



Fundação Universidade Federal do ABC

Pró reitoria de pesquisa

Av. dos Estados, 5001, Santa Terezinha, Santo André/SP, CEP 09210-580

Bloco L, 3º Andar, Fone (11) 3356-7617

iniciacao@ufabc.edu.br

Projeto de Iniciação Científica

submetido para avaliação no Edital: 04/2022

Título do projeto: O número cromossômico de *Scybalium fungiforme*: uma espécie parasita de genoma gigante

Palavras-chave do projeto: cariótipo, número cromossômico, Balanophoraceae, Santalales

Área do conhecimento do projeto: Ciências Biológicas/Botânica e Genética Vegetal.

1. RESUMO

A espécie *Scybalium fungiforme* é conhecida popularmente no Brasil como “cogumelo-de-caboclo”, nome este que faz referência à morfologia de sua inflorescência, a qual parece um fungo da cor vinho emergindo do solo. Esta espécie é uma holoparasita de raiz, como o restante das espécies da família Balanophoraceae. O hábito das espécies vegetais parece ter associação com caracteres citogenéticos, em especial com o tamanho de genoma, o qual pode variar graças a mudanças no número de cromossomos (como causado pela poliploidia) ou graças à expansão de sequências repetitivas. A espécie cogumelo-de-caboclo apresenta um dos maiores tamanho de genoma entre as Angiospermas, porém o desconhecimento do seu número cromossômico impede a identificação do mecanismo responsável pelo aumento no tamanho do genoma. Visando mitigar esse *gap*, o presente projeto visa determinar o número cromossômico de *S. fungiforme* e, a partir da comparação com os números cromossômicos das espécies próximas, determinar se houve ou não ocorrência de poliploidia nesta espécie.

2. INTRODUÇÃO CONTEXTUALIZANDO O PROJETO

2.1 O número cromossômico

O número cromossômico é a primeira característica obtida em estudos citogenéticos, sendo o mais simples e barato de se obter - até por isso é a característica mais descrita para as espécies vegetais. Este dado citotaxonômico é conhecido para quase todas as famílias e maioria dos gêneros de plantas (Guerra 2008, 2012). Durante o processo evolutivo, variações no número cromossômico aconteceram devido a dois processos: a disploidia e a poliploidia (Guerra 2012), o último sendo considerado o mais impactante na evolução das plantas (Jiao *et*

al. 2011), uma vez que se estima que todas as angiospermas atuais derivam de ancestrais que passaram por, no mínimo, um evento de poliploidia (Magallón *et al.* 2019). As espécies poliplóides possuem três ou mais genomas (*i.e.*, o total de DNA em um conjunto básico de cromossomos, como encontrado em um pólen maduro ou no núcleo do óvulo antes da fertilização) por núcleo celular ao invés de dois, como no caso das diplóides (revisado por Rezende *et al.* 2020).

O número cromossômico, quando analisados junto das hipóteses evolutivas, torna-se uma valiosa ferramenta de estudo já que, a partir dele, é possível obter o “número base” ou o “número cromossômico original”, que, segundo Guerra (2000), pode ser definido como “o número cromossômico haplóide que explica mais parcimoniosamente a variabilidade cromossômica do clado em estudo e mostra uma relação clara com o número básico dos grupos relacionados mais próximos”. Dessa forma, a identificação do número base só pode ser feita após uma criteriosa análise dos números cromossômicos registrados para o grupo em questão, analisados à luz da história evolutiva do grupo (Guerra 2008).

Como dito anteriormente, a alteração cromossômica mais impactante é a poliploidia, sugerida como um dos principais mecanismos de evolução das angiospermas (Jiao *et al.* 2011, Jiao 2018, Magallón *et al.* 2019). Estudos sobre ecologia dos poliplóides sugerem a associação de elevados níveis de ploidia com respostas a diferentes pressões ambientais (revisado em te Beest *et al.* 2012), favorecendo a ocupação de novos ambientes, extremos ou adversos (Ramsey e Ramsey 2014, Doyle e Coate 2019, López-Jurado *et al.* 2022, Moraes *et al.* 2022). Assim, aceita-se que a poliploidia seja um mecanismo capaz de promover mudanças de nicho, podendo, até mesmo, promover mudanças na montagem e dinâmica da

comunidade (Baduel *et al.* 2018, Rice *et al.* 2019, Rezende *et al.* 2020, Fox *et al.* 2020, Van de Peer *et al.* 2021). Acredita-se que isso deva-se ao aumento do número de cópias de genes, em conjunto com a potencial de criação de novos genes, eventos que podem promover a sobrevivência em ambientes variáveis (Leidinger *et al.* 2021).

2.2 O tamanho de genoma e sua importância no estudo das plantas

O tamanho de genoma, ou valor-C, diz respeito à quantidade de DNA presente no núcleo haplóide não duplicado (Winkler 1920, Greilhuber 2005), sendo apresentado em picogramas (pg, 1×10^{-12} g) ou em mega pares de base (1 pg = 978 Mpb). Esses valores costumam se mostrar constantes dentro das espécies, mas podem apresentar ampla variação entre espécies diferentes (Pellicer *et al.* 2018), podendo variar 2.000x entre angiospermas.

O tamanho de genoma é intimamente associado ao número cromossômico, pois uma vez que os cromossomos representam o próprio genoma, variações no cariótipo impactam o tamanho do genoma. Entretanto, apesar do número cromossômico se relacionar com tamanho de genoma entre espécies próximas, não apresenta relação quando comparamos grupos maiores, como famílias vegetais (Levin 2020).

Entretanto, as variações no tamanho de genoma, além de serem causadas por alterações no cariótipo, também podem ter origem nas variações nas porções repetitivas do genoma (ie., expansões e retrações na quantidade de cópias das sequências repetitivas como DNA satélite e elementos transponíveis). As mudanças no tamanho de genoma têm por consequência um conjunto de efeitos nucleotípicos (*i.e.*, características fenotípicas influenciadas pela quantidade bruta de DNA) que podem ser observados desde a escala micro

até macromorfológica (Knight *et al.* 2005, Beaulieu *et al.* 2007, Knight e Beaulieu 2008, Beaulieu *et al.* 2008, Doyle e Coate 2019), afetando também características funcionais, como a taxa fotossintética (Beaulieu *et al.* 2007, Roddy *et al.* 2020), velocidade do ciclo celular (quanto maior o tamanho do genoma, menor a velocidade, Francis *et al.* 2008) e tempo do ciclo de vida das espécies (quanto maior o tamanho do genoma, maior o tempo mínimo de uma geração, Levin 2020). Ao interferir em tais características essenciais, sugere-se que o tamanho do genoma possa apresentar associações com características ecológicas como latitude, variáveis bioclimáticas, ecorregiões e altitude (eg., Leitch *et al.* 2009, Trávníček *et al.* 2019, Souza *et al.* 2019, Veselý *et al.* 2020, Moraes *et al.* 2022), potencialmente afetando a diversificação adaptativa (Kang *et al.* 2014, Pellicer *et al.* 2018, Trávníček *et al.* 2019, Carta *et al.* 2020, Faizullah *et al.* 2021).

Outra característica que tem-se sugerido apresentar associação com o tamanho do genoma é o hábito. Por exemplo, em orquídeas, o hábito epífita tem-se mostrado associado ao tamanho de genoma pequeno (Leitch *et al.* 2009, Trávníček *et al.* 2019, Moraes *et al.* 2022). A explicação para este tipo de associação encontra apoio na forte correlação positiva já demonstrada entre tamanho de genoma e tamanho de célula guarda (ie, quanto menor o tamanho de genoma, menor o tamanho das células guarda, Knight *et al.* 2005). Para plantas epífitas é vantajoso apresentar células guardas pequenas, pois essas respondem mais rapidamente às variações de umidade do ambiente, logo temos a associação entre hábito epífita e tamanho de genoma pequeno.

Por outro lado, já sugeriu-se que o hábito parasita (independente se em plantas epífitas ou terrestres) possa estar associado a um tamanho de genoma mais elevado (Veselý *et al.*

2013, Faizullah *et al.* 2021), pois a abertura constante dos estômatos intensifica a transpiração e, assim, otimizam o acesso da planta parasita à seiva da planta hospedeira. Desta forma, o estudo da citogenética das plantas parasitas torna-se interessante visando melhor compreender a relação entre variações do genoma e hábitos.

2.3 As plantas parasitas

As plantas parasitas compreendem 4.500 espécies alocadas em 280 gêneros de 20 famílias de Angiospermas. Ao total, estima-se que o hábito parasita surgiu 12 vezes ao longo da evolução (Nickrent 2020). O hábito parasita caracteriza-se pela ligação da planta parasita à hospedeira via raízes modificadas (haustórios) e, a depender do grau de dependência do parasita, este pode ser hemiparasitas (ca. 4.100 spp.) ou holoparasitas (ca. 390 spp.). Enquanto as primeiras captam seiva bruta do hospedeiro e realizam fotossíntese, as últimas são espécies aclorofiladas, incapazes de fazer fotossíntese, obtendo carbono e nutrientes pelo hospedeiro (Heide-Jørgensen 2013).

Dentre as 12 ordens botânicas que apresentam espécies parasitas, Santalales destaca-se pela maior concentração de espécies parasitas e dentro desta ordem, destaca-se Balanophoraceae Rich., uma pequena família de plantas holoparasitas de raízes, que contempla aproximadamente 45 espécies aceitas distribuídas em 16 gêneros (WFO 2022). A família apresenta distribuição pantropical com ocorrência em florestas e savanas de clima tropical a subtropical em altitudes que variam do nível do mar até cerca de 4.000 metros (Heide-Jørgensen 2008, Kuijt e Hansen 2015). As espécies de Balanophoraceae são bastante curiosas: apresentam hábitos subterrâneos e apenas quando estão no estágio reprodutivo, projetam suas inflorescências acima do nível do solo (Cardoso 2018).

A ligação entre a espécie de Balanophoraceae parasita e o seu hospedeiro se dá por via de um haustório que parte do órgão vegetativo, um tubérculo que pesa entre alguns gramas até mais de 25 kg, podendo sustentar de uma a mais de 100 inflorescências na época de florescimento (Cardoso 2014, Teixeira-Costa e Ceccantini 2018). O desenvolvimento dos órgãos reprodutivos iniciam nos meristemas internos deste tubérculo ou em ramificações rizomatosas de onde esticam-se rumo à superfície do solo na forma de um estipe floral (Gonzalez e Mauseth 2010). Os estipes florais em certas espécies são cobertos por escamas de origem foliar e sem estômatos (Kuijt e Dong 1990). As inflorescências se desenvolvem no ápice destas estirpes e geralmente são espadiciformes ou capituliformes, apresentando um eixo carnosos, oval a oboval onde estão introduzidas flores diminutas (+/-1mm) que, às vezes, cobrem toda a superfície do eixo da inflorescência. Funcionando como brácteas, folhas escamiformes recobrem a inflorescência, podendo atuar tanto no *display* visual, quanto na sua proteção (Hansen e Engell 1978). Entretanto, considerando o polinizador mais eficaz, o gambá *Didelphis albiventris* Lund, 1840 (Amorim *et al.* 2020), este remove as brácteas no período noturno sendo que a comunicação da planta com esse polinizador, possivelmente, se dá por vias químicas e não por estímulos visuais. Frequentemente as inflorescências são confundidas com a serrapilheira ou solo adjacente, dificultando o seu reconhecimento a campo (Cardoso 2018).

Todas essas características morfológicas são facilmente identificadas na espécie *Scybalium fungiforme* Schott & Endl. (Fig. 1). Essa espécie projeta suas inflorescências unissexuais, com aproximadamente oito centímetros, nos meses de maio a agosto (Fig. 1A; Cardoso 2014). O seu nome popular, “cogumelo-de-caboclo”, faz referência à morfologia de sua inflorescência, mas recentemente, em um programa jornalístico na televisão, essa planta

também foi apelidada de “flor cogumelo” graças a sua semelhança com um fungo da cor vinho emergindo do solo, não parecendo à primeira vista com uma planta (Fig. 1A e B).

As flores unisexuais e diminutas de *S. fungiforme* são dispostas em uma inflorescência discóide que apresenta apenas um tipo de flor: ou masculina, ou feminina (Fig. 1A). No início do desenvolvimento, as flores são recobertas por brácteas (veja seta em Fig. 1A), que caem ao longo do desenvolvimento ou são removidas por polinizadores, expondo as flores e as grandes quantidades de néctar (Amorim *et al.* 2020). As flores são trímeras com tépalas parcialmente fundidas, tubulares na base e com formato irregular no ápice (para detalhe da flor masculina e feminina, veja Fig. 1B-C) (Hansen 1980 e Cardoso 2014). As sementes são ovais e alongadas, na cor vermelha ou marrom, com consistência suculenta (Fig. 1D, Cardoso 2014). O haustório é facilmente observado nas sementes ainda dispostas sobre a inflorescência (Fig. 1D).

Além da morfologia peculiar, *S. fungiforme* parece também ser peculiar na citogenética. Análises prévias do tamanho de genoma dessa espécie indicaram essa espécie como apresentando um dos maiores genomas em Angiospermas: $1C = c. 100Gb$ (Moraes, dados não publicados). A causa da formação deste genoma gigante de *S. fungiforme* é desconhecida. Os números cromossômicos determinados para seis espécies de Balanophoraceae variam entre $n=9$ a 23 (Rice *et al.* 2015), enquanto que em Loranthaceae, uma família irmã de Balanophoraceae, os número de cromossomos haplóides variam entre $n=8$ a 12 (Rice *et al.* 2015), com tamanhos de genoma variando entre $1C=2,65-17Gb$ (Pellicer e Leitch 2020). Entretanto, o desconhecimento do número cromossômico de *S. fungiforme* impede qualquer inferência da causa do genoma gigante desta espécie: se poliploidia ou se expansão de sequências repetitivas do genoma. Desse modo, a família Balanophoraceae se

destaca como um grupo interessante para se compreender melhor a associação entre tamanho do genoma e parasitismo.

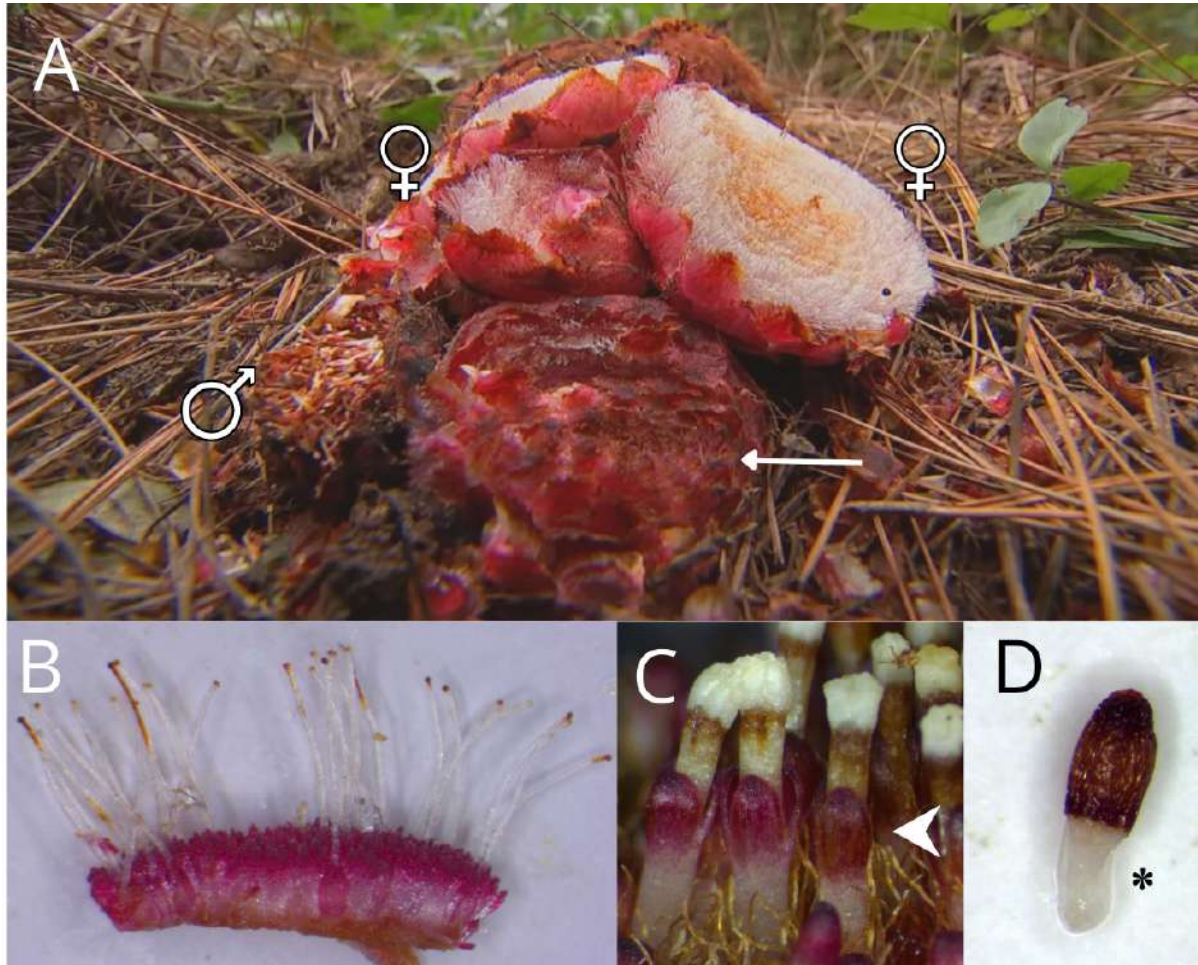


Figura 1. Morfologia das flores de *Scybalium fungiforme*. (A) Indivíduo com flores femininas (♀), masculinas (♂) e fechadas, ainda recobertas por brácteas (seta); (B) Corte do disco mostrando detalhe de flores femininas embebidas no disco e com pistilo e estigma (porção marrom final) projetados; (C) Detalhe as flores masculinas, observe o filete com antera terminal projetado acima da flor trímata (cabeça-de-seta); (D) Semente com coloração marrom e com haustório em início de desenvolvimento (asterisco). Fotos: (A) cedida para Globo Repórter / G1 por Felipe Amorim e fotos de B a D, de Ana Paula Moraes.

Assim, o primeiro passo é a determinação do número cromossômico de *S. fungiforme*, para que então possamos confirmar, a partir da comparação do número cromossômico desta espécie com as demais espécies da família, se o grande tamanho de genoma nessa espécie está associada à poliploidia ou à expansão de sequências repetitivas. Desta forma, o presente projeto visa determinar o número cromossômico de *S. fungiforme* e, a partir da comparação com os números cromossômicos das espécies próximas, determinar se houve ou não ocorrência de poliploidia nesta espécie.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é responder qual o número cromossômico de *Scybalium fungiforme* e, comparando com as demais espécies com número cromossômico conhecido na família Balanophoraceae, estimar a frequência de ocorrência de poliploidia na família.

4. MATERIAL e MÉTODOS

4.1 Material

O material necessário para esse projeto, *i.e.*, botões florais de *Scybalium fungiforme*, foram coletados nos período entre maio e julho nos anos de 2020 a 2022 em duas populações na cidade de Botucatu: Escola de Meio Ambiente de Botucatu e Fazenda Edgardia da UNESP/Botucatu. Material testemunho das duas populações foram depositados no Herbário Sinningia da UFABC (HUFABC 000626 e 000627, respectivamente).

4.2 Métodos

4.2.1 Revisão da literatura de números cromossômicos para ordem Santalales

Os dados de números cromossômicos e tamanho de genoma das espécies da ordem Santalales serão revisados na literatura utilizando, inicialmente, três bancos de dados citogenéticos: (1) catálogo de número cromossômico organizado pelo International Association of Plant Taxonomist - Chromosome data (IAPT, <https://www.iaptglobal.org/chromosome-data>), (2) catálogo do site Chromosome Count DataBase (Rice *et al.* 2015, CCDB, <http://ccdb.tau.ac.il/>) e (3) catálogo de tamanho de genoma do Kew Garden, Plant C-value (Pellicer e Leitch 2020; <https://cvalues.science.kew.org/>). A busca de dados no banco CCDB utilizará o pacote ‘chromer’ (<https://github.com/ropensci/chromer>) usando o RStudio v.4.3 (<http://www.rstudio.com>) no ambiente R (R Core Team 2021). Adicionalmente serão realizadas buscas ativas nos bancos da Scopus (<https://www.scopus.com/>), Web of Science (WOS, <https://apps.webofknowledge.com/>), SciELO (<http://www.scielo.org/>) e Google Scholar (<https://scholar.google/>). As buscas usarão o período máximo permitido em cada banco de busca. Nestas buscas serão empregadas as seguintes palavras chaves: “chromosome number”, “genome size”, “karyotype”, “Santalales”, e os nomes das famílias pertencentes à ordem Santalales. Todas as referências que forem obtidas ao longo desta revisão serão organizadas no software Mendeley.

4.2.2 Análises meiótica de *S. fungiforme*

a. Preparo das lâminas. Os botões florais coletados a campo foram fixados em etanol: ácido acético (3v:1v) por 24 horas à temperatura ambiente. As fixações estão estocadas em freezer a -20°C . Para a preparação cromossômica, os botões florais fixados serão lavados 3× em água destilada e as anteras serão esmagadas em uma gota de ácido acético 60%. As células serão observadas em microscópio para determinação da fase das células: (1) células durante processo meiótico, (2) em tétrade ou (3) grão de pólen. Enquanto as lâminas com células em meiose serão utilizadas para estimar regularidade do processo meiótico e número cromossômico, as lâminas com tétrade e grão de pólen serão utilizadas para determinação do índice meiótico e viabilidade de pólen, respectivamente.

b. Análise da regularidade meiótica e determinação do número cromossômico. As lâminas com células mãe de pólen em fases da meiose I e II, após serem maceradas em ácido acético 60%, serão prensadas e congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula. Após secagem da lâmina, as células serão coradas com DAPI (1 mg/mL) durante 30 minutos e montadas com tampão McIlvaine. A regularidade meiótica será estimada a partir da análise de cinco lâminas de cada população, sendo analisadas 500 células por lâmina. Cada célula será classificada de acordo com a fase do processo meiótico e se regular ou irregular (*ie.*, presença de cromossomos univalentes, cromossomos retardatários, pontes anafásicas, entre outras), anotando-se qual irregularidade. Sempre que possível, o número cromossômico será determinado.

c. Análise do índice meiótico. O índice meiótico é dado pela análise de tétrades viáveis pelo número de tétrades irregulares, refletindo a regularidade do processo meiótico. As lâminas

com tétrades serão coradas com carmim acético 2%. Para cada táxon, serão analisadas cinco lâminas, sendo 500 tétrades por lâmina.

d. Estimativa da viabilidade do grão de pólen. As políneas maduras serão utilizadas para estimar a viabilidade dos grãos de pólen via corabilidade com o corante Alexander (1980). As anteras de flores em antese serão maceradas em corante Alexander visando distinguir os grãos de pólen viáveis (ie., corados) dos inviáveis (não corados).

e. Captura, edição e armazenamento das imagens. As lâminas serão examinadas usando um microscópio de epifluorescência Olympus BX51, fotografadas com uma câmera Olympus CCD XC10 utilizando programa CellSens (Olympus). As imagens serão armazenadas tanto no HD externo do laboratório, como forma de backup em dispositivo físico, como na nuvem utilizando a plataforma Google Drive, com acesso fornecido pela instituição sede. As imagens serão processadas para o equilíbrio de cores, contraste e uniformidade de brilho usando o Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, Inc.).

5. CRONOGRAMA

Neste projeto a aluna irá executar tanto análises de determinação e revisão de número cromossômico, como também participará de reuniões semanais do grupo para discussões de artigos científicos selecionados e de encontros periódicos para acompanhamento dos resultados obtidos. Com isso, pretende-se ampliar o texto da revisão bibliográfica visando o relatório final durante todo período do estágio de IC. As atividades serão realizadas segundo o cronograma seguinte:

Atividade	2022	2023	
	Set-Dez	Jan-Abr	Mai-Ago
Revisão da literatura			
Análise da regularidade meiótica e determinação do número cromossômico			
Análise do índice meiótico			
Análise da viabilidade de grãos de pólen			
Escrita do relatório			
Apresentação no Salão de IC da UFABC	*Data a ser confirmada pela ProPes		

6. DESCRIÇÃO DA INFRAESTRUTURA E VIABILIDADE DO PROJETO

O trabalho será feito ligado ao Laboratório de Evolução e Diversidade III (Bloco Delta/Lab 103) da Universidade Federal do ABC que conta com todos os equipamentos necessários para o desenvolvimento deste projeto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander MP. 1980. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. Stain Technology. 2009; 55: 13–18. <https://doi.org/10.3109/10520298009067890>

Amorim FW, Ballarin CS, Mariano G, Lacerda-Barbosa PA, Costa JG, Hachuy-Filho L, et al. Good heavens what animal can pollinate it? A fungus-like holoparasitic plant potentially pollinated by opossums. Ecology. 2020; 101(5): 1–4. <https://doi.org/10.1002/ecy.3001>

Baduel P, Bray S, Vallejo-Marin M, Kolář F, Yant L. The “Polyploid Hop”: Shifting challenges and opportunities over the evolutionary lifespan of genome duplications. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2018; 6: 1–19. <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00117>

Beaulieu JM, Leitch IJ, Patel S, Pendharkar A, Knight CA. Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytologist*. 2008; 179(4): 975–986. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02528.x>

Beaulieu JM, Moles AT, Leitch IJ, Bennett MD, Dickie JB, Knight CA. Correlated evolution of genome size and seed mass. *New Phytologist*. 2007; 173(2): 422–437. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01919.x>

Carta A, Bedini G, Peruzzi L. A deep dive into the ancestral chromosome number and genome size of flowering plants. *New Phytologist*. 2020; 228(3): 1097–1106. <https://doi.org/10.1111/nph.16668>

Doyle JJ, Coate JE. Polyploidy, the nucleotype, and novelty: The impact of genome doubling on the biology of the cell. *International Journal of Plant Sciences*. 2019; 180(1): 1–52. <https://doi.org/10.1086/700636>

Faizullah L, Morton JA, Hersch-Green EI, Walczyk AM, Leitch AR, Leitch IJ. Exploring environmental selection on genome size in angiosperms. *Trends in Plant Science*. 2021; 26(10): 1039–1049. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.06.001>

Fox DT, Soltis DE, Soltis PS, Ashman TL, Van de Peer Y. Polyploidy: A Biological Force From Cells to Ecosystems. *Trends in Cell Biology*. 2020; 30(9): 688–694. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.06.006>

Francis D, Davies MS, Barlow PW. A strong nucleotypic effect on the cell cycle regardless of ploidy level. *Annals of Botany*. 2008; 101(6): 747–757. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn038>

Greilhuber J. Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Annals Botany*. 2005; 95(1): 91–98. <https://doi.org/10.1093/aob/mci004>

Guerra M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: Concepts and implications. *Cytogenetic and Genome Research*. 2008; 120(3–4): 339–50. <https://doi.org/10.1159/000121083>

Guerra M. Cytotaxonomy: The end of childhood. *Plant Biosystems*. 2012; 146(3): 703–710. <https://doi.org/10.1080/11263504.2012.717973>

Guerra M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*. 2000; 23(4): 1029–1041. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000400049>

Jiao Y, Chanderbali S, Landherr L, Ralph PE, Wickett NJ, Ayyampalayam S. Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms. *Nature*. 2011; 473: 97–102. <https://doi.org/10.1038/nature09916>

Kang M, Tao J, Wang J, Ren C, Qi Q, Xiang QY, et al. Adaptive and nonadaptive genome size evolution in Karst endemic flora of China. *New Phytologist*. 2014; 202(4): 1371–1381. <https://doi.org/10.1111/nph.12726>

Knight CA, Beaulieu JM. Genome size scaling through phenotype space. *Annals of Botany*. 2008; 101: 759–766. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm321>

Knight CA, Molinari NA, Petrov DA. The large genome constraint hypothesis: evolution, ecology and phenotype. *Annals of Botany*. 2005; 95(1): 177–190. <https://doi.org/10.1093/aob/mci011>

Kuijt J, Hansen B. Flowering plants · Eudicots, Santalales, Balanophoraceae. Vol. 12, Flowering Plants Eudicots Santalales, Balanophorales. 2015; 1–213. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-09296-6>

Cardoso L. 2018. Filogenia de Balanophoraceae e revisão da subfamília Scybalioideae. Tese de doutorado. Programa Pós-Graduação em Botânica da Escola Nacional Botânica Tropical. 284p.

Leidinger L, Vedder D, Cabral JS. Temporal environmental variation may impose differential selection on both genomic and ecological traits. *Oikos*. 2021; 130(7): 1100–1115. <https://doi.org/10.1111/oik.08172>

Leitch IJ, Kahandawala I, Suda J, Hanson L, Ingrouille MJ, Chase MW, et al. Genome size diversity in orchids: consequences and evolution. *Annals of Botany*. 2009; 104: 469–481. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp003>

Levin DA. Did dysploid waves follow the pulses of whole genome duplications? *Plants Systematics and Evolution*. 2020; 306(5): 1–4. <https://doi.org/10.1007/s00606-020-01704-5>

López-Jurado J, Mateos-Naranjo E, Balao F. Polyploidy promotes divergent evolution across the leaf economics spectrum and plant edaphic niche in the *Dianthus broteri* complex. *Journal Ecology*. 2022; 110(3): 605–618. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13823>

Magallón S, Sánchez-Reyes LL, Gómez-Acevedo SL. Thirty clues to the exceptional diversification of flowering plants. *Annals of Botany*. 2019; 123(3): 491–503. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy182>

Moraes AP, Brogliato T, Junqueira E, Forni-Martins ER, Barros F, Felix LP, Cabral JS. Are chromosome number and genome size associated with habit and environmental niche variables? Insights from the Neotropical orchids. *Annals of Botany*. 2022; in press. <https://doi.org/10.1093/aob/mcac021>

Nickrent DL. Parasitic angiosperms: How often and how many? *Taxon*. 2020; 69(1): 5–27. <https://doi.org/10.1002/tax.12195i>

Pellicer J, Hidalgo O, Dodsworth S, Leitch IJ. Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. *Genes*. 2018; 9(88): 5-14. <https://doi.org/10.3390/genes9020088>

Pellicer J, Leitch IJ. The Plant DNA C-values database (release 7.1): an updated online repository of plant genome size data for comparative studies. *New Phytologist*. 2020; 226(2): 301–305. <https://doi.org/10.1111/NPH.16261>

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em <https://www.R-project.org/>.

Ramsey J, Ramsey TS. Ecological studies of polyploidy in the 100 years following its discovery. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 2014; 369(20130352): 1–20. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0352>

Rezende L, Suzigan J, Amorim FW, Moraes AP. Can plant hybridization and polyploidy lead to pollinator shift? *Acta Botânica Brasilica*. 2020; 34(2). <https://doi.org/10.1590/0102-33062020abb0025>

Rice A, Glick L, Abadi S, Einhorn M, Kopelman NM, Salman-Minkov A, et al. The Chromosome Counts Database (CCDB) - a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytologist*. 2015; 206(1): 19–26. <https://doi.org/10.1111/nph.13191>

Rice A, Šmarda P, Novosolov M, Drori M, Glick L, Sabath N, et al. The global biogeography of polyploid plants. *Nature Ecology and Evolution*. 2019; 3(2): 265–273. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0787-9>

Roddy AB, Thérout-Rancourt G, Abbo T, Benedetti JW, Brodersen CR, Castro M, et al. The scaling of genome size and cell size limits maximum rates of photosynthesis with implications for ecological strategies. *International Journal of Plant Sciences*. 2020; 181(1): 75–87. <https://doi.org/10.1086/706186>

Souza G, Costa L, Guignard MS, Van-Lume B, Pellicer J, Gagnon E, et al. Do tropical plants have smaller genomes? Correlation between genome size and climatic variables in the Caesalpinia Group (Caesalpinioideae, Leguminosae). *Perspectives in Plant Ecology Evolution Systematics*. 2019; 38: 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2019.03.002>

te Beest M, Le Roux JJ, Richardson DM, Brysting AK, Suda J, Kubešová M, et al. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany*. 2012; 109(1): 19–45. <https://doi.org/10.1093/aob/mcr277>

Trávníček P, Čertner M, Ponert J, Chumová Z, Jersáková J, Suda J. Diversity in genome size and GC content shows adaptive potential in orchids and is closely linked to partial

endoreplication, plant life-history traits and climatic conditions. *New Phytologist*. 2019; 224(4): 1642–56. <https://doi.org/10.1111/nph.15996>

Van de Peer Y, Ashman TL, Soltis PS, Soltis DE. Polyploidy: an evolutionary and ecological force in stressful times. *The Plant Cell*. 2021; 33(1): 11–26. <https://doi.org/10.1093/plcell/koaa015>

Veselý P, Šmarda P, Bureš P, Stirton C, Muthama Muasya A, Mucina L, et al. Environmental pressures on stomatal size may drive plant genome size evolution: evidence from a natural experiment with Cape geophytes. *Annals of Botany*. 2020; 126(2): 323–330. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa095>

Winkler, H. 1920. Verbreitung und Ursache der Parthenogenesis im Pflanzen- und Tierreiche. Verlag Fischer, Jena.