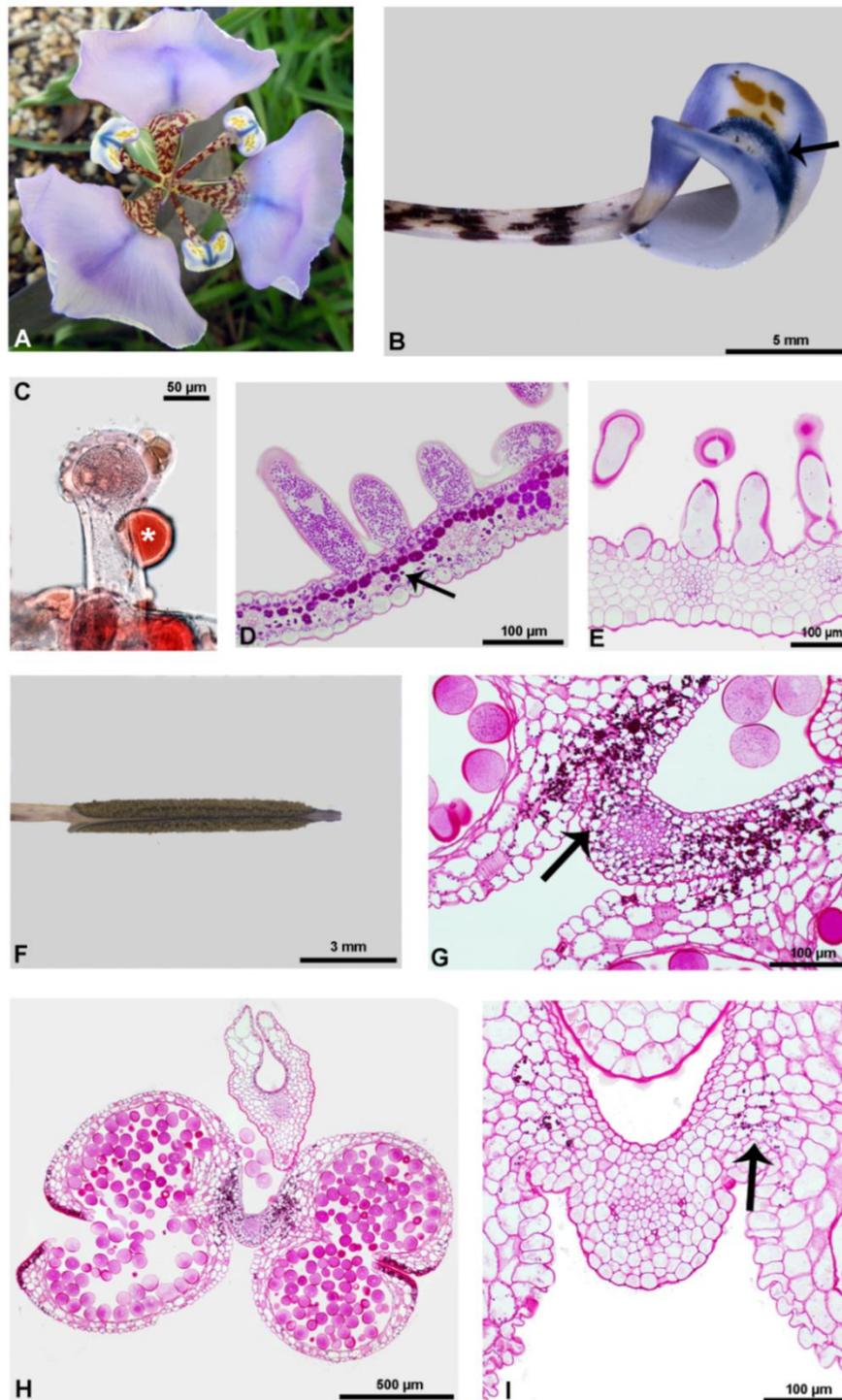


Figure 20: A) Flower of *Onira unguiculata* (Baker) Ravenna; (B) Inner tepal with an arrow indicating the elaiophore position; (C) Transversal section in the inner tepal in fresh material, showing the presence the trichomes with Sudan Red 7B test, indicated by white asterisk; (D) longitudinal section in elaiophore, showing the unicellular trichome with staining PAS-Schiff test showing the accumulation of the starch in pre-anthesis and anthesis (E); (F) Anther; (G) Transversal section in the anther with arrow indicating the position of the accumulation in the pre-anthesis stage, with PAS-Schiff test; (H) Transversal section in the anther, with an arrow indicating the connective tissue accumulation in the presence of starch with PAS-Schiff test in pre-anthesis; (I) and the accumulation disappear during anthesis. D, E, G, H, I: Section with 5µm.

B) Staminal nectaries

B.1. Presence of secretion among genera

The observation of the secretion in the surface of the anther's connective in *Cypella* and *Onira*, the additional measurements with the refractometer and the glucotest and histochemical tests, suggest that these two genera have nectaries in the connective tissue of the anther. Longitudinal sections in the anther filaments showed the absence of accumulation of starch in this region, which indicates that nectar producing region in the anther connective tissue.

The structure of connective tissue in the anther in all genera analysed is similar, differing only in the number of layers of parenchyma and the degree of accumulation of starch. The species *Calydorea alba* showed no secretion in the anther connective tissue, however during the analyses of pre-anthesis some accumulation of starch was visible in the parenchyma, which disappeared after anthesis. In *Catila amabilis* no secretion was observed in the anther connective tissue, however, during the analysis in pre-anthesis a moderate accumulation of starch was seen in the parenchyma. The accumulation of starch did not disappear after anthesis, only decreased, differently from the others species analysed. In the monotypic genus *Kelissa* secretion was not observed in the connective tissue of the anthers. During the pre-anthesis the analysis showed a small storage of the starch in parenchyma cells, which partially disappeared after the anthesis.

In species of *Herbertia* no secretion was observed in the connective tissue of the anthers. During the pre-anthesis analysis, the accumulation of starch in the parenchyma was evidenced, however, there were differences between examined species. In *Herbertia pulchella*, the starch accumulation disappeared after the anthesis, and in *Herbertia zebrina* it remained even after the anthesis.

B.2. Anatomical features and nectar analysis

The nectary consisted of a single-layered epidermis with the presence of sparse stomata and 3 to 5 layers of subepidermal nectariferous parenchyma. The epidermis is composed of small cells, the cytoplasm of each epidermal cell, including the stomata, showing the accumulation of starch, in pre-anthesis stage.

Subepidermal nectariferous parenchyma cells of all species showed an accumulation of starch in *Cypella*, but the larger grains appear to concentrate around the vascular bundles. The nectary was supplied by a single main vascular bundle. These bundles contained primary elements of xylem and phloem. Observations were made in all extension of the anther in transversal and longitudinal section (Figure 21). The anthers of *Cypella* have a slender vascular bundle and nectary parenchyma consists of many cells with accumulation of starch indicating a nectar-producing region.

In the comparison between nectar producing (such as *Cypella*) and non producers, (such as *Catila*) no clear differences were observed between staminal vascular bundles. These analyses probably indicate the existence of a non-structured nectary in the genera *Cypella* and *Onira*. In addition to structural analysis, measurements of nectar secretion was carried out for to verify sugars percentage in the nectar producing region. These measurements are shown in table 3.

The connective in *Cypella* has about 1 mm of width and the length can vary from 3.5 mm (*Cypella osteniana*) to 7 mm (*Cypella magnicristata*). Consequently, the volume of secretion also varies, although it is difficult to estimate quantitatively. Observations in the field showed that species such as *Cypella herbertii* produce a lot of nectar unlike species such as *Cypella luteogibbosa* which produces a moderate amount. The same pattern can be observed when comparing the levels of sugar in the nectar and accumulation of starch in the anther connective. Species such as *C. herbertii*, *C. magnicristata* and *Cypella* sp. AITA049 exhibited a further accumulation of starch compared to *C. discolor*, *C. pusilla* and *C. hauthalii* ssp. *opalina*. The species *Onira unguiculata* has a connective of about 0.5 mm width and length with approximately 8 mm, and the nectar secretion was very small, which might indicate a possible reduction of the function of the nectary tissue. The volume of nectary secretion is smaller than in the genus *Cypella*. In *Onira* the nectar is difficult to be collected and further analyzed. However, structural analyses showed the accumulation of starch in the anther connective in addition of the presence of the secretion confirming the nectaries function.

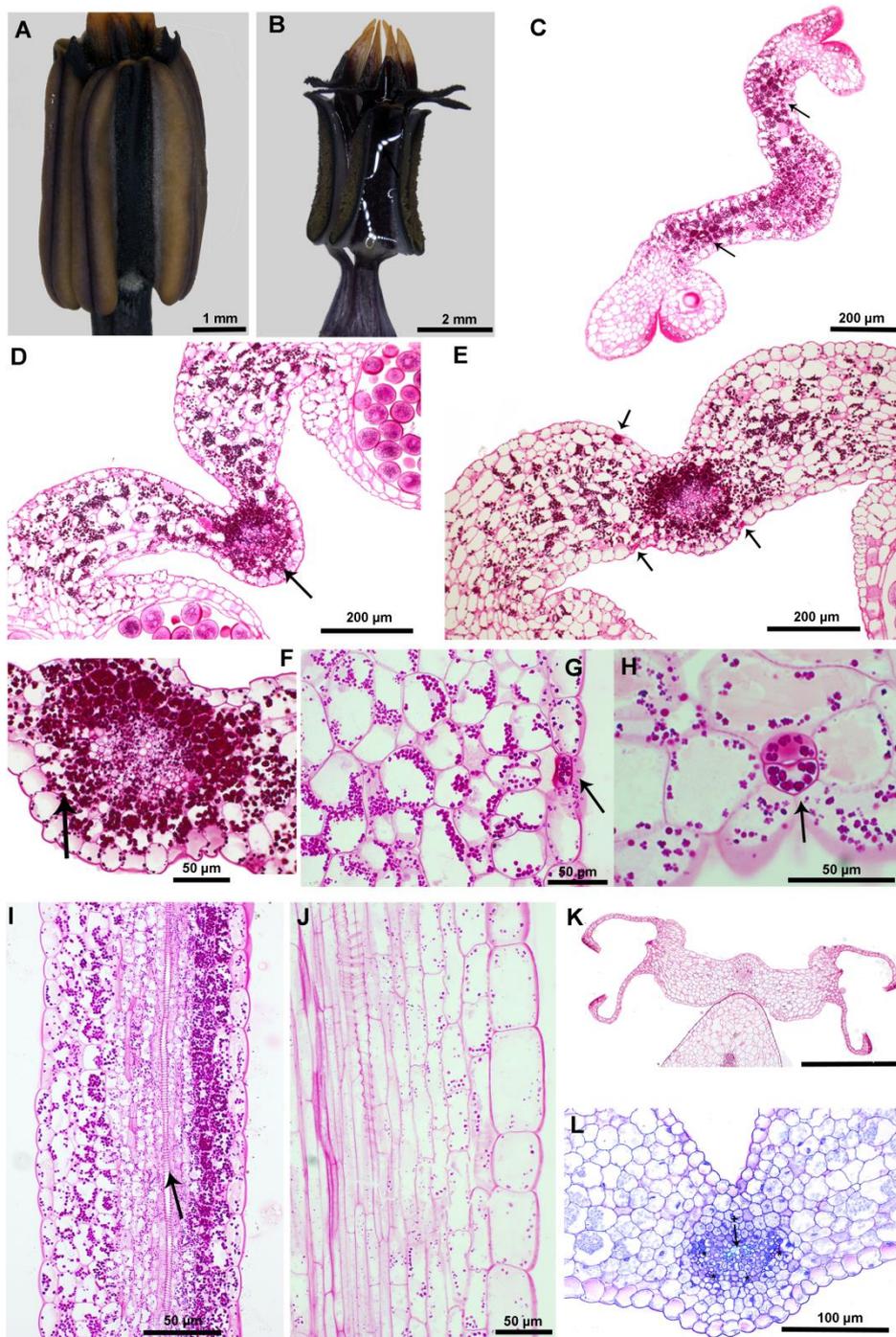


Figure 21: Staminial nectaries in *C. herbertii* (Lindl.) Herb. A) Anther in pre-anthesis stage. B) Anther in anthesis stage; Transversal section in connective tissue showing the development of nectaries, in upper part of connective tissue (C) in middle (D) and in the base (E) of connective tissue (F) G) black arrow showing the presence of stomata in longitudinal section and in H) in paradermic section with PAS-Schiff. I) Longitudinal section in connective tissue showing in black arrow the position of xylem with PAS-Schiff. J) Longitudinal section in the filament of the anther, showing the absence of accumulation of starch. K) Transversal section in anthesis stage with PAS-Schiff. L) Transversal section indicating the xylem and phloem with Toluidine blue. Section with 5 μm.

Table 3: Measurements of nectar species of *Cypella* and *Onira* obtained by refractometer (%) and also using the glucotest ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$);

Species	Voucher	Analyses				
		Refractometer %			Glucotest ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	
		Variation	Arithmetic Average	Standard deviation	Variation	Arithmetic average
<i>Cypella</i> sp.	EC ⁽¹⁾ 715	11 - 16.5	12.5	2.12	> 6.00	Hi
<i>Cypella</i> sp.	A ⁽²⁾ 049	7 - 22	14.5	10.61	4.77 - 5.68	5.22
<i>Cypella aquatilis</i>	EC ⁽¹⁾ 714	10 - 16.5	13	4.24	5.00 > 6.00	Hi
<i>Cypella discolor</i>	ESA ⁽³⁾ 011	9 - 14.5	9.5	1.15	-	-
<i>Cypella aff. discolor</i>	ECP ⁽⁴⁾ 745	7.5 - 13	10.67	0.71	3.39 > 6.00	Hi
<i>Cypella fucata</i>	P ⁽⁵⁾ 101	-	-	-	5.42 > 6.00	Hi
<i>Cypella fucata</i>	ECIP ⁽⁶⁾ 847	9 - 11	10	1.41	-	-
<i>Cypella fucata</i>	ECIP ⁽⁶⁾ 860	11.5 - 18	14.25	2.5	> 6.00	Hi
<i>Cypella hauthalii</i> subsp. <i>hauthalii</i>	ECIPSC ⁽⁷⁾ 820	8 - 10	9	0.82	5.35 > 6.00	Hi
<i>Cypella hauthalii</i> subsp.	EC ⁽¹⁾ 728	8 - 13	12.33	0.58	-	-
<i>Cypella hauthalii</i> subsp.	ECIP ⁽⁶⁾ 827	8 - 10	9	0.82	5.55 > 6.00	Hi

<i>Cypella hauthalii</i> subsp.	ECP ⁽⁴⁾ 833	8 - 10.5	8.67	0.58	-	-
<i>Cypella herbertii</i>	TA ⁽⁸⁾ 260	11 - 18	15.5	2.52	4.02 > 6.00	Hi
<i>Cypella herbertii</i>	ESC ⁽⁹⁾ 490	10 - 16	13.25	3.2	5.24 > 6.00	Hi
<i>Cypella herbertii</i>	ECIP ⁽⁶⁾ 862	9,8 - 12	11.5	0.71	5.72 > 6.00	Hi
<i>Cypella herbertii</i>	ECIP ⁽⁶⁾ 867	12 - 20	16	3.37	> 6.00	Hi
<i>Cypella herbertii</i>	ECIP ⁽⁶⁾ 875	12 - 17	15	2.83	5.58 > 6.00	Hi
<i>Cypella herbertii</i>	ECIP ⁽⁶⁾ 876	13 - 20	16.25	2.87	> 6.00	Hi
<i>Cypella herbertii</i> subsp. <i>brevicristata</i>	ECIP ⁽⁶⁾ 839	14 - 19	15.25	1.26	> 6.00	Hi
<i>Cypella pabstiana</i>	ECP ⁽⁴⁾ 741	9.5 - 10	10	-	5.78 > 6.00	Hi
<i>Cypella osteniana</i>	ECIP ⁽⁶⁾ 851	7.5 - 10	8.67	1.15	> 6.00	Hi
<i>Cypella</i> sp.	ECIP ⁽⁶⁾ 869	10 - 13	11.25	1.5	> 6.00	Hi
<i>Cypella</i> sp.	ECIP ⁽⁶⁾ 874	8 - 10	8.67	1.15	4.96 > 6.00	-
<i>Onira unguiculata</i>	ECIP ⁽⁶⁾ 865	-	-	-	>6.00	Hi

1) L. Eggers & Chauveau; (2) A. M. Aita, (3) E. Stiehl-Alves, (4) L. Eggers, O. Chauveau & T. Pastori, (5) T. Pastori, (6) L. Eggers, O. Chauveau, C. Inácio & T. Pastori, (7) L. Eggers, O. Chauveau, C. Inácio, T. Pastori & T.T. Souza-Chies, (8) T. Alves, (9) L. Eggers & T.T. Souza-Chies; Hi : >6.00 µg/µl

DISCUSSION

The American tribes Iridoideae display an unusual diversity of pollination system, including species that offer different rewards to pollinators. This study focused in clade A of Tigridieae confirming the existence of three types of floral rewards, highlighting in this work the presence of nectaries and elaiophores. Three different combinations can be distinguished in the clade A of Tigridieae: flowers that offer only pollen, flowers that offer pollen and oils, and flowers that offer pollen, oils and nectar.

According to the phylogenetic relationships observed among the genera of clade A (Chauveau et al., 2012), the ancestral state in clade A of Tigridieae is the absence of secretory structures. The presence of elaiophores in inner tepals and staminal nectaries evolved in the common ancestor of *Cypella*, *Kelissa*, *Onira* and *Herbertia* (Chauveau et al., 2012). In this case, *Calydorea* and *Catila* offer only pollen as a reward, representing an ancestral state (Chauveau et al., 2012). The absence of nectar secretion of the connective of the anthers in *Herbertia* and *Kelissa* probably resulted of a reversion to the loss of activity nectariferous tissue. However, in *Herbertia*, the position of the elaiophores in inner and outer tepals is an innovation in the clade (Chauveau et al., 2012).

Tigridieae occur exclusively in the New World, however these different patterns of rewards to pollinators offered in *Cypella* is associated with southern African genera of Iridaceae that have the same characteristics of pollination strategy. This differentiated strategy occurs for example in African genera of Iridaceae, i.e, *Gladiolus* L. (Goldblatt et al. 2001) and *Tritoniopsis* L. Bolus (Manning and Goldblatt, 2002). In addition, the only producing floral oil outside Iridoideae and outside America is *Tritoniopsis parviflora* (Jacq.) G.J.Lewis. This species is the only oil-producing species from South Africa and the subfamily Crocoideae. Moreover, *Tritoniopsis parviflora* is the only species that produces floral oil and nectar at the same time (Manning and Goldblatt, 2002).

The intermediate morphology between two pollination systems, indicate the presence of bimodal systems of the pollination (Manning and Goldblatt, 2002). According to Goldblatt and Manning (2006), bimodal systems using two classes of

pollinators is more common in the family Iridaceae. In the case of genera *Cypella*, the unusual system of floral rewards suggest the bimodal pollination strategy, however, more analyses are necessary to confirm this hypothesis.

Perigonal elaiophores

Glandular trichomes secreting lipids occur in many families, e.g. Solanaceae, Orchidaceae, and Iridaceae (Vogel, 1974, Fanh, 1979, Goldblatt and Manning, 2008, Chauveau et al. 2011). In Iridaceae, a study characterizing the floral rewards in the tribe Sisyrinchieae showed the existence of trichomal elaiophores in the genus *Sisyrinchium* (Chauveau et al., 2011; Silverio et al., 2012). The trichomatic elaiophores may be located in all parts of the flower, including the filaments of stamens, but generally they are located in the perianth (Buchmann, 1987). In Iridaceae, all the species analysed have trichomatic elaiophores. The only exception is *Tritoniopsis parviflora* that has epithelial elaiophores located on the inner tepals (Manning and Goldblatt, 2002).

The trichomal elaiophores are present in most species of Tigridieae, but in some cases it was not possible to confirm the results by histological tests. An example for this is the genus *Catila*, although the original description specifies the presence of elaiophores on the inner tepals of *Catila amabilis* (Ravenna, 1983). However, during this work, the presence of trichomes was verified, but without lipids production and it does not characterize the existence of elaiophores. Ravenna (1983) didn't test this information, therefore, or there is an error in the original description of *Catila amabilis* where elaiophores are not present in this species, or there are some variations at the intraspecific level.

The elaiophores were identified in all the species of *Cypella* with Sudan Red 7B test. In these species, the lipids are secreted spontaneously, probably through membrane permeation, which differs for example from some species of *Sisyrinchium* (Iridoideae: Iridaceae) where the lipids are accumulated in the blister, and the contact of pollinations is essential for the oil-liberation (Silverio et al., 2012). Another different point is the accumulation of high secretion outside the

trichome, in the space between each trichome, filling the entire region of elaiophore, forming large accumulation of oil, not occurring in *Sisyrinchium*, for example (Silverio et al., 2012).

Staminal Nectaries

In Iridaceae, the secretion of nectar was identified from septal nectaries located within the radial walls of the ovary, or in perigonal nectaries located on the tepals (Vogel, 1974; Rudall et al., 2003). *Cypella* and *Onira* are the unique genera of Iridaceae where nectar is produced by nectaries of the anthers. Staminal nectaries can be located on the filaments, in the tube formed by the fusion of the filaments, or in the connective tissue of anthers (Fahn, 1979). In *Cypella* and *Onira*, nectar is produced in the connective tissue, which exhibit important diagnostic traits.

The nectariferous tissues are generally characterized by the presence of small cells with thin walls and dense cytoplasm. The nectaries can be divided into structural when they're constituted by specialized tissues which differ in structure from neighbouring tissue and non-structural when they do not differ in structure (Zimmermann, 1932; Fahn, 1979). The nectariferous tissue of structural nectaries contains vascular bundles with very well developed vascular tissue and frequently consistent of the high proportion of phloem elements (Fahn, 1990). However, this trait cannot be clearly observed in non-structural nectaries, because of that distinct nectariferous tissue from the surrounding tissues. Some differentiation may be found in the nectariferous tissue, such as the accumulation of starch, the presence of intercellular spaces next to stomata or below the epidermis, the presence of the nectary stomata and especially the concentration of sugars.

In the case of *Cypella* and *Onira*, this difference was not observed, and the small difference in all analysed species suggests that the nectaries are non-structural as defined by Zimmerman (1932). Non-structural nectaries are found in many plants and different plant organs, for example, the sepals of *Paeonia*

albiflora Pall. (Fahn, 1990). In some Melastomataceae, non-structural nectary is described in the stamens (Stein and Tobe, 1989; Vogel, 1997).

The accumulation of starch in the connective tissue of the anther in pre-anthesis stage and the decrease and disappearance during anthesis indicates that this storage is being used in the formation of nectar. In addition, the period of disappearance of this starch in anthesis stage coincides with the onset of nectar secretion during anthesis.

The presence of stomata in the connective of the anthers of all the species of *Cypella* studied here suggests that the secretion in nectaries may occur by stomata. Secretion of nectar by stomata in floral nectaries occur floral occurs in several angiosperm lineages (Bernardello, 2007), but in monocotyledons stomatal nectaries were considered absent (Endress, 1995). However, some records of this type of secretion were made in Orchidaceae, for example, in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Davies et al., 2005) and *Disa* P.J. Bergius (Hobbhahn et al., 2013). Stomata involved in nectar secretion have been described as 'modified' because these structures do not finely regulate low rates of nectar as they do regulate gas exchange within a plant. To demonstrate this hypothesis more analyses are necessary to clarify the mode of secretion.

The presences of nectary on the connective tissue of the anther differ from the other genera, and suggest that the acquisition of staminal nectaries is a derived condition in the family. These observations suggest that repeated shifts between of rewards to pollination combined may have played a role in the diversification in the clade A of Tigridaeae in Southern America, showing a new system in the American Iridoideae. In addition, glandular structures, such as elaiophores and nectaries, are among the characters involved in these processes, a hypothesis that requires further investigation.

This research on nectar and oil-producing in flowers of Iridaceae should help guiding future researches. Considering the diversity of species, form and reward in the Tigridaeae, it would be important to study the hypothesis about bimodal pollination in *Cypella* and *Onira*, especially through studies of pollination.

LITERATURE CITED

ASCENSÃO, L. 2003. **Técnicas Histoquímicas Convencionais e de Microscopia de Fluorescência Aplicada em espécies de Cerrado**. Univ. Est. Campinas. Apostila.

BERNARDELLO, G. 2007. A systematic survey of floral nectaries. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E, eds. *Nectaries and nectar*. Dordrecht: Springer, 19–128.

BRUNDRETT, M.C, KENDRICK B, PETERSON CA. 1991. Efficient lipid staining in plant material with sudan red 7B or fluorol yellow 088 in polyethylene glycol glycerol. *Biotechnic and Histochemistry* 66(3): 111-116.

BUCHMANN, SL. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 343–369.

CHAUVEAU, O., EGGERS, L., RAQUIN,C., SILVÉRIO, A., BROWN, S., COULOUX, A., CRUAUD, C., KALTCHUK-SANTOS, E., YOCKTENG, R., SOUZA-CHIES, T.T., 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(8): 1287–1312.

CHAUVEAU, O., EGGERS, L., SOUZA-CHIES, T.T., NADOT, S. 2012. Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera. *Annals of Botany* 110: 713–729.

DAUMANN E. 1970. Das blütennektarium der monocotyledonen unter besonderer berücksichtigung seiner systematischen und phylogenetischen bedeutung. *Feddes Repertorium*, 80(7-8): 463-590.

DAVIES, K.L., STPICZYNSKA, M., GREGG, A. 2005. Nectar-secreting floral stomata in *Maxillaria anceps* Ames & C. Schweinf. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 96: 217–227.

DEVOTO, M., MEDAN, D. 2008. Expected mating system, floral diversity and flower visitors of five species of Iridaceae of the Argentine pampas. *Acta Botanica Venezuelica*. 31: 425-434.

ENDRESS, P.K. 1995. Major evolutionary traits of monocot flowers. In: Rudall PJ, Cribb PJ, Cutler DF, Humphries CJ. eds. *Monocotyledons: systematics and evolution*. London: Royal Botanic Gardens, Kew.

ESCALANTE-PÉREZ, M., HEIL, M. 2012. Nectar Secretion: Its Ecological Context and Physiological Regulation. In: *Secretions and Exudates in Biological Systems*. 12:187-219.

FAHN, A. 1979. Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. *American Journal of Botany* 66: 977–985.

FAHN, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol.* 108: 229–257.

FAHN A. 1990. *Plant anatomy*. 4th edn. Oxford: Pergamon Press.

FAHN, A. 2000. Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research* 31: 37–75

GOLDBLATT, P. 1993. The woody Iridaceae: systematics, biology and evolution of *Nivenia*, *Klattia* and *Witsenia*. *Timber Press*, Portland, Oregon, USA.

GOLDBLATT, P., BERNHARDT, P. E MANNING, J.C. 1998. Pollination of petaloid geophytes by monkey beetles (Scarabaeidae: Ruteliinae: Hopliini) in southern Africa. *Ann Mo Bot Gard.* 85: 215–230.

GOLDBLATT, P., MANNING, J.C, BERNHARDT P. 2001. Radiation of pollination systems in *Gladiolus* (Iridaceae: Crocoideae): a progression from a generalist to a specialist pollination system. *Adansonia.* 24: 243-262.

GOLDBLATT P, MANNING JC. 2006. Radiation of pollination systems in the Iridaceae of sub-Saharan Africa. *Annals of Botany* 97: 317–344.

GOLDBLATT P, MANNING JC. 2008. *The Iris family – natural history and classification*. Portland, OR: Timber Press.

GOLDBLATT, P., RODRIGUEZ, A., POWELL, M.P., ET AL. 2008. Iridaceae 'Out of Australasia'? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. *Systematic Botany* 33: 495–508.

HOBBAHN, N., JOHNSON, S.D., BYTEBIER, B., YEUNG, E.C., HARDER, L.D. 2013. The evolution of floral nectaries in *Disa* (Orchidaceae: Disinae): recapitulation or diversifying innovation? *Annals of Botany* 112 (7): 1303-1319.

JOHANSEN, D. A. 1940. Plant microtechnique. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc. 523 p.

MCDOWELL, E. M. & TRUMP, B. (1976). Histological fixatives for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology & Laboratory of Medicine*, 100: 405-414.

MANNING, J.C., GOLDBLATT, P. 2002. The pollination of *Tritionopsis parviflora* (Iridaceae) by the oil-collecting bee *Rediviva gigas* (Hymenoptera: Melittidae): the first record of oil-secretion in African Iridaceae. *South African Journal of Botany* 68: 171–176.

MICHENER, C.D. 2007. The bees of the world. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.

NEFF, J.L., SIMPSON, B.B. 2005. Other rewards: oils, resins, and gums. In: Dafni A, Kevan PG, Husband BC. eds. *Practical pollination biology*. Cambridge, UK: Enviroquest, 314–328.

O'BRIEN, T. P. & MCCULLY, M. E. 1981. The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods. Melbourne, Termacarphi Pty Ltd. 345p.

RAVENNA, P. 1983. *Catila* and *Onira*, two new genera of South American Iridaceae. *Nordic Journal of Botany* 3: 197–205.

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

RODRÍGUEZ, A., SYTSMA, K.J. 2006. Phylogenetics of the “Tiger-flower” group (Tigridieae: Iridaceae) based on molecular and morphological evidence. *Aliso* 22: 412–424.

RUDALL, P.J, MANNING, J.C, GOLDBLATT, P. 2003. Evolution of floral nectaries in Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 90: 613–631.

SIMPSON, B.B, NEFF, J.L. 1983. Evolution and diversity of floral rewards. In: Jones CE, Little RJ. eds. *Handbook of experimental pollination biology*. New York: Scientific and Academic Editions.

SILVÉRIO, A. NADOT, SOUZA-CHIES, T.T, CHAUVEAU, O. 2012. Floral rewards in the tribe Sisyrinchieae (Iridaceae): oil as an alternative to pollen and nectar? *Sexual Plant Reproduction* 25:267–279

STEIN, B.A., TOBE, H. 1989. Floral nectaries in Melastomataceae and their systematic and evolutionary implications. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 76: 519–531.

VOGEL, S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Abhandlungen Akademie Wissenschaften Mathematisch-Naturwissenschaften Klasse, Tropische und Subtropische Pflanzenwelt* 7: 1–267.

VOGEL, S. 1997. Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives. I. Substitutive nectaries. **Flora**. 192: 305–333.

ZIMMERMAN, J. 1932. Über die extrafloralen Nektarien der Angiospermen. *Beihefte zum Botanischen Centralblatt Abt I* 49: 99–196.

WEBSTER, P. 2007. Microwave-Assisted Processing and Embedding for Transmission Electron Microscopy. **Electron Microscopy**. *Methods in Molecular Biology*. 369: 47-65.

CAPÍTULO III



**Relações Filogenéticas do clado A da tribo Tigridieae (Iridoideae: Iridaceae):
testando a monofilia do gênero *Cypella* Herb.**

Relações filogenéticas e evolução dos recursos florais no clado A de Tigridieae (Iridoideae: Iridaceae): testando a monofilia do gênero *Cypella* Herb.

Tamara Pastori, Olivier Chauveau, Lilian Eggers,

Tatiana Teixeira de Souza-Chies

RESUMO

Iridaceae é uma das poucas famílias que oferecem três tipos de recursos florais aos polinizadores: polen, néctar e óleos florais. O polen e o néctar são recursos comuns em Iridaceae, no entanto os óleos florais estão presentes quase que exclusivamente nos gêneros americanos da subfamília Iridoideae, especialmente na tribo Tigridieae. Tigridieae é uma tribo taxonomicamente complexa, e seus principais gêneros são não-monofiléticos. Assim, este estudo tem como objetivo compreender as relações filogenéticas e inferir a história evolutiva das estruturas glandulares florais na tribo Tigridieae (clado A), com foco no gênero *Cypella*. Análises baseadas em cinco marcadores plastidiais foram conduzidas para investigar as relações filogenéticas desse grupo. Uma filogenia molecular foi utilizada para inferir a história evolutiva das recompensas aos polinizadores entre os táxons do clado A de Tigridieae. Os resultados sugerem que os dois principais gêneros do clado, *Cypella* e *Calydorea*, não são monofiléticos. Além disso, duas grandes mudanças de sistemas de polinização ocorreram em Tigridieae (clado A). Nectários estaminais e elaióforos perigonais evoluíram uma única vez na origem das linhagens *Cypella*, incluindo os gêneros monotípicos *Kelissa* e *Onira*. Além disso, o gênero *Herbertia* foi caracterizado pela perda da capacidade do tecido conjuntivo para produzir néctar, e as únicas estruturas restantes especializadas para atrair polinizadores foram os elaióforos. Assim, este estudo sugere que um sistema de polinização bimodal que combina características de dois sistemas distintos de polinização evoluiu na tribo Tigridieae (clado A), especialmente em *Cypella*. Este sistema de polinização é único na família Iridaceae ocorrente no continente americano e pode ter desempenhado um papel fundamental na diversificação de Tigridieae.

Palavras-chave: *Cypella*, evolução, nectários, elaióforos.

Phylogenetic relationships and evolution of floral rewards in clade A of Tigridaeae (Iridoideae: Iridaceae): testing the monophyly of the genus *Cypella* Herb.

Tamara Pastori, Olivier Chauveau, Lilian Eggers,

Tatiana Teixeira de Souza-Chies

ABSTRACT

Iridaceae is one of the few families that offer three types of floral rewards for pollinators: pollen, nectar and floral oils. The pollen and nectar are common rewards in Iridaceae, however the floral oils are present only in American genera of subfamily Iridoideae, especially in Tigridaeae tribe. Tigridaeae is taxonomically complex and its main genera are non-monophyletic. This study aims to understand the phylogenetic relationships and to infer the evolutionary history of floral glandular structures in the tribe Tigridaeae (clade A), with focus on the genus *Cypella*. Analyses based on five plastidial markers were conducted to investigate the phylogenetic relationships. Molecular phylogenies were used to infer the evolutionary history of pollination rewards among the clade A of Tigridaeae. The results suggest that two major shifts of pollination systems occurred in Tigridaeae. Staminal nectaries and perigonal elaiophores evolved once at the base of the *Cypella* lineages, including the monotypic genera *Kelissa* and *Onira*. Furthermore, *Herbertia* was retrieved nested in these lineages, but this genus was characterized by the loss of the connective tissue ability to produce nectar and the only remaining specialized pollination structures were elaiophores. Thus, this study suggests a bimodal pollination system that combines features of two distinct pollination systems evolved in the tribe Tigridaeae (clade A), particularly in *Cypella*. This pollination system is unique in the family Iridaceae occurring in the Americas and may have played a key role in diversifying Tigridaeae.

Key words: *Cypella*, evolution, nectaries, elaiophores.

INTRODUÇÃO

A oferta de recursos florais aos polinizadores é uma estratégia importante utilizada pelas espécies vegetais a fim de promover a polinização cruzada. A natureza dos recursos oferecidos é muito variável entre espécies, sendo o pólen e o néctar os recursos mais comumente encontrados. Iridaceae é uma das poucas famílias que apresenta um terceiro tipo de recurso: óleos florais (Goldblatt & Manning, 2008). Na maioria das famílias botânicas, as estruturas produtoras de óleos florais, chamadas elaióforos, evoluíram somente uma vez, no entanto em Orchidaceae e Iridaceae este tipo de recurso floral evoluiu múltiplas vezes (Renner & Schaefer, 2010). A oferta de uma ampla gama de recursos florais adicionada à grande variedade de formas e colorações das flores torna Iridaceae uma família interessante para estudos evolutivos, principalmente por apresentar diferentes síndromes de polinização (Rudall *et al.*, 2003). Sendo assim, o reconhecimento e a caracterização dos recursos oferecidos pelas espécies são importantes para a formulação de hipóteses sobre a evolução vegetal.

Iridaceae é uma das famílias mais representativas dentre as monocotiledôneas (Goldblatt & Manning, 2008) e é representada por sete subfamílias: Isophysidoideae, Patersonioideae, Geosiridoideae, Aristeoideae, Nivenioideae, Crocoideae e Iridoideae, as duas últimas compreendendo um total de dez tribos. Com exceção da espécie sul africana da subfamília Crocoideae, *Tritoniopsis parviflora* (Jacq.) G.J. Lewis, que secreta óleos florais em elaióforos epiteliais (Manning & Goldblatt, 2002), a secreção de óleo em Iridaceae é restrita a gêneros neotropicais da subfamília Iridoideae, na qual óleos são produzidos por tricomas glandulares conspícuos localizados nas tépalas ou na coluna estaminal (Chauveau *et al.*, 2011; Chauveau *et al.*, 2012; Silvério *et al.*, 2012).

A subfamília Iridoideae representa o maior ramo evolutivo da família, compreendendo cerca de 40% da riqueza específica da família Iridaceae (Goldblatt & Manning, 2008). Iridoideae é dividida em cinco tribos: Diplarreneae, Irideae, Sisyrinchieae, Trimezieae e Tigridieae (Goldblatt & Manning, 2008). Tigridieae é exclusiva do Novo Mundo (Goldblatt *et al.*, 2008; Goldblatt & Manning, 2008), compreende de 15 a 20 gêneros e 172 espécies, que ocorrem no

Sul da América do Norte, América Central e América do Sul (Rodriguez & Sytsma, 2006; Goldblatt *et al.*, 2008).

Tigridieae foi subdividida em duas subtribos: *Cipurinae* e *Tigridiinae*, com base em caracteres citogenéticos, palinológicos e morfológicos (Goldblatt, 1982). A subtribo *Cipurinae* é representada por gêneros com número cromossômico básico $x=7$, grãos de pólen monosulcados e ramos do estilete petaloides a cilíndricos, bifurcados ou simples, já na subtribo *Tigridiinae* os gêneros apresentam número cromossômico básico $x=14$, grãos de pólen bissulcados e ramos do estilete cilíndricos profundamente bifurcados (ou simples). Entretanto a filogenia publicada por Chauveau *et al.* (2012) envolvendo a subfamília Iridoideae, evidenciou que tanto *Cipurinae* quanto *Tigridiinae* não são monofiléticas e propôs a divisão de Tigridieae em dois cladogramas (A e B). Com relação aos gêneros pertencentes ao clado A, *Cypella* Herb. e *Calydorea* Herb. são não-monofiléticos (Chauveau *et al.*, 2012), e *Kelissa brasiliensis* (Baker) Ravenna e *Onira unguiculata* (Baker) Ravenna formam um agrupamento com *Cypella hauthalii* ssp. *opalina* Ravenna. *Kelissa* Ravenna e *Onira* Ravenna são pouco diferenciadas morfológicamente de *Cypella*, e as diferenças nos estames e nos ramos do estilete que discriminam estes gêneros foram recentemente consideradas insuficientes para sua diferenciação (Goldblatt & Manning, 2008). Além disso, a ausência de diferenças morfológicas claras entre *Calydorea*, *Cypella*, *Herbertia* Sweet e *Nemastylis* Nutt. sugere que as circunscrições genéricas devem ser revistas (Chauveau *et al.*, 2012).

O gênero *Cypella* representa um táxon importante para o entendimento de como evoluíram os diferentes recursos florais oferecidos aos polinizadores na família Iridaceae, já que neste gênero, pelo menos uma espécie, *C. herbertii* (Lindl.) Herb., oferece três tipos de recursos aos polinizadores: pólen, néctar e óleos (Vogel, 1974; Devoto & Medan, 2008), representando uma estratégia única dentro da subfamília Iridoideae (Iridaceae). No entanto, aspectos evolutivos e filogenéticos ainda são pouco conhecidos e compreendidos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é compreender as relações filogenéticas no clado A da tribo Tigridieae utilizando uma amostragem suficientemente representativa do grupo e, estudar a evolução dos nectários e elaióforos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram amostradas 60 espécies pertencentes às tribos Tigridaeae e Trimezieae (Tabela 1 – Apêndice A). Para o Clado A da tribo Tigridaeae foram amostrados os gêneros *Cypella*, *Kelissa*, *Onira*, *Calydorea*, *Catila* Ravenna, *Cipura* Aubl., *Larentia* Klatt, *Nemastylis* e *Ainea* Ravenna. Representantes do Clado B da tribo Tigridaeae foram amostrados como grupo externo e foram utilizados os gêneros *Phalocalis* Herb. e *Gelasine* Herb. (Chauveau *et al.*, 2012). Os gêneros *Trimezia* Salisb. ex Herb. e *Neomarica* Sprague pertencentes à tribo Trimezieae foram igualmente utilizados como grupos externos. As amostras foram coletadas a campo e posteriormente as espécies foram identificadas. Algumas amostras foram obtidas igualmente a partir de espécies cultivadas em jardins botânicos e viveiros.

Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

O DNA total foi extraído a partir de folhas frescas ou secas em sílica-gel utilizando o protocolo CTAB (Doyle & Doyle, 1987) modificado. O DNA total foi quantificado em espectrofotômetro (nanodrop) e em gel de agarose 1%, corado com “Gel Red”, utilizando um marcador de peso molecular (λ) nas concentrações de 10 ng, 50 ng e 100 ng como padrões de intensidade de bandas conhecidas.

As amplificações das regiões escolhidas foram realizadas com a técnica de PCR (Tabela 2 - Apêndice A). Como marcadores moleculares foram utilizadas regiões do DNA plastidial: uma combinação de regiões de cpDNA codificantes e não-codificantes foi utilizada para inferir as relações filogenéticas entre os táxons amostrados. Foram selecionadas duas regiões de DNA codificante (*matK* e *rbcl*), dois introns (*matK*- 5'*trnK* e *rps16* introns) e dois espaçadores intergênicos (*trnH-psbA* e *trnQ-rps16*) (Johnson & Soltis, 1995; Oxelman *et al.*, 1997; Reeves *et al.*, 2001). Na tabela 4 (Apêndice A) estão descritas as condições de amplificação para cada marcador.

Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados automaticamente por Cogenics (Meylan, França) utilizando o sequenciador automático ABI PRISM (Perkin Elmer, Courtaboeuf, França) com “primers” diretos e reversos. As sequências diretas e reversas de cada amostra foram analisadas com CodonCode Aligner 3.5.3 (CodonCode Corp, Dedham, MA, EUA) e as bases ambíguas foram corrigidas após o exame dos cromatogramas.

Análises Filogenéticas

Os alinhamentos foram produzidos utilizando Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) e MUSCLE (Edgar, 2004) e foram manualmente corrigidos com o programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). A matriz de dados correspondente ao alinhamento das sequências foi utilizada para a reconstrução filogenética utilizando os métodos de Máxima Parcimônia (MP), Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (IB). As cinco regiões do cpDNA foram analisadas independentemente. A comparação das topologias resultantes das análises separadas não revelou casos de diferenças topológicas, e uma melhor resolução foi obtida quando essas regiões foram analisadas em conjunto, sendo assim, os dados foram combinados em uma única “supermatrix” para posterior análise e obtenção da árvore de evidência total.

Máxima Parcimônia

As análises de Máxima Parcimônia (MP) foram realizadas através do programa PAUP versão 4.0b10 (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony* - Swofford, 2002). A análise foi realizada através de 100 replicações usando a adição randômica de sequências, algoritmo TBR (Tree bisection and reconnection). A partir desta análise, foram calculadas as árvores de consenso estrito e de maioria, e os suportes dos nós foram obtidos utilizando MP com 1000 repetições de *bootstrap*. Além disso, foram calculados para cada marcador os números de caracteres parcimoniosamente informativos (Tabela 5 – Apêndice A), assim como o índice de consistência (IC), índice de homoplasia (IH) e o índice de retenção (IR) (Tabela 6 - Apêndice A).

Máxima Verossimilhança

As análises de Máxima Verossimilhança (ML) (Felsenstein, 1981) foram realizadas com o programa RAxML 7.2.6 (Stamatakis, 2006) utilizando matrizes particionadas e também com dados de total evidência. Os modelos evolutivos mais apropriados para as análises foram determinados utilizando MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). A tabela 6 (Apêndice A) contém o modelo evolutivo mais apropriado implementado para cada tipo de partição. A confiabilidade das topologias de ML foi avaliada utilizando a árvore consenso com análises de *bootstrap*, com 1000 replicações.

Inferência Bayesiana

As matrizes de sequências de cada marcador foram particionadas para permitir a Inferência Bayesiana. Assim, os modelos evolutivos mais apropriados para as análises Bayesianas foram determinados utilizando MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004). Os conjuntos de dados que incluem “indels” compartilhados por dois ou mais *taxa* foram codificados como caracteres binários, utilizando GapCoder (Young & Healy, 2003). A Inferência Bayesiana foi realizada com MrBayes 3.12 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

Análise combinada de dados

As árvores filogenéticas resultantes das três análises MP, ML e IB foram combinadas para a reconstrução manual de uma árvore consenso. Para essa combinação foi utilizada a melhor árvore obtida a partir da análise de Verossimilhança, onde foram reportados os valores das análises de Parcimônia e Inferência Bayesiana. Para cada análise, o valor de suporte do nó foi mantido quando: valor de bootstrap em Parcimônia (PBS) e o valor de bootstrap em Máxima Verossimilhança (LBS) foram maiores do que 50%, ou, se a Probabilidade Posterior (PP) foi maior que 0,90. Foram considerados totalmente

suportados os nós que tiveram um valor de *bootstrap* em MP e um valor de *bootstrap* em ML de 100%, bem como valores de PP de 1,00. Nós fortemente suportados foram definidos com um limiar de pelo menos 80% para o PBS e LBS, e um valor $PP \geq 0,95$. Nós para os quais apenas dois dos três valores de suporte atingiram valores mínimos e o terceiro valor de suporte foi, pelo menos, 50% (PBS), 60% (LBS) e 0,95 (PP) foram considerados moderadamente suportados, e para nós que apenas um dos três valores de suporte atingiu os valores mínimos e os outros dois valores de suporte foram de pelo menos, 50% (PBS), 50% (LBS) e 0,90 (PP) foram considerados fracamente suportados.

Otimização dos caracteres morfológicos

Estruturas glandulares secretoras de néctar ou óleos presentes nas flores de várias espécies dentro da tribo Tigridieae foram caracterizadas a partir de observações a campo e testes histoquímicos, e os mesmos foram classificados como: Caractere A: Elaióforos Perigonais (Presente ou Ausente); Caractere B: Nectários Estaminais (Presente ou Ausente).

A melhor árvore de ML foi utilizada para a otimização dos caracteres com os métodos de MP e ML implementados em Mesquite 2.75 (Maddison & Maddison, 2010). Com MP, estados de caracteres foram tratados como não-ordenados, permitindo qualquer transição entre os estados. Otimização ML foi realizada utilizando o modelo evolutivo MK1 (Schluter *et al.*, 1997;. Pagel, 1999), o que dá igual probabilidade para as mudanças entre todos os estados de caráter.

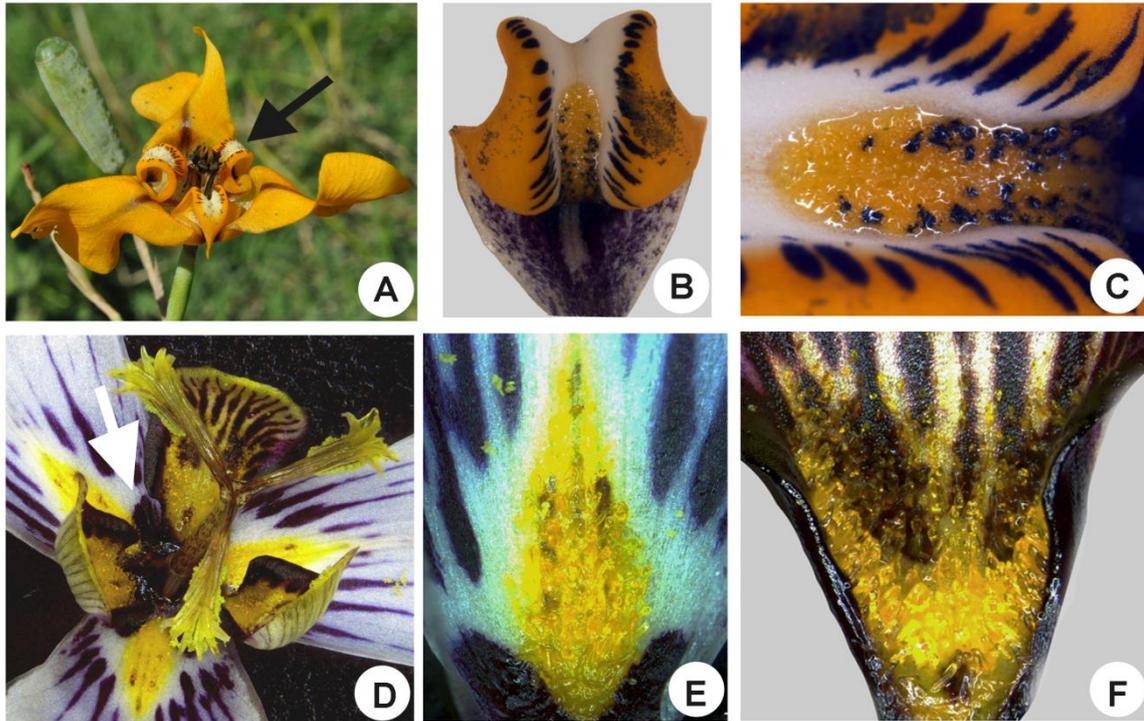


Figura 1: Elaióforos de *Cypella herbertii* e *Herbertia zebrina* Deble. A) Seta indicando a presença de elaióforos na tépala interna de *Cypella herbertii*; B) Detalhe da tépala interna de *Cypella herbertii*; C) Detalhe do elaióforo da tépala interna de *C. herbertii*. D) Elaióforos no gênero *Herbertia*, figura ilustrando a presença de elaióforos nas tépalas interna e externa; E) Detalhe do elaióforo na tépala externa de *H. zebrina*; F) Detalhe do elaióforo na tépala interna de *H. zebrina*.

RESULTADOS

Análise filogenética

A topologia das árvores filogenéticas com base nas análises em separado de cada região do cpDNA não revelou grandes incongruências, permitindo a combinação dos dados para análise. Todos os marcadores plastidiais foram combinados em uma supermatriz única.

Todos os marcadores do cpDNA foram combinados em uma única supermatriz totalizando 7338 caracteres com 1071 (14,6%) caracteres filogeneticamente informativos. O marcador que apresentou o maior número de caracteres parcimoniosamente informativos foi a região *matK* (11,8%) e o marcador menos informativo foi *rbcL* com 7,06% (Tabela 5 - Apêndice A).

As árvores filogenéticas evidenciaram dois clados (A e B) totalmente suportados em Tigridieae, corroborando os dados de Chauveau *et al.*, (2012). No clado B, observamos a presença da espécie *Ainea konzattii* (R.C. Foster) Ravenna, agrupada com espécies de *Gelasine*, *Phalocallis* e *Larentia*. Os gêneros *Gelasine* e *Larentia* mostraram-se não monofiléticos, sendo que a espécie *Larentia linearis* (Kunth) Klatt agrupou-se com as espécies pertencentes ao clado B de Tigridieae. Além disso, o Clado A é composto por gêneros exclusivamente da subtribo *Cipurinae* (Goldblatt, 1990), sendo que *Cipura* e *Larentia* constituem grupo-irmão para o resto do clado altamente suportado. Os dois maiores gêneros dentro do clado A de Tigridieae, *Calydorea* e *Cypella*, são não monofiléticos.

O gênero *Calydorea* aparece representado por quatro agrupamentos não relacionados. A espécie *Calydorea alba* encontra-se separada das demais espécies do gênero, na base do clado A. *C. pallens* e *C. undulata* formam um agrupamento moderadamente suportado com espécies dos gêneros *Catila* e *Nemastylis*. Um agrupamento fortemente suportado é formado somente pelas espécies do gênero *Calydorea*, *C. approximata*, *C. basaltica*, *C. campestris* e *C. crocoides*. No entanto, nenhum desses agrupamentos está relacionado com a espécie tipo do gênero *C. xiphioides*.

No gênero *Cypella*, *C. hauthalii* ssp *opalina* se destaca do restante do gênero formando um agrupamento fortemente suportado com as espécies *Onira unguiculata* e *Kelissa brasiliensis*. Neste agrupamento formado por *Cypella*, *Kelissa* e *Onira*, podemos observar a formação de uma politomia onde além destes, estão presentes espécies dos gêneros *Herbertia* e *Calydorea*. As outras espécies representantes do gênero *Cypella* estão pertencem a um agrupamento independente. Dentro deste grande agrupamento formado por espécies de *Cypella*, podemos observar que pequenos grupos são formados. O primeiro é composto pelas espécies *C. fucata*, *C. luteogibbosa*, *C. armosa* e *C. magnicristata* que formam um primeiro agrupamento fortemente suportado. Outro clado é formado pela espécie mais comum do gênero, *C. herbertii* juntamente com *C. pabstiana* e *C. osteniana* com alto suporte. Além disso, uma politomia é formada pelas espécies *C. laeta*, *C. pusilla*, *C. discolor* e *C. aquatilis*.

O gênero *Herbertia* corresponde a um grupo moderadamente suportado, no entanto *H. pulchella*, espécie irmã para o resto do gênero, forma uma politomia com as espécies dos gêneros *Cypella*, *Kelissa*, *Onira* e *Calydorea*.

Evolução de elaióforos e nectários

A otimização do estado de caractere ancestral utilizando ambos os métodos, MP e ML, evidenciou que a ausência de estruturas glandulares, tanto para nectários quanto para elaióforos, constitui o estado ancestral comum no clado A de Tigridieae. Os elaióforos parecem ter surgido independentemente duas vezes ao longo da evolução do clado A de Tigridieae, uma na base do gênero *Cipura*, e outra na base do agrupamento formado pelas espécies de *Cypella*, *Herbertia*, *Kelissa* e *Onira* com uma reversão para a ausência na espécie *Calydorea xiphioides*. Entretanto, quando analisamos a evolução dos nectários, a reconstrução do estado ancestral com MP mostra dois caminhos possíveis. Primeiramente os nectários estaminais no Clado A de Tigridieae podem ter evoluído duas vezes independentemente, uma na base do gênero *Cypella* e outra na base do clado que agrupa *Cypella hauthalii* ssp *opalina*, *Onira* e *Kelissa*, com uma reversão para a ausência de nectários em *Kelissa*. Outra hipótese teria sido um surgimento na base de todo o agrupamento formado por *Cypella*, *Kelissa*,

Onira, *Herbertia* e *Calydorea* com uma reversão para a ausência de nectários em *Kelissa*, *Herbertia* e *Calydorea xiphioides*.

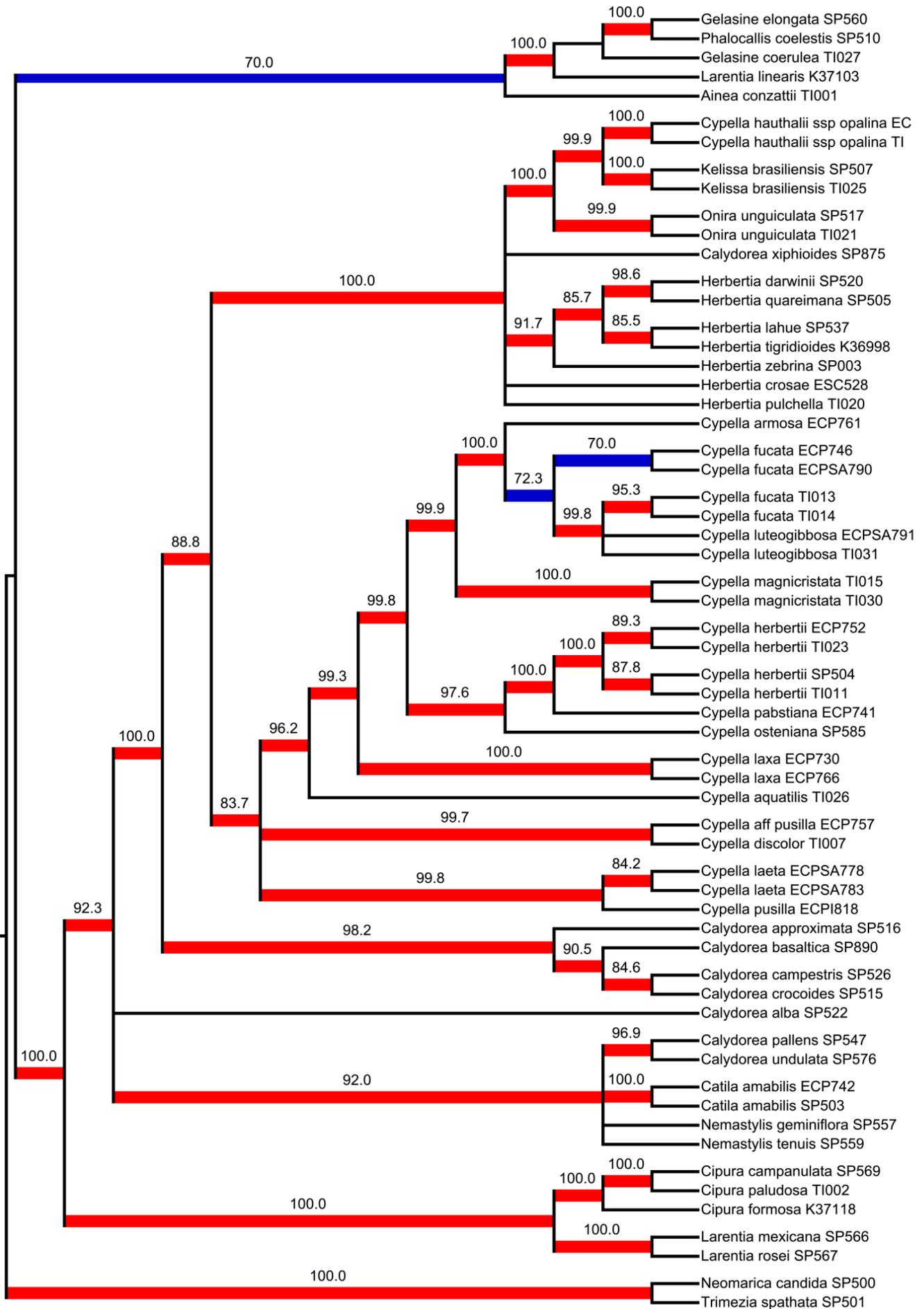


Figura 2: Análise de Máxima Parcimônia. Árvore de consenso estrito a partir de 1038 árvores igualmente parcimoniosas através da análise de Máxima Parcimônia. As cores dos ramos indicam os valores de *bootstrap*. Ramos de cor vermelha indicam ramos 100% suportados e ramos com forte suporte de 80% a 100%. Ramos de cor azul indicam ramos com suporte moderado de 70% a 80% de *bootstrap*. Ramos com linhas finas e pretas indicam ramos não suportados.

Figura 3: Melhor árvore obtida a partir da análise de Máxima Verossimilhança. As cores dos ramos indicam os valores de *bootstrap*. Ramos de cor vermelha indicam ramos 100% suportados e ramos com forte suporte de 80% a 100%. Ramos de cor azul indicam ramos com suporte moderado de 60% a 80% de *bootstrap*. Ramos de cor verde indicam ramos com suporte moderado de 50% de *bootstrap*. Ramos com linhas finas e pretas indicam ramos não suportados.

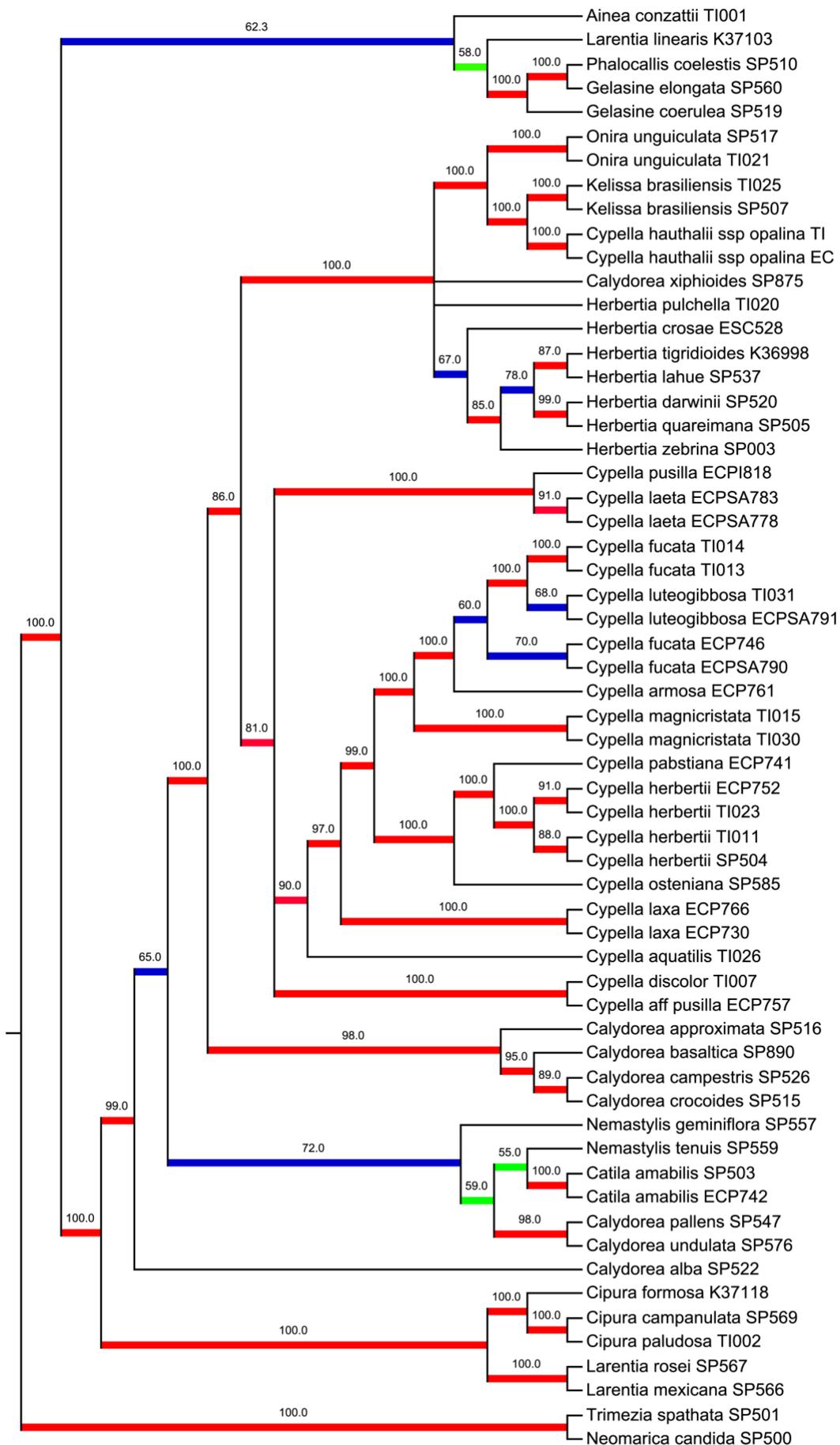
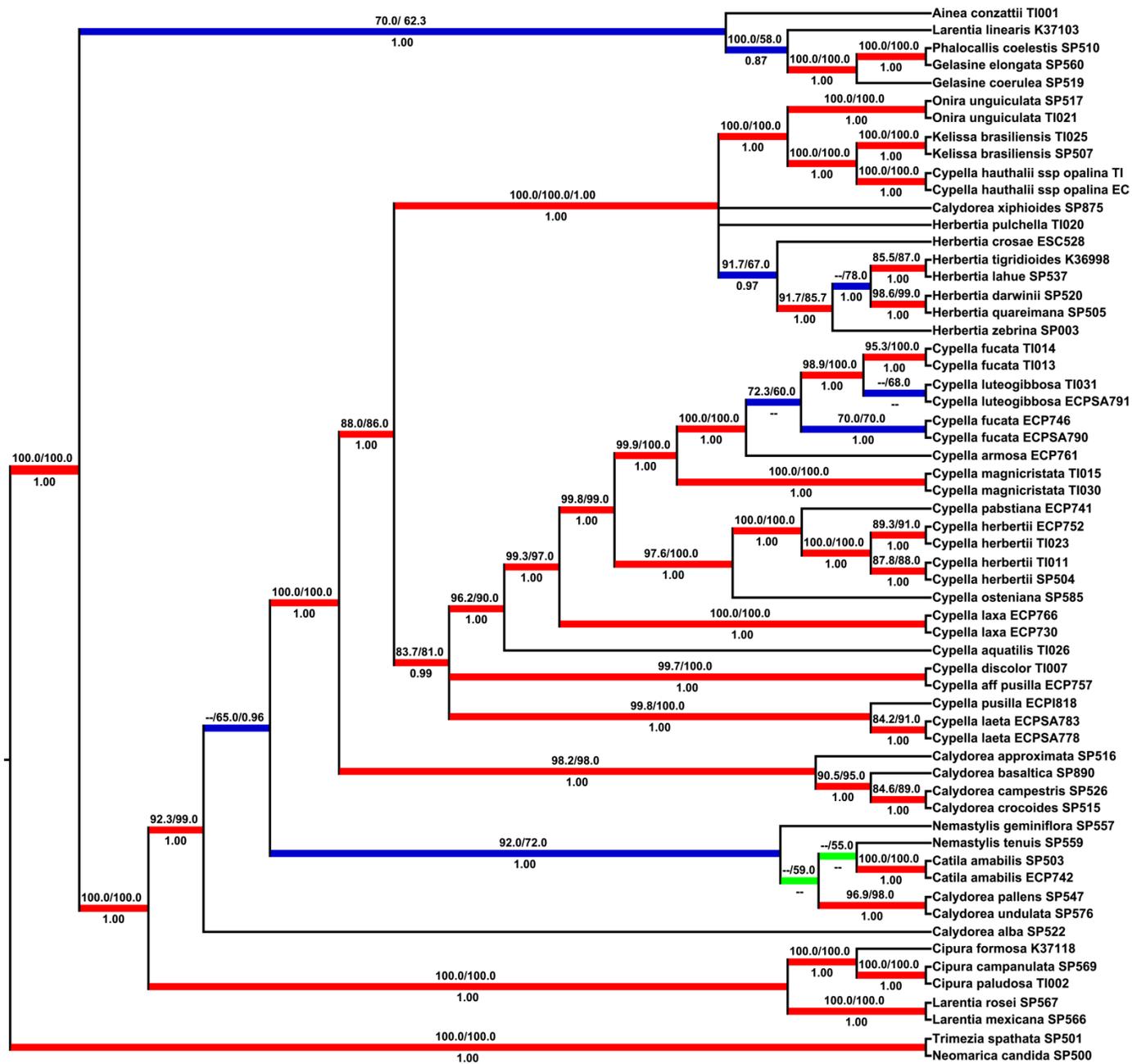


Figura 4: Melhor árvore obtida a partir da análise de Inferência Bayesiana. As cores dos ramos indicam os valores de bootstrap. Ramos de cor vermelha indicam ramos suportados com 1.00 de PP e ramos com forte suporte de 0.97 a 0.99 de PP. Ramos de cor azul indicam ramos com suporte moderado de 0.96 de PP. Ramos de cor verde indicam ramos com suporte fraco de 0.95 a 0.96. Ramos com linhas finas e pretas indicam ramos não suportados com menos de 0.95 de PP.

Figura 5: Melhor árvore obtida a partir da análise de Máxima Verossimilhança a partir do conjunto de dados combinados. Valores de bootstrap dos nós correspondem a MP (PBS, à esquerda, acima de ramos), ML (LBS, à direita, acima de ramos) e IB probabilidade posterior (PP, abaixo dos ramos). Ramos vermelhos indicam suporte de, pelo menos, 80% (PBS), 80% (LBS) e 0,95 (PP). Linhas azuis indicam ramos em que apenas dois dos três valores de suporte do alcançam os valores mínimos e o terceiro valor de suporte é de pelo menos 50% (PBS), 60% (LBS) e 0,95 (PP). Linhas verdes indicam ramos onde pelo menos um dos valores são de 50% (PBS), 50% (LBS) e 0,90 (PP).



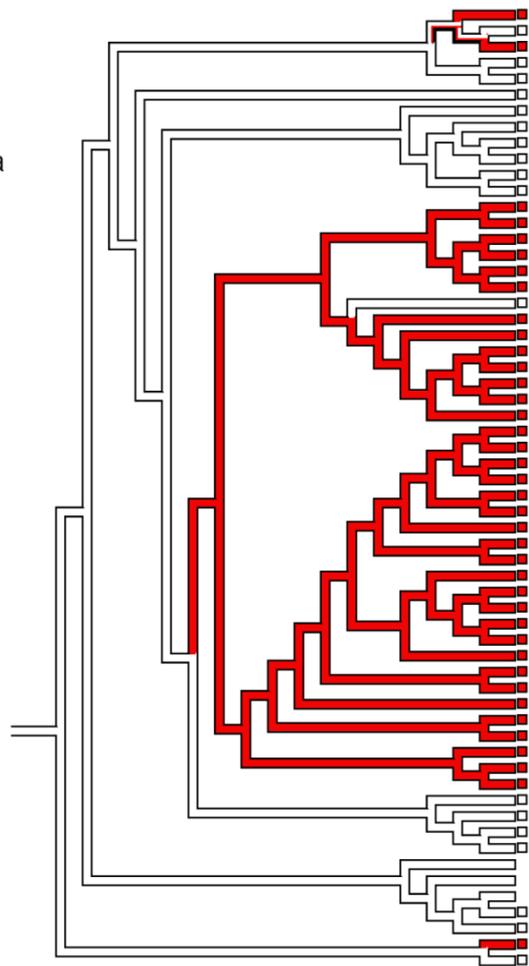
Tigridieae
Clado B

Tigridieae
Clado A

Trimezieae

Árvore 1:
Caracter A: Elaióforos
Perigonais
Reconstrução Parcimônia

□ Ausente
■ Presente



Cipura formosa K37118
Cipura campanulata SP569
Cipura paludosa TI002
Larentia rosei SP567
Larentia mexicana SP566
Calydorea alba SP522
Nemastylis geminiflora SP557
Nemastylis tenuis SP559
Catila amabilis SP503
Catila amabilis ECP742
Calydorea pallens SP547
Calydorea undulata SP576
Onira unguiculata SP517
Onira unguiculata TI021
Kelissa brasiliensis TI025
Kelissa brasiliensis SP507
Cypella hauthalii ssp opalina TI
Cypella hauthalii ssp opalina EC
Calydorea xiphoides SP875
Herbertia pulchella TI020
Herbertia crossae ESC528
Herbertia tigrisoides K36998
Herbertia lahue SP537
Herbertia darwinii SP520
Herbertia quareimana SP505
Herbertia zebrina SP003
Cypella fucata TI014
Cypella fucata TI013
Cypella luteogibbosa TI031
Cypella luteogibbosa ECPSA791
Cypella fucata ECP746
Cypella fucata ECPSA790
Cypella armosa ECP761
Cypella magnicristata TI015
Cypella magnicristata TI030
Cypella pabstiana ECP741
Cypella herbertii ECP752
Cypella herbertii TI023
Cypella herbertii TI011
Cypella herbertii SP504
Cypella osteniana SP585
Cypella laxa ECP766
Cypella laxa ECP730
Cypella aquatilis TI026
Cypella discolor TI007
Cypella aff pusilla ECP757
Cypella pusilla ECP1818
Cypella laeta ECPSA783
Cypella laeta ECPSA778
Calydorea approximata SP516
Calydorea basaltica SP890
Calydorea campestris SP526
Calydorea crocoides SP515
Ainea conzattii TI001
Larentia linearis K37103
Phalocallis coelestis SP510
Gelasine elongata SP560
Gelasine coerulea SP519
Trimezia spathata SP501
Neomarica candida SP500

Árvore 2
Caracter B: Nectários
Estaminais
Reconstrução Parcimônia

□ Ausente
■ Presente

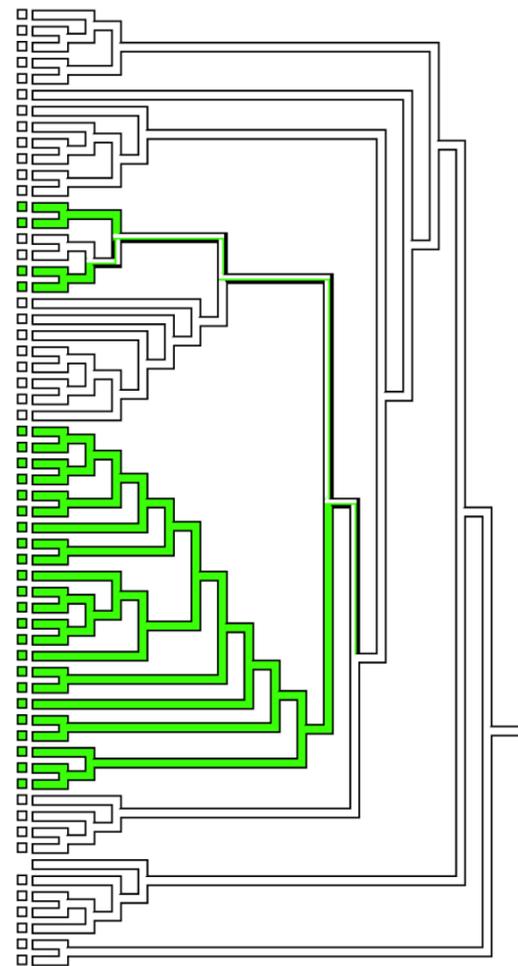


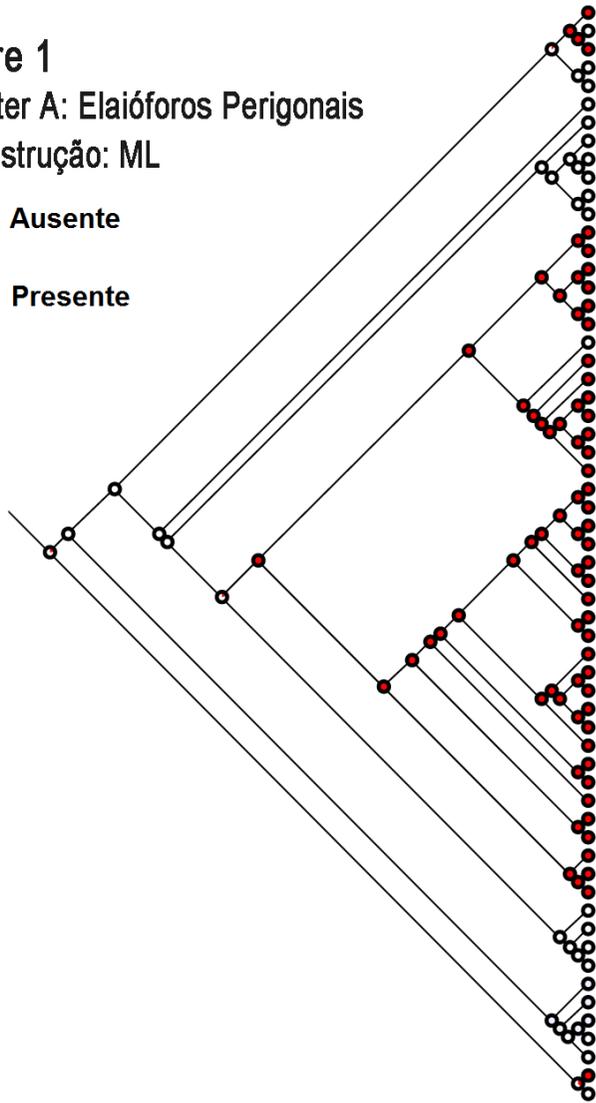
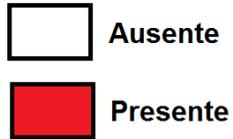
Figura 6: Árvores espelhadas ilustrando a otimização do estado ancestral do carácter Elaióforos Perigonais (Árvore 1), indicando a presença (vermelho) e a ausência (branco) de elaióforos; e Árvore 2, com a otimização do carácter Nectários Estaminais indicando a presença (verde) e a ausência (branco) de nectários através da melhor árvore da Máxima Verossimilhança, com reconstrução por máxima parcimônia. Os nós externos são coloridos de acordo com o estado de carácter observado e nós internos são coloridos de acordo com o estado ancestral inferido. Ramos com duas cores mostram estados de caracteres ancestrais não resolvidos com a análise de parcimônia.

Figura 7: Árvores espelhadas ilustrando a otimização do carácter Elaióforos Perigonais (Árvore 1), indicando a presença (vermelho) e a ausência (branco) de elaióforos; e Árvore 2, com a otimização do carácter Nectários Estaminais indicando a presença (verde) e a ausência (branco) de nectários através da melhor árvore da Máxima Verossimilhança, com reconstrução por Máxima Verossimilhança. Os nós externos são coloridos de acordo com o estado de carácter observado e nós internos são coloridos de acordo com o estado ancestral inferido.

Árvore 1

Caracter A: Elaióforos Perigonais

Reconstrução: ML

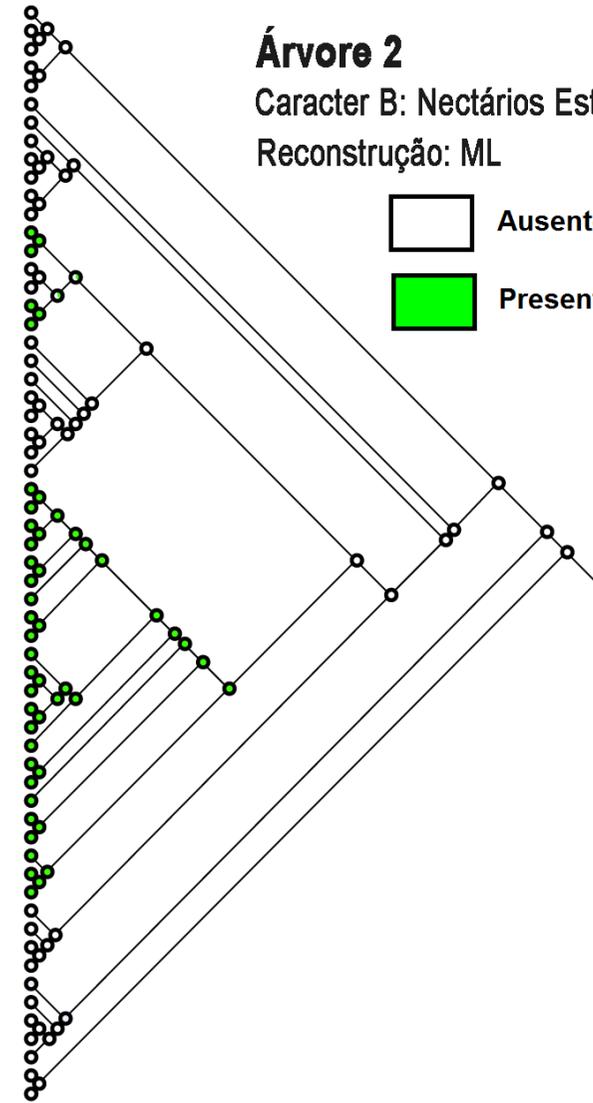
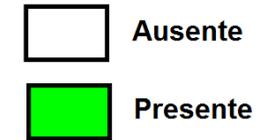


Cipura formosa K37118
Cipura campanulata SP569
Cipura paludosa TI002
Larentia rosei SP567
Larentia mexicana SP566
Calydorea alba SP522
Nemastylis geminiflora SP557
Nemastylis tenuis SP559
Catila amabilis SP503
Catila amabilis ECP742
Calydorea pallens SP547
Calydorea undulata SP576
Onira unguiculata SP517
Onira unguiculata TI021
Kelissa brasiliensis TI025
Kelissa brasiliensis SP507
Cypella hauthalii ssp opalina TI
Cypella hauthalii ssp opalina EC
Calydorea xiphioides SP875
Herbertia pulchella TI020
Herbertia crosae ESC528
Herbertia tigridioides K36998
Herbertia lahue SP537
Herbertia darwinii SP520
Herbertia quareimana SP505
Herbertia zebrina SP003
Cypella fucata TI014
Cypella fucata TI013
Cypella luteogibbosa TI031
Cypella luteogibbosa ECPSA791
Cypella fucata ECP746
Cypella fucata ECPSA790
Cypella armosa ECP761
Cypella magnicristata TI015
Cypella magnicristata TI030
Cypella pabstiana ECP741
Cypella herbertii ECP752
Cypella herbertii TI023
Cypella herbertii TI011
Cypella herbertii SP504
Cypella osteniana SP585
Cypella laxa ECP766
Cypella laxa ECP730
Cypella aquatilis TI026
Cypella discolor TI007
Cypella aff pusilla ECP757
Cypella pusilla ECP1818
Cypella laeta ECPSA783
Cypella laeta ECPSA778
Calydorea approximata SP516
Calydorea basaltica SP890
Calydorea campestris SP526
Calydorea crocoides SP515
Ainea conzattii TI001
Larentia linearis K37103
Phalocallis coelestis SP510
Gelasine elongata SP560
Gelasine coerulea SP519
Trimezia spathata SP501
Neomarica candida SP500

Árvore 2

Caracter B: Nectários Estaminais

Reconstrução: ML



DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo são concordantes com a classificação atual da tribo Tigridieae em dois clados (A e B) proposta por Chauveau *et al.* (2012). A abordagem obtida a partir da análise de evidência total, mostra que Tigridieae é claramente monofilética, como proposto por Goldblatt *et al.* (2008) e Chauveau *et al.* (2012). No entanto, a circunscrição de Tigridieae em duas subtribos Cipurinae e Tigridiinae (Goldblatt, 1982) não é suportada, já que estas duas subtribos não são monofiléticas.

Uma análise dos resultados obtidos para o Clado B de Tigridieae, mostra que a inclusão da espécie *Ainea konzattii* no complexo formado pelos gêneros *Gelasine*, *Larentia* e *Phalocallis* corrobora a filogenia apresentada por Goldblatt *et al.* (2008). Este trabalho inclui *Ainea* em *Tigridia* (atualmente Clado B) apoiado no seu número cromossômico básico idêntico ($x=14$) e no tipo de abertura bissulcado dos grãos de pólen. Outro resultado foi a posição da espécie *Larentia linearis* no clado B, já que as demais espécies *L. mexicana* e *L. rosei* estão agrupadas com espécies de *Cipura* no Clado A de Tigridieae. Essa condição torna o gênero *Larentia* não-monofilético. Este resultado, filogeneticamente suportado, nunca foi evidenciado na literatura. No entanto, maiores investigações nesse sentido são necessárias, pois existem problemas nomenclaturais nos gêneros, já que anteriormente *Larentia mexicana* foi considerada uma espécie do gênero *Cypella*. (Goldblatt *et al.*, 2008; Goldblatt e Manning, 2008).

Ainda no clado B, a estreita relação entre *Phalocallis coelestis* e o gênero *Gelasine* suporta a separação de *Phalocallis* e *Cypella* (clado A) que foram anteriormente considerados como sinônimos, evidenciando que *Phalocallis* deve ser considerado um gênero separado de *Cypella*. Além disso, no gênero *Gelasine*, *G. coerulea* e *G. elongata* não são relacionadas, sendo um gênero parafilético conforme proposto anteriormente por Chauveau *et al.* (2012). As relações filogenéticas entre os gêneros pertencentes ao clado A sugerem que vários destes gêneros devem ser examinados criticamente quanto as suas delimitações genéricas (Chauveau *et al.* 2012).

O clado formado por *Larentia* e *Cipura* é considerado irmão para o restante do clado A. O gênero *Calydorea* é claramente não-monofilético, conforme anteriormente sugerido por Chauveau *et al.* (2012). A espécie tipo *C. xiphioides* é totalmente separada do resto do gênero *Calydorea* assim como a espécie *C. alba*.

Filogenias anteriores apontavam para a parafilia do gênero *Cypella*, no entanto estes trabalhos haviam utilizado uma amostragem muito reduzida para o gênero. Goldblatt *et al.* (2008) amostrou três espécies de *Cypella*, *Cypella aquatilis*, considerada atualmente no gênero *Cypella*, as demais espécies utilizadas nesse estudo, *Cypella mexicana* e *Cypella rosei*, já foram anteriormente consideradas como pertencentes ao gênero *Larentia*, respectivamente de *Larentia mexicana* e *Larentia rosei*. Já o estudo de Chauveau *et al.* (2012) ampliou o número de espécies do gênero *Cypella*, mas ainda assim utilizou uma amostragem pouco representativa desse gênero. Neste estudo, *Cypella* foi dividido em dois clados, o primeiro formado por *C. hauthalii* relacionado com os gêneros monotípicos *Kelissa* e *Onira*, o segundo clado formado somente por espécies do gênero *Cypella*. Os dados apresentados no presente trabalho representam a maior amostragem obtida até o momento para o gênero *Cypella*, possibilitando um melhor panorama quanto às relações filogenéticas desse gênero.

Os gêneros *Herbertia*, *Cypella*, *Kelissa* e *Onira* compartilham características similares no hábito vegetativo, e os limites entre esses gêneros são baseados principalmente em poucas diferenças florais nas tépalas, estames ou nos estiletos (Chauveau *et al.*, 2012). Roitman & J.A. Castillo (2007) propuseram a inclusão de *Onira* e *Kelissa* em *Cypella*, o que já é aceito por alguns autores como Goldblatt e Manning (2008). *Kelissa brasiliensis* e *Onira unguiculata* são realmente pouco diferenciadas morfológicamente de *Cypella hauthalii*, e as diferenças nos estames e nos ramos do estilete que discriminam estes gêneros foram recentemente consideradas como insuficientes para sua diferenciação (Goldblatt & Manning, 2008).

No entanto, a ausência de diferenças morfológicas claras entre *Cypella*, *Kelissa*, *Onira*, *Calydorea*, *Herbertia*, *Nemastylis* e *Catila* sugere que as circunscrições genéricas de todos estes gêneros devem ser revistas (Chauveau *et*

al., 2012). As semelhanças entre os caracteres morfológicos nos gêneros e a dificuldade de definir caracteres diagnósticos prejudicam a interpretação das filogenias. Outros estudos têm sido realizados a fim de resolver a circunscrição das tribos e gêneros de Iridaceae, como por exemplo, o estudo publicado por Lovo *et al.*, (2012) onde foram analisadas as relações filogenéticas entre os gêneros da tribo Trimezieae, evidenciando através de caracteres morfológicos e moleculares a existência de quatro clados, sendo que três dos quatro gêneros analisados foram considerados parafiléticos (*Neomarica* Sprague, *Pseudotrimezia* R.C. Foster, *Trimezia* Salisb. ex Herb.). Nestes casos, investigações complementares são necessárias e a busca de caracteres diagnósticos relevantes é extremamente importante para delimitar e caracterizar adequadamente os gêneros.

Nesse sentido, estudos com foco na biologia da polinização destas espécies podem ser especialmente úteis, a fim de avaliar se as variações florais observadas estão relacionadas com adaptações aos polinizadores e a evolução e diversificação do clado A de Tigridieae. Exemplos claros da grande variação morfológica floral estão documentados em diversos gêneros africanos de Iridaceae, mostrando a estreita relação da influência do sistema de polinização para a diversificação floral nesses gêneros. Modelos como estes podem ser aplicados às tribos americanas de Iridoideae, principalmente a tribo Tigridieae. Na subfamília Crocoideae, gêneros como *Gladiolus* L. e *Tritoniopsis* L. Bolus são exemplos de gêneros africanos de Iridaceae que se diversificaram por radiação adaptativa, levando a uma profunda diversificação floral (Manning e Goldblatt, 2005; Goldblatt & Manning, 2008). *Gladiolus* é um exemplo clássico de um gênero com morfologia floral derivada associada com vários sistemas de polinização (Goldblatt *et al.*, 2001).

A reconstrução dos estados de caracteres relacionados à oferta de recursos florais mostra que tanto para nectários como para elaióforos a condição ancestral é a ausência de estruturas e que a evolução ocorreu no clado A de forma independente. Nectários estaminais e elaióforos perigonais evoluíram uma única vez na base das linhagens *Cypella*, incluindo os gêneros monotípicos *Kelissa* e *Onira*. Além disso, *Herbertia* foi caracterizado pela perda da capacidade do tecido conjuntivo para produzir néctar e as únicas estruturas restantes especializadas

para atrair polinizadores foram os elaióforos. Nectários florais estão presentes em diversas famílias botânicas, contrariamente aos elaióforos que são restritos a 11 famílias de Angiospermas, sendo Iridaceae uma exceção onde a evolução ocorreu múltiplas vezes, ao contrário das demais (Renner & Schaefer; 2010; Chauveau *et al.*, 2011; Chauveau *et al.* 2012). Chauveau *et al.* (2012) sugerem que na subfamília Iridoideae, provavelmente os elaióforos evoluíram independentemente nas três tribos, Sisyrinchieae, Trimezieae e Tigridieae. No clado A de Tigridieae os tricomas secretores de óleos florais estão presentes nas tépalas internas em *Cypella*, *Kelissa* e *Onira*. Em *Herbertia*, os elaióforos ocorrem nas tépalas internas e externas, uma inovação para o clado A de Tigridieae (Chauveau *et al.*, 2012).

Mudanças em sistemas de polinização são consideradas forças motrizes para a especiação, promovendo o isolamento reprodutivo das populações periféricas e ecologicamente distintas nas Iridaceae da África sub-saariana (Goldblatt & Manning, 2006). Da mesma forma, as transições observadas no sentido da presença de tricomas glandulares e nectários estaminais podem indicar que as interações com polinizadores especializados tenham promovido processos de especiação por evolução local, favorecendo o sucesso evolutivo de Iridoideae no continente americano (Chauveau *et al.*, 2012). Aliado a isso, a região Sul da América do Sul, especialmente a Bacia do Rio da Prata (Apendice B) parece ser o centro de diversificação para o gênero *Cypella*, já que neste local e especialmente no estado do Rio Grande do Sul ocorre o maior número de espécies do gênero. No entanto, fatores ligados a essa diversificação, sejam biogeográficos, ecológicos ou genéticos devem ser investigados.

A partir dos resultados obtidos através da reconstrução filogenética e também da reconstrução do estado ancestral das estruturas de recompensa floral, podemos fornecer informações importantes sobre monofilia do clado A de Tigridieae, assim como a evidência de que os principais gêneros deste clado não são monofiléticos, principalmente *Cypella*. Além disso, os resultados obtidos até o momento sobre a tribo Tigridieae (Chauveau *et al.*, 2012) evidenciam a urgência de um exame mais detalhado das características morfológicas, permitindo uma melhor compreensão de sua evolução e possível papel na sistemática da tribo.

Este estudo sugere que um sistema de polinização bimodal que combina características de dois sistemas distintos de polinização evoluiu na tribo Tigridieae (clado A), especialmente no gênero *Cypella*. Esta estratégia de polinização é única na família Iridaceae ocorrente no continente americano e pode ter desempenhado um papel fundamental na diversificação da tribo nesta área. Novos estudos taxonômicos devem ser realizados principalmente nos gêneros *Cypella* e *Calydorea*. Adicionado a isso, investigar a diversidade morfológica das flores, a partir de uma nova abordagem é fundamental para uma melhor compreensão de como evoluíram caracteres dentro do clado A da tribo Tigridieae.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHAUVEAU, O., EGGERS, L., RAQUIN, C., SILVÉRIO, A., BROWN, S., COULOUX, A., CRUAUD, C., KALTCHUK-SANTOS, E., YOCKTENG, R., SOUZA-CHIES, T.T., NADOT, S. 2011. Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. **Ann Bot.** 107(8): 1287–1312.

CHAUVEAU, O., EGGERS, L., SOUZA-CHIES, T.T., NADOT, S. 2012. Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera. **Ann Bot.** 110: 713–729.

CHUKR NS, GIULIETTI AM. 2008. Revisão de *Trimezia* Salisb. ex Herb. (Iridaceae) para o Brasil. **Sitientibus série Ciências Biológicas.** 8: 15–58.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. 1987. Isolation of DNA from fresh plant tissue. **Focus** 12: 13-15.

EDGAR, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research.** 32: 1792–1797.

FELSENSTEIN, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution.** 17: 368–376.

GOLDBLATT, P. 1990. Phylogeny and classification of Iridaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden.** 77(4): 607-627.

GOLDBLATT, P. 1982. Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of neotropical Iridaceae. **Systematic Botany.** 7(2): 186-198

GOLDBLATT, P. 1993. The woody Iridaceae: systematics, biology and evolution of *Nivenia*, *Klattia* and *Witsenia*. Timber Press, Portland, Oregon, USA.

GOLDBLATT, P., MANNING, J.C, BERNHARDT P. 2001. Radiation of pollination systems in *Gladiolus* (Iridaceae: Crocoideae): a progression from a generalist to a specialist pollination system. **Adansonia.** 24: 243-262.

GOLDBLATT, P., MANNING, JC. 2006. Radiation of pollination systems in the Iridaceae of sub-Saharan Africa. **Annals of Botany.** 97: 317-344.

GOLDBLATT, P., MANNING, J.C. 2008. The Iris family - natural history and classification. **Timber Press.** Portland, Oregon, USA, 290p.

GOLDBLATT, P., RODRIGUEZ, A., POWELL, M. P., DAVIES, T. J., MANNING, J.C., 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.

JOHNSON, L.A., SOLTIS, D.E. 1995. Phylogenetic inference in Saxifragaceae sensu stricto and *Gilia* (Polemoniaceae) using *matK* sequences. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 82: 149–175.

LOVO, J., WINKWORTH, R. C. & MELLO-SILVA, R. 2012. New insights into Trimezieae (Iridaceae) phylogeny: what do molecular data tell us? **Ann Bot.** 110 (3): 689-702.

MADDISON, W.P., MADDISON, D.R. 2010. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis**. Version 2.73, distributed by the authors: <http://mesquiteproject.org>.

MANNING, J.C., GOLDBLATT, P. 2002. The pollination of *Tritionopsis parviflora* (Iridaceae) by the oil-collecting bee *Rediviva gigas* (Hymenoptera: Melittidae): the first record of oil-secretion in African Iridaceae. **South African Journal of Botany**. 68: 171-176.

MANNING, J.C., GOLDBLATT, P., 2005. Radiation of pollination systems in the Cape genus *Tritionopsis* (Iridaceae: Corcoideae) and the development of bimodal pollination strategies. **International Journal of Plant Sciences**. 166(3): 459-474.

NYLANDER, J. A.A. 2004. **MrModeltest v2**. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University <http://www.abc.se/~nylander/>.

OXELMAN, B., LIDÉN, M., BERGLUND, D. 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). **Plant Systematics and Evolution**. 206: 393–410.

PAGEL, M. 1999. The maximum likelihood approach to reconstructing ancestral character states of discrete characters on phylogenies. **Systematic Biology**. 48: 612–622.

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

REEVES, G., CHASE, M.X., GOLDBLATT, P., *et al.* 2001. A phylogenetic analysis of Iridaceae based on four plastid sequence regions: *trnL* intron, *trnL-F* spacer, *rps4* and *rbcL*. **American Journal of Botany**. 88: 2074–2087.

- RODRÍGUEZ, A., SYTSMAN, J. 2006. Phylogenetics of the “Tiger-flower” group (Tigridieae: Iridaceae) based on molecular and morphological evidence. **Aliso**. 22:412-424
- RONQUIST, F., HUELSENBECK, J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19: 1572–1574.
- RUDALL, P. 2002. Homologies of inferior ovaries and septal nectaries in Monocotyledons. **International Journal of Plant Sciences**. 163: 261–276.
- RUDALL, P. J., MANNING, J. C., GOLDBLATT, P. 2003. Evolution of floral nectaries in Iridaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 90:613–631
- SOUZA-CHIES, T.T.; BITTAR, G.; NADOT, S.; CARTER, L.; BESIN, E. & LEJEUNE, B. 1997. Phylogenetic analysis of Iridaceae with parsimony and distance methods using the plastid gene rps4. *Plant Systematics and Evolution* 204:109-123.
- STAMATAKIS A, HOOVER P, ROUGEMONT J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers. **Systematic Biology**. 75:758-771.
- SCHLUTER, D., PRICE, T., MOOERS, A.O, LUDWIG, D. 1997. Likelihood of ancestor states in adaptive radiation. **Evolution**. 51: 1699–1711.
- SWOFFORD, D.L.2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), beta version 4.0. Sinauer, Sunderland, MA, USA.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., *et al.* 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**. 24: 1596–1599.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**. 24: 4876–4882.
- VOGEL, S. 1974. Ölblumen und ölsammelnde Bienen. *Abhandlungen Akademie Wissenschaften Mathematisch-Naturwissenschaften Klasse*, **Tropische und Subtropische Pflanzenwelt**. 7: 1–267.
- YOUNG, N.D., HEALY, J. 2003. GapCoder automates the use of indel characters in phylogenetic analysis. **BMC. Bioinformatics** 4: 6.doi:10.1186/14712105-4-6.

APÊNDICE A

Tabela 1: Lista da amostragem utilizada, número do Voucher e Herbário e local de coleta.

Espécie	Voucher (Herbário)	Pais, Estado, Município
<i>Ainea konzattii</i> (R.C. Foster) Ravenna	Rodríguez & Ortiz Catedral 2948 (IBUG)	México, Oaxaca, Nochistlán
<i>Calydorea alba</i> Roitman & A. Castillo	Eggers & Souza-Chies 519 (ICN) SP522	Brasil, Rio Grande do Sul, Uruguaiana
<i>Calydorea approximata</i> R.C. Foster	Eggers & Souza-Chies 249 (ICN) SP516	Brasil, Rio Grande do Sul, Palmeira
<i>Calydorea basaltica</i> Ravenna	Eggers & Souza-Chies 606 (ICN) SP890	Brasil, Paraná, General Carneiro
<i>Calydorea campestris</i> (Klatt) Baker	Eggers & Souza-Chies 330 (ICN) SP526	Brasil, Paraná, Balsa Nova
<i>Calydorea crocoides</i> Ravenna	Eggers & Souza-Chies 218 (ICN) SP515	Brasil, Rio Grande do Sul, São José dos Ausentes
<i>Calydorea pallens</i> Griseb.	Goldblatt 9579 (MO) SP547	Argentina, Córdoba (RBGK I-200)
<i>Calydorea undulata</i> Ravenna	Roitman T-12 SP576	Argentina, Córdoba (RBGK 30878)
<i>Calydorea xyphioides</i> Esp.	Chauveau H11001 (ICN) SP 875	Chile, Region VII, Libueno
<i>Catila amabilis</i> Ravenna	Eggers, Chauveau & Pastori 742 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul, Barra do Quaraí
<i>Catila amabilis</i> Ravenna	Eggers 697 (ICN) SP 503	Brasil, Rio Grande do Sul (PABG IRI032)
<i>Cipura campanulata</i> Ravenna	Henrich & Stevens 143 (MO) SP569	Nicaragua, Estelí (RBGK I-201)
<i>Cipura formosa</i> Ravenna	Wood, Soto & Villarroel 24865 (K, LPB) K37118	Bolivia, Santa Cruz, Angel Sandoval (RBGK 37118)
<i>Cipura paludosa</i> Aubl.	Rodríguez & Martinelli 2856 (IBUG) TI002	México, Nayarit, Compostela
<i>Cypella aquatilis</i> Ravenna	Eggers & Chauveau 714 (ICN) TI026	Brasil, Rio Grande do Sul, Muitos Capões
<i>Cypella armosa</i> Ravenna	Eggers, Chauveau & Pastori 761 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul, São Borja

<i>Cypella discolor</i> Ravenna	Aita 75 (ICN) TI007	Brasil, Rio Grande do Sul, Quaraí
<i>Cypella fucata</i> Ravenna	Silvério s.n. (ICN 174144) TI013	Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre
<i>Cypella fucata</i> Ravenna	Eggers & Souza-Chies 444 (ICN) TI014	Brasil, Rio Grande do Sul, Piratini
<i>Cypella fucata</i> Ravenna	Eggers, Chauveau & Pastori 746 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul, Uruguaiana
<i>Cypella fucata</i> Ravenna	Eggers, Chauveau, Pastori & Stiehl-Alves790 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul, Quaraí
<i>Cypella hauthalii</i> ssp. <i>opalina</i> Ravenna	Eggers & Souza-Chies 541 (ICN) TI	Brasil, Rio Grande do Sul, Santo Antônio das Missões
<i>Cypella hauthalii</i> ssp. <i>opalina</i> Ravenna	Eggers, Chauveau & Pastori 764 (ICN) EC	Brasil, Rio Grande do Sul, São Borja
<i>Cypella herbertii</i> (Lindl.) Herb.	Eggers 698 (ICN) SP504	Brasil, Rio Grande do Sul, Quaraí (PABG IRI034)
<i>Cypella herbertii</i> (Lindl.) Herb.	Eggers, Chauveau & Pastori 752 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul, Itaqui
<i>Cypella herbertii</i> (Lindl.) Herb.	Eggers & Souza-Chies 547 (ICN) TI023	Brasil, Rio Grande do Sul, São Borja
<i>Cypella herbertii</i> (Lindl.) Herb.	Aita 79 (ICN) TI011	Brasil, Rio Grande do Sul, Quaraí
<i>Cypella laxa</i> Ravenna	L. Eggers, O. Chauveau & T. Pastori 730 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul, São Pedro do Sul
<i>Cypella laxa</i> Ravenna	L. Eggers, O. Chauveau & T. Pastori 766 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul, Santo Antônio das Missões
<i>Cypella aff. pusilla</i> Ravenna	Eggers, Chauveau, Pastori & Stiehl-Alves778 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul, Lavras do Sul
<i>Cypella aff. pusilla</i> Ravenna	Eggers, Chauveau, Pastori & Stiehl-Alves783 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul, Lavras do Sul

<i>Cypella luteogibbosa</i> Deble	Eggers, Chauveau, Pastori & Stiehl-Alves 791 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul, Quaraí
<i>Cypella luteogibbosa</i> Deble	Eggers & Chauveau 711 (ICN) TI 030	Brasil, Rio Grande do Sul, Quaraí
<i>Cypella magnicristata</i> Deble	Aita 76 (ICN) TI015	Brasil, Rio Grande do Sul, Quaraí
<i>Cypella magnicristata</i> Deble	Eggers & Chauveau 708 (ICN) TI030	Brasil, Rio Grande do Sul, Quaraí
<i>Cypella osteniana</i> Beauverd	RBG Kew 1987-209 - sem voucher	Uruguay, Lavalleya, Minas (RBGK 30882)
<i>Cypella pabstiana</i> Ravenna	Eggers, Chauveau & Pastori 741 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul, Barra do Quaraí
<i>Cypella pusilla</i> (Link & Otto) Benth. & Hook. f. ex B.D. Jacks.	Eggers, Chauveau, Pastori & Inacio 818 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul, Porto Alegre
<i>Cypella</i> aff. <i>suffusa</i>	Eggers, Chauveau & Pastori 757 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul, São Borja
<i>Herbertia crosae</i> Roitman & J.A. Castillo	L. Eggers & T.T Souza-Chies 528 (ICN)	Brasil, Rio Grande do Sul
<i>Herbertia darwinii</i> Roitman & A. Castillo	Eggers & Souza-Chies 502 (ICN) SP520	Brasil, Rio Grande do Sul, Livramento
<i>Herbertia lahue</i> (Molina) Goldblatt	Chauveau H11011 (ICN) SP 537	Chile, Region VIII, Diguilin
<i>Herbertia pulchella</i> Sweet	Eggers & Souza-Chies 671 (ICN) TI020	Brasil, Rio Grande do Sul, Cristal
<i>Herbertia quareimana</i> Ravenna	Eggers 699 (ICN) SP 505	Brasil, Rio Grande do Sul, Quaraí (PABG IRI036)
<i>Herbertia tigridioides</i> (Hicken) Goldblatt	Huaylla 1502 (HSB, MO) K36998	Bolivia, Tarija, Arce (RBGK 36998)
<i>Herbertia zebrina</i> Deble	Eggers & Souza-Chies 179 (ICN) SP003	Brasil, Rio Grande do Sul, Encruzilhada do Sul
<i>Kelissa brasiliensis</i> (Baker) Ravenna	Eggers 701 (ICN) SP 507	Brasil, Rio Grande do Sul, Caçapava do Sul (PABG IRI038)
<i>Kelissa brasiliensis</i> (Baker) Ravenna	Eggers & Souza-Chies 670 (ICN) TI025	Brasil, Rio Grande do Sul, Cristal

<i>Larentia linearis</i> (Kunth) Klatt	Wood 17618 (LPB, USZ)	Bolivia, Santa Cruz, Ñuflo de Chavez (RBGK 37103)
<i>Larentia rosei</i> (R.C. Foster) Ravenna	Rodriguez & Martinelli 2855 (IBUG, WIS) SP567	México, Jalisco, Las Piedras (RBGK 22040)
<i>Larentia mexicana</i> (Morton & Foster) Goldblatt	Ortiz-Catedral 212 (IBUG) SP 566	México. Jalisco, Chamela (RBGK 21851)
<i>Nemastylis geminiflora</i> Nutt.	Went s.n. (Source: A. Rodríguez) SP 557	U.S.A. (RBGK 22043)
<i>Nemastylis tenuis</i> (Herb.) S. Watson	Rodríguez 2636 (IBUG)	México, Jalisco, San Miguel el Alto
<i>Onira unguiculata</i> (Baker) Ravenna	Eggers & Souza-Chies 273 (ICN) TI021	Brasil, Rio Grande do Sul, Rio Grande (PABG IRI168)
<i>Onira unguiculata</i> (Baker) Ravenna	Aita 73 (ICN) SP517	Brasil, Rio Grande do Sul, Quaraí
Outgroups - Tribo Trimezieae		
<i>Neomarica candida</i> (Hassl.) Sprague	Eggers 694 (ICN) SP500	Brasil (PABG IRI004)
<i>Trimezia spathata</i> (Klatt) Baker	Eggers 695 (ICN) SP501	Brasil, Rio Grande do Sul, Derrubadas (PABG IRI009)
Tigridieae - Clado B		
<i>Gelasine coerulea</i> (Vell.) Ravenna	Eggers & Souza-Chies 676 (ICN) TI027	Brasil, Rio Grande do Sul, São Francisco de Paula
<i>Gelasine elongata</i> (Graham) Ravenna	Eggers & Chauveau & Pastori 722 (ICN) SP 560	Brasil, Rio Grande do Sul, Salto do Jacuí
<i>Phalocallis coelestis</i> (Lehm.) Ravenna	Eggers 703 (ICN) SP 510	Rio Grande do Sul, São Lourenço do Sul (PABG IRI078)

Tabela 2: Condições de amplificação por PCR, padrão utilizado para as amplificações/tubo.

	Amplificação		
	Concentração inicial	Concentração final	Volume (μ l/tubo)
DNA	~ 50 ng/ μ l	~ 2,5 ng/ μ l	1,5
dNTP	2 mM	200 μ M	5
Primer F	10 μ M	1 μ M	5
Primer R	10 μ M	1 μ M	5
T 10 x	10 x	1 x	5
DMSO	-	4% Vf	2
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	1,5
Taq Pol	5 U/ μ l	1,5 U	0,3
H ₂ O qsp 50 μ l	-	-	24,7

Tabela 3: Primers utilizados para as ampliações.

Primer	Direção	Sequência do Primer 5'-3'	Fonte
<i>matK</i>			
<i>matK-F1</i>	Forward	5'-ATGGAAGAATTACAAGGATAT	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>trnK2R</i>	Reverse	5'-AACTAGTCGGATGGAGTAG	(Johnston and Soltis, 1995)
<i>psbA-trnH</i>			
<i>trn F(psbA)</i>	Forward	5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>trn R (rps16)</i>	Reverse	5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>rbcL</i>			
<i>rbcL 1F-675R / rbcL 656F-1360R</i>			
<i>rbcL 1F</i>	Forward	5'-ATGAGTTGTAGGGAGGGACT	(Reeves <i>et al.</i> , 2001)
<i>rbcL 1360R</i>	Reverse	5'-CTTCACAAGCAGCAGCTAGTTC	(Reeves <i>et al.</i> , 2001)
<i>rbcL 656F</i>	Forward	5'-TGCGTTGGAGAGACCGTTTC	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>rbcL 675R</i>	Reverse	5'-GAAACGGTCTCTCCAACGC	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>rps 16</i>			
	Forward	5'-GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT	(Oxelman <i>et al.</i> , 1997; Chauveau <i>et al.</i> 2012)
	Reverse	5'-TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC	(Oxelman <i>et al.</i> , 1997; Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>trnQ-rps16</i>			
<i>trnQ-rps16 F</i>	Forward	5'-GCGTGGCCAAGTGGTAAGGC	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>trnQ-rps16 R</i>	Reverse	5'-GTTGCTTTCTACCACATCGTTT	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>TQ-F6</i>	Forward	5'-TTTCGGTTAAGTCAAAGGGGG	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>TQ-R3</i>	Reverse	5'-CCCTTTGAGTTAACCGAAAGGCATTG	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)

Tabela 4: Condições de amplificação do DNA por PCR: (1) desnaturação inicial, (2) número de ciclos, (3), desnaturação, anelamento e etapa de alongamento de cada ciclo e (4) etapa final de alongamento. A temperatura e a duração estão indicadas em cada etapa.

Marcador	Perfil PCR
<i>matK</i>	(1) 80°C-5 mn; (2) 40; (3) 94°C-1 mn, 54°C - 40 s, 72°C-2 mn; (4) 72°C-5 mn
<i>psbA-trnH</i>	(1) 94°C-5 mn; (2) 40; (3) 94°C-1 mn, 53°C - 40 s, 72°C-2 mn; (4) 72°C-5 mn
<i>rbcL</i>	(1) 80°C-5 mn; (2) 40; (3) 94°C-1 mn, 56°C - 40 s, 72°C-2 mn; (4) 72°C-5 mn
<i>rps 16</i>	(1) 80°C-5 mn;(2) 40; (3) 94°C-1 mn,54°C - 40 s, 72°C-1:30 mn;(4) 72°C-5mn
<i>trnQ-rps16</i>	(1) 94°C-3 mn; (2) 40; (3) 94°C-1 mn, 62°C - 40 s, 72°C-2 mn; (4) 72°C-5 mn

Tabela 5: Dados obtidos durante a Análise de Máxima Parcimônia, evidenciando o número total de caracteres de cada matriz, o número total de caracteres informativos e a porcentagem de caracteres informativos para cada marcador.

Análise de Máxima Parcimônia			
	Número total de caracteres	Número de caracteres informativos	Porcentagem de caracteres informativos
matK	1866	221	11,8%
psbA-trnH	1098	106	9,65%
rbcL	1359	96	7,06%
rps16	895	89	9,94%
trnQ-rps16	2120	206	9,72%

Tabela 6: Índices obtidos durante a análise de Máxima Parcimônia para cada marcador, sendo Índice de Consistência (IC), Índice de retenção (IR) e Índice de homoplasia (IH).

Análise de Máxima Parcimônia - Índices					
	matK	rbcL	psbA-trnH	rps16	trnQ-rps16
Índice de Consistência (IC)	0.768	0.586	0.684	0.684	0.775
Índice de retenção (IR)	0.933	0.816	0.852	0.852	0.916
Índice de homoplasia (IH)	0.232	0.414	0.316	0.316	0.225

Tabela 7: Dados das sequências, partições das sequências e Modelos evolutivos utilizados para análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana.

Partição do DNA	Comprimento total	N.		ML	IB	
		Inicial	final			
<i>matK</i>	1581	1	1581	GTR+I+G	GTR+G	
<i>rbcL</i>	1359	1	1359		HKY+I+G	
<i>trnQ-rps16</i>	2120					
<i>trnQ</i>		1	49		K80	
<i>espaçador trnQ-rps16</i>		50	2102		GTR+G	
<i>rps16</i>		2103	2120		JC	
<i>rps16</i>	<i>rps16 Intron</i>	895	895		GTR+I+G	GTR+I
<i>psbA-trnH</i>	1098					
<i>psbA</i>		1	53		SYM	
<i>espaçador psbA-rps19</i>		54	180		GTR	
<i>rps19</i>		181	497	GTR+G		
<i>espaçador rps19-trnH</i>		498	1068	GTR+G		
<i>trnH</i>		1069	1098	K80		

APÊNDICE B

Mapa de distribuição do gênero *Cypella* na América do Sul

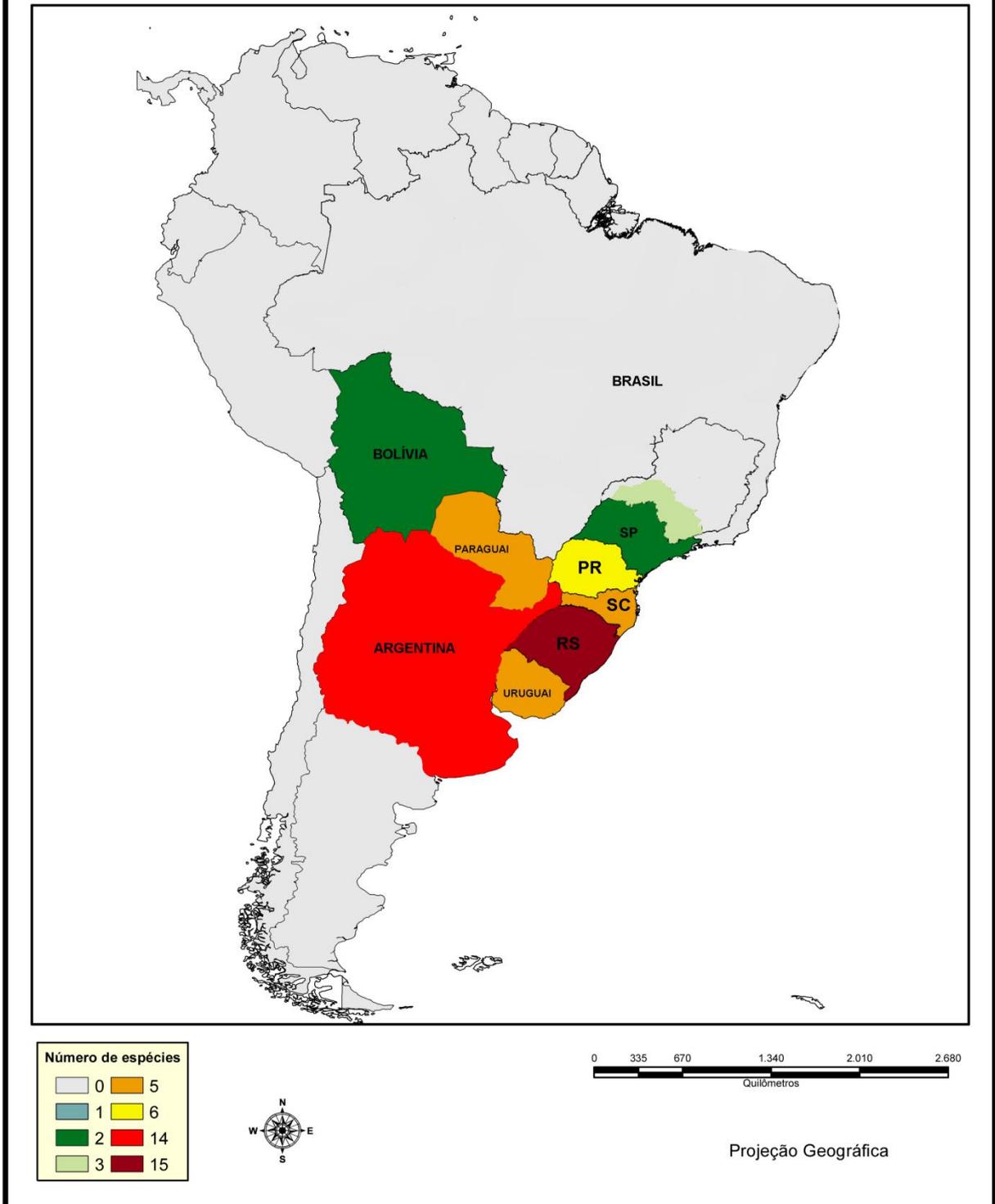


Figura 1 – Mapa de distribuição geográfica do gênero *Cypella* na América do Sul. Cada cor corresponde a uma classe quantitativa dos números de espécies correspondentes a cada estado ou país. (Programa: Arcgis versão 10.1). (Dados obtidos da literatura e de observações pessoais).



Figura 2: Bacia Hidrográfica do Rio da Prata e seus afluentes. Possível centro de diversificação do gênero *Cypella* na América do Sul. (Programa: Arcgis versão 10.1). Mapa internet: <http://global.britannica.com/EBchecked/topic/463804/Rio-de-la-Plata>.

CAPÍTULO IV



Foto: L.Eggers, 2013

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As interações entre plantas e polinizadores são os principais componentes da dinâmica da maioria dos ecossistemas terrestres. Estas interações desempenham papel fundamental na diversificação das espécies e em muitos eventos de especiação. Estudos sugerem que a seleção mediada por polinizadores constitui a principal força motriz para a diversidade floral e especiação vegetal. No entanto, existem muitos mecanismos atuando em conjunto nesse processo, desde ecológicos a genéticos. Características florais, tais como a forma da flor, recursos florais, coloração, presença de aromas florais, etc, integrados diretamente a polinizadores, poderiam mediar a seleção e o sucesso reprodutivo das espécies. Isso porque a morfologia, as preferências sensoriais e comportamento diferem entre polinizadores, a seleção imposta por eles pode levar à diversificação floral.

O padrão de diversificação floral observado nas espécies de Tigridaeae ocorrentes na região Sul da América do Sul parece estar diretamente relacionado com a ampla variação de formas, colorações e recursos oferecidos pelas espécies ocorrentes nessa região. Além disso, quando analisamos o padrão de distribuição geográfica de um único gênero de Tigridaeae, por exemplo, *Cypella*, observa-se que a ocorrência da maioria das espécies está na região Sul do Brasil, adicionado à região Norte da Argentina e ao Uruguai (Apêndice B). O centro de diversificação do gênero *Cypella* parece fortemente relacionado com a Bacia Hidrográfica do Rio da Prata. Essa bacia é formada pelas sub-bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai e por seus respectivos afluentes, estendendo-se pelo Brasil, Uruguai, Bolívia, Paraguai e Argentina. Além disso, a bacia do Rio da Prata abrange ecossistemas importantes como, por exemplo, o pampa, o chaco, o cerrado e a mata atlântica.

As análises realizadas durante a presente dissertação demonstraram a ampla oferta de recursos observados nas espécies do clado A de Tigridaeae. O estudo integrado apresentou possibilitou o reconhecimento de um padrão de oferta de recursos observado anteriormente em somente uma espécie africana de Iridaceae: a oferta de três tipos de recursos florais, pólen, óleos florais e néctar. Trabalhos anteriormente publicados, com a espécie *Cypella herbertii* (Vogel, 1974; Devoto e Medan, 2008) apontavam para a existência de néctar e óleos florais nessa espécie. No entanto, nenhum estudo estrutural ou histológico havia

sido realizado a fim de verificar a presença e a identificação de elaióforos e nectários.

A presente dissertação mostrou, através de estudos anatômicos e testes histológicos, a existência de estruturas como nectários estaminais e elaióforos perigonais nas espécies pertencentes ao clado A da tribo Tigridaeae. A evolução dos elaióforos perigonais e nectários estaminais ocorreram independentemente no clado A de Tigridaeae, especialmente no ancestral comum dos gêneros *Cypella*, *Kelissa*, *Onira* e *Herbertia*. Os gêneros *Kelissa* e *Herbertia* apresentam uma reversão para a perda de nectários, com uma diminuição do tecido conectivo da antera. No entanto, *Herbertia* apresenta uma inovação para o clado A, a presença de elaióforos nas tépalas internas e externas. Esse conjunto de observações demonstra uma estratégia incomum na família Iridaceae.

Além disso, análises morfológicas mostraram variações no formato das tépalas e a posição dos elaióforos entre as espécies *Cypella*, *Kelissa* e *Onira*. Estes dados obtidos da morfologia corroboraram dados filogenéticos, onde, apesar de *Cypella* não ser monofilética, as espécies foram agrupadas basicamente de acordo com a morfologia da tépala interna. Estes resultados sugerem fortemente que as circunscrições de *Cypella* e do clado A da tribo Tigridaeae devem ser revistos. Neste caso, investigações complementares são necessárias e a busca de caracteres diagnósticos relevantes é importante para delimitar e caracterizar adequadamente os gêneros. A utilização de caracteres como formato da tépala poderia ser um dado importante a ser utilizado na circunscrição. No entanto, o desenvolvimento de novos métodos para inclusão de um maior número de caracteres propiciará uma nova interpretação, a qual poderá trazer informações valiosas para a resolução taxonômica destes grupos.

Este estudo contribuiu para a compreensão dos recursos florais oferecidos e a evolução destes no clado A de Tigridaeae, propiciando um melhor entendimento de estruturas como elaióforos e nectários e a ampla ocorrência nas espécies estudadas. Espécies com estratégias de polinização bimodal, como o caso de *Cypella* e *Onira*, parecem ter moldado a evolução de Tigridaeae na região da Bacia do Rio da Prata. Ainda permanecem em aberto questões importantes que abrem novas perspectivas de estudos, como por exemplo, investigações

sobre a biologia da polinização e a importância de cada recurso para as espécies. Além disso, o esclarecimento sobre a composição do néctar em espécies de *Cypella* e dos elaióforos em espécies de *Kelissa*, *Onira* e *Herbertia* são aspectos importantes para formulação de hipóteses sobre a função dessas estruturas.