

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

DAIANE GONÇALVES FERREIRA

TAXONOMIA E RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE *Phalocallis* HERB.
(IRIDACEAE-IRIDOIDEAE)

GUARAPUAVA

2021

DAIANE GONÇALVES FERREIRA

**TAXONOMIA E RELAÇÕES FILOGENÉTICAS EM *Phalocallis* HERB.
(IRIDACEAE-IRIDOIDEAE)**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de concentração em Biologia Evolutiva)

Orientador: Prof^o. Dr. Adriano Silvério

Coorientadora: Prof^a Dr^a Rosângela Capuano Tardivo

GUARAPUAVA

2021

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

Ferreira, Daiane Gonçalves

F383t Taxonomia e relações filogenéticas de *Phalocallis* Herb. (*Iridaceae-Iridoideae*) / Daiane Gonçalves Ferreira. – – Guarapuava, 2021.
xi, 105 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste em Associação Ampla com UEPG, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva. Área de concentração: Biologia Evolutiva, 2021.

Orientador: Adriano Silvério

Coorientadora: Rosângela Capuano Tardivo

Banca Examinadora: Tatiana Teixeira de Souza Chies, Tamara Pastori

Bibliografia

1. Anatomia. 2. Biodiversidade. 3. Endemismo. 4. Filogenia. 5. Iridaceae.
I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva.

CDD 575



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro-Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



DAIANE GONÇALVES FERREIRA

“Taxonomia e relações filogenéticas em *Phalocallis* Herb. (Iridoideae-Iridaceae)”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva”, no Programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela comissão formada pelos professores:

Prof. Dr. Adriano Silvério

(Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO)

Profa. Dra. Tatiana Teixeira de Souza Chies

(Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS)

Profa. Dra. Tamara Pastori

(Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS)

Guarapuava, 25 de agosto de 2021.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder a perseverança em seguir em frente e vencer as adversidades e a Nossa Senhora que me consolou nos momentos difíceis e me guiou nessa jornada.

Aos meus alicerces, meu pai Aldo Ferreira e minha mãe Angelita Gonçalves, por toda a educação dada a mim e pelos exemplos que levarei por toda a minha vida.

Obrigada as minhas avós, que apesar de pouco entenderem do meio acadêmico, sempre estiveram torcendo por mim. Agradeço também toda a minha família pelas motivações e orações. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao Henrique Giongo, pelos vários puxões de orelha e conselhos. Obrigada pelo apoio incondicional e por me ajudar tanto, difícil poder retribuir toda ajuda.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Adriano Silvério, pelos ensinamentos e conselhos dados a mim durante esses anos de orientação. Obrigada pela compreensão, paciência e pela amizade construída nesse período. A minha coorientadora, professora Rosângela Tardivo, pela jornada durante esse ciclo de mestrado. Espero poder trabalhar com vocês novamente.

A banca, professora Tamara Pastori e professora Tatiana Chies, por terem aceitado participar e contribuir com correções ao estudo. Agradeço também a professora Bruna Saviatto e ao professor André pela participação na banca de Qualificação e pelos ensinamentos no decorrer do caminho.

A todos os professores pelos ensinamentos e experiências que contribuíram para a minha formação, desde o Magistério até o Mestrado. Agradeço especialmente aqueles que acreditaram em mim e que ainda hoje levo no coração.

Agradeço a professora Tânia Maria de Moura, pelos ensinamentos ao longo da nossa convivência, ensinamentos que hoje pude aplicar na dissertação.

Aos meus queridos amigos que a faculdade proporcionou, Daniela, Aline, Isac, Letícia, Paula, Carol pelos momentos de descontração, risos, pelas piadas e motivação, obrigada pela companhia durante os chás da tarde, sentirei muita falta desses momentos.

Aos amigos de longa data, Natália, Diego, Isis, Renata, Elaine, Luan, Cheila, obrigada pela jornada, pela amizade e principalmente pelas mensagens de apoio.

Aos meus colegas, já considerados grandes amigos, do Laboratório de Botânica Estrutural. Entre saídas de campo e ajuda nos experimentos, lembrarei dos momentos com muito carinho.

Ao professor Paulo Roberto, a Gabriela e a Laura pelo apoio em obter os dados moleculares, sem vocês com certeza teria sido mais difícil.

Aos meus colegas de mestrado, Bruna, Felipe, Yuri e, em especial a Karoline, por dividir comigo todo o caminho do mestrado, vindo desde a graduação.

A todos que participaram da minha trajetória e da minha formação, meus sinceros agradecimentos.

A todos que me colocaram em suas orações, em especial a minha madrinha Rosa, que nunca deixou de rezar por mim todos os dias.

Por fim, agradeço a Capes pela bolsa, ao Program de Pós Graduação em Biologia Evolutiva e a Universidade Estadual do Centro Oeste.

Obrigada à todos.



“[...] Não se diz bom quem tem um intelecto bom, mas uma vontade boa.”

São Tomás de Aquino

Lista de figuras

Figura 1: Pontos de coletas para as espécies utilizadas no trabalho.

Figura 2: Areas de coleta de *Phalocallis* sp e *Phalocallis* sp1.

Figura 3: Distribuição geográfica de *Phalocallis coelestis*.

Figura 4: Distribuição geográfica de *Phalocallis geniculata*.

Figura 5: Distribuição geográfica de *Phalocallis oreophila*.

Figura 6: Espécies de *Phalocallis*, com destaque para flor e hábito.

Figura 7: Anatomia floral de *Phalocallis coelestis*.

Figura 8: Anatomia floral de *Phalocallis* sp.

Figura 9: Anatomia floral de *Phalocallis* sp.1.

Figura 10: Anatomia floral de *Gelasine coerulea*.

Figura 11: Anatomia floral de *Cypella herbertii*.

Figura 12: Anatomia foliar de *Phalocallis coelestis*, *Phalocallis* sp1, *Gelasine coerulea* e *Cypella herbertii*.

Figura 13: Morfologia dos pólen de *Phalocallis* sp, *Phalocallis* sp1, *Phalocallis coelestis*, *Gelasine coerulea* e *Cypella herbertii*.

Figura 14: Gráfico Box plot dos tamanhos polínicos de *Phalocallis* e *Gelasine*.

Figura 15: Filogenia de Tigridaeae adaptada de Chauveau *et al.* 2012.

Figura 16: Filogenia com a melhor árvore obtida a partir da análise de Máxima Verossimilhança.

Figura 17: Filogenia com a melhor árvore obtida a partir da análise de Inferência Bayesiana.

Lista de tabelas

Tabela 01: Lista de espécies coletadas durante o trabalho, com seus respectivos locais de coleta e números de herbário.

Tabela 02: Caracteres morfológicos de *Phalocallis* sp, *Phalocallis* sp.1, *Phalocallis coelestis*, *Phalocallis geniculata* e *Phalocallis oreophila* (com base em materiais herborizados e cultivados), com destaque para os caracteres distintivos entre os acessos.

Tabela 03: Lista de nomes considerados aceitos (V), não aceitos (-), sinonimizados (S) e não listados (0) para o gênero *Phalocallis*, de acordo com os sites The plant list (TPL), World Checklist of Selected Plant Families (Kew), Encyclopedia of Life (EOL), Flora do Brasil 2020 (Reflora), Specieslink (SL) e Flora del Conosur (IBODA).

Tabela 04: Lista de espécies analisadas durante o trabalho, com seus respectivos pontos de coleta e números de herbário.

Tabela 05: Caracteres da anatomia floral de *Phalocallis coelestis*, *Phalocallis* sp, *Phalocallis* sp.1, *Gelasine coerulea* e *Cypella herbertii*

Tabela 06: Aspectos da anatomia foliar em *Phalocallis*, *Gelasine* e *Cypella*.

Tabela 07: Medidas dos grãos de pólen.

Tabela 08: Espécies utilizadas para extração de DNA.

Tabela 09: Relação dos *primers* e sequências utilizadas na amplificação de DNA cloroplastidial

Resumo

Phalocallis Herb pertence à família Iridaceae, subfamília Iridoideae, tribo Tigridieae. É formado por plantas herbáceas, com flores arroxeadas a violeta azuladas, com unguículas marrons e manchas amarelas. *Phalocallis* é representado por três espécies com distribuição na América do Sul, *Phalocallis coelestis* (Lehm) Ravenna, *Phalocallis geniculata* (Klatt) Ravenna e *Phalocallis oreophila* (Speg.) Ravenna. O gênero possui um longo histórico taxonômico, ainda com divergências quanto a delimitação e validação das espécies. O objetivo geral deste estudo é fornecer dados para elucidar questões referentes à taxonomia de *Phalocallis*, utilizando diversas abordagens metodológicas. Para isso foi realizado uma caracterização morfológica do gênero, além da anatomia floral, anatomia foliar e descrição dos grãos de pólen. Também foram empregadas análises filogenéticas com a utilização de dois marcadores plastidiais. É apresentada uma revisão das espécies reconhecidas, respectivos mapas de distribuição, ilustrações e chave de identificação. O presente estudo resultou na descrição de uma nova espécie pertencente ao gênero, a qual possivelmente já se encontra ameaçada de extinção. Os dados morfológicos e anatômicos revelaram algumas novidades para o gênero, como a presença de papilas na folha e de tecido secretor na região do conectivo da antera, indicando que o gênero oferta de três recursos ao polinizador. Diferenças estruturais também foram observadas na região da antera, além dos grãos de pólen, que apresentaram distinções no tamanho e no padrão da exina, demonstrando que os caracteres anatômicos podem contribuir para a taxonomia do grupo.

Palavras chave: Anatomia, Biodiversidade, Endemismo, Filogenia, Iridaceae.

Abstract

Phalocallis Herb belongs to the family Iridaceae, subfamily Iridoideae, tribe Tigridieae. It is formed by herbaceous plants, with purplish to bluish violet flowers, with brown spots and yellow stains. *Phalocallis* is represented by three species with distribution in South America, *Phalocallis coelestis* (Lehm) Ravenna, *Phalocallis geniculata* (Klatt) Ravenna and *Phalocallis oreophila* (Speg.) Ravenna. The genus has a long taxonomic history, still with divergences regarding the delimitation and validation of the species. The objective of this study is to provide data to elucidate questions regarding the taxonomy of *Phalocallis* using different methodological approaches. For this, a morphological characterization of the genus was carried out, in addition to the floral anatomy, leaf anatomy and description of pollen grains. Phylogenetic analyzes were also performed using two plastid markers. A review of the recognized species, their distribution maps, illustrations and identification key is presented. The present study resulted in the description of a new species belonging to the genus, which is possibly already threatened with extinction. The morphological and anatomical data revealed some novelties for the genus, such as the presence of papillae on the leaf and of secretory tissue in the anther connective region, indicating that the genus offers three resources to the pollinator. Structural differences were also observed in the anther region, in addition to the pollen grains, which showed differences in the size and pattern of the exine, demonstrating that the anatomical characters may contribute to the taxonomy of the group.

Key words: Anatomy, Biodiversity, Endemism, Iridaceae, Phylogeny.

Sumário

APRESENTAÇÃO.....	1
INTRODUÇÃO GERAL	2
A família Iridaceae Jussieu nom. cons.	2
Sistemática e filogenia da família	3
A tribo Tigridieae	3
Gênero <i>Phalocallis</i> Herb.	4
Características morfológicas	4
Histórico e posicionamento taxonômico	5
Diversidade de espécies e distribuição geográfica	5
OBJETIVOS.....	6
Objetivo geral	6
Objetivos específicos	6
REFERÊNCIAS	7
CAPITULO I: SINOPSE TAXONÔMICA EM <i>Phalocallis</i> HERB.....	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS	10
Coleta e herborização de material	11
Distribuição geográfica, habitat e período de floração.....	11
Descrições	11
RESULTADOS	13
Chave para as espécies de <i>Phalocallis</i>	13
Tratamento taxonômico	13
REFERÊNCIAS	27
CAPITULO II: CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATOMICA DE <i>PHALOCALLIS</i> HERB. E ESPÉCIES COMPARATIVAS	30
INTRODUÇÃO	31
Anatomia floral e foliar	31
Estudos palinológicos	32
MATERIAL E MÉTODOS	33
Material Vegetal:.....	33
Método de inclusão e microscopia de campo claro	34
Método de reidratação de amostra herborizada.....	34
Testes histoquímicos	34

Análise dos estratos parietais do endotécio	35
Dados palinológicos.....	35
RESULTADOS	36
Anatomia floral.....	36
Anatomia foliar.....	54
Dados Palinológicos.....	58
DISCUSSÃO	61
Anatomia floral.....	61
Anatomia foliar.....	66
Dados palinológicos.....	67
CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
Capítulo III: Delimitação filogenética de <i>Phalocallis</i> Herb.....	73
INTRODUÇÃO	74
METODOLOGIA	77
Coleta do material e extração de DNA.....	77
Amplificação e sequenciamento	78
Análises filogenéticas	80
RESULTADOS	81
DISCUSSÃO	85
CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIA	89
PROPOSTA DE ARTIGO:	92
CONCLUSÃO GERAL	93
Referências finais	94

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação está estruturada em uma introdução geral sobre a família Iridaceae e interações taxonômicas da tribo Tigridieae e do gênero *Phalocallis*, três capítulos e um artigo sendo eles:

Capítulo I:

Sinopse taxonômica de *Phalocallis* Herb

Capítulo II:

Caracterização anatômica de *Phalocallis* Herb. e espécies comparativas

Capítulo III:

Delimitação filogenética de *Phalocallis* Herb

Artigo:

New species of *Phalocallis* Herbert (Iridaceae: Tigridieae) from Paraná, Brazil

INTRODUÇÃO GERAL

A família Iridaceae Jussieu nom. cons.

A família Iridaceae pertence à ordem Asparagales (APG IV, 2016), apresenta cerca de 2000 espécies distribuídas em 66 gêneros, sendo considerada a segunda maior família desta ordem (GOLDBLATT e MANNING, 2008). Iridaceae possui uma ampla distribuição, Goldblatt e Manning (2008) descrevem a África Subsaariana como o principal centro de origem da família, Coccuci e Vogel (2001) consideram também a América do Sul como um centro evolutivo e possível centro de origem e dispersão de alguns gêneros. No Brasil, segundo a lista de espécies da Flora do Brasil 2020, existem 26 gêneros (sendo cinco endêmicos), 212 espécies (115 endêmicas), 16 subespécies (6 endêmicas), ocorrendo em todos os domínios fitogeográficos brasileiros (EGGERS *et al.*, 2020).

Iridaceae compreende plantas de hábito herbáceo, podendo ser perenes ou decíduais, raramente anual (*Sisyrinchium* L.), ocasionalmente arbustos com crescimento secundário (*Klattia* Back, *Nivenia* Vent. e *Witsenia* Thum.). Possuem rizoma, cormo, bulbo ou caule lenhoso, no caso de espécies arbustivas. Folhas paralelinérvias, planas ou cilíndricas, às vezes duas ou três inferiores, as folhas caulinares possuem lâminas unifaciais, nervação paralela, com ou sem nervação central distinta (GOLDBLATT *et al.*, 1998). Inflorescência ripídio, às vezes, reduzidas a uma flor solitária terminal, escapos eretos, cilíndricos ou achatados. As flores são actinomorfas ou zigomorfas, protegidas por brácteas, sendo geralmente pediceladas, apresentam seis tépalas, subiguais ou distintas, livres ou unidas, distribuídas em dois verticilos; androceu possui três estames, opostos as tépalas externas, livres ou unidos, às vezes adnatos às tépalas, anteras livres, às vezes adnatas aos ramos do estilete, grãos de pólen geralmente são monossulcados; gineceu com ovário ínfero (exceto em *Isophysis* T. Moore ex Seem), gamocarpelar, tricarpelar, trilocular, com placentação axial, os óvulos podem ser poucos ou numerosos, anátropos ou campilótropos, ramos do estilete podem ser livres ou parcialmente conatos, podem apresentar modificações (petaloides), com dois ou três estigmas terminais, também podem estar na superfície abaxial dos ramos do estilete. O fruto é uma cápsula loculicida, com uma a muitas sementes globosas ou piramidais por lóculo (GOLDBLATT, 1990; GOLDBLATT E MANNING, 2008; CHUKR E CAPELLARI, 2003; JUDD *et al.*, 2007).

O nome para a família deriva do gênero *Iris* L., descrito por Carolus Linnaeus em 1753, em referência à deusa grega Íris. Segundo a mitologia, ela é a responsável por levar as

mensagens ao Monte Olimpo através de um arco íris, cujas cores podem ser observadas nas flores de muitas espécies desta família (MANNING, 2004).

Sistemática e filogenia da família

Iridaceae foi inicialmente enquadrada na ordem Liliales de acordo com caracteres morfológicos (DAHLGREN E BREMER, 1985; CRONQUIST, 1988; DAHLGREN, 1989). Posteriormente, análises moleculares utilizando DNA cloroplastidial, confirmaram a família como pertencente a ordem Asparagales (APG III, 2009).

Goldblatt (1990) realizou um estudo cladístico englobando caracteres morfológicos, anatômicos, fitoquímicos, citológicos e de estrutura do grão de pólen. O autor sugeriu a existência de quatro subfamílias: Isophysidoideae Thorne & Reveal, Nivenioideae Goldblatt, Iridoideae Eaton (com quatro tribos) e Ixioideae Goldblatt (com três tribos). Empregando o uso de estudos moleculares, Souza-Chies *et al.* (1997) foram os primeiros a trabalhar as relações filogenéticas da família e demonstrar Nivenioideae como parafilética e a necessidade de um reorganização nomenclatural dos táxons ali posicionados, eles utilizaram sequências do gene plastidial *rps4* e confirmaram o monofiletismo da família. Goldblatt *et al.* (2008) publicaram uma filogenia, consideraram cinco regiões plastidiais (*rbcL*, *rpsL*, *trnL-F*, *matK* e *rps16*), onde propõem a divisão de sete subfamílias: Isophysidoideae, Patersonioideae Goldblatt, Geosiridoideae Goldblatt & Manning, Aristeoideae Vines, Nivenioideae, Crocoideae G.T. Burnett e Iridoideae.

Iridoideae é a única subfamília com representantes nativos no neotrópico. É formada por cinco tribos: Irideae Kitt (ocorre na África, Eurásia e América do Norte), Sisyrinchieae Klatt (Américas e Australásia), Trimezieae Ravenna (América Central e do Sul), Tigridieae Kitt (sul da América do Norte, América Central e do Sul) e Diplarreneae Labill (Austrália e Tasmânia) (GOLDBLATT E MANNING, 2008).

A tribo Tigridieae

Tigrideae compreende de 15 a 20 gêneros e 172 espécies, caracterizam-se pela presença de bulbo, folhas plicadas, flores actinomorfas com tépalas livres e ramos do estilete achatados a petalóides, sendo simples ou bifurcados (GOLDBLATT E MANNING, 2008).

Distribui-se desde o sul da América do Norte até a América do Sul (GOLDBLATT *et al.*, 2008), com dois principais centros de biodiversidade, um no México e outro na América do Sul (RODRIGUEZ E SYSTMA, 2006). Se trata de uma tribo de taxonomia complexa e relações

evolutivas ainda pouco compreendidas, devido à grande variação morfológica e duração curta das flores, além da dificuldade de herborização do material.

Goldblatt (1982) dividiu em duas subtribos, *Cipurinae* Benth. e Hook, caracterizada pelo número básico cromossômico $X=7$, ramos do estilete petalóides ou cilíndricos, bifurcados ou simples, filetes livres e pólen monossulcado e subtribo *Tigridiinae* Pax., com número cromossômico $=14$, ramos do estilete cilíndricos, filetes unidos e pólen bissulcado.

Análises cladísticas feitas por Rodriguez e Sytsma (2006), baseadas em dados morfológicos e moleculares, reconheceram o monofiletismo da tribo e a divisão em duas subtribos. Porém, ocorreram alterações em alguns gêneros nas subtribos, demonstrando que a inserção de dados morfológicos nas análises, leva a conclusões distintas do que utilizando apenas dados de genoma. Esse fato pode ser útil nas interpretações evolutivas e biogeográficas do grupo. Já Chauveau *et al.* (2012), aponta que as subtribos não são monofiléticas e propõem a divisão da tribo em dois clados (A e B). O clado A abrigou os gêneros *Ainea* Ravenna, *Calydorea* Herb., *Catila* Ravenna, *Cipura* Aubl., *Cypella* Herb., *Herbertia* Sweet, *Kelissa* Ravenna, *Larentia* Klatt, *Nemastylis* Nutt e *Onira* Ravenna, o clado B agregou os gêneros *Alophia* Herb., *Cardenanthus* Forster, *Eleutherine* Herb., *Ennealophus* N. E. Br., *Fosteria* Molseed, *Gelasine* Herb., *Hesperoxiphion* Baker, *Phalocallis* Herb., *Mastigostyla* Johnst, *Sessilanthera* Molseed e Cruden e *Tigridia* Juss.

Gênero *Phalocallis* Herb.

Características morfológicas

Phalocallis é formado por plantas herbáceas, bulbosas, com túnicas marrons a alaranjadas com colar longo. Folhas equitantes, ensiformes e plicadas. Caule florífero terete, dicotômico, com brácteas. Sinflorescência de ripídios pedunculados 2–3, protegidos por uma bráctea, com a valva externa menor que a interna. Flores arroxeadas a violeta azuladas, com unguículas marrons e manchas amarelas. Tépalas livres e desiguais, sendo a externa maior, obovada, patente, tépala interna menor, estreita, com porção distal alargada e revoluta, portando tricomas; androceu com filetes conatos na base e curtos, anteras basifixas com um amplo conectivo; gineceu com estilete longo, cilíndrico, com ápice trifurcado portando cristas terminais petalóides, levemente cuculadas, azuladas a arroxeadas. Cápsulas oblongas. Sementes trígonas (EGGERS *et al.*, 2020).

Histórico e posicionamento taxonômico

Phalocallis está incluído na subfamília Iridoideae, tribo Tigrideae (CHAUVEAU *et al.*, 2012). Possui um longo histórico taxonômico, sendo que ainda existem divergências quanto a delimitação e validação das espécies. Willian Herbert, em 1839, a partir de *Cypella plumbea* Lindl., publicada em 1838, descreveu o gênero *Phalocallis*. A espécie foi então recombinação, passando a ser *Phalocallis plumbea* (Lindl) Herb. John Baker, incluiu *Phalocallis* em *Cypella* Herb, em 1892. Pierfelice Ravenna, a princípio tratou *Phalocallis* como um subgênero dentro de *Cypella* (RAVENNA, 1964). Posteriormente em 1977, reconheceu como gêneros distintos, evidenciando diferenças principalmente pela inflorescência e morfologia das tépalas internas, as quais apresentam duas áreas hirsutas nas laterais da lâmina (RAVENNA, 1977). Goldblatt e Manning (2008) sinonimizaram o gênero novamente em *Cypella*, com base na morfologia floral. Ravenna (2009) incluiu *Cypella geniculata* (Klatt) Ravenna e *Cypella oreophila* Speg. em *Phalocallis* e propôs uma chave taxonômica para distingui-los e Chauveau *et al.* (2012) propuseram *Phalocallis* e *Cypella* como gêneros distintos, baseando-se em análises filogenéticas. Essas análises também revelaram *Phalocallis* próximo de *Gelasine elongata* (Graham) Ravenna, demonstrando uma maior proximidade filogenética com o gênero *Gelasine* Herb. do que com *Cypella*, que apesar de sua similaridade morfológica ficou relativamente afastado de *Phalocallis*.

Diversidade de espécies e distribuição geográfica

Phalocallis está representado por 3 espécies com distribuição na América do Sul. No Brasil, Eggers *et al.* (2020), citam 2 espécies nativas: *Phalocallis coelestis* (Lehm) Ravenna, restrita à região Sul, nos Biomas Mata Atlântica e Pampa e *Phalocallis geniculata* (Klatt) Ravenna, ocorrendo no Cerrado nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Segundo a Flora del Conosur (IBODA, 2020), além dessas duas espécies uma terceira é aceita, *Phalocallis oreophila* (Speg.) Ravenna, descrita para o Paraguai e Argentina.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Este estudo tem como principal objetivo levantar caracteres e estados de caracteres (morfológicos, anatômicos, moleculares, citogenéticos e palinológicos), visando uma busca por evidências taxonômicas contribuindo na circunscrição do gênero *Phalocallis*, bem como para a sistemática do grupo.

Objetivos específicos

- Elaborar um tratamento taxonômico para espécimes de *Phalocallis*, utilizando as evidências taxonômicas;
- Descrever a anatomia floral e foliar de três acessos de *Phalocallis* e de algumas espécies associadas morfollogicamente e/ou filogeneticamente ao gênero, visando a comparação entre elas.
- Levantar dados de ordem palinológica e citogenética, visando a compreensão de possíveis ploidias para o grupo.
- Interpretar as relações filogenéticas em *Phalocallis* e espécies/gêneros associados, especialmente *Cypella*: clado A e *Gelasine*: clado B, a fim de auxiliar no posicionamento taxonômico do gênero.

REFERÊNCIAS

- APG III (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 161: 105- 121, 2016.
- APG IV (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 181, 1-20, 2016.
- Baker, J.G. **Handbook of the Irideae**. London: George Bells & Sons, p. 248, 1892.
- Chauveau, O.; Eggers, L.; Souza-Chies, T. T.; Nadot, S. Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera. **Annals of Botany**, 110, 713-729, 2012.
- Chukr; Capellari.(coord.) Iridaceae In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Melhem, T.S., Giulietti, A.M., Kirizawa, M. (eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. Instituto de Botânica, São Paulo, 3:127-148, 2003.
- Cocucci, A. A.; Vogel, S. Oil-producing flowers of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. **Flora**, 196: 26–46, 2001.
- Cronquist, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: The New York Botanical Garden, 1988.
- Dahlgren, R.; Bremer, K. Major Clades of the Angiosperms. **Cladistics**, 1(4):349-368, 1985.
- Dahlgren, G. An updated angiosperm classification. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 100:197-203, 1989.
- Eggers, L., Gil, A., Lovo, J., Chukr, N. Iridaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB136>>. Acesso em novembro de 2020.
- Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB30046>>. Acesso em: 19 de novembro de 2020.
- Goldblatt, P. Chromosomic Cytology in Relation to Suprageneric Systematics of Neotropical Iridaceae. **Systematic Botany** 7(2):186-198, 1982
- Goldblatt, P. Phylogeny and classification of Iridaceae. **Ann Mo Bot Gard**.77:607-627, 1990.
- Goldblat, P.; Manning, J. C.; Bernhard, P. Adaptive radiation of bee-pollinated *Gladiolus* species (Iridaceae) in southern Africa. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. 85: 492–517, 1998.
- Goldblatt e Manning. The Iris family - natural history and classification. **Timber Press**. Portland, Oregon, USA, p.290, 2008

Goldblatt, P. Rodriguez, A. Powell, M. P., Davies, T. J., Manning, J. C., Van Der Bank, M., Savolainen, V. Iridaceae, Out of Australasia"? Phylogeny, Biogeography, and Divergence Time Based on Plastid DNA Sequences. **Systematic Botany**. 33: 495–508, 2008

Herbert, W. *Phalocallis plumbea* lead-coloured *Phalocallis*. **Botanical Magazine** 65-12:3710, 1839.

IBODA- Instituto de Botânica Darwinion. 2020. Disponível em: <<https://goo.gl/y6JMrU>> Acesso em: 19 de novembro. 2020.

Judd, W. S.; Campbell, C. S.; Kellogg, E. A.; Stevens, P. F.; Donoghue, M. J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2009.

Kew - Kew Royal Botanic Garden – World checklist of selected plant families – 2012. Disponível em: <apps.kew.org>. Acesso em novembro de 2020.

Manning, J. Iridaceae. 2004. Disponível em: <http://pza.sanbi.org/iridaceae>. Acesso em: 19 novembro 2020.

Ravenna, P. *Cypella* subg. *Phalocallis* (Herb.) Ravenna. **Revista del Instituto Municipal de Botánica**. Buenos Aires 2: 53, 1962[1964].

Ravenna, P. Notas sobre Iridaceae V. **Noticiario Mensual Museo Nacional de Historia Natural, Santiago** 21(249):7–9, 1977.

Ravenna, P. A survey in the genus *Cypella* and its allies (Iridaceae). **Onira** 12: 1–11, 2009

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

Souza-Chies, T. T.; Bittar, G.; Nadot, S.; Carter, L.; Besin, E. Lejeune, B. Phylogenetic analysis of Iridaceae with parsimony and distance methods using the plastid gene *rps4*. **Plant Systematics and Evolution**. 204:109-123, 1997.

Specieslink 2020. Disponível em:< <http://www.splink.org.br/>> Acesso em novembro de 2020.

The plant list, Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>. Acesso em novembro de 2020.

CAPITULO I: SINOPSE TAXONÔMICA EM *Phalocallis* HERB

INTRODUÇÃO

Phalocallis pertence à família Iridaceae, subfamília Iridoideae, tribo Tigridaeae (CHAUVEAU *et al.*, 2012), com três espécies distribuídas na América do Sul. Sendo duas com ocorrência descrita para o Brasil, *Phalocallis coelestis* (Lehm.) Ravenna e *Phalocallis geniculata* (Klatt) Ravenna (REFLORA, 2020), e uma com ocorrência descrita para o Paraguai e Argentina, *Phalocallis oreophila* (Speg.) Ravenna (IBODA, 2020). O gênero é representado por plantas herbáceas, geófitas com bulbo, com folhas equitantes e plicadas, caule florífero com brácteas, sinflorescência de ripídios pedunculados, flores arroxeadas a violeta azuladas, tépalas livres e desiguais, sendo a externa maior do que a interna, filetes conatos na base, anteras basifixas com um amplo conectivo, estilete longo, cilíndrico, com o ápice trifurcado portando cristas terminais roxas (EGGERS e CHAUVEAU, 2020).

O gênero foi descrito por Herbert em 1839, a partir de *Cypella plumbea* Lindl. Ravenna (1964) tratou *Phalocallis* como um subgênero subordinado de *Cypella* Herb. Porém, reconheceu, em trabalhos posteriores, como um gênero independente, com base em caracteres florais, principalmente devido a áreas hirsutas nas laterais das tépalas internas (RAVENNA, 1977). Em 2008, o gênero foi sinonimizado ao gênero *Cypella*, por Goldblatt e Manning e, posteriormente, foi tratado como gênero aceito (RAVENNA, 2009), informação confirmada por Chauveau *et al.* (2012) com base em estudos filogenéticos.

Phalocallis possui uma história taxonômica ampla, sendo que ainda apresenta problemas de delimitação das espécies. A exemplo dos dados on-line disponíveis sobre o gênero que trazem informações conflitantes quanto ao número de espécies (Tabela 03). Todos tratam o gênero como aceito, porém grande parte das espécies mencionadas são sinonimizadas a outros gêneros ou a *Phalocallis coelestis*. Duminil *et al.* (2012) aponta essa dificuldade na delimitação de alguns táxons, sendo plausível a ocorrência de diversos eventos evolutivos, como divergências filogenéticas, introgressão, elevada plasticidade fenotípica e diferenciação continua.

Por tanto, é apresentado um estudo do gênero visando reunir informações já existentes, além de novas descrições, acrescidas de caracteres relevantes para a delimitação das espécies em forma de uma chave de identificação e mapas de distribuição.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e herborização de material

O material fértil é proveniente de coletas realizadas nos meses de fevereiro e março, agosto e setembro, e novembro e dezembro, de 2016 a 2019 em áreas pertencentes ao bioma Mata Atlântica (figura 01). Posteriormente, os exemplares foram cultivados em vasos no Laboratório de Botânica Estrutural e em uma área externa (canteiro) no *campus* CEDETEG, Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, Paraná.

As amostras foram herborizadas de acordo com as técnicas usuais da taxonomia vegetal (PEIXOTO E MAIA, 2013) e tombadas nos herbários do Museu Botânico Municipal de Curitiba, Curitiba, PR (MBM) e do Instituto de Ciências Naturais, Porto Alegre, RS (ICN) (Tabela 01).

Distribuição geográfica, habitat e período de floração

A distribuição geográfica, habitat e período de floração foram obtido através de observações em campo, revisão de literatura, espécimes de herbário e em cultivo. Quando não haviam coordenadas geográficas nas exsicatas, as localidades foram georreferenciadas com o auxílio do Google Earth. Desse modo, esses pontos apresentam coordenadas aproximadas. Os mapas foram elaborados com o auxílio do programa Qgis 2.18 e editadas no Adobe Photoshop Cc.

Descrições

As descrições foram baseadas em caracteres vegetativos e reprodutivos, utilizando-se de material *in vivo* em cultivo no *campus* CEDETEG (Laboratório de Botânica Estrutural), fixado e em exemplares herborizados das coleções dos Herbários – MBM, HUPG, ICN, além das descrições originais e demais literaturas sobre o gênero. O sinônimos das espécies (Anexo 1) estão de acordo com Eggers e Chauveau (2020). As obras originais foram obtidas em parte através dos sítios: “Biodiversity Heritage Library”, “Botanicus Digital Library” e “Open Library”. A abreviatura dessas obras e autores seguem de acordo com os sites Tropicos Herbarium (TROPICOS, 2020) e World Checklist of Selected Plant Families (KEW, 2020). A terminologia utilizada segue Goldblatt e Manning (2008) e Bentje (2010). O conceito de espécie seguiu o conceito morfológico de Mayr (1970), baseado nas diferenças morfológicas entre as populações.

Outros sítios consultados foram Reflora (FLORA DO BRASIL, 2020), Species Link (SPECIESLINK, 2020), The Plant List (THE PLANT LIST, 2020), Encyclopedia of Life (EOL, 2020) e Flora del Conosur do Instituto Darwinion (IBODA, 2020).

Tabela 01: Lista de espécies coletadas durante o trabalho, com seus respectivos locais de coleta e números de herbário. (MBM: Museu Botânico Municipal de Curitiba; ICN: Instituto de Ciências Naturais)

Espécie	Figura	Local de coleta	Ponto no mapa	Herbário	Espécime Voucher
<i>Phalocallis coelestis</i>	1.A-C	Bituruna-PR	1	ICN	187425
<i>Phalocallis</i> sp*	1.D-F	Jardim Botânico de Faxinal do Céu-PR	2	MBM (holótipo) MBM (parátipo) MBM (parátipo)	287817 / /
<i>Phalocallis</i> sp1**	1.G-I	Parque Estadual de Vila Velha-PR	3	ICN (isótipo) MBM (holótipo)	199870 /

*= Espécie nova, artigo de descrição em fase de submissão, autores Ferreira, D. G., Tardivo, R. C., Arzorio, S. e Silvério, A. (2021) (Anexado no final da dissertação)

**= Espécie nova, está sendo publicada como *Phalocallis* sp nov, autores Pontarollo, E.; Silvério, A., Tardivo, R. C. (2021), artigo em fase de submissão.

/ = Aguardando o número tombo.

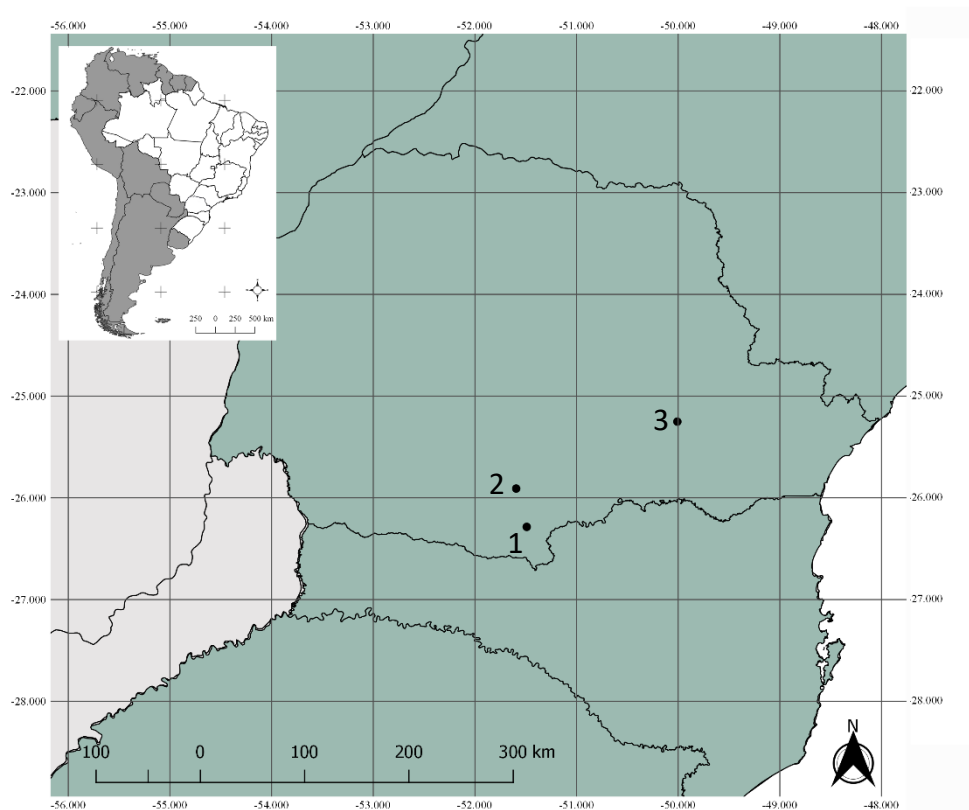


Figura 01: Pontos de coletas dos espécimes utilizados no trabalho. 1- *Phalocallis coelestis* (Bituruna); 2 – *Phalocallis* sp. (Jardim Botânico de Faxinal do Céu, Pinhão); 3 – *Phalocallis* sp.1 (Parque Estadual de Vila Velha).

RESULTADOS

São apresentadas e comentadas cinco espécies, sendo duas espécies novas (dados ainda não publicados) (figura 6).

Chave para as espécies de *Phalocallis*

1. Escapo floral geniculado ***Phalocallis geniculata***
- 1'. Escapo floral ereto.....2
2. Espatas de tamanhos iguais, anteras de coloração azul com máculas mais escuras no conectivo..... ***Phalocallis* sp.**
- 2'. Espatas de tamanhos desiguais, anteras de coloração amarela sem máculas.....3
3. Flores de menor diâmetro, filete delgado em todo seu comprimento.....
..... ***Phalocallis* sp1**
- 3'. Flores de maior diâmetro, filete largo na base e estreito na inserção com a antera.....4
4. Tépalas interna amarelo-creme, cristas do estilete lisas.....
..... ***Phalocallis oreophila***
- 4'. Tépalas interna roxa, cristas do estilete onduladas..... ***Phalocallis coelestis***

Tratamento taxonômico

Phalocallis sp. (figura 6 A-D)

Tipo. Brasil, Paraná, Pinhão: Jardim Botânico de Faxinal do Céu, novembro 2018 fl., S. Arzorio, A. Noga, A. Silvério sn. (Holótipo MBM! 287817); november 2019, fl., S. Arzorio, A. Silvério sn. (Parátipo MBM!); december 2020, fl., S. Arzorio, D. Ferreira sn. (Parátipo MBM!).

Planta herbácea de 45–81 cm de altura. Bulbo ovoide-alongado, 4,5–6 cm de compr., catafilos de coloração laranja escuro, lanceolado com ápice acuminado. Folhas basais na antese com lâmina linear, 43–46,5 × 3,8–4,5 cm, elíptico-lanceolado, plicadas, com ápice agudo. Folha mais basal caulinar, 28 cm, base envolvendo a haste; folhas distais gradualmente menores, com a base envolvendo a base dos pedúnculos florais. Hastes de floração 28,3–46 cm de compr., cilíndrica, com 2–4 ramificações na porção distal. Espatas 1–2 por ramificação, herbácea, verde pálido, bivalve, 1–3 flores, pedunculados; válvula externa e interna de mesmo comprimento,

ambas com bordas membranosas e ápice agudo; pedicelo filiforme. Flores de coloração roxa com máculas marrons; tépalas externas e internas diferentes; tépalas externas $3,0-3,2(3,4) \times 1,6-1,9$ cm, obovadas com a base estreita, região côncava de $0,65 \times 1,8$ cm, coloração roxa, com máculas marrons no terço proximal e uma tonalidade amarelo pálido de fundo entre as máculas, face abaxial branco azulado; margens onduladas, levemente voltadas para cima, ápice arredondado; tépalas internas $2,4-2,6 \times 0,5-0,6$ cm, revolutas no terço distal, porção centro-distal com coloração branca e margens roxas, base estreita com a presença de máculas marrons na base e máculas azuis em direção distal, com mesclas em amarelo pálido, uma mancha amarela na parte revoluta, centralmente na tépala e duas manchas amarelas alongadas na região estreita, em direção à base, densamente coberta por tricomas, principalmente na região mediana, onde os tricomas aparentam ser mais longos; filete de $2,1-3,1$ mm de compr., coloração verde pálido com máculas marrons na base e conatos na base; anteras $0,7-0,8 \times 0,2-0,3$ cm, lineares-oblongas, azul pálido, teca mais escura, conectivo azul pálido com máculas roxas, com secreção aparente entre o conectivo e a teca; pólen roxo ou azul escuro; ovário verde, $0,9-1,1 \times 0,2$ cm, oblongo. Estilete $1,3-1,5$ cm de compr., de coloração azul pálido, ramos do estilete petaloide, margens superiores das cristas lisas. Fruto e sementes triangulares.

Fenologia – Foram registradas flores nos meses de novembro à janeiro. As flores abrem ao amanhecer e se fecham logo após ao meio dia.

Distribuição e habitat – A coleta foi realizada em área de mata ciliar associada a um pequeno córrego (figura 5A) e em clareiras associadas a mata, em área de Floresta Ombrófila Mista, no município de Pinhão, em área pertencente a Faxinal do céu (figura 01).

Comentários – *Phalocallis* sp. apresenta anteras de coloração azul pálido com pontuações roxas na região do conectivo (vs. amarelo nas demais espécies), pólen de coloração azul (vs. amarelo ocre). *Phalocallis* sp. é semelhante a *Phalocallis coelestis*, se distinguindo pela coloração da antera, pelos adereços do estilete com extremidades das cristas lisas (vs. cristas onduladas) e pelo menor tamanho do vegetativo da planta durante a antese. *Phalocallis* sp. também se diferenciou de todos os demais acessos do gênero por apresentar espatas com valva externa e interna com o mesmo comprimento, sendo a descrição para o gênero valva interna maior que a externa.

***Phalocallis* sp. 1** (figura 6 E-G)

Tipo. Brasil. Paraná: Ponta Grossa, Parque Estadual de Vila Velha, trilha alternativa, 06/09/2017, fl., E. Pontarolo & A. Silvério 09 (Holótipo MBM!, Isótipo ICN!); 06/09/2017, fl. R. Kraemer & R.C.Tardivo 01 (Parátipo HUPG!).

Planta herbácea de 30,3–35,7 cm de altura, hastes subterrâneas de 3,8–4,9 cm de compr. Bulbo, 3,5–4,6 cm de compr., alongado; catafilos de coloração marrom e secos, de formato ovato-lanceolado. Folhas 13,5–18,6 × 1,1–1,4 cm, elíptico-lanceolado, plicadas. A folha mais basal, 18,6 cm, base envolvendo a haste. Haste de floração cilíndrica. Espata 1, herbácea, verde, bivalve, 1-flor, pedunculados; válvula externa 1,6 cm de compr., válvula interna 2 cm de compr., ambas com bordas membranosas e ápice agudo; pedicelo filiforme. Flores de coloração azul arroxeado com maculas marrons na base e máculas roxas em direção ao ápice, face abaxial com a base creme; tépalas externas e internas diferentes; tépalas externas (2,4)2,8–3,1(3,4) × (0,8)1,0–1,2 cm, obovadas com a base estreita, côncava, coloração azul, com máculas marrons no terço proximal e uma tonalidade amarelo de fundo entre as máculas, máculas roxas na região central, margens onduladas, levemente voltadas para cima, ápice arredondado-emarginado; tépalas internas revolutas no terço distal, 2,2–2,5 × 0,4–0,5 cm, base estreita com a presença de máculas marrons na base, com mesclas em amarelo ao fundo, e máculas roxas em direção ao ápice, duas manchas amarelas na parte revoluta e duas manchas amarelas alongadas na região central, nas margens da tépala, coberta por tricomas, principalmente na região revoluta-hirsuta, onde os tricomas aparentam ser mais longos. Filete de (1,9)2,3–2,8 mm de compr., conatos na base por 1mm, delgado por toda sua extensão, coloração amarelo ocre; anteras 0,7–0,8 × 0,1–0,2 cm, oblongas, coloração amarela, teca mais escura, conectivo amarelo; pólen amarelo ocre; ovário verde, 0,5–0,6 × 0,2 cm, oblongo; estilete (1,0)1,2–1,3 cm de compr., 0,5 cm de diâmetro nas cristas, de coloração roxa, ramos do estilete com adereços, margens superiores das cristas lisas. Fruto e sementes não observados.

Fenologia – Flores foram registradas nos meses de agosto e setembro.

Distribuição e habitat – Uma grande população foi encontrada em área após queimada recente no parque de Vila Velha (figura 5B).

Comentários – *Phalocallis* sp.1 exibe um padrão de cores e manchas na tépala interna que se diferencia dos outros acessos, filete delgado em toda sua extensão (vs. largo na base e delgado na inserção na antera) além de portar flores de menor diâmetro, ausência de folhas basais durante a antese (vs. presença de folhas basais).

***Phalocallis coelestis* (Lehm) Ravenna.** (Figura 6 H-J)

Not Men. Mus. Nac. Hist. Nat. 21:9, 1977. *Marica coelestis* Lehm. Index Seminum 1826:17, 1826.

Planta herbácea 0,80–1 m de altura. Bulbo 3,3–3,7 × 1,4–1,8 cm, ovoide; catafilos de coloração laranja escuro, lanceolados com ápice acuminado. Folhas basais na antese 2–5, elíptico-lanceoladas, plicadas, 59,4–73,5 cm de compr., a mais basal envolvendo a haste, as mais distais gradualmente menores, com a base envolvendo a base dos pedúnculos florais. Hastes de floração com 1–2 ramificações na porção distal, pedunculadas com brácteas verdes, 9,1 cm de comp. Espatas 1–3 por ramificação, herbácea, verde pálido, bivalve, 1–3 flores; válvulas de tamanhos desiguais, sendo a externa menor, 4,4–6,3 cm, e a interna maior, 3,9–5,9 cm, com bordas membranosas e ápice agudo; pedicelo filiforme. Flores de coloração azul arroxeado, com máculas marrons na base; tépalas externas e internas diferentes, as externas (3,4)3,9–4,2 × (1,9)2,0–2,2 cm, obovadas-emarginadas, com a base estreita, côncava, coloração azul, nervuras em azul escuro, com máculas marrons no terço proximal e uma tonalidade amarelo de fundo entre as máculas; margens onduladas, levemente voltadas para cima, ápice arredondado-emarginado; as tépalas internas revolutas no terço distal, 2,7–3,0 × 0,7–0,8 cm, com coloração branca centralmente e margens azuis, base estreita com a presença de máculas marrons na base, com mesclas em amarelo ao fundo, uma grande mancha amarela na parte revoluta que se estende de forma alongada em direção da base, com manchas marrons ao centro, densamente coberta por tricomas glandulares unicelulares, principalmente na região mediana-revoluta, onde os tricomas aparentam ser mais longos. Androceu com filetes de (2,8)3,5–4 mm compr., conatos na base por 1 mm, amarelo-esverdeado, anteras 0,9–1,0 × 0,2–0,3 cm, oblongas, amarelas, teca mais escura, conectivo amarelo, com secreção aparente entre o conectivo e a teca; pólen ocre escuro, prolato-esferoidal, monossulcado com exina reticulada. Gineceu com ovário verde, 0,9–1,2 × 0,3–0,4 cm, oblongo; estilete (1,3)1,5–1,8 cm compr., azul com a base amarelo-esverdeado, ramos do estilete com cristas, margens superiores das cristas onduladas. Fruto capsular, 3,9 × 1,8 cm.

Fenologia – Foram registradas flores nos meses de fevereiro e março, com antese das 10:00 horas às 15:00 horas.

Distribuição e habitat – Ocorrência nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. As coletas foram realizadas no município de Bituruna em área de beira de estrada (figura 5C), campos de altitude, pertencente ao Bioma Mata Atlântica (figura 2).

Comentários – *Phalocallis coelestis* se difere dos demais acessos analisados, principalmente, pelo seu estilete, o qual apresenta cristas com extremidades onduladas (vs. cristas com extremidades lisas) e plantas chegando a mais de 1 metro de altura (vs. menos de 1 metro).

Durante o desenvolvimento deste estudo, foram observadas identificações errôneas no material examinado nos herbários, portanto algumas exsicatas precisam ser revistas, tendo em vista a discrepância de algumas informações. A exemplo de acessos identificados como *Phalocallis coelestis* coletados na região mato-grossense, apresentando informações na etiqueta que demonstram a possível classificação como *Phalocallis geniculata*. Além de um espécime com tipo de inflorescência atípica para o gênero, significando uma classificação genérica diferente.

Material complementar – BRASIL:

Paraná, Bituruna, março 2016 (fl), *C. Valus*; *J. Richardo*; *A. Silvério sn.* (ICN-187425); São Mateus do Sul Rio Potinga, [-25.8742008209229; -50.3828010559082], *Hatschbach, G.*; *Lindeman, J.*; *Haas, H.*; *Lindeman, J.*; *Haas, H.* 13809, (MBM 2232); Santa Catarina, BR 116, Km101, entre Vacaria e Lages, [-28.175278; -50.695556], *Heiden, G. Oliveira, CT.* 2164, 11/03/2014, (ECT 5435); Caçador, [-26.7752990722656; -51.0149993896484], *Welker, C. s.n.* 10/01/2012 (ICN 180246); Campos dos Padres, Bom retiro, [-27.7971992492676; -49.489200592041], *Rambo, B. s.n.* 23/01/1957, (PACA-AGP 60222); Cerrito, BR 293, [-31,736944; -52.799444], *Heiden, G. Iganci, JRV.* 2436, 08/04/2018, (ECT 5465); Mirim Doce: Fazenda Agropec, [-27.17; -50.1305556], *Kassner-Filho, A.*; *Santos, D*; *Bollmann, G*; *Althoff, L.F.* 4765, 09/02/2019 (FURB 62763); São Bento do Sul, Serra Alta. Ponte do Rio Banhados. Borda de mata, [-26.275631; -49.383623] *Schwirkowski, P. s.n.* 16/01/2010 (FPS 1796); Urubici Santa Bárbara, trilha da cascatinha. Parque Nacional de São Joaquim, [-28.1463889; -49.6133333 WGS84] *Funez, L.A.*; *Costa-Rezende, D.H.*, *Ribeiro-Nardes, W.*, *Kossmann, T.*, *Kassner-Filho, A.*, *Bones, F.L.V.* 8575, 25/01/2019, (FURB 64322); Rio Grande do Sul, Bom Jesus: Fazenda Caraúno, [-28.6678009033203; -50.4166984558105], *Wasum, R.A. s.n.* 15/01/1997, (HUCS 12014); Cambará do Sul: Lajeado das Margaridas, [-29.038333; -50.225833], *Eggers, L*; *Chauveau, O* 973, 16/01/2016, (ICN 187393); Jaquirana RS 110 - aprox. Km 48, [-20.058611; -50.439722], *Eggers, L*; *Chauveau, O* 1024, 20/01/2017, (ICN 194538); São Francisco de Paula Jaquirana, [-29.4480991363525; -50.5835990905762] *Rambo, B.* 20/02/1952 (PACA-AGP 52062); São José dos Ausentes, Fazenda dos Sonhos, [-28.7483005523682; -

50.0657997131348], *Buzatto, CR.* 490, 16/01/2009 (ICN 160652); São Lourenço do Sul, [-31.3652992248535; -51.9782981872559], *Eggers, L* 703, 07/01/2012 (ICN 190691); ARGENTINA: Misiones, Oberá, Colonia Yazá, Campo Viera, [-27.355556; -55.066111], *Keller, H A; Franco, M M* 11947, 11/12/2013, (ICN 187406).

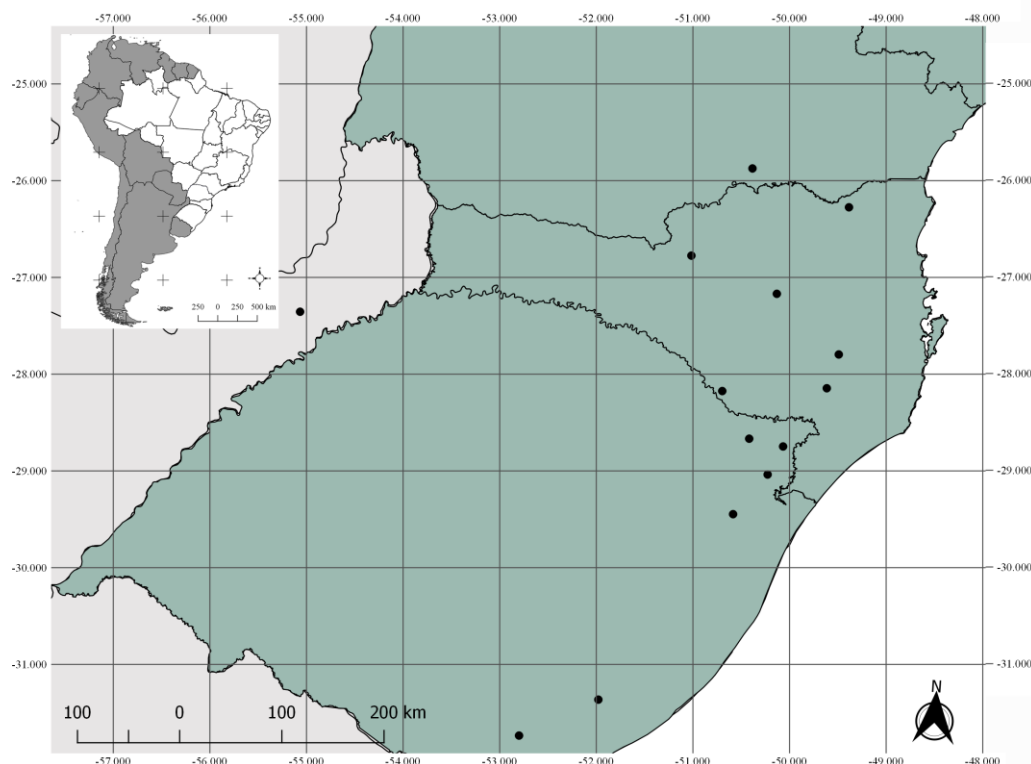


Figura 02: Distribuição geográfica de *Phalocallis coelestis*, com base em material de herbário.

***Phalocallis geniculata* (Klatt) Ravenna.** (Figura 6 M-O)

Not. Mens. Mus. Nac. Hist. Nat. 21:9. 1977. [*Alophia geniculata* Klatt. Fl. Bras. 3(1):517. 1871.]

Planta herbácea de 33,3–44,1 cm de altura. Bulbo ovoide-alongado, 4,9 cm de compr., prolongado em um colar; catafilos de coloração escura, de formato ovato-lanceolado. Folhas elíptico-lanceolado, plicadas, 41–60 cm de compr., com a base envolvendo a haste. Haste de floração cilíndrica e geniculada, 30–37,5 cm de compr., 2-3 ramificações. Brácteas verdes 2,4–11,8 cm de compr. Espata herbácea, verde, bivalve, 1-flor, pedunculados; válvula externa e interna desiguais, válvula externa 2,7–2,8 cm de compr., válvula interna 3,5–3,9 cm de compr., ambas com bordas membranosas, ovato-acuminado; pedicelo filiforme. Flores de coloração azul arroxeado com máculas marrons na base e máculas roxas em direção ao ápice, face abaxial com a base creme; tépalas externas e internas diferentes. Tépalas externas obovadas com a base

estreita, côncava, $3,2\text{--}3,8 \times 1,4$ cm, coloração azul, com máculas marrons no terço proximal, ápice arredondado-emarginado. Tépalas internas oblongas, revolutas no terço distal, 2,9 cm, base estreita com a presença de máculas marrons na base, duas manchas amarelas na região central. Filete de 3–4 mm de compr., coloração amarelo. Anteras oblongas 0,6 cm, de coloração amarela, teca mais escura. Ovário verde, oval, $0,6\text{--}0,8 \times 0,2\text{--}0,3$ cm. Estilete 1 cm de compr., de coloração roxa, ramos do estilete com adereços, margens superiores das cristas lisas. Fruto capsular.

Fenologia – Não foram encontrados dados com o tempo de floração e frutificação.

Distribuição e habitat – Espécie registrada em áreas de solo arenoso, associadas ao Bioma Cerrado (figura 3).

Comentários – Se diferencia dos demais acessos principalmente pela haste floral geniculada (vs. ereta), folhas estreitas e longas (vs. folhas lanceoladas alargadas) e por sua ocorrência descrita para região de Cerrado. Espécie descrita por Friedrich Wilhelm como *Alophia geniculata* em 1871, passou por outras classificações pelo mesmo autor, até que em 1962 [1964] Pedro Felix Ravenna classifica como *Cypella* e, posteriormente, em 1977 como *Phalocallis*.

Material complementar – BRASIL:

Mato Grosso, Corrego do Gato, [-12,816667; -51,766667], Harley, RM. Souza, R. Ferreira, A. 10438, 03/10/1968, ((UB 6071); Cuiabá, Ribeirão da Motuca, [-15,5960998535156; -56,0966987609863], Hatschbach, G. 57526, (MBM 48103); Itiquira, Rod. BR 163, [-17,2089004516602; -54,1502990722656], Hatschbach, G. 37444, (MBM 48066); Rio Verde, Sete Quedas, Hatschbach, G. Koczicki, C. 33148, (MBM 28723); Xavantina, [-14,633333; -52,233333], Philcox, D. Ferreira, A. 3750. 29/12/1967, (UB 6072); Mato Grosso do Sul, Amambai, Arredores da tribo Caiuá, [-23,118472; -55,320619], Garcia, WG. 13748, 1979, (UEC 31728); Bela Vista, [-22,1388889; -56,7833333], Sartori, ALB., Carvalho, FS., Fabri, JR., Souza, PR. 2035, 08/12/2016, (CGMS 68099); Coxim, [-18,5067005157471; -54,75999832154297], Hatschbach, G. Anderson, WR. Gates, B. 36000, (MBM 36078); Paraná, Campina Grande do Sul, Serra do Capivari, [-25,1377; -48,8215], Roderjan, CV. Kuniyoshi, YS. 1502, 21/05/1998 (EFC 8025); Tijucas do Sul, Morro dos Perdidos, [-25,9281005859375; -49,1988983154297], Vieira, ER. Pereira, S. 021, 17/11/2000, (HUCP 15042).

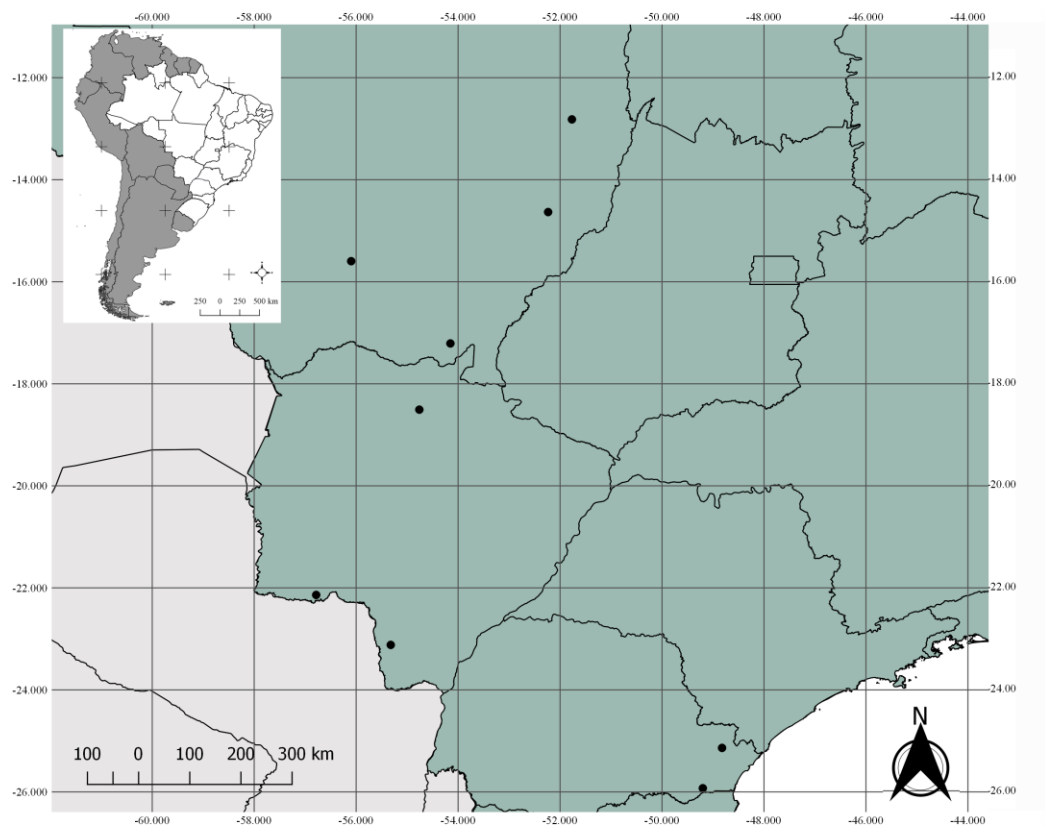


Figura 03: Distribuição geográfica de *Phalocallis geniculata*, com base em material de herbário

***Phalocallis oreophila* (Spegazzini) Ravenna.** (Figura 6 K-L)

Not. Mens. Mus. Nac. Hist. Nat. 21:9. 1977. [*Cypella oreophila* Spegazzini, Physis 3:44. 1917.]

Planta herbácea de 36–44,06 cm de altura, hastes subterrâneas 6,2–8,4 cm de comp. Bulbo 3,4–5,5 × 1,8 cm, ovoide-alongado prolongado em um colar, catafilos escurecidos, alongados com ápice acuminado. Folhas na antese com lamina linear, 26,7–29 cm, lanceolada-alongada, estreita, plicada, ápice agudo. Folha mais basal envolvendo a haste. Haste floral 22,5 cm de comp., cilíndrico, 1-2 ramificações. Espata herbácea, verde-pálido, bivalve, valva interna maior que a externa. Flores de coloração arroxeadas, com manchas marrons na metade proximal das tépalas; tépala externa 3,1 – × 2 cm, obovada, geniculada, com a metade distal de coloração lilás, metade proximal amarelo-creme, com maculas marrons e tricomas nas margens; tépala interna revoluta, 2,4–2,6 × 0,6 cm, de coloração amarelo-creme, com máculas marrons na metade proximal, metade distal com maculas roxas, com duas faixas longitudinais amarelas e uma central, no mesmo sentido, roxa, tricomas nas áreas hirsutas da lâmina; filete de 3,1 mm de compr., coloração amarelo-creme com maculas na base; anteras 0,9 × 0,3 cm, oblongas, coloração amarelo-creme, teca mais escura; ovário verde, 0,6–0,7 × 0,2–0,3 cm, oblongo;

estilete 1,6 cm de compr., de coloração lilás, ramos do estilete portando duas cristas, margens superiores das cristas lisas.

Fenologia – Não foi possível estimar o tempo de floração e frutificação.

Distribuição e habitat – Ocorrência descrita para Argentina, Bolívia e Paraguai (figura 4).

Comentários – *Phalocallis oreophila* se diferencia das demais espécies por apresentar folhas mais longas que a haste floral (vs. folhas de mesmo tamanho ou mais curtas), lâmina foliar mais estreita (vs. larga) e na coloração de suas flores e padrão de estriações e máculas nas tépalas internas e externas.

Material complementar – ARGENTINA: Campo del Arenal, Catamarca. *Jorgensen*, P. 1597, (MO 2192124). Tucuman, Trancas, em la cuesta de San Antônio, entre Trancas y Pampa Grande. *Spegazzini*, CL. 138, 13/01/1897 (MO 2454145). BOLÍVIA: Tarjas, Cercado. *Bastian*, E. 229, 23/12/1985 (MO 1933673)

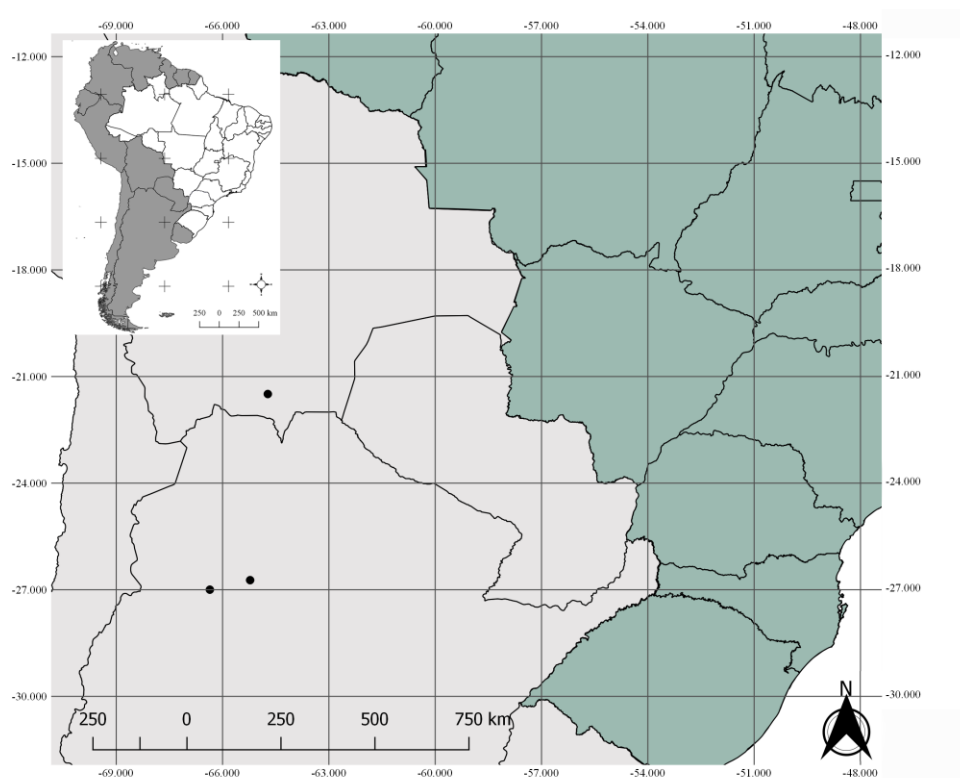


Figura 04: Distribuição geográfica de *Phalocallis oreophila*, com base em material de herbário

Os caracteres mais distintivos entre cada acesso foram descritos na tabela 02, com destaque para as particularidades de cada um.

Tabela 02: Caracteres morfológicos de *Phalocallis* sp, *Phalocallis* sp1, *Phalocallis coelestis*, *Phalocallis geniculata* e *Phalocallis oreophila* (com base em materiais herborizados e cultivados).

	<i>PHALOCALLIS</i> SP.	<i>PHALOCALLIS</i> SP.1	<i>PHALOCALLIS</i> COELESTIS	<i>PHALOCALLIS</i> GENICULATA	<i>PHALOCALLIS</i> OREOPHILA
TAMANHO DA PLANTA (CM)	45–81	30,3–35,7	80–100	33,3–44,1	36–44,06
TAMANHO DO BULBO (CM)	4,5–6	3,5–4,6	3,3–3,7	4,9	3,4–5,5 × 1,8
TAMANHO DA FOLHA (CM)	43–46,5 × 3,8–4,5	13,5–18,6 × 1,1–1,4	59,4–73,5	41–60	26,7–29
ESCAPO	Ereto	Ereto	Ereto	Geniculado	Ereto
FLORAL	28,3–46			30–37,5	22,5
ESPATA (VALVA EXTERNA E INTERNA)	Tamanho igual (4,5–5 cm)	Desiguais (Externa menor)	Desiguais (externa menor)	Desiguais (externa menor)	Desiguais (externa menor)
TAMANHO DA TÉPALA EXTERNA (CM)	3,0–3,2(3,4) × 1,6–1,9	(2,4)2,8–3,1 (3,4) × (0,8)1,0–1,2(1,3)	(3,4)3,9–4,2 × (1,9)2,0–2,2	3,2–3,8 × 1,4	3,1 × 2,0
TAMANHO DA TÉPALA INTERNA (CM)	2,4–2,6 × 0,5–0,6	2,2–2,5 × 0,4–0,5	2,7–3,0 × 0,7 – 0,8	2,9	2,4–2,6 × 0,6
FILETE (MM)	2,2–3,1	(1,9)2,3–2,8	(2,8)3,6–4	3–4	3,1
ANTERA (CM)	0,7–0,8 × 0,2–0,3	0,7–0,8 × 0,1–0,2	0,9–1,0 × 0,2–0,3	0,6	0,9 × 0,3
COR DA ANTERA (CONECTIVO)	Azul com pontuações roxas	Amarelo	Amarelo com pontuações ocre	Amarelo	Amarelo
OVÁRIO (CM)	0,9–1,0 × 0,2–0,3	0,5–0,6 × 0,2–0,3	0,9–1,2 × 0,3–0,4	0,6–0,8 × 0,2–0,3	0,6–0,7 × 0,2–0,3
ESTILETE COMPRIMENTO (CM)	1,3–1,5 cm	(1,0)1,2–1,3 cm	(1,3)1,5–1,8 cm	1 cm	1,6 cm

CRISTAS DO ESTILETE	Extremidade lisa	Extremidade lisa	Extremidade ondulada	*	Extremidade lisa
FENOLOGIA	Novembro-Janeiro	Agosto-Setembro	Fevereiro-Março	*	*

* = Dados não observados/encontrados na literatura e material herborizado.

Tabela 03: Lista de nomes considerados aceitos (V), incerto (-), sinonimizados (S) e não listados (0) para o gênero *Phalocallis*, de acordo com os sites The plant list (TPL), World Checklist of Selected Plant Families (Kew), Encyclopedia of Life (EOL), Flora do Brasil 2020 (Reflora), Specieslink (SL) e Flora del Conosur (IBODA).

Espécie	TPL	Kew	EOL	Reflora	SL	IBODA
<i>Phalocallis coelestis</i> (Lehm.) Ravenna	V	V	V	V	V	S
<i>Phalocallis geniculata</i> (Klatt) Ravenna	S	S	0	V	V	V
<i>Phalocallis gigantea</i> (Klatt) Kuntze	S	S	0	S	0	0
<i>Phalocallis gracilis</i> (Klatt) Kuntze	S	S	0	-	0	0
<i>Phalocallis herbertii</i> (Lindl.) Kuntze	S	S	0	S	0	0
<i>Phalocallis oreophila</i> (Speg.) Ravenna	S	S	0	V	S	V
<i>Phalocallis paludosa</i> (Klatt) Kuntze	S	S	0	S	0	0
<i>Phalocallis peruviana</i> (Baker) Kuntze	S	S	0	0	0	0
<i>Phalocallis plumbea</i> (Lindl.) Herb.	S	S	0	S	0	S
<i>Phalocallis pusila</i> (Link e Otto) Kuntze	S	S	0	S	0	0
<i>Phalocallis herbertii</i> var. <i>angustifolia</i> Kuntze	S	S	0	S	0	0
<i>Phalocallis herbertii</i> var. <i>latifolia</i> Kuntze	S	S	0	S	0	0

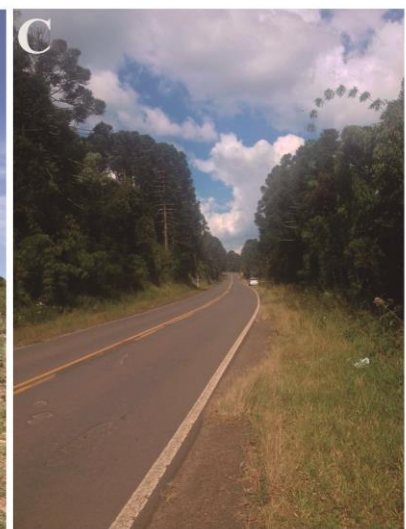


Figura 5: Áreas de coleta. **A:** Faxinal do céu, Pinhão-PR, ocorrência de *Phalocallis* sp. associada a margem de um córrego na região. **B:** Parque Estadual de Vila Velha, Ponta Grossa-PR, *Phalocallis* sp.1 ocorrente em área de recente queimada controlada, em uma trilha alternativa (foto: Adriano Silvério). **C:** Bituruna-PR, *Phalocallis coelestis* ocorrente em beira de estrada (foto: Adriano Silvério)

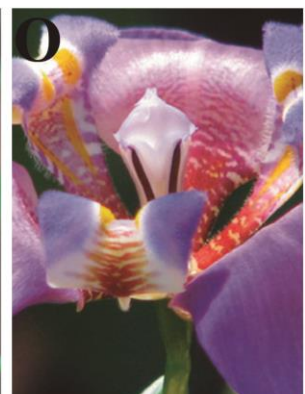
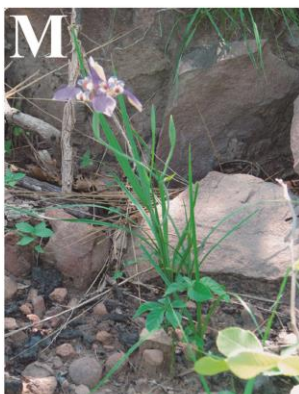
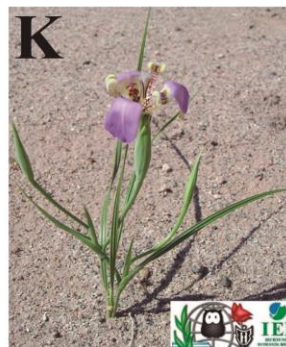
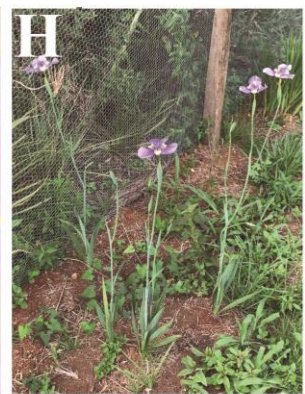


Figura 6: **A-D:** *Phalocallis* sp; **A:** Hábito; **B:** Porte da planta com bulbo evidente; **C:** Vista superior dos verticilos florais; **D:** Destaque para a região central da flor (androceu e estilete); **E-G:** *Phalocallis* sp.1; **E:** Hábito, porte da planta com bulbo evidente; **F:** Destaque para a região central da flor (androceu e estilete); **G:** Vista superior dos verticilos florais; **H-J:** *Phalocallis coelestis*; **H:** Hábito; **I:** Destaque para o centro da flor (androceu e estilete); **J:** Vista superior dos verticilos florais. **K-L:** *Phalocallis oreophyla*; **K:** Hábito; **L:** Vista superior dos verticilos florais; **M-O:** *Phalocallis geniculata*; **M:** Hábito; **N:** Vista dos verticilos florais; **O:** Destaque para o centro da flor (androceu e estilete);
Fotos: **A-J:** Adriano Silvério; **K-L:** Instituto de Botânica Darwinion (IBODA); **M-O:** Huaylla e Wood, 2012.

REFERÊNCIAS

- Beentje, H. J. The Kew Plant Glossary: An illustrated Dictionary of Plant Terms. Richmond, UK: **Royal Botanic Gardens**, Kew, 2010.
- Chauveau, O.; Eggers, L.; Souza-Chies, T. T.; Nadot, S. Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): evolutionary trends in the flowers of the New World genera. **Annals of Botany**, 110, 713-729, 2012.
- Eggers, L., Chauveau, O. *Phalocallis* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB136>>. Acesso em novembro de 2020.
- Encyclopedia of Life. Available from <http://eol.org>. Acesso novembro de 2020.
- Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB30046>>. Acesso em: 19 de novembro de 2020.
- Duminil, J.; Kenfack, D.; Viscosi, V.; Grumiau, L. Hardy, O.J. Testing species delimitation in sympatric species complexes: The case of an African tropical tree, *Carapa* spp. (Meliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 62: 275-285, 2012.
- Goldblatt e Manning. The Iris family - natural history and classification. **Timber Press**. Portland, Oregon, USA, p.290, 2008.
- Herbert, W. *Phalocallis plumbea* lead-coloured *Phalocallis*. **Botanical Magazine** 65-12:3710, 1839.
- Huaylla, H; Wood, J. R. *Cypella boliviiana* (Iridaceae), a new species from Bolivia. **Kew Bulletin**, 67: 797, 2012.
- IBODA- Instituto de Botânica Darwinion. 2020. Disponível em: <<https://goo.gl/y6JMrU>> Acesso em: 19 de novembro. 2020.
- Kew - Kew Royal Botanic Garden – World checklist of selected plant families – 2012. Disponível em: <apps.kew.org>. Acesso em novembro de 2020.
- Peixoto, AL. e Maia, LC. Manual de Procedimentos para Herbários, INCT, Herbário Virtual da Flora e dos Fungos, UFPE, 2013.
- Ravenna, P. *Cypella* subg. *Phalocallis* (Herb.) Ravenna. **Revista del Instituto Municipal de Botánica**. Buenos Aires 2: 53, 1962[1964].
- Ravenna, P. Notas sobre Iridaceae V. **Noticiario Mensual Museo Nacional de Historia Natural, Santiago** 21(249):7–9, 1977.
- Ravenna, P. A survey in the genus *Cypella* and its allies (Iridaceae). **Onira** 12: 1–11, 2009
- Specieslink 2020. Disponível em:< <http://www.splink.org.br/>> Acesso em novembro de 2020.

The plant list, Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>. Acesso em novembro de 2020.

Tropicos 2020, Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>> Acesso em novembro de 2020.

Anexo 1 (Capítulo I)

***Phalocallis coelestis* (Lehm) Ravenna.**

Not Men. Mus. Nac. Hist. Nat. 21:9, 1977. [*Marica coelestis* Lehm. Index Seminum 1826:17, 1826.]

Sinônimos heterotípicos: *Cypella gigantea* Klatt, Abh. Naturf. Ges. Halle, 15: 364, 1882. *Cypella plumbea* (Herb) Lindl, Edwards Bot. Reg. 24:71, 1837. *Phalocallis gigantea* (Klatt) Kuntze Revis. Gen. Pl. 2: 702, 1891. *Phalocallis plumbea* Herb. Curtis's Bot Mag, 66:3710, 1840. *Tigridia azurea* Hort. Fl. Serres Jard. Eur., 9: s.p., 1853. *Tigridia coelestis* Lehm. Index Seminum (HBG), 1826: 17, 1826.

Sinônimos homotípicos: *Cipura coelestis* (Lehm) Heynh. Nomencl. Bot. Hort. 197, 1840. *Cipura northiana* var *coelestis* (Lehm.) C.Morren, Ann. Soc. Roy. Agric. Gand, 5: 209, 1849. *Cypella coelestis* (Lehm) Diels, Natur, Pflanzefam, 2:15, 1930.

***Phalocallis geniculata* (Klatt) Ravenna**

Not. Mens. Mus. Nac. Hist. Nat. 21:9. 1977. [*Alophia geniculata* Klatt. Fl. Bras. 3(1):517. 1871.]

Sinônimos homotípicos: *Sphenostigma geniculata* (Klatt) Klatt, Abh. Naturf. Ges. Hall. 15:363. 1882. *Cypella geniculata* (Klatt) Ravenna. Rev. Int. Munic. Bot. 2:53. 1964. *Cypella boliviana* Huaylla, Kew Bull. 67:297. 2012.

CAPITULO II: CARACTERIZAÇÃO MORFO-ANATOMICA DE
PHALOCALLIS HERB. E ESPÉCIES COMPARATIVAS

INTRODUÇÃO

Iridaceae compreende cerca de 2000 espécies, distribuídas em 66 gêneros e divididas em sete subfamílias monofiléticas (GOLDBLATT *et al.*, 2008). A África do Sul e a América do Sul são descritos como os dois principais centros de diversificação da família (GOLDBLATT E MANNING, 2008). Entre as subfamílias, Iridoideae é a única com representantes nativos no Neotrópico e divide-se em cinco tribos: Irideae Kitt, Sisyrinchieae Klatt, Trimezieae Ravenna, Tigridieae Kitt e Diplarreneae Labill (GOLDBLATT E MANNING, 2008). O gênero *Phalocallis* Herb. enquadra-se na tribo Tigridieae, e sua delimitação genérica apresentou, ao longo do tempo, algumas controvérsias. Baker (1892) incluiu *Phalocallis* em *Cypella* Herb. e Ravenna (1977) reconheceu como sendo gêneros separados, diferenciando dos demais gêneros pelo formato hirsuto das tépalas internas. Goldblatt e Manning (2008) fundiram novamente os gêneros e Ravenna (2009) incluiu *Cypella geniculata* (Klatt) Ravenna e *Cypella oreophila* Speg em *Phalocallis* e propôs uma chave taxonômica para distingui-los e, por fim, Chauveau *et al.* (2012) propuseram uma filogenia confirmando *Phalocallis* e *Cypella* como gêneros separados, além de trazer *Gelasine* Herb. como grupo irmão de *Phalocallis*, apesar de suas significativas diferenças morfológicas.

O gênero se caracteriza por plantas com bulbo prolongado em um colar, com catafilos marrons a alaranjados. Folhas plicadas e ensiformes. Escapo floral dicotômico e reta, cilíndrica, portando brácteas. Inflorescência de ripídio pedunculados, protegidos por uma espata. Flores roxas a azuladas, com estriações marrons e manchas amarelas. Tépalas livres e desiguais, tépala externa maior, obovada e patente, tépala interna menor, estreita com a porção distal alargada e revoluta, portando tricomas. Filetes conatos na base e curtos. Anteras com conectivo amplo. Estilete longo, portando cristas terminais petaloides. Capsulas oblongas e sementes trigonas (EGGERS *et al.*, 2020).

Anatomia floral e foliar

A anatomia vegetal constitui uma importante ferramenta de auxílio na interpretação dos processos envolvidos durante o desenvolvimento vegetal como bem amostrado por Sokoloff *et al.*, (2021). Por meio dela, é possível estabelecer relações taxonômicas e sistemáticas entre as espécies. Estudos feitos por Rudall (1991, 1994) demonstram como a anatomia foliar permitiu que detalhes peculiares fossem obtidos, principalmente em nível de tribo. Em Tigridieae são propostos dois tipos de morfologia foliar, folhas plicadas e folhas foliadas. Diversos outros caracteres foram considerados promissores para distinção de táxons,

como o aspecto da margem foliar, com presença ou ausência de esclerênquima (RUDALL, 1991; RUDALL, 1994)

As flores são uma inovação chave das plantas na evolução para o meio terrestre, proporcionando aumento da diversidade de espécies, como bem observado quando se compara as angiospermas com os demais grupos de plantas (SOKOLOFF *et al.*, 2021). Diversos artigos são publicados utilizando-se de dados anatômicos para responder seus questionamentos centrais (ENDRESS, 2019; PACINI E FRANCHI, 2020; CARRIVE *et al.*, 2020). Desse modo, acredita-se que a descrição da anatomia floral possa fornecer importantes detalhes sobre a fase reprodutiva do vegetal, assim como a descrição de órgãos como o androceu, o gineceu e o perigônio podem auxiliar na compreensão do processo de polinização. Além de que as espécies nativas de Iridaceae necessitam de estudos mais aprofundados, visto o fato de que foram escassamente estudadas, devido ao seu curto período de florescimento e abertura das flores durante o dia (EGGERS, 2008)

Estudos palinológicos

A estrutura do grão de pólen é altamente conservada e importante para compreender os padrões evolutivos, pois raramente variam dentro de uma espécie e nem sempre dentro de um gênero (GOLDBLATT E MANNING, 2008). Daí a importância taxonômica e evolutiva da morfologia polínica, possibilitando análises em nível específico, genérico e superiores a estes (MELHEM, 1978)

Em Iridaceae, o pólen sulcado é o mais comum, sendo considerado ancestral em monocotiledôneas, assim como nas angiospermas em geral (ZAVADA, 1983). É descrito como sulcado e bissulcado em Tigridieae, para subtribo Cipurinae e Tigridiinae, respectivamente, contudo algumas variações foram relatadas nas subtribos (GOLDBLATT, 1982; RUDALL E WHEELER, 1988; GOLDBLATT E MANNING, 2008). Essa classificação da tribo Tigridieae foi proposta por Goldblatt (1982) com base principalmente em caracteres citológicos. O autor correlacionou as ploidias ao tipo de pólen, grãos monossulcados relacionados a diploidia e os bissulcados a tetraploidia. Porém, estudos moleculares põem em dúvida a monofilia dessas subtribos, propondo uma classificação em dois clados (clado I e II), reestruturando as relações entre os gêneros dentro da tribo (CHAUVEAU *et al.*, 2012).

Em Iridodeae a forma básica da exina é descrita como semitectada-reticulada, com destaque para a tendência de uma exina microrreticulada ou retículo-rugulada (GOLDBLATT E LE THOMAS, 1992). Uma classificação em cinco grupos é apontada por Goldblatt e Le

Thomas (1992), sendo a exina microrreticulada (lúmen < 1µm), exina reticulada (lúmen = 1-2µm), exina de retículo aberto (lúmen > 2µm), exina com retículo heterogêneo (lúmen = 0,5 e 2µm) e exina retículo-rugulada (lúmen < 1µm, com muri alongado).

O presente capítulo busca levantar informações com potencial taxonômico, a fim de contribuir para a delimitação e caracterização do gênero *Phalocallis*. Para isso uma análise da anatomia floral e foliar foi empregada, visto que a anatomia vegetal constitui uma importante ferramenta de auxílio na interpretação dos processos envolvidos durante o desenvolvimento vegetal. Por meio dela, pode ser possível estabelecer relações taxonômicas e sistemáticas entre as espécies. Além disso, caracteres palinológicos são descritos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal:

O material fértil é proveniente de coletas realizadas nos meses de fevereiro e março, agosto e setembro, e novembro e dezembro, de 2016 a 2019 em áreas pertencentes ao bioma Mata Atlântica (tabela 04). Posteriormente, cultivadas em vasos no Laboratório de Botânica Estrutural e em uma área (canteiro) no *campus* CEDETEG, Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, Paraná.

As amostras foram herborizadas de acordo com as técnicas usuais da taxonomia vegetal (PEIXOTO E MAIA, 2013) e tombadas no Herbário Municipal de Curitiba (MBM) e no Herbário do Instituto de Ciências Naturais - RS (ICN).

Tabela 04: Lista de espécies analisadas durante o trabalho, com seus respectivos pontos de coleta e números de herbário. (MBM: Herbário do Jardim Botânico de Curitiba; ICN: Herbário do Instituto de Ciências Naturais)

Espécie	Local de coleta	Herbário	Número do Voucher
<i>PHALOCALLIS COELESTIS</i>	Bituruna-PR	ICN	187425
<i>PHALOCALLIS SP</i>	Jardim Botânico de Faxinal do Céu-PR	MBM	287817
<i>PHALOCALLIS SP1</i>	Parque Estadual de Vila Velha-PR	ICN	199870
<i>GELASINE COERULEA</i>	Jaguariaíva –PR	MBM	X

<i>CYPELLA</i>	Colombo-PR	MBM	212769
<i>HERBERTII*</i>			

* = Material herborizado cedido pelo curador do Herbário do Jardim Botânico de Curitiba (MBM)

X = Números de voucher ainda não confirmados

Método de inclusão e microscopia de campo claro

As flores coletadas foram fixadas em uma solução de formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico a 50% (FAA 50%) (JOHANSEN, 1940) e em glutaraldeído 1% e formaldeído 4% (MCDOWELL E TRUMP, 1976). As amostras passaram por uma série etílica de desidratação crescente, foram inclusas em hidroxietilmetacrilato (GERRITS E SMID, 1983), para isso foram ajustadas em histomoldes (0,5 ml). Os blocos com as amostras foram fixados em um pedaço de madeira e levados ao micróto mo rotatório (Zeiss Mikron) para seção de cortes de 2 a 5µm. As seções obtidas foram montados em lâminas, coradas e montados com lamínula em Entelan. As observações foram realizadas com um microscópio de luz (Olympus CX31) e as imagens fotografadas utilizando uma câmera Axio CamErc5c, acoplada ao microscópio, pelo programa Zen lite (2011). As estampas foram montadas utilizando o programa Photoshop CC de edição de imagens. As ilustrações das folhas foram feitos a partir de observações em microscopia de campo claro, desenvolvidos mão livre com caneta Nankin sobre papel Canson A4, digitalizados e organizados no programa Photoshop CC.

Método de reidratação de amostra herborizada

Uma parte da folha de *Cypella herbertii* foi submetida ao processo de reidratação (SMITH E SMITH, 1942). O material foi fervido por 5 minutos em água destilada com algumas gotas de glicerina. Quando frio, foi adicionado uma solução de hidróxido de potássio a 2%, por 3 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi lavado em água destilada por três vezes com intervalos de uma hora cada troca, desidratadas em série etílica a partir de etanol 10% até o etanol 70%. Por fim, se seguiu o protocolo de inclusão em historresina para amostras fixadas (GERRITS E SMID, 1983).

Testes histoquímicos

Para os testes histoquímicos foram utilizados:

- Azul de Toluidina 0,05% pH 4,4 um corante metacromático (FEDER E O'BRIEN, 1968);

- Lugol para detectar amido (JOHANSEN, 1940);
- Ácido Periódico-Schiff (Reação PAS) para polissacarídeos totais (O'BRIEN E MCCULLY, 1981);
- Sudan III para lipídeos estruturais (GURR, 1971);
- Azul de Astra 3% em solução aquosa + Fucsina básica 0,05% em solução aquosa (KRAUS *et al.*, 1998).

Análise dos estratos parietais do endotécio

As anteras foram submetidas a dissociação química em uma solução aquosa de ácido láctico 60% a 45°C overnight. Após a completa degradação dos tecidos e dissociação dos espessamentos, as amostras foram montadas em lamina e lamínula com gelatina glicerizada (NOEL, 1983).

Dados palinológicos

Para cada espécie foram realizadas medidas aleatórias do diâmetro polar (DP) e do diâmetro equatorial (DE), medidas da espessura da intina e exina também foram mensuradas sempre que possível. Foram medidos 30 grãos de pólen para cada espécie e cálculos estatísticos foram aplicados, média ($\bar{x}$) e desvio padrão (s_x). Um gráfico boxplot foi elaborado, por meio do software R X64 3.3.0 (Rstudio), para representar a variação do tamanho dos grãos de pólen observados. Para determinar o formato do grãos a classificação de Erdtman (1952) foi aplicada, utilizando-se a relação entre o eixo polar e equatorial em vista equatorial. O tamanho do pólen foi definido seguindo a classificação de Erdtman (1952) baseado no comprimento do eixo maior, sendo pequeno (10-25 μ m), médio (25-50 μ m) e grande (50-100 μ m). As medidas foram feitas a partir de polens submetidos ao método de Wodehouse (1935), visto que nesse método o grão de pólen não é submetido a nenhuma substância química corrosiva, permanecendo com tamanho próximo ao “in-natura”. O método de acetólise (Erdtman, 1960) também foi empregado, para análise da ornamentação da exina. Esse método consiste em uma combustão ácida por meio de ácido sulfúrico e anidrido acético (1:9) para remoção do conteúdo citoplasmático. As amostras foram analisadas em Microscópio Olympus CX31 equipado com câmera Axio Cam ERc 5s através do software Zen Lite (2011). A terminologia palinológica empregada segue Rudall e Wheeler (1988) e Punt *et al.*, (2007).

RESULTADOS

Anatomia floral

Phalocallis coelestis

Perigônio

O perigônio apresenta dois verticilos contendo três tépalas cada, sendo três internas e três externas, totalmente livres entre si. As externas são maiores e apresentam formato oboval, base estreita com máculas marrons. As internas são revolutas com inúmeros tricomas (elaióforos) nas áreas hirsutas, também apresentam estriações em direção a base.

A tépala externa (figura 7A) apresentou uma epiderme uniestratificada em seção transversal; a face abaxial com epiderme de aspecto sinuoso, devido a sua composição de células papilosas, e a presença de estômatos; a face adaxial portanto inúmeros tricomas unicelulares e longos (figura 7C), cutícula aparentemente delicada e núcleo localizado na porção médio-basal. As células da epiderme adaxial, adjacentes aos tricomas, apresentaram um citoplasma denso, principalmente na porção voltada ao meio externo. Mesofilo multiestratificado, 2–5 estratos, células de formato alongado, com pequenos espaços entre as células, principalmente, próximo aos feixes vasculares. Feixes vasculares do tipo colateral.

A tépala interna (figura 7B) com epiderme uniestratificada em seção transversal, células com núcleos evidentes; epiderme da face abaxial com células de formato redondo a alongado; epiderme na face adaxial com células menores e papilosas, aparentando uma epiderme sinuosa, células com citoplasma denso; Mesofilo com células grandes e arredondadas, com vários estratos na região central, 5-7, sendo que o número de estratos diminui em direção das extremidades, 3-4 estratos, algumas células com um citoplasma mais denso e vacúolos aparentes. Feixes vasculares do tipo colateral, grânulos de amido foram observados próximos aos feixes de maior calibre (figura 7D). O teste para lipídios estruturais evidenciou uma delicada cutícula sobre a epiderme (figura 7E).

Androceu

Androceu composto por três anteras tetrasporangiadas, bilobadas, basifixas e de conectivo amplo, adpressas ao estilete e suportadas por três filetes totalmente livres entre si.

Filete (figura 7K) com epiderme uniestratificada em seção transversal, células com citoplasma denso, vacúolos aparentes e núcleos bem evidentes, de formato irregular a alongado, com uma espessa camada de pectina na parede externa. Células do mesofilo menores do que as da epiderme, de formato arredondado.

Antera (figura 7F) composta por um conectivo amplo; região da teca composta por uma epiderme uniestratificada com células pequenas e de formato cubico a arredondado, endotécio apresentado 1 a 2 camadas de células, com visíveis espessamentos parietais; espessamentos do tipo U, anel (figura 7J) e helicoidal (figura 7I); camada média e tapete se mostraram efêmeros durante a antese. Conectivo formado por quatro expansões laterais. Foi observada uma secreção aparente na região entre essas expansões, as células dessa região apresentaram citoplasma mais denso (figura 7H), com possível secreção em seu interior, grânulos de amido foram observados nas células que compõem a epiderme do esporângio (figura 7G). Presença de um feixe colateral, localizado centralmente no conectivo. Células do mesofilo grandes e de formato irregular. Estômatos foram observados tanto na região do conectivo quanto na região da teca, inclusive na região estomial.

Gineceu

O gineceu é formado pelo estigma, estilete e pelo ovário, contendo cavidades (lóculos) onde estão acomodados os óvulos. O ovário em *Phalocallis* é ínfero, trilocular e tricarpetal. O estilete é trifurcado e dotado de adereços (petaloide) com a região estigmática bífida.

Estilete de formato triangular arredondado com tecido transmissor do tipo oco, em seção transversal (figura 7M), epiderme externa com células oblongas-alongadas, mesofilo composto por células isodiamétricas e arredondadas, sendo que o tamanho das células diminuiu em direção a epiderme interna, está por sua vez, apresenta células pequenas com citoplasma denso com aspecto típico de um tecido secretor, presença de três feixes vasculares. Superfície estigmática das cristas do estilete, composta por papilas de formato alongado (figura 7N), com citoplasma denso, vacuolado, com núcleo central bem evidente, células próximas também de formato papiloso, não tão alongadas, e com citoplasma denso.

O ovário apresenta formato triangular-arredondado em seção transversal mediana. A epiderme externa é composta por uma camada de células cúbicas-alongadas. Mesofilo multiestratificado com células de formato arredondado; grânulos de amido foram observados na região do mesofilo, principalmente próximo aos feixes vasculares (figura 7P). Epiderme interna com células achatadas. O teste para polissacarídeos revelou um citoplasma denso e granuloso nas células da epiderme externa e nos 4 a 5 estratos do mesofilo adjacentes (figura 7O).

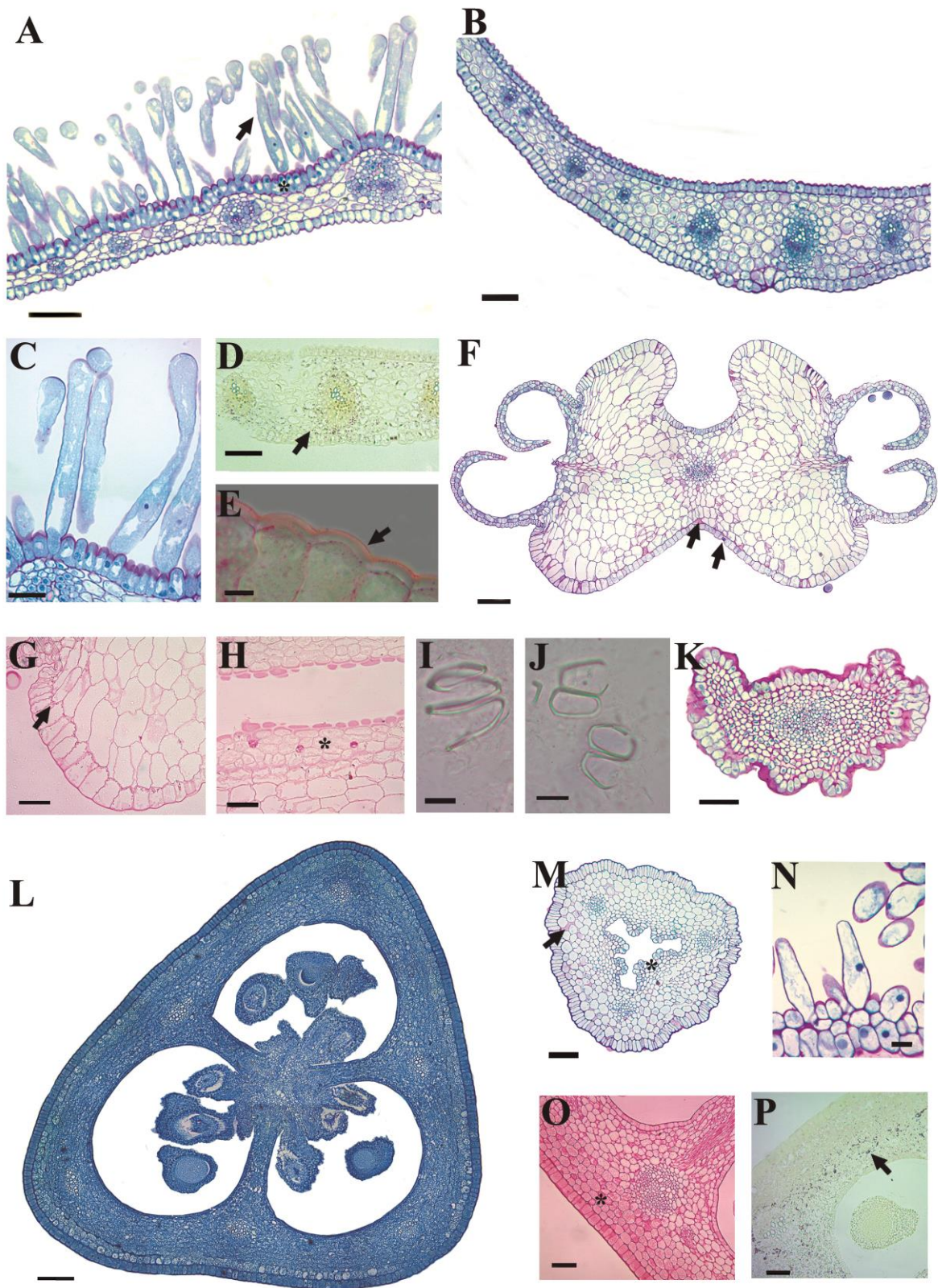


Figura 7: *Phalocallis coelestis*. **A:** Tépala externa em seção transversal, destaque para a presença de tricomas (seta) e epiderme adaxial com citoplasma denso (*); **B:** Tépala interna em seção transversal; **C:** Tricoma da tépala externa em seção longitudinal, evidenciando um citoplasma denso granuloso e vacuolado; **D:** Grânulos de amido presentes na tépala interna, principalmente próximo ao feixe vascular (seta); **E:** Teste com sudan, evidenciando uma cutícula espessa na tépala interna (seta); **F:** Antera em corte transversal, destaque para os espaços subepidérmicas e presença de estômatos (setas); **G:** Grânulos de amido na região do esporângio na antera (seta); **H:** Antera em seção longitudinal, evidenciando células com citoplasma granulosa na região próxima ao conectivo (*); **I-J:** Espessamentos do tipo helicoidal, U e anel; **K:** Filete em seção transversal; **L:** ovário em seção transversal mediana?; **M:** Estilete em seção transversal, com destaque para o tecido secretor (*) e presença de espaços intercelulares (seta); **N:** Papila estigmática em seção longitudinal, com núcleo evidente; **O:** Teste para polissacarídeos no ovário em seção transversal, com células de citoplasma denso e granuloso (*); **P:** Grânulos de amido no parênquima do ovário. **Escalas:** F: 200 µm; A, B, D, G, H, K, M, O, P: 100 µm; C: 40 µm; E, I, J, N: 20 µm.

***Phalocallis* sp.**

Perigônio

O perigônio apresenta tépalas externas e internas desiguais, sendo externa maior de formato obovado e levemente voltada para baixo e a interna menor revoluta, portanto inúmeros tricomas na região hirsuta e alguns tricomas esparsos na região da base.

Tépala externa com epiderme uniestratificada em seção transversal (figura 8A); células da parte abaxial menores, de formato oblongo, apresentando uma epiderme menos sinuosa, com a presença de estômatos; epiderme adaxial apresentando aspecto sinuoso, devido a presença de células papilosas, células maiores e de formato arredondado; região do mesofilo com vários estratos, até 9, com maior quantidade de estratos na região central da tépala, presença de espaços entre as células; inúmeros feixes vasculares de tamanhos grandes, médios e pequenos, feixes pequenos se localizam em regiões entre os feixes de tamanho médio.

Tépala interna com epiderme uniestratificada em seção transversal (figura 8B), células da epiderme maiores que as do mesofilo, de formato arredondado na face abaxial e de aspecto papiloso na face adaxial, com uma fina camada cuticular (figura 8D); tricomas unicelulares, longos e estreitos, foram observados na face adaxial, localizados principalmente nas extremidades da lamina; mesofilo com células irregulares e grandes espaços entre as células, feixes de tamanho padronizado. Grânulos de amido foram registados associados a epiderme adaxial (figura 8C)

Androceu

Androceu apresenta três anteras tetrasporangiadas, bilobadas e basifixas, com aparente secreção de néctar na região do conectivo, tanto dorso quanto ventralmente, e adpressas ao estilete e suportadas por três filetes curtos (ca. 2–3 mm) e livres.

Filete com epiderme uniestratificada em seção transversal (figura 8H), com células de formato oblongo-alongado, com granulações evidentes no citoplasma, com deposição de pectina na parede voltada ao lado externo; parênquima com células menores, de formato arredondado, com espaços intercelulares; Grânulos de amido foram registrados em grande parte das células da epiderme e do mesofilo (figura 8I).

Antera (seção transversal) com conectivo e base do esporângio amplo (figura 8F), células de formato irregular a arredondado com aparente secreção na região central do conectivo; epiderme do conectivo muito fina com visíveis espaços intercelulares no parênquima

adjacente. O teste para polissacarídeos se mostrou positivo na área adjacente a epiderme e para a epiderme (figura 8E), possivelmente se tratando de um tecido nectarífero, visto que foi observada secreção nessa região do conectivo em material fresco; feixe vascular central colateral; Endotécio com 1-2 camadas com visível espessamento parietal; espessamento tipo U, anel e helicoidal (figura 8G); camada média e tapete se mostraram efêmeros durante a antese.

Gineceu

Estilete de formato triangular/arredondado em seção transversal (figura 8J), epiderme externa com uma fina deposição de pectina, células estreitas e alongadas; células do mesofilo de formato arredondado, sendo que o tamanho das células vai diminuindo em direção ao centro. Tecido transmissor do tipo oco, de formato irregular, com epiderme secretora, células com citoplasma denso e de pequeno tamanho; três feixes vasculares presentes. Região da superfície estigmática do estilete, portando papilas estigmáticas (figura 8K); papilas de formato alongado, com um grande vacúolo central, citoplasma denso na porção basal, núcleo bem evidenciado e cutícula aparentemente delicada.

Ovário de formato arredondado em seção transversal (figura 8M) com epiderme externa composta de células cúbicas; epiderme interna com células tabulares-alongadas e estreitas, núcleo bem evidente; mesofilo multiestratificado, 7-9 estratos. Algumas células, tanto da epiderme quanto do mesofilo apresentaram citoplasma mais denso (figura 8L), com aparentes vacúolos e núcleo bem evidente. Estômatos foram observados na epiderme externa e interna. Presença de feixes vasculares colaterais. Grânulos de amido foram observados no mesofilo, principalmente nas áreas associadas aos feixes vasculares (figura 8N). Óvulo do tipo tenuinucelado, com dois tegumentos, região da micrópila modificada em papilas; antípodas efêmeras; sinérgides com aparelho fibrilar adjacente (figura 8O).

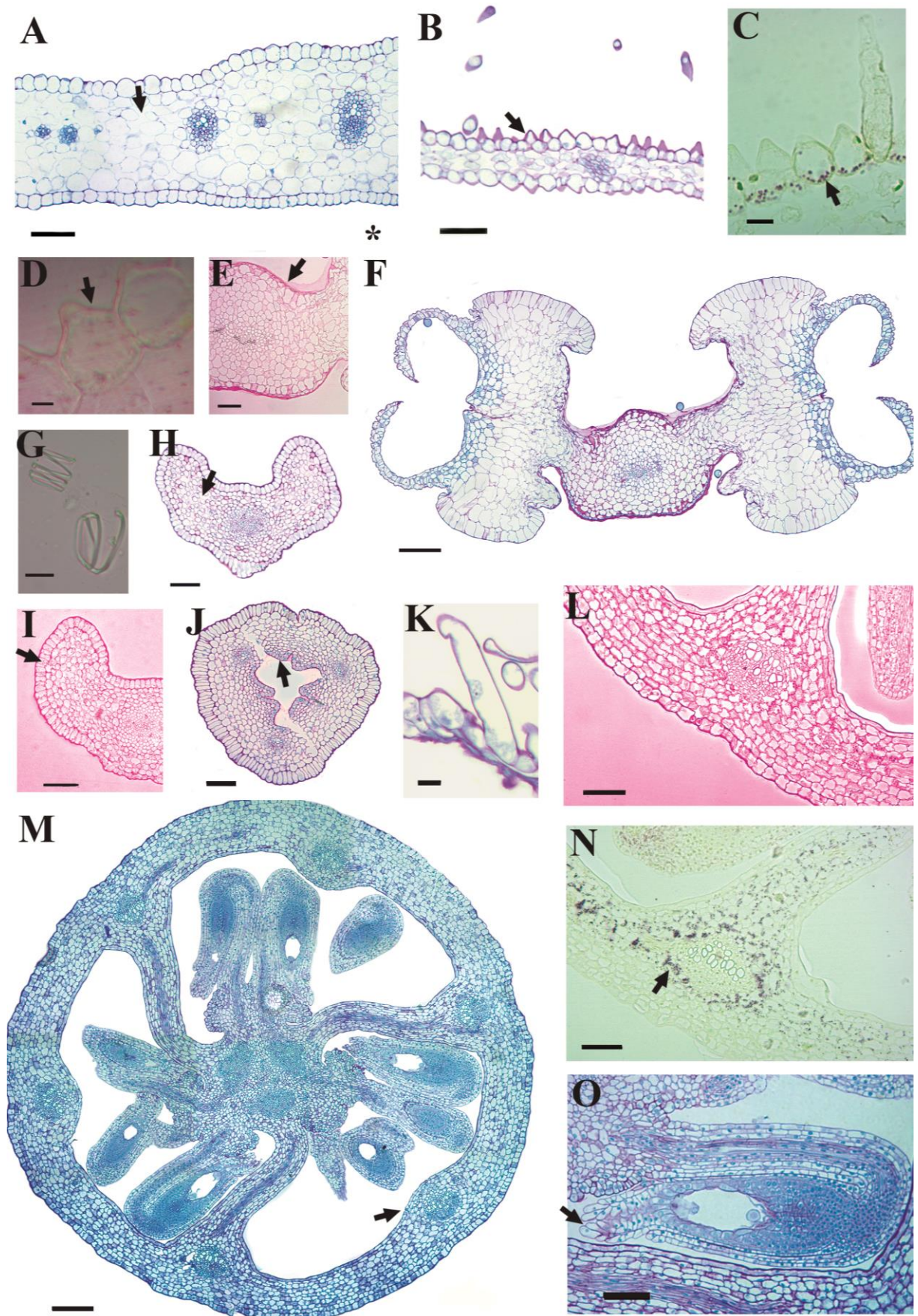


Figura 8: *Phalocallis* sp. **A:** Tépala externa em seção transversal, com espaços intercelulares presentes (*); **B:** Tépala interna em seção transversal, destaque para a epiderme papilosa (seta); **C:** Grânulos de amido nas células da epiderme da tépala interna (seta); **D:** Cutícula sobre a epiderme da tépala interna (seta), teste com sudan; **E:** Teste para polissacarídeos evidenciando uma camada de secreção na região do conectivo (seta); **F:** Antera em seção transversal; **G:** Espessamento do endotécio em forma helicoidal e em anel; **H:** Filete em seção transversal, destaque para os espaços intercelulares (seta); **I:** Teste para polissacarídeos no filete, em seção transversal, destacando os grânulos de amido (seta); **J:** Estilete em corte transversal, destaque para o tecido secretor (seta); **K:** Papila estigmática em seção longitudinal; **L:** Teste para polissacarídeos no ovário em corte transversal, evidenciando um citoplasma denso e granuloso; **M:** Ovário em seção transversal, com estômatos localizados na epiderme interna, próximo ao feixe vascular (seta); **N:** Granuloso de amido localizados no ovário, principalmente próximo ao feixe vascular; **O:** Óvulo em seção longitudinal, com destaque para a região micropilar dotada de células tegumentares (seta). **Escala:** F, M: 200µm; A, B, E, H, I, J, L, N, O: 100µm; C, D, G, F: 20µm.

***Phalocallis* sp. 1**

Perigônio

O perigônio apresenta seis tépalas, sendo possível diferenciar as externas, de formato oboval e maiores, das internas, menores e revolutas. Ambas portando tricomas secretores de óleo, sendo mais abundante na interna.

Tépala externa com epiderme uniestratificada em seção transversal (figura 9A); células da epiderme abaxial oblongo-alongadas, estômatos presente; células da face adaxial papilhosas, citoplasma denso, núcleo bem evidente, tricomas presentes (figura 9E) de formato alongado com citoplasma denso, granuloso e com núcleo centro-basal; mesofilo multiestratificado com células arredondadas; grânulos de amido esparsos (figura 9C) feixes vasculares de diversos tamanhos. Tépala interna com epiderme uniestratificada (figura 9B), células alongadas, papilosas, com citoplasma muito denso; tricomas presentes na face adaxial; mesofilo com células arredondadas de citoplasma denso, com grânulos de amido em sua extensão (figura 9D), com presença de espaços entre as células preenchidos com algum conteúdo de secreção, presença de estômatos em toda extensão da epiderme.

Androceu

Androceu composto por três anteras tetrasporangiadas, bilobadas e basefixas, adpressas ao estilete e suportadas por três filetes totalmente livres e de aspecto delgado.

Antera com epiderme uniestratificada (seção transversal) (figura 9I), endotécio composto por 2 a 3 camadas de células com visível espessamento parietal; espessamento do tipo U e anel (figura 9H); camada média e tapete se mostraram efêmeros durante a antese. Presença de vários estômatos, principalmente associados ao conectivo. Base do esporângio ampla, conectivo com pequenos espaços intercelulares. Teste para polissacarídeos revelou um citoplasma denso nas células da epiderme na região próxima ao feixe vascular, tanto dorsal quanto ventralmente na antera (figura 9F). Filete com células pequenas e delicadas, de formato arredondado com citoplasma denso e presença de um feixe colateral (figura 9G).

Gineceu

Ovário com epiderme externa composta por células cúbicas-alongadas em seção transversal (figura 9J); epiderme interna fina com células alongadas; mesofilo com cerca de 12 estratos de células de formato isodiamétrico, muitos grânulos de amido foram observados

próximo aos feixes vasculares, sendo estes do tipo colateral. O teste para polissacarídeos evidenciou uma epiderme externa com citoplasma denso (figura 9M).

Estile de formato triangular arredondado com tecido transmissor oco (figura 9K), epiderme externa com células alongadas, com citoplasma denso; mesofilo com células arredondadas e de menor tamanho; epiderme interna com células pequenas, de formato cubico-arredondado, e com citoplasma denso, típico de tecidos secretores. Presença de três feixes vasculares. Grânulos de amido foram observados nas regiões próximas aos feixes vasculares. O teste para polissacarídeos revelou células com citoplasma denso e granuloso, principalmente na região da epiderme externa. Papilas de formato alongado e citoplasma denso foram registradas na região da superfície estigmática (figura 9L)

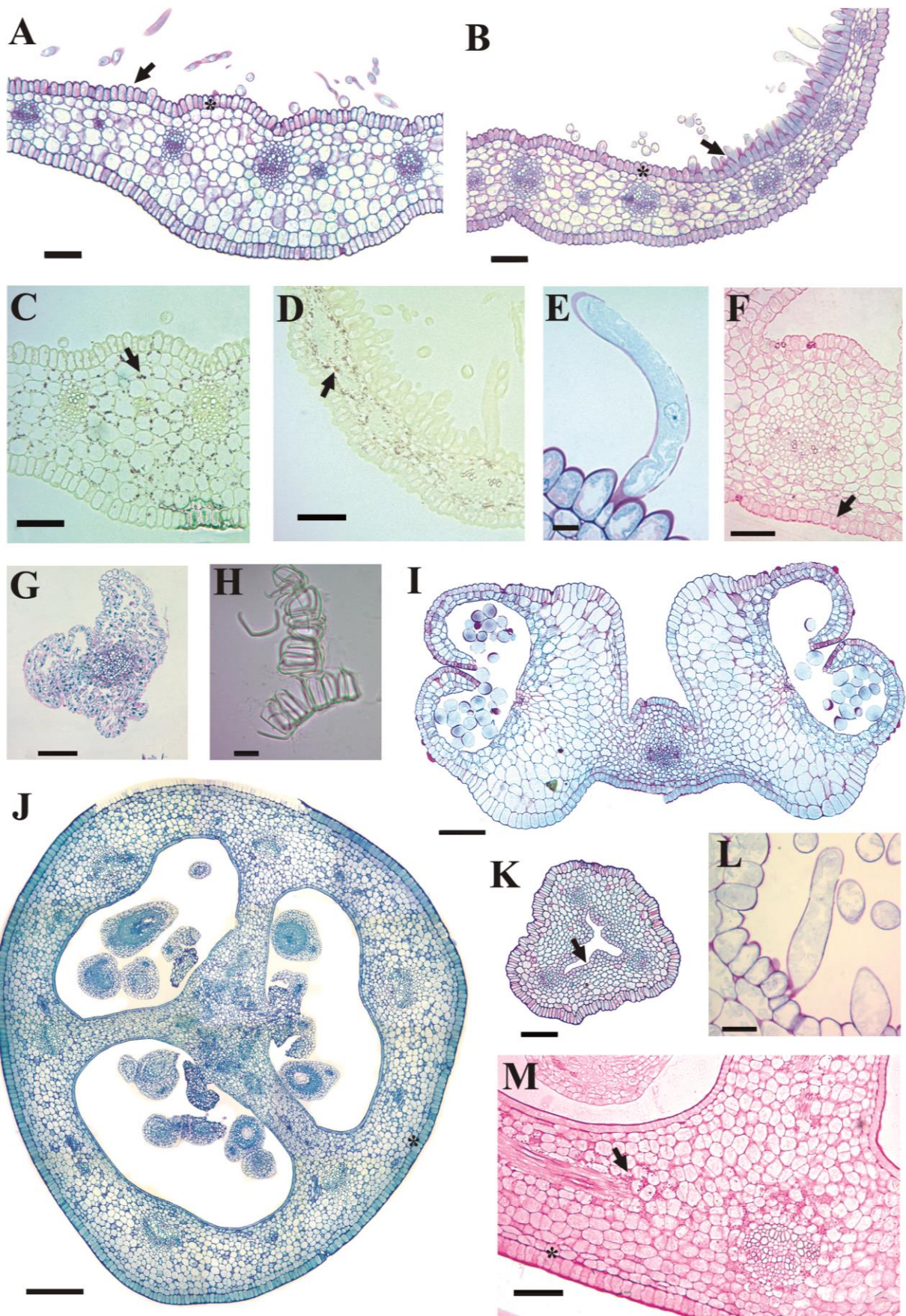


Figura 9: *Phalocallis* sp.1. **A:** Tépala externa em seção transversal , destaque para a epiderme papilosa na face adaxial (seta) e citoplasma denso (*); **B:** Tépala interna em seção transversal, células papilosas (seta) e epiderme com citoplasma denso (*); **C:** Grânulos de amido no parênquima da tépala externa; **D:** Grânulos de amido no parênquima da tépala interna, em maiores quantidades próximo ao feixes; **E:** Tricoma da tépala externa em corte longitudinal; **F:** Teste para polissacarídeos evidenciando epiderme com citoplasma denso na região próxima ao conectivo (seta); **G:** Filete em seção transversal; **H:** Espessamento do endotécio do tipo U; **I:** Antera em seção transversal; **J:** Ovário em seção transversal com destaque para a região epidérmica externa e células parênquimas adjacentes com citoplasma denso; **K:** Estilete em seção transversal, com epiderme secretora (seta); **L:** Papilas estigmáticas em seção longitudinal; **M:** Teste para polissacarídeos evidenciando epiderme e células parenquimáticas com citoplasma granuloso (*) e amido nas células próximas aos feixes (seta). **Escala:** **J:** 300µm; **I:** 200µm; **A, B, C, D, F, G, K, M:** 100µm; **E, H, L:** 20µm

Gelasine coerulea

Perigônio

Perigônio portando três tépalas internas de formato oboval, levemente voltadas para cima, e três tépalas externas de formato oblongo e geniculadas. A tépala externa apresentou epiderme adaxial e abaxial uniestratificada em seção transversal (figura 10A), composta por células isodiamétricas; mesofilo com vários estratos celulares irregulares, com grandes espaços intercelulares, feixes vasculares bem definidos; estômatos presentes, associados aos espaços abaixo da epiderme. A tépala interna de aspecto fino (figura 10B), com epiderme adaxial e abaxial composta por células isodiamétricas; mesofilo com células menores e irregulares, com grandes espaços intercelulares.

Androceu

Antera com epiderme uniestratificada em seção transversal (figura 10D), endotécio com 1-2 camadas celulares, espessamento parietal do tipo helicoidal (figura 10C). Conectivo com células isodiamétricas, com um feixe vascular central bem desenvolvido. Porção basal do esporângio, no dorso da antera, com maior quantidade de estratos celulares, sendo essas células maiores que as demais. Uma grande quantidade de amido foi observada na região do conectivo e base do esporângio (figura 10E).

Gineceu

Gineceu composto por ovário ínfero, trilocular com inúmeros óvulos. Estilete longo (acima do androceu e perigônio), filiforme e trifido, região estigmática dotada de papilas. Estilete de formato triangular-arredondado em seção transversal (figura 10G), epiderme externa com células alongadas, parênquima com células arredondadas, presença de três feixes vasculares. Tecido transmissor do tipo oco com epiderme secretora composta por células pequenas e arredondadas, com citoplasma denso. Superfície estigmática portando papilas de formato alongado, com um grande núcleo central e citoplasma vacuolado (figura 10H). Ovário com formato triangular-arredondado (seção transversal) (figura 10F), epiderme externa com células oblongas-alongadas, justapostas formando uma epiderme regular, estômatos presentes; mesofilo com células isodiamétricas de tamanhos variados, presença de cristais de oxalato de cálcio (figura 10I), presença de três feixes vasculares e três feixes colaterais e outros pequenos feixes de menor calibre observados ao longo da parede do ovário, grânulos de amido também foram observados nas células parenquimáticas; epiderme interna fina, composta por células alongadas.

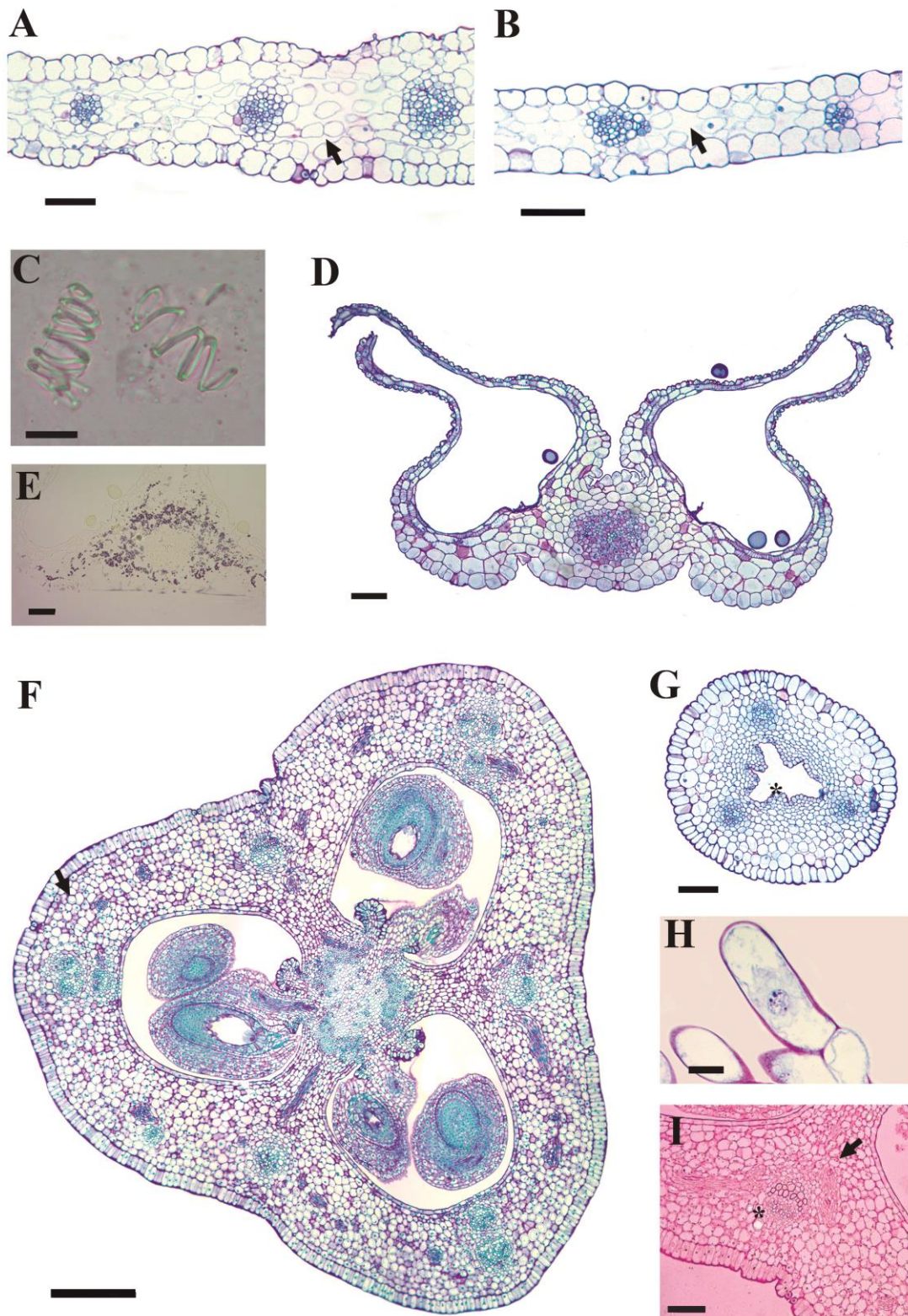


Figura 10: *Gelasine coerulea*. **A:** Tépalas externa em seção transversal, com espaços intercelulares (seta); **B:** Tépalas interna em seção transversal, com espaços intercelulares (seta); **C:** Espessamento do endotécio do tipo helicoidal; **D:** Antera em seção transversal; **E:** Destaque para os grânulos de amido no conectivo da antera ; **F:** Ovário em seção transversal, destaque para a presença de cristais de oxalato de cálcio (seta); **G:** Papila estigmática em seção longitudinal; **H:** Estilete em seção transversal com destaque para o tecido secretor (*); **I:** Teste para polissacarídeos evidenciando grânulos de amido no parênquima do ovário (seta) e a presença de idioblastos (*). **Escala:** F: 300µm; A, B, H, I: 100µm; C, G: 20µm.

Cypella herbertii

Perigônio

A tépala externa apresenta epiderme uniestratificada em seção transversal (figura 11A), face abaxial composta por celular arredondadas e grandes, face adaxial com células menores portando tricomas unicelulares. Mesofilo multiestratificado, 4-6 estratos, células isodiamétricas, espaços intercelulares presentes principalmente abaixo da epiderme abaxial. Feixes vasculares bem desenvolvidos.

A tépala interna com o método de reidratação, as células acabaram se deformando, dificultando em parte a descrição adequada da estrutura. Contudo pode-se notar que a epiderme é uniestratificada e mesofilo multiestratificado. Feixes vasculares bem desenvolvidos. Tricomas unicelulares presentes na face abaxial, de aspecto secretor, curtos e com citoplasma mais denso (figura 11B).

Androceu

Filete de formato triangular em seção transversal (figura 11C), mesofilo composto por células arredondadas. A antera tem um conectivo amplo (figura 11D), epiderme uniestratificada (seção transversal) com células pequenas e arredondadas, estômatos presentes em sua extensão. Endotécio com 1 a 2 camadas, com visíveis espessamentos parietais, região estomial bem desenvolvida composta por um conjunto de células endoteliais e epiteliais. Camada média e tapete efêmeros nessa fase. Conectivo achatado com células de vários tamanhos e formatos. Feixe vascular de pequeno calibre localizado no centro do conectivo.

Gineceu

Estilete de formato triangular em corte transversal e tecido transmissor oco. Epiderme externa com células alongadas, com aparente deposição de pectina subcuticular. Mesofilo composto por células pequenas e arredondadas, epiderme interna com células ainda menores e citoplasma denso. Três feixes vasculares presentes.

O ovário apresenta epiderme externa com células cubico-retangulares (seção transversal), uniestratificada com presença de estômatos (figura 11E). A epiderme interna composta por células menores e achatadas. Mesofilo com vários estratos de células isodiamétricas com feixes vasculares bem desenvolvidos. Por se tratar de uma amostra herborizada reidratada, houve o descolamento da epiderme externa, contudo a análise para a descrição não foi afetada.

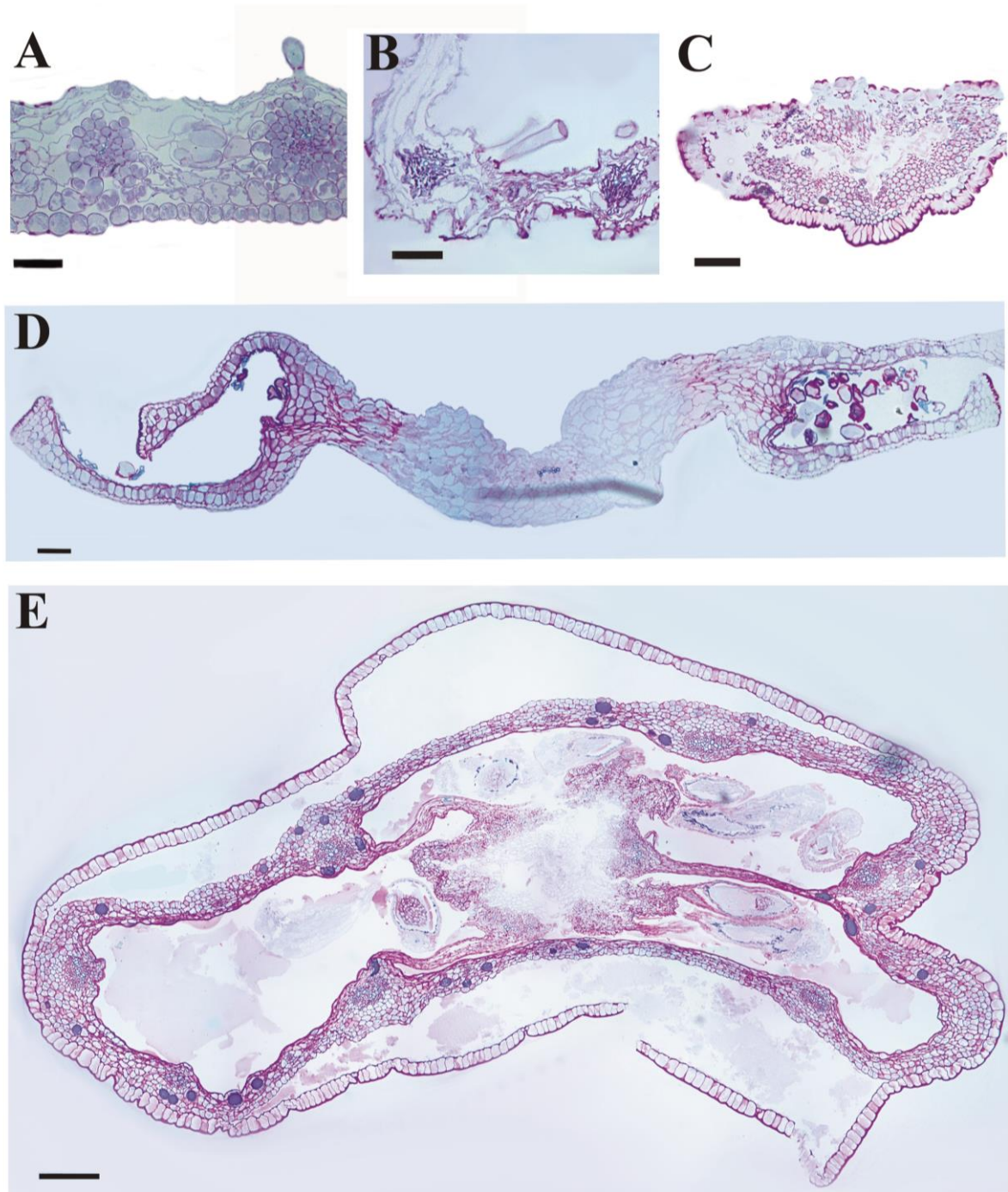


Figura 11: *Cypella herbertii*. **A:** Tépal externa em seção transversal; **B:** Tépal interna em seção transversal, com tricoma evidente; **C:** Filete em seção transversal; **D:** Antera em seção transversal; **E:** Ovário em seção transversal. **Escala:** A-D: 100 μm ; E: 200 μm .

Todos os caracteres florais, com alguma possível relevância taxonômica, foram distribuídos na tabela 05, de modo a destacar os caracteres particulares em cada espécie e estrutura.

Tabela 05: Caracteres da anatomia floral de *Phalocallis coelestis*, *Phalocallis* sp, *Phalocallis* sp1, *Gelasine coerulea* e *Cypella herbertii*.

	<i>PHALOCALLIS</i> <i>COELESTIS</i>	<i>PHALOCALLIS</i> SP 1	<i>PHALOCALLIS</i> SP1	<i>GELASINE</i> <i>COERULEA</i>	<i>CYPELLA</i> <i>HERBERTII</i>
TÉPALA EXTERN A (Seção tranves sal)	Face abaxial com células papilosas ; Face adaxial com tricomas ; Mesofilo com 2 a 5 estratos, presença de pequenos espaços intercelulares;	Face abaxial com células menores , de formato oblongo; face adaxial com células maiores, papilosas ; mesofilo com até 9 estratos, presença de espaços intercelulares;	Face abaxial com células oblongo-alongadas; face adaxial com células papilosas com citoplasma denso e com tricomas ; mesofilo com células arredondadas;	Face abaxial e adaxial com células isodiamétricas; mesofilo com estratos celulares irregulares e grandes espaços intercelulares;	Face abaxial com células arredondadas e grandes, face adaxial com células menores com tricomas . Mesofilo com 4-6 estratos, células isodiamétricas, com espaços principalmente abaixo da epiderme abaxial.
TÉPALA INTERN A (Seção tranves sal)	Face abaxial com células alongadas/arredondadas ; face adaxial com células papilosas ; mesofilo com 3 a 7 estratos;	Face abaxial com células arredondadas ; face adaxial com células papilosas e tricomas ; mesofilo com grandes espaços intercelulares.	Face abaxial e adaxial com células alongadas-papilosas , citoplasma denso e tricomas na face adaxial; mesofilo com células arredondadas com espaços intercelulares preenchidos com secreção;	Face abaxial e adaxial com células isodiamétricas; mesofilo com células menores e irregulares com grandes espaços intercelulares;	Epiderme é uniestratificada e mesofilo multiestratificado. Tricomas unicelulares na face adaxial.
ANTER A (Seção tranves sal)	Conectivo amplo com expansões laterais, células grandes de formato irregular, com grânulos de amido; secreção aparente no conectivo; espaços intercelulares abaixo da epiderme e presença de vários	Base do esporângio e conectivo amplo, células de formato irregular a arredondado com aparente secreção ; epiderme do conectivo muito fina com visíveis espaços intercelulares no parênquima adjacente.	Base do esporângio ampla; epiderme no dorso e ventre da antera com células de citoplasma denso ; conectivo com pequenos espaços intercelulares; Espessamento U e anel ;	Espessamento helicoidal ;	Conectivo amplo e achatado, epiderme uniestratificada com células pequenas e arredondadas, região estomial bem desenvolvida composta por células endoteliais e epiteliais.

	estômatos; Espessamento tipo U, anel e helicoidal;	Espessamento tipo U, anel e helicoidal;			
FILETE (Seção tranves sal)	Formato triangular; células do parênquima com citoplasma denso;	Epiderme com citoplasma denso e granuloso; parênquima com células menores e arredondadas com espaços intercelulares;	Células pequenas e delicadas, de formato arredondado e citoplasma denso;	-	-
ESTILE TE (Seção tranves sal)	Formato triangular arredondado;	Formato triangular arredondado; epiderme externa com uma fina deposição de pectina;	Formato triangular arredondado;	Formato circular;	Formato triangular
OVÁRIO (Seção tranves sal)	Epiderme externa com células cúbicas- alongadas; parênquima com células arredondadas com grânulos de amido; citoplasma denso e granuloso na epiderme externa e nos estratos adjacentes;	Epiderme externa com células cúbicas; parênquima com citoplasma denso e vacúolos aparentes;	Epiderme externa com células cúbicas- alongadas e citoplasma denso; parênquima com células isodiamétricas, com muitos grânulos de amido próximo ao feixe vascular;	Formato triângulo- arredondado em C.T. Epiderme externa com células oblongo- alongadas; parênquima com células isodiamétricas de tamanhos variados, presença de cristais de oxalato e grânulos de amido;	Epiderme externa com células cúbico- retangulares, epiderme interna com células menores e achatadas. Mesofilo com vários estratos de células isodiamétricas.

Anatomia foliar

Phalocallis

Todos os acessos de *Phalocallis* mostraram uma epiderme uniestratificada, composta por células arredondadas-achatadas, região da quilha com células menores; mesofilo com células arredondadas em *Phalocallis coelestis* (figura 12A-B) e células variando de

isodiamétricas a alongadas (paliádicas) em *Phalocallis* sp (figura 12C), espaços intercelulares presentes em ambas, principalmente associados aos estômatos, em regiões subepidérmicas.

Phalocallis coelestis e *Phalocallis* sp.1 apresentaram quilha mais pronunciada e de formato arredondado, com maior quantidade de fibras (esclerênquima) associadas ao feixe vascular (figura 12B), do que *Phalocallis* sp, que apresentou quilha de formato acuminado (figura 12D). A margem foliar apresenta dois feixes vasculares espelhados entre si com esclerênquima em todos os acessos (figura 12I). *Phalocallis* sp.1 se destacou pela presença de papilas na região da quilha, dado considerado inédito para o gênero.

Gelasine

Gelasine coerulea conta com uma epiderme uniestratificada, composta por células arredondadas, região da quilha com células menores; mesofilo com células isodiamétricas e uma camada de células alongadas, lembrando células paliádicas, e grandes espaços intercelulares presentes (figura 12E-F). Grande quantidade de células esclerenquimáticas associadas ao feixe vascular na base da quilha, com alguns feixes de menor calibre circundando as células fibrosas. Quilha de formato acuminado. Esclerênquima marginal presente (figura 10J).

Cypella

Epiderme uniestratificada. Quilha com pronunciada extensão, de formato arredondado, com feixes de menor calibre e com esclerênquima localizado na extremidade da quilha (figura 12G-H). Pouco esclerênquima presente na proximidade com o feixe vascular da base da quilha (tabela 06).

Tabela 06: Alguns aspectos da anatomia foliar em *Phalocallis*, *Gelasine* e *Cypella*.

	<i>PHALOCALLI</i> <i>S COELESTIS</i>	<i>PHALOCALLI</i> <i>S SP</i>	<i>PHALOCALLI</i> <i>S SP 1</i>	<i>GELASINE</i> <i>COERULEA</i>	<i>CYPELLA</i> <i>HERBERTII</i>
CLASSIFICAÇÃO*	Plicado	Plicado	Plicado	Plicado	Foliado
FORMATO DA QUILHA	Arredondado	Acuminado	Arredondado com papilas presentes	Acuminado	Arredondado
ESCLERÊNQUIMA MARGINAL	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente

*: Baseada em Ruddal (1991)

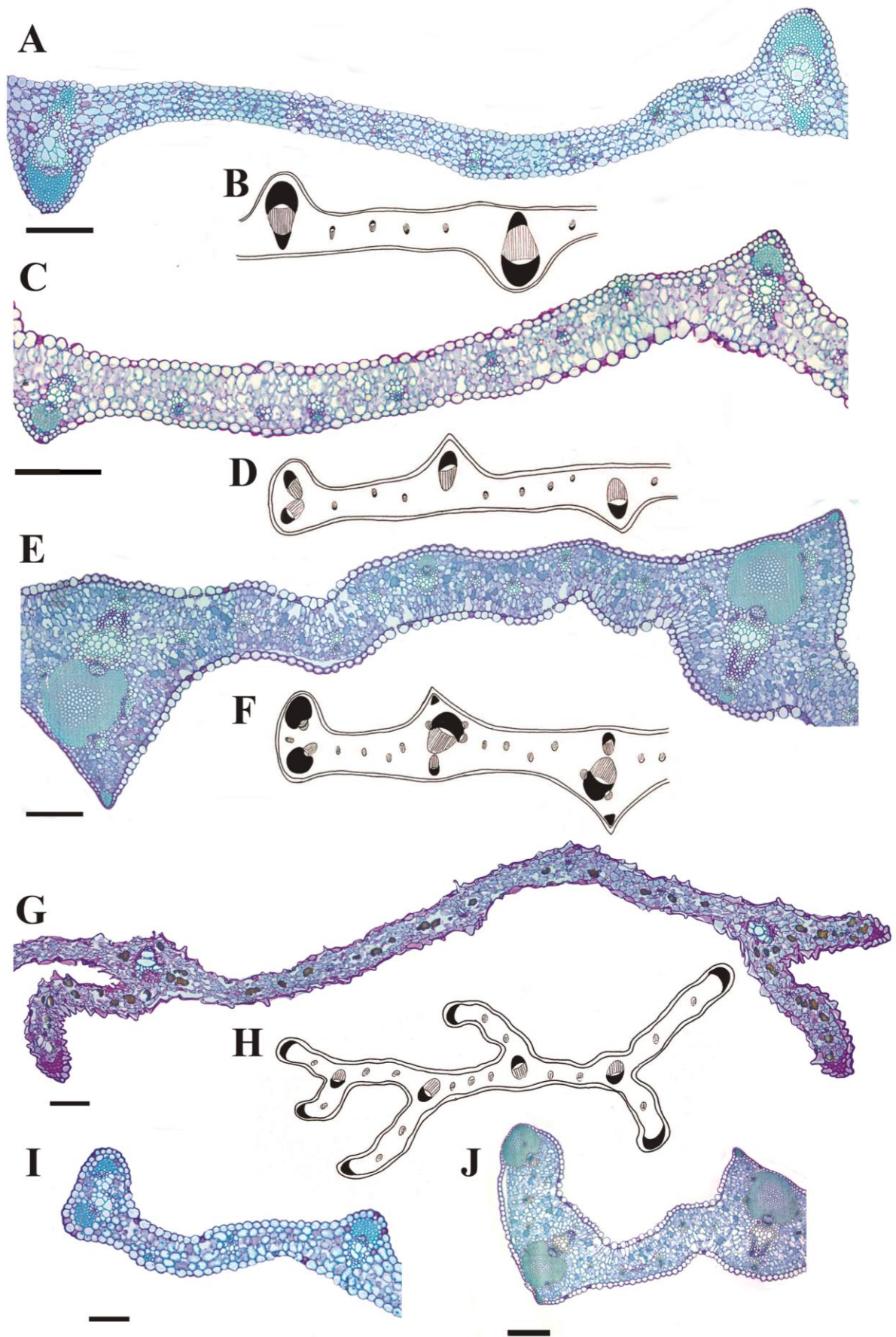


Figura 12: Anatomia foliar. **A:** Folha em seção transversal de *Phalocallis coelestis*; **B:** Diagrama da folha de *Phalocallis coelestis*; **C:** Folha em seção transversal de *Phalocallis* sp 1; **D:** Diagrama da folha de *Phalocallis* sp 1; **E:** Folha de *Gelasine coerulea*, em seção transversal, destaque para o esclerênquima na extremidade da quilha (seta); **F:** Diagrama da folha de *Gelasine coerulea*; **G:** Folha em seção transversal de *Cypella herbertii*; **H:** Diagrama da folha de *Cypella herbertii*; **I:** Destaque para a margem foliar de *Phalocallis coelestis*; **J:** Margem foliar de *Gelasine coerulea*, destaque para o esclerênquima marginal (seta). **Escala:** **A, C e E:** 200µm; **G, I e J:** 100µ.

Dados Palinológicos

Tanto em *Phalocallis* quanto em *Gelasine*, os grãos se mostraram heteropolares, monossulcados, com simetria bilateral e superfície reticulada (figura 13A-D). Em todos os acessos de *Phalocallis* o formato observado foi prolato-esferoidal, já em *Gelasine* o formato oblato-esferoidal é apontado (tabela 07). Para *Cypella herbertii* não foi possível estimar o formato, nem o tamanho devido a distorção dos grãos de pólen.

Para avaliar a variação do tamanho do pólen, a análise gráfica boxplot foi empregada (figura 14). Pode-se observar grãos de pólen menores em *Phalocallis* sp.1 variando de $\cong 40 \mu\text{m}$, a $\cong 45 \mu\text{m}$, com mediana de $\cong 42 \mu\text{m}$, tendendo ao alcance maior. Em *P. coelestis* variou de $\cong 43 \mu\text{m}$ a $\cong 50 \mu\text{m}$, com mediana de $\cong 45 \mu\text{m}$, tendendo ao alcance maior. Já *Phalocallis* sp., apresentou o maior pólen dentro do gênero, variando de $\cong 45 \mu\text{m}$ a $\cong 51 \mu\text{m}$, com mediana de $\cong 47 \mu\text{m}$, tendendo ao menor alcance. *Gelasine coerulea*, usada como grupo comparativo devido a sua proximidade filogenética com *Phalocallis*, apresentou o maior tamanho de pólen, variando de $\cong 55 \mu\text{m}$ a $\cong 65 \mu\text{m}$, com mediana de $\cong 58 \mu\text{m}$ com eixo de variação centralizado. Segundo a classificação de Erdtman (1945), o gênero *Phalocallis* tem grãos de pólen médios, já *G. coerulea* tem grãos de pólen grandes.

O padrão reticulado da exina também se mostrou diferente entre os acessos (figura 13 E-I), sendo o mais denso *G. coerulea* (microrreticulado) e o mais frouxo *P. coelestis*, *Phalocallis* sp. e *Cypella herbertii* (reticulado), já *Phalocallis* sp.1 possui lúmens mais estreitos que os demais *Phalocallis* e, portanto, com aspecto mais denso, possivelmente tendendo a microrreticulado.

Diferenças a espessura da intina na região da abertura foram observadas, não podendo ser correlacionada ao tamanho polínico, pois *P. coelestis* foi o acesso com a maior média de espessura na intina na região do sulco em vista equatorial, $6,4 \mu\text{m}$, seguido por *G. coerulea*, $5,6 \mu\text{m}$, *Phalocallis* sp.1 $4,2 \mu\text{m}$ e *Phalocallis* sp., apresentou a menor espessura, $2,9 \mu\text{m}$,

Tabela 07: Medida (μm) dos grãos de pólen, em vista equatorial, dos materiais analisados (n=30) de *Phalocallis coelestis*, *Phalocallis* sp, *Phalocallis* sp.1 e *Gelasine coerulea*. (DPx) media do diâmetro polar, (DEx) media do diâmetro equatorial, (DP/DEx) relação entre o diâmetro polar e equatorial, (sx) desvio padrão.

Espécie	DPx	sx	DEx	sx	DP/DE x	Forma
<i>P. coelestis</i>	50.3	2.5	45.1	2,5	1,12	Prolato-esferoidal
<i>Phalocallis</i> sp	52,2	1,8	47,6	1,3	1,09	Prolato-esferoidal

<i>Phalocallis</i> sp1	43,8	1,3	41,9	1,6	1,04	Prolato-esferoidal
<i>G. coerulea</i>	56,9	1,7	58,3	2,2	0,97	Oblato-esferoidal

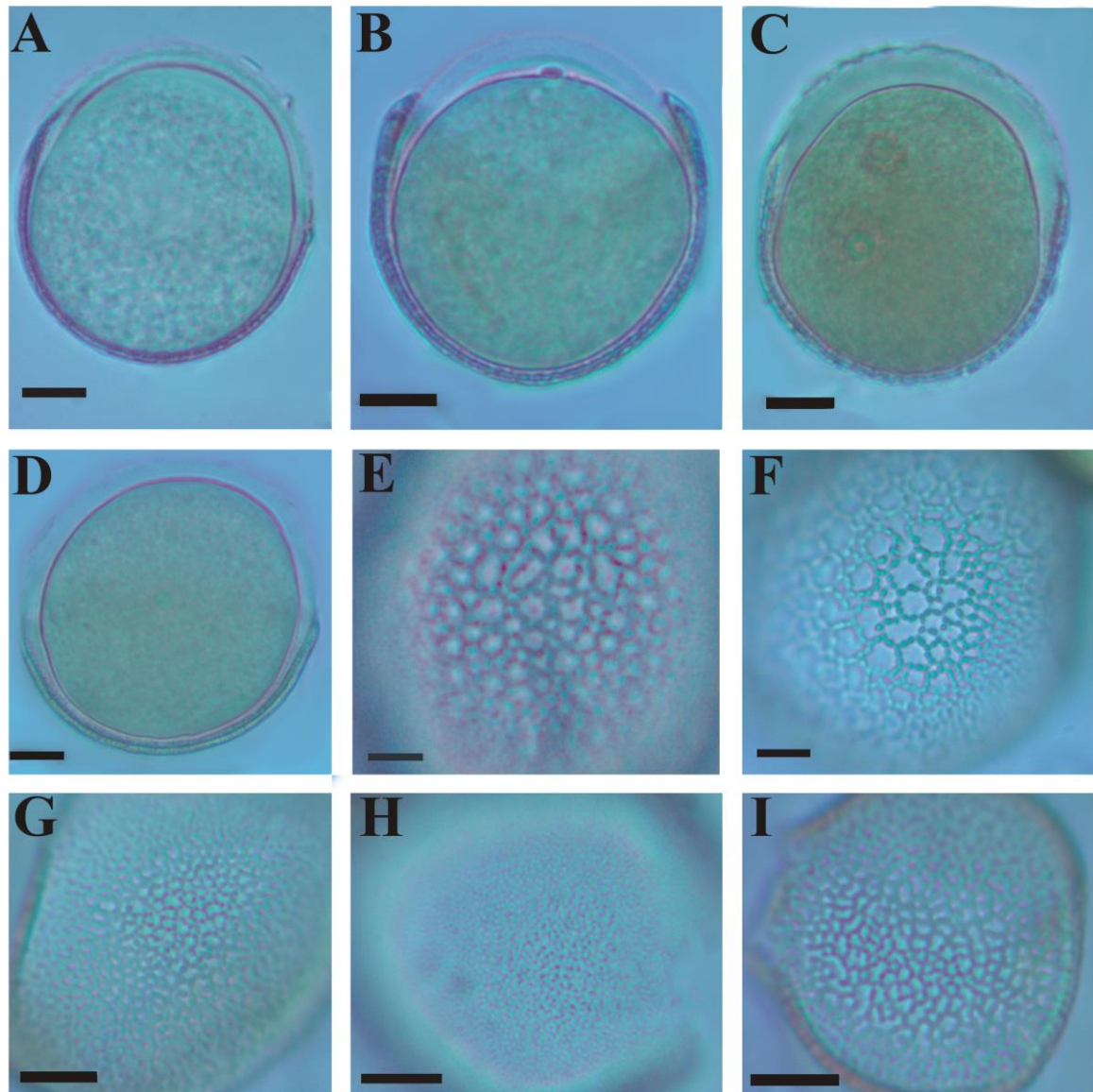


Figura 13: A-D: Grãos de pólen em vista equatorial. A: *Phalocallis* sp. B: *Phalocallis* sp.1; C: *Phalocallis coelestis*; D: *Gelasine coerulea*; E-I: Exina reticulada dos grãos de pólen. E: *Phalocallis* sp.; F: *Phalocallis coelestis*; G: *Phalocallis* sp.1; H: *Gelasine coerulea*; I: *Cypella herbertii*. Escalas: A-I: 10µm.

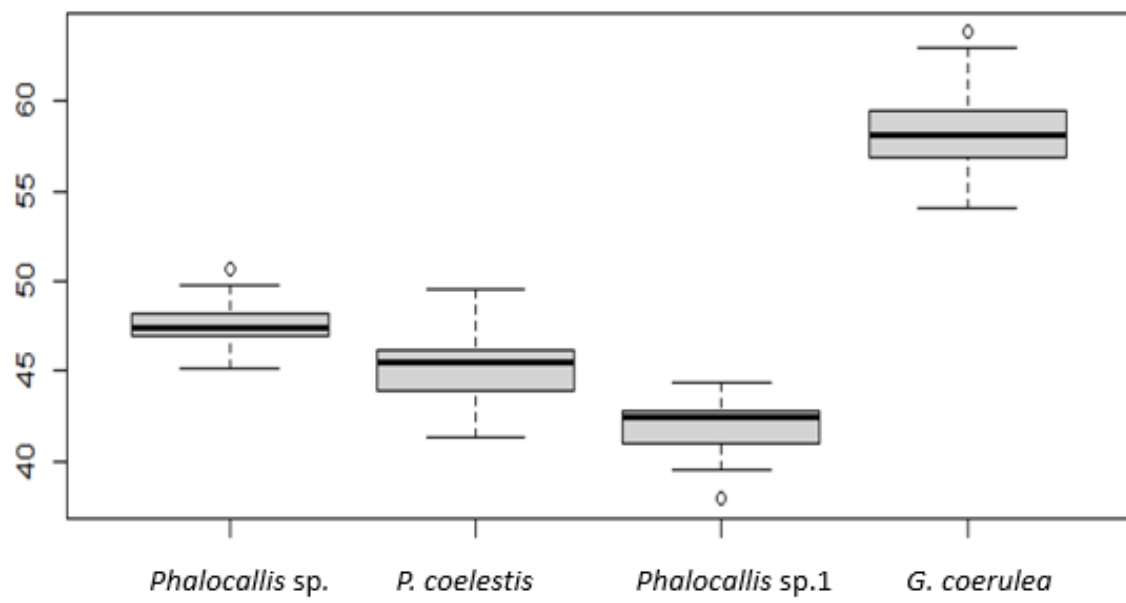


Figura 14: Gráfico Box-plot para tamanho dos grãos de pólen de *Phalocallis sp.*, *Phalocallis coelestis*, *Phalocallis sp.1* e *Gelasine coerulea*.

DISCUSSÃO

Anatomia floral

A anatomia floral é relativamente uniforme para Iridaceae mas a arquitetura geral pode se mostrar muito complexa (RUDALL, 1994).

Perigônio

Uma sinapomorfia para a Iridaceae é a presença de dois verticilos contendo três tépalas cada um. Sendo que para a tribo Tigrideae, as tépalas externas se diferenciam morfologicamente das internas. Todos os acessos para *Phalocallis* apresentaram tépalas externas e interna com epiderme papilosa, seja adaxial, abaxial ou ambas. Rudall (2007) levanta o fato de que nem sempre a distinção entre tricoma e papila é bem clara, mas que para o caso de várias manifestações pequenas em células epidérmicas, se denominam papilas. Estas são menores que os tricomas. Segundo Fahn e Cutter (1992) as papilas podem desempenhar função de refletir a luz e proteger os estômatos contra dessecação e perda de água. A reflexão da luz pode interferir na percepção de cor do visitante, tornando-a mais atrativa visualmente, Endress (1994) aponta que papilas mais proeminentes refletem menos luz, tornando a coloração da estrutura mais saturada. As papilas também podem oferecer uma maior aderência ao pouso do visitante floral, principalmente se tratando de insetos. Em contraste, uma epiderme sem células papilosas também foi registrada, uma superfície lisa faz com que a luz incidente seja fortemente refletida (RUDALL, 2007). Porém tal característica se mostrou ocorrente principalmente na face abaxial das tépalas, a qual apresenta uma coloração mais clara e sem ornamentações.

A presença de tricomas também foi registrada na face adaxial, principalmente na porção revoluta da tépala interna, em *Phalocallis*. Guo (2015) descreve que a distribuição dos tricomas nas tépalas não é um evento aleatório e está diretamente relacionado com o visitante floral. Esses tricomas se tratam de elaióforos, como já descritos por Chauveau *et al.* (2012), devido a sua aparência morfológica característica. Silvério *et al.* (2012) apontam que a morfologia e a espessura da cutícula (blíster) do tricoma pode ser variável, visto que está diretamente relacionada com o tipo de polinizador. A região do blister não se mostrou tão proeminente quando comparada a outras espécies da família, como algumas do gênero *Sisyrinchium*. Os teste para lipídios mostraram pouca deposição de óleo nessa região, principalmente para *Phalocallis* sp. podendo ser um indicio da mudança de recurso ao polinizador, visto que essa espécie apresentou uma quantidade considerável de néctar na região

estaminal, estando presente na região dorsal e ventral da antera, no conectivo. *Phalocallis* sp.1, por sua vez apresentou maior quantidade de tricomas, podendo ser observado tanto na tépala interna quanto na externa e, apesar de um tecido aparentemente ativo para secreção na região estaminal, nenhum néctar foi observado.

O teste para lipídios insolúveis evidenciou a presença de uma cutícula fina a qual é apontada como a primeira barreira de proteção da planta em contato com o ambiente, ela constitui um obstáculo para o movimento da água, incluído o processo de transpiração (EVERT, 2006). Foram observados espaços entre as células parenquimáticas das tépalas externas e internas, variando quanto ao grau de espaçamento. A presença desse aerênquima pode estar relacionada com uma maior leveza da estrutura (ENDRESS, 1994), além de facilitar a passagem de gases. A atribuição de uma maior leveza as tépalas devido a presença de aerênquima pode, em parte, explicar a dificuldade de herborização desse material, frente a fragilidades das flores.

Muitas características presentes na epiderme das tépalas são provenientes de adaptações evolutivas, frente à conquista das angiospermas nos mais variados ambientes. Desse modo, pode ser tratada como um importante caractere taxonômico e sistemático, já que pode estar relacionada também com as interações entre planta-polinizador. Peris (2017) aponta que cerca de 85% das angiospermas são polinizadas por animais, principalmente por insetos. Esse fato acarreta adaptações morfológicas e comportamentais tanto para a planta quanto para o polinizador.

Androceu

O androceu de todos os acessos é constituído por três anteras tetrasporangiadas, bilobadas, dorsifixas, suportadas cada uma por um filete ereto. Goldblatt e Manning (2008) apontam que a redução do número de estames para três na família (vs. seis nas outras relacionadas), pode ser considerada como o primeiro passo essencial que conduz a colocação exata do pólen no corpo do polinizador, o que possibilita um sistema de polinização especializada para Iridaceae.

A estrutura da antera é conservada em angiosperma (ENDRESS, 1994) e apresentaram distinções entre os acessos, principalmente na região do conectivo e interior do esporângio, consistindo no arranjo das células, seus tamanho e formatos, podendo ser tratado como um forte determinante taxonômico entre as espécies. Um conectivo amplo foi observado em alguns dos acessos, a presença de expansões laterais, pode ser na verdade um aumento no número de células na inserção da teca com o conectivo, aparentando um conectivo amplo. Puri (1951)

afirma que variações morfológicas estão localizadas na região do conectivo e na lateral interna do esporângio. Desse modo, as características dessa região podem ser melhores investigadas para fins taxonômicos e sistemáticos, já que podem apresentar diferenças significativas entre os *taxa*. Uma observação da antera durante a pré-deiscência é indicada, a fim de levantar mais dados quanto a estruturação, visto que a antera se mostrou com profundas diferenças estruturais entre os acessos.

A presença de grânulos de amido também foi registrada na antera deiscente, Keijker (1987) afirma que a hidrólise de amido pode estar relacionada com o processo de deiscência da antera. Assim como a presença de estômatos na região da antera podem estar relacionados com o processo de dessecação e deiscência da antera por meio da liberação de água (HESLOP-HARRISON *et al.*, 1987). Além disso, a presença de amido no conectivo também pode estar relacionado com a presença de secreção nessa região. A secreção foi observada na região do conectivo em *Phalocallis coelestis* e *Phalocallis* sp, onde possivelmente se localiza um tecido nectarífero, sendo o néctar exsudado através dos estômatos. Fahn (1979) aponta que o néctar pode ser produzido em áreas do filamento e conectivo em determinados grupos, podendo apresentar feixe vascular composto principalmente por floema, além de um parênquima especializado em armazenar o néctar (FAHN, 2000; PACINI *et al.*, 2003). A presença desses tecido secretor de néctar é descrita para *Cypella herbertii* (DEVOTO E MEDAN, 2008), gênero pertencente ao clado A da filogenia proposta por Chauveau *et al.*, (2012), em Tigrideae. Porém, essa mesma filogenia posiciona *Phalocallis* no clado B, onde não há registro de nectário na região da antera, como pode ser observado em *Gelasine coerulea*, presente nesse estudo. Isso pode significar que esse nectário evoluiu independentemente mais de uma vez dentro da tribo Tigrideae.

Phalocallis sp 1, apesar de apresentar uma epiderme com características de possível atividade secretora, isto é uma epiderme com citoplasma denso, não foi observada secreção durante a análise morfológica. A ausência dessa recompensa pode estar relacionada com a pressão seletiva direcionada por agentes polinizadores. Uma ocorrência similar foi descrita no gênero *Sisyrinchium* para espécies ocorrentes na América do Norte, onde foram descritos elaióforos vestigiais que não produzem mais óleo, sendo que essas espécies são visitadas apenas por abelhas coletoras de pólen (COCUCCI E VOGEL, 2001). Além disso, um recente estudo realizado com *Pseudotrimezia* (LOVO *et al.*, 2021) aponta a presença de espécies produtoras de óleo e pólen e espécies que apresentam apenas pólen, sendo que as últimas parecem ser mais derivadas apesar da simplicidade na oferta de recursos.

Outra característica observada foi a epiderme do esporângio e as camadas do endotécio. Sendo que o endotécio mostrou algumas diferenças quanto ao tamanho celular e disposição das camadas entre os acessos, essas diferenças pode estar relacionadas ao processo de deiscência. Manning e Goldblatt (1990) afirmam que para a família Iridaceae o endotécio pode constituir um caractere de grande relevância taxonômica. Segundo Johri (1984) endotécio com mais camadas é comumente encontrado em famílias relativamente mais primitivas, o que pode indicar se tratar de uma característica basal. O autor ainda afirma que a tendência filogenética é de redução do tecido endotecial.

Os espessamentos parietais presentes nas células do endotécio podem contribuir como mecanismo de deiscência da antera. Os apresentaram espessamentos em forma de U, de anel e helicoidal, sendo esse último tipo não visualizado somente em *Phalocallis* sp 1. Para Manning e Goldblatt (1990) o espessamento em forma de U pode ser considerado como uma forma básica, visto que os espessamentos helicoidais ocorrem em membros mais especializados na família. Contudo esse fato é conflitante com estudos feitos com outras monocotiledôneas (FRENCH, 1985; MANNING; LINDER, 1990), que sugerem que o espessamento em U é um tipo especializado de um helicoidal simples. Este último cenário se mostra menos parcimonioso, já que exige a evolução independente de caracteres em membros da família, portanto, dizer se este espessamento é uma característica básica permanece um tanto controverso. Para o caso deste estudo em questão, foi observado que todos os tipos de espessamento ocorrem em quase todos os acessos, deixando inconclusiva a relação dos acessos aos tipos de espessamento do endotécio.

O tapete e as camadas médias são efêmeros e provavelmente o tapete participa da formação do pollenkitt. Um estudo feito em *Lilium longiflorum* demonstrou a origem tapetal do pollenkitt e sua constituição, principalmente, de lipídeos e carotenóides (JOHRI, 1984). Pacini e Hesse (2005) sugerem que o pollenkitt tem a função de proteger o pólen contra a desidratação e radiação ultravioleta, conter o pólen no interior da antera até a dispersão e mantê-los juntos durante o transporte, além de permitir aderência no corpo do animal e proporcionar maior atratividade do pólen para os visitantes. Silvério *et al.* (2012) descrevem a ocorrência de grandes quantidades de pollenkit associados ao pólen em espécies do gênero.

O filete é a estrutura que sustenta a antera e se apresenta em número de três em Iridaceae. Foi observada uma fragilidade nessa estrutura, pode ser devido ao pequeno tamanho das células parenquimáticas e a presença de espaços entre as células. No caso de *Phalocallis* sp.1, o filete perdeu a sua conformação original ficando com um aspecto retorcido, o mesmo

foi observado em pequena escala para *Phalocallis coelestis*. A fragilidade do filete em sustentar a antera é compensada pela característica adpressa da antera ao estilete, sendo observada apenas em *Phalocallis*, as espécies comparativas não apresentaram tal característica, apesar de não ter sido possível observar o filete de *G. coerulea* e o de *C. herbertii* estar desconformado devido a herborização da amostra. Apesar disso, acredita-se que eles contem com uma estruturação mais reforçada para suportar a antera sem que está se escore no estilete.

Gineceu

O gineceu é a parte central e mais complexa nas flores (ENDRESS, 1994), é formado pelo estigma, estilete e ovário, contendo cavidades (lóculos) onde estão acomodados os óvulos.

O estigma é a superfície receptiva ao grão de pólen e o seu desenvolvimento apropriado é essencial para essa receptividade. A presença de papilas foi observada em todos os acessos, elas facilitam a aderência e reconhecimento do grão de pólen ao estigma. O estilete é a estrutura que interliga o estigma ao ovário e, por meio do tecido secretor, realiza nutrição e orientação do tubo polínico quando este atravessa o gineceu até chegar ao lóculo do ovário em direção ao óvulo, fornecendo um meio para o crescimento e possibilitando a passagem de sinais elétricos. Todos os acessos de *Phalocallis* apresentaram estilete de formato triangular com pontas arredondadas, podendo ser uma característica constante no gênero e diferenciando-se de *G. coerulea*, a qual apresentou estilete de formato arredondado.

O ovário é tricarpelar, trilocular, portando diversos óvulos, característico para a família. *Phalocallis* sp e sp1 apresentaram ovário de formato circular em corte transversal, em contraste com formato triangular com ângulos arredondados em *P. coelestis* e *Gelasine*. Esta última também apresentou idioblastos de cristais na região parenquimática, fato não observado em *Phalocallis*, os cristais de oxalato de cálcio podem estar atrelados a função de regulador de níveis elevados de cálcio na planta e proteção contra a herbivoria (FRANCESCHI E NAKATA, 2005). Desse modo, o formato do ovário em corte transversal não se mostrou um bom indicativo taxonômico devido a sua inconstância entre as espécies.

Os feixes vasculares são bem desenvolvidos, sendo possível diferenciar os feixes ventrais dos demais, estes feixes ventrais provavelmente se ramificam para a vascularização do rudimento seminal. Quanto aos feixes de menor calibre, possivelmente são provenientes do receptáculo floral, visto que se tratam de ovários ínferos. Endress (2011) argumenta que o ovário ínfero se torna mais econômico e com maior proteção, justamente devido ao fato de que a parede do ovário e receptáculo floral estão combinados em um. Os estômatos presentes na

epiderme do ovário podem estar relacionado com o processo de trocas gasosas, visto que se trata de uma estrutura que também realiza fotossíntese (FLINT E MORELAND, 1979)

Os óvulos são órgãos conservados, são as unidades reprodutivas mais antigas das angiospermas, da geração esporofítica, que podem ser rastreadas até os primórdios (ENDRESS, 2011). Os óvulos observados se mostraram ser do tipo anátropos, essa curvatura do óvulo permite o posicionamento da micrópila perto da placenta, permitindo um acesso fácil do tubo polínico até a micrópila. Com dois tegumentos, sendo essa característica apontada por Rudall (2007) como comum entre as angiospermas. As antípodas são efêmeras durante a antese floral e as sinérgides apresentam aparelho fibrilar. Uma região com células alongadas estão presentes no funículo da micrópila, o que facilita a passagem do tubo polínico do ovário para o interior do óvulo (GOLDBLATT; MANNING, 2008). O tipo tenuinucelado foi observado para *Phalocallis*, discordando com o descrito por Cronquist (1981) para a família como crassinucelado, com exceção do gênero *Sisyrinchium*, o qual ele descreveu como tenuinucelado. Porém Goldblatt e Manning (2008) descrevem uma classificação diferente, a de semicrassinucelado para a família Iridaceae, com presença de apenas uma ou duas camadas de células periféricas ao redor da célula megásporo mãe. Devido a forma como ocorre o desenvolvimento do óvulo, onde as divisões iniciam como crassinucelado e acabam na forma de tenuinucelado, pode ser a possível causa da confusão feita na descrição de Cronquist. Tendo isso em mente, se faz necessário a análise de mais óvulos em outras fases de maturação, para compreender melhor como está sendo a formação desse rudimento seminal.

Anatomia foliar

Rudall (1991) considera a divisão de Tigridieae em dois grupos baseado em sua anatomia foliar. Desse modo, tem-se como “plicadas” as espécies que são mais ou menos zigzague e “foliadas” as que apresentam extensões alongadas (quilhas). Os representantes utilizados nesse estudo podem ser agrupados de acordo com essa classificação, visto que *Phalocallis* e *Gelasine* apresentaram tipo plicado e *Cypella* tipo foliado. O tipo foliado apresenta extensões da quilha que se confundem com a margem, dificultando a identificação da margem verdadeira, fato observado em *Cypella herbertii* e já descrito por Rudall (1991) para esse tipo foliar. A autora também afirma que os caracteres da margem da folha são significativos para delimitação genérica, para isso a margem foliar pode ser melhor analisada em estudos seguintes.

Em *Phalocallis* e *Gelasine* foi observada uma folha com aspecto mais espesso, 6-8 camadas, na região entre quilhas, do que *Cypella*, corroborando com o que é descrito para *Gelasine* (RUDALL, 1991). Os feixes vasculares, por sua vez, tem uma orientação alternada (quilhas), com feixes menores presentes entre os feixes maiores. Todos os acessos/espécies se diferenciaram quanto a quantidade de fibras associadas ao feixe vascular, Rudall (1991) descreve que a forma do esclerênquima é o aspecto mais variável da anatomia foliar. Levanta-se aqui a ideia de que esse caractere pode ser utilizado não somente para a delimitação genérica, mas também para a categorização de espécies.

Phalocallis sp.1 se destacou dentre os acessos pela presença de papilas na região da quilha. Rudall (1993) descreve a presença de papilas na tribo Trimeziae, no gênero *Trimezia*, em sulcos na folha. Em *Pseudotrimezia*, as papilas estão localizadas em sulcos e na superfície das cristas (LOVO e MELLO-SILVA, 2015), a função exercida por essas papilas não é clara.

Dados palinológicos

As características polínicas encontradas são úteis para diferenciar e estabelecer relações entre as espécie (FAZAL *et al.*, 2013; AMORIM *et al.*, 2014), que podem ser tratadas como espécie-específicas. Desse modo, o tamanho, formato e variação nas ornamentações se mostram como bons indicadores taxonômicos, como já mencionado por Goldblatt e Manning, (2008).

Uma das principais diferenças entre os acessos foi o tamanho médio do grão de pólen, Rudall e Wheeler (1988) afirmam que o tamanho do pólen é muito variável entre as espécies, admitindo um padrão de pólen ligeiramente maiores em Cipurinae.

A intina se mostrou espessa, principalmente na região do sulco na região polar, corroborando com Heslop-Harrison (1977) que relatam a intina como espessa para a família Iridaceae. Ressalta-se também a existência de uma variação na espessura da intina em cada espécie, podendo se tratar de um caractere com potencial taxonômico, juntamente com as variações na ornamentação da exina, já descritas por Goldblatt e Manning (2008) como importantes caracteres.

Variações no tamanho do lúmen já foram observadas por Rudall e Wheeler (1988) e por Goldblatt e Manning (2008), sendo que algumas espécies o lúmen é tão pequeno (<5µm) que a exina é descrita como microrreticulada, como pode ser observado em *Gelasine coerulea*, característica já observada por Goldblatt e Le Thomas (1992), os quais apontam um

alongamento do muri e estreitamento do lúmen, sendo que o estreitamento pode já ter atingido o limite máximo em algumas espécies do gênero, a exemplo de *Gelasine elongata* descrito como rugulada. Em *P. coelestis* e *Phalocallis* sp. a exina ainda pode ser definida como frouxa, apesar dessa hipótese de redução no tamanho do lúmen em vários gêneros pertencentes a antiga classificação Cipurinae (GOLDBLATT E LE THOMAS, 1992), sendo que *Phalocallis* sp.1 mostrou uma possível tendência ao estreitamento do lúmen. Estudos mais detalhados quanto a estruturação e dimensões do lúmen devem ser realizados para entender como essa possível redução atua no gênero *Phalocallis*.

CONCLUSÃO

Muitos caracteres com grande potencial taxonômico foram observados, destaca-se principalmente a região do androceu na estrutura floral com grandes diferenças entre as espécies e gêneros. Análises da antera em pré-antese podem ser úteis para entender a degradação dos grânulos de amido na região do conectivo, dada a presença de néctar em alguns táxons, além de possibilitar a descrição detalhada do arranjo dessa estrutura nos diferentes estágios de maturação da flor. Visto que essa estrutura apresenta grande potencial de delimitação taxonômica das espécies.

Estudos mais aprofundados também podem ser realizados quanto a oferta de recursos florais no gênero *Phalocallis*, tendo em mente que o mesmo apresenta a demanda de três recursos ofertados ao polinizador, o pólen, o óleo e o néctar. Ressalta-se a necessidade de averiguar que recursos são ofertados pelas demais espécies pertencentes ao gênero, sendo reconhecidas *Phalocallis geniculata* e *Phalocallis oreophila*, que não fizeram parte da descrição desse estudo. O reconhecimento desses recursos podem auxiliar na interpretação da rota evolutiva tomada por esse táxon, visto que a interação com os polinizadores é um evento crucial nos eventos de especiação.

Os grãos de pólen também se mostraram um bom caractere na distinção das espécies, especialmente quando observado o padrão reticulado da exina, variando de denso até frouxo e rugulado em *Gelasine*. Além disso, o tamanho médio polínico foi bem distintivo entre os acessos, sendo que *Phalocallis* apresentou polen menores do que *Gelasine*. Estudos adicionais podem ser realizados com mais acessos de generos filogeneticamente próximos, como as demais espécies de *Gelasine*, além de *Eleutherine*.

A folha também apresenta caracteres distintivos, principalmente em nível de gênero, como a espessura da lamina foliar e organização das fibras esclerenquimáticas. Caracteres espécie-específicos também foram relatados, como a presença de papilas na região da quilha de *Phalocallis* sp1.

REFERÊNCIAS

- Amorim, J.S.; Souza, M.M.; Viana, A.J.C; Corrêa, R.X.; Araújo, I.S.; Ahnert, D. Cytogenetic, molecular and morphological characterization of *Passiflora capsularis* L. and *Passiflora rubra* L. **Plant Systematics and Evolution** 300: 1147-1162, 2014.
- Baker, J.G. **Handbook of the Irideae**. London: George Bells & Sons, p.248, 1892.
- Beentje, H. J. **The Kew Plant Glossary: An illustrated Dictionary of Plant Terms**. Richmond, UK: Royal Botanic Gardens, Kew, 2010.
- Carrive, L.; Domenech, B.; Sauquet, H.; Jabbour, F.; Damerval, C. Insights into the ancestral flowers of Ranunculales. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 194: 23–46, 2020.
- Chauveau, O., Eggers, L., Souza-Chies, T. T., & Nadot, S. Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): Evolutionary trends in the flowers of the New World genera. **Annals of Botany London** 110: 713–729, 2012.
- Chies, T. T. S.; Burchardt, P.; Alves, E. M. S.; Essi, L.; Santos, E. K. O estudo da biodiversidade e evolução vegetal através de marcadores de DNA e citogenética: exemplos em Iridaceae e Poaceae. **Ciência e Natura**. 36:279-293, 2014
- Cronquist, A. Iridaceae: **An integrated system of classification of flowering plants**. Columbia University Press. New York, 1981.
- Cocucci, A. A.; Vogel, S. Oil-producing flowers of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. **Flora**, 196(1): 26-46, 2001.
- Devoto, M.; Medan, D. Expected mating system, floral diversity and flower visitors of five species of iridaceae of the argentine pampas. **Acta Botánica Venezuélica** 31(2):425-434, 2008.
- Eggers, L.; A família Iridaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, 6: 167, 175, 2008.
- Eggers, L.; Gil, A.S.B.; Inácio, C.D.; Lovo, J.; Pastori, T.; Hall, C.F.; Damasceno, R.G.L.; Chauveau, O. 2020. Iridaceae in **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB136>>. Acesso em: 25 jul. 2020.
- Endress, P. K. Floral structure and evolution of primitive angiosperms: recent advances. **Plant Systematics and Evolution**, 192: 79-97, 1994.

- Endress, P. K. Evolutionary diversification of the flowers in angiosperms. **American Journal of Botany**. 98 (3): 370-396, 2011.
- Endress, P. K. The morphological relationship between carpels and ovules in angiosperms: pitfalls of morphological interpretation. **Botanical Journal of the Linnean Society** 189: 201–227, 2019.
- Erdtman, G. **Pollen morphology and plant taxonomy: Angiosperm**. Waltham: Chonica Botanica C O., 540 pp, 1952.
- Erdtman, G. Pollen walls and angiosperm phylogeny. **Botaniska Notiser**, 113: 41-45, 1960.
- Evert, R. F. **Esau's plant anatomy**. Meristems, cells, and tissues of the plant body – their structure, function and development. New Jersey: John Wiley & Sons, p.601, 2006.
- Fahn, A. **Secretory tissues in plants**. Academic Press London. P 302, 1979.
- Fahn, A.; Cutter, D. F. **Xerophytes**. Berlin: Gebruder Borntraeger, p.176, 1992.
- Fahn, A. Structure and function of secretory cells. **Advances in Botanical Research**, 31: 37-75, 2000.
- Fazal, H.; Ahmad, N.; Abbasi, B.H. Identification, characterization, and palynology of high-valued medicinal plants. **Scientific World Journal** 2013: 1-9, 2013.
- Feder, N; O'Brien, T. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, 55: 123-142, 1968.
- Flint, L. H.; Moreland, C. F. Note on photosynthetic activity in seeds of the spider lily. **American Journal of Botany**, 30: 315–317, 1978.
- Franceschi, V. R., Nakata, P. A. Calcium oxalate inn plants: formation and function. **Annual review of Plant Biology**, 56:41-71, 2005.
- French, J. C. Patterns of endothelial wall thickenings in Araceae: subfamilies Pothoideae and Monsteroideae. **Amer. J. Bot.** 72:472-486, 1985.
- Gerrits, P. O.; Smid, L.A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. **Journal of Microscopy**, 132:81-85, 1983.
- Goldblatt, P. Chromosome cytology in relation to suprageneric systematic of neotropical Iridaceae. **Systematic Botany**, 7: 186-198, 1982.
- Goldblatt, P.; Le Thomas, A. Pollen apertures, exine sculpturing and phylogeny in Iridaceae subfamily Iridoideae. **Review of Paleobotany and Palinology**, 75: 301-315, 1992.
- Goldblatt, P.; Manning, J.C. The Iris family - natural history and classification. **Timber Press**. Portland, Oregon, USA, p. 290, 2008
- Goldblatt, P.; Rodriguez, A., Powell, M. P., Davies, T. J., Manning, J.C., Van Der Bank, M., Savolainen, V. Iridaceae, Out of Australasia"? Phylogeny, Biogeography, and Divergence Time Based on Plastid DNA Sequences. **Systematic Botany**. 33: 495–508, 2008

- Gurr, E. (1971). **Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry**. Academic Press, London, England.
- Heslop-Harrison, Y.; Shivanna, K.R. The receptive surface of the angiosperm stigma. **Annals of Botany**, 41:1233-1258, 1977.
- Heslop-Harrison, J. Pollen germinatioons and pollen-tube growth. **International Review of Cytology**, 107: 1-78, 1987.
- Johansen, D. A. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill, New York, 1940.
- Johri, B. M. **Embryology of Angiosperms**, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Springer-Verlag, p. 830, 1984.
- Keijzer, C. J. The processes of anther dehiscence and pollen dispersal. Part I. The opening mechanism of longitudinally dehiscing anthers. **New Phytol**, 105:487–498, 1987.
- Kraus, J. E.; Sousa, H. S.; Rezende, M. H.; Castro, N. M.; Vecchi, C.; Luque, R. Astra Blue and Basic Fuchsin Double Staining of Plant Materials. **Journal Biotechnic e Histochemistry**. 73:235-243, 1998
- Lovo, J. e Mello-Silva, R. Two new species of *Pseudotrimezia* (Iridaceae) endemic to Diamantina Plateau, Minas Gerais, Brazil. **Phytotaxa**. 195:145-153, 2015.
- Manning, J. C.; Goldblatt, P. Endothecium in Iridaceae and its systematics implications. **American Journal of Botany**, 77:527-532, 1990
- Manning, J. C.; Linder, H. P. A cladistic analysis of patterns of endothelial thickenings in Poales/Restionales. **American Journal of Botany**. 77:194-208, 1990.
- McDowell, E. M.; Trump, B. F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and eléctron microscopy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, 100(8):405-414, 1976.
- Melhem, T. S. Palinologia: suas aplicações e perspectivas no Brasil. **Coleção Museu Paulista-Série Ensaio**s, São Paulo, 278pp, 1978.
- Noel, A. R. A. The endothecium: a neglected criterion in taxonomy and phylogeny? **Bothalia**, 14: 833–838, 1983.
- O'Brien, T. P.; McCully, M. E. **The Study of Plant Structure: Principles and Selected Methods**. Termarcaphi Pty. Ltd., Melbourne, 1981.
- Pacini, E.; Nepi, M.; Vesprini, J. L. Nectar biodiversity: a short review. **Plant Systematics and Evolution**, 238: 7-21, 2003.
- Pacini, E.; Hesse, M. Pollenkitt – its composition, forms and functions. **Flora** v. 200:399–415, 2005.
- Pacini, E.; Franchi, G. G. Pollen biodiversity – why are pollen grains different despite having the same function? A review. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 193: 141–164, 2020.
- Peixoto, AL. e Maia, LC. Manual de Procedimentos para Herbários, INCT, **Herbário Virtual da Flora e dos Fungos**, UFPE, 2013.

- Peris, D. False Blister Beetles and the Expansion of Gymnosperm-Insect Pollination Modes before Angiosperm Dominance. **Current Biology**, 27(6):897-904, 2017.
- Punt, W., P.P. Hoen; S. Blackmore; S. Nilsson; Thomas, A. L. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Paleobotany and Palynology** 143: 1-81, 2007.
- Puri, V. The role of floral anatomy in the solution of morphological problems. **The Botanical Review**, 17(7):471- 553, 1951.
- Ravenna, P. F. *Cypella* subg. *Phalocallis* (Herb.) Ravenna. **Revista del Instituto Municipal de Botánica**. Buenos Aires 2: 53. 1962[1964].
- Ravenna, P. Notas sobre Iridaceae V. **Noticiario Mensual Museo Nacional de Historia Natural, Santiago** 21(249):7–9, 1977.
- Ravenna, P. A survey in the genus *Cypella* and its allies (Iridaceae). **Onira** 12: 1–11, 2009.
- Rudall, P. Leaf anatomy in Tigridieae (Iridaceae). **Plant Systematics and evolution**. 175:1-10, 1991.
- Rudall, P. Leaf anatomy and systematics of Mariceae (Iridaceae), **Kew bulletin**, 48:151-160, 1993.
- Rudall, P. J. Anatomy and systematics of Iridaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 114, p. 1–21, 1994.
- Rudall, P. Anatomy of Flowering Plants: An Introduction to structure and development. **Cambridge University Press**, Ney York. ed. 3, p.159, 2007
- Rudall, P.; Wheeler, A. Pollen morphology in Tigridieae (Iridaceae). **Kew Bulletin**, 43: 693-701, 1988.
- Silvério, A.; et al. Floral rewards in the tribe *Sisyrinchium* (Iridaceae): Oil as an alternative to pollen and nectar. **Sexual Plant Reproduction**, 267-279, 2012.
- Smith, F.H. & Smith, E.C. Anatomy of the inferior ovary of *Darbia*. **American Journal of Botany**, 29:464-471, 1942.
- Sokoloff, D.D.; Zoric, L.; Jura-Morawiec, J.; Fay, M. F. Plant anatomy: At the heart of modern botany. **Botanical Journal oh the Linnean Society**, 195: 249-253, 2021.
- Tacuatiá, L. O.; Souza-Chies, T. T.; Flores, A. M.; Eggers, L.; Siljak-Yakovlev, S.; Keltchuk-Santos, E. Cytogenetic and molecular characterization of morphologically variable *Sisyrinchium micranthum* (Iridaceae) in southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 169(2): 350-364, 2012.
- Woudehouse, R.P. **Pollen grains: Their structure, identification and signification and significance in Science and medicine**. 574pp, 1935.
- Zavada, M. Comparative morphology of monocot pollen and evolutionay trends of apertures and wall structures. **The Botanical Review**, 49: 333-341, 1983.

Capítulo III: Delimitação filogenética de *Phalocallis* Herb

INTRODUÇÃO

As espécies representam a unidade básica de estudos filogenéticos (RIESEBERG e BROUILLET, 1994). A delimitação de espécies é apontada como difícil dentro de alguns ecossistemas, devido à falta de caracteres morfológicos diagnósticos claros (DUMINIL *et al.*, 2012). Dúvidas acerca do conceito de espécie aplicado as plantas foram levantadas, devido a variação fenotípica e as frequentes introgressões (BACHMAN, 1998). Queiroz (1998, 2005, 2007) sugere uma reformulação no conceito de espécie, ao invés de tratar diferenças morfológicas, monofilias e isolamento reprodutivo como os únicos indicadores de espécies, sugere que esses atributos sejam tratados como acumulativos durante a diversificação das linhagens, defendendo o conceito de linhagem generalizada. Antes era necessário coletar os dados diretamente relacionado com o critério escolhido na delimitação da espécie, por exemplo a diferenciação morfológica é necessária no conceito de espécie morfológica, a coalescência alélica sob o conceito de espécie genealógica e o isolamento reprodutivo é requisito do conceito de espécie biológica (CARSTEN *et al.*, 2013). Queiroz (2007) define que quanto mais critérios de espécie um táxon atender, maior é a probabilidade de se tratar de um grupo distinto, apresentando menos questionamentos acerca de sua delimitação como espécie.

Algumas décadas atrás começou a surgir suspeitas quanto o real número de espécies existentes, sendo que a maioria ainda não foi descrita e podem ser extintas antes desse feito (ERWIN, 1982; BARNOSKY *et al.*, 2011). A utilização de dados moleculares surgem como uma solução para os problemas taxonômicos até então enfrentados (HERBERT *et al.*, 2013). Porém, assim como a utilização exclusiva da morfologia na delimitação de gêneros e espécies pode levar a interpretação equivocada da diversidade fenotípica (DUMINIL e DI MICHEL, 2009), o uso de apenas dados genéticos no limite das espécies também pode acabar gerando conflitos (WILL *et al.*, 2005). Portanto, se faz necessário levar diversos pontos em consideração, como a distribuição geográfica, a morfologia, dados ecológicos, estatísticos e de comportamento, por meio de uma abordagem integrativa (DAYRAT, 2005; WILL *et al.*, 2005). Em caso de dados morfológicos e genéticos incongruentes, uma análise cuidadosa deve ser aplicada (CARSTEN *et al.*, 2013).

Iridaceae tem uma representação significativa entre as monocotiledôneas, compreendendo sete subfamílias: Isophysodoideae Thorne & Reveal, Patersonioideae Goldblatt, Geosiridoideae Goldblatt & Manning, Aristeoideae Vines, Nivenioideae Goldblatt, Crocoideae G.T. Burnett e Iridoideae Eaton. (GOLDBLATT *et al.*, 2008; GOLDBLATT E MANNING, 2008). Iridoideae, com distribuição neotropical, apresenta três possíveis recursos

florais ao polinizador: pólen, óleo e néctar. O óleo está localizado em tricomas glandulares denominados elaióforos, presente na face adaxial das tépalas internas e as vezes nas externas em Tigrídieae (CHAUVEAU *et al.*, 2012). Os nectários florais são descritos como pouco comuns em espécies neotropicais, sendo mais comum na subfamília Crocoideae (originária da África), sendo eles septais (GOLDBLATT *et al.*, 2008) e na subfamília Iridoideae (neotropical), sendo produzido em nectários perigonais (RUDALL *et al.*, 2003) ou em nectários estaminais (DEVOTO E MEDAN, 2008).

Iridoideae compreende cerca de 40 % de toda riqueza de espécies da família Iridaceae, é dividida em cinco tribos: Diplarreneae Labill, Irideae Kitt, Sisyrinchieae Klatt, Trimezieae Ravenna e Tigrídieae Kitt (GOLDBLATT E MANNING, 2008). A última tribo é exclusiva do Novo Mundo e compreende cerca de 20 gêneros (GOLDBLATT *et al.*, 2008; RODRIGUEZ E SYTSMA, 2006). Duas subtribos foram propostas em Tigrídieae (GOLDBLATT, 1982), Cipurinae descrita com número cromossômico $X=7$, pólen monossulcado, ramos do estilete com adereços, com os gêneros *Ainea* Ravenna, *Calydorea* Herb., *Cardenanthus* R. C. Foster, *Cipura* Aubl., *Cypella* Herb., *Eleutherine* Herb., *Ennealophus* N. E. Br., *Gelasine* Herb., *Herbertia* Sweet, *Kelissa* Ravenna, *Mastigostyla* I. M. Johnst., *Nemastylis* Nutt. e *Onira* Ravenna e Tigrídiinae com $X=14$, pólen bissulcado e ramos do estilete filiformes, com os gêneros *Alophia* Herb., *Cabana* Ravenna, *Fosteria* Molseed, *Sessilanthera* Molseed & Cruden e *Tigridia* Juss. (GOLDBLATT, 1990). Já uma filogenia proposta por Chauveau *et al.* (2012) propôs a divisão de Tigrídieae em dois clados (figura 15) e demonstrou que as duas subtribos propostas por Goldblatt (1982) não são monofiléticas, corroborando com Rodriguez e Sytsma (2006).

Na atual classificação proposta por Chauveau *et al.* (2012) o clado A conta com os gêneros *Ainea* Ravenna, *Calydorea* Herb., *Catila* Ravenna, *Cipura* Aubl., *Cypella* Herb., *Herbertia* Sweet, *Kelissa* Ravenna, *Larentia* Klatt, *Nemastylis* Nutt e *Onira* Ravenna, no clado B estão os gêneros *Alophia* Herb., *Cardenanthus* Forster, *Eleutherine* Herb., *Ennealophus* N. E. Br., *Fosteria* Molseed, *Gelasine* Herb., *Hesperoxiphion* Baker, *Phalocallis* Herb., *Mastigostyla* Johnst, *Sessilanthera* Molseed e Cruden e *Tigridia* Juss. A tribo Trigrídieae é taxonomicamente mal compreendida (RODRIGUEZ E SYTSMA, 2006). Daí a importância de estudar mais aprofundadamente as relações genéricas entre os táxons, visto que os limites genéricos e as relações filogenéticas são problemáticas e acabam variando de acordo com os diferentes autores.

A exemplo de *Phalocallis*, que por muito tempo vem sendo alvo de controversas taxonômicas, sendo muitas vezes sinonimizada ou relacionada com *Cypella* (GOLDBLATT E MANNING, 2008) devido aos seus atributos morfológicos. Tanto que na classificação de subtribos proposta por Goldblatt (1982) *Phalocallis* é tratado como uma classificação infragenérica associado a *Cypella plumbea*. Na filogenia publicada por Chauveau *et al.* (2012) o gênero foi destacado como separado, visto que *Phalocallis* se encontra no clado A e *Cypella* no clado B. *Phalocallis* formou um grupo irmão com *Gelasine elongata* e esses por sua vez formaram um grupo irmão com *Eleutherine*.

Na filogenia de Chauveau *et al.* (2012) apenas *Phalocallis coelestis* foi adicionada na análise, insere-se neste estudo mais acessos pertencentes ao gênero, sendo alguns inéditos para o grupo. Desse modo, espera-se contribuir para um melhor entendimento das relações filogenéticas existentes no gênero. Além disso, os resultados preliminares foram confrontados com informações morfológicas disponíveis na literatura para alguns táxons próximos de *Phalocallis* na árvore, a fim de averiguar a congruência entre os dados genéticos e fenotípicos.

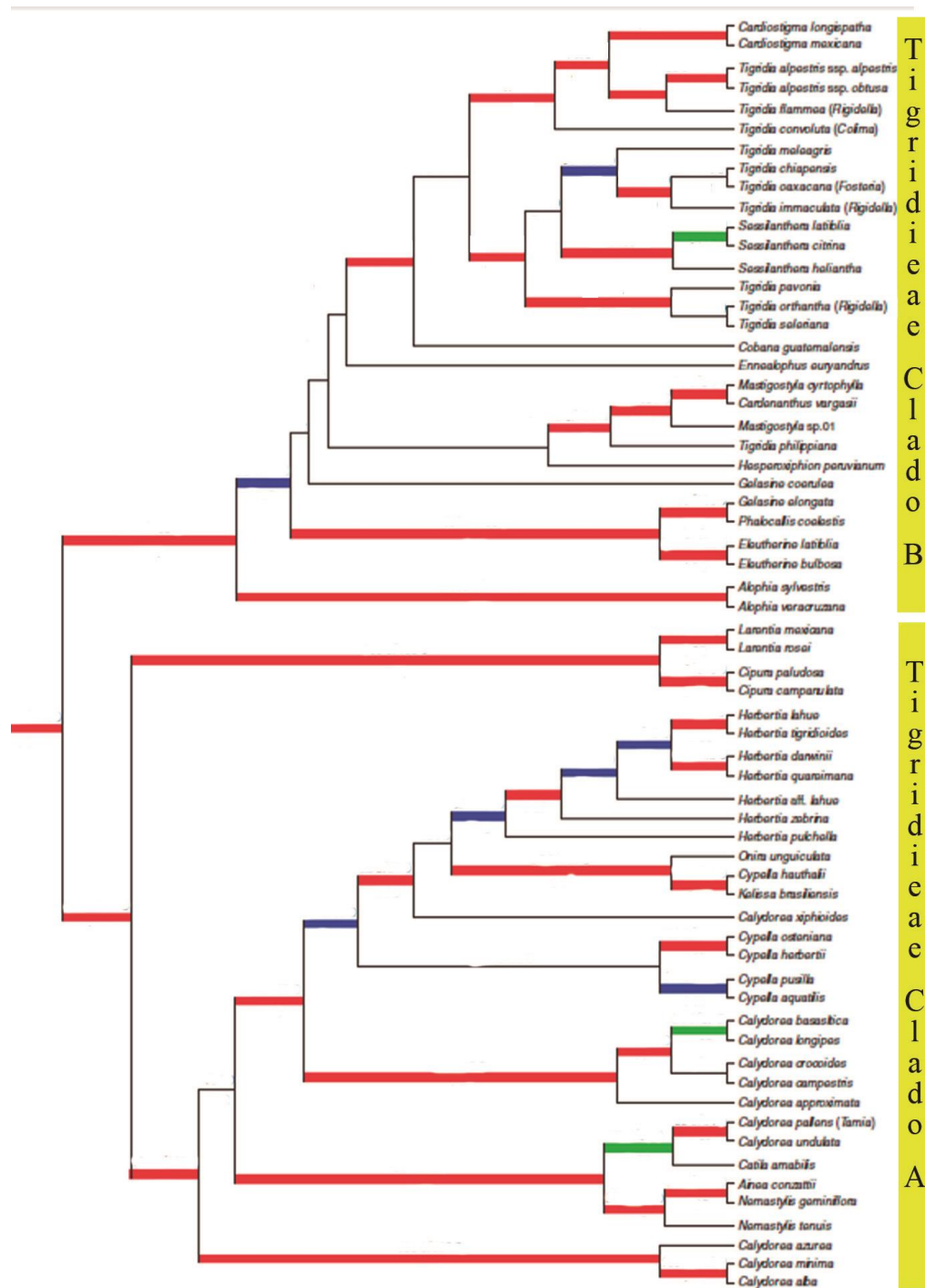


Figura 15: Filogenia da Tribo Tigridae, subdividida em dois clados (A e B), adaptado de Chauveau et al (2012). Ramos em vermelho indicam valores de Bootstrap e PP altos, ramos fortemente suportados. Ramos em verde indicam apenas dois valores de suporte significativos. Ramos em azul apenas um valor de suporte significativo.

METODOLOGIA

Coleta do material e extração de DNA

Foram realizadas coletas de folhas de quatro populações do gênero *Phalocallis*. Localizadas no estado do Paraná, nos municípios de Pinhão (Jardim Botânico de Faxinal do Céu), Bituruna, Ponta Grossa (Parque Estadual de Vila Velha) e Turvo (Estação Ecológica Rio

Bonito) e uma do gênero *Gelasine* (tabela 08). As folhas foram armazenadas em sílica em gel até o momento da extração. Alguns exemplares de cada população foram transplantados em uma área do *Campus* CEDETEG, possibilitando a coleta de material fresco para a extração.

Para a extração de DNA do material fresco, as folhas foram trituradas com o auxílio de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó e armazenado sob refrigeração de -20°C. O protocolo de extração utilizado foi Doyle e Doyle (1987) adaptado.

Tabela 08: Espécies/acessos utilizados para a extração de DNA.

Espécie	Localidade de coleta	Município	Coordenadas geográficas
<i>Phalocallis coelestis</i>	-	Bituruna-PR	26°28'70"S, 51°49'03"W
<i>Phalocallis sp nov</i>	Jardim Botânico de Faxinal do Céu	Pinhão-PR	25°54'41"S, 51°35'31"W
<i>Phalocallis sp nov 2</i>	Parque Estadual de Vila Velha-PR	Ponta Grossa-PR	-
<i>Phalocallis sp</i>	Estação Ecológica Rio Bonito	Turvo-PR	-
<i>Gelasine coerulea</i>	Margem da PR-151	Jaguariaíva -PR	24°12'45"S, 49°39'07"W
<i>Gelasine sp nov</i>	-	Água Doce-SC	26°42'38"S, 51°36'27"W

—: sem informações adicionais

Amplificação e sequenciamento

Após a extração de DNA, as regiões do DNA cloroplastidial trnL e psbA (espaçadores intergênicos) foram amplificadas por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). As regiões não codificantes de plastídios tendem a evoluir mais rapidamente que as sequências de codificação, pois nessas regiões ocorrem substituições de nucleotídeos e eventos de inserção/deleção (KELCHNER, 2000). As amplificações de PCR foram realizadas usando um termociclador em uma reação de volume total de 10 µL consistindo em 20 ng de DNA, 10 µM de cada iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, 1U Taq DNA Polimerase, 1x tampão de PCR. O programa do termociclador para trnL inclui uma etapa inicial de 94 °C por 1 minuto para desnaturação, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e 72 °C por 10 minutos para completar a extensão final. Para o psbA, desnaturação

inicial de 94 °C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 45s, 55 °C por 45s, 72 °C por 50s e extensão final de 72 °C por 4 minutos. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,8% para confirmar a amplificação do fragmento e o tamanho esperado.

Uma nova amplificação por PCR foi realizada como descrito anteriormente, porem com volume final de 40 µL, visando obter quantidade suficiente para o sequenciamento. Parte do produto foi novamente resolvida por eletroforese em gel de agarose 1,8%. O restante dos produtos de amplificação foram purificados com o kit de purificação GenElute PCR (Sigma-Aldrich) ou por meio de precipitação do DNA com etanol (New England Biolabs, 2017) com modificações, 150 µL de etanol absoluto foi aplicado ao produto da PCR, deixado a -20°C por 12 horas, centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos com descarte do sobrenadante, na sequência 300 µL de etanol 70% foi adicionado e centrifugado por 2 minutos, sobrenadante descartado, as amostras foram secas a 37°C por 2 horas e ressuspensas em 30 µL de água ultrapura. Os produtos purificados foram quantificados em eletroforese, corados com brometo de etídio e visualizados em fotodocumentador sob luz UV. A concentração de DNA foi avaliada e preparado para cada amostra uma solução contendo 50 ng de DNA e 4,5 picomol dos respectivos *primers* utilizados na amplificação (tabela). As amostras foram secas a 60°C. Os dados de sequenciamento foram coletados no ABI-Prism 3500 Genetic Analyzes (Applied Biosystems) pela empresa ACTGene Analyzes Moleculares Ltda.

As sequências obtidas foram corrigidas após exame de cromatogramas e sequências de consenso foram editadas com Bioedit 7.0.5 (HALL, 2005) e serão depositadas no GenBank. Sequências adicionais de espécies pertencentes a tribo Tigridieae foram retiradas do GenBank (tabela no anexo I), incluindo dois táxons externos pertencentes a tribo Trimeziae. As sequências foram alinhadas no software Bioedit 7.0.5, utilizando o procedimento de alinhamento múltiplo Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994) e conferidas manualmente no software Mega6 (TAMURA *et al.*, 2013).

Tabela 09: Relação dos *primers* e suas sequências utilizados para amplificação de regiões do DNA cloroplastidial (intron do gene *trnL* e região intergênica *psbA-trnH*)

Barcoding region	Primer	Direction	Fragment size (pb)	Sequence (5'-3')	Reference
psbA	psbA	Forward	594	GTTATGCATGAACGT AATGCTC	Sang <i>et al.</i> , 1997

	trnH	Reverse		CGCGCATGGTGGATT CACAATCC	
trnL	trnL	Forward	907	CGAAATCGGTAGACG CTACG	Taberlet <i>et al.</i> , 1991
	trnF	Reverse		ATTGAACTGGTGAC ACGAG	

Análises filogenéticas

As análises de Máxima parcimônia (MP) foram realizadas por meio do programa PAUP* 4.0 (*Phylogenetics Analysis Using Parsimony*) (SWOFFORD, 2002), 100 replicações usando a adição randômica foi empregada, algoritmo TRB (Tree bisection and reconnection). Árvores de consenso estrito foram calculadas com 1000 repetições de *bootstrap* para calcular o suporte dos nós.

As análises de Máxima Verossimilhança (ML) (FELSENTEIN, 1981) foram realizadas no programa PAUP*4.0. Os modelos evolutivos mais apropriados foram determinados utilizando o Modeltest 3.7 (POSADA E CRANDALL, 1998) e o modelo TIMef foi determinado como o melhor modelo segundo o *Akaike Information Criterion*. A confiabilidade das topologias da árvore foi avaliada por meio de análise *bootstrap* com 1000 replicações.

A análise de Inferência Bayesiana foi realizada por meio do programa MrBayes v3.2.6 (HUELSENBECK E RONQUIST, 2005). O modelo (GTR+I+G) de substituição de nucleotídeos foi usado, pois foi determinado ser o melhor modelo de acordo com o *Akaike Information Criterion* no software Jmodelteste (POSADA, 2008). Os dados foram executados por 50 000 000 de gerações, com uma árvore amostrada a cada 1000 gerações.

As análises filogenéticas foram realizadas para cada região do cpDNA separadamente. O FigTree v1.4.0 foi usado para editar as árvores. As árvores filogenéticas resultantes de cada análise foram combinadas para construção de uma árvore consenso. Sendo utilizada a melhor árvore obtida na Máxima Verossimilhança, onde os valores de parcimônia e Bayesiana foram adicionados.

A topologia das árvores de consenso de *bootstrap* para Máxima Verossimilhança (MLB) foi interpretada através das seguintes categorias de suporte de *bootstrap* (ZOMLEFER

et al., 2001): sem suporte (<50%), fraco (50–74%), moderado (75–84%) e forte (85–100%). Para a probabilidade posterior (PP) foi considerada 0.95 como significativa e 0.99 como fortemente suportado. Os valores de suporte dos ramos nas análises de Máxima Parcimonia não foram avaliados.

RESULTADOS

O comprimento do espaçador *psbA-trnH* variou de 479 a 601 pb, o alinhamento reunido resultou em um comprimento de 630 pb. Para o *trnL-trnF* o comprimento variou de 631 a 890pb e o alinhamento final com 939 pb. Os clados propostos por Chauveau *et al.* (2012) fora observados como monofiléticos. O clado A com os gêneros: *Calydorea*, *Catila*, *Cipura*, *Cypella*, *Herbertia* e *Kelissa* (PP=0.99 /MBL= 98%). O clado B com os gêneros: *Alophia*, *Cardiostigma*, *Eleutherine*, *Ennealophus*, *Gelasine*, *Hesperoxiphion*, *Phalocallis*, *Sessilanthera* e *Tigridia* (PP= 0.99/ MBL= 90%).

A análise individual de cada alinhamento não mostrou suporte significativo em alguns ramos, incluindo o ramo de interesse para o estudo, onde o gênero *Phalocallis* se encontra. Desse modo, as árvores foram combinadas manualmente para os dois marcadores apesar de algumas diferenças na topologia. Apesar de alguns valores de suporte fracos e a presença de algumas politomias em algumas análises, foi possível gerar uma resolução parcial para o gênero *Phalocallis*, visto que alguns valores bem suportados também foram observados (figura 16-17).

Nas três análises empregadas no trabalho, *Phalocallis* está bem suportado como pertencente ao clado B da filogenia proposta por Chauveau *et al.* (2012) e se sustenta em nível de gênero, corroborando com o autor. A topologia da árvore sugere *G. elongata* como moderadamente aninhado entre os ramos de *Phalocallis* (PP=0,96), estando extremamente próximo de *Phalocallis coelestis* (MLB= 61%), formando uma politomia.

A priori consideramos que tanto *G. elongata* quanto os acessos de *Phalocallis* estão corretamente identificados para a análise. Desse modo, *Phalocallis* se apresenta como um gênero parafilético, devido ao posicionamento de *G. elongata* entre os ramos internos do gênero *Phalocallis*. Outra questão relevante é o distanciamento das demais espécies de *Gelasine*, demonstrando que apenas *G. elongata* está intimamente relacionada com o gênero. Esta espécie é descrita para a região sul do Brasil (Rio Grande do Sul), podendo ocorrer em simpatria com *P. coelestis*, que ocorre na região sul do Brasil. Coincidentemente, essa é a mesma espécie com o maior grau de proximidade, demonstrado pela árvore filogenética.

Outro gênero próximo filogeneticamente é *Eleutherine*, esse gênero tem ocorrência em grande parte da América do Sul, e assim como *G. elongata* se diferencia drasticamente de *Phalocallis* pelos caracteres morfológicos. Duas espécies foram amostradas no trabalho, *Eleutherine bulbosa* (mil.) Urb. e *Eleutherine latifolia* (Standl. & L.O. Williams) Ravenna, formando um clado fortemente suportado (PP=1) e irmão com total suporte de *Phalocallis* e *G. elongata*.

A Inferência Bayesiana suportou fortemente o gênero *Phalocallis* com a inserção de *G. elongata* (PP = 1), assim como a Máxima Verossimilhança (MLB = 92%). Porém, em todas as análises foram observados valores de suporte baixos nos ramos entre as espécies de *Phalocallis* (Probabilidade Posterior < 0,95 e *Bootstrap* < 70%).

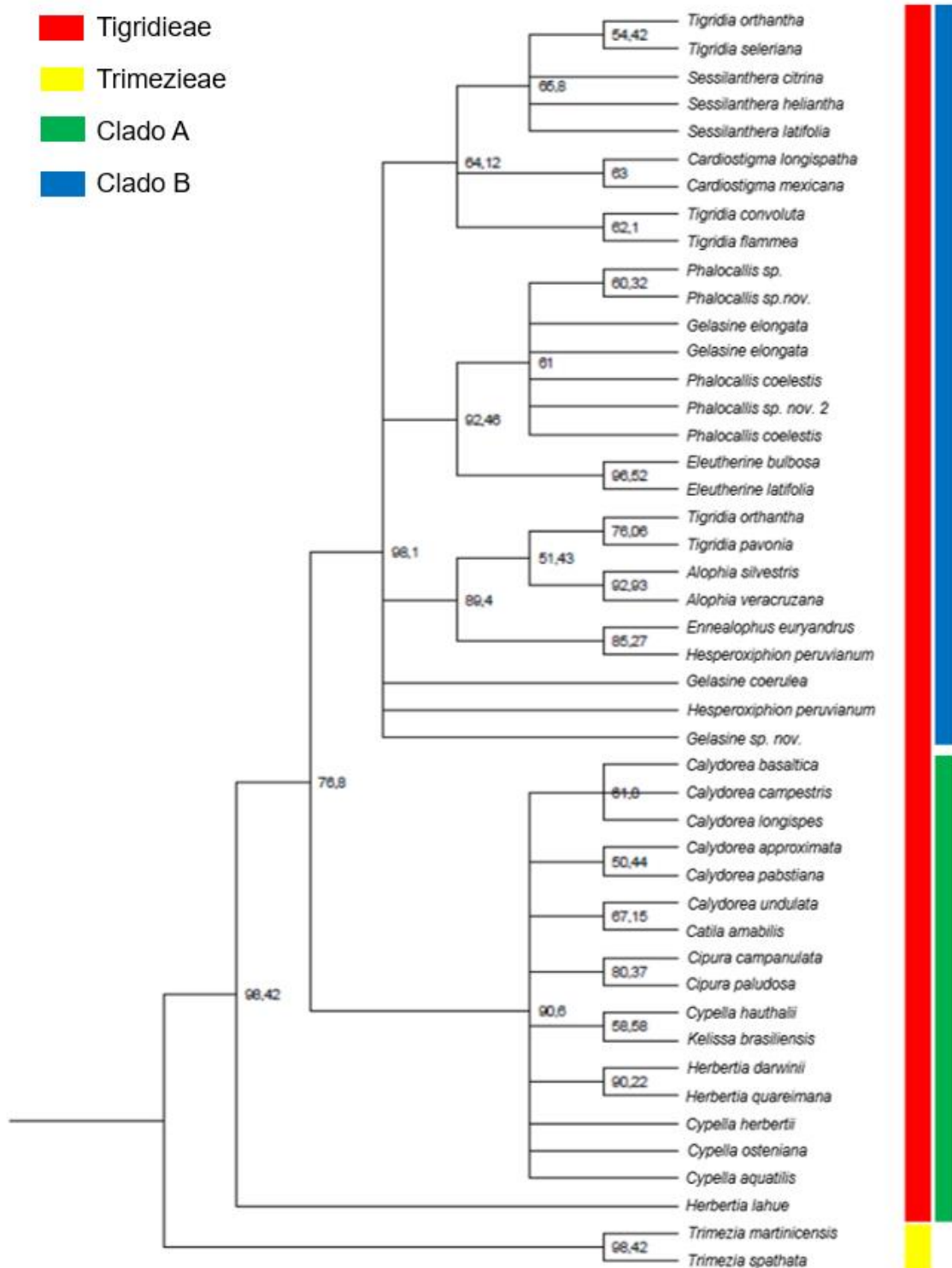


Figura 16: Filogenia com a melhor árvore obtida a partir da análise de Máxima Verossimilhança. Valores de suporte (*bootstrap*) destacados nos ramos.

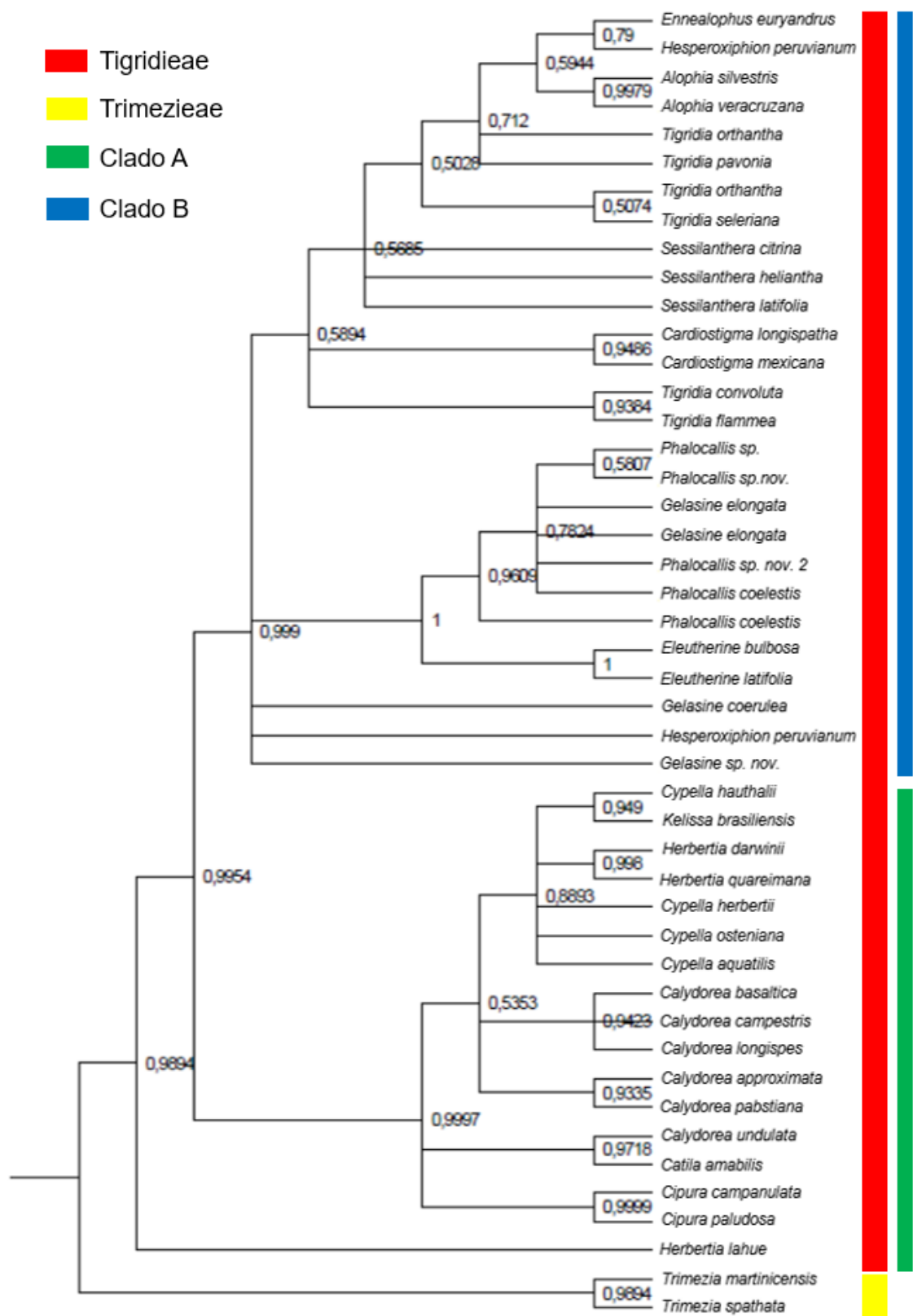


Figura 17: Filogenia com a melhor árvore obtida a partir da análise de Inferência Bayesiana. Valores de suporte (probabilidade posterior) destacados nos ramos.

DISCUSSÃO

O trabalho contou com a análise de regiões não codificantes de plastídeos, essas regiões tendem a evoluir mais rápido do que sequências codificantes, isso porque ocorrem substituições de nucleotídeos e eventos de inserção e deleção (KELCHNER, 2000). Além disso, a região do *trnL* e do *psbA* vem sendo utilizada em diversos trabalhos realizados com Iridaceae (RODRIGUEZ E SYSTMA, 2006; PASTORI *et al.*, 2018).

Pensando em delimitação de espécies o método Bayesiano é o mais utilizado (YANG E RANNALA, 2010), usando a abordagem de Cadeia de Markov Monte Carlo para calcular as probabilidades posteriores. Esse modelo assume que todo polimorfismo compartilhado é resultado ancestral (CARSTENS *et al.*, 2013). Contudo, se o polimorfismo compartilhado entre as linhagens foi ocasionado por fluxo gênico pode dificultar a delimitação das espécies (ECKERT E CARTENS, 2008). Já a Máxima Verossimilhança procura pela árvore mais provável com base nos dados e no modelo de evolução escolhido, sendo que esse modelo de substituição de nucleotídeo pode aumentar a precisão das estimativas filogenéticas (POSADA E CRANDALL, 2001). Quanto ao uso de marcadores moleculares para delimitar os táxons, Duminil e Di Michele (2009) comentam sobre a necessidade de que a “árvore de espécies” seja inferida a partir de uma “árvore de genes”, ou seja, a história evolutiva do táxons é deduzida com base em fragmentos de DNA.

Barracough e Nee (2001) apontam que o uso de poucos táxons em análises filogenéticas mascaram o real delineamento genérico e que todas as quase todas as espécies devem ser amostradas, podendo muitas vezes se tratar de um gênero parafilético, quando analisado em conjunto com mais acessos. Portanto, no trabalho optamos por utilizar uma grande quantidade de acessos, buscando explorar ao máximo o posicionamento de *Phalocallis* na filogenia. Sendo observada uma classificação parafilética para o gênero, devido ao compartilhamento como grupo irmão de *G. elongata*. Para Rieseberg e Brouillet (1994) as espécies são frequentemente parafiléticas, sendo a especiação um processo parafilético, as suposições operacionais não devem ser confundidas com a realidade biológica. Hörandl (2006) afirma que em uma reconstrução dicotômica, qualquer grupo de descendentes destrói a monofilia mais antiga de grupos ancestrais, isso ocorre devido a não extinção dos grupos parentais, resultando na parafilia desses grupos mais antigos. Partindo da ideia proposta pelo

autor supracitado, o táxon *G. elongata* pode se tratar de um grupo mais recente que *Phalocallis*, que resultou na quebra da monofilia do grupo.

Gêneros parafiléticos já foram observados na tribo Tigridieae, em *Cypella* e *Gelasine* (CHAUVEAU *et al.*, 2012). Portanto não é grande surpresa a classificação de *Phalocallis* como um gênero parafilético. Isso apenas demonstra a necessidade de mais estudos acerca do relacionamento existente dentro da tribo. Uma possibilidade é pontuar os caracteres fenotípicos dos táxons, pois a congruência de similaridade morfológica com descendência pode ser útil para distinguir as similaridades resultantes de parafilia e similaridades decorrentes de evolução paralela ou convergente (HÖRANDL E STUESSY, 2010).

Muitas vezes, devido a ancestralidade compartilhada, os táxons parafiléticos frequentemente tem alta similaridade fenotípica, porem isso não é observado entre *Gelasine* e *Phalocallis*. Este último por sua vez compartilha grande similaridade na morfologia floral com *Cypella* e *Onira*, porém ambos os gêneros se encontram filogeneticamente distantes de *Phalocallis*, ressaltando a independência entre os gêneros e levantando questionamentos quanto a relação entre os táxons de Tigridieae. Hörandl e Stuessy (2010) afirmam que os dados moleculares e os fenotípicos se complementam, o primeiro relacionado com a reconstrução de padrões de descendência e o segundo com reconhecimento de entidades evolutivas estabelecidas. Uma análise mais criteriosa deve ser realizada quanto a relação filogenética de *G. elongata* com *P. coelestis*, frente a grande diferença morfológica de *Gelasine* com *Phalocallis*.

Outro ponto importante é que *Phalocallis* apresenta, além do pólen como recurso floral, também tricomas glandulares unicelulares produtores de óleo e tecido secretor de néctar nos estames (dados do capítulo II) e se encontra agrupado filogeneticamente como grupo irmão com *G. elongata* e *Eleutherine*, espécies que não apresentam óleo e néctar como recompensa ao polinizador (RUDALL, 2003).

A produção de três formas de recursos florais foi observada somente mais uma vez no clado B de Tigridieae, sendo descrito para *Alophia drummondii* (Graham) R.C. Foster, Lee (1994) descreve como um novo modo de produzir néctar, no qual os conectivos expandidos da antera secretam uma mucilagem com conteúdo de açúcar diluído, promovendo a aderência do pólen no tórax das abelhas visitantes. Já no clado A, a presença de nectários estaminais e elaióforos nas tépalas é descrito para *Cypella herbertii* (DEVOTO E MEDAN, 2008). Muito ainda precisa ser estudado a cerca desses nectários estaminais, principalmente pela oferta

conjunta de óleo, já que pouco se sabe sobre essas ocorrências em outros táxons, sugerindo uma síndrome de polinização bimodal, como observado em um táxon Africano, *Tritoniopsis parviflora* (MANNING E GOLDBLATT, 2002).

Existe a possibilidade desses nectários estaminais terem surgido independentemente nesses grupos, como ocorreu para a oferta de óleo através de tricomas secretores em grande parte das espécies de Iridoideae (CHAUVEAU *et al.*, 2012), podendo se tratar de uma característica de grupos mais derivados. Assim como existe a possibilidade desses nectários estarem presentes no ancestral mais próximo desse grupo, visto que algumas espécies parecem ser derivadas de um processo de redução da complexidade, como observado por Goldblatt e Snow (1991) em *Eleutherine* quanto a autocompatibilidade e autogamia. Outros exemplos de simplificação da estrutura floral são descritos na tribo Irideae (GOLDBLATT, 1981; WILLIAMS *et al.*, 1986), nas quais tépalas com garras e estilete petaloide foram reduzidas em várias linhagens, levando a espécies com flores de tépalas subiguais e estilete filiforme.

Um estudo realizado por Lovo *et al.* (2021) com *Pseudotrimezia* demonstra a existência de espécies com flores ornamentadas e com tricomas produtores de óleo, as quais apresentam uma ampla gama de possíveis polinizadores, e espécies com flores planas, apenas o pólen como recurso, com uma gama menor de polinizadores e uma maior especialização ecológica. No caso de *Pseudotrimezia* as flores planas são apontadas como mais derivadas dentro do grupo por apresentarem uma especialização superior às espécies ornamentadas (LOVO *et al.*, 2021). Dentro dessa possibilidade, *Phalocallis* teria mantido uma complexidade ancestral, enquanto *G. elongata* estaria se direcionando a uma simplificação da estrutura floral, assim como possivelmente *Eleutherine*. Outra possibilidade pode ser uma condição básica de flores planas para o clado B, sendo *Phalocallis* uma das exceções presentes no grupo. Para entender melhor essa relação o caminho mais parcimonioso deve ser empregado para determinar a forma do ancestral mais próximo, determinando assim o caminho evolutivo tomado por esse grupo.

O fato de *Phalocallis* ser o único gênero que apresenta ao menos duas espécies com néctar e óleo como recompensas no clado B, pode ser relevante em estudos de síndrome de polinização, como já apontado por Rodriguez (1999) devido às radiações similares com convergências e reversões que podem estar ocorrendo em Tigridieae. Além disso, as estruturas vinculadas aos recursos florais, como elaióforos e nectários, podem constituir caracteres relevantes em estudos taxonômicos e filogenéticos.

Destaca-se aqui o gênero *Cypella*, *Kellisa* e *Onira*, como distante filogeneticamente de *Phalocallis*, apesar de serem gêneros antes sinonimizados devido aos seus caracteres morfológicos (GOLDBLATT E MANNING, 2008). Aponta-se a discrepância na relação entre a morfologia e os dados moleculares para o gênero *Phalocallis*. Rodriguez e Sytsma (2006) apontam esse paralelismo em características florais como um fenômeno evolutivo importante em Tigrídieae. *Phalocallis* pode se tratar de um gênero homoplásico, visto que apresenta características morfológicas muito similares a *Cypella*, como a forma floral, a presença de nectários estaminais (DEVOTO E MEDAN, 2008) e a presença de elaióforos nas tépalas (CHAUVEAU *et al.*, 2012). Não se sabe ao certo o centro de origem para *Phalocallis*, porém pode ter passado por condições ecológicas similares as submetidas a *Cypella*. Em caso de análises cladísticas de dados morfológicos, os gêneros descritos acima tenderiam a se agruparem, devido a essas síndromes de polinização semelhantes. Já com a adição de dados moleculares fica nítido o agrupamento de táxons muitas vezes não relacionados filogeneticamente.

Homoplasias são relatadas no trabalho de Patterson e Givnish (2002) onde apontam que a convergência de várias características diferentes, fornecidas por um conjunto de condições ecológicas, se trata de um processo evolutivo importante e que muitas vezes pode enganar análises evolutivas baseadas apenas na forma fenotípica. Sendo comuns em caracteres que desempenham funções ecológicas importantes e, desse modo, sujeitos a grande pressão seletiva (EVANS *et al.*, 2000). Portanto, parece ser válido determinar as possíveis homoplasias ocorrentes em Tigrídieae.

CONCLUSÃO

A árvore filogenética gerada, apesar de necessitar de apoio em estudos futuros, principalmente para elevar os valores de suporte com a inserção de mais táxons, já traz uma prévia de evidências para interpretações evolutivas o gênero *Phalocallis*. Esses dados suportam fortemente como um gênero válido, apesar da parafilia ocasionada pela inserção de *Gelasine elongata* no grupo. Ressalta-se a necessidade de uma análise mais aprofundada quando ao posicionamento dessa espécie no gênero, podendo ter sua taxonomia repensada de acordo com as possibilidades evolutivas existentes nesse táxon.

Por fim, a inserção de mais espécies de *Phalocallis* na análise parece não ter solucionado completamente o caminho evolutivo tomado por este gênero, porém abre caminho para pesquisas futuras e levantamento de novos questionamentos. Visto que se trata de um

gênero parafilético e, segundo o conceito de espécie filogenética, necessitaria de um posicionamento monofilético. Esse conceito é adotado por diversos autores e a busca pelo motivo de tantos táxons parafiléticos em Tigridieae ainda não está elucidada. Desse modo, estudos adicionais são recomendados, ressaltando-se a necessidade de incluir as demais espécies próximas do grupo, além das duas outras espécies aceitas para o gênero *Phalocallis*, talvez assim uma proposta mais robusta possa ser sugerida.

REFERÊNCIA

- Barracough, T. G.; Nee, S. Phylogenetics and speciation. **Trends in Ecology and Evolutions**, 16: 391-399, 2001.
- Carstens, B. C.; Pelletier, T. A.; Reid, N. M.; Satler, J. D. How to fail at species delimitation. **Molecular Ecology**, 22: 4369-4383, 2013.
- Chauveau, O., Eggers, L., Souza-Chies, T. T., & Nadot, S. Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): Evolutionary trends in the flowers of the New World genera. **Annals of Botany London** 110: 713–729, 2012.
- Devoto, M.; Medan, D. Expected mating system, floral diversity and flower visitors of five species of iridaceae of the argentine pampas. **Acta Botánica Venezuéllica** 31(2):425-434, 2008.
- Doyle, J. J.; Doyle, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19: 11-15, 1987.
- Duminil, J.; Di Michele, M. Plant species delimitation: A comparison of morphological and molecular markers. **Plant biosystems**, 143: 528-542, 2009.
- Duminil, J.; Kenfack, D.; Viscosi, V.; Grumiau, L. Hardy, O.J. Testing species delimitation in sympatric species complexes: The case of an African tropical tree, *Carapa* spp. (Meliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 62: 275-285, 2012.
- Eckert, A. J.; Carstens, B. C. Does gene flow destroy phylogenetic signal? The performance of three methods for estimating species phylogenies in the presence of gene flow. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49:832-842, 2008.
- Evans, T. M., R. B. Faden, and K. J. Sytsma. Homoplasy in the Commelinaceae: a comparison of different classes of morphological characters. in K. A. Wilson, ed. *Mono-cots. II*. Univ. of New South Wales Press, Sydney, 547–556, 2000.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, 39: 783-791, 1985.
- Goldblatt, P. Systematics and Biology of *Homeria* (Iridaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 68: 413-503, 1981.

- Goldblatt, P. Chromosome cytology in relation to suprageneric systematic of neotropical Iridaceae. **Systematic Botany**, 7:186-198, 1982.
- Goldblatt, P. Phylogeny and classification of Iridaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 77: 607-627, 1990.
- Goldblatt, P.; Snow, N. Systematics and Chromosome Cytology of Eleutherine Herbert (Iridaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 78: 942-949, 1991.
- Goldblatt, P.; Manning, J.C. The Iris family - natural history and classification. **Timber Press**. Portland, Oregon, USA, p. 290, 2008.
- Goldblatt, P.; Rodriguez, A., Powell, M. P., Davies, T. J., Manning, J.C., Van Der Bank, M., Savolainen, V. Iridaceae, Out of Australasia? Phylogeny, Biogeography, and Divergence Time Based on Plastid DNA Sequences. **Systematic Botany**. 33: 495–508, 2008.
- Hall, T. BioEdit Sequence Alignment Editor for Windows 95. 2005.
- Hörandl, E. Paraphyletic versus monophyletic taxa evolutionary versus cladistic classifications. **Taxon**, 55: 564-570, 2006.
- Hörandl, E.; Stuessy, T. F. Paraphyletic groups as natural units of biological classifications. **Taxon**, 59: 1641-1653, 2010.
- Huelsenbeck, J. P.; Ronquist, F. Bayesian Analysis of Molecular Evolution Using MrBayes. **Statistical Methods in Molecular Evolution**, 183-226, 2005.
- Kelchner, S. A. The Evolution of Non-Coding Chloroplast DNA and Its Application in Plant Systematics. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 87: 482-498, 2000.
- Lee, J. Fatty oil production by *Alophia drummondii* (Iridaceae) and modified oil collection behavior of *Centris* (Centridini-Apidae). Thesis, **University of Texas**, Austin, 1994.
- Lovo, J.; Alcantara, S.; Vasconcelos, T.; Sajo, M. G.; Rudall, P.; Prenner, G.; Aguiar, A. J. C.; Mello-Silva, R. Evolutionary lability in floral ontogeny affects pollination biology in Trimezieae. **American Journal of Botany**, 108:828-843, 2021.
- Manning, J.; Goldblatt, P. The pollination of *Tritonopsis parviflora* (Iridaceae) by the oil-collecting bee *Rediviva gigas* (Hymenoptera: Melittidae): the first record of oil secretion in African Iridaceae. **South African Journal of Botany**, 68:171-176, 2002.
- Patterson, T.B.; Givnish, T. J. Phylogeny, concerted convergence, and phylogenetic niche conservatism in the core liliales: insights from rbcL and ndhF sequence data. **Evolution**, 56: 233-252, 2002.
- Posada, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, 25: 1253-1256, 2008.
- Posada, D.; Crandall, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, 14: 817-818, 1998.
- Queiroz, K.; Howard, D. J.; Berlocher, S. H. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. **Endless forms: Species and speciation**, 57-75, 1998.

- Queiroz, K. Ernst Mayr and the modern concept of species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 102: 6600-6607, 2005.
- Queiroz, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic biology**, 56: 879-886, 2007.
- Reeves, G.; Goldblatt, P.; Rudall, P. J.; Chase, M. W. Molecular systematics of iridaceae: a combined analysis of four plastid dna sequence matrices. **Annali di Botanica**, 58: 29-42, 2000.
- Rieseberg, L. H.; Brouillet, L. Are many plant species paraphyletic? **Taxon**, 43: 21-32, 1994.
- Rodriguez, A. Molecular and morphological systematics of the "tiger-flower" group (tribe Tigridieae: Iridaceae), biogeography and evidence for the adaptive radiation of the subtribe Tigridiinae. Dissertations. **The University of Wisconsin** – Madison, 1999.
- Rodriguez, A., Sytsma, K. J. Phylogenetics of the “Tiger-flower” group (Tigridieae: Iridaceae) based on molecular and morphological evidence. **Aliso**. 22: 412:424, 2006.
- Rudall, P.; Manning, J.; Goldblatt, P. Evolution of floral nectaries in Iridaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 90:613-631, 2003.
- Sang, T.; Crawford, D. J.; Stuessy, T. F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of Paeonia (Paeoniaceae). **American journal of Botany**. 84: 1120-1136, 1997.
- Swofford DL paup*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods). Version 4. Sinauer and Associates, Sunderland, Massachusetts, 2002.
- Taberlet, P.; Gielly, L.; Pautou, G.; Bouvet, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, 17: 1105-1109, 1991.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 30: 2725–2729, 2013.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22: 4673–4680, 1994.
- Willians, C. A. Harborne, J.B. Goldblatt, P. Correlations between phenolic patterns and tribal classification in the family Iridaceae. **Phytochemistry**, 25: 2135-2154, 1986.
- Yang, Z.; Rannala, B. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. **PNAS**, 107: 9264-9269, 2010.
- Zomlefer, W. B.; Williams, N. H.; Whitten, W. M.; Judd, W. S. Generic circumscription and relationships in the tribe Melanthieae (Liliales, Melanthiaceae), with emphasis on Zigadenus: evidence from ITS and trnL-F sequence data. **American Journal of Botany**, 88: 1657-1669, 2001.

PROPOSTA DE ARTIGO:

Nova espécie de *Phalocallis* Herbert (Iridaceae: Tigridieae) do
Paraná, Brasil

O presente capítulo foi preparado na forma de artigo a ser submetido ao periódico Phytotaxa, já estando de acordo com as normas da revista (<https://mapress.com/pt/about/submissions>).

CONCLUSÃO GERAL

A análise morfológica ainda é a abordagem básica na distinção das espécies, visto que é uma das primeiras características observadas já em campo. Além disso, grande parte dos trabalhos taxonômicos publicados com descrição de novos táxons nos últimos anos, trazem principalmente, se não exclusivamente, dados de distinção morfológica (DEBLE et al., 2012; INACIO et al., 2018; GOLDBLATT et al 2021). Desse modo, não descartamos a importância dessa prática em análises taxonômicas, porém reiteramos a necessidade combinação de caracteres, como a anatomia floral e foliar, a palinologia, a citogenética, a filogenia, entre outras. Visto que quanto mais caracteres distintivos um taxón tenha, mais pode ser adequadamente delimitado a nível de gênero e espécie.

A análise combinada de conjuntos de dados moleculares e morfológicos é importante assim como analisá-los separadamente também. Esse método pode ser útil para resolver dados conflituosos, principalmente quando o suporte de caracteres é baixo para alguns ramos, como foi observado nas análises filogenéticas presentes nesse estudo. Além disso, incongruências entre cladogramas morfológicos e filogenéticos podem ser evidenciados, a exemplo do que ocorre em diversos gêneros em Tigridieae, inclusive com *Phalocallis*.

Consideramos também a importância dos dados anatômicos nas análises, como já bem ponderado em inúmeros estudos (RUDALL, 1991; RUDALL, 1994; SOKOLOFF et al., 2021). Desse modo, diversos caracteres com grande potencial taxonômico podem ser levantados. Como já mencionado a anatomia foliar uma boa evidência taxonômica, já que caracteres inéditos foram evidenciados, como a presença de papilas localizadas na região da quilha, além dos que já foram descritos como significativos, como as fibras esclerenquimáticas e a espessura da lamina foliar. Contudo, algumas características permanecem ambíguas para delimitar o gênero, como o formato do ápice da quilha, sendo observadas espécies com ápice arredondado e com ápice acuminado, não possibilitando uma distinção para padrão genérico.

A anatomia floral também contribuiu com dados de distinção genérica e específica, visto que apesar de ser uma estrutura uniforme, também apresenta uma arquitetura complexa. Caracteres florais consistentes foram observadas para o gênero *Phalocallis*, com grande potencial taxonômico, com destaque para o androceu, na região do conectivo. As descrições morfológicas apontam como sendo um conectivo amplo. Desse modo, os dados anatômicos demonstram detalhes da arquitetura dessa estrutura, apresentando projeções associadas a base do esporângio. Essas projeções podem estar relacionadas com a presença do tecido secretor na

epiderme do conectivo, realizando o trabalho de proteger essa secreção contra a ação de fatores ambientais.

Os dados filogenéticos, discordam das antigas classificações designadas a *Phalocallis* (BAKER, 1892; RAVENNA, 1964; GOLDBLATT E MANNING, 2008), as quais associam o gênero a *Cypella* devido a sua similaridade morfológica. Ao invés disso, o associam molecularmente com *Gelasine* e *Eleutherine*, espécies com visíveis distinções morfológicas e uma aparente simplicidade fenotípica quando comparadas a *Phalocallis*. Inclusive com *Gelasine elongata* aninhada entre os ramos de *Phalocallis*, com grande proximidade filogenética com *Phalocallis coelestis*. Fazendo com que o gênero adquira uma conformação parafilética, assim como outros gêneros de Tigridieae (*Cypella*, *Calydorea*, *Tigridia*) (CHAUVEAU *et al.*, 2012)

Embora a parafilia em *Phalocallis* pareça problemática, ela pode ser considerada uma ponte para trabalhos futuros. Além disso, a similaridade morfológica com outros gêneros, que a primeira vista causam problemas de delimitação genérica, pode ter sua causa melhor trabalhada buscando as causas evolutivas dessas convergências e/ou polimorfismos. O atual agrupamento com *Gelasine elongata* também deve ser melhor explorado, talvez sendo necessário rever a classificação dessa espécie.

Após tudo exposto ressalta-se a importância da continuidade de estudos envolvendo o gênero *Phalocallis*, como uma possibilidade em compreender melhor as relações genéricas ocorrentes na tribo Tigridieae, podendo-se utilizar a junção de dados combinados, filogenéticos e morfológicos, para fornecer melhores índices de suporte para Tigridieae, como já mencionado por Rodriguez e Sytsma (2006). Ressalta-se também a necessidade de revisões complementares, a partir das coleções de herbários, considerando a possibilidade de novas espécies ainda não descritas estarem classificadas como *Phalocallis coelestis*.

Referências finais

Baker, J.G. **Handbook of the Irideae**. London: George Bells & Sons, 248 pp, 1892.

Chauveau, O., Eggers, L., Souza-Chies, T. T., & Nadot, S. Oil-producing flowers within the Iridoideae (Iridaceae): Evolutionary trends in the flowers of the New World genera. **Annals of Botany London** 110: 713–729, 2012.

Deble, L. Deble, A. S.; Alves, F.S. Two new species of *Cypella* (Iridaceae: Tigridieae) from Rio Grande do Sul, Brazil. **Phytotaxa**, 71: 59-68, 2012.

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

Goldblatt, P.; Manning, J.; Ebrahim, I. Two new species of *Moraea* Mill. (Iridaceae: Iridoideae) from the southern African winter rainfall area. *South African Journal of Botany*, 139: 290-293, 2021.

Inácio, C. D.; Chauveau, O.; Eggers, L. Three new species of *Sisyrinchium* (Iridaceae) from Campos of South America. **Phytotaxa**, 361:198-210, 2018.

Ravenna, P. F. *Cypella* subg. *Phalocallis* (Herb.) Ravenna. **Revista del Instituto Municipal de Botánica**. Buenos Aires 2: 53. 1962[1964].

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

Rudall, P. Leaf anatomy in Tigridieae (Iridaceae). **Plant Systematics and evolution**. 175:1-10, 1991.

Rudall, P. J. Anatomy and systematics of Iridaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 114, p. 1–21, 1994.

Sokoloff, D.D.; Zoric, L.; Jura-Morawiec, J.; Fay, M. F. Plant anatomy: At the heart of modern botany. **Botanical Journal oh the Linnean Society**, 195: 249-253, 2021.