

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

**Taxonomia das espécies sul-brasileiras de *Calydorea* Herbert
(Iridaceae) e caracterização por DNA “barcode”**

Leandro Dal Ri

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul como requisito parcial para a obtenção do Título
de Mestre em Botânica.

Orientadora: Dra. Lilian Eggers

Co-orientadora: Dra. Tatiana Teixeira de Souza-Chies

Porto Alegre, março de 2012

Não se pode falar em potencialidades paisagísticas sem pensar no grande dilema dos tempos modernos: o *economismo* e o *ecologismo*. Enquanto o *economismo* é de um imediatismo por vezes criminoso, o *ecologismo*, tomado em seus termos mais simples, é de uma ingenuidade e puerilidade tão grandes que chega a prejudicar qualquer causa que vise à proteção dos recursos naturais ditos renováveis, na maioria dos casos de muito problemática reconstrução.

Neste sentido, partilhamos a opinião de Walder Góes, onde nem *ecologismo*, que manda conservar a natureza reservando-a a função de paraíso ambiental, nem *economismo*, que manda transformar o capital ecológico em consumo, mas sim o equilíbrio e a planificação racional que compatibilize os objetivos do desenvolvimento e da proteção a um só tempo, com proveito de metas econômicas e ecológicas.

Aziz Ab'Sáber – Geógrafo Brasileiro

Agradecimentos

À minha orientadora Lilian Eggers pela incansável disposição na tarefa de me orientar, pela amizade sincera e pelo conhecimento taxonômico em botânica que obtive durante o curso de mestrado, tanto nos trabalhos de laboratório quanto de campo.

À minha co-orientadora Tatiana Teixeira de Souza-Chies pelo auxílio na compreensão das novas fronteiras da sistemática molecular em plantas.

A todos os professores do Departamento de Botânica com os quais estive em sala de aula e àqueles com quem pude ter a oportunidade de trocar valiosas conversas esclarecedoras. Agradeço em especial às professoras Mara Ritter, Silvia Miotto, Hilda Longhi-Wagner, Ilsi Boldrini e Eliane Kaltchuk e aos professores Luis Rios de Moura Baptista, Rodrigo Singer, Gerhard Ernst Overbeck, Paulo Brack e Sérgio Leite, que sempre me fortaleceram com seus comentários. Ao professor João André Jarenkow que inicialmente me recebeu e permitiu que eu pudesse realizar a prova de seleção.

Ao pesquisador Olivier Chauveau pelo apoio, pelos esclarecimentos científicos e pelos dados moleculares necessários para o início do trabalho com DNA “barcode”.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Taxonomia Adriana Aita, Eduardo Pasini, Jaqueline Durigon, Priscila Porto Alegre Ferreira, Marília Trojan e João Iganci, com os quais tive verdadeiras aulas de botânica, pela amizade e pelo crescimento pessoal. Agradeço também os sempre oportunos diálogos com Maria da Conceição.

É sabido que o LabTax sempre foi marcado pelo gosto pela música manifestada rotineiramente pelos seus integrantes, neste contexto, dedico um especial obrigado ao Eduardo, com seu violão e seu repertório, sempre bem executado, de clássicos do Rock’n’Roll e Hard Rock, durante os encontros musicais que tivemos.

Aos colegas do Laboratório de Sistemática Molecular Juliana Fachinetto, Juliana Lustosa, Janaína Gomes da Silva, Paula Burchardt, Rogéria Miz, Cassiano Welker e Alice Flores pela enorme paciência em explicar os procedimentos e protocolos. Em especial quero agradecer a Eudes Maria Stiehl-Alves e Tiago Luiz da Silva Alves pela amizade, pelas conversas e desabafos, sem os quais, eu não teria obtido novos dados ao trabalho em sistemática molecular. Agradeço ao pesquisador Cassio van den Berg e Hibert Huayalla da UEFS pelo envio de DNA e amostra vegetal de *Calydorea gardneri*. Agradeço a Greta Dettke pela sua disposição na confecção dos mapas de registros de coleta.

Aos amigos Rodrigo Fernandez e Pedro Rates Vieira, componentes fundamentais do *Angiosperms blues sessions* e a Angelo Schneider por ter encontrado os exemplares de *Calydorea crocoides* com tépalas brancas e pela amizade. Agradeço a Aline Pigatto e Luciana Mancino pela amizade e apoio sempre oportunos.

À Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul por ter me concedido licença durante o período em que estive no mestrado. Desejo agradecer meus amigos da FZB, técnicos do Parque Zoológico, Felipe Simões Pires Netto, Hilberto Schaurich, Henrique Feix, Maria Tereza Valduga Schmitt, Marco Squeff, Flávio Flores Pires, Raquel Hohendorff, Maria do Carmo Both e ao ex-diretor do Parque Zoológico Roque Tomazeli pela amizade e apoio constante. Agradeço também os colegas do Jardim Botânico Jorge Dupont, Andréia Carneiro, Ricardo Aranha, Ari Nilson, Luiz Carlos da Silva e ao meu grande amigo Saulo Barbosa Lopes.

Agradeço minha colega da FZB, Rejane Rosa, pelos desenhos dos hábitos das plantas e pelo incentivo, e ao botânico Edson Carvalho pelos demais desenhos e pela elaboração das pranchas.

Aos todos meus amigos de São Leopoldo e Caxias do Sul, sem exceções, quero agradecer pelo incentivo e compreensão e a todos os colegas da pós-graduação com os quais

tive contato durante este período, pelas conversas técnicas, filosóficas e não-filosóficas, meu muito obrigado.

À minha mãe Loirene Roso Dal Ri por me ouvir sempre e me aconselhar, aos meus irmãos Alexsandro Dal Ri e Leonardo Dal Ri e suas respectivas esposas Vânia Schiochet Dal Ri e Fabiana Dal Pizzol Dal Ri pelo apoio constante. Aos que já se foram, mas que nunca sairão da memória, meu pai Alcides Dal Ri, meu nono Atillio Roso e minha nona Regina Roso, agradeço.

Agradeço de forma muito especial a Thais de Beauclair Guimarães pelo amor e carinho que tem me dedicado, pela revisão criteriosa dos meus escritos, pelas suas sugestões botânicas e pela companhia em todos os momentos.

Muito obrigado.

Leandro Dal Ri

Sumário

Introdução Geral

	Página
A Família Iridaceae Jussieu.....	2
Características morfológicas.....	2
Sistemática e filogenia.....	4
A Tribo Tigridieae.....	8
O gênero <i>Calydorea</i> Herbert.....	11
Características morfológicas.....	11
Posicionamento taxonômico.....	11
Histórico taxonômico.....	12
Diversidade de espécies e distribuição geográfica.....	15
Levantamentos florísticos no Brasil.....	17
Estudos citogenéticos em espécies de <i>Calydorea</i>	17
Uso de DNA “barcode” para caracterização de espécies vegetais.....	19
Objetivos.....	23
Referências bibliográficas.....	23

Capítulo 1

Espécies de *Calydorea* Herbert (Iridaceae) ocorrentes na Região Sul do Brasil

	Página
Resumo e abstract	33
1.1 Introdução.....	34
1.2 Material e métodos.....	37
1.3 Tratamento taxonômico.....	38
1.4 Chave para identificação das espécies de <i>Calydorea</i> da Região Sul do Brasil.....	39
1.4.1 <i>Calydorea alba</i> Roitman & A. Castillo.....	40
1.4.2 <i>Calydorea approximata</i> R.C. Foster.....	46
1.4.3 <i>Calydorea basaltica</i> Ravenna.....	52
1.4.4 <i>Calydorea campetris</i> (Klatt) Baker.....	57
1.4.5 <i>Calydorea crocoides</i> Ravenna.....	64
1.5 Mapa com registros de coletas espécies sul-brasileiras de <i>Calydorea</i>	70
1.6 Outras espécies de <i>Calydorea</i> citadas para a Região Sul.....	72
<i>Calydorea amabilis</i> (Ravena) Goldblatt & Henrich.....	72
<i>Calydorea azurea</i> Klatt	73
<i>Calydorea luteola</i> (Klatt) Baker.....	73
<i>Calydorea nuda</i> (Herbert) Baker.....	74
<i>Calydorea riograndensis</i> Deble.....	74
1.7 Agradecimentos.....	75

1.8 Referências bibliográficas.....	76
1.9 Índice de coletores.....	82

Capítulo 2

Caracterização de espécies de *Calydorea* Herbert (Iridaceae) por DNA “barcode”

	Página
Resumo	84
Abstract	85
2.1 Introdução.....	85
2.2 Materiais e Métodos.....	89
Material vegetal.....	89
Laboratórios envolvidos na pesquisa.....	92
Extração do DNA vegetal.....	92
Quantificação do DNA total.....	93
Amplificação de DNA por PCR e sequenciamento.....	93
Protocolo de amplificação do gene <i>matK</i>	93
Protocolo de amplificação do gene <i>rbcL</i>	94
Protocolo de amplificação do gene <i>rps4</i>	95
Protocolo de amplificação do íntron do gene <i>rps16</i>	95
Protocolo de amplificação do espaçador <i>trnL-F</i>	95
Purificação das amostras amplificadas.....	96
Alinhamento das sequências nucleotídicas.....	96

Análise da probabilidade das substituições nucleotídicas.....	97
Estimativas das distâncias intra e interespecífica K2P.....	97
Estimativas da sobreposição “Overlap” e da separação “DNA barcode Gap” entre as espécies.....	97
Estimativa do poder de discriminação das sequências de DNA com análise de dendrograma Neighbor-Joining.....	98
Teste de Identificação das espécies usando as ferramentas MEGABLAST-GenBank e BOLD –IDS.....	98
2.3 – Resultados.....	99
Análise das sequências do gene <i>matK</i>	99
Análise das sequências do gene <i>rbcL</i>	102
Análise das sequências do gene <i>rps 4</i>	106
Análise das sequências do íntron do gene <i>rps16</i>	108
Análise das sequências do espaçador <i>trnL-F</i>	111
Análise conjunta <i>matK</i> + <i>rbcL</i> utilizando o método da parcimônia.....	114
Análise comparativa dos diferentes segmentos gênicos.....	116
Identificação no MEGABLAST GenBank e BOLD -IDS-.....	118
2.4 Discussão.....	119
Poder de discriminação de espécies.....	119
Distâncias genéticas e identificação no BOLD e GenBank.....	127
2.5 Conclusões.....	129
2.6 Agradecimentos.....	130
2.7 Referências bibliográficas.....	131

Considerações finais	137
-----------------------------------	-----

Apêndices

Apêndice 1: Perfis de PCR para amplificação de DNA.....	140
Apêndice 2: Inicializadores usados na amplificação e sequenciamento.....	141
Apêndice 3: Registros de <i>Calydorea</i> e <i>Cardiostigma</i> no GenBank e BOLD.....	142
Apêndice 4: Resultados de identificação BOLD-IDS.....	143
Apêndice 5: Resultados de identificação MEGABLAST GenBank.....	144
Apêndice 6: Perfil das distâncias genéticas dos acessos de <i>matK</i>	145
Apêndice 7: Perfil das distâncias genéticas dos acessos de <i>rbcL</i>	146

Resumo

O presente estudo objetivou realizar a revisão taxonômica das espécies de *Calydorea* ocorrentes na Região Sul do Brasil, fornecendo base para a identificação e distinção das mesmas por meio de chave analítica, ilustrações e imagens de plantas no ambiente natural. Além disto, buscou verificar a eficácia da utilização de sequências e genes alvo para discriminar as espécies à luz da proposta do DNA “barcode”, a partir da mensuração das variabilidades intra e interespecífica e da interpretação das árvores resultantes da análise de agrupamento, produzidas a partir dos dados moleculares.

Para a realização do trabalho, foi realizada coleta de material botânico em excursões de campo pela Região Sul do Brasil e foram reunidas e analisadas exsicatas de diversos herbários brasileiros e do exterior.

Os resultados do levantamento taxonômico indicaram cinco espécies pertencentes ao gênero *Calydorea* ocorrentes na Região Sul do Brasil: *C. alba* Roitman & A. Castillo, *C. approximata* R.C. Foster, *C. basaltica* Ravenna, *C. campestris* (Klatt) Baker e *C. crocoides* Ravenna. Outras espécies citadas para a região em diferentes fontes são também apresentadas e discutidas. Foi realizada uma lectotipificação em *Calydorea basáltica*, e uma espécie foi sinominizada neste táxon.

O estudo da aplicabilidade das sequências para proposta do DNA “barcode” avaliou a variabilidade de cinco trechos do genoma plastidial (*matK*, *rbcL*, *rps4*, *rps16* e *trnL-F*) em 94 acessos de 12 espécies de *Calydorea* e duas espécies de *Cardiostigma*. As análises de agrupamento Neighbor-Joining demonstraram que o poder de discriminação do gene *matK* foi o mais elevado, seguido pelo *rps16*. Quatro grupos de espécies ficaram evidenciados em todas as topologias, com pequenas variações e os grupos formados apresentam relação com

características morfológicas das espécies que os compõem, guardadas algumas exceções. Inferências filogenéticas puderam ser visualizadas e correlacionadas com observações anteriormente publicadas.

Foi verificado que a implementação de marcadores DNA “barcode” em *Calydorea* é promissora. No entanto, o aumento de dados moleculares provenientes de diferentes acessos é necessário para melhor determinar as variações intra e interespecífica no gênero.

Abstract

This study aimed a taxonomic revision of the genus *Calydorea* from southern Brazil, providing the basis for identification of the species, by means of a dichotomous key, illustrations and images of plants in the natural environment. Another aim was to verify the effectiveness of use of target gene sequences to discriminate species, in the light of the proposed DNA "barcode", through the measurement of intra and interspecific variability and the interpretation of the trees obtained from cluster analysis.

Collection of plants in field trips through Southern Brazil were performed, and exsiccates from Brazilian herbaria and from foreign countries were analyzed.

The results of the taxonomic work indicated five species of the genus *Calydorea* occurring in Southern Brazil: *C. alba* Roitman & A. Castillo, *C. approximata* R.C. Foster, *C. basaltica* Ravenna, *C. campestris* (Klatt) Baker and *C. crocoides* Ravenna. Other species mentioned for the region are also presented and discussed. It was made a lectotypification in *Calydorea basaltica* and one synonymization in this taxon.

The study of the applicability of the proposed sequences for the DNA "barcode" focused on the variability of five sections of the plastid genome (*matK*, *rbcL*, *rps4*, *rps16* and *trnL-F*) in different accessions of 14 species of *Calydorea* and two species of *Cardiostigma*. Cluster analysis with Neighbor-Joining method demonstrated that the power of discrimination

of *matK* gene was the highest, followed by *rps16*. Four groups of species were evident in all topologies, with small variations and the groups formed are related to morphological traits of the species, saved few exceptions. Phylogenetic inferences can be visualized and correlated with previously published observations.

The use of DNA markers "barcode" in *Calydorea* is promising, although the increase of molecular data from different accessions is needed to determine intra and interspecific variability with more precision.

Introdução Geral

Introdução Geral

A Família Iridaceae Jussieu

A família Iridaceae possui cerca de 2.000 espécies, distribuídas em 66 gêneros, sendo a segunda família mais numerosa da ordem Asparagales (Goldblatt & Manning 2008). Iridaceae apresenta uma distribuição ampla, ocorrendo em todos os continentes e está especialmente bem representada no sul do continente africano e nas regiões temperadas e de terras altas das Américas Central e do Sul (Goldblatt *et al.* 1998). No Brasil ocorrem 158 espécies, dentre as quais 62 são endêmicas e pertencem a 19 gêneros (Eggers *et al.* 2011). Muitas destas espécies ainda estão escassamente estudadas devido ao curto período de florescimento, à fragilidade das flores e à dificuldade de preservação das características morfológicas importantes para definição das espécies (Eggers 2008).

O nome da família deriva do gênero *Iris* L., descrito pelo botânico sueco Carolus Linnaeus em 1753, quando este fez referência à deusa grega Íris, responsável por levar as mensagens do Olimpo à Terra através do arco íris cujas cores estão presentes nas flores de muitas espécies deste gênero (PlantZafrica 2012).

Características morfológicas

Iridaceae é constituída de plantas perenifólias ou ervas decíduas, ocasionalmente arbustos com crescimento secundário anômalo (*Klattia* Baker, *Nivenia* Vent., *Witsenia* Thunb.), raramente anuais (*Sisyrinchium* L.). São plantas que podem possuir rizoma, cormo, bulbo ou quando arbustivas, um caule lenhoso. Apresentam folhas basais ou caulinares, às

vezes duas ou três inferiores sem lâmina, embainhando a base do caule e sobressaindo-se um pouco do nível do solo, tal como catafilos. As bainhas das folhas podem ser abertas ou fechadas. As folhas caulinares possuem lâminas unifaciais, nervação paralela, com ou sem nervação central distinta (Goldblatt *et al.* 1998).

As flores são dispostas em inflorescências determinadas, monocásios do tipo ripídio, frequentemente muito modificadas e, às vezes, reduzidas a uma flor solitária terminal. São protegidas por brácteas (espatas), sendo geralmente pediceladas. As flores são perfeitas e possuem simetria radial ou bilateral. Apresentam seis tépalas, as externas às vezes diferenciadas das internas, livres ou conatas, imbricadas, petalóides, podendo portar manchas. Os estames são tipicamente em número de três, opostos às tépalas externas, com filetes livres ou conatos, às vezes adnatos ao perianto; anteras livres ou às vezes adnatas aos ramos do estilete. Os grãos de pólen são geralmente monossulcados. O gineceu apresenta três carpelos conatos e o ovário é geralmente ínfero com placentação axial. Os ramos do estilete podem ser expandidos e petalóides, com dois ou três estigmas terminais, ou também, presentes na superfície abaxial dos ramos do estilete. Os óvulos podem ser poucos a numerosos, anátropos ou campilótopos. As flores podem apresentar nectários nos septos do ovário ou nas tépalas. O fruto é uma cápsula loculicida, podendo apresentar sementes ariladas ou com uma testa carnosa.

As principais sinapomorfias em Iridaceae são: i) folhas isobilaterais e unifaciais com lâminas orientadas no mesmo plano, dispostas em leque; ii) presença de cristais prismáticos de oxalato de cálcio, denominados estilóides, nas bainhas dos feixes vasculares (ocasionalmente ausentes); iii) inflorescências determinadas tipo ripídio e iv) três estames (Goldblatt *et al.* 2008; Judd *et al.* 2009).

Sistemática e filogenia

A família Iridaceae é composta por sete subfamílias (Goldblatt *et al.* 2008): i) Isophysidoideae, ii) Patersonioideae, iii) Geosiridoideae, iv) Aristeoideae, v) Nivenioideae, vi) Crocoideae e vii) Iridoideae. As subfamílias Isophysidoideae e Geosiridoideae são monoespecíficas. As espécies destas subfamílias são singulares dentro de Iridaceae, visto que *Isophysis tasmanica* (Hook.) T. Moore, que ocorre nas montanhas do oeste da Tasmânia, é a única que possui ovário súpero, enquanto *Geosiris aphylla* Baill., nativa de Madagascar e Ilhas Comoro, é a única espécie aclorofilada saprofítica. Patersonioideae e Aristeoideae são monogênicas. A primeira abrange 21 espécies dos gêneros *Patersonia* R. Br. *ex* Ker Gawler, distribuídas pela Austrália, Nova Guiné, Borneo e Sumatra, e a segunda contém 55 espécies de *Aristea* Aiton, dispersas pela África sub-Sahariana até Madagascar. Nivenioideae inclui os gêneros *Nivenia*, *Klattia* e *Witsenia*, totalizando 15 espécies, apresentando a peculiaridade de possuir crescimento secundário anômalo e caule lenhoso com cicatrizes das inserções foliares, suas espécies são nativas da África do Sul. Crocoideae abrange 29 gêneros, agrupando mais da metade das espécies da família (1.032) que ocorrem, especialmente, na África, Ásia e Europa. Iridoideae inclui 29 gêneros e cerca de 890 espécies, distribuídas pelas Américas, Eurásia, África, Austrália e Tasmânia (Goldblatt *et al.* 2008).

Todas as espécies autóctones americanas de Iridaceae pertencem à subfamília Iridoideae, que está dividida em cinco tribos: i) Diplarreneae (ocorrente na Austrália e Tasmânia); ii) Irideae (África, Eurásia e América do Norte); iii) Sisyrinchieae (Américas e Australásia); iv) Trimezieae (América Central e do Sul) e v) Tigridieae (sul da América do Norte, América Central e do Sul) (Goldblatt *et al.* 2008).

Estudos filogenéticos da família Iridaceae foram desenvolvidos inicialmente por Dahlgren *et al.* (1985). Esses autores consideraram cinco subfamílias na abordagem

taxonômica: Isophysidoideae, Aristeoideae, Sisyrinchioideae, Iridoideae e Ixioideae e dispuseram *Geosiris aphylla* em uma família separada (Geosiridaceae).

O primeiro estudo cladístico amplo em Iridaceae, abrangendo dados de campo, morfológicos, embriológicos, citológicos, químicos e anatômicos, foi realizado por Goldblatt (1990) e indicou a existência de quatro subfamílias: Isophysidoideae (um gênero monoespecífico), Nivenioideae (seis gêneros, 83 espécies), Iridoideae (quatro tribos, 42 gêneros, 690 espécies) e Ixioideae (três tribos, 28 gêneros, 860 espécies). O autor apontou a tribo Tigridaeae como sendo taxonomicamente pouco compreendida e apresentou três importantes sinapomorfias: folhas plicadas, presença de bulbo e número cromossômico básico $x = 7$. As subtribos Cipurinae e Tigridiinae, propostas anteriormente por Goldblatt (1982) foram brevemente caracterizadas.

Souza-Chies *et al.* (1997) analisaram a filogenia molecular de Iridaceae com base no gene plastidial *rps4*. Esse trabalho avaliou 34 espécies da família, mais oito espécies no grupo externo, mostrando que a monofilia de Iridaceae é bem sustentada, conforme já demonstrado por Dahlgren *et al.* (1985). De acordo com Souza-Chies *et al.* (1997), não foi confirmada a monofilia de Nivenioideae, evidenciando os gêneros *Aristea*, *Nivenia* e *Patersonia* como parafiléticos. *Isophysis tasmanica* foi indicada como sendo a espécie irmã da família, corroborando a aceitação de Isophysidoideae, já proposta por Dahlgren *et al.* (1985). Foi verificado que a divisão das tribos da subfamília Iridoideae, que inclui Tigridaeae, é consistente com a sua distribuição geográfica. Os autores salientaram que o gene *rps4*, apesar de seu tamanho relativamente pequeno, apresentou baixos índices de homoplasia e demonstrou ser filogeneticamente informativo para a reconstrução da filogenia em Iridaceae.

Reeves *et al.* (2001) realizaram um estudo de sistemática molecular em Iridaceae a partir da análise de quatro regiões do DNA plastidial. Foram avaliados os genes *rps4*, *rbcL*, o íntron do gene *trnL* e o espaçador intergênico *trnL-F* de 57 espécies de Iridaceae e seis outras

espécies de três famílias distintas no grupo externo. O trabalho indicou que as subfamílias Isophysidoideae, Iridoideae e Ixioideae são bem sustentadas e monofiléticas, contudo Nivenioideae forma um grupo basal com Ixioideae. A parafilia em Nivenioideae apresentada se deve aos altos níveis de sequências extremamente divergentes, associadas à falta de sinapomorfias morfológicas. *Isophysis tasmanica* foi considerada grupo irmão do restante da família e *Geosiris aphylla*, às vezes referida como Geosiridaceae ou Burmanniaceae, foi incluída no grupo de Nivenioideae.

Goldblatt *et al.* (2008) realizaram uma análise filogenética em Iridaceae considerando cinco regiões plastidiais (*rbcL*, *rps4*, *trnL-F*, *matK* e *rps16*). Os autores confirmaram a posição de Isophysidoideae como grupo irmão do restante da família e a parafilia da subfamília Nivenioideae, propondo um novo arranjo infrafamiliar, com a aceitação de duas novas subfamílias (Patersonioideae e Geosiridoideae), tornando Nivenioideae monofilética e reconhecendo, desta forma, sete subfamílias. Os resultados indicaram que o uso de sequências adicionais de DNA plastidial deu suporte às divisões das tribos das subfamílias Crocoideae e Iridoideae.

Estudos filogenéticos no nível taxonômico de gênero dentro de Iridaceae são escassos, alguns exemplos são os trabalhos de Goldblatt *et al.* 2002; Wilson 2004, 2011; Petersen *et al.* 2008; Lovo 2009 e Chauveau *et al.* 2011.

A filogenia do gênero *Moraea* foi inferida por Goldblatt *et al.* (2002) a partir de quatro regiões do DNA plastidial (*rbcL* éxon, *trnL* íntron, *trnL-trnF* e *rps16* íntron) de 73 espécies pertencentes aos principais agrupamentos do gênero. Os resultados indicaram que nenhuma das regiões provou ser suficientemente variável para ser usada de forma separada, mas ficou evidenciado que a variação do gene *rbcL* forneceu mais informação filogenética do que qualquer outra região plastidial. Os autores verificaram que, para tornar *Moraea* um grupo monofilético, os gêneros *Galaxia* Thunb., *Gynandriris* Parl. e *Homeria* Vent., aparentemente

distintos, bem como outros gêneros imprecisos, tais como *Barnardiella* Goldblatt, *Hexaglottis* Vent., *Rheome* Goldblatt e *Roggeveldia* Goldblatt, deveriam ser incluídos no grupo com base na evidência molecular.

Uma filogenia de *Crocus* L. foi inferida a partir de dados de cinco regiões plastidiais por Petersen *et al.* 2008. Os autores verificaram que dentre as quinze séries usualmente reconhecidas dentro do gênero, oito foram confirmadas como monofiléticas sendo as duas séries mais numerosas, *Reticulati* e *Biflori*, claramente merofiléticas, segundo os mesmos autores, os dados obtidos até então ainda haviam resolvido satisfatoriamente as relações filogenéticas em *Crocus*.

Lovo (2009) realizou uma ampla análise cladística, molecular e morfológica, em espécies de *Pseudotrimezia* R.C. Foster, com dados do genoma plastidial (*trnG*, *trnH-psbA* e *trnK*) e nuclear (ITS) associados com 50 caracteres morfológicos. Os resultados evidenciaram a monofilia em *Pseudotrimezia*, indicando polifiletismo em *Trimezia* Salisb. *ex* Herb. e em *Neomarica* Sprague, além de apontar Tigrídieae como tribo irmã. A autora concluiu que os caracteres usados na taxonomia tradicional dentro do grupo não refletem a verdadeira história evolutiva e que o emprego de marcadores mais variáveis, no nível específico, é necessário para elucidar as relações em *Pseudotrimezia*.

Um abrangente estudo filogenético com o gênero *Sisyrinchium*, realizado por Chauveau *et al.* (2011), combinou regiões codificantes (*rpoC1*, *rpoB* e *matK*) e não codificantes (*trnQ-rps16*) dos genomas plastidial, mitocondrial (*nad1-2/3* e *nad4-1/2*) e nuclear (ITS1, ITS2 e 5,8/S), além de dados morfológicos e biogeográficos, na elucidação da evolução de tricomas especializados relacionados ao processo de polinização, chamados de elaióforos. Os resultados evidenciaram que os elaióforos evoluíram pelo menos três vezes, independentemente, e permitiram confirmar a monofilia do gênero. Nove clados principais foram identificados, os quais não apresentam congruência com as classificações taxonômicas

infragenéricas existentes. Os autores também concluíram que dois eventos de dispersão do gênero podem ter ocorrido com rotas distintas, um em direção às terras subandinas da Argentina e do Chile e outro em direção à bacia do Rio Paraná.

Uma avaliação filogenética no gênero *Iris* foi realizada com sequências plastidiais por Wilson (2011), na busca de uma nova classificação infragenérica, pois um estudo prévio (Wilson 2004) indicou que a classificação dos subgêneros, baseada em caracteres morfológicos, não estava concordante com a evolução. Utilizando dados dos genes *ndhF*, *matK* e dos íntrons flaqueadores *trnK*, foi possível verificar a monofilia dos subgêneros *Nepalensis* (Dykes) Lawr. e *Xiphium* (Mill.) Spach e o polifiletismo dos subgêneros *Iris*, *Limniris* (Tausch) Spach, *Scorpiris* Spach e *Hermodactyloides* Spach. O autor verificou que mudanças na circunscrição dos subgêneros foram necessárias, além da inclusão dos gêneros *Belamcanda* Adanson, *Pardanthopsis* (Hance) Lenz e *Hermodactylus* Mill. em *Iris*, para poder tornar este gênero monofilético.

Dezenas de outros gêneros em Iridaceae, no que diz respeito as suas relações filogenéticas, ainda não tiveram nenhuma avaliação à luz de metodologias mais recentes. Filogenias a partir de dados moleculares ou combinados com características morfológicas formam um campo amplo de pesquisa a ser trilhado.

A Tribo Tigridieae

A tribo Tigridieae inclui as espécies americanas bulbosas com folhas plicadas, abrangendo os gêneros: *Alophia* Herb., *Calydorea* Herb. (incluindo *Catila* Ravenna, *Itysa* Ravenna e *Tamia* Ravenna), *Cardenanthus* R.C.Foster, *Cipura* Aubl., *Cobana* Ravenna, *Cypella* Herb. (incluindo *Kelissa* Ravenna, *Onira* Ravenna e *Phalocallis* Herb.), *Eleutherine* Herb., *Ennealophus* N.E.Br. (incluindo *Tucma* Ravenna), *Gelasine* Herb., *Herbertia* Sweet,

Hesperoxiphion Baker, *Larentia* Klatt, *Mastigostyla* I.M. Johnst., *Nemastylis* Nutt. e *Tigridia* Juss. (incluindo *Ainea* Ravenna, *Cardiostigma* Baker, *Colima* (Ravenna) Aarón Rod. & Ortiz-Cat., *Fosteria* Molseed, *Rigidella* Lindl. e *Sessilanthera* Molseed & Cruden). A tribo compreende 15 gêneros e 172 espécies e está dividida nas subtribos Tigridiinae e Cipurinae, que ocorrem no Sul da América do Norte, Cuba, México, América Central e América do Sul (Rodriguez & Sytsma 2006; Goldblatt *et al.* 2008).

Tigridieae é caracterizada por Goldblatt (1982) por apresentar plantas com bulbos; folhas plicadas; flores normalmente actinomorfas; tépalas externas muito distintas das internas; tépalas geralmente livres; ramos no estilete variáveis, desde achatados a petalóides com apêndices apicais bifurcados ou simples; filetes livres ou unidos. A subtribo Cipurinae é caracterizada por possuir ramos do estilete elaborados e petalóides ou cilíndricos, bifurcados ou simples, filetes normalmente livres, pólen monossulcado e número cromossômico básico $x = 7$; ao passo que a subtribo Tigridiinae distingue-se pelos ramos do estilete mais ou menos cilíndricos, filetes usualmente unidos, pólen bissulcado e número cromossômico básico $x = 14$.

Tigridieae está estritamente distribuída no Novo Mundo, com centros de diversidade na América do Sul andina de clima temperado e áreas no México e Guatemala, sendo uma tribo taxonomicamente difícil e com relações filogenéticas pouco compreendidas (Rodriguez & Sytsma 2006). As dificuldades taxonômicas neste grupo são devidas à grande variação morfológica e duração efêmera das flores, e à dificuldade de preservação destas em material herborizado. Rodriguez & Sytsma (2006) realizaram uma análise cladística em Tigridieae baseada em dados morfológicos e moleculares de 23 espécies da tribo, tendo reconhecido a monofilia do grupo que compreende dois clados principais. O primeiro clado inclui os gêneros tradicionalmente conhecidos como pertencentes à subtribo Cipurinae: *Calydorea*, *Nemastylis*, *Cipura* e *Cypella*. O segundo clado inclui todos os gêneros tradicionalmente

dispostos na subtribo Tigridiinae, além de *Eleutherine*, *Ennealophus*, *Cardiostigma* e *Nemastylis*, anteriormente dispostos em Cipurinae. As análises indicaram que o cladograma gerado pelos caracteres morfológicos foi muito distinto daqueles gerados com base nos dados do genoma nuclear e do genoma plastidial. Os autores concluíram que é útil combinar dados moleculares e morfológicos na busca de interpretações evolutivas e biogeográficas, especialmente em grupos com alta plasticidade morfológica. Verificaram ainda que houve uma recorrente dispersão de espécies da subtribo sul-americana Cipurinae em direção à América do Norte, o que sugere a origem sul-americana do clado mexicano-guatemalteco das espécies da subtribo Tigridiinae.

O único estudo que apresentou considerações filogenéticas com ênfase no gênero *Calydorea* foi o de Goldblatt & Henrich (1991), que utilizaram dados morfológicos de *Calydorea* e incluíram dados de *Salpingostylis* W. Bartram, *Cardiostigma*, *Itysa*, *Catila*, *Onira*, *Cypella* e outros gêneros. Estes autores concluíram que *Calydorea* é um membro moderadamente especializado dentro de Tigridieae e provavelmente evoluiu a partir de um ancestral semelhante a *Cypella*, no qual os ramos do estilete perderam o espessamento e os apêndices apicais, bem como as diferenças entre as tépalas externas e internas terem sido reduzidas. Outra conclusão deste trabalho foi a de que a flor de *Catila amabilis* Ravenna é a mais próxima deste tipo ancestral, e que *Calydorea pallens* Griseb. representa outro passo neste processo.

O gênero *Calydorea* Herbert

Características morfológicas

O gênero *Calydorea* é um pequeno grupo sul-americano de plantas perenes, pequenas, com bulbos revestidos com túnicas membranosas não fibrosas de cor marrom escura. As folhas são pouco numerosas, lineares ou ensiformes. O caule florífero é simples ou pouco ramificado, liso e circular em seção transversal. As inflorescências são ripídios, com espatas verdes, membranáceas a coriáceas, envolvendo firmemente os botões florais. As flores são radialmente simétricas, providas de pedicelos delgados, de coloração branca, azul pálido até purpúreo, podendo apresentar outra coloração na base das tépalas. As tépalas são livres, subiguais, ou as externas marcadamente maiores que as internas, as vezes unguiculadas. Os estames são simetricamente arranjados, com filetes livres, ascendentes e com anteras suberetas ou divergentes, frequentemente associadas aos ramos do estilete. O estilete é curto ou excede as anteras e podem ser divididos em três ramos curtos a longos, delgados, adpressos às anteras ou estendidos entre ou acima dos estames. As cápsulas são obovóides a cilíndricas, truncadas no ápice, contendo sementes angulares. O número cromossômico básico é $x = 7$ (Goldblatt & Manning 2008).

Posicionamento Taxonômico

O gênero *Calydorea* está incluído na subfamília Iridoideae, Tribo Tigridieae, Subtribo Cipurinae (Rodriguez & Sytsma 2006; Goldblatt *et al.* 2008).

Os sinônimos genéricos para *Calydorea*, de acordo com Goldblatt & Manning (2008), estão abaixo relacionados:

Catila Ravenna, tipo: *Catila amabilis* = *Calydorea amabilis* (Ravenna) Goldblatt & Henrich;

Itysa Ravenna, tipo: *Itysa gardneri* (Baker) Ravenna = *Calydorea gardneri* Baker

Tamia Ravenna, tipo: *Tamia pallens* (Griseb.) Ravenna = *Calydorea pallens* Griseb.

Histórico taxonômico

O botânico britânico William Herbert em 1843, a partir da espécie *Sisyrinchium speciosum* Hook., publicada em 1837, descreveu o gênero *Calydorea*. Herbert percebeu que *S. speciosum*, planta bulbosa, de folhas plicadas, foi erroneamente disposta em *Sisyrinchium*, um gênero cujas espécies possuem raízes fasciculadas e ausência de bulbo. A espécie foi então recombinada, tornando-se *Calydiorea speciosa* (Hook.) Herb., passando a ser a espécie tipo do gênero.

Em 1876, John Baker, curador do herbário dos Jardins Botânicos Reais de Kew descreveu *C. gardneri* e efetuou seis novas combinações: *C. campestris* (Klatt) Baker, *C. furcata* (Klatt) Baker, *C. longispatha* (Herb.) Baker, *C. luteola* (Klatt) Baker, *C. punctata* (Herb.) Baker e *C. texana* (Herb.) Baker.

O botânico e fitogeógrafo alemão, August Grisebach, em 1879 na obra “*Symbolae ad floram Argentinam*”, registrou a ocorrência de *C. campestris* no Brasil meridional e Uruguai e descreveu *C. pallens*, a partir de exemplares coletados no Rio Juramento, Província de Salta, no extremo noroeste do território da Argentina. O autor comentou que a espécie descrita é próxima de *C. luteola*.

Friedrich Klatt, botânico alemão especialista em plantas africanas, em 1882, descreveu *C. azurea* Klatt e *C. cipuroides* Klatt.

O botânico chileno Marcial Ramón Espinosa Bustos, em 1922, transferiu *Sisyrinchium xiphioides* Poepp., descrita em 1833, para o gênero *Calydorea*. A nova combinação, *C. xiphioides* (Poepp.) Espinosa, tornou-se então a espécie tipo do gênero, pois *C. speciosa*, anteriormente considerada espécie tipo, é seu sinônimo heterotípico, pois *Sisyrinchium speciosum* fora descrita em 1837.

A espécie *C. guatemalensis* (Standl.) R.C. Foster foi descrita em *Eleutherine*, a partir de exemplares provenientes de Cobán, região central da Guatemala, coletados a 1.350 m de altitude.

Calydorea crocoides Ravenna foi descrita em 1965 pelo botânico chileno Pierfelice Ravenna, com base em exemplares coletados em São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul. O autor a distinguiu das demais pelo tamanho notável de seus estames e de suas espatas (Ravenna 1965).

Novas combinações em *Calydorea* foram realizadas por Goldblatt & Henrich (1991), que observaram que as características diagnósticas do gênero também caracterizavam o gênero monotípico *Salpingostylis*, bem como os gêneros *Cardiostigma* e *Itysa*. Segundo estes autores, *Cardiostigma* e *Salpingostylis* dificilmente são distinguíveis entre si e diferem de *Calydorea* pelo estilete que é fracamente excêntrico, dividindo-se próximo do ápice das anteras em ramos simples e que tais diferenças são insignificantes, a ponto de não justificarem separação genérica. Os autores também consideraram o gênero monoespecífico *Catila* como sinônimo de *Calydorea*, devido à proximidade com *C. pallens*. Em resumo, Goldblatt & Henrich (1991) realizaram cinco novas combinações: *C. coelestina* (Bartr.) Goldblatt & Henrich; *C. longispatha* (Herb.) Goldblatt & Henrich, *C. mexicana* (R.C. Foster) Goldblatt & Henrich; *C. venezolensis* (Ravenna) Goldblatt & Henrich e *C. amabilis* (Ravenna) Goldblatt & Henrich.

Oito novas espécies de *Calydorea* foram descritas nos últimos dez anos. *Calydorea bifida* Ravenna é endêmica da província do Maule, próximo a Constitución, Chile (Ravenna 2003). *Calydorea chilensis* Muñoz-Schick (Muñoz-Schick 2003) foi descrita erroneamente a partir de exemplares de *Romulea rosea* (L.) Eckl. encontrados nesta mesma província. *Calydorea alba* Roitman & A. Castillo foi descrita a partir de exemplares encontrados nas pastagens úmidas do Departamento de Artigas no Uruguai (Roitman & Castillo 2005). *Calydorea basaltica* Ravenna e *C. longipes* Ravenna foram descritas para o Paraná, a partir de exemplares coletados na região de Clevelândia e nos campos de Guarapuava, respectivamente (Ravenna 2005). *Calydorea minima* Roitman & Castillo foi descrita com base em exemplares coletados em Corrientes, Argentina, sendo também indicada para o sul do Paraguai (Roitman & Castillo 2007). *Calydorea undulata* Ravenna foi descrita a partir de exemplares identificados como *C. pallens* ocorrentes nas províncias de Córdoba e San Luís, Argentina, vegetando em altitudes entre 800 e 1.000 m (De Tullio *et al.* 2008). *Calydorea riograndensis* Deble é a mais recente descrição de uma espécie do gênero, feita por Deble (2011), a partir de exemplares coletados em campos com solos ácidos da Campanha Gaúcha, no sudoeste do Rio Grande do Sul.

A taxonomia em *Calydorea* sofreu mudanças mais recentes após o trabalho de Rodrigues & Sytsma (2006), onde foram apresentados os resultados do estudo de sistemática molecular e morfológica da tribo Tigridaeae. Os autores constataram que *Cardiostigma longispatha* Herb. [= *Calydorea longispatha* (Herb.) Baker] está incluída no clado de *Tigridia* Juss. Goldblatt & Manning (2008) também reconheceram que o gênero *Cardiostigma* deve ser incluído em *Tigridia* e com isto as espécies *Calydorea mexicana* [= *Cardiostigma mexicanum* (R.C.Foster) Ravenna] e *C. longispatha* [= *Tigridia longispatha* (Herb.) Goldblatt] ficaram validadas em *Tigridia*. Goldblatt & Manning (2008) também revalidaram o gênero *Salpingostylis*, devido à ausência de dados citológicos necessários à possível transferência de

S. coelestina Bartram [= *Calydorea coelestina* (Bartram) Goldblatt & Henrich] para *Tigridia*, com isto *C. coelestina* ficou invalidada.

Calydorea chilensis foi invalidada pela sua própria descritora e colaboradores por tratar-se, na realidade, de *Romulea rosea*, uma espécie adventícia proveniente da África do Sul, que foi encontrada na região do Maule, Chile (Roitman *et al.* 2009).

Diversidade de espécies e distribuição geográfica

Os principais sites disponíveis na Internet apresentam números distintos de nomes de espécies para o gênero *Calydorea*. Os sites consultados foram: International Plant Name Index (INPI 2012), TROPICOS (Missouri Botanical Garden 2012), World Checklist of Selected Plant Families (Kew 2012) e Encyclopedia of Life (EOL 2012). A Tabela 1 indica os nomes de espécies e seus “status” nas diferentes fontes consultadas, onde se constata que há números distintos de nomes válidos.

Na abrangente obra “The Iris Family” de Goldblatt & Manning (2008) há a indicação imprecisa no que diz respeito ao número de espécies de *Calydorea*: cerca de 16 espécies. Quanto à distribuição geográfica, os autores afirmaram que *Calydorea* é um gênero exclusivo da América do Sul. Em relação a trabalhos anteriores, a distribuição mais restrita é decorrente do fato de que as espécies citadas para a América Central, o México e os Estados Unidos ficaram excluídas de *Calydorea*, nas novas combinações propostas.

Na América do Sul, espécies de *Calydorea* foram registradas na Colômbia, Venezuela, Bolívia, Chile, Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil (INPI 2012; KEW 2012; TROPICOS 2012).

Tabela 1: Lista de nomes de espécies considerados válidos (V), não aceitos (-) e não listados (0) do gênero *Calydorea* de acordo com os sites do International Plant Name Index - INPI (com buscas individualizadas no Gray Herbarium Card Index - GCI - e Index Kewensis - IK), TROPICOS - Missouri Botanical Garden -, World Checklist of Selected Plant Families, Kew Royal Botanical Garden - KEW - e Encyclopedia of Life - EOL.

Espécie	INPI GCI	INPI IK	TROPICOS	KEW	EOL
<i>Calydorea alba</i> Roitman & Castillo	V	-	V	V	V
<i>Calydorea amabilis</i> (Ravenna) Goldblatt & Henrich	V	V	V	V	V
<i>Calydorea approximata</i> R.C. Foster	V	V	V	V	V
<i>Calydorea azurea</i> Klatt	-	V	V	V	V
<i>Calydorea basaltica</i> Ravenna	-	V	V	V	V
<i>Calydorea bifida</i> Ravenna	V	-	V	V	V
<i>Calydorea campestris</i> (Klatt) Baker	-	V	V	V	V
<i>Calydorea campestris</i> var. <i>longicaulis</i> Baker	V	0	-	-	0
<i>Calydorea chilensis</i> Muñoz-Schick	V	-	-	-	V
<i>Calydorea ciporoides</i> Klatt	-	V	V	V	V
<i>Calydorea coelestina</i> (Bartram) Goldblatt & Henrich	V	V	V	-	0
<i>Calydorea crocoides</i> Ravenna	V	V	V	V	V
<i>Calydorea furcata</i> (Klatt) Baker	-	V	-	-	0
<i>Calydorea gardneri</i> Baker	V	V	V	V	V
<i>Calydorea guatemalensis</i> (Stand.) R.C. Foster	V	V	-	-	0
<i>Calydorea longipes</i> Ravenna	-	V	V	V	V
<i>Calydorea longispatha</i> (Herb.) Baker	-	V	-	V	V
<i>Calydorea luteola</i> (Klatt) Baker	-	V	V	V	V
<i>Calydorea mexicana</i> (R.C. Foster) Goldblatt & Henrich	V	V	-	V	V
<i>Calydorea minima</i> Roitman & Castillo	V	-	V	V	V
<i>Calydorea nuda</i> (Herb.) Baker	-	V	V	V	V
<i>Calydorea pallens</i> Griseb.	V	V	V	V	V
<i>Calydorea punctata</i> (Herb.)	V	V	-	-	0
<i>Calydorea riograndensis</i> Deble	0	0	0	0	0
<i>Calydorea speciosa</i> (Hook.) Herb.	-	V	V	-	0
<i>Calydorea texana</i> (Herb.) Baker	-	V	-	-	0
<i>Calydorea undulata</i> Ravenna	V	V	V	V	V
<i>Calydorea venezolensis</i> (Ravenna) Goldblatt & Henrich	V	V	V	V	V
<i>Calydorea xiphioides</i> (Poep.) Espinosa	V	V	V	V	V
Total	17	23	20	20	21

Levantamentos florísticos no Brasil

Diversos trabalhos de levantamento de espécies de Iridaceae em diferentes Estados e localidades brasileiras foram realizados, porém na maioria deles não foi constatada a ocorrência de espécies de *Calydorea* (Wanderley & Toledo 1986; Churk 1992; Capellari Jr. 2005; Garcia & Pirani 2005; Eggers 2008; Takeuchi *et al.* 2008; Dias 2010).

Dentre os primeiros registros de *Calydorea* para o território brasileiro, está o de Rambo (1951), com *C. campestris* sendo listada como um elemento andino no pinhal riograndense. Para o Paraná, *C. campestris* foi registrada no município de Guaratuba (Vieira *et al.* 2003) e em Jaguariaíva (Linsingen *et al.* 2006). Esta espécie também é citada para o Estado de São Paulo por Churk & Capellari Jr. (2003) e os autores incluem também Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul na sua área de ocorrência.

Estudos citogenéticos em espécies de *Calydorea*

Em Iridaceae, os estudos citogenéticos disponíveis avaliaram o número cromossômico (Goldblatt 1982; Kenton & Heywood 1984; Golbblatt & Takei 1997), o tamanho do genoma (Martínez & Azkue 1987; Kenton *et al.* 1990), ou caracterização do cariótipo (De Tullio *et al.* 2008). Esses estudos incluíram alguns poucos táxons de *Calydorea* e normalmente foram embasados em amostragens amplas dentro de Iridaceae.

Um estudo citológico em espécies de Iridaceae neotropicais realizado por Goldblatt (1982) indicou que na tribo Tigridieae o cariótipo é bimodal, com um ou dois pares longos e cinco ou seis pares mais curtos de cromossomos e que o número cromossômico básico é $x = 7$. Neste estudo, foi avaliado pelo menos um indivíduo de dez gêneros, dentre os 15 gêneros

da subtribo Cipurinae, e foi constatado que a maioria das espécies apresentava $n = 7$, com algumas poucas espécies apresentando $n = 14$ ou $n = 28$.

Cinco espécies de Tigridae foram analisadas por Martínez & Azkue (1987), que estudaram a implicação evolutiva da variação do conteúdo de DNA. Os valores do tamanho do genoma, obtidos para estas espécies, variaram de 1,47 a 2,48 pg, no qual *Calydorea* apresentou o menor genoma: 0,98 pg. A quantidade de DNA nuclear em *Cypella* e em *Hesperoxiphion* foi avaliada por Kenton *et al.* (1990) e os valores 1C, ou seja, da quantidade do genoma haplóide, encontrados em *Cypella* variaram de 2,03 a 2,39 pg, enquanto que para *Hesperoxiphion* variaram de 1,24 a 1,34 pg.

As análises citogenéticas realizadas por Goldblatt & Takei (1997) avaliaram padrões de variação cromossômica em cerca de 1.630 espécies de Iridaceae, verificando variações não usuais nas características do cariótipo, tais como disploidias, níveis de ploidia e número cromossômico básico (x). Em *Calydorea* foi encontrada uma série de poliplóides em vários níveis, baseada no número básico $x = 7$, onde *C. amabilis* apresentou $2n = 14$, *C. nuda* $2n = 14$, *C. undulata* $2n = 14$, *C. azurea* $2n = 28$ e *C. xiphioides* $2n = 42$.

Um estudo citológico e cromossômico foi realizado por De Tullio *et al.* (2008) com *Calydorea undulata* e *Tamia pallens*, com a finalidade de avaliar a validade da segunda espécie. Os resultados indicaram níveis de ploidia distintos, sendo *C. undulata* um diplóide ($2n = 14$) e *T. pallens* um tetraplóide ($2n = 28$). A bimodalidade do cariótipo é característica de Tigridae e *C. undulata* possui esta característica, ao passo que em *T. pallens* o cariótipo é moderadamente assimétrico. Os autores concluíram que *T. pallens* deve ser considerada sinônimo de *C. pallens*.

Uso de “DNA barcode” para caracterização de espécies vegetais

A utilização de trechos do DNA como ferramenta na identificação de organismos vivos tem se mostrado útil e está sendo difundida mundialmente devido à possibilidade de discriminação de espécies a partir de um fragmento de tecido, vivo ou morto, de qualquer fase do desenvolvimento do organismo, observando-se genes alvo como marcadores moleculares (Herbert *et al.* 2003; Barcode of Life 2011).

A identificação biológica realizada de forma clássica apresenta, segundo Herbert *et al.* (2003) algumas limitações: i) a plasticidade fenotípica e a variabilidade genética conduzem a identificações errôneas; ii) a avaliação morfológica estrita é incapaz de detectar as espécies crípticas; iii) as chaves morfológicas são úteis somente para fases específicas do ciclo de vida de muitos organismos; e iv) apesar do uso de chaves interativas, frequentemente é necessário um alto grau de conhecimento para que estas possam ser utilizadas, evitando diagnoses incorretas.

Métodos de identificação de espécies usando sequências curtas de genes, referidas como “DNA barcodes” foram propostas em estudos de biodiversidade, de identificação de formas juvenis, de melhoramento de análises forenses e de identificação de novas espécies (Herbert *et al.* 2003, Kress *et al.* 2005). Os três critérios básicos que um trecho candidato ao “barcoding” em plantas deve satisfazer, segundo Kress *et al.* (2005), são: I) apresentar significativo nível de variabilidade e divergência interespecífica, II) apresentar uma sequência relativamente curta que facilite a extração e amplificação do DNA e III) apresentar regiões flangeadoras conservadas para o desenvolvimento de primers universais.

Na discriminação de espécies animais, a região com a subunidade c do citocromo oxidase 1 (CO1) tem provado ser eficiente em diversos grupos. Em plantas, o gene CO1 apresenta baixo poder de discriminação das espécies, devido à baixa velocidade de evolução

do genoma mitocondrial no reino vegetal. A busca de um gene ou de uma associação de genes com semelhante capacidade de discriminação em plantas tem sido realizada no genoma plastidial (Herbert *et al.* 2003, Pennisi 2007; CBOL 2009; Barcode of Life 2011).

Com o intuito de avaliar o poder discriminatório entre as diferentes sequências e genes, Fazekas *et al.* (2008) compararam oito regiões do genoma plastidial, sendo cinco codificantes (*rpoB*, *rpoC1*, *rbcL*, *matK* e 23S rDNA) e três espaçadores (*trnH-psbA*, *atpF-atpH* e *psbK-psbI*) além do gene mitocondrial CO1 e verificaram que há um platô na performance de discriminação das espécies em combinações com mais de duas ou três regiões. Os autores concluíram que, uma solução razoável para o barcoding em plantas, em um único loco, é menos eficiente do que um sistema multilocos.

O *Consortium for the Barcode of life* (CBOL) é uma iniciativa internacional estabelecida em 2004, contando com pesquisadores de mais de 50 países, que visa desenvolver uma ferramenta global para identificação das espécies, e tem coordenado a busca do DNA barcode em plantas. O CBOL (2009) recomendou que a combinação de *matK* + *rbcL* seja utilizada como “core barcode” no reino vegetal, afirmando que esta combinação apresenta uma solução pragmática para o conflito de escolhas entre universalidade, qualidade da sequência, discriminação e custo. Conforme Hollingsworth (2011), o *rbcL* barcode compreende desde a primeira base da extremidade 5' até a posição 599 da sequência genômica plastidial de *Arabidopsis thaliana* Schur, enquanto que a região *matK* barcode consiste de 841 pb localizada entre as bases 205-1046 do mesmo genoma.

Uma avaliação ampla sobre a escolha e o uso de DNA barcode em plantas foi realizada por Hollingsworth *et al.* (2011), na qual o autor verificou que os genes *matK* e *rbcL*, bem como o espaçador *trnH-psbA* e o espaçador interno transcrito nuclear ITS e ITS2, são considerados como os trechos mais promissores. Os autores destacaram que a combinação de *matK* + *rbcL* em plantas é menos discriminatória do que CO1 em animais e que o

desenvolvimento de primers universais e eficientes para amplificação e seqüenciamento do *matK* ainda são limitações que devem ser consideradas.

O segundo espaçador interno transcrito do DNA ribossomal -ITS2- mostrou ser uma região com potencial para uso como DNA barcode em plantas, conforme demonstrado por Chen *et al.* (2011) em estudo de identificação de plantas medicinais. Os autores compararam sete trechos candidatos ao barcoding (*psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5*, ITS, e ITS2) e verificaram que o ITS2 discriminou 92,7% das espécies. Os resultados de Chen *et al.* (2011) corroboraram as propostas de Kress *et al.* (2005) que indicaram o ITS e o espaçador *trnH-psbA* como regiões potenciais para o barcoding em plantas.

Li *et al.* (2011) realizaram uma ampla análise comparativa, com 6.286 indivíduos de 1.757 espécies, a fim de testar a eficiência e universalidade dos genes *rbcL* e *matK*, do espaçador *trnH-psbA*, e do ITS em espermatófitas. Nos grupos onde o sequenciamento do ITS foi possível, este apresentou o mais alto poder discriminativo dos quatro marcadores, levando os autores a indicá-lo para compor o “core barcode” nas plantas com sementes. Pang *et al.* (2011) aplicaram técnicas de DNA barcode testando quatro regiões (*rbcL*, *matK*, *rpoC1*, e ITS2) na identificação de 893 espécies da família Rosaceae, onde o ITS2 discriminou 78% das espécies e 100% dos gêneros.

Hollingsworth (2011) considerou os dados obtidos pelo *China Plant BOL Group*, contidos no artigo de Li *et al.* (2011), onde foi sugerida a inclusão do ITS/ITS2 no “core barcode” para espermatófitas, e salientou que, apesar da performance do trecho na resolução de estudos filogenéticos, há problemas quanto à existência de cópias parálogas dentro de uma mesma célula, que podem desordenar as sequências devido à presença de variantes, além da limitação na amplificação e sequenciamento do ITS que ainda apresentam restrições técnicas.

As técnicas de DNA barcode em Iridaceae, até o momento, somente foram testadas no gênero *Crocus* L. por Seberg & Petersen (2009), que realizaram a avaliação das 86 espécies

de *Crocus* conhecidas. Diferentes combinações dos trechos *ndhF*, *matK*, *trnH-psbA*, *rps8-pl36*, *accD* e *rpoCI* foram testadas e a combinação com menor número de sequências e maior poder discriminatório foi *ndhF* + *matK* + *trnH-psbA* + *rps8-rpl36*, com resolução para 92% das espécies. Individualmente, o gene *ndhF* discriminou 71% dos táxons e o *matK* 58%. Os autores corroboraram com os resultados de Fazekas *et al.* (2008), de que há um limite na resolução dos táxons, não importando qual região ou regiões gênicas são escolhidas e salientaram que, baseando-se somente nas variações da sequência, o gene *matK* e o espaçador *trnH-psbA* são fortes candidatos ao “barcoding”.

Com relação à escolha dos genes alvo em plantas, Hollingsworth (2011) afirmou que há muitos gêneros de plantas com suas sequências de DNA completamente desconhecidas, além de não haver um banco de dados mundial que possa fornecer um robusto sistema de identificação de gêneros de plantas, com genes ideais para “barcoding”. O autor finalizou dizendo que o esforço de agrupar novas sequências, à luz dos melhoramentos técnicos e sua posterior análise, ainda merece um grande esforço de busca.

A proposta do DNA “barcode” tem recebido críticas no que diz respeito aos seus métodos (Will & Rubinoff 2004), bem como com relação às conceituações teóricas adotadas pelo projeto Barcode of Life (Meier *et al.* 2006, 2008). Neste trabalho adotamos a metodologia corrente de análise de agrupamento por Neighbor-Joining, devido à rapidez no processamento dos dados e à possibilidade de comparação com resultados de outros artigos publicados, não obstante algumas análises com método da Parcimônia também foram geradas e comparadas. O programa MEGA5 foi utilizado devido à praticidade com que os dados podem ser tratados no momento da interpretação dos eletroferogramas e durante o alinhamento, bem como devido à rapidez com que se obtêm análises de agrupamentos e de reconstruções evolutivas, tais como Neighbor-Joining, Parcimônia, Máxima verossimilhança e Evolução Mínima. O program TaxonDNA foi utilizado devido à adequação de suas análises

à proposta do DNA “barcode”, pois o mesmo foi criado e desenvolvido para esta finalidade. Seus recursos de análise permitem observar as distâncias entre sequências, além de possibilitar análises exclusivas no que diz respeito à utilização das sequências como marcadores do tipo “barcode” em qualquer grupo de organismos.

Objetivos

O presente estudo visa a revisão taxonômica das espécies de *Calydorea* ocorrentes na Região Sul do Brasil fornecendo base para a identificação e distinção das mesmas, por meio de chave analítica, ilustrações e imagens de plantas no ambiente natural. O trabalho com DNA “barcode” tem como objetivo verificar a eficácia da utilização de sequências e genes alvo para discriminar as espécies, a partir da mensuração das variabilidades intra e interespecíficas e da interpretação das árvores resultantes da análise de agrupamento produzidas a partir dos dados moleculares.

Referências bibliográficas

Baker, J.G. 1876. Systema Iridacearum. **J. Linn. Soc.**, London, 16 (89-93): 61-180.

Barcode of Life. 2012. Identifying Species with DNA barcoding. Disponível em <<http://www.barcodeoflife.org/>>. Acesso em 27 Janeiro 2012.

Capellari Jr., L. 2005. Iridaceae da planície litorânea de Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brasil. **Hoehnea** 32(2): 207-213.

CBOL - Plant Working Group - 2009. A DNA barcode for land plants. **PNAS** 106(31): 12794-12797.

Chauveau, O.; Eggers, L., Raquin, C., Silvério, A., Brown, S., Couloux, A., Cruaud, C.,

- Kaltchuk-Santos, E., Yockteng, R., Souza-Chies, 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.
- Chen, S.; Yao, H.; Han, J.; Liu, C.; Song, J.; Shi, L.; Zhu, Y.; Ma, X.; Gao, T.; Pang, X.; Luo, K.; Li, Y.; Li, X.; Jia, X.; Lin Y. & Leon, C. 2010. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. **PLoS ONE** 5(1): e8613
- Chukr, N.S. & Capellari Jr., L. 2003. Iridaceae. In: Wanderley, M.G.L.; Shepherd, G.J.; Giulietti, A.M.; Melhem, T.S. (Coords.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Vol. 3.** Fapesp/Rima, São Paulo. Pp 127-147.
- Chukr, N.S. 1992. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Iridaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** 13: 111-131.
- Dahlgren, R.M.T.; Clifford, H.T. & Yeo, P.F. 1985. **The families of the Monocotyledons.** Springer-Verlag, Berlin. 520 p.
- De Tullio, L.; Roitman, G. & Bernardello, G. 2008. *Tamia* (Iridaceae), a synonym of *Calydorea*: Cytological and morphological evidence. **Systematic Botany** 33(3): 509-513.
- Deble, L.P. 2011. Taxonomic Novelties in *Calydorea* Herbert (Iridaceae:Tigridieae). **Bonplandia** 20(1): 35-39.
- Dias, E.B.A. 2010. **Iridaceae Juss. no Distrito Federal, Brasil.** Dissertação de mestrado – Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Dep. Botânica. 61 p.
- Eggers, L. 2008. A família Iridaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências** 6(3): 167-175.
- Eggers, L. 2011. *Calydorea*. In: **Lista de espécies da flora do Brasil.** Disponível em <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012>. Acesso em 20 Dezembro 2012.

Encyclopedia of Life - EOL - 2012. Disponível em < <http://eol.org/pages/61874/overview>>.

Acesso em 7 Fevereiro 2012.

Fazekas, A.J.; Burgess K.S.; Kesanakurti, P.R.; Graham, S.W.; Newmaster, S.G.; Husband, B.C.; Percy, D.M.; Hajibabaei, M. & Barrett, S.C.H. 2008. Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. **PLoS ONE** 3: e2802.

Garcia, R.J.F. & Pirani, J.R. 2005. Análise florística, ecológica e fitogeográfica do Núcleo Curucutu, Parque Estadual da Serra do Mar (São Paulo, SP), com ênfase nos campos junto à crista da Serra do Mar. **Hoehnea**, 32(1): 1-48.

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

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

Goldblatt, P. & Henrich, J.E. 1991. *Calydorea* Herbert (Iridaceae-Tigridieae) Notes on this New World genus and reduction to synonymy of *Salpingolytis*, *Cardiostigma*, *Itysa* and *Catila*. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 78: 504-511.

Goldblatt, P. & Manning, J.C. 2008. **The Iris family: Natural History and Classification**. Timber Press, Portland & London 290 p.

Goldblatt, P.; Manning, J.C.; Rudall, P. (1998). Iridaceae. In: Kubitzki, K. (ed.). **The Families and Genera of Vascular Plants. III Flowering Plants. Monocotyledons: Lillanae**. Springer, Berlin, 1998. Pp. 295-333.

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(3): 495-508.

- Goldblatt, P.; Savolainen, V.; Porteous, O.; Sostaric, I.; Powell, M.; Reeves, G.; Manning, J. C.; Barraclough, T.G. & Chase, M.W. 2002. Radiation in the Cape Flora and the phylogeny of peacock irises *Moraea* (Iridaceae) based on four plastid DNA regions. **Molecular phylogenetics and evolution** 25: 341-360.
- Goldblatt, P. & Takei, M. 1997. Chromosome cytology of Iridaceae – Patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. **Annals of Missouri Botanical Garden** 84(2): 285-304.
- Grisebach, A. 1879. **Symbolae ad Floram argentinam. Zweite Bearbeitung argentinischer Pflanzen.** Dieterisch'sche Verlags Buchhandlung, Göttingen, 345 p.
- Herbert, W. *Calydorea* 1843. **Edwards's Botanical Register.** 29(Misc.): 85.
- Herbert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L. & De Waard, J.R. 2003. Biological identification through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences** 270: 313-321.
- Hollingsworth, P.M. 2011. Refining the DNA barcode for land plants. **PNAS** 108(49): 19451-19452.
- Hollingsworth, P.M.; Graham, S.W. & Little, D.P. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. **PLoS ONE** 6(5): e19254
- INPI - The International Plant Names Index - 2012. Disponível em <<http://www.ipni.org>>. Acesso em 30 Janeiro 2012.
- Judd, W.S.; Campell, C.S.; Kellogg, E.A.; Stevens, P.F. & Donoghue, M.J. 2009. **Sistemática Vegetal – Um enfoque filogenético.** 3 ed. Artmed, Porto Alegre. 632p.
- Kenton, A.; Dickie, J.B.; Langton, D.H. & Bennett, M.D. 1990. Nuclear DNA amount and karyotype symmetry in *Cypella* and *Hesperoxiphion* (Tigridieae: Iridaceae).

Evolutionary Trends in Plants 4: 59-69.

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

KEW – Kew Royal Botanic Garden – World checklist of selected plant families – 2012.
Disponível em <apps.kew.org>. Acesso em 30 Janeiro 2012.

Klatt, F.W. 1882. *Calydorea azurea*. **Abhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft zu Halle** 15: 387.

Kress, W.J.; Wurdack, K.J.; Zimmer, E.A.; Weight, L.A. & Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **PNAS** 102(23): 8369-8374.

Li, D.Z.; Gao, L.; Li, H.; Wang, H.; Liu, J.; Chen, Z. – China Plant BOL Group – 2011.
Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. **PNAS** 108(49): 19641-19646.

Linsingen, L.; Sonehara, J.S.; Uhlmann, A. & Cervi, A. 2006. Composição florística do Parque Estadual do Cerrado de Jaguariaíva, Paraná, Brasil. **Acta Biológica Paranaense** 35(3-4): 197-232.

Lovo, J. 2009. Filogenia e Revisão de *Pseudotrimezia* (Iridaceae). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 102p.

Martínez, A. & Azkue, D. 1986. Variación del contenido de ADN y su implicación evolutiva. **Congreso Latinoamericano de Botánica**, V.3:35-55.

Meier, R.; Kwong, S.; Vaidya, G.; Ng, P.K.L. 2006. DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: a Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. **Systematic Biology**, 55: 715-728.

- Meier, R.; Zhang, G. & Ali, F. 2008. The use of mean instead of smallest interspecific distance exaggerates the size of the “Barcoding Gap” and leads to misidentification. **Systematic Biology** 37(5): 809-813.
- Muñoz-Schick, M. 2003. Tres nuevas monocotiledoneas descubiertas en Chile: *Alstroemeria mollensis* M. Muñoz et A. Brink (Alstroemeriaceae), *Miersia chilensis* var. *bicolor* M. Muñoz (Gilliesiaceae) y *Calydorea chilensis* M. Muñoz (Iridaceae). **Gayana Botany** 60(2): 101-106.
- Pang, X.; Song, J.; Zhu Y.; Xu. H.; Huang, L. & Chen, S. 2011. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification. **Cladistics** 27: 165-170.
- Pennisi, E. 2007. Taxonomy – Wanted: A barcode for plants. **Science** 318: 190-191.
- Petersen, G.; Seberg, O.; Thorsøe, S.; Jørgensen, T. & Mathew, B. 2008. A phylogeny of the genus *Crocus* (Iridaceae) based on sequence data from five plastid regions. **Taxon** 57 (2): 487-499.
- PlantZafrica 2012. Disponível em: <<http://www.plantzafrica.com/planthij/Iridaceae.htm>>. Acesso em 21 Janeiro 2012.
- Rambo, B. 1951. O elemento andino no pinhal riograndense. **Anais Botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues** 3: 7-39
- Ravenna, P. 1965. Notas sobre Iridaceae II. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**. 10: 311-322.
- Ravenna, P. 1983. *Catila* and *Onira*, two new genera of South American. **Nordic Journal of Botany** 3(2): 197-205.
- Ravenna, P. 1986. *Itysa* and *Lethia*, two new genera of neotropical Iridaceae. **Nordic Journal of Botany** 6:581-588.

- Ravenna, P. 2001. The Iridaceae of the Cuyo region Argentina. **Onira** 6: 1-18.
- Ravenna, P. 2003. New species in the genus *Calydorea* (Iridaceae). **Onira** 9(3): 23-24.
- Ravenna, P. 2005. New species of South American bulbous Iridaceae. **Onira** 10: 39-45.
- Reeves, G.; Chase, M.W.; Goldblatt, P.; Rudall, P.; Fay, M.F.; Cox, A.V.; Lejeune, B. & Souza-Chies, T. 2001. Molecular systematic of Iridaceae: evidence from four plastid DNA regions. **American Journal of Botany** 88(11): 2074-2087.
- Rodriguez, A. & Sytsma, K. 2006. Phylogenetics of the “Tiger-flower” group (Tigridiae: Iridaceae) molecular and morphological evidence. **Aliso** 22: 412-424.
- Roitman, G. 2009. Iridaceae. In: Kiesling, R. **Flora de San Juan - República Argentina: Monocotiledóneas**. 1 ed.. Zeta Editores, Mendoza. v 4. Pp. 404-410.
- Roitman, G.; Castillo, A. & Mara, I. 2008. In: Zuloaga, F.O.; Morrone, O.; Belgrano, M.J.; Marticorena, C.; Marchesi, E. (Eds.). Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur: Pteridophyta, Gymnospermae, Monocotyledonea. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden** 107(1): 423-453.
- Roitman, G.G. & Castillo, A. 2005. *Calydorea alba* (Iridaceae: Tigridieae) a new species from Uruguay. **Bulletin of the Botanical Society of Argentina** 40(3-4): 311-312.
- Roitman, G. & Castillo, A. 2007. *Calydorea minima* (Iridaceae: Tigridieae) a new species from South America. **Bulletin of the Botanical Society of Argentina** 42(3-4): 321-323.
- Seberg, O. & Petersen, G. 2009. How many loci does it take to DNA barcode a *Crocus*? **PLoS ONE** 4(2):e4598
- 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.

- Takeuchi, C.; Affonso, P. & Chukr, N. S. 2008. Levantamento de Iridaceae Juss. no Núcleo Curucutu, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. **Revista do Instituto Florestal** 20(1):51-63.
- TROPICOS – Missouri Botanical Garden 2012. Disponível em <<http://tropicos.org/>>. Acesso em 7 Fevereiro 2012.
- Vieira, E.R.; Santos, E.P. & Tardivo, R.C. 2003. Flórua do Morro dos Perdidos, Serra de Araçatuba, Paraná, Brasil: Iridaceae. **Estudos de Biologia** 25(51): 17-29.
- Wanderley, M.G. L. & Toledo, C.B. 1986. Flora Fanerogâmica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo-Brasil) - Iridaceae. **Hoehnea** 13: 144-147.
- Wilson, C.A. 2004. Phylogeny of *Iris* based on chloroplast *matK* gene and *trnK* intron sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 33:402-412.
- Wilson, C.A. 2011. Subgeneric classification in *Iris* re-examined using chloroplast sequence data. **Taxon** 60(1): 27-35
- Will, K.W. & Rubinoff, D. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. **Cladistics** 20: 47-55.

Capítulo 1

Espécies de *Calydorea* Herb. (Iridaceae) ocorrentes na Região Sul do Brasil

Leandro Dal Ri, Andréa Ristoff Lemos & Lilian Eggers

Manuscrito preparado segundo as normas de publicação para o periódico *Rodriguésia*, com exceção das imagens e mapas que serão retrabalhados para reunir as informações de todas as espécies.

Capítulo 1

Espécies de *Calydorea* Herb. (Iridaceae) ocorrentes na Região Sul do Brasil

Título abreviado: *Calydorea* (Iridaceae) da Região Sul do Brasil

Leandro Dal Ri¹, Andréa Ristoff Lemos² & Lilian Eggers³

1 Programa de Pós-Graduação em Botânica, UFRGS; Jardim Botânico, Fundação Zoobotânica do Estado do Rio Grande do Sul, Rua Dr. Salvador França, 1427, CEP 9150-970, Porto Alegre, RS. dalri2010@gmail.com

2. Escola Estadual de Ensino Médio Orieta, Viamão, RS.

3. Departamento de Botânica, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500, Bloco IV, Prédio 43433, Campus do Vale, Porto Alegre, RS. lilian.egggers@ufrgs.br

Espécies de *Calydorea* Herb. (Iridaceae) ocorrentes na Região Sul do Brasil

Resumo

O trabalho apresenta uma revisão dos táxons do gênero *Calydorea* (Iridaceae) ocorrentes na Região Sul do Brasil, a partir do exame de exemplares depositados em herbários e provenientes de coletas de campo. Inclui uma chave para identificação das espécies, ilustrações, descrições morfológicas, mapas de distribuição geográfica, informações sobre a época de florescimento e hábitat preferencial, além de comentários taxonômicos para cada táxon. Foram registradas na região de estudo cinco espécies pertencentes ao gênero *Calydorea*: *C. alba* Roitman & A. Castillo, *C. approximata* R.C. Foster, *C. basaltica* Ravenna, *C. campestris* (Klatt) Baker e *C. crocoides* Ravenna. Foi realizada uma sinonimização em *C. basaltica*. O hábitat mais comum dessas espécies é o campestre, em organossolos úmidos ou em solos mais secos e pedregosos. O florescimento é bastante efêmero e normalmente se estende por algumas horas, a floração é mais acentuada nos meses de outubro a dezembro.

Palavras chave: *Calydorea*, diversidade, Iridaceae, Região Sul

Species of *Calydorea* Herb. (Iridaceae) from southern Brasil

Abstract

The paper presents a review of taxa of genus *Calydorea* (Iridaceae) occurring in southern Brasil, based on the examination of specimens deposited in herbaria and from field collections. The work includes key to species, illustrations, morphological descriptions, distribution maps, flowering period, habitat and taxonomic comments of each taxon. Five species of *Calydorea* were recorded in the study area: *C. alba* Roitman & A. Castillo, *C. approximata* R.C. Foster, *C. basaltica* Ravenna, *C. campestris* (Klatt) Baker and *C. crocoides*

Ravenna. It was made one sinonimization in *C. basaltica*. The most common habitat of these species is grassland vegetation with moist and humic soils or even dry and rocky soils. Flowering is ephemeral, usually lasts few hours, concentrated from October to December.

Key words: *Calydorea*, diversity, Iridaceae, Southern Brasil

1.1 Introdução

Iridaceae possui cerca de 2.000 espécies incluídas em 66 gêneros (Goldblatt & Manning 2008). A família apresenta uma ampla distribuição geográfica estando bem representada no sul da África e em terras altas e temperadas das Américas Central e do Sul, principalmente em savanas abertas, desertos e campos (Goldblatt & Manning 2008). No Brasil, conforme Eggers *et al.* (2011), ocorrem 18 gêneros e 160 espécies de Iridaceae, sendo os gêneros *Sisyrinchium* L. (58 espécies), *Pseudotrimezia* R.C. Foster (21 espécies) e *Neomarica* Sprague (21 espécies) os mais diversos.

Estudos filogenéticos demonstraram que a monofilia de Iridaceae é bem sustentada (Dahlgren *et al.* 1985; Goldblatt 1990; Souza-Chies *et al.* 1997; Reeves *et al.* 2001; Goldblatt *et al.* 2008). Constituem-se em sinapomorfias da família as folhas isobilaterais, unifaciais com as lâminas orientadas para o mesmo plano em torno do ramo reprodutivo; a presença de cristais cubóides e estilóides de oxalato de cálcio e flores com três estames (Goldblatt *et al.* 2008).

Goldblatt *et al.* (2008) reconheceram sete subfamílias em Iridaceae, sendo que todas as espécies americanas pertencem à subfamília Iridoideae. Esta subfamília contém 30 gêneros e 890 espécies, que estão incluídas em cinco tribos: Diplarreneae, Irideae, Sisyrinchieae, Trimezieae e Tigridieae (Goldblatt & Manning 2008). A tribo Tigridieae contém espécies bulbosas com folhas plicadas e é dividida em duas subtribos: Tigridiinae e Cipurinae (Goldblatt 1982). Tigridieae é complexa em relação à sua taxonomia, com relações

filogenéticas pouco compreendidas entre muitos de seus táxons. As flores apresentam grande variação de cor, forma e estrutura, são efêmeras e de difícil preservação, dificultando seu estudo. Os limites entre os gêneros, os agrupamentos entre as espécies e as relações filogenéticas em Tigridaeae variam consideravelmente entre os especialistas (Rodriguez & Sytsma 2006).

Calydorea Herb. pertence à subtribo Cipurinae, que é caracterizada por possuir grãos de pólen monossulcados, número cromossômico básico $x=7$ e centro de diversificação na América do Sul (Rodriguez & Sytsma 2006).

Calydorea (incluindo *Catila* Ravenna, *Itysa* Ravenna e *Tamia* Ravenna) possui cerca de 16 espécies, ocorrendo exclusivamente na América do Sul (Goldblatt & Manning 2008; Goldblatt *et al.* 2008). As espécies *Calydorea mexicana* (R.C. Foster) Goldblatt & Henrich e *C. coelestina* (W. Bartram) Goldblatt & Henrich, dispostas em *Calydorea* por Goldblatt & Henrich (1991), e que ocorrem na América Central e América do Norte, foram retiradas do gênero e inseridas em *Cardiostigma* Baker e *Salpingostylis* Small, respectivamente, após os resultados apresentados por Rodriguez & Sytsma (2006), restringindo a área de ocorrência natural de *Calydorea* para o continente sul-americano.

Na América do Sul, espécies de *Calydorea* foram registradas em quase todos os países, exceto no Equador, Guiana Francesa, Peru e Suriname. O Brasil e a Argentina são os países com maior riqueza de espécies, respectivamente com dez e oito indicações (INPI 2012; KEW 2012; TROPICOS 2012).

No norte da América do Sul encontram-se as espécies *C. cipuroides* Klatt e a endêmica *C. venezolensis* (Baker) Goldblatt & Henrich, para a Venezuela (Innes 1985; Ravenna 1986) e a espécie *C. cipuroides*, indicada para a Colômbia (Innes, 1985). Para o oeste do continente, na Bolívia, são autóctones as espécies: *C. approximata* R.C. Foster, *C. azurea* Klatt, *C. campestris* (Klatt) Baker e *C. pallens* Griseb. (Foster 1958; Innes 1985; Ravenna 2001). No

Chile são citadas as espécies *C. bifida* Ravenna, *C. chilensis* Muñoz-Schick e *C. xiphioides* (Poepp.) Espinosa (Innes 1985; Muñoz-Schick 2003). No entanto, *C. chilensis* foi posteriormente reconhecida como *Romulea rosea* (L.) Eckl., uma espécie de origem sul-africana com ocorrência no Chile (Roitman 2009), não se tratando, portanto, de uma espécie do gênero. No Paraguai, foram registradas quatro espécies e uma variedade: *C. approximata*, *C. campestris*, *C. campestris* var. *longicaulis* Baker, *C. gardneri* (Baker) Goldblatt & Henrich e *C. minima* Roitman & Castillo (Innes 1985; Roitman & Castillo 2007; Roitman *et al.* 2008). Ao sul do continente, *C. alba* Roitman & A. Castillo, *C. approximata*, *C. azurea*, *C. campestris* e *C. nuda* Baker ocorrem no Uruguai (Ravenna 1983; Lombardo 1984; Innes 1985; Roitman & Castillo 2005; Roitman *et al.* 2008) e *C. amabilis* (Ravenna) Goldblatt & Henrich, *C. approximata*, *C. azurea*, *C. campestris*, *C. minima*, *C. nuda*, *C. pallens* e *C. undulata* Ravenna, na Argentina (Ravenna 1983; Ravenna 2001; Roitman *et al.* 2008; TROPICOS 2012). Dentre estas espécies, cabe destacar que *C. alba* e *C. minima* foram descritas em um período inferior a dez anos atrás, ressaltando a deficiência de estudos referentes a este gênero no sul da América do Sul, até recentemente.

Para o Brasil, Eggers *et al.* (2011) citaram a ocorrência de dez espécies de *Calydorea*: *C. alba*, *C. amabilis*, *C. approximata*, *C. azurea*, *C. basaltica* Ravenna, *C. campestris*, *C. crocoides* Ravenna, *C. gardneri*, *C. longipes* Ravenna e *C. luteola* (Klatt) Baker.

Embora tenham sido realizados trabalhos de levantamento de espécies de Iridaceae em diversos estados e localidades brasileiras, na maioria deles não foi constatada a ocorrência de espécies de *Calydorea* (Wanderley & Toledo 1986; Churk 1992; Capellari Jr. 2005; Garcia & Pirani 2005; Eggers 2008; Takeuchi *et al.* 2008; Dias 2010). Um registro pioneiro foi o de Rambo (1951), que relacionou *C. campestris* como um elemento andino no pinhal riograndense. No Estado de São Paulo, Churk & Capellari Jr. (2003) examinaram material de *C. campestris* de Campos do Jordão, Itararé, São José do Barreiro e São Paulo e indicaram

sua ocorrência em Minas Gerais. Para o Paraná, esta mesma espécie foi registrada para a região do Morro dos Perdidos, município de Guaratuba (Vieira *et al.* 2003) e citada para o levantamento do Parque Estadual do Cerrado, em Jaguariaíva (Linsingen *et al.* 2006).

O presente trabalho tem como objetivos: 1) identificar as espécies de *Calydorea* que ocorrem na Região Sul do Brasil; 2) contribuir para o conhecimento taxonômico de *Calydorea*, indicando os principais caracteres diagnósticos para a distinção das espécies e apresentando uma chave de identificação; 3) resolver os problemas nomenclaturais existentes, fornecendo os nomes válidos para os táxons; e 4) indicar a distribuição geográfica das espécies encontradas.

1.2 Material e métodos

As amostras analisadas para este estudo foram obtidas por meio de coletas botânicas realizadas nos três estados da Região Sul do Brasil durante o período de 2004 a 2012, bem como provenientes dos acervos botânicos contidos nos herbários brasileiros HAS, HBR, HUUS, HUEFS, ICN, MBM, PACA, PEL, RB, SP e UPCB. Exsicatas dos herbários argentinos CTES, LP e SI, dos herbários uruguaios MVFA, MVJB E MVM e dos herbários europeus B, K e P, bem como fotografia de material tipo contido no GH foram também analisadas (acrônimos conforme Thiers 2012). As abreviações bt., fl. e fr., contidas na lista de material examinado, correspondem respectivamente, à presença de botões, flores e frutos nas exsicatas.

As medições das estruturas morfológicas foram realizadas com o auxílio de um estereomicroscópio com capacidade de amplificação de 45x e de um paquímetro eletrônico. A terminologia das denominações das estruturas morfológicas das descrições seguiram Goldblatt *et al.* (1998) e Goldblatt & Manning (2008). A terminologia utilizada para as regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, apresentadas na

distribuição das espécies está de acordo com Fortes (1959), Governo do Estado de Santa Catarina (2011) e Maack (1981), respectivamente. Os mapas com os pontos de coleta foram confeccionados no programa SIG ArcView 9.3 (ESRI®). As ilustrações dos hábitos foram feitas a partir de fotocópias de exsicatas previamente selecionadas. Os detalhes foram feitos a partir de fotografias, bem como de desenhos executados a partir de flores preservadas no álcool/glicerol (70:30), analisadas com o auxílio de estereomicroscópio com câmara-clara acoplada. As ilustrações finais, com tinta nanquim, foram digitalizadas com de resolução de 300 dpi e em seguida foi feita a limpeza das figuras com Adobe Photoshop CS®. As estampas de cada espécie foram montadas no programa Corel Draw 11.0®.

1.3 Tratamento taxonômico

Calydorea Herb., Edward's Bot. Reg. 29: 85. 1843.

Espécie tipo: *C. xiphioides* (Poepp.) Espin. [= *C. speciosa* (Hook.) Herb.]

Plantas herbáceas, bulbosas, catafilos externos membranáceos a papiráceos, marrom escuros. Folhas basais planas, lanceoladas a lineares ou plicadas, ocasionalmente ausentes no florescimento. Caule florífero, um a vários, simples ou ramificados, cilíndricos, bráctea uma ou mais (2-3). Inflorescência ripídio, pedunculado ou séssil, um a muitos, fortemente guarnecido por um par de espatas membranáceas a coriáceas. Flores brancas, lilases, azuis ou púrpuras. Tépalas livres, subiguais, as internas um pouco menores que as externas, elípticas, oblanceoladas, oblongas, obovadas. Androceu com filetes livres, anteras amarelas, lineares, basifixas, latrorsas, pólen amarelo. Gineceu com estilete indiviso e posteriormente dividido em três ramos, alternos aos estames, ápice truncado a lobado. Cápsulas globosas, cilíndricas,

ovóides a obovóides, cicatriz do perigônio evidente. Sementes angulares, com superfície rugosa.

Etimologia: *Calydorea* é derivado dos termos gregos *caly*, que significa embainhado ou coberto, e *dorea*, que significa lança. Provavelmente o nome foi dado devido aos botões florais estarem fortemente encobertos pelas brácteas (espatas) até a antese. Cerca de 16 espécies (Goldblatt & Manning 2008).

O gênero *Calydorea* foi descrito por Herbert (1843), para abrigar a espécie chilena *Sisyrrinchum speciosum* Hook, sob a nova combinação *Calydorea speciosa* (Hook.) Herb. Duas foram as características diferenciais do gênero recém criado, em relação às demais espécies americanas bulbosas e com folhas plicadas descritas até aquele momento: estames livres e estilete com longos e delgados ramos não divididos, alternados entre os estames (Goldblatt & Henrich 1991). O número cromossômico básico para o gênero é $x=7$ (Goldblatt & Manning 2008).

Calydorea está representada na Região Sul do Brasil por cinco espécies: *C. alba*, *C. approximata*, *C. basaltica*, *C. campestris* e *C. crocoides*. *Calydorea alba* é uma espécie tipicamente do Bioma Pampa, enquanto *C. basaltica*, *C. campestris* e *C. crocoides* ocorrem no Bioma Mata Atlântica. *Calydorea approximata*, por sua vez, ocorre nos dois biomas.

1.4 Chave para determinação das espécies de *Calydorea* da Região Sul do Brasil

1. Ripídios sésseis; bráctea longa ultrapassando as flores 2. *Calydorea approximata*
- 1'. Ripídios pedunculados; bráctea não ultrapassando as flores
 2. Estilete com base indivisa até 2 mm; flores lilás a lilás arroxeadas

3. Espatas externas (11-)13(-18) mm, internas (14-)19(-23) mm; anteras 2-3,8 mm
 4. *Calydorea campestris*
- 3'. Espatas externas (31-)42(-72) mm, internas (53-)99(-117) mm; anteras 7-11 mm
 5. *Calydorea crocoides*
- 2'. Estilete com base indivisa de 2,0 a 3,8 mm; flores desde brancas até lilases
4. Espatas internas de (19-)24(-30) mm; tépalas brancas a lilás claras, com traços arroxeados na base; originárias do sudoeste do RS 1. *Calydorea alba*
- 4'. Espatas internas de (28-)45(-64) mm; tépalas lilases; originárias do Paraná
 3. *Calydorea basaltica*

1.4.1 *Calydorea alba* Roitman & A. Castillo, Bol. Soc. Argent. Bot. 40: 311. 2005.

Holótipo: Uruguai, Dep. Artigas, Artigas, 9.X.2003, *G. Roitman et al. s.n.* (BAA 25500!)

Figuras: 1, 2 e 3

Iconografia: Roitman & Castillo (2005), fig. 1

Plantas 13-29(-42) cm alt. Bulbo subgloboso, 14-21 x 12-19 mm, túnicas membranáceas, pseudocolo escuro, 8-27 (-32) mm compr. Folhas, 2-5, lineares, 10-24 cm compr., 0,6-0,8 mm larg., sulcadas longitudinalmente. Caule florífero 1-3(-5), 7,5 -21 cm compr. Bráctea uma ou mais, (1,9-) 2,9-5,2 (-8,9) cm compr., 0,7-1,3 mm larg. Ripídios 1-2 (-5), pedunculados, pedúnculos às vezes sinuosos, 14-28(-63) mm compr. Espatas membranáceas, a externa (12-)16(-20) mm compr., ápice agudo, marcescente, a interna (19-)24(-30) mm compr., ápice agudo, marcescente, pedicelo 18-31(-44), exserto. Tépalas brancas, base amarela de aproximadamente 2 mm, seguida de traços irregulares lilases em 2-3 mm, elípticas a oblanceoladas, membranáceas, ápice arredondado, sem tricomas na base, as

externas 13-21 x 4-8 mm, as internas 11-17 x 4-7 mm. Androceu com filetes amarelos de 1,5-2,7 mm compr.; anteras 2,1-7 mm compr., arqueadas durante a deiscência, espiraladas na maturação, conectivo conspícuo. Gineceu com estilete amarelo, indiviso em 2,1-3,4 mm compr.; ramos do estilete amarelos, 3-4,8 mm compr., ascendentes a levemente encurvados, ápice truncado, área estigmática esbranquiçada a lilás; ovário 2,2-5,6 x 1-1,9 mm. Cápsula clavada, 2,4-9,2 x 1,3-4,3 mm. Sementes, 1,6-2,5 x 1,1-1,4 mm, marrom-escuras, opacas, irregularmente achatadas, com superfícies arredondadas a planas e áreas angulares, textura rugosa foveolada.

Material examinado: BRASIL: RIO GRANDE DO SUL: Alegrete, Reserva Biológica de Ibirapuitã, 21.III.1998, bt., *R. Wasum* (HUCS 12447). Barra do Quaraí, estrada Uruguaiana-Barra do Quaraí, km 17, 24.XI.1972, fl. e fr., *D. Lima et al.* (ICN 20961). Quaraí, BR 377, em direção ao Cerro do Jarau, fl. e fr., *L. Dal Ri et al. 01* (ICN). Santana do Livramento, 16.X.2004, fl. e fr., *L. Eggers & T.T. Souza-Chies 51* (ICN). Uruguaiana, BR 472, km 596, 18.X.2009, fl. e fr., *L. Eggers & T.T. Souza-Chies 519* (ICN).

Material adicional examinado: ARGENTINA: Província de Corrientes, Dep. Mercedes, 22 km SE de Mercedes, nacientes del Ayo. Guayaibí, 23.II.1984, fl. e fr., *S.G. Tressens et al. 2386* (CTES).

Comentários

Calydorea alba apresenta distribuição restrita ao extremo oeste do Estado do Rio Grande do Sul, no Bioma Pampa, na região fisiográfica da Campanha, municípios de Alegrete, Quaraí, Uruguaiana e Santana do Livramento (Fig. 3). A espécie é registrada, pelos seus autores, no Departamento de Artigas, Uruguai (Roitman & Castillo 2005). Foi coletada em floração nos meses de março, outubro e novembro. Ocorre em ambiente campestre, tanto

em solos húmidos compactados e úmidos, quanto em solos pedregosos e secos. Vegeta entremeada com gramíneas cespitosas ou de forma isolada e bem distribuída no campo. Os registros de coleta indicam altitude de 78 até 159 m.

A espécie pode ser facilmente reconhecida, pois apresenta flores brancas. As espécies mais relacionadas com *C. alba* são *C. azurea* e *C. minima*. *Calydorea minima* é uma planta de 10 a 15 cm de altura, com flores de 1,5 a 2,2 cm de diâmetro, ramos do estilete truncados, e tépalas lilases claras, com ápice agudo. Na descrição original, *C. alba* é relatada como uma espécie de maior porte, apresentando flor de 3,2 a 3,6 cm de diâmetro, com ramos do estilete subulados e tépalas arredondadas (Roitman & Castillo 2005). No presente estudo, no entanto, foi observada uma maior amplitude de variação no tamanho das flores, com plantas de flores de aproximadamente 2,6 a 4,2 cm de diâmetro. Além disto, em exame ao material tipo, verificou-se que os ápices dos ramos do estilete não deveriam ser enquadrados como subulados, apresentando-se mais tipicamente como truncados. Assim, os caracteres indicados para *C. minima* não se mostram muito adequados para a diferenciação das espécies, sendo demasiadamente embasados nas dimensões das estruturas. Estudos moleculares com estas espécies também tem demonstrado a proximidade entre estes táxons (Dal Ri *et al.* Dados não publicados). Neste trabalho, não foi encontrada nenhuma planta que pudesse ser determinada como *C. minima* e acredita-se que estudos populacionais e um maior número de coletas na área de ocorrência de ambas as espécies deveria ser efetuado, na busca de melhores elementos para a distinção das mesmas.

Calydorea azurea, por sua vez, possui tépalas lilases pálidas, com base arroxeadas marcada e flores marcadamente maiores, com 4,4 a 5,3 cm de diâmetro.

O caule florífero em *C. alba*, em geral, é único com 1-2(-5) ripídios pedunculados, no entanto, sob cultivo, pode apresentar número maior de ramificações.

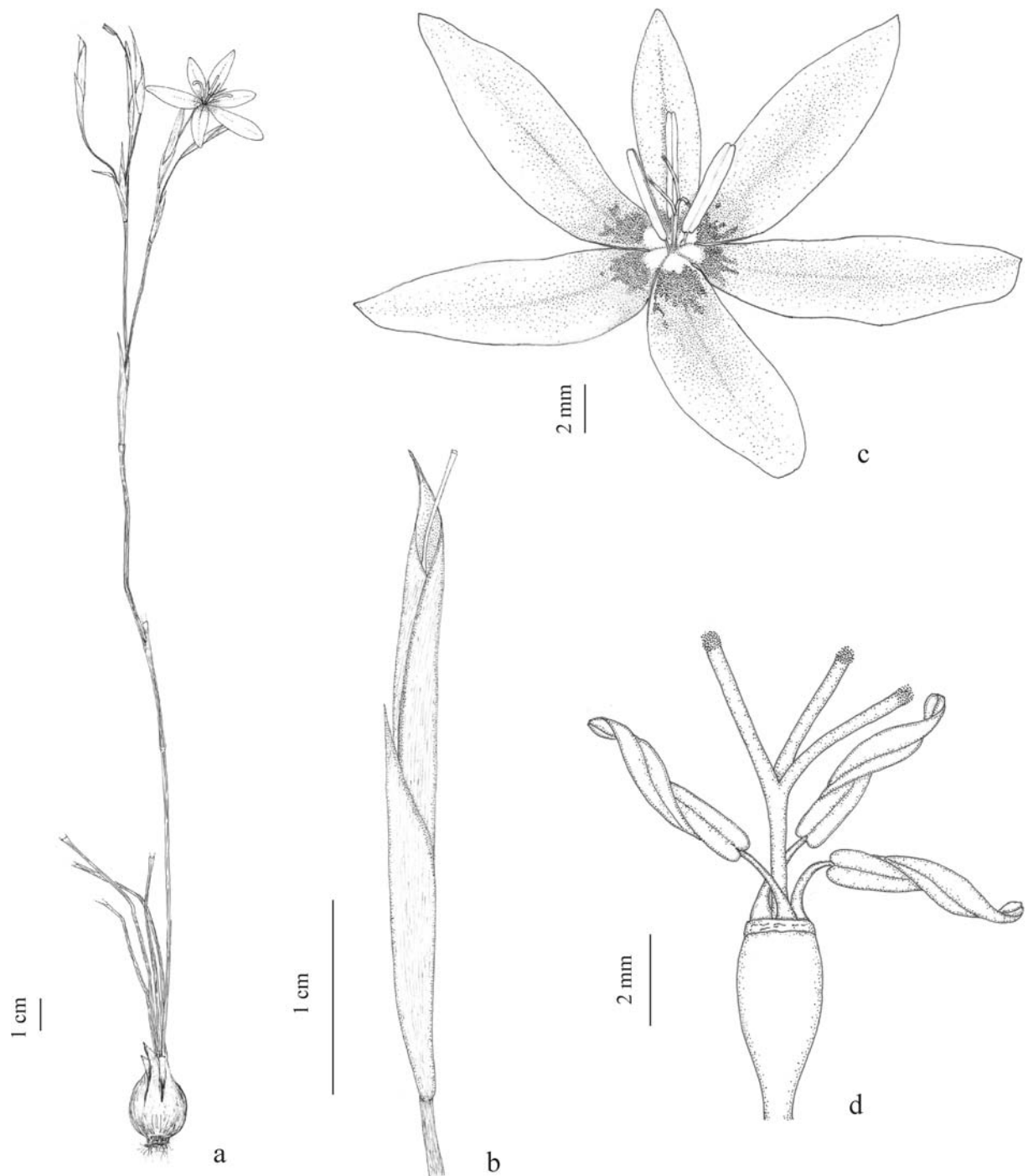


Figura 1: *Calydorea alba* Roitman & A. Castillo: a) Hábito; b) Detalhe do ripídio com espata externa, interna e pedicelo exserto; c) Flor em vista lateral com estames e ramos do estilete ascendentes; d) Flor com as tépalas removidas mostrando o ovário, os estames espiralados e o estilete tripartido (a,b Eggers & Souza-Chies 519; c foto do acervo dos autores; d Dal Ri et al. 01).

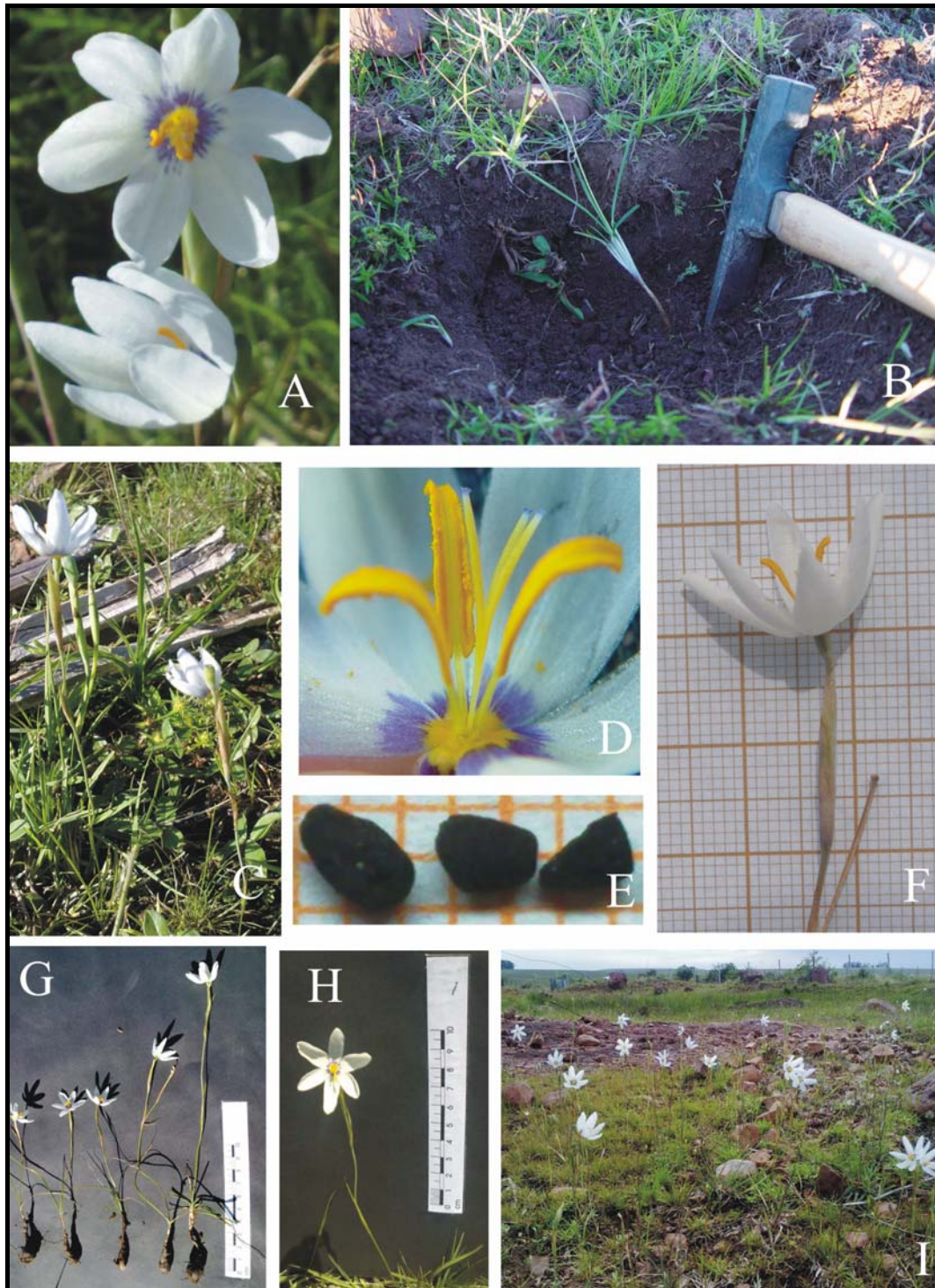


Figura 2: *Calydorea alba* Roitman & A. Castillo: a) Flores em antese no início da manhã; b) detalhe da profundidade da escavação para coleta da planta com bulbo; c) Indivíduos entremeados com a vegetação campestre; d) detalhe dos estames e do estilete; e) sementes; f) flor com espatas externa e interna; g) variação na altura das plantas; h) aspecto de indivíduo com ripídio único; i) campo pedregoso próximo ao Cerro do Jarau com indivíduos em plena floração, outubro de 2011.

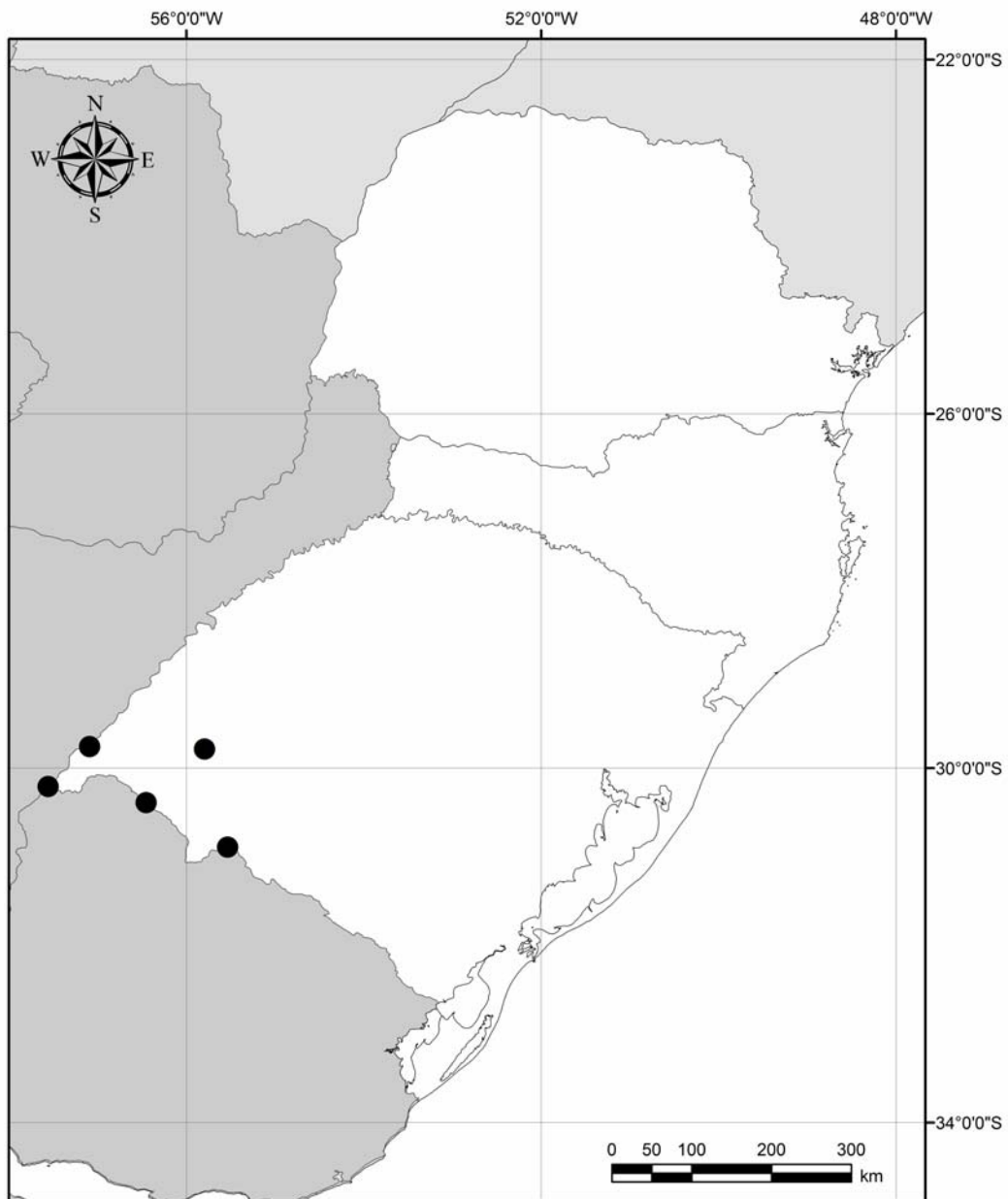


Figura 3: Registros de coleta de *Calydorea alba* Roitman & A. Castillo, Região Sul do Brasil.

1.4.2 *Calydorea approximata* R.C. Foster, Contr. Gray Herb. 155: 46. 1945.

Holótipo: Bolívia, Tarija, Toldos, bei Bermejo, 1.850 m alt., 5.XII.1903, *Fiebrig 2344* (G, n.v., isótipos: GH - Foto!, K!)

Figuras: 4, 5 e 6

Iconografia: sem registro.

Plantas (6)12-20(-35) cm alt. Bulbo globoso, 7-9 x 5-7 mm, túnicas membranáceas, pseudocolo, quando presente, escuro, 6-15(-32) mm compr. Folhas 1-5, lineares, (3,5-) 8-17 cm compr., 0,4-0,8 mm larg., sem sulcos longitudinais. Caule florífero 1-2, 4-14 cm compr. Bráctea única, (1,7-)3-10 cm compr., 0,7-1 mm larg., ápice acuminado, ultrapassando as flores. Ripídio único, séssil. Espatas membranáceas, externa (5-)10(-17) mm compr., ápice acuminado não marcescente, interna (10-)14(-26) mm compr., ápice agudo, pedicelo 8-16 mm compr., incluso. Tépalas lilás claras, base amarela a esbranquiçada cerca de 2 mm, oblongas a oblanceoladas, membranáceas, ápice agudo, sem tricomas na base, externas 11-13 x 4-6 mm, internas 9-12 x 3-4 mm. Androceu com filetes amarelos, 1,6-2,9 mm compr.; anteras 2-6 mm compr., recurvadas durante a deiscência, conectivo inconspícuo. Gineceu com estilete branco, indiviso em 0,9-2,5 mm compr.; ramos do estilete esbranquiçados, 2,4-3,5 mm compr., ascendentes a patentes, ápice arredondado, área estigmática esbranquiçada; ovário 2,6-5,6 x 0,9-2,5 mm. Cápsula obcônica a clavada, 3,8-6 x 2-3,6 mm. Sementes 1,3-1,4 x 0,4-1 mm, marrom-escuras, brilhantes, irregularmente arredondadas, com superfícies planas e áreas angulares, textura reticulada-foveolada.

Material examinado: BRASIL: PARANÁ: Palmeira, BR 277, 15.X.2007, fl., *L. Eggers & T.T. Souza-Chies 249* (ICN). RIO GRANDE DO SUL: Alegrete, 17.X.2004, fl., *L. Eggers & T.T. Souza-Chies 72* (ICN). Bom Jesus, 10.XI.11, fl. fr, *Eggers & T.T. Souza-Chies 683* (ICN).

Canoas, fl., *P.J.S. Silva Filho* 440 (ICN). Cruz Alta, 2.X.1971, fl., *J.C. Lindeman et al.* (HAS 3191, ICN 8240). Esmeralda, Estação Ecológica de Aracuri, 08.XI.1981, fl. e fr., *S. Miotto & E. Franco* (ICN 64844). Santo Antônio das Missões, BR 285, aprox. km 614, 29.X.2009, fl., *L. Eggers & T.T. Souza-Chies* 542 (ICN). São Borja, BR 285, km 499, XII.1980, fr., *J. Goergem* (ICN 30244). São Luiz, Caaró, 24.XI.1952, fr., *B. Rambo* (PACA 53470). Tupanciretã, Jarí, 16.VIII.1946, fl., *B. Rambo* (PACA 10089). Vacaria, 3.I.1947, fl., *B. Rambo* (PACA 34734). SANTA CATARINA: Lages, 13.XII.2004, fl., *L. Eggers & T.T. Souza-Chies* 97 (ICN). São Joaquim, Pericó, SC 430, km 56,8, 23.XI.2010, fl. e fr., *L. Dal Ri et al.* 60 (ICN).

Material adicional examinado: ARGENTINA: PROVINCIA DE CHACO: Dep. 1° de Mayo, Colônia Benítez, 11.XI.1934, fl., *A.G. Schulz* 9311 (CTES). PROVINCIA DE CORRIENTES: Dep. Concepción, 19.X.1979, fl. e fr., *T.M. Pedersen* (CTES 12492). Dep. Ituzaingó, 2.III.1987, fl. e fr., *A. Krapovickas et al.* 41014 (CTES). Dep. de Mercedes, 21.II.1984, fl. e fr., *S.G. Tressens et al.* 2310 (CTES). Dep. Paso de Los Libres, 21.III.1983, fl., *C.L. Cristóbal et al.* 1944 (CTES). Dep. Santo Tomé, 12.XI.1976, fl. e fr., *Guaglianone et al.* 16 (SI). PROVINCIA DE MISSIONES: Dep. Candelaria, 23.IX.1969, fl. e fr., *A. Krapovickas et al.* (CTES 15497). Caniguás Mineral, 5.V.1949, fl. e fr., *J.E. Montes* 4108 (LP). Dep. Capital, Posadas, 24.I.1984, fl. e fr., *Absi-Daviña* 4 (CTES). Dep. de Guarani, 26.XII.2001, fl. e fr., *H. Keller* 503 (CTES). Dep. Leandro N. Alem, 9.III.1969, fl. e fr., *A. Krapovickas et al.* 14973 (CTES). Dep. San Ignacio, 27.X.2009, fr., *H. A. Keller* 7658 (CTES). Dep. San Javier, 24.I.1976, fl. e fr., *A. Krapovickas y C.L. Cristóbal* 28869 (CTES). PARAGUAI: Guairá Iturbe, 10.X.1952, fr., *J.E. Montes* 12682 (LP).

Comentários

Calydorea approximata ocorre no estado do Rio Grande do Sul nas regiões fisiográficas dos Campos de Cima da Serra (municípios de Esmeralda e Vacaria), Planalto Médio (Cruz Alta, Tupanciretã), Missões (Santo Antônio das Missões, São Luiz Gonzaga, São Borja), Depressão Central (Canoas) e Campanha (Alegrete). Em Santa Catarina, foi encontrada no Planalto Serrano (municípios de Lages e São Joaquim) e no Paraná, na região dos Campos Gerais, no Segundo Planalto (Palmeira) (Fig. 6). Ocorre também na Argentina, Paraguai (Roitman *et al.* 2008) e Bolívia (Foster 1945). Foi encontrada em floração, na região sul do Brasil, no mês de agosto e de outubro a dezembro. A espécie vegeta em campos baixos, entre herbáceas cespitosas e em condições de umidade. A altitude nos pontos de coleta variou de 53 até 1.217 m.

Calydorea approximata é uma espécie de fácil reconhecimento, por ser a única a apresentar ripídios sésseis. As inflorescências surgem a partir da base de uma bráctea alongada que ultrapassa as flores, característica exclusiva deste táxon.

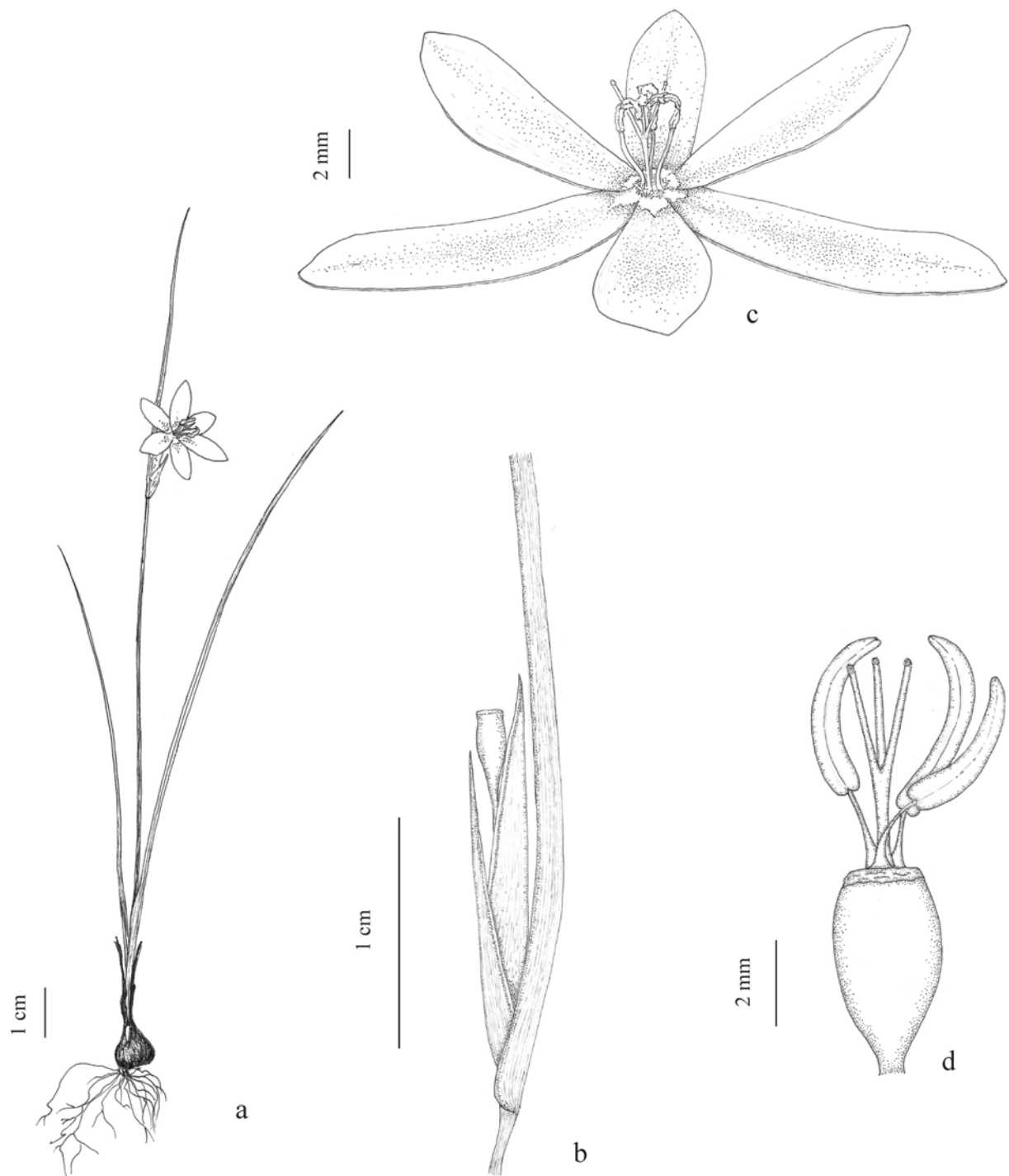


Figura 4: *Calydorea approximata* R.C.Foster: a) Hábito; b) Detalhe do ripídio sésil junto à base da bráctea caulinar com espata externa e interna, c) Flor em vista lateral com anteras recurvadas e ramos do estilete ascendentes; d) Flor com as tépalas removidas mostrando o ovário, os estames e o estilete tripartido (a,b,d Eggers & Souza-Chies 519; c foto do acervo dos autores).

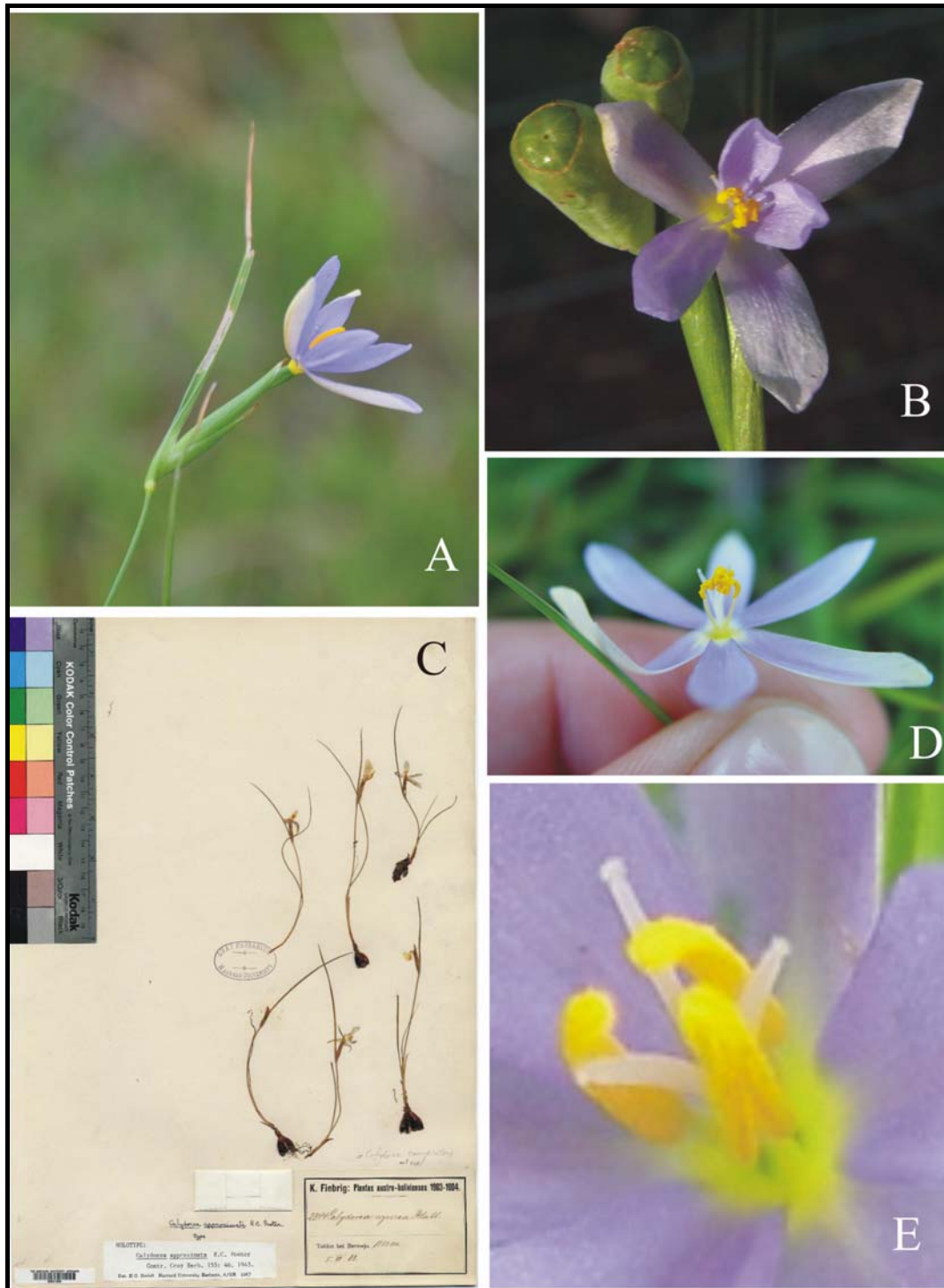


Figura 5: *Calydorea approximata* R.C. Foster: a) ripídio sésstil com espata interna, externa e bráctea ultrapassando a flor; b) frutos alongados apresentando cicatriz do perigônio e flor em vista frontal (foto: Sérgio Bordignon); c) fotografia do isótipo (Fiebrig 2344, GH); d) flor em vista lateral; e) detalhe dos estames e do estilete.

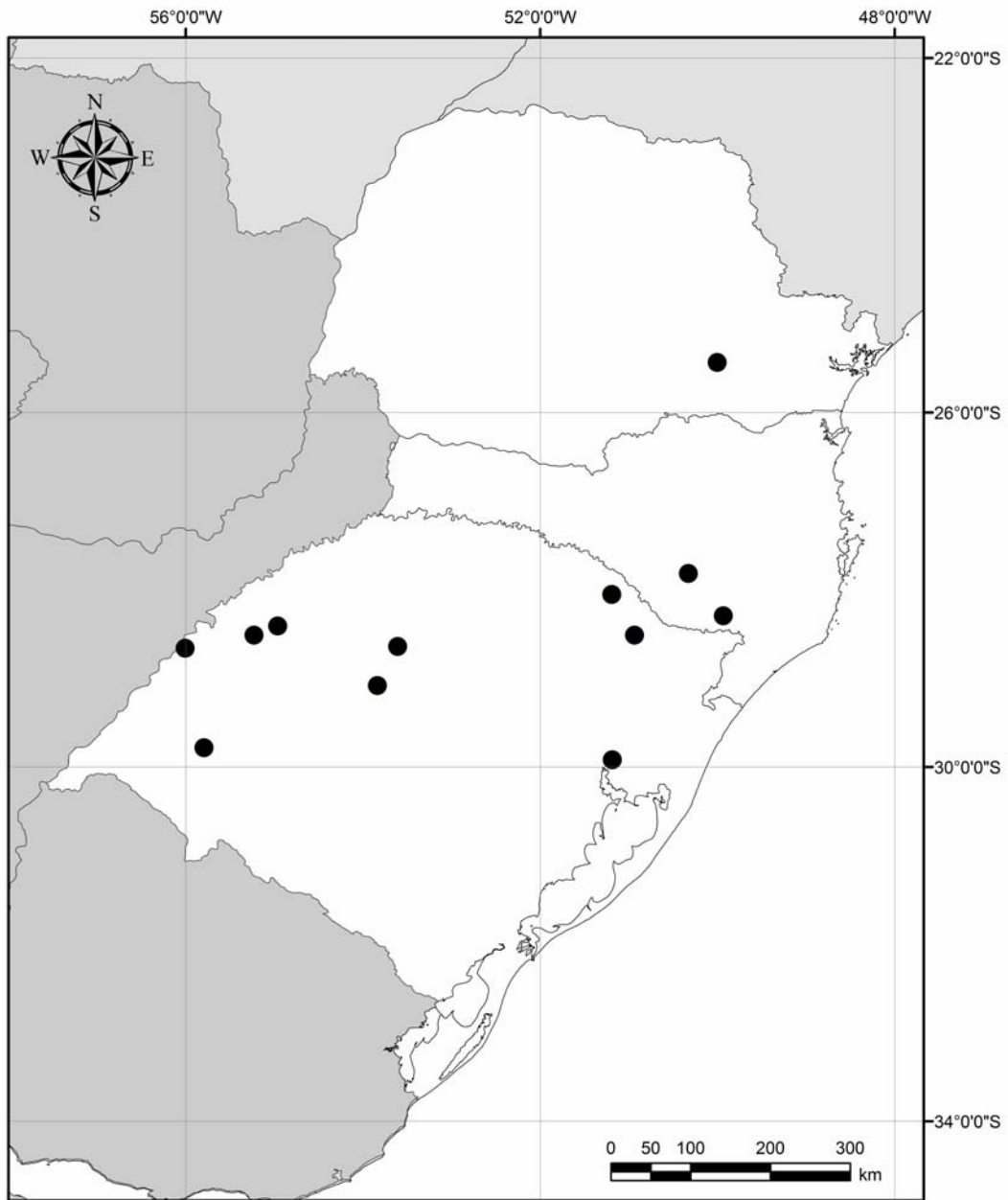


Figura 6: Registros de coleta de *Calydorea approximata* R.C. Foster, Região Sul do Brasil.

1.4.3 *Calydorea basaltica* Ravenna, Onira 10: 40. 2005.

Holótipo: Brasil, Paraná, Guarapuava, Cantagalo, 4.XI.1996, *Ravenna 3201* (MBM, *n.v.*)

Calydorea longipes Ravenna, Onira 10: 41. 2005. *syn. nov.*

Figuras: 7, 8 e 9

Iconografia: sem registro.

Plantas 13-27 cm alt. Bulbo globoso, 10-21 x 10-20 mm, túnicas membranáceas; pseudocolo marrom-escuro, 15-70 mm compr. Folhas, 2-7, lineares, (8-)18-25(-30) cm compr., 0,7-1,8 mm larg., brevemente plicadas. Caule florífero 1-2, 4-12 cm compr. Bráctea única, 6-10 cm compr., 0,8-0,9 mm larg. Ripídios 1-4 (-7), pedunculados, pedúnculos 20-66 mm compr. Espatas membranáceas, externa (15-)27(-40) mm compr., ápice acuminado, marcescente, interna (28-)48(-64) mm compr., ápice acuminado, marcescente, pedicelo 56 mm, exserto. Tépalas lilases, base esbranquiçada ou amarelada a esverdeada de aproximadamente 2 mm, elípticas, oblanceoladas a obovadas, membranáceas, ápice arredondado até brevemente acuminado, com tricomas esparsos na base; externas 14-23 x 6-8 mm, internas 12-22 x 5-6 mm. Androceu com filetes brancos a lilás escuros, 2,0-3,8 mm compr.; anteras 2,8-6,4 mm compr., inicialmente eretas, torcidas após deiscência, conectivo conspicuo. Gineceu com estilete lilás a lilás arroxeadado, indiviso em 2,0-3,8 mm; ramos do estilete lilás a lilás escuro, 2,8-4,3 mm compr., ascendentes a patentes, ápice arredondado, área estigmática lilás; ovário 2,4-5,4 x 1,5-4,1 mm. Cápsula subglobosa a obcônica, 3,4-5,8 x 2,6-5,3 mm. Sementes, 1,9 x 1,2 mm, marrom-avermelhadas a marrom escuras, brilhantes, irregularmente cônicas, com superfícies planas e áreas angulares, textura enrugada.

Material examinado: BRASIL: PARANÁ: Clevelândia, 26.X.1969, *G. Hatschbach 22710* (MBM). General Carneiro, BR 280, km 71, 17.XI.2010, fl. e fr., *L. Dal Ri et al. 27* (ICN).

Guarapuava, Cantagalo, 4.XI.1966, fl. e fr., *J.C. Lindeman & H. Haas* 2830 (MBM). Laranjeiras do Sul, 21.X.1966, fl. e fr., *J.C. Lindeman & J.H. Haas* 2773 (MBM). Palmas, BR 280, direção União da Vitória, 1.XI.2008, fl. e fr., *L. Eggers & T.T. Souza-Chies* 390 (ICN).

Comentários

Calydorea basaltica ocorre no Paraná, na região do Terceiro Planalto (Clevelândia, General Carneiro, Guarapuava, Laranjeiras do Sul e Palmas) (Fig. 9). Foi encontrada em floração nos meses de outubro e novembro. A espécie vegeta em campos baixos e a altitude nos pontos de coleta variou de 1.170 até 1.348 m.

Ravenna (2005) descreveu *C. basaltica* e *C. longipes* para o Paraná. *Calydorea basaltica* é apresentada com apenas a coleta do material tipo, *Ravenna* 3201 (MBM) que, no entanto, não se encontra no MBM. A descrição de *C. longipes* apresenta citação de materiais depositados no MBM (*Ravenna* 3202 e outros) que, da mesma forma, não se encontram no herbário. Somente duas exsicatas estão lá depositadas. Ravenna (2005) descreveu que são espécies relacionadas e que *C. basaltica* se diferencia por apresentar espatas e flores menores que *C. longipes*. O material examinado apresentou medidas correspondentes ora a uma espécie, ora a outra, em uma mesma planta. Assim, optou-se pela sinonimização de *C. longipes* em *C. basaltica*. Reforça a nossa decisão o resultado de Chauveau *et al.* (dados não publicados) que observou grande similaridade das espécies coletadas com base em análise molecular.

Calydorea basaltica ocorre em simpatria com *C. campestris*, distinguindo-se desta por possuir espatas maiores e estilete indiviso maior: 2,0-3,8 mm *versus* 0,1-0,7(1,7) mm em *C. campestris*. A espécie é também semelhante a *C. crocoides*, porém esta última possui espatas e anteras maiores, além da porção indivisa do estilete menor (0,2-2,0 mm).

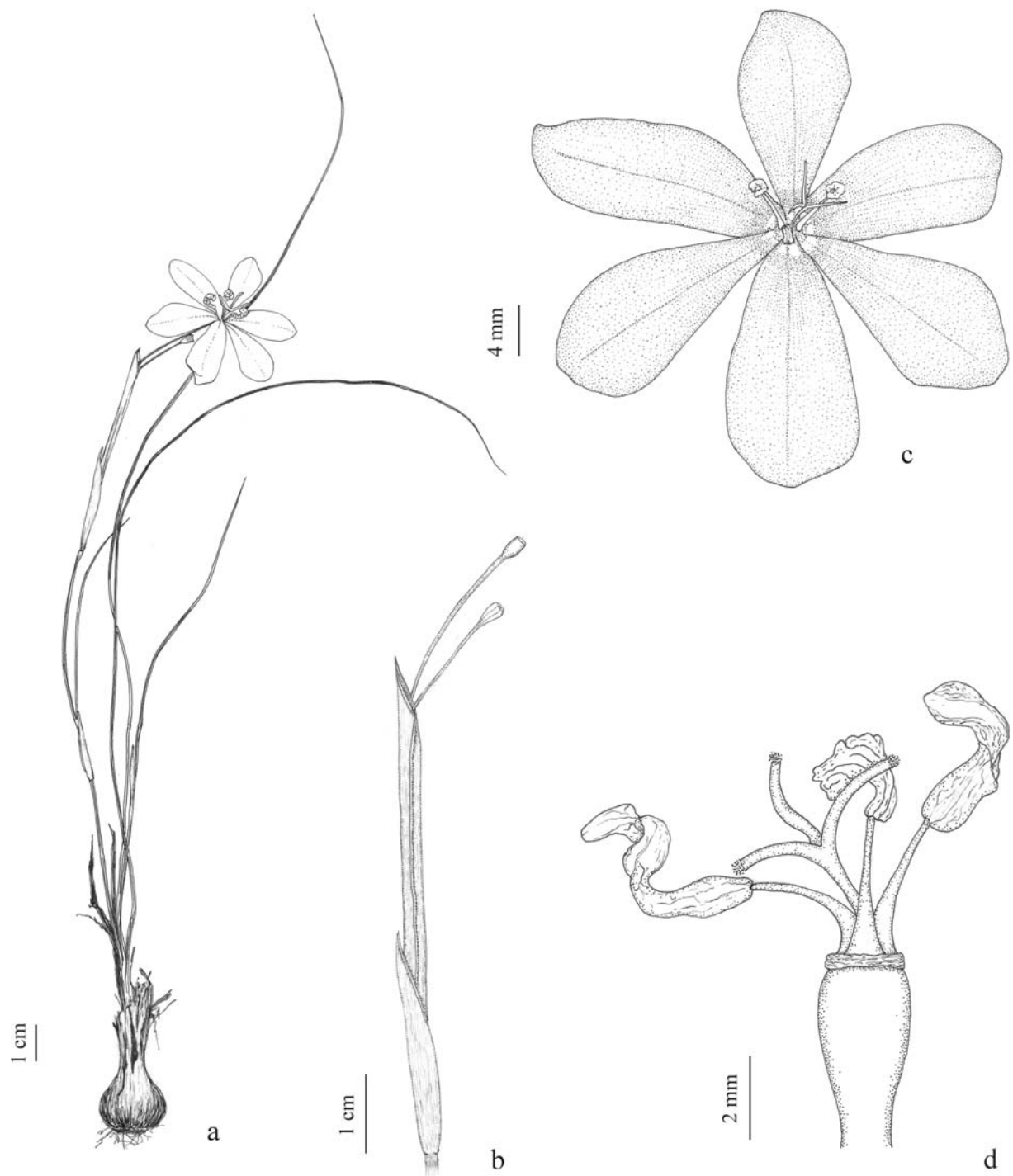


Figura 7: *Calydorea basaltica* Ravenna: a) Hábito; b) Detalhe do ripídio com espata externa, interna e pedicelos exsertos; c) Flor em vista lateral com estames recurvados e ramos do estilete ascendentes; d) Flor com as tépalas removidas mostrando o ovário, os estames e o estilete tripartido (a,b,d Dal Ri et al. 27; c foto do acervo dos autores).



Figura 8: *Calydorea basaltica* Ravenna: a) flor em vista frontal; b) detalhe dos estames e do estilete; c) vista lateral da flor e das espatas externa e interna; d) fruto subgloboso; e) semente; f) vista superior da cápsula madura com sementes dispostas no interior dos lóculos.

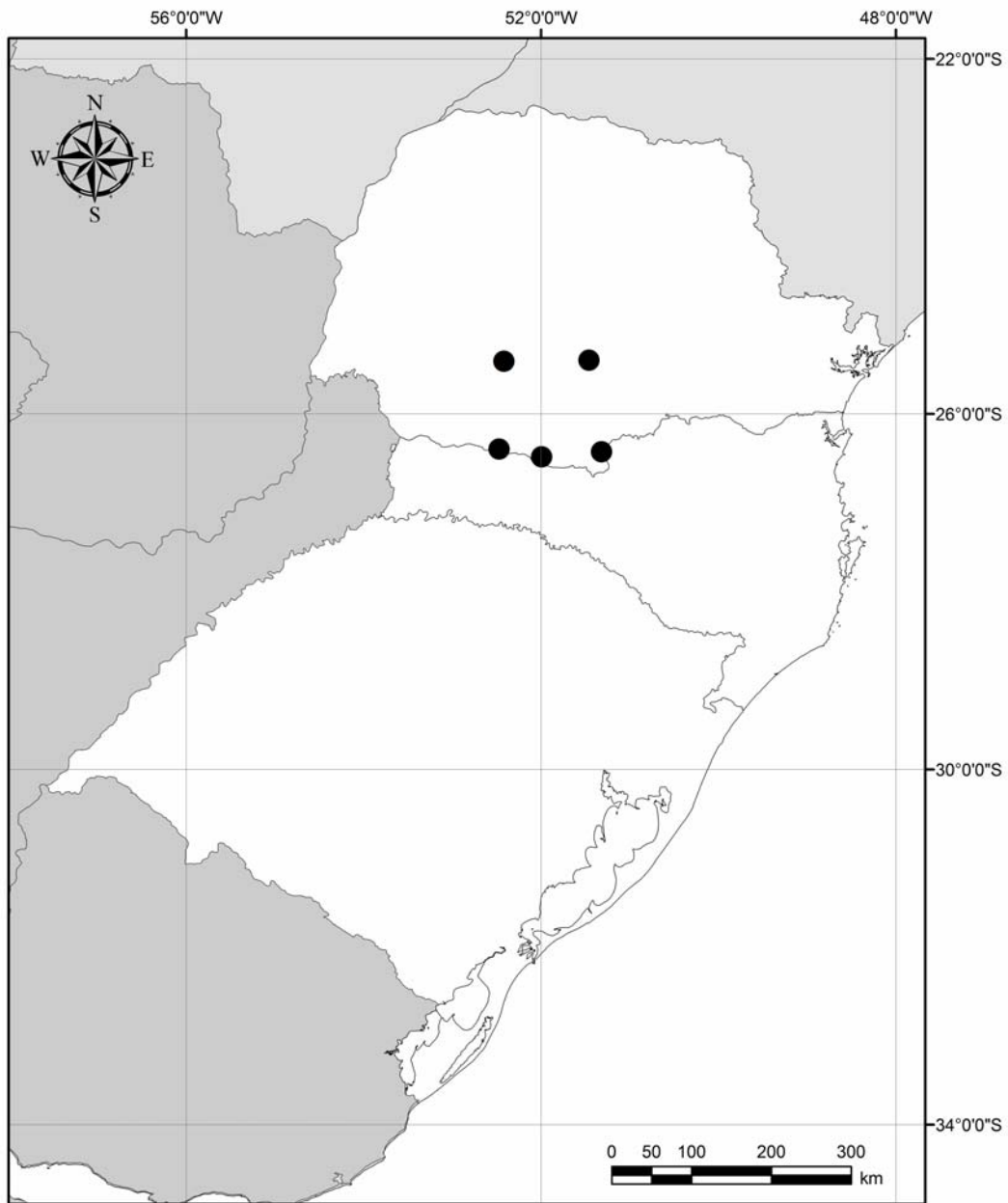


Figura 9: Registros de coleta de *Calydorea basaltica* Ravenna, Região Sul do Brasil.

1.4.4 *Calydorea campestris* (Klatt) Baker, J. Bot. 14: 187. 1876.

Basiônimo: *Botherbe campestris* Klatt, Linnaea 31: 563. 1861.

Lectótipo: São Paulo, s. mun., 1861-62, *Sellow 4730* (K!) designado por Chukr (2003)

Roterbe campestris Klatt in Mart. & Eichler, Fl. bras. 3(1): 544. 1871.

Figuras: 10, 11 e 12

Iconografia: Chukr & Capellari Jr. (2003), fig. 1-V; Vieira *et al.* (2003), fig 2.

Plantas 8-33(-46) cm alt. Bulbo globoso ou subgloboso, 8-15 x 6-13 mm, túnicas membranáceas, pseudocolo, quando presente, escuro, 5-17(-39) mm compr. Folhas, 1-5, lineares, (4-)6,4-20(-45) cm compr., 0,4-1,3 mm larg., sulcadas longitudinalmente. Caule florífero 1-2, 4-21(-30) cm compr. Bráctea única, 3-9 cm compr., 0,4-2,0 mm larg. Ripídios 1-2(-8), pedunculados, pedúnculos eretos a curvados (60-)78(-92) mm compr. Espatas papiráceas, externa (11-)13(-18) mm compr., ápice acuminado, ápice e margens de coloração ferrugínea, interna (14-)19(-23) mm compr., ápice agudo a acuminado; pedicelo 10-23 mm compr., incluso. Tépalas lilases, base esbranquiçada de aproximadamente 2 mm compr., oblanceoladas a obovadas, membranáceas a papiráceas, com tricomas na base; externas, 12-19 x 5-8 mm, ápice arredondado a brevemente acuminado, internas 10-13 x 4-7 mm, ápice arredondado a brevemente acuminado. Androceu com filetes brancos, 1,4-4 mm compr., anteras 2-3,8 mm compr., retorcidas após a deiscência, conectivo conspícuo. Gineceu com estilete branco, indiviso em (0,1-)0,7(-1,7) mm compr., ramos do estilete brancos na metade basal e lilases na metade apical, (0,5-)3,9(-5,4) mm de compr., patentes, ápice lobado, área estigmática lilás, ovário 2,0-4,0 x 1,0-1,8 mm. Cápsula obcônica a obdeltóide 2,7-6,5 x 2,2-3,6 mm. Sementes, 1,5 x 0,75 mm, marrom-avermelhadas a marrom-escuras, brilhantes, cônicas a arredondadas, com superfícies planas e áreas angulares, textura enrugada.

Material examinado: BRASIL: PARANÁ: Almirante Tamandaré, 23.IX.1976, fl., *R. Kummrow 1131* (MBM). Arapoti, Rio das Perdizes, 6.IV.1970, fl. e fr., *G. Hatschbach 24126* (MBM). Balsa Nova, 28.X.2008, fl., *L.Eggers & T.T. Souza-Chies 357* (ICN). Campo Largo, BR 376, 25.X.2008, fl., *L. Eggers & T.T. Souza-Chies 330* (ICN). Castro, PR 151, km 280, 20.XI.2010, fl., *L. Dal Ri et al. 29* (ICN). Colombo, Rio Canguiri, 3.X.1967, *G. Hatschbach 17267* (MBM). Curitiba, Capão da Imbuia, X.1966, fl., *L.T. Dombrowski 1900 & Y.S. Kuniyoshi 1626* (MBM). Curitiba, 13.X.1958, *G. Hatschbach 1222* (B). Guaratuba, Serra de Araçatuba, Morro dos Perdidos, 26.XI.1999, fl. e fr., *E.P. Santos & S. Pereira 851* (MBM, UPCB). Irati, Recanto dos Papagaios, 16.XI.2000, fr., *E.R. Vieira & J. Marzinek 15* (UPCB). Jaguariaíva, PR 151, km 228, 21.XI.2010, fl., *L. Dal Ri et al. 44* (ICN). Lapa, Johanisdorf, 31.X.1972, fl. e fr., *G. Hatschbach 30594* (MBM). Laranjeiras do Sul, 21.X.1966, fl. e fr., *J.C. Lindman & J.H. de Haas 2773* (RB). Palmas, Santo Agostinho, 13.XII.1966, fl., *G. Hatschbach 15413* (MBM). Palmeira, Cercado, 14.II.2006, fl. e fr., *E. Barbosa et al. 1178* (MBM). Piraí do Sul, PR 090, km 156, 20.X.2010, fl. E fr., *L. Dal Ri et al. 30* (ICN). Piraquara, Pinhais, 17.X.1969, fl., *G. Hatschbach 22495* (MBM). Ponta Grossa, Capela Nossa Senhora das Pedras, Fazenda das Almas, 10.X.1999, fl. e fr., *S.R. Ziler & W. Maschio 1906* (MBM). Porto Amazonas, Chácara do Dr. Antonio Franco, 17.XII.1950, fr., *A. Mattos* (MBM 209972). São José dos Pinhais, Roseira, 21.XII.1982, fl. e fr. , *R. Kummrow 2128* (MBM). Tijucas do Sul, 24.X.2008, fl., *L. Eggers & T.T. Souza-Chies 324* (ICN). Umuarama, 30.XI.1935, fl. e fr., *M. Kulhmann* (SP 32481). RIO GRANDE DO SUL: Cambará do Sul, Parque Nacional dos Aparados da Serra, 12.XII.2010, fl., *L. Dal Ri et al. 72* (ICN). Capão da Canoa, Arroio Teixeira, 14.X.2011, fl., *T.L.S. Alves 100* (ICN). São Francisco de Paula, CPCN Pró-Mata, 06.I.2004, fl., *L. Eggers & T.T. Souza-Chies 46* (ICN). Tapes, Saco de Tapes, XII.1980, fr., *J. Goergem* (ICN 50188). Xangri-lá, RS 389, Estrada do Mar, 13.XI.2008, fl., *L. Eggers & T.T. Souza-Chies 429* (ICN). SANTA CATARINA: Campo Alegre, Serra do Quiriri,

29.XII.1998, fl. e fr., *J.M. Silva et al.* 2795 (MBM). Palhoça, Campo do Massiambú, 24.IX.1953, fl. e fr., *Reitz & Klein 1007* (HBR). Santa Cecília, BR 116, km 154, 17.XI.2010, fl., *L. Dal Ri et al.* 25 (ICN). São Francisco do Sul, Morro do Campo Alegre, 7.X.1960, fenologia, *Reitz & Klein 10052* (HBR).

Material adicional examinado: BRASIL: MINAS GERAIS: Caldas, Serra de Caldas, Morro das Antenas, 13.I.2001, fl. e fr., *C. Van den Berg & E.L. Borba* (HUEFS 76503). Camanduaia, Serra Mantiqueira, II.1953, fl. e fr., *H. Srk* (RB 82148). Presidente Kubitschek, 15.XII.2004, fr., *R. Mello-Silva & R.C. Forzza*, 2674 (RB). SÃO PAULO: Campos do Jordão, I.1944, fl. e fr., *E. Friderichs* (PACA 27891). São Paulo, Vila Emma, XII.1933, fl. e fr., *Brade 12848* (RB). Serra da Bocaina, V. 1951, fl. e fr., *A.C. Brade 21075* (RB).

Comentários

Calydorea campestris foi coletada nos três estados da Região Sul do Brasil. No Rio Grande do Sul é encontrada nas regiões fisiográficas dos Campos de Cima da Serra, do Litoral e da Encosta do Sudeste, município de Tapes. Em Santa Catarina, a espécie ocorre no Planalto Serrano e no Planalto Norte. No Paraná, a espécie está presente na Região dos Primeiro, Segundo e Terceiro Planaltos (Fig. 12). A espécie também foi registrada na Região Sudeste do Brasil, nos estados de Minas Gerais (município de Caldas) e São Paulo (Campos do Jordão e Serra da Bocaina), o que também é relatado por Chukr & Capellari Jr. (2003) e Vieira *et al.* (2003). Nos países vizinhos do Cone Sul, a espécie foi relatada para a Argentina, Província de Entre Rios (Grisebach 1879), sendo também citada como autóctone no Paraguai e no Uruguai (Innes 1985) e na Bolívia (Foster 1958).

Os registros das exsicatas e das coletas de campo indicam que *C. campestris* floresce durante a primavera e verão, com a floração iniciando em setembro e estendendo-se até o mês de abril. Vegeta em campos limpos de altitude, ou em áreas entremeadas com gramíneas de

hábito cespitoso, especialmente em organossolos e áreas úmidas, tais como campos brejosos; podendo também crescer em solos um pouco pedregosos e bem drenados. A espécie foi coletada entre altitude de 151 m até 1.200 m.

Indivíduos de *C. campestris* apresentam uma variação notável na altura total da planta, podendo ser encontradas plantas de menos de 10 cm, até cerca de 50 cm. Baker (1903) descreveu a variedade *longicaulis*, definindo-a como plantas com caule de 20 a 40 cm de comprimento. No presente trabalho, optou-se por não subdividir a espécie, pois foi observada continuidade na variação deste caráter.

Calydorea campestris é morfologicamente próxima à *C. crocoides*, ocorrendo em simpatria em algumas áreas. É facilmente distinguível desta pelo tamanho menor de suas espatas e das anteras: 2-3,8 mm *versus* 7-11 mm em *C. crocoides*.



Figura 10: *Calydorea campestris* (Klatt) Baker: a) Hábito; b) Detalhe do ripídio com espata externa e interna, bractéolas, pedicelos exsertos e cápsulas obcônicas; c) Flor com estames e ramos do estilete horizontalmente dispostos; d) Flor com as tépalas removidas mostrando o ovário, os estames e o estilete tripartido (a,b *Dal Ri et al. 29*; c foto do acervo dos autores; d *Eggers & Souza-Chies 330*).

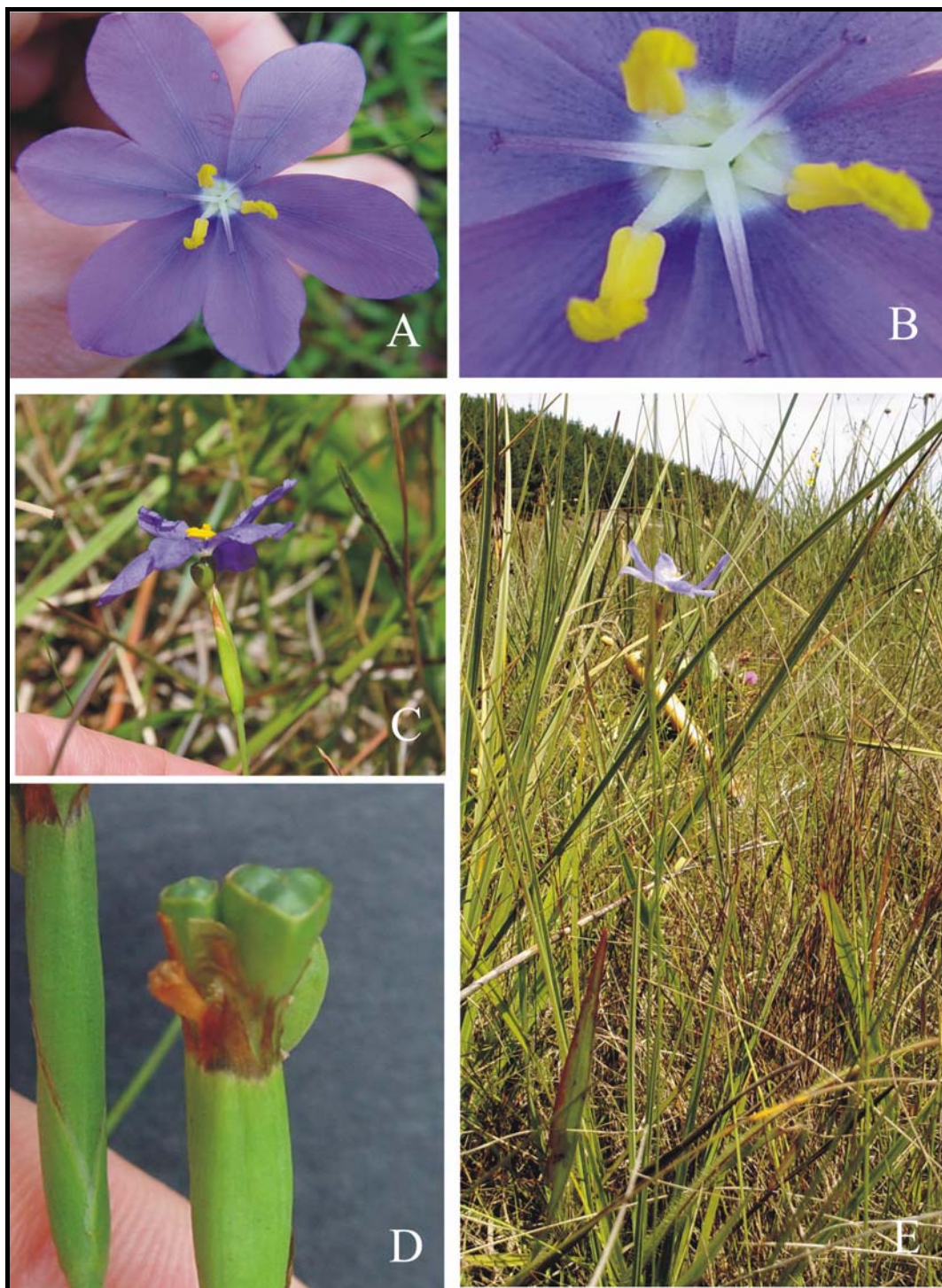


Figura 11: *Calydorea campestris* (Klatt) Baker: a) flor em vista frontal; b) detalhe dos estames com anteras retorcidas e do estilete com ramos intercalados entre os estames; c) Vista lateral da flor e das espatas externa e interna; d) frutos obcônicos com cicatriz do perigônio e lóculos bem marcados; e) hábito da planta entremeada na vegetação herbácea adensada.

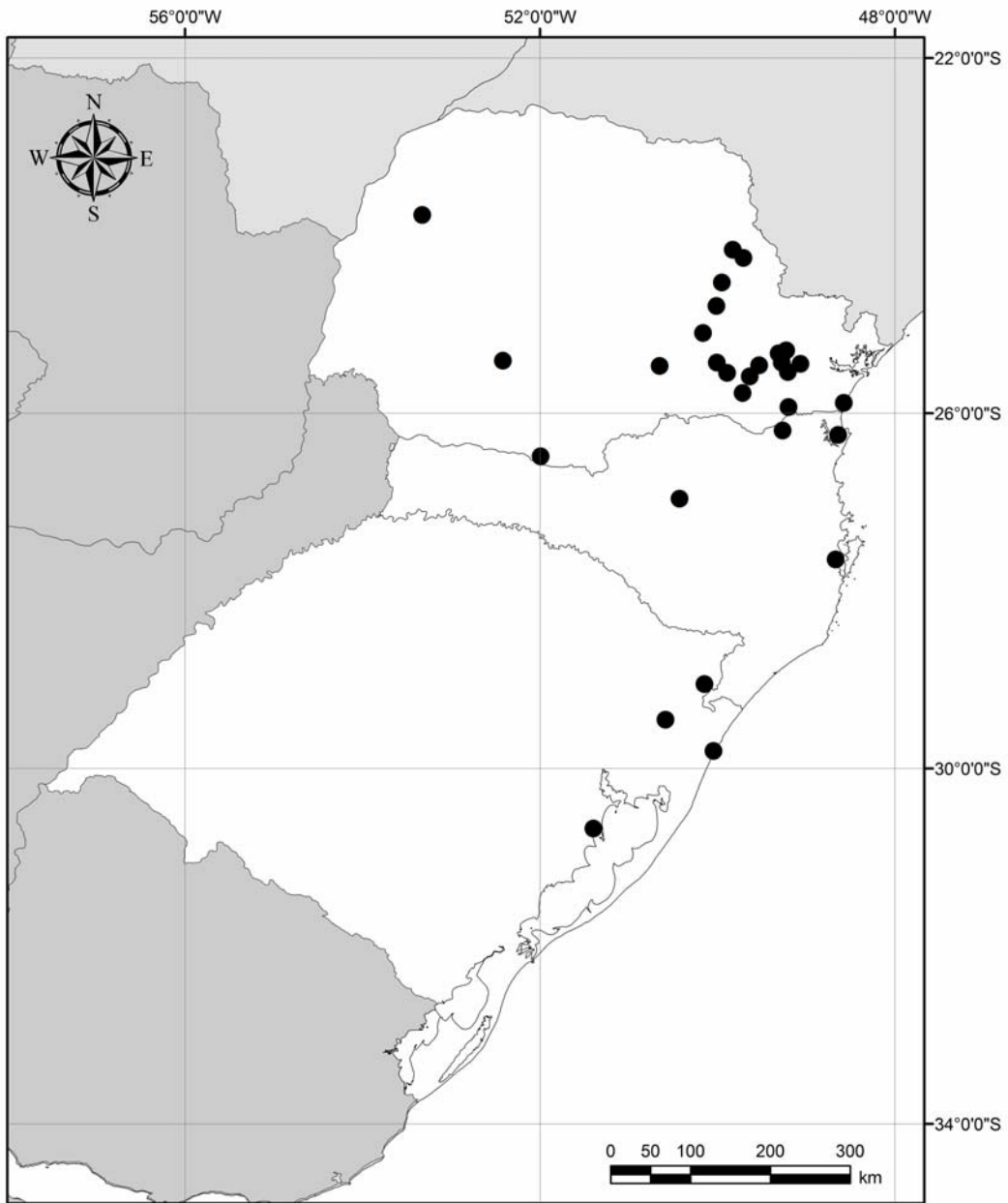


Figura 12: Registros de coleta de *Calydorea campestris* (Klatt) Baker, Região Sul do Brasil.

1.4.5 *Calydorea crocoides* Ravenna, Bol. Soc. Argent. Bot. 10: 311. 1965.

Holótipo: Brasil, Rio Grande do Sul, São Francisco de Paula, Rio Itaimbesinho, X.1959, *Aydil Andrade 162* (Herbário Ravenna; Isótipo: R, *n.v.*)

Figuras: 13, 14 e 15

Iconografia: Ravenna (1965), fig 1-A.

Plantas 10-33 (-47) cm alt. Bulbo globoso, 10-22 x 22-54(-69) mm, túnicas membranáceas; pseudocolo marrom escuro, 22-54(-69) mm compr. Folhas 1-7, lineares, 14-30(-43) cm compr., 0,6-3,6 mm larg., brevemente plicadas. Caule florífero 1-4, 4-14 cm compr. Bráctea única, 7-19 cm compr., 0,7-2,0 mm larg. Ripídios pedunculados 1-2 (-8), pedúnculos 11-56(-115) mm compr. Espatas membranáceas, externa (31-)42(-72) mm compr., ápice acuminado, marcescente, interna (53-)99(-117) mm compr., ápice acuminado, marcescente, pedicelo 55-139 mm compr., exserto. Tépalas lilás arroxeadas, base esbranquiçada ou amarelada de aproximadamente 2 mm, elípticas, oblanceoladas a obovadas, membranáceas a papiráceas, ápice arredondado até brevemente acuminado, com tricomas esparsos na base; externas 18-31 x 6-17 mm, internas 15-27 x 6-14 mm. Androceu com filetes brancos, 1,6-3,3 mm compr.; anteras 7-11(-15) mm compr., inicialmente notavelmente eretas, espiraladas após deiscência, conectivo conspícuo. Gineceu com estilete esbranquiçado, indiviso em 0,9-2,0 mm compr.; ramos do estilete esbranquiçados na metade basal e lilases na metade apical, 3-6,2 mm compr., patentes, ápice bilobado, área estigmática lilás, ovário 2,4-4,2 x 1,0-2,5 mm. Cápsula obcônica, obdeltóide ou subglobosa, 4-7 x 1,7-6 mm. Sementes marrom-avermelhadas, opacas, grosseiramente arredondadas, com superfícies planas e áreas angulares, textura enrugada.

Material examinado: BRASIL: RIO GRANDE DO SUL: Bom Jesus, Serra da Rocinha, 14.I.1942, fr., *B. Rambo* (PACA 8715). Cambará do Sul, Parque Nacional dos Aparados da Serra, 11.XI.2010, fl., *L. Dal Ri et al. 62,63* (ICN). Parque Nacional da Serra Geral, Canyon Fortaleza, 03.IX.2011, fl., *T.B. Guimarães & L. Dal Ri 01* (ICN). Canela, Laje de Pedra, 20.X.1974, fr., *A.R. Schultz* (ICN 26300). Osório, Terra de Areia, 8.II.1988, fl. e fr., *N. Silveira & D. Farias Filho 5499* (HAS). São Francisco de Paula, Veraneio Hampel, 30.XI.2006, fl., *L. Eggers & T.T. Souza-Chies 152* (ICN). São José dos Ausentes, Pico Montenegro, 9.XI.2004, fr., *A.D. Nilson et al. 1217* (HAS). Tramandaí, 1.XI.1949, fl. e fr., *Schultz* (ICN 1410). SANTA CATARINA: Bom Jardim da Serra, SC 438, 23.XI.2010, fl., *L. Dal Ri et al. 61* (ICN). Praia Grande, Mirante da Serra do Faxinal, 21.II.2012, fl. e fr., *T.B. Guimarães & L. Dal Ri 03* (ICN). São Joaquim, 03.XI.2005, fl. e fr., *L. Eggers & T.T. Souza-Chies 104* (ICN).

Material adicional examinado: BRASIL: MINAS GERAIS: Mocambinho, arredores, 22.IX.2004, fl., *G. Hatschbach et al. 78451* (MBM).

Comentários

Calydorea crocoides é uma espécie com distribuição predominante no sul do Brasil, na região dos Campos de Cima da Serra no Rio Grande do Sul, tendo sido, no entanto, também registrada na região da Planície Litorânea. No Estado de Santa Catarina foi coletada no Planalto Serrano e na Região Sul, em Praia Grande (Fig. 15). Há registro desta espécie para o norte de Minas Gerais, no município de Mocambinho (*G. Hatschbach et al. 78451*, MBM). Floresce preferencialmente nos meses de outubro a dezembro, contudo já foram coletados espécimes em floração nos meses de julho, agosto, setembro, fevereiro e março. *Calydorea crocoides* é encontrada, preferencialmente, em organossolos úmidos. No entanto, pode ocorrer em solos um pouco mais secos, compactados e pedregosos, tais como afloramentos de rochas.

É encontrada em campos limpos, campos com herbáceas cespitosas, encostas de morros, beira de mata e bordas de banhados. Ocorre, tipicamente, em altitudes de 900 até 1.200 m. Contudo, duas coletas foram realizadas em áreas litorâneas. Indivíduos normalmente ocorrem de forma isolada, porém podem formar pequenos grupos, devido à divisão dos bulbos e formação de novas plantas.

As espécies morfológicamente próximas a *C. crocoides* são *C. basaltica* e *C. campestris* (ver comparação nas descrições já apresentadas).

Foram encontrados exemplares de *C. crocoides* com as tépalas completamente brancas no Parque Nacional dos Aparados da Serra (*Dal Ri et al. 63, ICN*).

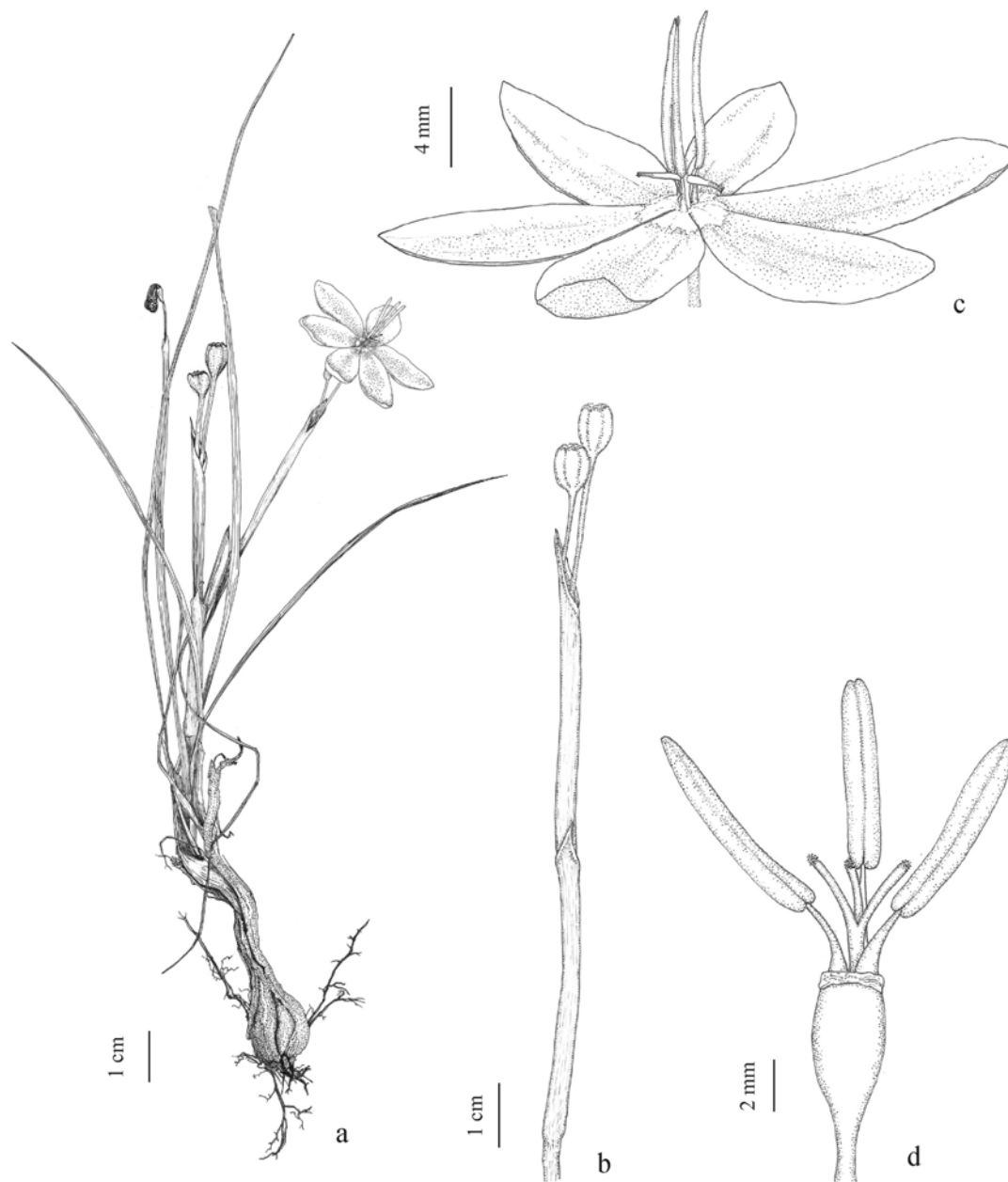


Figura 13: *Calydorea crocoides* Ravenna: a) Hábito; b) Detalhe do ripídio com espata externa e interna, pedicelos exsertos e cápsulas subglobosas; c) Flor em vista lateral com estames e ramos do estilete horizontalmente dispostos; d) Flor com as tépalas removidas mostrando o ovário, os estames e o estilete tripartido (a,b Dal Ri *et al.* 62; c foto do acervo dos autores; e Eggers & Souza-Chies 127).

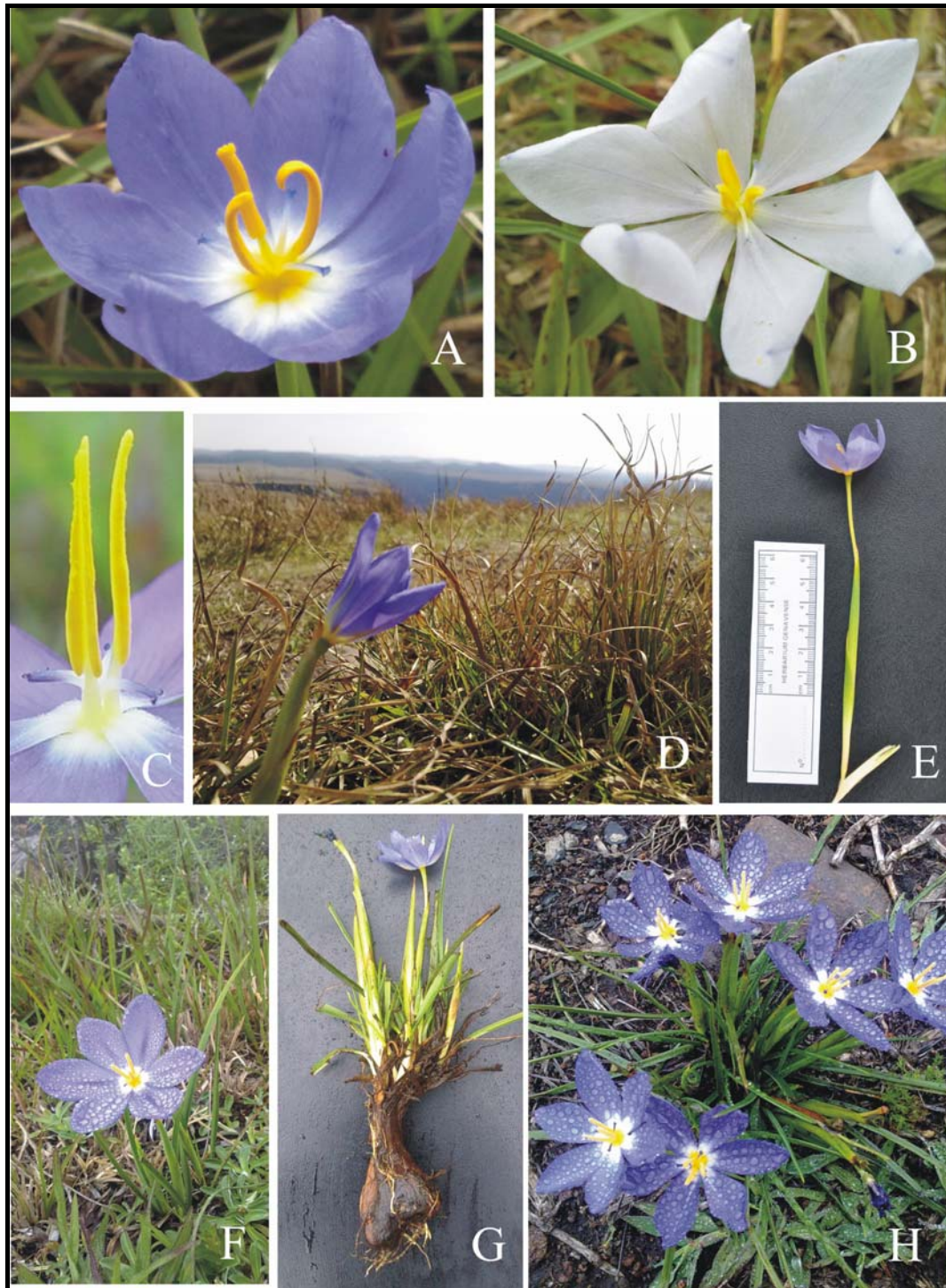


Figura 14: *Calydorea crocoides* Ravenna: a) flor típica com tépalas lilases arroxeadas; b) variação da coloração da flor com tépalas brancas; c) verticilos reprodutivos com estames eretos e ramos dos estiletos dispostos horizontalmente; d) indivíduo encontrado no alto do Canyon Fortaleza, Cambará do Sul, RS; e) lateral da flor e das espatas externa e interna; f) indivíduo isolado entre gramíneas; g) bulbo em processo de divisão com pseudocolo evidente; h) indivíduos reunidos devido à divisão dos bulbos.

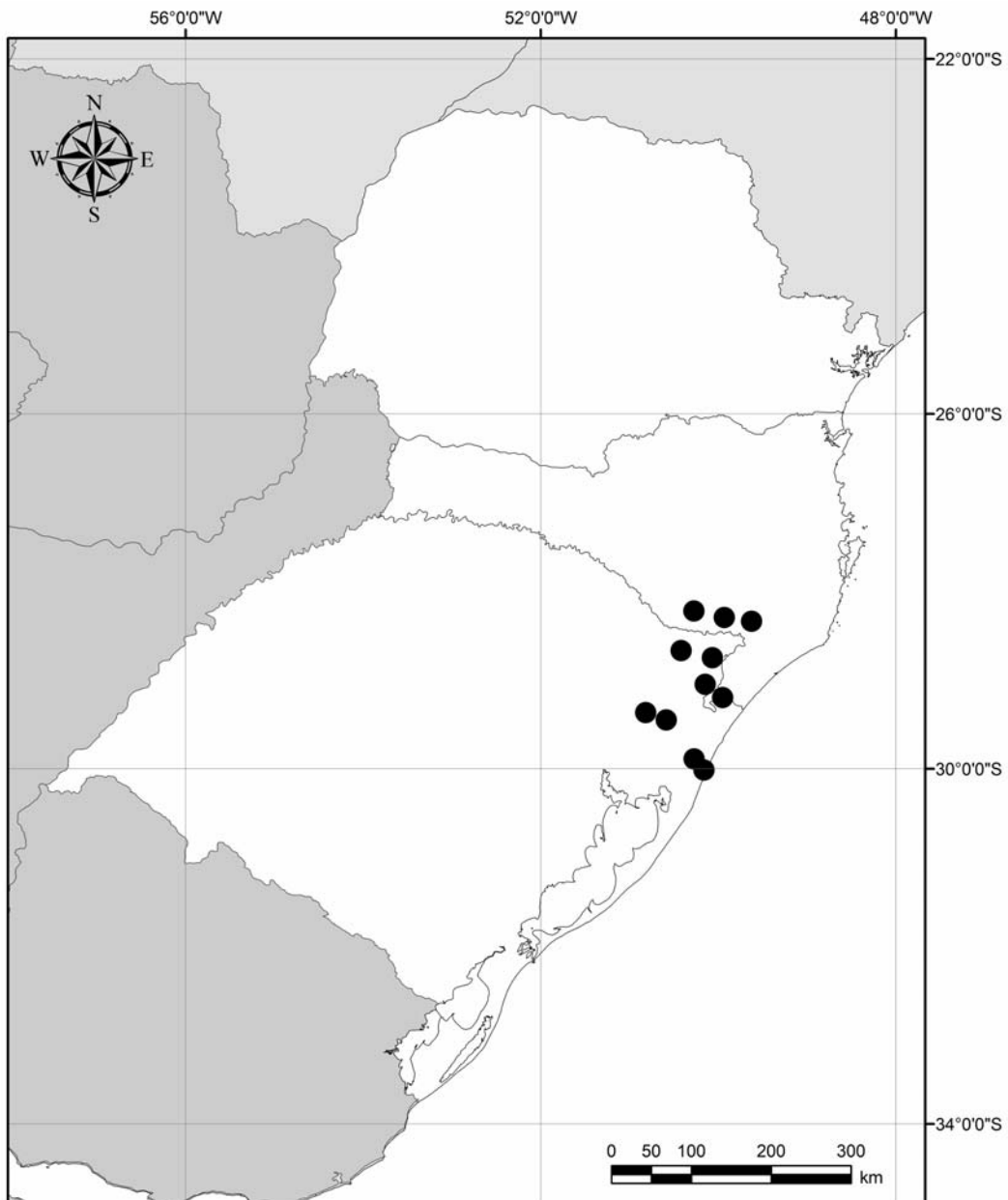


Figura 15: Registros de coleta de *Calydorea crocoides* Ravenna, Região Sul do Brasil.

1.5 Mapa com registros de coletas das espécies sul-brasileiras de *Calydorea*

Os registros de coleta das cinco espécies de *Calydorea* encontradas na Região Sul do Brasil estão apresentados na Fig. 16.

Os eventos parapátricos e simpátricos foram registrados em seis ocasiões. No Rio Grande do Sul são simpátricas: *C. campestris* e *C. crocoides* em Cambará do Sul e São Francisco de Paula e *C. alba* e *C. approximata* no município de Alegrete. Em Santa Catarina foram registradas *C. approximata* e *C. crocoides* em São Joaquim. Os registros de simpatria no Paraná estão restritos as espécies *C. campestris* e *C. basaltica* nos municípios de Laranjeiras do Sul e Palmas e um registro parapátrico de *C. approximata* em Palmeira e *C. campestris* em Campo Largo. É provável que possa haver maior número de registros de simpatria nestas espécies que somente serão verificados com novas viagens ao campo, coleta e catalogação de exemplares em áreas já vistoriadas e em novas áreas adjacentes àquelas já estudadas.

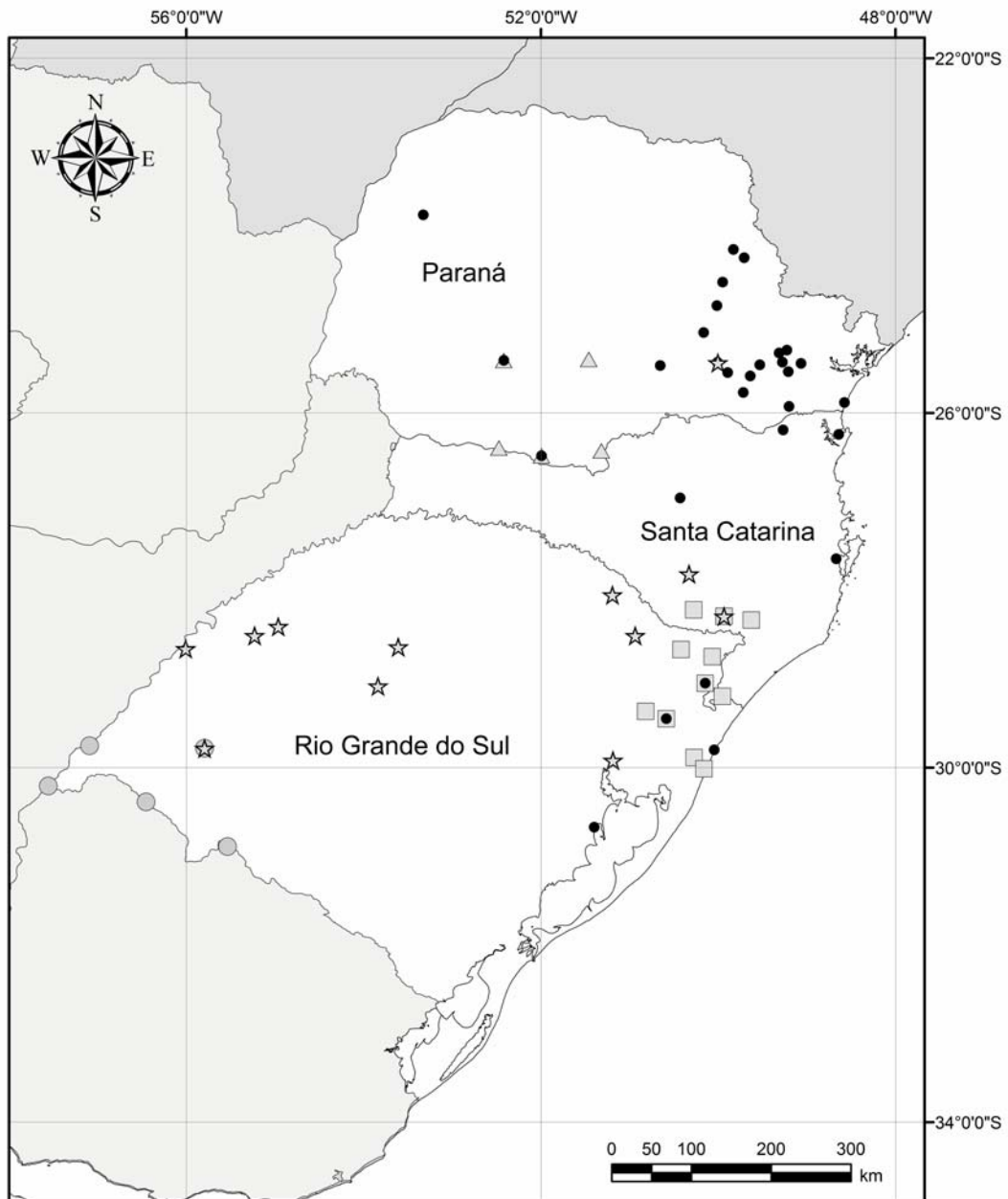


Figura 16: Registros de coleta das cinco espécies de *Calydorea* encontradas na Região Sul do Brasil. *C. alba* (○), *C. approximata* (☆), *C. basaltica* (Δ), *C. campestris* (●), *C. crocoides* (□).

1.6 Outras espécies de *Calydorea* citadas para a Região Sul

Calydorea amabilis (Ravenna) Goldblatt & Henrich, Ann. Missouri Bot. Gard. 78: 511. 1991.

Basiônimo: *Catila amabilis* Ravenna. Nordic J. Bot. 3: 197. 1983.

Holótipo: Argentina, Entre Rios, *Ravenna* 3, II.1959 (Herbário Ravenna, *n.v.*).

Iconografia: Ravenna (1983), fig. 1. Innes (1985), fig. 18. Muñoz-Schick, M. (2003), fig 4-E.

Goldblatt & Manning (2008), fig. 57.

Calydorea amabilis (Ravenna) Goldblatt & Henrich foi descrita no gênero monoespecífico *Catila* Ravenna, como *Catila amabilis* Ravenna (Ravenna 1983). O gênero foi descrito, enfatizando a peculiaridade do androceu, no qual as anteras se posicionam de forma oposta aos ramos do estilete, abraçando os mesmos após a liberação do pólen (Ravenna 1983). Além da diferença marcante no posicionamento dos estames em relação aos ramos do estilete, as tépalas em *Catila* são organizadas em dois verticilos diferentes entre si, sendo as tépalas externas patentes, enquanto as internas são menores em comprimento e largura, e a porção apical é revoluta, características que somente ocorrem em *Calydorea pallens*, dentro do gênero.

O estudo filogenético da tribo Tigrideae realizado por Chauveau *et al.* (2012, prelo) revelou que o gênero *Calydorea* não é monofilético. O resultado da árvore filogenética, aliado às diferenças morfológicas deste táxon em relação às demais espécies, leva-nos a considerar inapropriada a inclusão do mesmo em *Calydorea*. A proposição de revalidação de *Calydorea amabilis* em *Catila amabilis* também foi efetuada por Ravenna (2009), sendo considerada a melhor opção taxonômica no momento.

A espécie foi coletada no Rio Grande do Sul, na região fisiográfica da Campanha, em Barra do Quaraí e em Uruguaiana, com exsicatas depositadas no ICN e HAS,

respectivamente. Também foram encontradas exsicatas provenientes da Argentina (Província de Entre Rios) e do Uruguai (Departamento de Artigas e Rio Negro).

Calydorea azurea Klatt, Abh. Naturf. Ges. Halle 15: 387. 1882.

Holótipo: Uruguai, *Lorentz 135*, IV.1875 (B!)

A espécie apresenta uma descrição bastante antiga e concisa. O tipo da espécie evidencia uma planta de porte avantajado (cerca de 30 cm de altura) com o caule florífero ramificado. Na descrição original, Klatt apresentou medida de 10,5 mm (correspondente a 5 *lin.*) para o que chamou de lacínias do perigônio. Por outro lado, Roitman & Castillo (2005; 2007) citaram altura de planta de 25 a 35 cm, folhas de 3 a 6 mm de largura, flores de 4,4 a 5,3 cm de diâmetro e estilete truncado, sem referir, no entanto, a origem destes dados.

Eggers *et al.* (2011) citaram esta espécie para a Região Sul do Brasil, no entanto, neste estudo, consideramos a ocorrência da espécie como duvidosa, pois não foram encontradas plantas em inúmeras viagens de coleta. São necessárias mais coletas na região fisiográfica da Campanha (RS), para elucidar esta questão.

Calydorea luteola (Klatt) Baker, J. Bot. 14: 188. 1876.

Basiônimo: *Botherbe luteola* Klatt, *Linnaea* 31: 563. 1861.

Holótipo: *Brasilia meridionalis*, Sellow 3598 (B!)

Roterbe luteola Klatt in Mart. & Eichler, *Fl. bras.* 3(1): 544. 1871.

Iconografia: Mart. & Eichler (1871), como *Roterbe luteola*, fig. 71-IV.

Calydorea luteola foi descrita com base em material coletado por Sellow em “Brasilia meridionalis”. A espécie foi descrita, como o nome indica, portando perigônio amarelo. A análise da exsicata, no entanto, lembra a espécie *C. alba*.

Consideramos a espécie como duvidosa, pela ausência de qualquer coleta com exceção do exemplar-tipo e pela coloração descrita para a flor, que não é típica para as espécies do gênero.

Calydorea nuda (Herb.) Baker, J. Bot. 14: 188. 1876.

Basiônimo: *Gelasine nuda* Herb., Bot. Mag. 66, t.3779. 1840.

Holótipo: Brasilia, Montevideo, Sellow 560 (B, F - Foto!)

Botherbe gracilis Klatt, Linnaea 31: 565. 1862.

Roterbe gracilis Klatt in Mart. & Eichler, Fl. bras. 3(1): 544. 1871.

Iconografia: Lombardo (1984), fig. 160-1. Innes (1985), fig. 17.

Calydorea nuda, embora citada como de provável ocorrência no sul do Brasil por alguns autores (Lombardo 1984; Roitman *et al.* 2008), não teve a sua ocorrência confirmada nessa região. A espécie é típica do Uruguai, com registros nos Departamentos de Canelones, Florida, Maldonado, Montevideo, Paysandu, Salto, Soriano e Tacuarembó. Conforme Innes (1985), ocorre também na Argentina, sem precisar província. É facilmente distinguível de todas as espécies abordadas neste trabalho, pela presença de um estilete sem ramificações.

Calydorea riograndensis Deble, Bonplandia 20(1): 36. 2011.

Holótipo: Brasil, Rio Grande do Sul, Dom Pedrito, L.P. Deble & A.S. de Oliveira-Deble 10984 (CTES *n.v.*)

Iconografia: Deble (2011), fig. 1.

Calydorea riograndensis foi recentemente descrita por Deble (2011), com base em material originário dos municípios de Dom Pedrito, Santana do Livramento e Quaraí. A espécie é descrita com flores lilases claras, azul claras ou, raramente, brancas. Ao compararmos *C. alba* e *C. minima* com a *C. riograndensis*, observa-se uma superposição de medidas de estruturas e de aspectos de coloração. A separação destes táxons, empregando-se as dimensões das tépalas, dos filetes, das anteras e do estilete, recai em valores que se sobrepõem com uma ou outra espécie. *Calydorea alba*, *C. azurea*, *C. minima* e *C. riograndensis* são espécies muito fortemente diferenciadas pelos seus tamanhos, incluindo táxons com medidas menores (*C. minima*), maiores (*C. azurea* ou *C. alba*) e intermediárias (*C. riograndensis*), sem levar em consideração a plasticidade fenotípica que as plantas podem apresentar relacionada ao ambiente, ou mesmo a possibilidade de hibridação entre os tipos extremos. Além disto, a coloração da flor não parece consistente suficiente para a distinção das espécies, ou pelo menos de algumas delas. Dados moleculares com genes plastidiais desmostraram a relação estreita entre estas espécies (Dal Ri *et al.* dados não publicados) Acreditamos que, para a melhor circunscrição de todas as espécies mencionadas é necessário um estudo mais abrangente, com base em um maior número de coletas, em cultivo das espécies.. Pelos motivos aqui expostos, consideramos a espécie *C. riograndensis* como duvidosa.

1.7 Agradecimentos

À Fundação Zoobotânica do Estado do Rio Grande do Sul pela licença concedida ao primeiro autor para realização do curso de mestrado que resultou neste trabalho, ao Jardim Botânico da FZB pela manutenção da coleção viva de espécies de Iridaceae da Região Sul do

Brasil. À colega da FZB, Rejane Rosa, pelos desenhos dos hábitos das plantas e ao botânico Edson Luís de Carvalho Soares pela elaboração das demais ilustrações e pela montagem final das estampas. Agradecemos à botânica Thais de Beauclair Guimarães pelo apoio e pelas sugestões.

1.8 Referências bibliográficas

- Baker, J.G. 1876. *Calydorea campestris* (Klatt) Baker. **Journal of Botany** 14: 187-188.
- Baker, J.G. 1903. *Calydorea campestris* var. *longicaulis*. In: Chodat, R. & Hassler, E. *Plantae Hasslerianae*. **Bulletin de L'Herbier Boissier** II, 3: 1103.
- Capellari Jr., L. 2005. Iridaceae da planície litorânea de Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brasil. **Hoehnea** 32(2): 207-213.
- 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** (no prelo).
- Chukr, N.S. 1992. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Iridaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**. 13: 111-131.
- Chukr, N.S. & Capellari Jr., L. 2003. Iridaceae In: Wanderley, M.G.L.; Shepherd, G.J.; Giulietti, A.M.; Melhem, T.S. (Coords.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Fapesp/Rima. 3: 127-147.
- Chukr, N.S. 2003. *Calydorea* In: Wanderley, M.G.L.; Shepherd, G.J.; Giulietti, A.M.; Melhem, T.S. (Coords.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Fapesp/Rima. 3: 129-130.
- Dahlgren, R.M.T.; Clifford, H.T. & Yeo, P.F. 1985. **The families of the Monocotyledons**.

- Berlim : Springer-Verlag. 520 p.
- Dias, E.B.A. 2010. **Iridaceae Juss. no Distrito Federal, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília: Brasília, 61 p.
- Eggers, L. 2008. A família Iridaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências** 6: 167-175.
- Eggers, L. *et al.* 2011. *Calydorea*. In: Forzza, R.C. *et al.* (eds.). **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em 20 dezembro 2011.
- Fortes, A.B. 1959. **Geografia física do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Livraria do Globo. 393 p.
- Foster, R.C. 1945. Studies in the Iridaceae. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University** 155: 46.
- Foster, R.C. 1958. A catalogue of the ferns and flowering plants of Bolivia. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University** 184: 47-48.
- Garcia, R.J.F. & Pirani, J.R. 2005. Análise florística, ecológica e fitogeográfica do Núcleo Curucutu, Parque Estadual da Serra do Mar (São Paulo, SP), com ênfase nos campos junto à crista da Serra do Mar. **Hoehnea** 32(1): 1-48.
- Goldblatt, P. 1982. Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of neotropical Iridaceae. **Systematic Botany** 7: 186-198.
- Goldblatt, P. 1990. Phylogeny and classification of Iridaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 77: 607-627.

- Goldblatt, P. & Henrich, J.E. 1991. *Calydorea* Herbert (Iridaceae - Tigridieae) Notes on this New World genus and reduction to synonymy of *Salpingostylis*, *Cardiostigma*, *Itysa* and *Catila*. **Annals of the Missouri Botanical Garden** 78: 504-511.
- Goldblatt, P.; Manning, J.C. & Rudall, P. 1998. Iridaceae. In: Kubitzki, K. (ed.). **The Families and Genera of Vascular Plants. III Flowering Plants. Monocotyledons: Liliaceae**. Berlin: Springer. 295-333.
- Goldblatt, P. & Manning, J.C. 2008. **The Iris family: Natural History and Classification**. Portland & London: Timber Press. 290 p.
- 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(3): 495-508.
- Governo do Estado de Santa Catarina 2012. Disponível em <<http://www.sc.gov.br/conteudo/santacatarina/geografia/paginas/regioes.htm>>. Acesso em 20 janeiro 2012.
- Grisebach, A. 1879. **Symbolae ad Floram argentinam. Zweite Bearbeitung argentinischer Pflanzem**. Göttingen: Dieterich'sche Verlags Buchhandlung. 345 p.
- Herbert, W. 1843. *Calydorea*. **Edwards's Botanical Register**. 29 (Misc.): 85.
- Innes, C. 1985. **The world of Iridaceae: a comprehensive record**. Ashington, Sussex: Holly Gate International. 405 p.
- INPI - The International Plant Names Index- 2012. Disponível em <<http://www.ipni.org>>. Acesso em 20 janeiro 2012.
- KEW – Kew Royal Botanic Garden – World Checklist of Selected Plant Families – 2012. Disponível em <<http://apps.kew.org/wcsp/prepareChecklist.do;jsessionid=>

22DE66CB2602CC8F21D579B07F3902E1?checklist=selected_families%40%40055240220121901588>. Acesso em 20 janeiro 2012.

Klatt, F.W. 1861. *Botherbe campestris*. **Linnaea** 31: 563.

Klatt, F.W. 1871. *Roterbe campestris* (Klatt) Klatt. In: Martius. **Flora Brasiliensis**, 3: 543.

Klatt, F.W. 1882. *Calydorea azurea*. **Abhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft zu Halle** 15: 387.

Linsingen, L.; Sonehara, J.S.; Uhlmann, A. & Cervi, A. 2006. Composição florística do Parque Estadual do Cerrado de Jaguariaíva, Paraná, Brasil. **Acta Biológica Paranaense** 35(3-4): 197-232.

Lombardo, A. 1984. **Flora Montevidensis**. Vol.3. Montevideo: Intendencia Municipal. 456p.

Maack, V. 1981. **Geografia física do Estado do Paraná**. Rio de Janeiro: José Olympio Ed. 442p.

Muñoz-Schick, M. 2003. Tres nuevas monocotiledoneas descubiertas en Chile: *Alstroemeria mollensis* M. Muñoz et A. Brink (Alstroemeriaceae), *Miersia chilensis* var. *bicolor* M. Muñoz (Gilliesiaceae) y *Calydorea chilensis* M. Muñoz (Iridaceae). **Gayana Botany** 60(2): 101-106.

Rambo, B. 1951. O elemento andino no pinhal riograndense. **Anais botânicos do Herbário Barbosa Rodrigues** 3: 7-39.

Ravenna, P. 1965. Notas sobre Iridaceae II. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**. 10: 311-322.

Ravenna, P. 1983. *Catila* and *Onira*, two new genera of South American. **Nordic Journal of Botany** 3(2): 197-205.

Ravenna, P. 1986. *Itysa* and *Lethia*, two new genera of neotropical Iridaceae. **Nordic Journal**

- of Botany** 6: 581-588.
- Ravenna, P. 2001. The Iridaceae of the Cuyo region Argentina. **Onira** 6: 1-18.
- Ravenna, P. 2005. New species of South American bulbous Iridaceae. **Onira** 10: 39-45.
- Ravenna, P. 2009. A survey in the genus *Cypella* and its allies (Iridaceae). **Onira** 12(1): 1-11.
- Reeves, G.; Chase, M. W.; Goldblatt, P.; Rudall, P.; Fay, M. F.; Cox, A. V.; Lejeune, B. & Souza-Chies, T. 2001. Molecular systematic of Iridaceae: evidence from four plastid DNA regions. **American Journal of Botany** 88(11): 2074-2087.
- Rodriguez, A. & Sytsma, K. 2006. Phylogenetics of the "Tiger-flower" group (Tigridiae: Iridaceae) molecular and morphological evidence. **Aliso** 22: 412-424.
- Roitman, G. & Castillo, A. 2005. *Calydorea alba* (Iridaceae: Tigridieae) a new species from Uruguay. **Bulletin of the Botanical Society of Argentina** 40(3-4): 311-312.
- Roitman, G. & Castillo, A. 2007. *Calydorea minima* (Iridaceae: Tigridieae) a new species from South America. **Bulletin of the Botanical Society of Argentina** 42(3-4): 321-323.
- Roitman, G.; Castillo, A.; Mara, I. 2008. In: Zuloaga, F.O.; Morrone, O.; Belgrano, M.J.; Marticorena, C.; Marchesi, E. (eds.). Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur: Pteridophyta, Gymnospermae, Monocotyledonea. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden** 107(1): 423-453.
- Roitman, G. 2009. Iridaceae. In: Kiesling, R. (ed.) **Flora de San Juan - República Argentina: Monocotiledóneas**. 1ed., v. 4. Mendoza: Zeta Editores. Pp. 404-410.
- 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.

- Takeuchi, C.; Affonso, P. & Chukr, N.S. 2008. Levantamento de Iridaceae Juss. no Núcleo Curucutu, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo. **Revista do Instituto Florestal** 20(1): 51-63.
- Thiers, B. 2012. **Index Herbariorum**: A global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. Disponível em <<http://sweetgum.nybg.org/ih/>>. Acesso em 20 janeiro 2012.
- Tropicos – Missouri Botanical Garden- 2012. Disponível em <<http://tropicos.org/>>. Acesso em 20 janeiro 2012.
- Vieira, E.R.; Santos, E.P. dos & Tardivo, R.C. 2003. Flórua do Morro dos Perdidos, Serra de Araçatuba, Paraná, Brasil: Iridaceae. **Estudos de Biologia** 25(51): 17-29.
- Wanderley, M.G.L. & Toledo, C.B. (1986). Flora Fanerogâmica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo-Brasil) - Iridaceae. **Hoehnea** 13: 145-147.

1.9 Índice de Coletores.

Os números entre parênteses após o número do coletor ou do registro de tombamento no herbário indicam a espécie. 1 - *Calydorea alba*, 2 – *Calydorea approximata*, 3- *Calydorea basaltica*, 4- *Calydorea campestris* e 5- *Calydorea crocoides*.

Absi-Daviña 4 (2); **Barbosa, E.** 1178 (4); **Brade, A.C.** 21075 (4), **Cristóbal** 1944 (2); **Dal Ri, L.** 01 (1), 60 (2), 27 (3), 25, 29, 30, 44, 72 (4), 61, 62 (5); **Dombrowski, L.T.** 1900; **Eggers, L.** 51, 519 (1), 72, 97, 249, 542 (2), 390 (3), 46, 199, 324, 330, 357, 429 (4), 104, 152 (5); **Friderichs, E.** s.n. (PACA 27891); **Goergem, J.** s.n. [ICN 30244 (2), 50188]; **Guaglianone** 16 (2); **Guimarães, T.B.** 02, 03 (5); **Hatschbach, G.** 22710 (3), 1222, 15413, 17267, 19693, 22495, 24126, 30594 (4), 61349, 78451 (5); **Irigoyen, J.** 334 (4); **Keller, H.A.** 503, 7658 (2); **Krapovickas, A.** 14973, 28869, 41014 (2), 15497 (4), s.n. (CTES 15497); **Kulhman, M.** (SP 32481); **Kummrov, R.** 1131, 2128 (4); **Lima, D.** s.n. (ICN 20961) (1); **Lindeman, J.C.** 2773, 2830 (3), s.n. [HAS 3191 (2), ICN 8240 (2), 8462 (4)]; **Marchesi** 5947 (4), s.n. (MVFA 21568) (4); **Mattos, A.** 5437 (4), s.n. (MBM 209972) (4); **Mello-Silva, R.** 2674 (4); **Miotto, S.** s.n. (ICN 64844) (2); **Montes, J.E.** 4108, 12682 (2); **Nilson, A.D.** 1217 (5), s.n. (HAS 82148) (4); **Pedersen, T.M.** s.n. (CTES 12492) (2); **Brade** 12848 (4); **Rambo, B.** s.n. [53470, 10089 (2), 34734 (4), PACA 8715 (5)]; **Reitz, R.** 1007, 10052 (4); **Ribas, J.M.** 2795 (4); **Sáenz, A.A.** 233 (4); **Santos, E.P.** 851 (4); **Schwacke** 2517 (4); **Silva, J.M.** 2795 (4); **Silva Filho, P.J.S.** 440 (2); **Silveira, N.** 5499 (5); **Schultz** s.n. (ICN 1410) (5); **Shulz, A.G.** 9311(2); **Srk, H.** s.n. (RB 82148) (4) ; **Tressens, S.G.** 2386 (1), 2310 (2); **Van den Berg, C.** s.n. (HUEFS 76503) (4); **Vieira, E.R.** 15 (4); **Ziler, S.R.** 1906 (4); **Wasum, R.** s.n. (HUCS 12447) (1).

Capítulo 2

Caracterização de espécies de *Calydorea* Herbert (Iridaceae) por DNA “barcode”

Manuscrito com resultados parciais, que sofrerá acréscimo de novas sequências de diferentes acessos, para posterior publicação.

Capítulo 2

Caracterização de espécies de *Calydorea* Herbert (Iridaceae) por DNA “barcode”

Resumo

O presente trabalho avaliou a variabilidade de cinco trechos do genoma plastidial (*matK*, *rbcL*, *rps4*, *rps16* e *trnL-F*) em diferentes acessos de 12 espécies de *Calydorea* e duas espécies de *Cardiostigma* visando a possível utilização destas como marcadores DNA “barcode”. Análises de agrupamento Neighbor-Joining demonstraram que o poder de discriminação do gene *matK* foi o mais elevado (55%), seguido pelo *rps16* com (45%). Quatro grupos de espécies ficaram evidenciados em todas as topologias, com pequenas variações: i) o grupo contendo *Cardiostigma*; ii) o segundo contendo, *Calydorea amabilis*, *C. gardneri*, *C. pallens* e *C. undulata*; iii) o terceiro com *Calydorea alba*, *C. azurea*, *C. minima* e; iv) o quarto grupo contendo um politomia entre *Calydorea approximata*, *C. basaltica*, *C. campestris*, *C. crocoides* e *C. xiphioides*. Verificou-se que a implementação de sequências, em especial do gene *matK*, como marcadores DNA “barcode” em *Calydorea* é possível, porém havendo a necessidade de aumento do número de acessos para melhor caracterização das variabilidades intra e interespecíficas. A inclusão de dados de trechos com alta variabilidade, como o ITS e o espaçador *psbA-trnH* poderá ser muito útil na resolução da politomia das espécies do Planalto Sul-Brasileiro e na discriminação das demais espécies do gênero.

Palavras chave: *Calydorea*, DNA “barcode”, Iridaceae

Abstract

This study evaluated the variability of five sequences of the plastid genome (*matK*, *rbcL*, *rps4*, *rps16* e *trnL-F*) in different accessions of 12 species of *Calydorea* and 2 of *Cardiostigma*, for possible use of these markers as DNA “Barcode”. Cluster analysis with Neighbor-Joining demonstrated that the power of discrimination *matK* gene was the highest (55%), followed by *rps16* com (45%). Four groups of species were evident in all topologies, with minor variations: i) the group containing *Cardiostigma*; ii) the second containing *Calydorea amabilis*, *C. gardneri*, *C. pallens* e *C. undulate*; iii) the third with *Calydorea alba*, *C. azurea* and *C. minima*; and iv) the fourth group containing a polytomy between *Calydorea approximata*, *C. basaltica*, *C. campestris*, *C. crocoides* e *C. xiphioides*. The introduction of sequences, in particular those from gene *matK* as DNA “barcode” marker in *Calydorea* is possible, but there is the need to increase the number of accesses to better characterization of the intra and interspecies variabilities. The inclusion of data from segmentes with high variability, such as ITS and the spacer *psbA-trnH* may be helpful in resolving the polytomy of species from South Brazilian Plateau and the discrimination of others species.

Key words: *Calydorea*, DNA barcode, Iridaceae

2.1 Introdução

O conceito de DNA barcode (código de barras de DNA) refere-se à utilização de sequências de DNA padronizadas como um recurso para a identificação de espécies (CBOL 2009). O *Consortium for Barcode of Life* (CBOL), é uma iniciativa internacional estabelecida em 2004, formado por pesquisadores de mais de 50 países, que visa desenvolver uma

ferramenta global para a identificação das espécies e tem coordenado a busca do DNA barcode em plantas (CBOL 2009).

Para a discriminação de espécies animais, a região com 648 pares de base (pb) do genoma mitocondrial que codifica para a subunidade c do citocromo oxidase 1 (CO1), tem provado ser altamente eficiente na identificação de espécies de aves, borboletas, peixes, dípteros e diversos outros grupos animais (Herbert *et al.* 2003; CBOL 2009; Hollingsworth 2011). Por outro lado, o uso de um limitado trecho do genoma como sendo a solução para a identificação precisa de espécies tem recebido críticas. De acordo com Will & Rubinoff (2004), a simples análise fenética de similaridade dos dados de DNA barcode é reducionista, desconsiderando uma visão integrada, que deve abranger a filogenia, aspectos morfológicos funcionais, comportamento e ecologia na definição de uma espécie. Meier *et al.* (2006) consideram que propostas simplistas baseadas unicamente em sequências de DNA geram pseudo-soluções para os reais problemas biológicos, sendo necessária uma abordagem taxonômica com todas as evidências disponíveis.

O gene CO1 é incapaz de discriminar espécies de plantas devido à baixa taxa evolutiva do genoma mitocondrial no reino vegetal. A busca de um gene ou de uma associação de genes com capacidade similar de discriminação em plantas tem sido efetuada no genoma plastidial (Herbert *et al.* 2003; Pennisi 2007; CBOL 2009; Barcode of Life 2012).

Segundo Kress *et al.* (2005), os critérios básicos para uma região candidata ao DNA barcode em plantas são: i) significativo nível de variabilidade e divergência interespecífica; ii) apresentar regiões flangeadoras conservadas para o desenvolvimento de *primers* universais; e iii) apresentar uma sequência relativamente curta, de fácil amplificação. O CBOL (2009), a partir da análise comparada de três espaçadores intergênicos (*atpF-atpH*, *trnH-psbA*, *psbK-psbI*) e quatro genes (*matK*, *rbcL*, *rpoC* e *rpoC1*) candidatos ao DNA barcode, recomenda a

utilização das sequências combinadas *matK+rbcL* como “core barcode”. A indicação dessa combinação foi baseada no poder discriminatório de 72% das 550 espécies avaliadas e na solução pragmática para o conflito de escolhas entre universalidade, qualidade da sequência, discriminação e custo (CBOL 2009).

No entanto, trabalhos mais recentes mostram que o espaçador ITS2 (espaçador interno transcrito do DNA ribossomal) é uma região com potencial para compor o “core barcode” (Chen *et al.* 2010; Li *et al.* 2011; Pang *et al.* 2011). Como exemplo do poder discriminatório de ITS2, Chen *et al.* (2010) testaram a capacidade discriminatória do ITS2 na identificação de 4.800 espécies medicinais, pertencentes a 753 gêneros e obtiveram sucesso na identificação de 92,7% em nível específico. Li *et al.* (2011) realizaram uma análise comparativa com 6.286 indivíduos pertencentes a 1.757 espécies de espermatófitas, para verificar a eficiência e universalidade dos genes *rbcL* e *matK*, do espaçador *trnH-psbA* e do ITS. Estes autores verificaram que a região ITS apresentou o mais alto poder de discriminação nos grupos onde foi possível seqüenciá-lo. Pang *et al.* (2011) aplicaram técnicas de DNA barcode testando quatro regiões (*rbcL*, *matK*, *rpoC1* e ITS2) para identificação de 893 espécies representando 96 gêneros de Rosaceae, e verificaram que o ITS2 discriminou 78% das espécies e 100% dos gêneros.

Hollingsworth (2011), com base na análise do trabalho de Li *et al.* (2011), que comentou que, devido ao desconhecimento de sequências de DNA em muitos gêneros de plantas, além da ausência de um banco de dados robusto que possibilite indicar genes ideais para DNA barcode, ainda é preciso melhoramentos técnicos e esforço para agrupar novas sequências.

A família Iridaceae possui cerca de 2.000 espécies incluídas em 66 gêneros (Goldblatt & Manning 2008), sendo bem representada no sul da África e nas regiões temperadas e de

altitude da Américas Central e do Sul (Goldblatt & Manning 2008). No Brasil ocorrem 18 gêneros e 160 espécies (64 endêmicas), de acordo com Eggers *et al.* (2011). Porém, muitas espécies estão escassamente estudadas e pouco conhecidas, devido ao seu curto período de florescimento, à dificuldade de herborização e posterior preservação de estruturas importantes para a definição das espécies (Eggers 2008).

Os estudos filogenéticos com uso de sequências de DNA, em nível de gênero, na família Iridaceae até o presente momento são os seguintes: *Iris* L. (Makarevicht *et al.* 2003; Wilson 2004, 2011), *Crocus* L. (Petersen *et al.* 2008), *Moraea* Mill. (Goldblatt 2002), *Pseudotrimezia* R.C. Foster (Lovo 2009) e *Sisyrinchium* L. (Chauveau *et al.* 2011). O único trabalho realizado até o momento com DNA barcode em Iridaceae foi o de Seberg & Petersen (2009), que ao tentar verificar quantos trechos do genoma são necessários para identificar as espécies de *Crocus*, encontraram um poder discriminatório de 92% com a combinação *ndhF* + *matK* + *trnH-psbA* + *rps8-rpl36*. Os autores afirmaram que a maioria dos testes com DNA barcode em plantas foi realizada para floras locais com relativo sucesso e que ainda há poucos trabalhos com espécies de um único gênero.

Calydorea Herb. é um gênero com 16 espécies, restrito ao continente sul-americano (Goldblatt & Manning 2008). Dez espécies de *Calydorea* foram citadas para o Brasil (Eggers *et al.* 2011), principalmente em ambientes campestres. São espécies herbáceas, bulbosas, de pequeno porte, com folhas lineares. As flores são frágeis, de curta duração e depois de secas tornam-se difícil a visualização das estruturas importantes à identificação. Em relação à taxonomia do gênero, ainda existem dificuldades na delimitação de algumas espécies. A construção de perfis de DNA “barcode” para a identificação de espécies de Iridaceae sul-americanas é útil devido à dificuldade de separação de táxons morfológicamente próximos.

O presente trabalho visa analisar a variabilidade das sequências dos genes *matK*, *rbcL*, *rps4*, *rps16* e do espaçador *trnL-F* do genoma plastidial de diferentes acessos de

espécies de *Calydorea* e de duas espécies de *Cardiostigma* Baker, a fim de verificar a possibilidade de seu uso como marcadores DNA barcode.

2.2 Materiais e métodos

Material vegetal

Foram amostrados 94 acessos pertencentes a 12 espécies de *Calydorea* e duas espécies de *Cardiostigma*. A análise do *matK* e *rps16* contou com 16 acessos; a análise do *rps4* e *trnL-F* contou com 15 acessos e a análise do *rbcL* contou com 32 acessos (ver Tabela 1).

As espécies *Cardiostigma longispatha* (Herb) Baker e *C. mexicana* (Goldblatt & Henrich) Ravenna foram incluídas em todas as análises com o intuito de verificar a sua proximidade das sequências analisadas em relação àquelas do gênero *Calydorea*, pois até recentemente eram incluídas nesse gênero. A Tabela 1 apresenta a relação dos acessos e das espécies avaliadas.

As amostras de material vegetal para extração de DNA foram provenientes de coletas a campo, bem como de espécimens cultivados na coleção viva do Jardim Botânico de Porto Alegre da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (JB/FZB), além de material cedido pelo Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS). Amostras de DNA de *C. azurea*, *C. minima*, *C. pallens* e *C. undulata* foram provenientes do banco de DNA do Royal Botanic Garden of Kew (Inglaterra) e duas amostras de *Calydorea* cf. *gardneri* foi enviada pelo HUEFS (Tabela 1).

Tabela 1: Relação das espécies e dos acessos incluídos na análise e respectivos códigos dos coletores.). Acrônimos: ICN = Instituto e Ciências Naturais – Universidade Federal do Rio Grande do Sul; JBPA = Jardim botânico de Porto Alegre; RBGK = Royal Botanic Garden of Kew; UPSBG = Université Paris Sud Botanical Garden.

Espécie / Acessos	Trechos amostrados				
(1) <i>Calydorea alba</i> Roitman & Castillo					
Acessos	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>rps4</i>	<i>rps16</i>	<i>trnL-F</i>
AITA 45 A, Brasil, RS, Barra do Quaraí (ICN)		02			
AITA 45 M, Brasil, RS, Barra do Quaraí (ICN)		02			
Eggers & Souza-Chies 519, Brasil, RS, Uruguaiana, (ICN)		x			
Eggers & Souza-Chies 516, Brasil, RS, Quaraí (ICN)		x			
(SP522) Brasil: Rio Grande do Sul (JBPA)	x	x	x	x	x
(2) <i>Calydorea amabilis</i> (Ravenna) Goldblatt & Henrich					
(SP 503) Brasil: Rio Grande do Sul (JBPA)	x	x	x		x
JB, Brasil: Rio Grande do Sul (JBPA)		x		x	
(3) <i>Calydorea approximata</i> R.C. Foster					
Eggers & Souza-Chies 249, Brasil, Palmeira, Paraná (ICN)		X			
(SP503) Brasil: Rio Grande do Sul (JBPA)		X			
(SP516) Brasil: Paraná (JBPA)	x	X	x	x	x
(SP525) Brasil: Rio Grande do Sul (JBPA)	x	X	x	x	x
(4) <i>Calydorea azurea</i> Klatt					
(SP577) DNA Bank Kew ID 30880 Argentina: Entre Ríos	x	X		x	
(5) <i>Calydorea basaltica</i> Ravenna					
(SP890); Eggers & Souza-Chies 606, Brasil, Paraná (ICN).	x	x	x	x	x
(6) <i>Calydorea campestris</i> (Klatt) Baker					
Eggers & Souza-Chies 218, Brasil, RS, São José dos Ausentes (ICN)		x			

Tabela 1: Continuação

Espécie / Acessos	Trechos amostrados				
Eggers & Souza-Chies 330, Brasil, Paraná, Campo Largo (ICN)	03				
Eggers & Souza-Chies 324, Brasil, Paraná, Tijucas do Sul (ICN)	x				
(SP526) Brasil, Paraná (JBPA)	x	x	x	x	x
(7) <i>Calydorea crocoides</i> Ravenna					
Eggers & Souza-Chies 218 (ICN)	x				
(SP513) Brasil: Rio Grande do Sul (JBPA)	x	x	x	x	x
(SP515) Brasil: Rio Grande do Sul (PABG)	x	x	x	x	x
(8) <i>Calydorea gardneri</i> Baker					
HUEFS 1875	x				
HUEFS 4	x				
(9) <i>Calydorea minima</i> Roitman & Castillo					
(SP578) DNA Bank Kew ID 30874 Argentina: Corrientes	x	x	x	x	x
(10) <i>Calydorea pallens</i> Griseb					
(SP547) Golbblatt 9579 (K), DNA Bank Kew ID I-20	x	x	x	x	x
AJ580606 Genbank	x	x	x	x	x
(11) <i>Calydorea undulata</i> Ravenna					
(SP576) DNA Bank Kew ID 30874	x	x	x	x	x
(12) <i>Calydorea xiphioides</i> (Poepp.) Espinosa					
(SP875), Chile: Region VII (UPSBG)	x	x	x	x	x
(1) <i>Cardiostigma longispatha</i> (Herb.) Baker					
(SP548); México, Michoacán: DNA Bank Kew ID 22039	x	x	x	x	x
(2) <i>Cardiostigma mexicana</i> (Foster) Goldblatt & Henrich					
(SP546), América do Sul, DNA Bank Kew ID 2184	x	x	x	x	x
Sub-Totais	16	32	15	16	15
Total geral: 94 acessos					

Laboratórios envolvidos na pesquisa

As rotinas laboratoriais de extração e ampliações dos trechos estudados foram realizadas no Laboratório Ecologie, Systématique et Evolution (LESE) da Université Paris-Sud em Orsay, França, e no Laboratório de Sistemática Molecular (LSM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.

A purificação e o sequenciamento das amostras amplificadas no LESE foram realizadas no Genoscope, Centre National de Séquençage, em Evry, França (WWW.genoscope.fr).

Extração do DNA vegetal

O DNA total das amostras processadas no Laboratório de Sistemática Molecular foi extraído pelo método CTAB (Doyle e Doyle, 1987), a partir de folhas secas mantidas em sílica-gel e maceradas com esferas metálicas por 3 min em macerador Qiagen TissueLyser®. Para a extração foram utilizados tubos eppendorf de 2 ml contendo o material macerado e o tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M; CTAB 2%; EDTA 20mM; PVP 1%; proteinase K 20mg/mL e β -mercaptoetanol 2%). As amostras foram deixadas com a solução de extração em Banho-Maria a 65 °C por 45 min e os tubos foram homogeneizados a cada 10 min invertendo-se os frascos vagarosamente. Após aquecimento as amostras foram deixadas sobre a bancada até atingirem a temperatura ambiente e foi acrescentado 800 μ l de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As amostras foram homogeneizadas em agitador vórtex até ficarem com coloração leitosa e levadas para centrifugação por 10 min a 12.000 rpm. Coletou-se a fase aquosa e foram adicionados metade do volume coletado de acetato de amônio (7,5 M) e um volume igual ao somatório da fase aquosa mais o volume de acetato de amônio, de isopropanol gelado. Os tubos foram homogeneizados e levados ao freezer por um período de 12 h. Após, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 12000 rpm, o sobrenadante foi descartado gentilmente para evitar a perda do *pelet* (precipitado) de DNA,

foi acrescentado 500µl de etanol 70% e as amostras foram novamente centrifugadas por 10 min a 13000 rpm, sendo o etanol descartado ao final da centrifugação. As amostras foram então secas em estufa a 35 °C por 20 min e o DNA foi ressuspensionado em tampão TE (50-100 µl), conforme o tamanho da amostra e então guardados em freezer - 20 °C.

As amostras de DNA proveniente do Kew DNA Bank, foram extraídas a partir de CTAB-clorofórmio, com precipitação por etanol seguida de diálise e lavagem por gradiente de densidade, sendo as amostras então secas até tornarem-se estáveis à temperatura ambiente e a seguir estocada em ultrafreezer – 80 °C (KEW 2011).

Quantificações do DNA total

As amostras de DNA foram quantificadas com o auxílio de Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 espectrofotômetro. Quantificações em gel de agarose 0,8% também foram realizadas com a finalidade de comparar os valores obtidos com aqueles verificados no Nanodrop, além de fornecer informações acerca da qualidade do DNA extraído.

Amplificação de DNA por PCR e sequenciamento

Os perfis de amplificação para todos os trechos, com indicação de temperaturas e tempo, estão contidos no Apêndice 1. Os inicializadores utilizados na amplificação e sequenciamento, suas respectivas sequências nucleotídicas e fonte bibliográfica estão listados no Apêndice 2 ao final do texto.

Protocolo de amplificação do gene *matK*

Para amplificação do gene *matK*, no Laboratório ESE, foi usado o termociclador PTC-100 MJ-Research, e o protocolo consistiu de desnaturação inicial por 1 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94 °C para desnaturação, 40 s a 53 °C para anelamento, 40 s a 72 °C

para elongação e 5 min a 74 °C para extensão final, em conformidade com o protocolo contido em: <http://kew.org/barcoding/protocols.html>

As ampliações do gene *matK* realizadas no Laboratório de Sistemática Molecular, foram utilizados dois pares de inicializadores, primeiro usou-se o conjunto de *primers matK* F1/R2, e posteriormente a associação *matK* F2/trnK2R. O protocolo de amplificação consistiu de 3 min a 94°C para desnaturação inicial, seguido de 40 ciclos com 1 min para desnaturação, 40 s a 50°C para anelamento, 1 min e 40 s a 72°C para elongação e 5 min para elongação final a 72°C.

As reações de amplificação para os inicializadores F1/R2 consistiram de 1,25 µl de DNA genômico total, dNTP (2 mM), *primers forward e reverse* (2 mM cada), tampão da Taq DNA polimerase (1X), MgCl₂ (3 mM), Taq DNA polimerase (1,25 U), DMSO e H₂O miliq (qsp). Para as reação de amplificação com os *primers* F2/2R, utilizou-se 1 µl de DNA total.

Protocolo de amplificação do gene *rbcL*

Para a amplificação da região *rbcL* foram usados os inicializadores *rbcL-If* e *rbcL-1360r*. O volume total da reação de amplificação foi realizado com 25 µl de volume total, com os seguintes componentes da reação: 1 µl de DNA genômico total, dNTP (1,6 mM), *primers forward e reverse* (1 pMol cada), tampão da Taq DNA polimerase (1X), MgCl₂ (2 mM), Taq DNA polimerase (1,25 U), e H₂O miliq (qsp).

As condições de amplificação para *rbcL* foram as seguintes: 5 min a 94 °C para desnaturação inicial, 40 ciclos com 48 s a 94 °C para desnaturação, 1 min a 60 °C para anelamento, 1 min 30 s a para 72 °C extensão e 10 min a 72 °C para extensão final, com temperatura de espera de 15 °C.

Protocolo de amplificação do gene *rps4*

Para a amplificação do gene *rps4* foram usados os inicializadores *rps4-F* e *trnS-R*. O volume total da reação de amplificação foi 25 µl e foi usado o termociclador OC-IRI56 Machine Applied, com os seguintes componentes da reação: 1 µl de DNA genômico total, dNTP (2 mM), *primers forward e reverse* (2 mM cada), tampão da Taq DNA polimerase (1X), MgCl₂ (3 mM), Taq DNA polimerase (1,25 U), 1 µl de DMSO e H₂O miliq (qsp). As condições da amplificação para *rps4* foram: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial, 40 ciclos com 1 min a 94 °C para desnaturação, 40 s a 56 °C para anelamento, 1 min 40 s para alongação e 5 min a 72 °C para alongação final, com temperatura de espera de 15 °C.

Protocolo de amplificação do íntron do gene *rps16*

Para a amplificação da região *rps16* foram usados os inicializadores *rps16-f* e *rps16r2*. O volume total da reação de amplificação foi 30 µl e foi usado o termociclador PTC-100 MJ-Research, com os seguintes componentes da reação: 1,5 µl de DNA genômico total (~15-50 ng), 100 µM dNTP, *primers forward e reverse* (0,5 µM cada), tampão da Taq DNA polimerase (1X), MgCl₂ (1,5 mM), Taq DNA polimerase (0,2 U) e H₂O miliq (qsp).

As condições da amplificação para *rps16* foram: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial, 40 ciclos com 1 min a 94 °C para desnaturação, 40 s a 58 °C para anelamento, 1 min 30 s para alongação e 5 min a 72 °C para alongação final, com temperatura de espera de 15 °C.

Protocolo de amplificação do espaçador intergênico *trnL-F*

Para a amplificação da região *trnL-F* foram usados os inicializadores *cB49317* e *fA50272*. O volume total da reação de amplificação foi 30 µl e foi usado o termociclador

PTC-100 MJ-Research, com os seguintes componentes da reação: 1,5 µl de DNA genômico total (~15-50 ng), 100 µM dNTP, *primers forward e reverse* (0,5 µM cada), tampão da Taq DNA polimerase (1X), MgCl₂ (1,5 mM), Taq DNA polimerase (0,2 U) e H₂O miliq (qsp).

As condições da amplificação para *trnL-F* foram: 3 min a 94 °C para desnaturação inicial, 40 ciclos com 1 min a 94 °C para desnaturação, 40 s a 56 °C para anelamento, 1 min 40 s para alongação e 5 min a 72 °C para alongação final, com temperatura de espera de 15 °C.

Purificação das amostras amplificadas

As reações de PCR contendo as amostras amplificadas no LSM foram purificadas através de reação enzimática com Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP – 0,75 U) e Exonuclease I (EXO – 2,5 U). Após a adição das enzimas os produtos de PCR foram levados ao termociclador para a reação enzimática, posteriormente foram adicionados os inicializadores *forward e reverse* numa concentração de 3,2 pMol para cada inicializador, além de H₂O miliq (qsp). Todas as amostras foram encaminhadas ao serviço de sequenciamento da Universidade Católica de Brasília.

Alinhamento das sequências nucleotídicas

Todas as regiões genômicas analisadas foram alinhadas com o uso do programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011), utilizando-se os recursos de alinhamento automático MUSCLE e ClustalW e posteriormente editadas manualmente. Os trechos de DNA foram alinhados detectando-se visualmente os polimorfismos devidos às inserções e deleções (*indels*) e às substituições simples de nucleotídeos.

Análise da probabilidade das substituições nucleotídicas

A análise do padrão de substituição nucleotídica, em probabilidades percentuais de transições e transversões, com cálculos das taxas K_1 (transições/transversões) para purinas e K_2 para pirimidinas foram calculadas no programa MEGA5, opção >Models > Compute MCL (Maximum Composite Likelihood) >Transition/Transversion bias, a partir do modelo de substituição Tamura-Nei com indels e dados faltantes desconsiderados. A opção de cálculo dos percentuais de transições e transversões permite estimar o tempo de divergência entre as espécies.

Estimativas das distâncias intraespecífica e interespecífica K2P (Pairwise Distance)

Para a análise de divergência entre sequências nucleotídicas, foram calculadas as distâncias pareadas (Pairwise Distance), apresentadas em percentuais de substituição de bases por sítio, considerando o modelo de substituição de Kimura (K2P) no programa TaxonDNA/SpeciesIdentifier 1.7.8-sy1 (Meier *et al.* 2006).

Estimativas da sobreposição “Overlap” e da separação “DNA barcode Gap” entre as espécies

Os gráficos representativos das divergências percentuais (distância entre pares) foram produzidos a partir dos resultados da opção “Pairwise Summary” apresentados pelo programa TaxonDNA/SpeciesIdentifier 1.7.8-sy1. A distribuição de frequência das distâncias pareadas permite visualizar a sobreposição (overlap) ou a separação (Barcoding Gap) entre as sequências. Os gráficos foram construídos no site ChartTool, ferramenta disponível em: <http://www.onlinecharttool.com/graph.php>.

Para evitar superestimativas no cálculo do “Barcoding Gap”, adotamos o cálculo sugerido por Meier *et al.* (2008), calculado pelo programa TaxonDNA/SpeciesIdentifier 1.7.8-sy1, usando-se o recurso >Distance Analysis e posteriormente o >calculate smallest interspecific/congeneric sequences.

Estimativa do poder de discriminação das sequências de DNA a partir de dendrograma gerado pelo método Neighbor-Joining e Parcimônia

A discriminação de uma espécie através do DNA barcode, com a análise do perfil da espécie no dendrograma gerado pelo método Neighbor-Joining (NJ), levou em consideração dois critérios: a monofilia do táxon, conforme sugerido por Herbert *et al.* (2003) e a sustentação por Bootstrap acima de 60%, conforme Gonzales *et al.* (2009). Também foram consideradas como discriminadas as espécies, sustentadas por Bootstrap > 60%, as espécies com um só acesso que surgiram isoladas no dendrograma.

O poder de discriminação dos trechos genômicos foi calculado em percentuais sobre o total de espécies de *Calydorea* na amostragem, observando-se a topologia no dendrograma NJ produzido no programa MEGA5. Foi gerada uma árvore com os dados combinados do *matK* e *rbcL*, por tratar-se dos genes considerados “barcode core” a partir do método de NJ e da parcimônia. A análise de parcimônia foi feita usando-se o algoritmo “Close-Neighbor-Interchange”, com bootstrap de 1000 replicações e com topologia da árvore contendo ramos colapsados com bootstrap inferior a 60%. Foram feitas comparações entre as topologias produzidas, a fim de verificar as possíveis diferenças no poder de discriminação entre elas.

Teste de Identificação das espécies usando as ferramentas MEGABLAST-GenBank e BOLD –IDS.

Para testar a possibilidade de identificação das espécies a partir das sequências obtidas, estas foram submetidas ao alinhamento por BLAST - Basic Local Alignment Search

Tool, com a opção “Nucleotide MEGABLAST (Highly similar sequences)”, com algoritmos definidos por Zhang *et al.* (2000) dispostos na base de dados GenBank em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

As sequências dos genes *rbcL* e *matK* também foram submetidas a buscas no BOLD – Barcode of Life Data Systems v2.5 Identification System (IDS) – Plant Identification-, em http://www.boldsystems.org/views/idrequest_plants.php. (Ratnasingham *et al.* 2007).

A relação dos registros de *Calydorea* e *Cardiostigma* contidos no GenBank e Bold estão apresentados no Apêndice 3 ao final do texto.

2.3 - Resultados

Análise das sequências do gene *matK*

O gene *matK* nas espécies estudadas é composto por 1864 pb, com 1747 (93,7%) caracteres conservados, 115 (6,2%) caracteres variáveis, e 85 (4,5%) caracteres filogeneticamente informativos.

As frequências nucleotídicas do gene *matK* são: 30,39 % de adenina (A), 38,09 % de timina (T), 14,22% de citosina (C), e 17,31% de guanina (G). A razão das taxas de transições/transversões para purinas é $k_1 = 14,83$, e para pirimidinas é $K_2 = 7,4$. Transições perfazem 84,27% das substituições, enquanto que transversões somam 15,28% (Tabela 2).

Salientamos que os dados referentes às transições e transversões extraídos a partir da análise de distância K2P, não foram utilizados diretamente neste trabalho, pois os algoritmos de análise para DNA “barcode” usualmente empregados, utilizam, na maioria dos casos, os valores percentuais de similaridade e dissimilaridades. Não obstante, as tabelas foram

mantidas para uma utilização posterior em cálculos de estimativa de tempo divergência entre os táxons envolvidos no trabalho.

Tabela 2: Probabilidade de substituições nucleotídicas (linhas x colunas), em valores percentuais, calculados para o gene *matK* de 14 acessos de *Calydorea* e dois acessos de *Cardiostigma*, de acordo com o modelo de substituição de Tamura-Nei (2004). Valores em negrito indicam transições, em itálico transversões, cálculos realizados no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

	A	T	C	G
A	-	3	<i>1,36</i>	16,59
T	2,39	-	10,07	<i>1,12</i>
C	2,39	22,16	-	<i>1,12</i>
G	35,45	3	<i>1,36</i>	-

A distribuição das frequências das distâncias pareadas, calculadas a partir do número de substituições de bases por sítio entre as sequências, utilizando-se o modelo Kimura 2P (Kimura, 1980) está ilustrada na Figura 1. Observa-se uma sobreposição de 21,34% das distâncias interespecíficas na classe 0,0 – 0,5%. Considerando as demais distâncias interespecíficas, 78,6% estão em categorias superiores àquelas intraespecíficas (Fig. 1).

A distância K2P média, calculada para as sequências do gene *matK* é de 0,0016 (+/- 0,004).

A análise de agrupamento utilizando-se o método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987), produzida no programa MEGA5 é apresentada na Fig. 2. Considerando os critérios de monofilia da espécie e valores de Bootstrap acima de 60%, ficaram distinguíveis as espécies de *Calydorea undulata*, *C. pallens*, *C. amabilis*, *C. azurea*, *C. xiphioides* e *C. crocoides*. No caso das espécies reunidas no agrupamento contendo *C. approximata*, *C. campestris* e *C. basaltica* o valor de bootstrap é baixo (55%) e apresentou uma politomia, portanto indistinguíveis através da variação do gene. O poder discriminatório do *matK*, considerando

as 11 espécies de *Calydorea* foi de 55% (6/11). As espécies de *Cardiostigma* encontram-se isoladas num clado com bootstrap 100%.

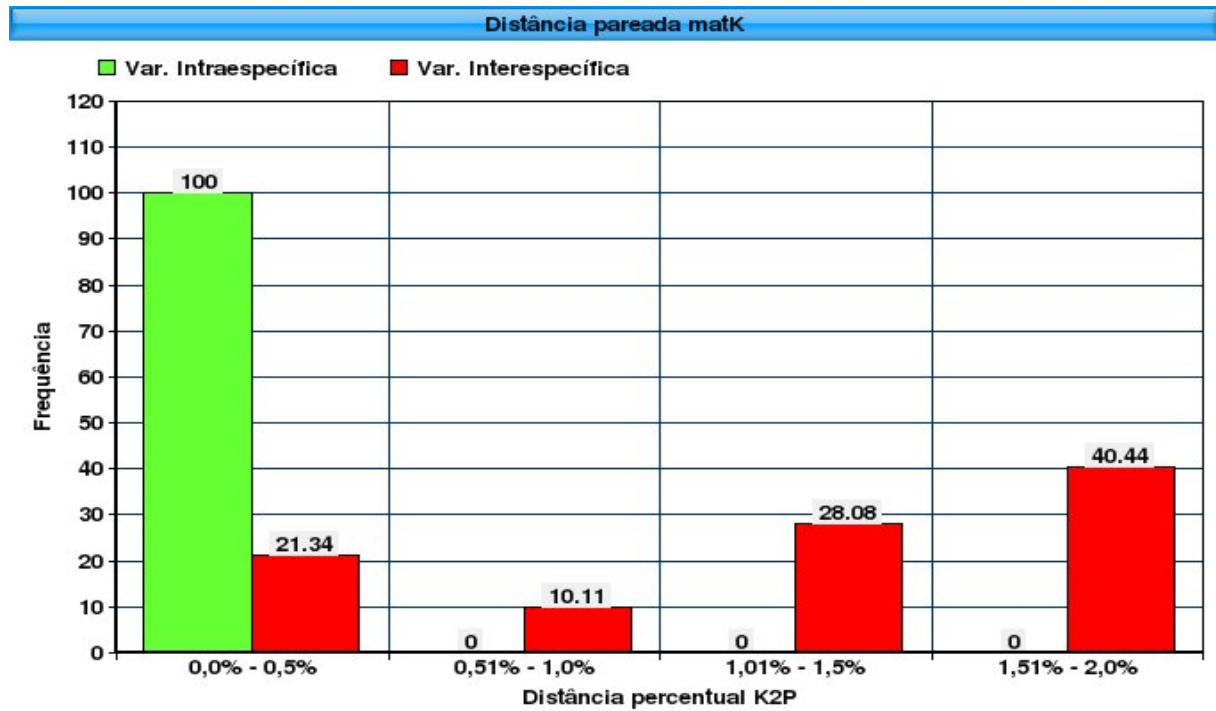


Figura 1: Distância pareada entre as sequências do gene *matK* de 14 acessos de *Calydorea* e dois acessos de *Cardiostigma*. A barra cinza indica distâncias intraespecíficas, as barras pretas indicam as distâncias interespecíficas. Números acima da barra indicam a frequência absoluta. Distâncias calculadas no programa TaxonDNA/SpeciesIdentifier 1.7.8-syl (Meier *et al.* 2006).

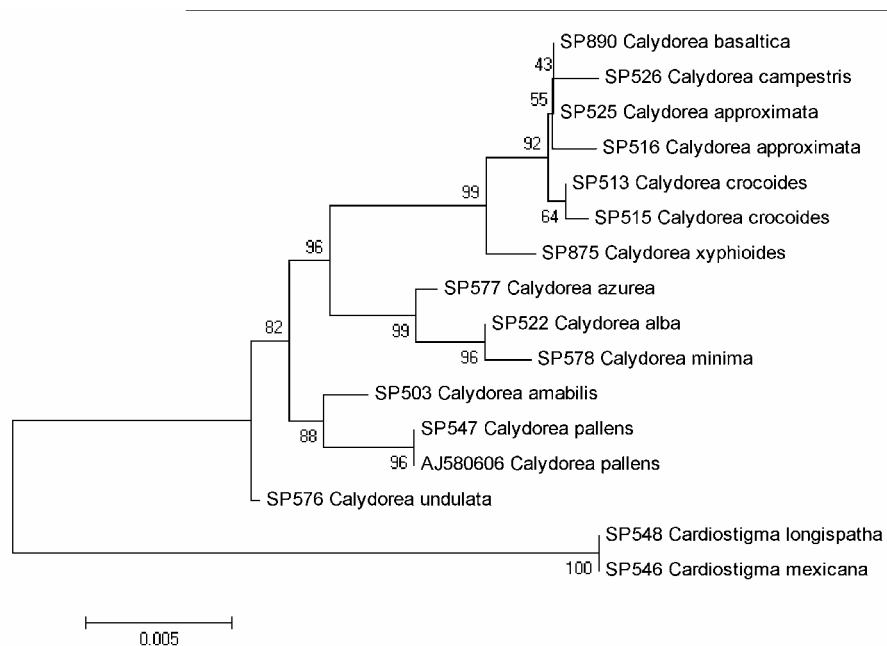


Figura 2: Análise de agrupamento inferida a partir do método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) com dados do *matK*. A árvore apresenta a soma do comprimento dos ramos = 0,0582. Os números próximos dos cladogramas indicam os valores percentuais do teste de Bootstrap com 1000 repetições. As distâncias evolutivas foram inferidas usando-se o método K2P (Kimura, 1980), expressas em número de substituições de bases por sítio. Árvore produzida no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

Análise das sequências do gene *rbcL*

O gene *rbcL* apresentou uma extensão total de 1402 pb nas espécies de *Calydorea* analisadas. Os sítios conservados somam 1361 pb (97,1%), 41 (2,92%) são sítios variáveis, e 31 (2,21%) são sítios filogeneticamente informativos.

As frequências nucleotídicas do gene *rbcL* nas espécies estudadas são: 27,51% de (A), 28,62% de T, 24,47 de C, e 19,4% de G. A razão das taxas de transições/transversões para purinas é $k_1 = 1,4$ e para pirimidinas é $K_2 = 2,6$. Transições somam 49,55% das substituições e transversões 50,44% (Tab. 3).

Tabela 3: Probabilidade de substituições nucleotídicas (linhas x colunas), em valores percentuais, calculados para 14 acessos de *Calydorea* e dois acessos de *Cardiostigma* do gene *rbcL*, de acordo com o modelo de substituição de Tamura-Nei (2004). Valores em negrito indicam transições em itálico transições, cálculos realizados no programa MEGA5.

	A	T	C	G
A	-	7,22	4,89	8,56
T	6,94	-	12,67	6,17
C	6,94	18,7	-	6,17
G	9,62	7,22	4,89	-

Verifica-se uma sobreposição de 14,6% das distâncias na categoria 0% e 77% das distâncias encontram-se na faixa de 0,1-1% de divergência (Fig. 3).

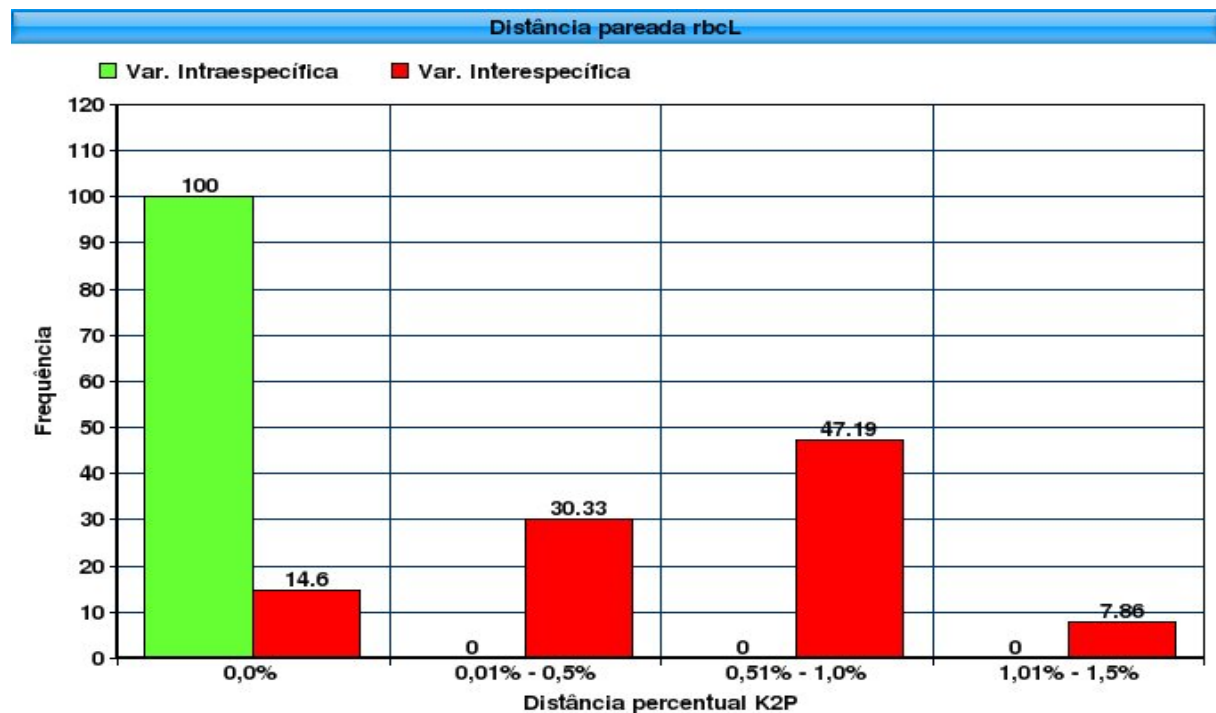
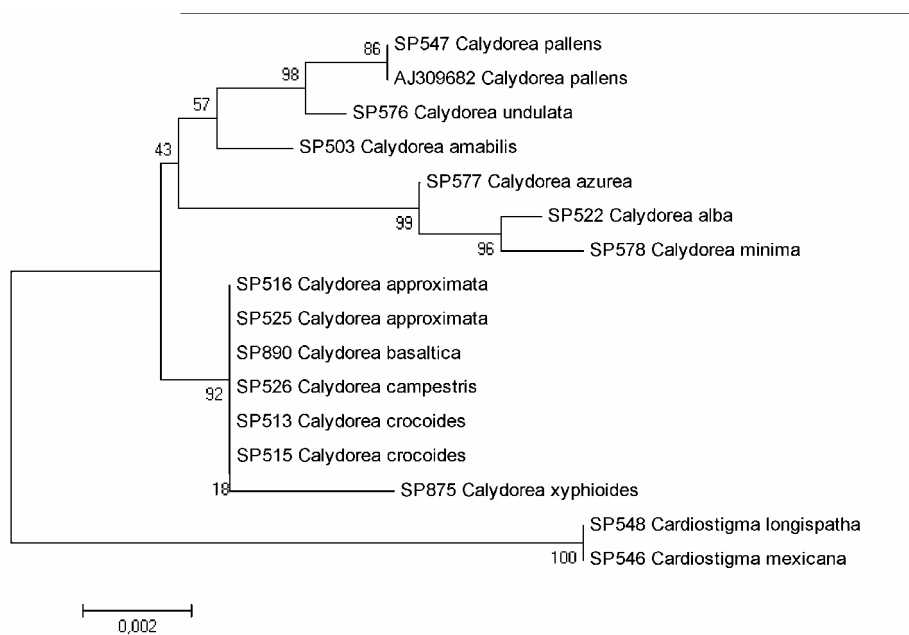


Figura 3: Distância pareada entre as sequências do gene *rbcL* de 14 acessos de *Calydorea* e dois acessos de *Cardiostigma*. A barra cinza indica as distâncias intraespecíficas, as barras pretas as distâncias interespecíficas. Números acima da barra indicam a frequência absoluta. Distâncias calculadas no programa TaxonDNA/SpeciesIdentifier 1.7.8-syl (Meier *et al.* 2006).

Na análise de agrupamento Neighbor-Joining gerada a partir dos dados do gene *rbcL*, percebe-se um baixo poder discriminatório para as espécies de *Calydorea*, onde somente *C. azurea*, *C. undulata* e *C. pallens* podem ser discriminadas (Fig 4). A politomia *C. crocoides*, *C. campestris*, *C. basaltica* e *C. approximata*, associada à *C. xiphioides*, contribuíram para reduzir o poder discriminatório do gene *rbcL* para apenas 33% das espécies (4/12). As espécies de *Cardiostigma* estão reunidas num clado com sustentação de 100%, isoladas das demais espécies de *Calydorea*. A distância K2P média para o *rbcL* é de 0,008 (+/-



0,001).

Figura 4: Análise de agrupamento inferida a partir do método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) para o gene *rbcL*. A árvore ótima apresenta a soma do comprimento dos ramos = 0,0320. Os números próximos dos cladogramas indicam os valores do teste de Bootstrap com 1000 repetições. As distâncias evolutivas foram inferidas usando-se o método K2P (Kimura, 1980), expressas em número de substituições de bases por sítio. Árvore produzida no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

A partir dos dados iniciais de *rbcL* foram acrescentadas 16 novas sequências parciais com 548 pb (início na base 64 e término na base 611 do alinhamento inicial), com o intuito de aumentar o número de acessos por espécie. O dendrograma apresentado na Figura 4A é o resultado da análise conjunta destes dados.

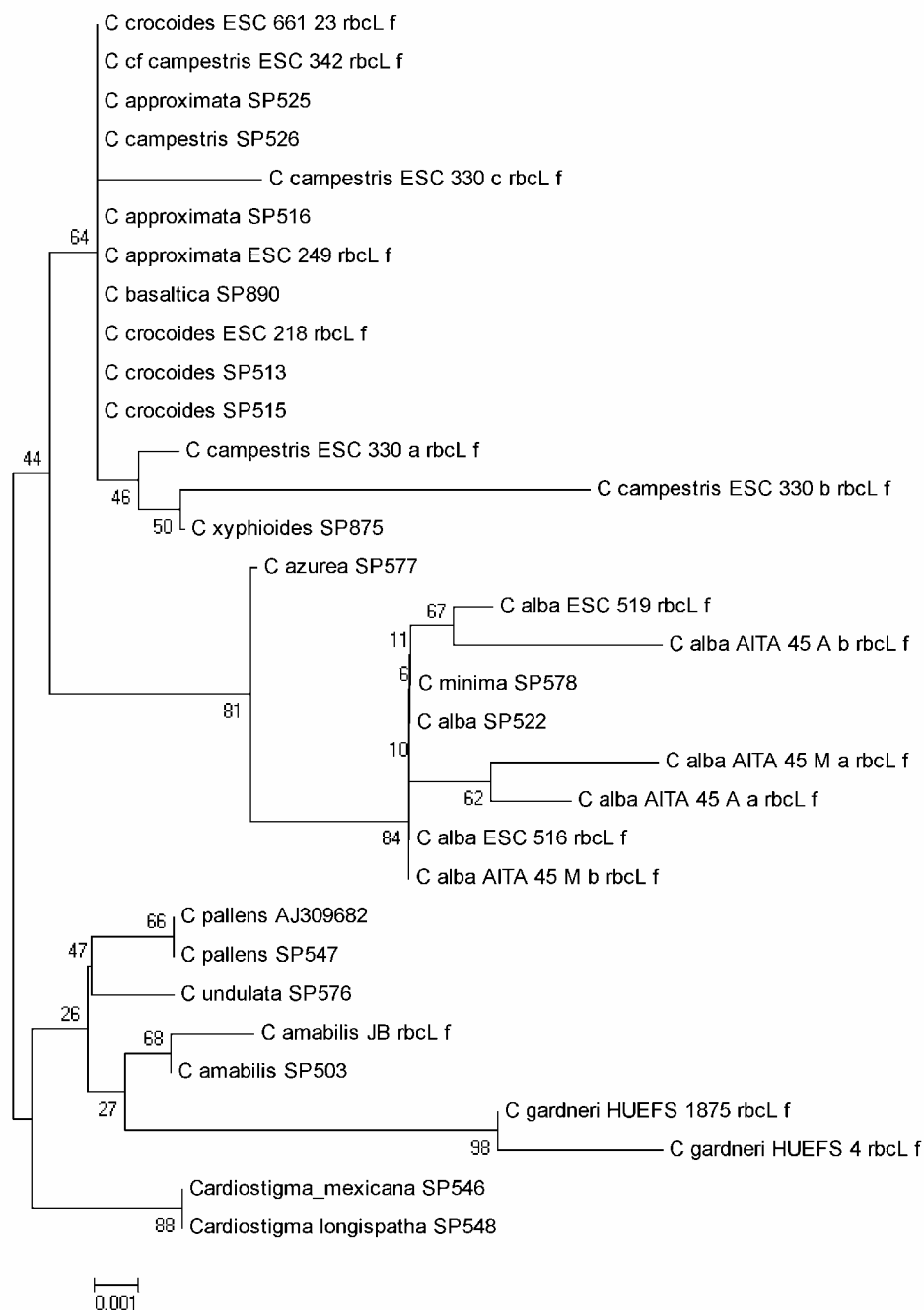


Figura 4A: Análise de agrupamento inferida a partir do método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) para 32 acessos do gene *rbcL*. A árvore ótima apresenta a soma do comprimento dos ramos = 0,0318. Os números próximos dos cladogramas indicam os valores do teste de Bootstrap com 1000 repetições. As distâncias evolutivas foram inferidas usando-se o método K2P (Kimura, 1980), expressas em número de substituições de bases por sítio. Árvore produzida no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

Análise das sequências do gene *rps4*

O gene *rps4* apresentou uma extensão total de 952 pb, sendo 822 pb (86,3%) são sítios conservados, 97 (10,2%) são sítios variáveis, e 92 (8,9%) são sítios filogeneticamente informativos.

As frequências nucleotídicas do gene *rps4* são: 34,38% (A), 28,06% (T), 19,82 % (C), e 17,74% (G). As purinas perfazem 42,12%, e as pirimidinas 47,88%. A razão nas taxas de transições/transversões para purinas é $K_1= 0,867$ e para pirimidinas é $K_2= 1,033$. Transições somam 32,05 % das substituições, transversões perfazem 67,96%, (Tab. 4).

Tabela 4: Probabilidade de substituições nucleotídicas (linhas x colunas), em valores percentuais, calculados para 14 acessos de *Calydorea* e dois acessos de *Cardiostigma* do gene *rps4*, de acordo com o modelo de substituição de Tamura-Nei (2004). Valores em negrito indicam transições, em itálico transversões, cálculos realizados no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

	A	T	C	G
A	-	<i>9,54</i>	<i>6,03</i>	5,84
T	<i>11,68</i>	-	6,23	<i>6,73</i>
C	<i>11,68</i>	9,85	-	<i>6,73</i>
G	10,13	<i>9,54</i>	<i>6,03</i>	-

A distribuição de frequência das distâncias pareadas para o gene *rps4* é peculiar quando comparada com *matK* e *rbcL*, pois apresenta menor sobreposição (4,49%), e 22% dos valores de divergência interespecífica estão nas classes entre 9% - 11%, ou seja, entre duas e dez vezes maior que as demais divergências interespecíficas no *rps4*, evidenciando que algumas regiões são bastante divergentes dentro do gene (Fig. 5). A distância K2P média para *rps4* é de 0,01 (+/- 0,005).

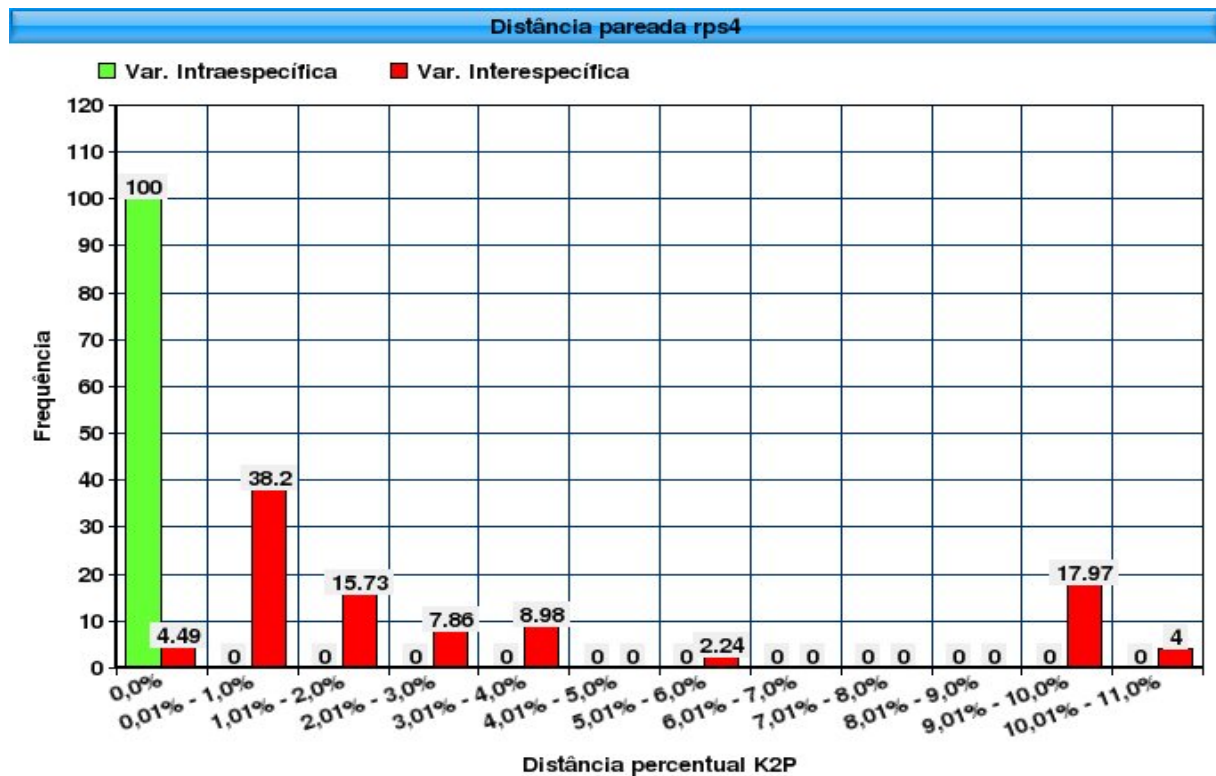


Figura 5: Distância pareada entre as sequências do gene *rps4* de 14 acessos de *Calydorea* e dois acessos de *Cardiostigma*. A barra verde indica as distâncias intraespecíficas, as barras pretas indicam as distâncias interespecíficas. Números acima da barra indicam a frequência absoluta. Distâncias calculadas no programa TaxonDNA/SpeciesIdentifier 1.7.8-sy1 (Meier *et al.* 2006).

A análise de Neighbor-Joining com base no gene *rps4* apresenta duas politomias reunindo as espécies de *Calydorea*, a primeira composta por *C. approximata*, *C. basaltica*, *C. campestris* e *C. crocoides*, e a segunda composta por *C. minima* e *C. undulata*. O valor de Bootstrap, em mais da metade dos casos, é inferior a 60%. Considerando as politomias e percentuais de bootstrap baixos, o poder discriminatório do gene *rps4*, neste caso, não é significativo (Fig. 6).

As espécies de *Cardiostigma*, isoladas das demais, constituem um clado muito bem sustentado com bootstrap de 97%.

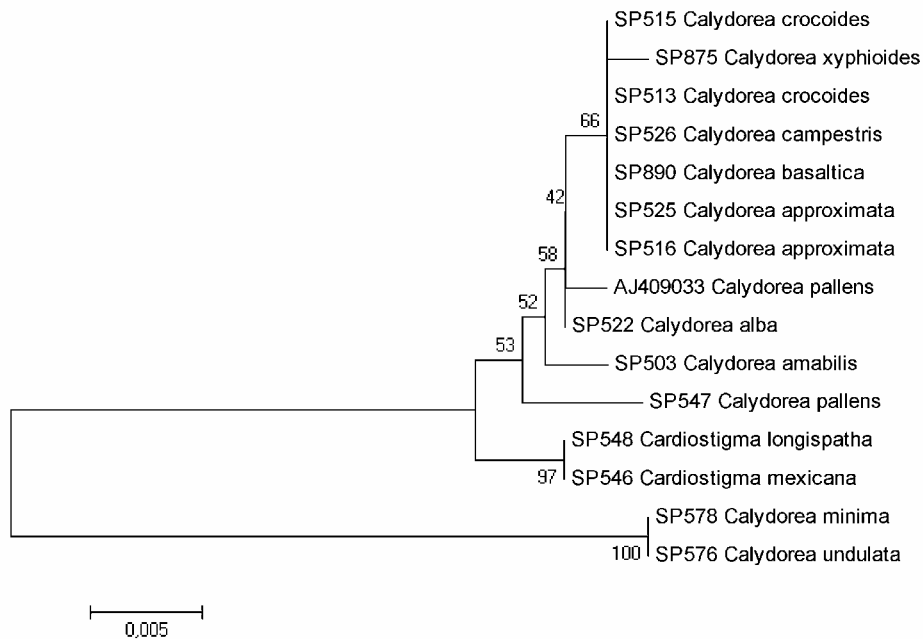


Figura 6: Análise de agrupamento inferida a partir do método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) para o gene *rps4*. A árvore ótima apresenta a soma do comprimento dos ramos = 0,0709. Os números próximos dos ramos indicam os valores do teste de Bootstrap com 1000 repetições. As distâncias evolutivas foram inferidas usando-se o método K2P (Kimura, 1980), expressas em número de substituições de bases por sítio. Árvore produzida no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

Análise das sequências do íntron do gene *rps16*

O íntron do gene *rps16* nas espécies de *Calydorea* avaliadas apresentou uma extensão total de 898 pb, com 858 (95,54%) sítios conservados, 39 sítios variáveis (4,34%), 29 (3,23%) sítios filogeneticamente informativos.

As frequências nucleotídicas do íntron do gene *rps16* são: 36,53% (A), 31,88% (T), 17,56 % (C), 14,02 % (G). Purinas perfazem 50,55%, pirimidinas 49,45% do total das bases.

A razão das taxas de transições/transversões $k_1 = 2,04$ e $k_2 = 4,71$. Transições somam 62,05%, enquanto que as transversões somam 37,94% dos eventos de substituições (Tab 5).

Tabela 5: Probabilidade de substituições nucleotídicas (linhas x colunas), em valores percentuais, calculados para 14 acessos de *Calydorea* e dois acessos de *Cardiostigma* do gene *rps16*, de acordo com o modelo de substituição de Tamura-Nei (2004). Valores em negrito indicam transições, em itálico transversões, cálculos realizados no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

	A	T	C	G
A	-	<i>6,05</i>	<i>2,66</i>	6,81
T	<i>6,93</i>	-	12,55	<i>3,33</i>
C	<i>6,93</i>	28,53	-	<i>3,33</i>
G	14,16	<i>6,05</i>	<i>2,66</i>	-

As distribuições de frequências das distâncias pareadas no gene *rps16* indicaram uma sobreposição de 11,23% na classe 0%. A distância K2P média para o gene *rps16* é de 0,011 (+/- 0,002) (Fig. 7).

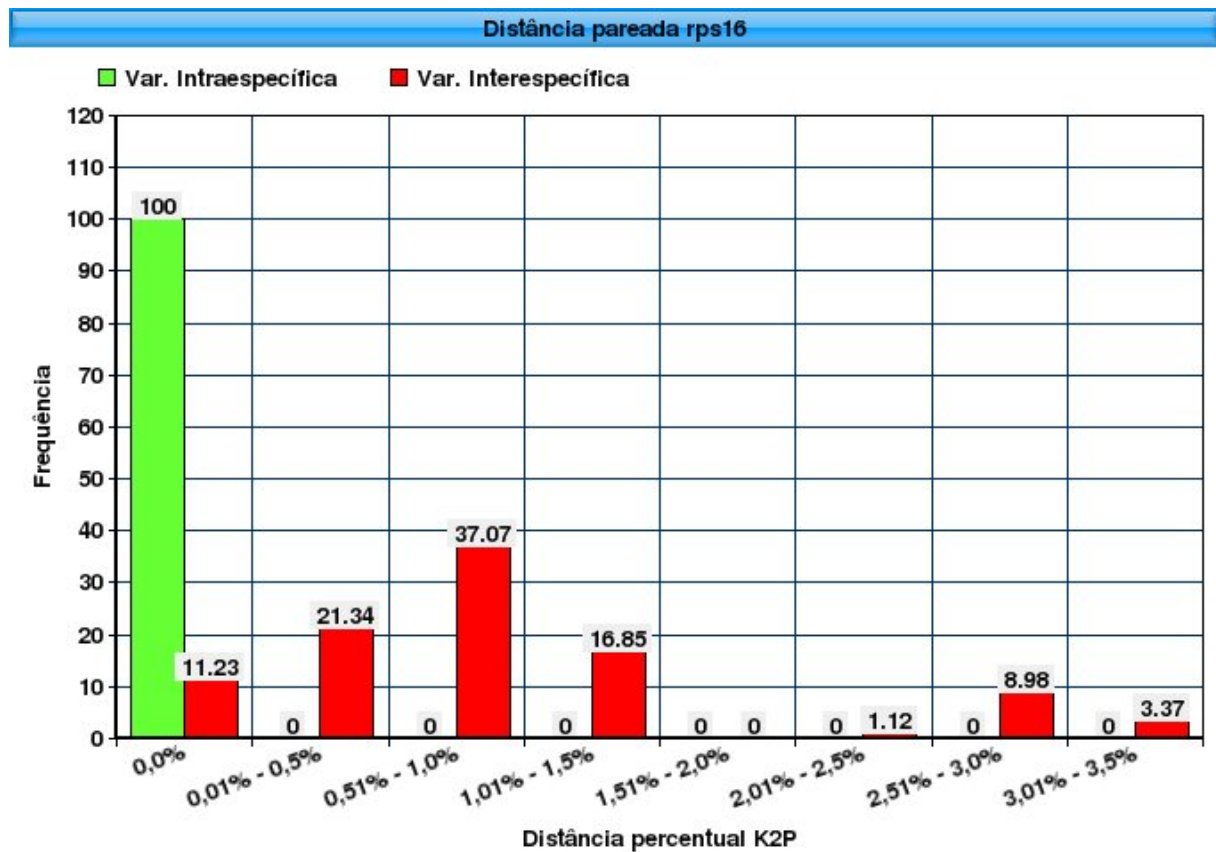


Figura 7: Distância pareada entre as sequências do gene *rps16* de 14 acessos de *Calydorea* e dois acessos de *Cardiostigma*. A barra cinza indica as distâncias intraespecíficas, as barras pretas indicam as distâncias interespecíficas. Números acima da barra indicam a frequência absoluta. Distâncias calculadas no programa TaxonDNA/SpeciesIdentifier 1.7.8-sy1 (Meier *et al.* 2006).

O dendrograma gerado com dados do íntron do gene *rps16* permite visualizar a discriminação de cinco espécies: *C. approximata*, *C. azurea*, *C. amabilis*, *C. undulata* e *C. pallens*, ou seja, 45% das espécies de *Calydorea* (5/11). O clado que contém *Cardiostigma* é muito bem sustentado (bootstrap 100%) (Fig. 8).

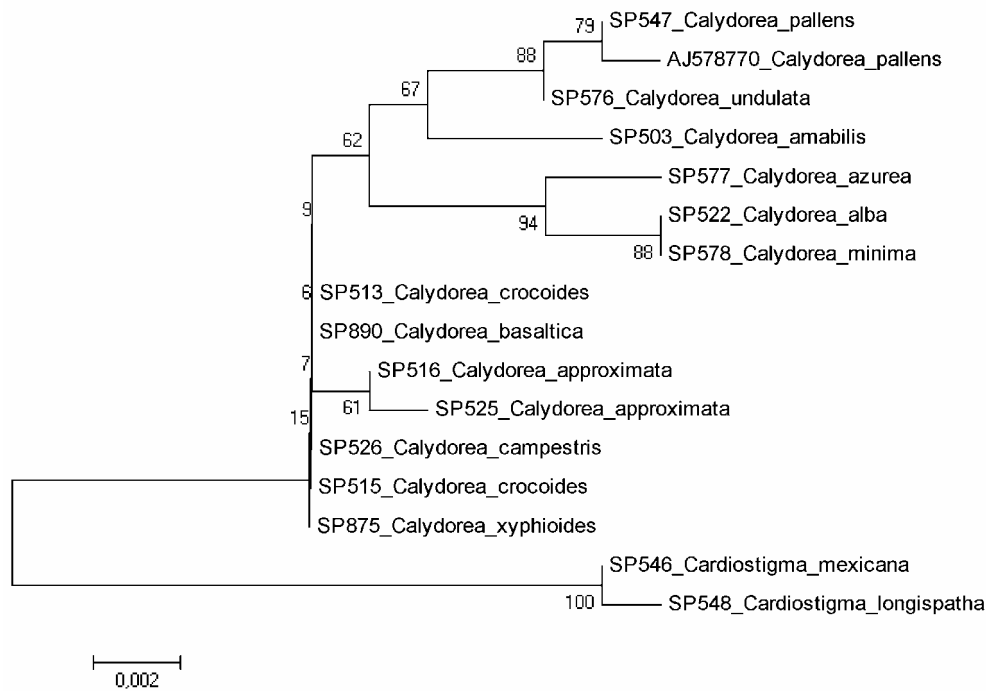


Figura 8: Análise de agrupamento inferida a partir do método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) para o íntron do gene *rps16*. A árvore ótima apresenta a soma do comprimento dos ramos = 0,0454. Os números próximos dos ramos indicam os valores do teste de Bootstrap com 1000 repetições. As distâncias evolutivas foram inferidas usando-se o método K2P (Kimura, 1980), expressas em número de substituições de bases por sítio. Árvore produzida no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

Análise das sequências do espaçador intergênico *trnL-F*

O espaçador *trnL-F* apresentou uma extensão de 1033 pb, com 920 (89,06%) sítios conservados, 57 (5,52%) sítios variáveis e 39 (3,77%) sítios filogeneticamente informativos.

As frequências nucleotídicas do espaçador intergênico *trnL-F* são: 35,42% (A), 29,73% (T), 17,99% (C), e 16,86% (G), com purinas perfazendo 52,28% e pirimidinas 47,72% do total das bases. As razões das taxas de transições/transversões são: k_1 (purinas) =

2,74 e k_2 (Pirimidinas) = 2,7. Transições perfazem 57,65%, enquanto que as transversões somam 42,35 % do total das substituições (Tab. 6).

Tabela 6: Probabilidade de substituições nucleotídicas (linhas x colunas), em valores percentuais, calculados para 14 acessos de *Calydorea* e dois acessos de *Cardiostigma* do espaçador *trnL-F*, de acordo com o modelo de substituição de Tamura-Nei (2004). Valores em negrito indicam transições, em itálico transversões, cálculos realizados no programa MEGA5.

	A	T	C	G
A	-	6,3	3,57	10,43
T	7,5	-	9,66	3,81
C	7,5	17,03	-	3,81
G	20,53	6,3	3,57	-

Na distribuição de frequência das distâncias pareadas para o espaçador *trnL-F*, onde pode-se observar uma sobreposição de 2,24%. As classes de distância com as maiores frequências são aquelas entre 1 – 4%, perfazendo um total de 62,9% (Fig 9). A distância K2P média para o espaçador *trnL-F* é de 0,013 (\pm 0.003).

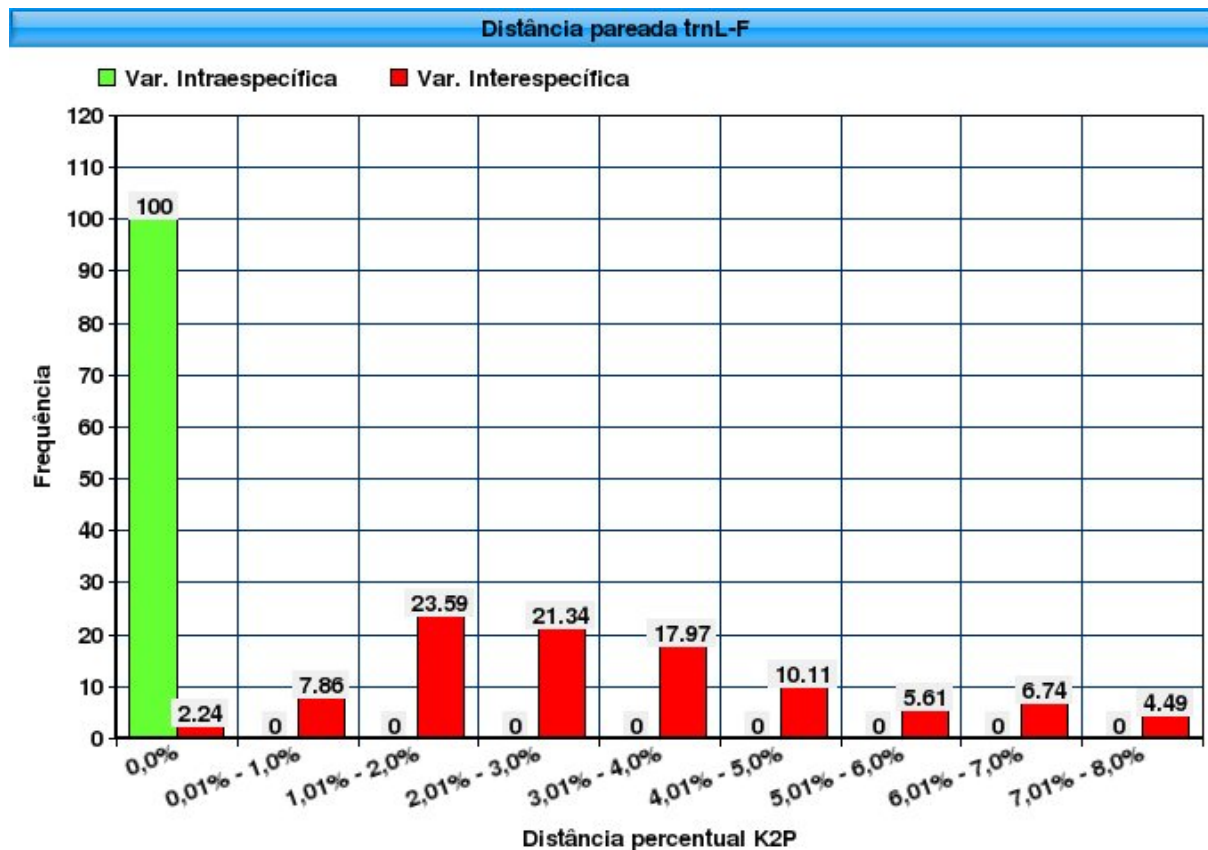


Figura 9: Distância pareada entre as sequências do espaçador *trnL-F* de 14 acessos de *Calydorea* e dois acessos de *Cardiostigma*. A barra verde indica as distâncias intraespecíficas, as barras pretas indicam as distâncias interespecíficas. Números acima da barra indicam a frequência absoluta. Distâncias calculadas no programa TaxonDNA/SpeciesIdentifier 1.7.8-syl

No dendrograma produzido pelo método de Neighbor-Joinning, com os dados referentes ao espaçador *trnL-F*, verifica-se que as espécies *C. pallens*, *C. undulata* e *C. approximata* são discriminadas, correspondendo a 30% das espécies de *Calydorea* (3/10). O gênero *Cardiostigma* forma um grupo monofilético com 100% de sustentação (Fig. 10).

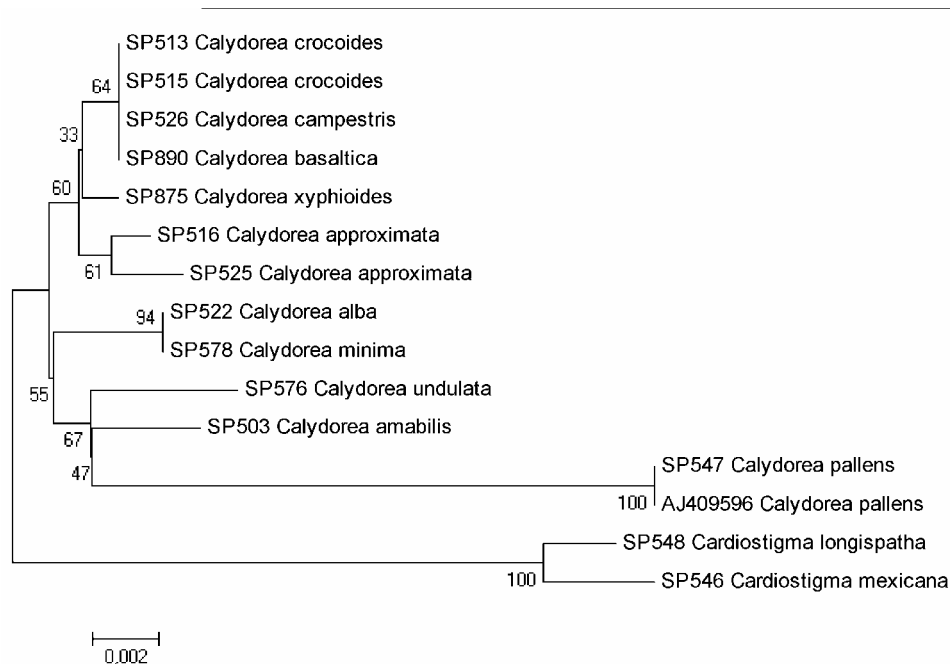


Figura 10: Análise de agrupamento inferida a partir do método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) para o espaçador *trnL-F* com extensão de 910 pb. A árvore ótima apresenta a soma do comprimento dos ramos = 0,0596. Os números próximos dos cladogramas indicam os valores do teste de Bootstrap com 1000 repetições. As distâncias evolucionárias foram inferidas usando-se o método K2P (Kimura, 1980), expressas em número de substituições de bases por sítio. Árvore produzida no programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

Análise conjunta *matK* + *rbcL* utilizando o método da parcimônia

A associação de genes na busca de um aumento na resolução das espécies é uma estratégia sugerida pelo (CBOL 2009) e utilizada em diversos trabalhos com DNA “barcode” (Kress & Erickson 2007, Seberg & Petersen 2009, Burgess *et al.* 2011; Fazekas *et al.* 2009). Neste sentido foram avaliados os genes *matK* e *rbcL* em análise conjunta de dados, com análise de agrupamento Neighbor-Joining e parcimônia pelo MEGA5.

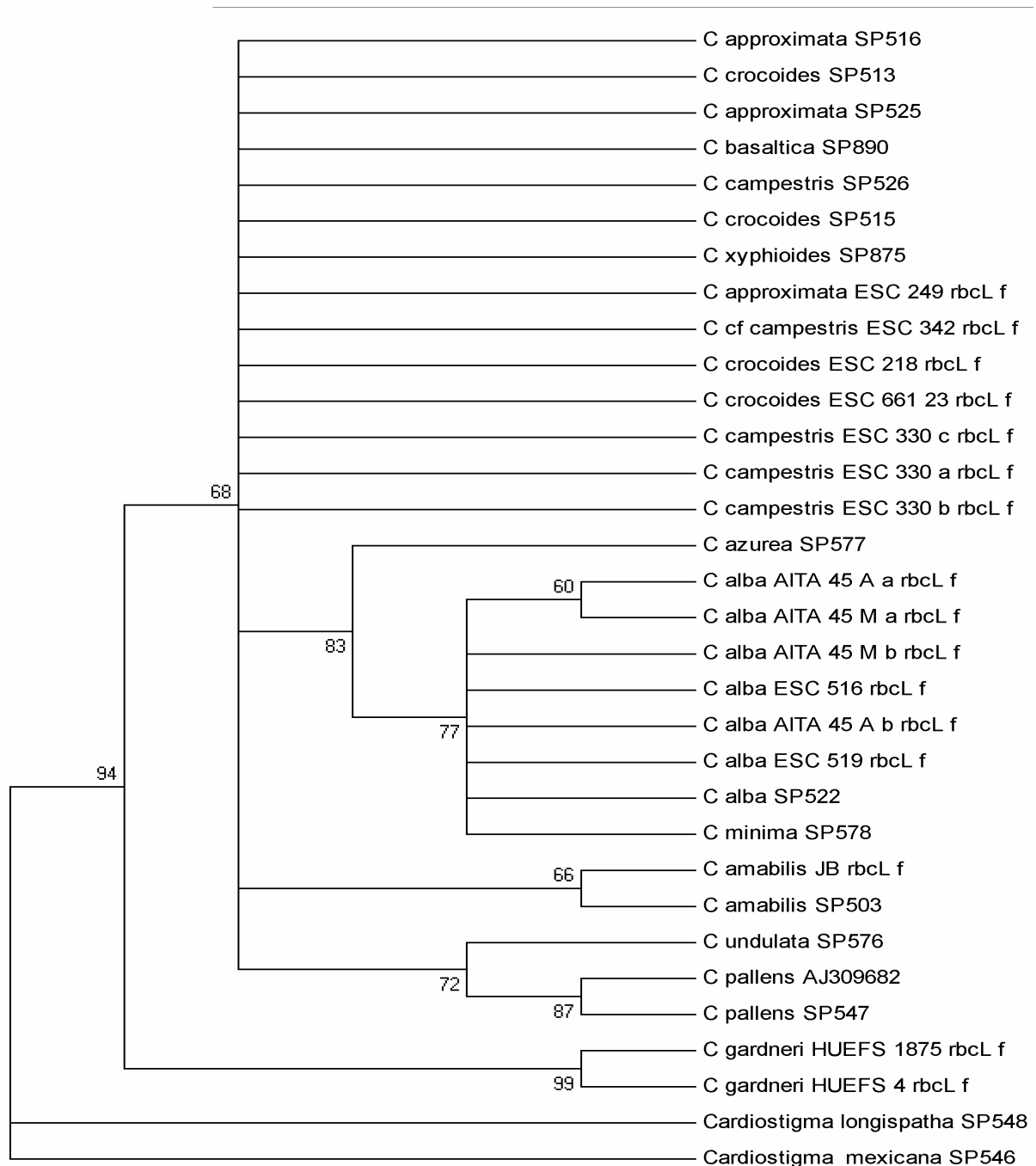


Figura 11: Árvore filogenética mais parcimoniosa inferida a partir de análise conjunta dos dados de *matK* e *rbcL* com o método da Parcimônia usando-se o algoritmo “Close-Neighbor-Interchange” e bootstrap de 1000 replicações. Ramos com bootstrap inferior a 60% estão colapsados. Os números nos nós de cada grupo indicam o percentual bootstrap. IC: 0,83; IR: 0,92. Árvore produzida no programa MEGA5.

A topologia da árvore produzida por agrupamento Neighbor-Joining com *matK* + *rbcL* resultou semelhante àquela da Fig. 4A, não acrescentando maior resolução. A análise de

parcimônia com dados dos genes *matK* e *rbcL* apresenta os mesmos grandes grupos anteriormente formados nas análises Neighbor-Joining individuais e com percentuais de sustentação muito semelhantes (Fig. 11 e Fig. 4A). Verifica-se neste caso que, ao contrário dos demais dendrogramas, as espécies de *Cardiostigma*, apesar de estarem próximas, não formam um clado e *Calydorea gardneri* apresenta aqui uma posição de isolamento não estando incluída em nenhum clado maior. Os acessos de *Calydorea amabilis* resultam agrupados e clado isolado e *C. minima* permanece no clado que contém os acessos de *C. alba* com sustentação de 77% bootstrap.

Análise comparativa dos índices dos diferentes segmentos gênicos

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostram a extensão total alinhado de cada trecho analisado e o número de caracteres conservados, variáveis e filogeneticamente informativos, bem como o poder discriminatório das espécies de *Calydorea* deste estudo.

Tabela 7: Caracterização comparativa dos trechos genômicos estudados com relação à extensão total, ao número de caracteres conservados, variáveis e filogeneticamente informativos (FI) e número de espécies discriminadas (ED) a partir da análise dos dendrogramas Neighbor-Joining.

Região genômica	Número de caracteres (sítios)				
	Extensão total	Conservados (%)	Variáveis (%)	FI (%)	ED (%)
<i>matK</i>	1864	1747 (93,7)	115 (6,2)	85 (4,5)	6/11 (55)
<i>rbcL</i>	1402	1361 (97,1)	41 (2,9)	31 (2,2)	4/12 (33)
<i>rps4</i>	952	822 (86,3)	97 (10,2)	92 (8,9)	- (0)
<i>rps16</i>	898	858 (95,5)	39 (4,3)	29 (3,2)	5/11 (45)
<i>trnL-F</i>	1033	920 (89,1)	57 (5,5)	39 (3,8)	3/10 (30)
Dados combinados	6149	5708 (92,8)	349 (5,7)	276 (4,5)	8/12 (66)

O poder discriminatório apresentado pelo conjunto dos genes foi de 72%, individualmente, a discriminação foi bastante variável, desde 0% para *rps4*, até 55% para o gene *matK*. Em ordem decrescente de poder de discriminar as espécies os resultados foram: *matK* 55%, *rps16* 45%, *trnL-F* 40%, *rbcL* com 27%, e *rps4* 0%.

Quanto ao percentual de caracteres filogeneticamente informativos foi verificado que o gene *rps4* apresentou o maior percentual 8,9%, seguido por *matK* (4,5%), *trnL-F* (3,8%), *rps16* (3,2%) e *rbcL* 2,9%).

A sobreposição das distâncias intraespecíficas e interespecíficas variou de 2,24% para o espaçador *trnL-F* a 21,34% para o gene *matK*. Valores intermediários de sobreposição foram apresentados para *rps4* (4,49%), *rps16* (11,23%) e *rbcL* (14,6%).

As distâncias médias K2P para todos os trechos avaliados, calculados pelo programa MEGA5 e a distância mínima e média interespecífica, expressas em percentuais, calculado pelo TaxonDNAspeciesfinder1.7.8 encontram-se na Tab. 8.

Tabela 8: Distância K2P média e respectivo desvio padrão (d.p.) expressos em número de substituições de base por sítio (s/s), calculados pelo programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) e Distância mínima (Dmin) e média (Dmed) Interespecífica calculadas pelo TaxonDNAspeciesfinder1.7.8, expressas em percentuais.

Trecho genômico	K2P média (s/s)	d.p.	Dmin (%)	Dmed (%)
<i>matK</i>	0,0016	+/- 0,004	0,33	1,2
<i>rbcL</i>	0,008	+/- 0,001	0,15	0,53
<i>rps4</i>	0,01	+/- 0,005	0,17	3,48
<i>rps16</i>	0,011	+/- 0,002	0,26	0,9
<i>trnL-F</i>	0,013	+/- 0,003	1,4	2,68

A análise “All species barcodes”, no programa TaxonDNAspeciesfinder1.7.8, indica quais sequências podem ser usadas com sucesso na identificação correta dos táxons. Os

resultados não satisfatórios apresentados nesta análise (Tab. 9) podem estar relacionados ao baixo número de acessos intraespecíficos para estabelecimento de valores referência de distâncias mais precisos, pois considerando os limiares (threshold) estabelecidos pelo próprio programa, não há sequências que possam ser corretamente usadas na resolução das espécies.

Tabela 9: Análise da eficiência das sequências para uso como “barcode”. Valores percentuais de limiar “Threshold” correspondem às distâncias mínimas calculadas a partir dos dados do estudo. Resultados obtidos com recurso >“All species barcode” pelo programa TaxonDNAspeciesfinder1.7.8. Correta (C), ambigua (A) e incorreta (I).

Trecho genômico	Limiar (%)	Corretas	Ambiguas	Incorretas	No macht
<i>matK</i>	0,33	0	11	1	4
<i>rbcL</i>	0,15	0	8	2	6
<i>rps4</i>	0,17	0	10	2	4
<i>rps16</i>	0,26	0	8	3	5
<i>trnL-F</i>	1,4	0	6	4	6

Resultados da identificação com uso de sequências -MEGABLAST GenBank e BOLD-IDS-

Sequências de *matK* e *rbcL* foram submetidas à análise MEGABLAST –Highly similar sequences-/GenBank e ao BOLD-IDS –Plant Identification System-, para verificação das espécies mais próximas no que diz respeito à sequência nucleotídica.

Cabe salientar que, para as espécies do gênero *Calydorea*, somente seis sequências nucleotídicas depositadas no GenBank, correspondentes à espécie *Calydorea pallens*. No caso do BOLD-IDS-, mesmo contando com 873 espécies de Iridaceae, somente duas sequências de

Calydorea pallens estão registradas até o momento. O Apêndice 3 apresenta a relação das sequências registradas neste bancos de dados genéticos.

Os resultados da identificação pelo BLAST e BOLD-IDS apresentaram diversas espécies muito próximas em relação à sequência submetida e várias vezes, espécies de outros gêneros, apresentaram maior similaridade do que a sequência de *Calydorea pallens* contida nestes bancos de dados. Espécies tais como *Nemastylis tenuis*, *Ainea konzattii*, *Cypella rosei*, *Cypella mexicana*, *Onira unguiculata* e *Ainea konzattii* apresentaram menos de 2% de divergência em relação às sequências deste estudo. A relação das espécies (resposta ao “query”) e respectivos valores de similaridade encontrados no BOLD-IDS estão listadas nos Apêndices 4, enquanto que os valores de similaridade encontrados no GenBank estão no Apêndice 5.

2.4 – Discussão

Poder de discriminação de espécies

Dentre as sequências estudadas, o gene *matK* apresentou a maior capacidade de discriminação das espécies (55%). Em termos de percentual de resolução de espécies neste estudo, em ordem decrescente, temos os seguintes genes: *matK*, *rps16* (45%) e *rbcL* (33%), o espaçador *trnL-F* (30%) e *rps4* (0%) (Tab. 7).

Estes resultados condizem com os níveis de resolução apresentados por *matK*, pois esta é uma região plastidial codificante que apresenta altas taxas de evolução e que já está estabelecida como “core barcode”, justamente devido ao seu alto grau de variação em níveis hierárquicos inferiores (CBOL 2009). Diversos artigos apontam tal poder discriminatório em diferentes grupos de plantas. Seberg & Petersen (2009) utilizaram técnicas de “barcode” em

Crocus L. e verificaram uma capacidade de discriminação de 71% das espécies com *matK*. Gonzales *et al.* (2009) encontraram um poder de resolução desta sequência de 63% dentre as 254 espécies de árvores amazônicas da Guiana Francesa. Burgess *et al.* (2011) utilizaram técnicas de DNA “barcode” para identificar as espécies vegetais de uma comunidade de clima temperado ao sul de Ontário, Canadá, tendo encontrado um poder de resolução de 88,8% para *matK*. Numa avaliação ampla na busca de genes ideais para o “barcode” em plantas, o CBOL (2009) utilizou 550 espécies de plantas pertencentes às principais linhagens e verificou que o gene *matK* apresentou variação suficiente para discriminar 66% dos táxons.

Fazekas *et al.* (2008) realizaram uma comparação com oito genes candidatos ao “barcode” em plantas e concluíram que o gene *matK* apresentou uma das mais altas resoluções, contudo os autores salientaram que este gene apresenta dificuldades técnicas para a obtenção de suas sequências. Neste sentido, Yu *et al.* (2011) conduziram um trabalho de elaboração de *primers* universais, obtendo 93% de amplificação diante de um conjunto de espécies de 47 famílias com os novos *primers* *matK472F* e *matK1248R*. Com o intuito de identificar a composição de flora de dois *hotspots*, Lahaye *et al.* (2008) verificaram que a utilização isolada de *matK* provou ser útil na identificação de orquídeas listadas na Convenção Internacional de Espécies Ameaçadas e também na discriminação de espécies crípticas. Nossos dados mostraram que, para espécies de *Calydorea*, o gene *matK* apresentou níveis de resolução levemente inferior àqueles apresentados em outros trabalhos, mas ainda assim superior aos índices dos outros genes aqui avaliados.

A análise de agrupamento Neighbor-Joining gerada com dados do *matK* resultou em um dendrograma cuja topologia indica o estabelecimento de quatro grupos de espécies: o primeiro formado pelas espécies de *Cardiostigma*; o segundo pelos acessos de *C. pallens* e *C. amabilis*; o terceiro congregando *C. alba*, *C. minima* e *C. azurea* e o quarto grupo composto por *C. crocoides*, *C. campestris*, *C. approximata* e *C. basaltica* (Fig. 2).

O grupo composto pelas espécies de *Cardiostigma* (*C. longispatha* e *C. mexicana*) foi formado, invariavelmente, em todos os dendrogramas resultantes para todos os trechos avaliados. Esta evidência corrobora os resultados de Rodriguez & Sytsma (2006), onde *C. longispatha* foi disposta no clado de *Tigridia*, não estando próxima a *Calydorea pallens*. O uso das sequências deste estudo para discriminar as espécies de *Cardiostigma* das demais espécies de *Calydorea* é promissor.

O segundo grupo formado por *C. pallens* e *C. amabilis* está bem sustentado (88% BS) e apresenta monofilia para os acessos de *C. pallens*. Esta espécie é também discriminada com o gene *rbcL* (Fig. 4 e 4A), *rps16* (Fig. 8) e pelo espaçador *trnL-F* (Fig 9). Conforme Goldblatt & Henrich (1991), estas duas espécies apresentam similaridades morfológicas, com destaque para as tépalas internas revolutas e marcadamente menores que as externas. Outra característica destes dois táxons também diz respeito às tépalas, que se apresentam contortas. Para Ravenna (1983), as tépalas internas de *Catila amabilis* (= *Calydorea amabilis*), guardada a sua simplicidade, são similares àquelas de *Cypella* e a presença de elaióforos evidencia a necessidade de separação genérica de *Calydorea*, visto que estas estruturas não ocorrem neste gênero. O mesmo autor afirmou que as anteras de *C. pallens* são atípicas e se assemelham com aquelas de *Catila*, sendo opostas aos ramos do estilete, contudo nunca envolvendo os mesmos após a deiscência. Goldblatt & Henrich (1991) corroboraram com a hipótese de que *Cypella* seja ancestral em relação à *Catila amabilis* e que *Calydorea pallens* represente mais um passo neste processo, conduzindo a espécies com flores semelhantes à *Calydorea speciosa* (= *C. xiphioides*). O que pode se perceber é que há proximidade evolutiva entre os táxons deste grupo, contudo diferenças morfológicas significativas sugerem a separação genérica entre eles.

Quanto à distribuição geográfica, o exame das exsicatas de *C. pallens* indicam a ocorrência da espécie nas províncias de Jujuy, Salta e Tucumán, na Argentina, podendo haver

alguma simpatria com populações de *C. amabilis*, que ocorre na Província de Entre Rios e em Concepción del Uruguai.

O terceiro grupo formado por *C. alba*, *C. minima* e *C. azurea* é muito bem sustentado (99% BS) no dendrograma gerado pelos dados de *matK*, bem como aqueles gerados pelo *rbcL* (81% BS) e *rps16* (94% BS). Os acessos de *C. alba* e *C. minima*, em todos os casos, formam um clado bem sustentado com BS sempre superior a 85%, exceto para o caso do *rps4* (Fig. 6), onde *C. minima* forma um grupo com *C. undulata*. A proximidade de *C. minima* e *C. alba* é uma hipótese que deve ser investigada com mais critério, visto que *C. alba* apresenta indivíduos que guardam semelhança com *C. minima*. Os principais critérios morfológicos de distinção entre *C. minima* e *C. alba* referem-se ao menor tamanho da planta como um todo e à coloração lilás claro e ápice acuminado das tépalas da primeira espécie. Quanto ao formato das tépalas, foi verificado em campo, que populações de *C. alba* apresentam indivíduos com tépalas de ápice acuminado e arredondado numa distribuição contínua, favorecendo a hipótese de que *C. minima* possa ser uma variação de *C. alba*.

Calydorea azurea, quando presente na análise, sempre surgiu como grupo irmão de *C. alba* e *C. minima*, fato que sugere a sua proximidade genética com estas. Vale notar que a proximidade entre estas espécies também se refere à área de ocorrência, sendo encontradas no Bioma Pampa do Rio Grande do Sul, Argentina e Uruguai e sendo simpátricas em determinadas áreas de ocorrência.

O quarto grupo no dendrograma gerado pelo gene *matK* contendo *C. campestris*, *C. approximata* e *C. basaltica* é caracterizado pela presença de politomia e de táxons agrupados de forma não-monofilética, não havendo deste modo uma identificação confiável destas espécies (Fig. 2). Este mesmo grupo foi formado nas análises geradas via *rbcL* (Fig. 4 e 4a), *rps4* (Fig. 6) e *rps16* (Fig. 8), com a inclusão eventual de *C. crocoides* e *C. xiphioides*. A

topologia do dendrograma gerado pelos dados de 30 acessos de *Calydorea* com *rbcL* parciais (Fig. 4A) também apresenta uma politomia evidente envolvendo estas espécies.

Este conjunto de táxons em politomia forma um complexo de espécies de limites genéticos tênues de acordo com as sequências utilizadas neste estudo. Novamente é notada a proximidade geográfica dos táxons dos grupos aqui formados, neste caso são espécies ora exclusivas de áreas do Planalto Sul-Brasileiro (*C. crocoides*, *C. basaltica*), ora predominantemente encontradas nesta região (*C. campestris*) ou com ocorrência estendida também ao Planalto da Região Sul do Brasil (*C. approximata*). A exceção a esta evidência acerca da distribuição geográfica simpátrica/parapátrica é a inclusão eventual de *C. xiphioides*, que ocorre no Chile. Não obstante, os resultados aqui evidenciados são concordantes com a hipótese de Ravenna (2005), de que *C. basaltica* pertence à aliança que inclui *C. crocoides* e que podem estar associadas com *C. xiphioides* dentro de um mesmo grupo.

Outras evidências reforçam a união destas espécies neste grupo em politomia. A análise de exemplares coletados na Região Sul do Brasil e exemplares de diversos herbários deixa claro que *C. crocoides*, *C. basaltica* e *C. campestris* formam um grupo estreitamente relacionado. As dimensões das espadas, importante na diferenciação das espécies do grupo, por muitas vezes apresenta sobreposição (em *C. crocoides* e em *C. basaltica*) e as flores de maneira geral guardam semelhança. Alguns pontos de simpatria/parapatria no Planalto Sul-Brasileiro incluem *C. campestris/C. crocoides*, *C. campestris/C. approximata*, *C. basaltica/C. approximata*, *C. approximata/C. crocoides*.

A interpretação conjunta destes dendrogramas nos auxilia na construção de algumas hipóteses evolutivas. A proximidade entre *C. campestris*, *C. approximata* e *C. basaltica* pode estar refletindo uma diversificação mais recente, ao contrário do que acontece quando se

avalia a topologia de outros agrupamentos contendo, por exemplo, *C. pallens*, *C. undulata*, *C. azurea*, *C. amabilis* e *C. alba*, onde há maior distância genética entre os táxons, sugerindo uma diferenciação e evolução em curso por um tempo maior. Algumas sequências, entretanto, apresentam a capacidade de resolver parcialmente a politomia verificada, como é o caso de *C. crocoides* com o gene *matK* e de *C. approximata* com o gene *rps4* e do espaçador intergênico *trnL-F*, pois surgem aí discriminadas de forma isolada.

O poder de resolução do gene *rbcL* neste estudo (27%) foi inferior a *rps16* (45%) e *trnL-F* (36%) e a topologia das árvores (Fig 4 e 4A), de forma geral, apresentam agrupamentos muito semelhantes aos verificados quando utilizamos *matK*, *rps16* e *trnL-F*. A relativa baixa variação apresentada pelo gene *rbcL* já está documentada para alguns grupos, como no caso do trabalho de Lahaye *et al.* (2008) onde *rbcL* não apresentou resolução em nível de espécie para Orchidaceae.

As espécies *C. azurea*, *C. undulata*, *C. pallens* e *C. gardneri* foram discriminadas pelo *rbcL* que, a despeito de apresentar taxas evolutivas menores, distingue estes táxons no dendrograma e agrega indícios à hipótese de uma especiação mais remota destes, quando comparados com os táxons que invariavelmente formam grupos em politomia, caso das espécies que se distribuem no Planalto Sul-Brasileiro.

As sequências parciais do gene *rbcL* (548 pb) de *C. gardneri* resultaram em um agrupamento com BS de 98%, incluídas no ramo que contém os acessos de *C. amabilis* (68% BS) e de *C. pallens* (66% BS) (Fig. 4A). Este clado une *C. gardneri* e *C. amabilis*, espécies que guardam uma proximidade morfológica exclusiva dentro das espécies de *Calydorea*: a união parcial das anteras com o estilete em *C. gardneri* e a união das anteras com os ramos do estilete em *C. amabilis*.

O acréscimo de novas sequências reforçou a hipótese aventada com base em dados morfológicos de que *C. minima* e *C. alba* podem pertencer a uma mesma espécie, pois o acesso SP578 (*C. minima*) e os acessos dos exemplares menores de *C. alba* com flores lilás claro (AITA 45 M a, AITA 45 M b) formaram um grupo monofilético, com sustentação de 84% BS com todos os demais acessos de *C. alba*.

O gene *rbcL* não apresentou poder de discriminação satisfatório para *C. crocoides*, *C. campestris*, *C. basaltica*, *C. approximata* e *C. xiphioides*, o mesmo padrão foi observado com o *matK*, *rps4*, *rps16* e *trnL-F*, com algumas exceções: *C. xiphioides* e *C. crocoides* para *matK* e *C. approximata* com *rps16* e *trnL-F*. Não é surpreendente que o *rbcL* não tenha sido capaz de discriminar estas espécies, visto não terem sido discriminadas anteriormente pelo *matK*, que é um gene com a mais alta taxa de mutação para uma região plastidial codificante. As relações de proximidade morfológica e de distribuição geográfica de alguns destes táxons foram explicitadas acima e são igualmente válidas para justificar a topologia apresentada pelo *rbcL*.

A análise conjunta dos dados de *rbcL* + *matK* por Neighbor-Joining (árvore não apresentada) resultou num dendrograma com os mesmos agrupamentos gerados individualmente, ou seja, a associação destes genes não resultou em aumento da resolução. Topologia semelhante as demais também foi encontrada quando árvores foram geradas pelo método de parcimônia (Fig. 11), com a exceção das espécies de *Cardiostigma*, que não mais formam um clado e sim uma politomia e da separação dos acessos de *C. gardneri* do clado contendo *C. amabilis*, *C. pallens* e *C. undulata*, o restante da árvore guarda muita semelhança.

O gene *rps4* apresentou um poder de discriminação insuficiente, sendo pouco útil, no caso de *Calydorea*, como marcador para “barcode”; contudo, o gene *rps4* foi a região com maior percentual de caracteres variáveis (10,2%) e caracteres filogeneticamente informativos

(8,9%), índices estes cerca de duas vezes maiores do que aqueles apresentados pelo gene *matK*. Este paradoxo entre identificação pouco eficiente e a alta variabilidade é compreensível quando se observa que a variabilidade de *rps4* foi devida quase que exclusivamente ao grande número de mudanças nas sequências compartilhadas de *C. minima* e *C. undulata*. A análise de agrupamento apresentou estas duas espécies unidas num clado com BS 100%, sendo esta a única ocasião em que estes dois táxons apresentam-se no mesmo clado. Nas demais análises, *C. minima* sempre fez parte do grupo que inclui *C. alba* e *C. azurea*, nunca estando ao lado de *C. undulata*. A proximidade morfológica entre *C. minima* e *C. azurea* é relatada pelos autores da primeira espécie (Roitman & Castillo 2007), porém nunca foi suscitada sua proximidade com *C. undulata*. Conforme De Tullio *et al.* (2008), *C. undulata* foi descrita a partir de exemplares identificados como *C. pallens* e guarda semelhanças como esta espécie. Portanto, as variações conjuntas de *C. minima* e *C. undulata*, exclusivamente apresentadas pelo *rps4*, pode ser fruto de uma identificação errônea de amostras ou de sequências, ou uma evidência real parentesco entre estas espécies até o momento não relatado e mantida neste gene. Como visto com *matK* e *rbcL*, a politomia contendo *C. campestris*, *C. crocoides*, *C. basaltica*, *C. approximata* e *C. xiphioides* também está apresentada no dendrograma obtido a partir das sequências de *rps4* (Fig 6).

No dendrograma gerado pelos dados do gene *rps16*, as espécies *C. approximata*, *C. undulata*, *C. amabilis*, *C. pallens* e *C. azurea* são discriminadas e as espécies de *Cardiostigma* também formam um clado à parte. O poder de identificação do *rps16* (45%) só é inferior ao *matK* neste estudo, o que é algo interessante, pois este gene não está relacionado por Hollingsworth *et al.* (2011), que procederam um balanço geral dos marcadores já usados para propostas de “barcode” em plantas. A disposição dos acessos de *C. approximata* em clado único foi evidenciado no dendrograma obtido a partir do gene *rps16* e do espaçador *trnL-F*

somente, nos demais casos estes acessos compuseram uma politomia com as espécies próximas a *C. crocoides*.

Distâncias genéticas entre as sequências e identificação de espécies no BOLD_IDS e GenBank usando-se Megablast

As distâncias genéticas entre as espécies, em termos percentuais, variaram de 0% a 11%. O gene *matK* apresentou 60% da distribuição das distâncias genéticas entre pares na faixa de 1-2% de divergência, enquanto que o *rbcL* foi observado que 77% dos casos na classe de 0,1-1%.

O gene *rps4* apresentou uma distinta distribuição bimodal, onde 22% dos casos apresentaram distância de duas a dez vezes maiores que as demais. Estas distâncias estão relacionadas, invariavelmente, às espécies *C. minima* e *C. undulata*, conforme análises produzida no “Pairwise Explorer” do TaxonDNA.

As distâncias percentuais de divergências entre as espécies próximas contidas no BOLD, em muitos casos, são inferiores a 1% (Apêndice 4) e frequentemente espécies não pertencentes ao gênero *Calydorea* apresentam maior similaridade do que a espécie congênica submetida para comparação (“query”). Estes resultados refletem a ausência de um banco de dados (mantido pelo BOLD) com um perfil de diversidade intra e interespecies mais robusto para comparação, pois se verifica que, em muitos casos, a distância entre espécies congêneres é inferior a 1% (Apêndice 6 e 7), podendo fornecer identificações errôneas.

Usando-se a ferramenta MEGABLAST no GenBank, os percentuais de similaridade apresentam variações na ordem de unidade, o que limita ainda mais o uso deste valor como uma referência na distinção das espécies congênicas. Sequências de *matK* e *rbcL* de *C. alba*, *C. crocoides* e *C. pallens* deste estudo foram submetidas no MEGABLAST e os resultados tiveram uma eficiência baixa, pois em cinco dos seis casos de sequências submetidas, espécies não congênicas apareceram como mais similares (Apêndice 5).

Meier *et al.* 2006 relataram limitações na utilização de valores de divergências, onde a simples determinação de um valor percentual de divergência invariável entre espécies pode, em alguns grupos, obrigar uma larga redescrição de espécies, tornando-se na realidade um impedimento taxonômico, ao invés de uma ferramenta útil. Meier *et al.* (2008), utilizando amplo banco de dados genéticos em díptera, concluíram que a utilização da distância média interespecífica superestima o “barcode gap” e pode conduzir a identificações errôneas, e sugeriram que a utilização da distância mínima interespecífica produz identificações mais precisas.

As distâncias mínimas para cada trecho foram calculadas para *Calydorea* e foram aplicadas às sequências obtidas neste estudo para teste. Os resultados de identificações foram na maioria ambíguos (Tab. 9). Estes resultados podem refletir uma inadequação destes dados para tratamento no TaxonDNA, devido muito provavelmente à necessidade do programa de ter maior número de sequências para melhor caracterização das distâncias críticas e definição de utilização na identificação das espécies.

2.5 Conclusões

- a) A avaliação do uso de sequências para proposta do “barcode”, no caso de *Calydorea*, foi possível diante da interpretação das topologias dos dendrogramas resultantes da análise de Neighbor-Joining produzidas no programa MEGA5, contudo os resultados apresentados pelas análises estritas das distâncias genéticas no TaxonDNA resultaram insatisfatórios; é possível que o acréscimo de maior número de acessos por espécie auxilie no poder de discriminação das espécies;
- b) O gene *matK* apresentou o melhor percentual de discriminação de espécies de *Calydorea* (55%) seguido do gene *rps16* (45%);
- c) O aumento do número de acessos de *rbcL*, com 16 novas sequências parciais de 548 pb possibilitou verificar que *C. gardneri* é monofilética e está incluída num clado formado pelas espécies *C. amabilis*, *C. pallens* e *C. undulata*;
- d) A disposição de *C. gardneri* no mesmo clado com *C. amabilis* está refletida também numa peculiaridade morfológica destas duas espécies dentro de *Calydorea*: a união parcial das anteras com o estilete e a união destas com os ramos do estilete, respectivamente;
- e) As sequências parciais de *rbcL* também aumentaram a evidência da relação estreita entre *C. minima* e *C. alba*, contudo não resolveu a politomia entre *C. basaltica*, *C. campestris*, *C. crocoides*, *C. approximata* e *C. xiphioides*;
- f) A análise conjunta de *matK* + *rbcL* resultou em dendrogramas, produzidos pelos métodos de Neighbor-Joining e de máxima parcimônia, são bastante similares aos dendrogramas individuais e não aumentou a resolução ao nível de espécie;

- g) O aumento do número de sequências, de diferentes acessos de espécies do gênero *Calydorea*, com ênfase nos genes “barcode core” é necessário para melhor caracterizar as variações intraespecíficas;
- h) A inclusão de dados de trechos ainda não avaliados, tais como o espaçador *psbA-trnH* e do ITS, poderão caracterizar melhor as relações entre as espécies, podendo resolver a politomia das espécies próximas à *C. crocoides*, além de produzir perfis de variabilidade genética mais definidos e assim úteis para a proposta do “DNA barcode”.
- i) O conjunto de espécies em politomia, apresentado em todas as topologias, reflete as proximidades morfológicas entre *C. crocoides*, *C. campestris* e *C. basaltica*, bem como agrupa as espécies simpátricas e parapátricas ocorrentes no Planalto Sul-Brasileiro, incluindo *C. approximata* ao grupo e corroboram a hipótese aventada por Ravenna (2009) de formarem um grupo relacionado com *C. xiphioides*.

2.6 - Agradecimentos

Ao pesquisador Olivier Chauveau do Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution da Université Paris-Sud, pelas sequências de dados moleculares gentilmente cedidas para iniciar esta pesquisa. Agradeço a todas as pessoas do Laboratório de Sistemática Molecular da UFRGS pelo auxílio nas tarefas laboratoriais, em especial a Eudes Maria Stiehl-Alves e Tiago Luiz da Silva Alves.

2.7 Referências bibliográficas

Barcode of Life – Identifying Species with DNA barcoding – 2012. Disponível em:

<<http://www.barcodeoflife.org/>>. Acesso em 28 janeiro 2012.

BOLD – Barcode of Life Data Systems – 2012. Disponível em:

<http://www.boldsystems.org/views/idrequest_plants.php>. Acesso em 27 janeiro 2012.

CBOL – Plant Working Group- 2009. A DNA barcode for land plants. **PNAS** 106(31): 12794-12797.

ChartTool – 2012. Disponível em: <<http://www.onlinecharttool.com/graph.php>>. Acesso em 27 janeiro 2012.

Chauveau, O.; Eggers, L.; Raquim, C.; Silvério, A.; Brown, S.; Couloux, A.; Cruaud, C.; Kaltchuk-Santos, E.; Yockteng, R.; Souza-Chies, T. T. & Nadot, S. 2011. Evolution of iol-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** (in press).

Chen, S.; Yao, H.; Han, J.; Liu, C.; Song, J.; Shi, L.; Zhu, Y.; Ma, X.; Gao, T.; Pang, X.; Luo, K.; Li, Y.; Li, X.; Jia, X.; Lin Y. & Leon, C. 2010. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. **PLoS ONE** 5(1): e8613. doi:10.1371/journal.pone.0008613.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin** 19:11-15.

- Eggers, L. 2008. A família Iridaceae no Parque Estadual de Itapuã. Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências** 6: 167-175.
- Eggers, L. *et al.* 2011. *Calydorea*. In: Forzza, R.C. *et al.* (eds.). **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>.
- Fazekas, A.J.; Burgess K.S.; Kesanakurti, P.R.; Graham, S.W.; Newmaster, S.G.; Husband, B.C.; Percy, D.M.; Hajibabaei, M. & Barrett, S.C.H. 2008. Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. **PLoS ONE** 3: e2802.
- GenBank – Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)- 2012. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em 27 janeiro 2012.
- Genoscope – Centre National de Séquençage – 2012. Disponível em: <<http://www.genoscope.cns.fr/spip/>>. Acesso em 27 janeiro 2012.
- Goldblatt, P. & Manning, J.C. 2008. **The Iris family: Natural History and classification**. Timber Press, 290 p.
- Goldblatt, P.; Rodriguez, A.; Powell, M.P.; Jonathan Davies, T.; 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(3): 495-508.
- Goldblatt, P.; Rudall, P. & Henrich, J.E. 1990. The genera of the *Sisyrinchium* alliance (Iridaceae: Iridoideae): Phylogeny and relationships. **Systematic Botany** 15(3):497-510.
- Goldblatt, P.; Savolainen, V.; Porteous, O.; Sostaric, I.; Powell, M.; Reeves, G.; Manning, J. C.; Barraclough, T.G. & Chase, M.W. 2002. Radiation in the Cape Flora and the

- phylogeny of peacock irises *Moraea* (Iridaceae) based on four plastid DNA regions. **Molecular phylogenetics and evolution** 25:341-360.
- Gonzalez, M.A.; Baraloto, C.; Engel, J.; Mori, S.A.; Pétronelli, P.; Riéra, B.; Roger, A.; Thébaud, C. & Chave, J. 2009. Identification of Amazonian trees with DNA barcodes. **PLoS ONE** 4(10): e7483
- Herbert, P.D.N.; Cywinska, A.; Ball, S.L.; deWaard, J.R. 2003. Biological identification through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences** 270: 313-321.
- Hollingsworth, P.M. 2011. Refining the DNA barcode for land plants. **PNAS** 108(49): 19451-19452.
- Hollingsworth, P.M.; Graham, S.W. & Little, D.P. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. **PLoS ONE** 6(5): e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254
- 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
- KEW – Royal Botanic Gardens of KEW – 2012. Disponível em: <www.kew.org/barcoding/protocols.html>. Acesso em 27 janeiro 2012.
- Kress, W.J.; Wurdack, K.J.; Zimmer, E.A.; Weight, L.A. & Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. **PNAS** 102(23): 8369-8374.
- Kumar, S. & Gadagkar, S.R. 2001. Disparity index: A simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences. **Genetics** 158: 1321-1327.

- Lahaye, R.; van der Bank, M.; Bogarin, D.; Warner, J.; Pupulin, F.; Gigot, G.; Maurin, O.; Duthoit, S.; Barraclough, G. & Savolainen, V. 2008. **PNAS** 105(8): 2923-2928.
- Li, D.Z.; Gao, L.; Li, H.; Wang, H.; Liu, J.; Chen, Z.; Zhou, S.; Chen, S.; Yang, J.; Fu, C.; Zeng, C.; Yan, H.; Zhu, Y.; Sun, Y.; Chen, S.; Zhao, L.; Wang, K. & Yang, T. – China Plant BOL Group – 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. **PNAS** 108(49): 19641-19646.
- Lovo, J. 2009. Filogenia e Revisão de *Pseudotrimezia* (Iridaceae). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 102p.
- Makarevitch, I.; Golovina, K.; Scherbik, S. & Blinov, A. 2003. Phylogenetic relationships of the Siberian *Iris* species inferred from noncoding chloroplast DNA sequences. **Journal of Plant Science** 164(2):229-237.
- Meier, R.; Kwong, S.; Vaidya, G.; Ng, P.K.L. 2006. DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: a Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. **Systematic Biology**, 55: 715-728.
- Meier, R.; Zhang, G. & Ali, F. 2008. The use of mean instead of smallest interspecific distance exaggerates the size of the “Barcoding Gap” and leads to misidentification. **Systematic Biology** 37(5): 809-813.
- Oxelman, B.; Lidén, M.; Berglund, D. 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). **Plant Systematics and evolution** 206: 393-410.
- Pang, X.; Song, J.; Zhu, Y.; Xu, H.; Huang, L. & Chen, S. 2011. Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification. **Cladistics** 27: 165-170.
- Pennisi, E. 2007. Taxonomy – Wanted: A barcode for plants. **Science** 318: 190-191.

- Petersen, G.; Seberg, O.; Thorsøe, S.; Jørgensen, T. & Mathew, B. 2008. A phylogeny of the genus *Crocus* (Iridaceae) based on sequence data from five plastid regions. **Taxon** 57(2):487-499.
- Ratnasingham, S.; Herbert, P.D.N. 2007. BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes** 7:355-364
- Ravenna, P. 1983. *Catila* and *Onira*, two new genera of South American. **Nordic Journal of Botany** 3(2): 197-205.
- Ravenna, P. 2005. New species of South American bulbous Iridaceae. **Onira** 10: 39-45.
- Reeves, G.; Chase, M.W.; Goldblatt, P.; Rudall, P.; Fay, M.F.; Cox, A.V.; Lejeune, B. & Souza-Chies, T. 2001. Molecular systematic of Iridaceae: evidence from four plastid DNA regions. **American Journal of Botany** 88(11): 2074-2087.
- Rodriguez, A. & Sytsma, K. 2006. Phylogenetics of the “Tiger-flower” group (Tigridiae: Iridaceae) molecular and morphological evidence. **Aliso** 22: 412-424.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4:406-425.
- Seberg, O. & Petersen, G. 2009. How many loci does it take to DNA barcode a *Crocus*? **PLoS ONE** 4(2):e4598. doi:10.1371/journal.pone.0004598
- Taberlet, P.; Gielly, L.; Patou, G.; Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology** 17: 1105_1109.
- Tamura K.; Nei M.; & Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **PNAS** 101:11030-11035.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary

- Distance and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** 28(10): 2731-2739.
- TaxonDNA/SpeciesIdentifier 1.7.8-sy1, Copyright (C) 2005-06 Gaurav Vaidya.
- Will, K.W. & Rubinoff, D. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. **Cladistics** 20: 47-55.
- Wilson, C.A. 2004. Phylogeny of *Iris* based on chloroplast *matK* gene and *trnK* intron sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 33:402-412.
- Wilson, C.A. 2011. Subgeneric classification in *Iris* re-examined using chloroplast sequence data. **Taxon** 60(1): 27-35
- Yu, J.; Xue, J-H.; Zhou, S-L. 2011. New universal primers for DNA barcoding angiosperms. **Journal of Systematics and Evolution** 49 (3):176-181.
- Zhang, Z.; Schwartz, S.; Wagner, L. & Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology** 7(1-2):203-214.

Considerações finais

Considerações finais

Os resultados da presente pesquisa apresentaram informações novas sobre a ocorrência das espécies de *Calydorea* na Região Sul do Brasil, além de apresentar uma sinonimização e uma avaliação das espécies ocorrentes em países vizinhos, que possivelmente podem ocorrer nesta região. Para algumas espécies, onde as descrições não apresentavam ilustrações ou estas eram restritas à poucas estruturas, as ilustrações aqui apresentadas são as primeiras publicadas, contendo hábito da planta, aspectos das espatas, verticilos reprodutivos e das flores. A abordagem molecular, por sua vez, também apresentou informações novas sobre as espécies dentro do gênero, com a evidenciação de um clado das espécies que ocorrem no Bioma Pampa e outro com aquelas que ocorrem no Planalto Sul-Brasileiro, fornecendo assim subsídios para considerações filogenéticas. A abordagem voltada para o DNA “barcode”, no gênero *Calydorea*, é um trabalho que ainda não havia sido realizado.

A partir dos resultados aqui apresentados e devido a questões taxonômicas incertas, novas pesquisas poderão aprimorar o conhecimento sobre as espécies de *Calydorea*. Por exemplo, a compreensão da real circunscrição deste gênero que, a despeito de possuir menos de 20 espécies, apresenta táxons duvidosos. Podem ser incluídos aqui *C. gardneri* e *C. venezolensis*, que possuem singularidades nos verticilos reprodutivos, os quais, segundo análise morfológica, geram questionamentos a cerca da sua inclusão em *Calydorea*.

Outra questão a ser elucidada diz respeito a um grupo de espécies do Bioma Pampa, que compreende *C. alba*, *C. azurea*, *C. minima* e a recentemente descrita *C. riograndensis*. Estes táxons possuem enorme similaridade morfológica e suas diferenças estão estabelecidas em critérios variáveis, tais como cor da flor e tamanho das estruturas, que muitas vezes se sobrepõem. Novas pesquisas de campo, com informações sobre a fenologia, distribuição

geográfica precisa, documentação fotográfica ampla, verificação de possíveis híbridos, bem como análises morfológicas e moleculares mais aprofundadas certamente esclarecerão as relações entre estes táxons.

Outro tópico de pesquisa refere-se à verificação de que as espécies que ocorrem no Planalto Sul-Brasileiro, considerando nossas análises moleculares, invariavelmente estão em politomia. Acredita-se que a busca de novos marcadores moleculares, mais variáveis, que possam discriminar estas espécies e possam ser aplicá-los também a outras espécies do gênero de forma ampla, incluindo aquelas que ocorrem em outros países da América do Sul, trará elementos suficientes para inferências filogenéticas. Desta forma poderão ser elucidadas as relações internas entre as espécies do gênero que, até o momento, foram somente aventadas a partir de correlações morfológicas e considerações filogenéticas parciais.

Por último, no que diz respeito à distribuição geográfica das espécies brasileiras e de países vizinhos, há necessidade de maiores informações sobre a ocorrência de algumas delas. O registro de coleta de um espécime de *C. crocoides* em Minas Gerais evidenciou o não endemismo da espécie para a Região Sul do Brasil. No entanto, é interessante que sejam realizadas outras buscas desta planta no sudeste brasileiro, para confirmação do dado e análise da abrangência desta distribuição. Informações mais precisas sobre a ocorrência de *C. campestris* e *C. crocoides* em São Paulo e em Minas Gerais, além de maiores detalhes da distribuição geográfica de *C. gardneri*, registrada até o momento somente na localidade do tipo no Piauí e raros registros no território baiano, elucidarão estas lacunas e poderão compor um amplo estudo futuro com o gênero *Calydorea*.

Apêndice 1: Perfis de PCR para amplificação de DNA. (1) desnaturação inicial; (2) número de ciclos; (3) desnaturação, anelamento e amplificação em cada ciclo; (4) alongação final. A temperatura e a duração estão indicadas em cada etapa.

Trecho gênico	Perfis de PCR
<i>matK</i> + <i>matK</i> -5' <i>trnK</i> íntron	(1) 94°C-3 min; (2) 40; (3) 94°C-1 min, 53°C - 40 s, 72°C-2 min; (4) 72°C-5 min
<i>rbcL</i>	(1) 94°C-3 min; (2) 40; (3) 94°C-1 min, 55°C - 40 s, 72°C-2 min; (4) 72°C-5 min
<i>rps4</i> + espaçador <i>rps4</i> - <i>trnS</i>	(1) 94°C-3 min; (2) 40; (3) 94°C-1 min, 56°C - 40 s, 72°C-1:30 min; (4) 72°C-5 min
<i>rps16</i> íntron	(1) 94°C-3 min; (2) 40; (3) 94°C-1 min, 58°C - 40 s, 72°C-1:30 min; (4) 72°C-5 min
<i>trnL-F</i>	(1) 94°C-3 min; (2) 40; (3) 94°C-1 min, 56°C - 40 s, 72°C-1:40 min; (4) 72°C-5 min

Apêndice 2 – Inicializadores usados na amplificação (PCR) e seqüenciamento (Seq). LESE - Laboratoire de Ecologie Systématique et Evolution; LSM – Laboratório de Sistemática Molecular.

Inicializadores	Direção	PCR/Sequenciamento	Sequência dos Inicializadores 5'-3'	Fonte
<i>matK</i> + <i>matK</i>-5'<i>trnK</i> íntron				
<i>matK-f1</i>	Forward	PCR,Seq	ATGGAAGAATTACAAGGATAT	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>trnK-2r</i>	Reverse	PCR,Seq	AACTAGTCGGATGGAGTAG	(Johnston & Soltis 1995)
<i>matK-f2</i>	Forward	Seq	CATATAAACCAATTATCAAAC	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>matK-f3</i>	Forward	Seq	CTTGTCTAAAGCTCAATTTTG	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>matK-r1</i>	Reverse	Seq	ATCCTGTACGATTGATACC	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>matK-r2</i>	Reverse	Seq	AGTTTGATAATTGGTTTATATG	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>rbcL</i>				
<i>rbcL-1f</i>	Forward	PCR,Seq	ATGAGTTGTAGGGAGGGACT	(Reeves <i>et al.</i> 2001)
<i>rbcL-1360r</i>	Reverse	PCR,Seq	CTTCACAAGCAGCAGCTAGTTC	(Reeves <i>et al.</i> 2001)
<i>rbcL-656f</i>	Forward	Seq	TGCGTTGGAGAGACCGTTTC	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>rbcL-675r</i>	Reverse	Seq	GAAACGGTCTCTCCAACGC	(Chauveau <i>et al.</i> 2012)
<i>rps4</i> + espaçador <i>rps4-trnS</i>				
<i>rps4-f</i>	Forward	PCR,Seq	ATGTCCCGTTATCGAGGACCT	(Souza-Chies <i>et al.</i> 1997)
<i>trnS-r</i>	Reverse	PCR,Seq	TACCGAGGGTTCGAATC	(Souza-Chies <i>et al.</i> 1997)
<i>rps16</i> Íntron				
<i>rps16-f</i>	Forward	PCR,Seq	GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT	(Oxelman <i>et al.</i> 1997)
<i>rps16-r2</i>	Reverse	PCR,Seq	TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC	(Oxelman <i>et al.</i> 1997)
<i>trnL-F</i>				
c B49317	Forward	PCR,Seq	CGAAATCGGTAGACGCTACG	(Taberlet <i>et al.</i> 1991)
f A50272	Reverse	PCR,Seq	ATTTGAACTGGTGACACGAG	(Taberlet <i>et al.</i> 1991)
e B49873	Forward	Seq	GGTTCAAGTCCCTCTATCCC	(Taberlet <i>et al.</i> 1991)
d A49855	Reverse	Seq	GGGGATAGAGGGACTTGAAC	(Taberlet <i>et al.</i> 1991)

Apêndice 3 – Sequências depositadas no GenBank para as espécies *Calydorea pallens* Griseb., *Cardiostigma longispatha* (Herb.) Baker e *Cardiostigma mexicana* (Goldblatt & Henrich) Ravenna. Registros no BOLD estão abaixo da tabela.

Espécie	Região gênica	GenBank
<i>Calydorea pallens</i>	Sequência parcial gene matK, 3' region	AJ580607.1
	Sequência parcial gene matK, 5' region	AJ580606.1
	Sequência parcial gene rps16, intron	AJ578770.1
	Sequência parcial gene rbcL	AJ309682.1
	Sequência parcial do gene tRNA-Leu do espaçador intergênico trnL-trnF	AJ409596.1
	Sequência parcial gene rps4	AJ409033.1
<i>Cardiostigma longispatha</i>	Sequência parcial gene 18S; ITS1, 5.8S, ITS2 e Sequência parcial do gene 28S	DQ224199.1
	Sequência parcial gene 18S; ITS1, 5.8S, ITS2 e Sequência parcial do gene 28S	DQ224198.1
<i>Cardiostigma mexicana</i>	Sequência parcial gene do pseudogene matK	AM940207.1
	Sequência parcial on íntron do gene rps4	AM940195.1
	rbcL	AM940184.1
	Sequência parcial gene íntron do gene rps16	AM940172.1

Registros de *Calydorea pallens* no BOLD: GBVC2467-11 (*rbcL*) e GBVC2466-11 (*matK*).

Apêndice 4: Sequências mais similares e respectivas espécies contidas no BOLD-ID a partir de sequências *matK* e *rbcL* das espécies *Calydoea alba* (SP522), *C. crocoides* (SP513) e *C. pallens* (SP547).

Código BOLD	Espécie	Similaridade (%)
<i>matK Calydoea alba</i> (SP522)		
GBVC2275-11	<i>Ainea konzattii</i>	99,42
GBVC2466-11	<i>Calydoea pallens</i>	98,85
GBVC3255-11	<i>Nemastylis tenuis</i>	98,73
<i>matK Calydoea crocoides</i> (SP513)		
GBVC3270-11	<i>Onira unguiculata</i>	98,96
GBVC2275-11	<i>Ainea konzattii</i>	98,85
GBVC2812-11	<i>Herbertia pulchella</i>	98,73
GBVC2466-11	<i>Calydoea pallens</i>	98,27
<i>matK Calydoea pallens</i> (SP547)		
GBVC2466-11	<i>Calydoea pallens</i>	99,98
GBVC2275-11	<i>Ainea konzattii</i>	99,19
GBVC3255-11	<i>Nemastylis tenuis</i>	98,5
<i>rbcL Calydoea alba</i> (SP522)		
GBVC3269-11	<i>Onira unguiculata</i>	98,91
GBVC2276-11	<i>Ainea konzattii</i>	98,8
GBVC2467-11	<i>Calydoea pallens</i>	98,67
<i>rbcL Calydoea crocoides</i> (SP513)		
GBVC3269-11	<i>Onira unguiculata</i>	100
GBVC2276-11	<i>Ainea konzattii</i>	99,52
GBVC2813-11	<i>Herbertia pulchella</i>	99,52
GBVC2467-11	<i>Calydoea pallens</i>	98,39
<i>rbcL Calydoea pallens</i> (SP547)		
GBVC2467-11	<i>Calydoea pallens</i>	100
GBVC3256-11	<i>Nemastylis tenuis</i>	99,64
GBVC-11	<i>Ainea konzattii</i>	99,52

Apêndice 5: Sequências mais similares obtidas com MEGABLAST (highly similar sequence) no GenBank a partir do *matK* e *rbcL* das espécies *Calydorea alba* (SP522), *C. crocoides* (SP513) e *C. pallens* (SP547) deste estudo.

Código GenBank	Espécie	Similaridade (%)
<i>matK Calydoea alba</i>		
AM940213.1	<i>Nemastylis tenuis</i>	98
AM940209.1	<i>Cypella rosei</i>	97
AM940210.1	<i>Cypella mexicana</i>	97
<i>matK Calydoea crocoides</i>		
AJ579975.1	<i>Onira unguiculata</i>	98
AM940213.1	<i>Nemastylis tenuis</i>	98
AM940209.1	<i>Cypella rosei</i>	97
<i>matK Calydoea pallens</i>		
AM940213.1	<i>Nemastylis tenuis</i>	99
AM940209.1	<i>Cypella rosei</i>	98
AM940210.1	<i>Cypella mexicana</i>	97
<i>rbcL Calydoea alba</i>		
AM940183.1	<i>Ainea konzattii</i>	99
AM940190.1	<i>Nemastylis tenuis</i>	99
AJ577251.1	<i>Onira unguiculata</i>	99
<i>rbcL Calydoea crocoides</i>		
AM940190.1	<i>Nemastylis tenuis</i>	99
AJ577251.1	<i>Onira unguiculata</i>	99
AM940189.1	<i>Nemastylis convoluta</i>	98
<i>rbcL Calydoea pallens</i>		
AJ309682.1	<i>Calydorea pallens</i>	100
AM940190.1	<i>Nemastylis tenuis</i>	99
AJ577251.1	<i>Onira unguiculata</i>	99

Apêndice 6: Perfil das distâncias genéticas do *matK* em relação à sequência AJ580606.1 *Calydorea pallens*. A diferença percentual (\neq %) e o número de pares de bases desiguais (\neq pb) foram calculadas no TaxonDNA com recurso >"query against sequences". Obs: a sequência AJ580606 possui 1315 pb e as demais sequências 1864 pg, ou seja, um diferença inicial de 549 pb na extensão total.

\neq %	\neq pb	Acesso
0,0000	0	AJ580606 <i>C. pallens</i>
0,0000	549	SP547 <i>C. pallens</i>
0,4563	555	SP 503 <i>C. amabilis</i>
0,5323	556	SP576 <i>C. undulata</i>
0,9125	561	SP577 <i>C. azurea</i>
1,0646	563	SP522 <i>C. alba</i>
1,2167	565	SP578 <i>C. minima</i>
1,2167	565	SP875 <i>C. xiphioides</i>
1,2928	566	SP525 <i>C. approximata</i>
1,2928	566	SP890 <i>C. basaltica</i>
1,3688	567	SP513 <i>C. crocoides</i>
1,4449	568	SP515 <i>C. crocoides</i>
1,4449	568	SP516 <i>C. approximata</i>
1,4449	568	SP526 <i>C. campestris</i>
3,2700	539	SP546 <i>Cardiostigma mexicana</i>
3,2700	592	SP548 <i>Cardiostigma longispatha</i>

Apêndice 7: Perfil das distâncias genéticas do *rbcL* em relação à sequência AJ309682.1 *Calydorea pallens*. A diferença percentual (\neq %) e o número de pares de bases desiguais (\neq pb) foram calculadas no TaxonDNA com recurso >"query against sequences". Obs: a sequência AJ580606 possui 1339 pb e demais sequências com 1406 pb (amostras SP) e 548 (amostras ESC).

\neq %	\neq pb	Acesso
0,0000	0	AJ580606 <i>C. pallens</i>
0,0000	0	SP547 <i>C. pallens</i>
0,2240	70	SP576 <i>C. undulata</i>
0,4481	73	SP 503 <i>C. amabilis</i>
0,5228	74	SP516 <i>C. approximata</i>
0,5228	74	SP525 <i>C. approximata</i>
0,5228	74	SP890 <i>C. basaltica</i>
0,5228	74	SP526 <i>C. campestris</i>
0,5228	74	SP513 <i>C. crocoides</i>
0,5228	74	SP515 <i>C. crocoides</i>
0,7299	04	JB <i>C. amabilis</i>
0,7299	04	ESC 342 <i>C. cf campestris</i>
0,7299	04	ESC 218 <i>C. crocoides</i>
0,7299	04	ESC 661 <i>C. crocoides</i>
0,8215	78	SP875 <i>C. xiphioides</i>
0,8962	79	SP577 <i>C. azurea</i>
0,9124	05	ESC 249 <i>C. approximata</i>
1,1202	82	SP522 <i>C. alba</i>
1,1949	83	SP578 <i>C. minima</i>
1,2774	07	AITA 45M <i>C. alba</i>
1,2774	07	ESC 516 <i>C. alba</i>
1,2774	07	ESC 330c <i>C. campestris</i>
1,4599	08	ESC 519 <i>C. alba</i>
1,4599	08	HUEFS 1875 <i>C. gardneri</i>
1,6423	09	ESC 330a <i>C. campestris</i>
1,7177	90	SP548 <i>Cardisotigma longispatha</i>
1,7177	59	SP546 <i>Cardiostigma mexicana</i>
1,8248	10	AITA 45A a <i>C. Alba</i>
1,8248	10	HUEFS 4 <i>C. gardneri</i>
2,0073	11	AITA 45 M <i>C. Alba</i>
2,1898	12	AITA 45 A b <i>C. Alba</i>
2,5547	14	ESC 330 b <i>C. campestris</i>