

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO
Oxalis (OXALIDACEAE)

Magdalena Vaio Scvortzoff

Recife
Outubro 2012

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO
Oxalis (OXALIDACEAE).

Tese apresentada por Magdalena Vaio Scvortzoff ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal (área de concentração em Florística e Sistemática)

Orientador: Prof. Marcelo Guerra (Depto. Botânica, UFPE)

Recife
Outubro 2012

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

S437r Scvortzoff, Magdalena Vaio

Relações filogenéticas e evolução cromossômica em espécies do gênero *Oxalis* (Oxalidaceae) / Magdalena Vaio Scvortzoff. – Recife: O Autor, 2012.

150 f. : il., fig., tab.

Orientador: Marcelo Guerra

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia Vegetal, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

1. Genética vegetal 2. Filogenia 3. Plantas - Evolução I. Guerra, Marcelo (orientadora) II. Título.

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-107

Magdalena Vaio Scvortzoff

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA EM ESPÉCIES DO GÊNERO
Oxalis (OXALIDACEAE)

Tese de Doutorado submetida à apreciação pela banca examinadora:

Membros titulares:

Prof. Dr. Marcelo Guerra, Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Prof.^a Dra. Andrea Pedrosa-Harand, Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Prof.^o Dr. Marccus Alves, Depto. de Botânica, CCB, UFPE

Prof.^o Dr. Leonardo Pessoa Felix, Depto. de Fitotecnia, CCA, UFPB

Prof.^a Dra. Tatiana Teixeira de Souza Chies, Depto. de Botânica, UFRGS

Membros suplentes:

Prof.^a Ana Maria Benko-Iseppon, Depto. de Genética, UFPE

Prof.^o Dr. Reginaldo de Carvalho, Depto. de Biologia, UFRPE

Dedicado a mi querida familia y amigos que hicieron posible que esta tesis se hiciera realidad

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Marcelo Guerra por aceptarme como estudiante, por su apoyo, orientación, paciencia, enseñanzas y amistad

A Andrea Pedrosa-Harand por su apoyo, enseñanzas, consejos y amabilidad

A Ana Emilia por su amistad y apoyo constante

A mis queridos amigos y familia del Laboratorio de Citogenética y Biología Molecular Vegetal, Guga, Are, Lili, Marianita, Lidi, Nice, Sandra, Tiago R, Tiago E, Silvo, Artur, André, Fernando, Lucas, Joana, Leo e Helen, por su amistad, apoyo, ayuda, compañerismo, tantas traducciones de mi nordestiñol, correcciones de trabajos, y por hacerme reír todos los días haciéndome olvidar que estaba tan lejos de casa.

A mi queridísima amiga Areeeee, a Ana y Paulo que me trataron como parte de su familia dándome todo su apoyo, amistad y cariño.

A Eve y Andy que me brindaron la gran oportunidad de pasar unos meses en Madison; por sus enseñanzas de filogenética y de *Oxalis*. Por recibirme con gran hospitalidad y amabilidad.

A Brian, Lauren y Jane por su ayuda en el laboratorio y amabilidad

A Sara, Ron, Ronnie y Claudia por su gran hospitalidad, apoyo y amabilidad durante esos meses lejos de mis dos casas

A mi querida profesora Cristina por su amistad, consejos y siempre estar ahí

A Paola por su amistad, ánimo y por darme varias manos con el inglés

A Pablo por sus enseñanzas de filogenética, apoyo y consejos científicos

A mis compañeros del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía, Montevideo, por el apoyo. En especial a Crosa por sus interesantes y entusiastas charlas sobre bulbosas y biogeografía, a Susana por el ánimo y amistad, a Gabriela y Ana que me permitieron acompañarlas en la super colecta por todo Uruguay y a Julio que cuidó de mis plantitas.

A Eduardo Marchesi que me presentó a *Oxalis* y me entusiasmó a estudiar este super género de plantas

A Daniel de Azkue por sus amables respuestas a mis mails y sus inspiradores trabajos en citogenética de *Oxalis*

A Leo por tantas plantitas de *Oxalis* que colectó para mi trabajo

A los miembros del tribunal, los profesores Andrea Pedrosa, Marccus Alves, Leo Félix y Tatiana Tchies por sus correcciones, comentarios y sugerencias que permitieron mejorar la tesis y artículos

A Pedro por su ayuda con las identificaciones de *Oxalis* y su gran apoyo en la colecta por el sur de Brasil

Al personal del Museo Botánico de Curitiba, Paraná por su ayuda en las colectas y colecta de material para los análisis filogenéticos

A James Lucas y Maria Carolina por la identificación de especies de *Thamnoxy*s

A Hidelbrando y Adriano por su ayuda desde la secretaria del programa con tantos trámites y papeleos

Al programa PEC-PG y al Programa de Posgraduación en Biología Vegetal que me brindaron la posibilidad de realizar el doctorado en el Laboratorio de Citogenética y Evolución Vegetal

A CAPES, IANAS y SRF por las becas y ayuda financiera

A mi queridísima amiga y hermana separada al nacer Lucia por su amistad y apoyo incondicional

A Pat que a pesar de la distancia me mandaba ánimos

Al café que me mantuvo despierta en las horas de escrita de la tesis y al skype que me mantuvo conectada a la distancia con mi gente querida....

A mi familia.....

A mi madre Katia, mi hermana Matilde y mi sobrina Luana que me brindan todo su amor y apoyo y sin las cuales no tendría llegado hasta aquí.

A mi padre Osvaldo por su entusiasmo en mis estudios y mantenerme informada del paisito a la distancia

A la Tía Zule por sus mensajitos domingueros dándome ánimos y cariño y que extraño tanto

Gracias a todos por el apoyo, amistad y ánimos durante estos cuatro años!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	2
2.1 Filogenética Molecular.....	3
2.1.1 Introdução à filogenética molecular.....	3
2.1.2 Diferentes métodos para a inferência filogenética: conceitos, prós e contras.....	4
2.1.3. Sequências de DNA utilizadas nas análises filogenéticas.....	7
2.1.3.1 Sequências de DNA plastidial (cpDNA): simples de analisar, mas pouco informativas?.....	7
2.1.3.2. Região ITS: vantagens e desvantagens.....	10
2.1.3.3 O futuro na filogenética molecular: Genes de cópia única ou baixa cópia.....	13
2.2 Evolução cromossômica.....	16
2.2.1. Citotaxonomia.....	16
2.2.1.1 Simetria e assimetria cariotípica.....	18
2.2.2. Displóidia e Poliploidia.....	19
2.3 Evolução no tamanho do genoma.....	25
2.4 Filogenia molecular, cromossomos e conteúdo nuclear de DNA.....	28
2.5 Introdução ao grupo de estudo.....	30
2.5.1 O gênero <i>Oxalis</i> (Oxalidaceae).....	30

2.5.2 Citogenética do grupo.....	33
2.5.3 Estudos filogenéticos no gênero <i>Oxalis</i>	34
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
4. CAPÍTULO I- submetido a <i>Molecular Phylogenetics and Evolution</i>	
Molecular phylogeny and chromosome evolution among creeping herbaceous <i>Oxalis</i> species of sections <i>Corniculatae</i> and <i>Ripariae</i>	59
5. CAPÍTULO II- a ser submetido a <i>Botanical Journal of the Linnean Society</i>	
Relações filogenéticas e citogenéticas entre as espécies de <i>Oxalis</i> da seção <i>Articulatae</i> (Oxalidaceae) com ênfase em <i>O. linearantha</i> Lourteig.....	92
6. CAPÍTULO III- a ser submetido a <i>Annals of Botany</i>	
Diversificação cromossômica e evolução em espécies de <i>Oxalis</i> , subgênero <i>Thamnoxys</i> (Oxalidaceae).....	117
7. RESUMO.....	144
8. ABSTRACT.....	145
9. CONCLUSÕES	146
10. ANEXOS	
10.1 Normas das revistas.....	149
LISTA DE FIGURAS	
CAPÍTULO I	
Figure 1. Maximum parsimony (MP) strict consensus topologies from plastid (cpDNA) and nuclear ribosomal transcribed spacer (nrITS) data for species of <i>Oxalis</i> sections <i>Ripariae</i> and <i>Corniculatae</i> and related taxa. Parsimony bootstrap scores are shown above branches and Bayesian posterior probabilities are below. Different gray tones indicate the two main clades retrieved for the species analyzed.....	81

Figure 2. Maximum likelihood phylogeny of combined nuclear ribosomal internal transcribed spacer (nrITS) and plastid data set for species of *Oxalis* sections *Ripariae* and *Corniculatae* and related taxa. Parsimony bootstrap values are shown above branches and Bayesian posterior probabilities are below.....82

Figure 3. Bayesian inference (BI) majority-rule consensus topology of combined nuclear internal transcribed spacer (nrITS) and plastid data set for species of *Oxalis* from sections *Ripariae* and *Corniculatae*. Chromosome base number (x), ploidy levels, average Cx -values are presented for each group. Grey branches represent Northern Hemisphere and cosmopolitan species while black branches represent Southern Hemisphere ones.....83

Figure 4. Heterochromatin pattern observed with CMA (b-h) and DAPI (a-e) fluorochromes in species from *Oxalis* section *Ripariae* (R) and *Corniculatae* (C). a. *Oxalis serpens* (R) $2n = 2x = 12$; b. *O. paludosa* (C) $2n = 2x = 12$; c. *O. stricta* (C) $2n = 4x = 24$; d. *O. corniculata* (C) $2n = 8x = 48$; e. *O. conorrhiza* (C) $2n = 6x = 36$; f. *O. niederleinii* (C) $2n = 2x = 10$; g. *O. refracta* (C) $2n = 2x = 10$; h. *O. eriocarpa* (C) $2n = 2x = 10$. Arrows in f-h point at CMA^+ bands. Insert in e, f, and g shows small CMA^+ bands. Bar represents 10 μm84

Figure 5. Phylogenetic relationships among different karyotype formulae and nuclear DNA content (2C values) for *Oxalis* species with $x = 5$. *Oxalis sarmentosa* and *O. paranaensis* idiograms, in light grey, are based on images from de Azkue and Martínez (1984). Blue and yellow in the idiograms of *O. refracta*, *O. eriocarpa* and *O. niederleinii* represent DAPI staining and CMA^+ bands, respectively. Grey represents conventional staining for *O. paranaensis* and *O. sarmentosa* for which CMA/DAPI pattern is unknown. Idiogram for hypothetical ancestral karyotype ($x = 6$) is represented in white.....85

Figure 6. Ancestral state reconstruction of chromosome number for sections *Corniculatae* and *Ripariae*. The model of reconstruction used was maximum likelihood under the Markov k- state one- parameter (Mk1) model in Mesquite software. Ancestral state reconstruction was estimated using the 50% majority-rule topology obtained by Bayesian analysis of the three plastid and nuclear (nrITS) regions. Bayesian posterior probabilities are shown above branches. Node numbers are indicated in bold and proportional likelihoods for each of them are indicated in table A2. Chromosome numbers (n) are given for each species while hypothetical basic chromosome numbers (x) are represented by different colors.....86

CAPÍTULO II

Figura 1. a. Árvore consenso da maioria (50%) obtida via análise de máxima parcimônia das regiões de DNA plastidial em espécies da seção *Articulatae* e outras seções de *Oxalis* que apresentam caules bulbosos e rizomatosos **b.** Árvore consenso da maioria resultado das análises de inferência Bayesiana (IB das regiões plastidiais). Os valores de bootstrap são apresentados acima dos ramos e as probabilidades posteriores das análises Bayesianas abaixo desses. As letras acima dos ramos indicam os clados discutidos no texto. **c.** Rede de haplótipos baseada nas regiões de DNA plastidial para as espécies do clado F.....110

Figura 2. Inferências Bayesianas (IB) para a região nuclear ITS de taxa de *Oxalis* (seção *Articulatae*) e espécies relacionadas. Os níveis de ploidia estão indicados em cada acesso e representados por diferentes cores. Os suportes de bootstrap das análises de máxima parcimônia estão indicados acima dos ramos enquanto que as análises de probabilidade posterior das inferências bayesianas abaixo dos mesmos. As letras acima dos ramos se referem aos clados discutidos no texto. A foto ilustra a morfologia do bulbo para *Oxalis linarantha* (esquerda) e caule rizomatozo em *O. articulata* (direita).....111

Figura 3. Inferências Bayesianas (IB) para as regiões plastidiais e a região nuclear ITS da seção *Articulatae* e espécies de *Oxalis* relacionadas. Os suportes de bootstrap das análises de máxima parcimônia estão indicados acima dos ramos enquanto que as análises de probabilidade posterior das inferências bayesianas aparecem abaixo.....112

Figura 4. Padrão de heterocromatina observado com os fluorocromos CMA/DAPI presentes nas espécies da seção *Articulatae* **a)** *O. linarantha* $2n = 2x = 14$; **b)** *O. monticola* $2n = 2x = 14$; **c)** *O. lasiopetala* $2n = 2x = 14$; **d)** *Oxalis* sp. "Cuervos" $2n = 2x = 14$; **e)** *O. articulata* subsp. *rubra* $2n = 2x = 14$; **f)** *O. articulata* subsp. *rubra* f. *crassipes* $2n = 2x = 14$; **g)** *O. articulata* subsp. *articulata* $2n = 5x = 35$; **h)** *O. floribunda* subsp. *floribunda* $2n = 2x = 14$; **i)** *O. floribunda* subsp. *floribunda* $2n = 4x = 28$. Insertos em b e g representam bandas CMA⁺ pequenas. Barra em i representa 2.5 μm113

CAPÍTULO III

Figura 1. Árvores de consenso estrito obtidas das análises por Máxima Parcimônia das regiões plastidiais e nucleares das espécies analisadas do subgênero *Thamnoxys*. Números acima dos ramos representam o suporte de bootstrap. As letras acima dos ramos se referem aos clados discutidos no texto. As diferentes seções taxonômicas estão representadas por cores diferentes.....135

Figura 2. Complemento cromossômico e distribuição da heterocromatina observada com a coloração CMA/DAPI. **a.** *Oxalis hedysarifolia* $2n = 12$; **b.** *O. grisea* $2n = 12$; **c.** *O. glaucescens* $2n = 12$; **d.** *O. alstonii*, $2n = 10$, Metáfase meiótica I com 5II; **e-f.** *O. neuwiedii* $2n = 10$; **g.** *Oxalis* sp. $2n = 12$; **h.** *O. umbraticola* $2n = 10$; **i.** *O. psoraleoides* $2n = 12$. Fotos obtidas com a sobreposição das imagens obtidas com DAPI e CMA, exceto em **f** (DAPI) e em **g e i** (CMA). Setas sinalizam bandas CMA pequenas. Barras representam $10\mu\text{m}$. Barra em **f** corresponde à a-f, Barra em **i** corresponde desde g-i136

Figura 3. Complemento cromossômico e distribuição da heterocromatina observada com a coloração CMA/DAPI.(a-d, f) e CMA (e) **a.** *Oxali. cratensis* $2n = 12$; **b.** *O. cytisoides* $2n = 12$; **c.** *O. barrelierii* $2n = 12$; **d.** *O. frutescens* $2n = 12$; **e.** *O. frutescens* $2n = 36$; **f.** *O. divaricata* $2n = 12$. Fotos obtidas com a sobreposição das imagens obtidas com DAPI e CMA, exceto em e (CMA). Barra representa $5\mu\text{m}$137

Figura 4. Reconstrução do estado de caractere para o número cromossômico básico (x) em espécies do subgênero *Thamnoxys* de *Oxalis*. Os modelos de reconstrução utilizados foram o de Máxima parcimônia (direita) e Máxima verossimilhança utilizando o modelo MK-1 (esquerda) no programa Mesquite. A reconstrução foi baseada na árvore de consenso estrito obtida da análise de máxima parcimônia das regiões de DNA plastidial. As cores indicam os números básicos mais prováveis para cada nó do cladograma.....138

Figura 5. Reconstrução do estado de caractere para o conteúdo de DNA nuclear (valor 2C) junto com dados cromossômicos em espécies do subgênero *Thamnoxys* de *Oxalis*. Os idiogramas foram baseados em medições de metáfases obtidas neste trabalho (*) e em imagens dos trabalhos de De Azkue e Martínez (1983, 1987) e De Azkue (2000). As cores

indicam os números básicos mais prováveis para cada nó do cladograma. As espécies sublinhadas representam aquelas nas quais são conhecidos materiais poliploides.....139

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1. Species of sections *Corniculatae* and *Ripariae* analyzed cytogenetically and by flow cytometry with respective voucher and provenance information.....87

Table 2. Chromosome number ($2n$), ploidy level (x), 2C-values and monoploid genome size data (Cx), in picograms for species of sections *Corniculatae* and *Ripariae*. Standard deviation for 2C-values are presented only for data determined in this study.....88

Appendix A.1 *Oxalis* species, provenance, voucher and GenBank accession numbers.....89

Appendix A.2 Ancestral character state reconstruction on the combined plastid and ITS Bayesian inference analyses. Node numbers refer to numbers indicated in bold on the tree in Figure 6. Proportional likelihoods of reconstructions are indicated for each node.....91

CAPÍTULO II

Tabela 1. Espécies da seção *Articulatae* de *Oxalis* utilizadas nas análises citogenéticas e de citometria de fluxo, com informação dos vouchers e procedências.....114

Tabela 2. Números cromossômicos, níveis de ploidia, conteúdo de DNA nuclear (valores 2C e Cx) nos acessos analisados da seção *Articulatae*.....115

Tabela 1 suplementar. Espécies, número do voucher, procedência e número de acesso no GenBank de cada taxa de *Oxalis* incluídos no presente estudo.....116

CAPÍTULO III

Tabela 1. Espécies do subgênero *Thamnoxys* analisadas neste trabalho com os respectivos dados de herbário e sequências de DNA analisadas (+).....140

Tabela 2. Números cromossômicos e conteúdo nuclear de DNA nas espécies de *Thamnoxys* (*Oxalis*) analisadas.....142

Tabela 3. Números cromossômicos e conteúdo de DNA em espécies do subgênero *Thamnoxys* de *Oxalis*.....143

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Oxalis* L. é o mais diversificado da família Oxalidaceae e suas espécies estão distribuídas em dois principais centros: América do Sul e África do Sul. Do ponto de vista biossistemático se trata do gênero mais estudado da família, tendo sido investigado por técnicas citogenéticas convencionais, citometria de fluxo (determinação do conteúdo de DNA nuclear) e por técnicas moleculares, como RAPDs e análise de regiões de DNA plastidial e nuclear. No entanto, a maioria destas investigações está restrita a poucas espécies de algumas regiões geográficas ou às espécies relacionadas a *O. tuberosa* Molina, a espécie de maior importância econômica do gênero. A taxonomia do grupo é bastante complexa, devido principalmente à grande variação morfológica e à existência de hibridações interespecíficas que dificultam a delimitação das espécies e o estabelecimento das relações evolutivas. O trabalho de taxonomia mais recente para o gênero reconhece quatro subgêneros: *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Trifidus* Lourteig, *Thamnoxys* (Endl.) Reiche e *Oxalis* L. Os subgêneros *Monoxalis* e *Trifidus* estão constituídos por duas espécies cada, enquanto *Oxalis* possui 204, divididas em 29 seções, e *Thamnoxys* com 71, agrupadas em nove seções. Apesar de se basear em dados exclusivamente morfológicos, vários desses agrupamentos podem refletir uma classificação natural, existindo inclusive uma concordância em algumas destas seções e dados citogenéticos. Entretanto, análises moleculares recentes tem mostrado que são necessários mais estudos para determinar a monofilia das seções nas quais foi dividido o gênero já que pelo menos seções como *Pseudobulbosae*, *Articulatae*, e as relacionadas com *O. tuberosa* não seriam grupos naturais.

O gênero apresenta uma grande variabilidade cariotípica, tanto em número como em morfologia cromossômica. Apresenta uma extensa variação dispoloide $n = 5, 6, 7, 8, 9$ e 11 . Os números cromossômicos básicos $x = 6$ ou $x = 7$, tem sido indicados como possíveis números plesiomórficos para o gênero. A poliploidia também teve papel importante na evolução do gênero, uma vez que várias espécies são poliploides, com níveis de ploidia que variam de diploide a octaploide. Trabalhos mais recentes têm incrementado as análises citogenéticas com a análise do tamanho do genoma, que têm se revelado importante na sistemática de plantas.

Os dados cariotípicos e de conteúdo de DNA nuclear têm começado a ser mais utilizados em combinação com as análises filogenéticas moleculares, permitindo entender melhor a evolução de diferentes linhagens, eventos de hibridização e poliploidia, bem como a

importância das mudanças nos números cromossômicos na formação de novas espécies, além de ter auxiliado no entendimento da evolução cromossômica dentro de determinado grupo de plantas. No entanto, os estudos moleculares são relativamente recentes no gênero *Oxalis* e têm sido compostos por poucas seções taxonômicas. Até o momento não existe uma filogenia para todo o gênero e estudos combinando dados moleculares e citogenéticos que permitam determinar a relação entre as grandes variações cromossômicas e a diversidade taxonômica não foram ainda realizados.

Portanto, este trabalho teve por objetivo analisar as relações filogenéticas e de evolução cromossômica em espécies pertencentes a diferentes seções dos subgêneros *Oxalis* e *Thamnoxys* do gênero *Oxalis* (Oxalidaceae), assim como contribuir para o melhor entendimento da taxonomia das mesmas. Foram analisadas as seções *Corniculatae*, *Ripariae* e *Articulatae* do subgênero *Oxalis* e várias seções do subgênero *Thamnoxys*, todas as quais apresentam grandes variações cromossômicas e relações filogenéticas ainda não estudadas.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. FILOGENÉTICA MOLECULAR

2.1.1. Introdução à filogenética molecular

A filogenética é o estudo ou a reconstrução da história evolutiva e das relações entre os organismos. Este método envolve a identificação de caracteres homólogos, compartilhados pelos diferentes organismos, e a inferência das relações evolutivas com base na comparação desses caracteres por diferentes métodos. Até a década de 70 a reconstrução filogenética estava baseada quase que exclusivamente nas análises de caracteres morfológicos. Porém, com a introdução de dados moleculares no final dos anos 80, a mesma passou por uma revolução (Savolainen e Chase 2003). Com o início do uso de sequências de DNA, o número de caracteres homólogos que poderiam ser comparados aumentou bastante, de menos de 100 (normalmente observado em análises morfológicas) a mais de 1000 (levando em conta que cada nucleotídeo numa cadeia de DNA corresponde a um caractere), melhorando a resolução das inferências filogenéticas (Delsuc et al. 2005). Apesar de algumas desvantagens nas filogenias moleculares, como possíveis problemas com cópias parálogas (especialmente quando se analisam famílias multigênicas), problemas no alinhamento de sequências por alta divergência, e o número limitado de estado de caráter para os nucleotídeos, as sequências de DNA estão presentes em todos os organismos, a informação contida nelas é herdada fielmente, e diferentes regiões apresentam distintas taxas evolutivas, o que facilita seu uso em análises evolutivas em diferentes níveis taxonômicos (Savolainen e Chase 2003).

A filogenética molecular tem ajudado também a testar diferentes classificações taxonômicas baseadas quase exclusivamente em caracteres morfológicos. Além de representar as relações entre diferentes taxa, na atualidade, as árvores filogenéticas estão sendo utilizadas para entender os processos existentes por trás destas relações e a partir daí realizar novas inferências (Yang e Rannala 2012). Em plantas, por exemplo, as filogenias estão sendo utilizadas para analisar as duplicações gênicas e descrever as relações entre as cópias parálogas das famílias multigênicas. Além disso, permitem analisar as taxas de evolução de polimorfismos, divergências entre linhagens e populações, estudar as origens de domesticação, eventos de poliploidia e hibridização, entre outros. Atualmente, a filogenética molecular converteu-se em uma ferramenta indispensável para comparações genômicas e é utilizada tanto nas análises metagenômicas, identificação gênica, de elementos regulatórios e

RNAs não codificantes, assim como na reconstrução de genomas ancestrais (Bos e Posadas 2005; Hughes et al. 2006; Yang e Rannala 2012).

2.1.2. Diferentes métodos para a inferência filogenética: conceitos, prós e contras

As árvores filogenéticas são inferidas a partir de sequências de DNA ou outros caracteres mediante a utilização de diferentes métodos. Os chamados métodos de reconstrução filogenética podem ser divididos em primeira instância naqueles baseados em distância e aqueles baseados em caracteres. Dentro da primeira classe, os mais utilizados são *Unweighted pair group method with arithmetic mean* (UPGMA), o de mínima evolução (ME) e o NJ (*neighbour joining*). Nestes métodos o passo inicial para a análise é transformar as sequências de DNA ou aminoácidos (no caso de sequências expressas) numa matriz de distância, a qual representa uma estimativa da distância genética entre sequências (número de mudanças que ocorreram ao longo dos ramos entre duas sequências). A matriz resultante é então utilizada para a construção da árvore baseada nas distâncias par-a-par e essa transformação da distância em uma filogenia utiliza diferentes algoritmos segundo o método.

O maior problema com os métodos baseados em distância é que as diferenças observadas nas sequências não necessariamente refletem de forma precisa as distâncias evolutivas entre as mesmas (Holder e Lewis 2003). Por exemplo, múltiplas substituições num mesmo sítio podem fazer com que as sequências pareçam como mais próximas, embora isso pode ser mais reflexo de evolução convergente do que de uma relação por ancestralidade. Por isto, a maioria das análises filogenéticas moleculares na atualidade utiliza métodos baseados nos caracteres e não na distância. Dentre estes métodos os mais utilizados são o de máxima parcimônia (MP ou *maximum parsimony*; Fitch 1971), máxima verossimilhança (ML ou *maximum likelihood*; Felsenstein 1981) e a inferência Bayesiana (BI ou *Bayesian inference*; Larget e Simon 1999). Existem várias diferenças entre estes métodos, sendo os dois últimos mais próximos por compartilharem o uso explícito de modelos estatísticos de evolução nucleotídica (Bos e Posadas 2005). A máxima parcimônia (MP) procura encontrar a melhor topologia de árvore que possa explicar todas as mudanças com o menor número de passos. Basicamente, este tipo de inferência envolve determinar para cada árvore o número de passos requeridos para explicar a distribuição das mutações observadas, o que é denominado de comprimento da árvore. Este procedimento é repetido para cada uma das árvores possíveis, até ser determinada a árvore ou árvores com o menor comprimento e estas são denominadas as árvores mais parcimoniosas. Este método foi desenvolvido originalmente para ser utilizado

na análise de caracteres morfológicos discretos (Henning 1966) e no final dos anos 70 passou a ser utilizado com dados moleculares, aparecendo em quase todas as análises filogenéticas moleculares até o dia de hoje. O método de parcimônia apresenta algumas desvantagens. Em geral nas análises de parcimônia todas as mudanças são contadas de forma igual, isto quer dizer que modificações em qualquer caráter e entre qualquer par de estados de caráter recebem o mesmo peso e então não é possível incorporar conhecimento sobre os processos de evolução das sequências na reconstrução das árvores (Yang e Rannala 2012). Além disso, a MP pode ser susceptível ao processo conhecido como atração dos ramos longos (Holder e Lewis 2003), resultado da impossibilidade de identificar a ocorrência de múltiplas substituições num mesmo sítio (similarmente aos métodos de distância). Sequências de DNA podem ter taxas de substituição tão alta em alguns sítios que a informação pode ser perdida devido às múltiplas mudanças, reversões e saturações. Como resultado sequências com taxas diferentes, mas que convergiram para o mesmo estado final, podem ser atraídas artificialmente. Estes taxa não relacionados na árvore verdadeira podem portanto ser inferidos como proximamente relacionados por parcimônia (Savolainen e Chase 2003).

Apesar destas desvantagens o MP é o mais utilizado nas inferências filogenéticas moleculares, possivelmente por sua simplicidade, relativa rapidez e por prover inferências moleculares robustas, no caso de não existirem divergências evolutivas muito grandes.

As inferências por máxima verossimilhança e bayesianas, se diferenciam da MP por utilizarem métodos probabilísticos incorporando vários modelos de evolução para encontrar a árvore que melhor explique a variação de um conjunto de sequências. Por incorporar esses modelos evolutivos esses métodos têm ganhado muita popularidade na filogenética molecular. São vários os modelos evolutivos que podem ser incorporados nestas inferências, todos baseados na observação da evolução das sequências. É sabido, por exemplo, que raramente os quatro diferentes nucleotídeos ocorrem numa mesma percentagem numa sequência, ou que as transições (purina → purina ou pirimidina → pirimidina) são mais frequentes que as transversões (pirimidina → purina ou purina → pirimidina). O primeiro e mais simples modelo de evolução do DNA foi proposto por Jukes e Cantor (1969), no qual se assumia igual proporção para todas as bases e as mesmas taxas de transição entre todas. Kimura (1980), por sua vez, introduziu outro modelo com dois parâmetros, um para as transições e outro para a taxa das transversões. Felsenstein (1981) propôs outro modelo, no qual a frequência dos quatro tipos de nucleotídeos é diferente. Posteriormente, outros modelos

foram desenvolvidos, nos quais tanto o viés nas transições-transversões como a frequência desigual de nucleotídeos são considerados. Chegando ao modelo GTR (*General Time-Reversible*) que permite não só considerar as diferentes frequências de nucleotídeos, mas também pondera as seis substituições possíveis entre os estados ($A \leftrightarrow T$, $A \leftrightarrow G$, $A \leftrightarrow C$, $C \leftrightarrow G$, $C \leftrightarrow T$ e $G \leftrightarrow T$), ocorrem a diferentes taxas (Lanave et al. 1984).

O primeiro método probabilístico que incorporou estes diferentes tipos de modelos de evolução de sequências foi o de máxima verossimilhança. O método foi originalmente desenvolvido por Fisher em 1920 como um método estatístico para inferir valores paramétricos dos dados de um modelo. Posteriormente, Felsenstein (1981) criou algoritmos para poder utilizar este tipo de inferência nas análises de sequências de DNA e propôs esta metodologia como uma alternativa mais robusta e consistente em relação à máxima parcimônia. A máxima verossimilhança tenta avaliar a hipótese filogenética em termos da probabilidade dos dados dado um modelo ou árvore. O objetivo é encontrar a árvore com o valor de máxima verossimilhança que seja considerado a melhor estimativa ou a árvore ótima. As vantagens deste tipo de metodologia é ser um modelo estatístico que permite incorporar modelos evolutivos complexos e por tanto realiza inferências simultâneas sobre os padrões e os processos de evolução (Whelan et al. 2001). Esses modelos podem ser completamente definidos ou conter uma série de parâmetros estimados a partir dos dados. Partindo dos quatro possíveis estados de caráter nas sequências de DNA é necessário inicialmente realizar determinadas suposições sobre as taxas relativas de mudanças entre os estados do caráter. Depois de especificar o modelo pelo qual os caracteres evoluem, é possível calcular a verossimilhança dos dados para uma dada topologia. O maior problema com este tipo de inferência é que cada possível topologia é avaliada individualmente durante a análise, tornando-as computacionalmente muito extensas e limitadas no caso de um elevado número de taxa. Por este motivo em geral o ML é menos utilizado que o resto das metodologias de inferência filogenética (Guindon et al. 2010).

As análises bayesianas (BI, *Bayesian inferences*) aplicadas na filogenética são relativamente recentes (Rannala e Yang 1996), mas tornaram-se rapidamente as mais populares, sobretudo por permitir analisar conjuntos complexos de dados originados de diferentes regiões gênicas. O método está relacionado com o de ML, já que ambos utilizam a função de verossimilhança (likelihood) e um modelo explícito de substituição nucleotídica, como o Kimura dois parâmetros (K2P) ou o General Time Reversible (GTR).

No entanto as BI se diferenciam da ML por assumirem a probabilidade das hipóteses *a priori* que poderão influenciar o resultado final e pelo fato de que os parâmetros no modelo são considerados variáveis ao acaso com distribuição estatística, enquanto na ML são constantes fixas. Antes da análise dos dados na BI, uma distribuição *a priori* é determinada para cada parâmetro, que é combinada com os dados para gerar a distribuição *a posteriori*. Dessa forma, se nós temos um conhecimento *a priori* do que estamos analisando, podemos incluir a sua probabilidade na análise, influenciando o resultado da probabilidade posterior, pois a probabilidade posterior é um produto da verossimilhança e da hipótese *a priori*, divididos pela probabilidade do dado dadas todas as possíveis hipóteses (Yang e Rannala 2012). É mais rápido que o método ML e oferece quase os mesmos benefícios (Archibald et al. 2003). A diferença está em que enquanto os outros métodos produzem somente uma melhor estimativa das relações evolutivas e ignoram a falta de certeza no resultado final, a BI produz um conjunto de árvores do qual é escolhida a árvore com a maior probabilidade posterior (Lewis 2001). Porém, assim como os outros métodos, a BI também é suscetível ao processo de atração dos ramos longos (Kolaczowski e Thornton 2009).

Devido às desvantagens da inferência por parcimônia e do surgimento dos novos métodos estatísticos de análise filogenética, com o uso de modelos evolutivos explícitos, surgiu uma controvérsia de qual seria o melhor método para inferir uma árvore filogenética. Mesmo assim, na atualidade as análises por MP continuam sendo altamente utilizadas, embora sempre combinada a uma ou duas metodologias baseadas em métodos probabilísticos, sobretudo por produzir resultados razoáveis num tempo eficiente de análise (Yang e Rannala 2012). Nestas análises combinadas o mais comum é observar que as árvores produzidas por MP, BI e/ou ML possuem topologias altamente congruentes (Archibald et al. 2003).

2.1.3. Sequências de DNA utilizadas nas análises filogenéticas

Para ser utilizado nas análises filogenéticas um marcador de DNA deve ser suficientemente variável para unir espécies e/ou grupos de espécies que compartilham substituições (sinapomorfias) (Chase et al. 2005). Quando esta variação é pequena o resultado são árvores não-resolvidas, mas quando é muito alta pode aparecer altas percentagens de homoplasia. As altas taxas de substituições ou a presença de deleções e inserções, indels, levam também à problemas no alinhamento das sequências (Raubeson e Jansen 2005). Em geral, para analisar as relações a níveis hierárquicos altos têm sido usadas as sequências que evoluem mais lentamente, enquanto que para grupos mais relacionados, como espécies

próximas, aquelas de evolução rápida têm se mostrado eficazes para estudar as relações evolutivas.

A maioria das análises filogenéticas ao nível de espécie em plantas tem utilizado um conjunto limitado de sequências não-codificantes de DNA plastidial e os espaçadores transcritos internos (ITS) do DNA ribossomal nuclear (Hughes et al. 2006). Estas regiões têm sido amplamente utilizadas nas análises por serem variáveis em baixos níveis taxonômicos, mas, sobretudo pela facilidade de amplificação utilizando *primers* universais (Taberlet et al 1991, Shaw et al 2005, 2007). Diferentemente das análises em animais, o DNA mitocondrial (mtDNA) não tem sido muito utilizado na filogenia de plantas, devido principalmente a sua instabilidade estrutural, transferência gênica para o núcleo e a sua conservação de sequência e evolução mais lenta em relação às regiões plastidial e nuclear (Palmer et al. 2000). Porém, nos últimos 10 anos começaram a ser utilizados em combinação com outras regiões de DNA e em diferentes níveis hierárquicos (Beckert et al. 2001; Havananda et al. 2010; Seberg et al. 2012).

2.1.3.1. Sequências de DNA plastidial (cpDNA): simples de analisar, mas pouco informativas?

Desde o início do uso de sequências de DNA para a reconstrução filogenética o número de regiões de DNA possíveis de serem usadas para esse fim têm aumentado bastante (Degnan e Rosenberg 2009). Dentre elas as regiões codificantes e não-codificantes (íntrons e espaçadores intergênicos - IGS) do DNA plastidial têm sido, juntamente com os ITSs do genoma nuclear, os marcadores mais utilizados nos estudos filogenéticos ao nível de espécie, gênero ou famílias. A principal vantagem do cpDNA como marcador molecular é que o mesmo apresenta uma herança simples. Na maioria das angiospermas a herança é uniparental e materna, embora existam algumas exceções. A herança paternal para este marcador, por exemplo, tem sido observada em gimnospermas e algumas angiospermas, como *Turnera*, *Pelargonium* e *Oenothera* (Metzlaff et al. 1981; Chiu et al. 1988; Shore et al. 1994). Além disso, tem sido observada herança biparental em alfafa (Lee et al. 1988) e dos três tipos, materna, paterna e biparental, em *Passiflora* (Hansen et al. 2007). Isso deve ser levado em consideração no momento de sua utilização nas análises filogenéticas.

Outras características que fazem das regiões de DNA plastidial bons candidatos para as análises filogenéticas são o número de cópias e a estrutura relativamente estável. Existem múltiplas cópias do genoma plastidial por cloroplasto e múltiplos cloroplastos por célula

numa única folha (~1000 cópias por célula), fazendo com que o cpDNA seja facilmente amplificado por PCR em um número de cópias relativamente elevado. O sequenciamento comparativo de vários genomas plastidiais tem mostrado uma variação em tamanho entre 120 e 170 kb, além de uma grande conservação em estrutura (Shaw et al. 2007). Com poucas exceções, o genoma plastidial contém duas repetições invertidas, de aproximadamente 25kb cada, que são a imagem especular uma de outra em termos de conteúdo gênico. Estas repetições estão separadas uma da outra por uma região grande (LSC; *Large Single Copy*) e outra pequena (SSC; *Small Single Copy*) de cópia simples.

Em alguns grupos de plantas tem sido observadas modificações na estrutura plastidial, como a presença ou ausência de determinados genes, íntrons ou pseudogenes, assim como inversões ou deleções (ver Ravi et al. 2008). Os casos mais extremos de mudança na estrutura são a inversão de um segmento de aproximadamente 50 kb na região LSC nas leguminosas ou a perda de uma das repetições invertidas em gimnospermas, entre outras (Palmer e Thompson 1981; Jansen e Palmer 1987; Strauss et al. 1988; Ravi et al. 2008). Mesmo assim, o DNA plastidial das plantas apresenta um alto grau de similaridade em tamanho e arquitetura geral, além do conteúdo de genes e a ordem dos mesmos o que tem facilitado o desenho de *primers* universais para ser utilizados na amplificação das distintas regiões por PCR até em espécies evolutivamente muito distantes. Na maioria dos casos o DNA plastidial codifica para 3 a 5 genes de RNAr plastidiais, 30 genes para RNAt e mais de 100 genes que codificam para proteínas (ver Ravi et al. 2008). No genoma plastidial de *Nicotiana tabacum*, o primeiro a ser sequenciado, a parte codificante compreendeu 60% do genoma enquanto os 40% restante está constituído por regiões não-codificantes como espaçadores intergênicos (IGS) ou íntrons (Borsch e Quandt 2009).

Em geral, para as análises filogenéticas, têm sido utilizadas as regiões gênicas e as não codificantes do DNA plastidial localizadas nas regiões de copia única, já que estas apresentam uma taxa de variação maior que os repetidos inversos (Small et al. 2004), podendo chegar até aproximadamente 2-3 vezes como nas leguminosas (Perry e Wolfe 2002). Dentre as regiões codificantes mais utilizadas estão *rbcL* e *ndhF*, que foram das primeiras utilizadas na resolução de relações a níveis hierárquicos altos, para determinar as relações entre os diferentes grupos de plantas ou ao nível de família (Chase et al. 1993; Olmstead e Sweere 1994; Soltis et al. 1998; Savolainen et al. 2000). Porém ao nível específico as mais utilizadas são as não-codificantes. O uso destas últimas começou na década de 90, com a publicação

por Taberlet et al. (1991) de seis *primers* universais para o íntron *trnL*, e dos espaçadores *trnL-trnF* e *trnT-trnL*, as quais são das mais utilizadas nas análises filogenéticas. Outras regiões também bastante empregadas ao nível de espécies são *trnK-matK-trnK* e os íntrons *rps16*, *rpl16*, para as quais também há *primers* universais disponíveis (Shneyer 2009).

A maioria das sequências de DNA plastidial demonstraram ser úteis em níveis hierárquicos maiores, como família, gênero, até seções e tribos, em quase todos os grupos de plantas estudados. Porém, em um número elevado de gêneros, os níveis de variabilidade não são suficientes para resolver as relações evolutivas ao nível de espécie, sobretudo naquelas de especiação recente ou rápida, dando como resultado árvores pouco resolvidas (Hughes et al. 2006; Mort et al. 2007). Existe uma busca constante de novas regiões com um nível de variabilidade maior para ser utilizadas na resolução das relações ao nível específico (Small et al. 1998; Shaw et al. 2005, 2007). Na maioria das análises, para aumentar o nível de informação, são utilizadas várias regiões combinadas. Por exemplo, para resolver as relações entre as espécies de *Nicotiana* foram utilizadas três sequências não-codificantes, os espaçadores *trnL-trnF* e *trnS-trnG*, o íntron *trnL*, em conjunto com duas regiões gênicas *ndhF* e *matK* (Clarkson et al. 2004). Outro caso com um número ainda maior de sequências analisadas é *Lithospermum* (Boraginaceae) no qual foram testadas 10 regiões de DNA plastidial entre codificantes e não-codificantes para resolver as relações entre as espécies e sugerir possíveis marcadores para as análises do resto dos gêneros da família (Cohen e Davis 2012). Outra estratégia para aumentar a resolução das análises e a resolução das mesmas foi utilizada recentemente por Kumagai et al. (2010) no gênero *Oryza*. Estes pesquisadores analisaram os genomas plastidiais *in silico* das espécies *O. sativa* e *O. nivara* e identificaram 4 regiões com sítios suficientemente variáveis, as quais foram utilizadas nas análises filogenéticas de 21 espécies do gênero. Mas na maioria dos casos para aumentar a resolução, uma combinação de marcadores plastidiais e nucleares não-codificantes (ITS), com diferentes taxa evolutivas, é utilizada. Além da baixa variabilidade, o genoma plastidial é herdado em geral de forma uniparental permitindo traçar apenas metade da história evolutiva. Além disso, a utilização exclusiva de sequências de DNA plastidial não permite detectar eventos de evolução reticulada, entre outros processos evolutivos que podem estar envolvidos.

2.1.3.2. Região ITS: vantagens e desvantagens

A região nuclear não-codificante mais utilizada para a reconstrução filogenética ao nível específico e genérico é a região ITS que compreende os espaçadores transcritos internos

do DNA nuclear para o gene 18S-5.8S-26S (nrDNA) (Nieto Feliner e Roselló 2007). A região ITS que geralmente é amplificada consiste nos espaçadores intergênicos ITS1 e ITS2, o gene para o 5,8S rDNA, formado somente de um éxon é uma região altamente conservada e localizada entre os dois espaçadores, e parte dos genes para o RNA ribossomal 18S e 26/28S (ver Calonje et al 2009). O comprimento desta região em plantas varia desde 500-700 pb em angiospermas e entre 1500-3700 pb em algumas gimnospermas (Álvares e Wendel 2003). Os espaçadores ITS1 e ITS2 não são incorporados ao rRNA maduro pois sofrem uma clivagem específica durante a maturação do mesmo (Venema e Tollervey 1999), e segundo Calonje et al. (2009) podem por isto ser considerados como marcadores de evolução neutra e ser utilizados nas análises filogenéticas. Como parte da unidade transcricional do nrDNA, o ITS está presente em todos os organismos. Além disso, a sua herança biparental, uma taxa relativamente alta de evolução e variação e um número elevado de cópias, tornam o ITS extremamente vantajoso para análises filogenéticas (Baumel et al. 2002; Álvares e Wendel 2003; Nieto Feliner e Roselló 2007). Esta última característica, associada à possibilidade da utilização de *primers* universais para amplificação dessa região (White et al. 1990), fazem dela uma das mais simples de se obter por PCR (Baldwin et al., 1995). Segundo Baldwin et al. (1995), a variação possível de ser detectada nessa região pode chegar a 59% de diferenças informativas, sendo a maioria delas substituições de nucleotídeos, embora também seja comum encontrar inserções-deleções. Por esta característica, o ITS tem sido utilizado para resolver as relações em inúmeros grupos vegetais e em distintos níveis de hierarquia, como na família Brassicaceae, onde o uso do ITS permitiu resolver as relações entre as tribos e, posteriormente, propor uma filogenia para a família (Bailey et al. 2006; Warwick et al. 2006).

Em eucariotos os genes que codificam 18S, 5,8S e 28/26S rRNA estão agrupados em unidades de transcrição e organizados em agrupamentos de centenas a milhares de cópias localizadas em um ou vários sítios cromossômicos que são denominadas geralmente de RONS (regiões organizadoras nucleolares). Essas distintas cópias do DNAr sofrem um processo denominado evolução em concerto, que ocorre em famílias multigênicas e em alta taxa no caso do DNA ribossomal. A evolução em concerto ocorre quando as diferentes sequências presentes nas distintas cópias de um organismo são homogeneizadas por crossing-over desigual ou conversão gênica promovendo assim uma uniformidade intragenômica (Baldwin et al. 1995; Calonje et al. 2009). Isto foi considerado uma vantagem frente a outras regiões nucleares, já que quando a evolução em concerto é completa, os produtos da PCR podem ser sequenciados diretamente e não existe o problema de análise de cópias paralogas. Um dos

primeiros estudos de evolução em concerto no DNAr em plantas foi em algodão (Wendel et al. 1995), no qual cada uma das espécies tetraploides fixou uma das sequências para ITS de um dos dois parentais. Além disto, estudos posteriores de hibridização *in situ* com sondas de DNAr mostraram o mapeamento em vários cromossomos diferentes, sugerindo que a evolução em concerto ocorreu entre cromossomos não-homólogos (Hanson et al. 1996). Porém, a evolução em concerto pode não ser completa e tem sido detectado que não atua imediatamente depois de processos como hibridização, poliploidização e duplicação cromossômica ou gênica. Como consequência as cópias não-homogeneizadas podem gerar dados divergentes quanto ao DNAr (Álvarez e Wendel 2003; Nieto Feliner e Roselló 2007). A evolução em concerto pode ser retardada ou acelerada por vários processos, por exemplo, pela localização cromossômica dos distintos loci de DNAr ou por reprodução agâmica, respectivamente (ver Nieto Feliner e Roselló 2007). Embora a presença de várias cópias seja um problema para as análises filogenéticas elas podem ajudar a identificar eventos de evolução reticulada (Calonje et al. 2009). Essas diferentes cópias do DNAr podem experimentar destinos diferentes depois de um evento de poliploidização ou hibridização (Wendel 2000). Por exemplo, elas podem ser mantidas e serem informativas como em espécies aloploiploides de *Tragopogon* nas quais as cópias de ambos progenitores foram mantidas e permitiram determinar as espécies envolvidas na origem (Soltis et al. 1995). Outra possibilidade é a presença de sequências quiméricas por recombinação entre as unidades dando localizações na filogenia próximas a ambos os progenitores. A terceira possibilidade é que um tipo de sequência repetida domine sobre o outro, e esta pode ser igual a uma das espécies progenitoras (ver Álvarez e Wendel 2003).

Outro problema com as sequências de ITS é a possibilidade de estar analisando cópias parálogas em vez de ortólogas que são os que devem ser comparados para inferir relações evolutivas. Além disso, a alta taxa de mudanças na sequência de ITS pode dificultar a identificação de homologies no alinhamento das sequências dos distintos organismos e provavelmente por isto a porcentagem de homoplasia para ITS é mais alta que para outras regiões (Nieto Feliner e Roselló 2007). A presença de mais de uma cópia também representa uma desvantagem técnica, já que para o sequenciamento de todas é necessária a clonagem com o consequente aumento de tempo e custos das análises.

Apesar de todas as desvantagens dos ITS estes continuam sendo, junto com as regiões não-codificantes do DNA plastidial, as regiões mais utilizadas nas análises filogenéticas em

quase todos os níveis de hierarquia (ver por exemplo Gardner et al. 2012; Drew e Sytsma 2012; Porter et al. 2010). Porém, tem sido sugeridas e recentemente começaram a ser utilizadas com maior assiduidade novas alternativas a estas duas regiões de DNA que são as sequências de DNA nucleares (nDNA) de cópia única ou de poucas cópias ou membros específicos de famílias multigênicas e em especial os íntrons dessas regiões (Hughes et al. 2006).

2.1.3.3. O futuro na filogenética molecular: Genes de cópia única ou poucas cópias

Na atualidade, os genes de cópia única ou poucas cópias são considerados, dependendo da escala taxonômica, os melhores marcadores nas análises filogenéticas quanto ao nível de variação encontrado. Os genes de cópia única evoluem quatro a cinco vezes mais rápido que as regiões plastidiais e apresentam herança biparental pelo qual representam uma boa alternativa ao uso dessas regiões tradicionais (Steele et al. 2008). Apresentam também vantagens sobre os ITS por serem menos sujeitos a falta de evolução em concerto, e por tanto permitindo identificar os possíveis progenitores de híbridos ou aloploidos. Além disso, não possuem alta taxa de polimorfismo intragênico, apresentam menos homoplasia e possuem regiões de éxons que facilitam os alinhamentos e as comparações de homologia (Sang 2002). Outra característica vantajosa é representar vários loci não-ligados e portanto podem ser utilizados como fontes independentes nas inferências filogenéticas (Small et al. 2004).

Apesar de todas estas vantagens, os genes de cópia única apresentam vários problemas técnicos e de análise. Um dos principais problemas é encontrar genes que estejam no genoma como cópia única ou em um pequeno número de cópias, já que são poucos os genes nos genomas nucleares que se apresentam desta forma (Mort e Crawford 2004). Em geral nos eucariotos existe uma tendência dos genes nucleares a existir em famílias gênicas (Small et al. 2004). Neste caso, se não atua a evolução em concerto ou se esta ocorre de forma incompleta, surge o problema de distinguir entre cópias parálogas e ortólogas.

Outras dificuldades estão em achar as sequências de genes de cópia única que sejam de fácil amplificação, de altas taxas evolutivas, e que possam ser alinhadas sem ambiguidade (Steele et al. 2008). Existem, além disto, dificuldades de extrapolar uma região de um grupo a outro e o sucesso das amplificações por PCR é baixo. Na maioria das vezes, novos *primers* tem que ser desenhados para conseguir uma amplificação nos distintos grupos de organismos. O problema de identificar *primers* universais para amplificar estas regiões seria o resultado

das diferentes taxas de evolução nas sequências e histórias gênicas entre os diferentes grupos de plantas (Small et al. 2004). As dificuldades achadas também na amplificação destas sequências estão relacionadas com o requerimento de uma alta qualidade do DNA molde que limita o uso de materiais de herbário. Além disto, as dificuldades nas amplificações podem ser devidas a diferenças na presença/ausência de íntrons, na taxa de substituição nucleotídica, ou variação no número de cópias nos diferentes grupos de plantas (Hughes et al. 2006; Ilut e Doyle 2012), pois estão sujeitas a processos evolutivos como duplicação gênica, deleção, conversão gênica e recombinação. Em geral, estes processos são linhagens específicos o que dificulta ainda mais a transferência de uso destas regiões de um grupo para outro. A duplicação gênica tem sido, por exemplo, detectada no gene que codifica para RNA polimerase II, *rpb2*, em *Hibiscus* e algumas Malvaceae relacionadas, ou no gene codificante para álcool desidrogenase (ADH), que tem sofrido duplicação nas gramíneas, palmeiras e outras monocotiledôneas e no gene LEAFY em algumas Leguminosas (Rønstead et al. 2006). Em geral, estas regiões não são sequenciadas de forma direta, e depois das amplificações por PCR os produtos devem ser clonados devido à presença de múltiplas cópias ou simplesmente porque aparecem diferentes alelos, o que aumenta custos e tempos de análise (Small et al. 2004).

Mesmo assim, desde a década de 2000 são vários os genes de cópia única ou poucas cópias têm sido incorporados nas análises filogenéticas e utilizados em distintos níveis de hierarquia e são cada vez mais frequentes a incorporação dos mesmos e a procura por novas regiões deste tipo nos distintos estudos. Mort e Crawford (2004) num artigo de revisão sobre o tema descreveram 16 genes entre estes: o gene ADH (e.g. Small e Wendel 2000), o gene *waxy* ou GBSSI que codifica para a amido sintetase ligada ao grão (e.g. Walsh e Hoot 2001; Small 2004), o gene *pistillata* relacionado com a morfologia da planta (e.g. Bailey e Doyle 1999), o gene glutamina sintetase npGS (Emshwiller and Doyle 2002), o gene para a nitrato reductase NIA (e.g. Rodríguez e Spooner 2009), o PEP carboxilase (e.g.: Helfgott e Mason-Gamer 2004), o LEAFY/FLORICAULA (e.g. Yang et al. 2012), e o gene para a malato sintetase (Lewis e Doyle 2001). Muitos destes participam de complexas vias biossintéticas, o que faz destes genes candidatos ideais, porque para eles em geral existem dados de sequência e informação sobre o número de cópias. Entre estas regiões, a mais utilizada tem sido o gene *waxy* ou GBSSI para resolver relações evolutivas tanto a nível específico como níveis hierárquicos maiores. Na maioria dos casos o gene *waxy* é de cópia única, pelo menos nos taxa diploides, e a sua estrutura gênica esta conservada consistindo em 13 éxons que são

transcritos e um éxon não transcrito. Nas diferentes análises tem sido utilizadas diferentes partes do gene *waxy*, por exemplo, para os níveis hierárquicos altos tem sido utilizados os éxons, enquanto para o nível específico tanto éxons como íntrons tem sido utilizados. Este gene tem sido empregado com êxito em vários gêneros de distintas famílias como *Spartina* e *Thamnocalamus* (Poaceae), *Capsicum* e *Solanum* (Solanaceae) *Hibiscus* (Malvaceae) e *Ipomoea* (Convolvulaceae) (Walsh e Hoot 2001; Peralta e Spooner 2001; Baumel et al. 2002).

Distintas estratégias têm sido desenvolvidas para solucionar os diferentes problemas encontrados com os genes de cópia única e identificar novas regiões que possam ser utilizadas nas análises. Por exemplo, incluir genes bem caracterizados, dos quais são bem conhecidas as regiões éxon-íntron. Como os éxons em geral tem um alto nível de conservação da sequência, estes podem ser utilizados como lugar de união dos *primers* para amplificar os íntrons, que apresentam maior variabilidade (Steele et al. 2008). Outras estratégias são desenhar *primers* a partir de informação que se encontra em base de dados de sequências, por exemplo de ESTs, isolar homólogos utilizando sondas de outros organismos, ou obter novas sequências por clonagem de DNA cópia (Steele et al. 2008; Ilut e Doyle 2012).

Em um trabalho recente na família Musaceae (Christelová et al. 2011), os autores selecionaram regiões informativas a partir de um banco de sequências de ESTs para *Musa* que está depositada no GenBank procurando pelos critérios de genes de cópia única e com pelo menos um íntron. Com esses critérios foram selecionados 19 genes, que compreendem 16 kb e 73% deles correspondem a íntrons, os quais permitiram inferir com boa resolução as relações filogenéticas dentro da família.

Novas estratégias para procurar regiões informativas têm surgido com o sequenciamento de um número maior de genomas de plantas e com os sequenciamentos de última geração (Steele e Pires 2011). Estas permitem selecionar regiões variáveis e identificar os genes ortólogos baseado no conhecimento genômico. Um dos primeiros trabalhos em filogenética, utilizando a estratégia que Eisen (1998) denominou de filogenômica, é o de Zou et al. (2008). Neste trabalho foram avaliadas as sequências genômicas de dois cultivares de arroz o que permitiu a seleção de 142 regiões gênicas de cópia simples e livres do problema de cópias paralogas, para construir uma filogenia molecular para o gênero *Oryza*. Além de resolver relações entre os distintos genomas presentes no gênero, o uso destas regiões permitiu determinar eventos de diversificação. Segundo os autores a filogenômica é uma

ferramenta fundamental para resolver com um alto grau de confiança as relações evolutivas até em grupos de espécies de evolução rápida.

Apesar da maior variabilidade dos genes de cópia única e que em geral contém uma maior porcentagem de variação informativa que as regiões plastidiais e ITS, é sempre recomendável a comparação das filogenias inferidas dos genes nucleares com filogenias a partir de regiões plastidiais, de herança materna, para poder reconhecer incongruências entre as árvores que podem indicar a existência de variados processos (Soltis e Soltis 2000a; Small et al. 1998).

2.2. Evolução cromossômica

2.2.1. Citotaxonomia

Os cromossomos são as unidades herdáveis dentro do núcleo das células dos eucariotos. Cada cromossomo está representado por uma única molécula de DNA linear e de dupla fita que corresponde geneticamente a um grupo de ligação. Estas moléculas lineares são o pré-requisito para a acumulação de DNA (geralmente redundante), permitindo desta forma a alta diversificação tanto qualitativa como quantitativa que é observada nos cromossomos de eucariotos. As mudanças que ocorrem nestas unidades podem ser na sequência do próprio DNA, na composição das proteínas relacionadas ou na morfologia, tamanho e número de cromossomos. Todas estas características podem estar sujeitas a mudanças evolutivas e, portanto, diferir entre e dentro dos mais variados organismos (Schubert 2007). O uso de dados cariotípicos na taxonomia é conhecido como citotaxonomia e tem contribuído significativamente na determinação das relações genéticas entre espécies ou dentro de populações, tanto em plantas como em animais. A maioria dos estudos cromossômicos inclui a descrição do cariótipo, o qual se refere ao aspecto fenotípico do complemento cromossômico na metáfase mitótica. Na descrição do cariótipo de uma espécie são consideradas diferentes características cromossômicas como morfologia, número, tamanho absoluto e relativo dos cromossomos, simetria (determinada pela posição do centrômero), distribuição da heterocromatina e número e localização do DNAr, além do tamanho do genoma (Levin 2002). Esses dados têm sido observados na maioria das espécies de plantas e animais, e 90% dessas espécies analisadas diferem no cariótipo (Riesberg 2001; Lai et al. 2005).

A morfologia dos cromossomos monocêntricos está determinada pela posição da constrição primária, denominada centrômero, a qual subdivide o cromossomo em braços. Os braços cromossômicos podem ser de tamanho igual ou diferente e, dependendo da relação de ambos os braços, podem ser classificados em quatro tipos diferentes: metacêntrico, submetacêntrico, acrocêntrico e telocêntrico (Guerra 1986). As mudanças na morfologia dos cromossomos são, em geral, produzidas por rearranjos cromossômicos. Esses rearranjos ocorrem em regiões do DNA que sofreram quebras e são em seguida reparadas. O rearranjo resulta da união das extremidades livres diferentes. Dependendo do tipo de rearranjo, pode ocorrer mudança no tamanho e número de cromossomos, assim como alteração na ordem e combinação gênica nos grupos de ligação. Os rearranjos cromossômicos que mudam somente a morfologia cromossômica são as inversões paracêntricas e pericêntricas e, nestes casos, as quebras ocorrem em ambos os lados do centrômero ou apenas num dos braços cromossômicos, respectivamente. Outros tipos de rearranjos cromossômicos envolvem mudanças na morfologia e no tamanho dos cromossomos. Nas translocações recíprocas são trocados segmentos cromossômicos entre dois cromossomos não homólogos enquanto nas translocações não recíprocas a troca de segmentos é unidirecional. Outros tipos de mudanças que podem afetar o tamanho e a morfologia são a perda (deleção) ou inserção de segmentos de DNA. As primeiras são mais toleradas naqueles organismos nos quais existem mais de duas cópias do genoma (poliploides) e nos casos que envolvem sequências dispensáveis. A segunda ocorre em geral por inserção de elementos transponíveis que, além de propiciar rearranjos cromossômicos, tem sido indicada como uma das principais causas para o aumento do tamanho do genoma entre diferentes organismos (Schubert e Lysak 2011).

Os números cromossômicos variam amplamente nas plantas. O menor número conhecido é de $2n = 4$, descrito para espécies pertencentes a distintas famílias, sendo duas espécies de Poaceae, uma espécie de Hyacinthaceae, uma Cyperaceae e duas Asteraceae (Bennett 1998). Por outro lado, os maiores números cromossômicos têm sido observados em *Ophioglossum reticulatum* (Pteridófita), com $2n = \text{ca. } 1200$, no gênero *Sedum* (Crassulaceae), com $2n = 640$ e na monocotiledônea *Voanioala gerardii* (Arecaceae), com $2n = \text{ca. } 596$. Vários grupos de plantas apresentam um número constante de cromossomos, como por exemplo, os gêneros *Lilium* e *Pinus*, nos quais todas as espécies apresentam $2n = 24$, a subfamília Aurantoideae da família Rutaceae com $2n = 18$ ou ainda nas famílias Magnoliaceae, Bromeliaceae e Cactaceae, nas quais a maioria das espécies apresentam $2n = 36, 50$ e 22 , respectivamente (Guerra 2008, IPCN 2012). Embora vários grupos apresentem

essa estabilidade no número de cromossomos, uma grande porcentagem de plantas apresenta mudanças no número cromossômico, geralmente relacionadas a diferenças taxonômicas e evolução desse grupo de organismos.

Um conceito fundamental em taxonomia relacionado com o número cromossômico é o do número cromossômico básico (x). O conceito de número básico tem variado ao longo da história da citotaxonomia. O primeiro a definir o termo foi Langlet (1927) que considerava que era aquele fator algebricamente mais comum. Mais recentemente, Guerra (2000) o definiu como "um dos números cromossômicos haploides que são observados em um táxon e que explica de forma mais parcimoniosa a variação cromossômica daquele grupo e que apresenta uma relação clara com os outros números básicos presentes em grupos relacionados". Segundo Guerra (2008), o número cromossômico básico seria aquele que está presente na população inicial de um clado ou táxon e, portanto, cada espécie, gênero ou família teria um único número básico original. Entretanto, Stuessy (2009) o definiu como o menor número haploide de um grupo de taxa relacionados. Em alguns grupos o número cromossômico básico tem sido conservado com pouca ou quase nenhuma mudança e, portanto, é facilmente identificado, mas em outros grupos o número cromossômico básico tem experimentado várias mudanças, de forma que se torna difícil reconhecer o número original (Guerra 2000).

2.2.1.1. Simetria e assimetria cariotípica

A simetria cariotípica tem sido utilizada para inferir a direção da evolução em plantas superiores, assim como para a sua classificação. Ela está baseada principalmente no posicionamento do centrômero ao longo do eixo cromossômico e no tamanho relativo dos braços cromossômicos. Um cariótipo simétrico consiste de cromossomos que apresentam um tamanho relativamente similar e os centrômeros se encontram na posição mediana ou sub-mediana. Enquanto um cariótipo assimétrico possui vários cromossomos com o centrômero em posição terminal e ou subterminal e estão caracterizados por grandes diferenças no tamanho cromossômico (Stebbins 1950). O aumento na assimetria cariotípica pode ocorrer por mudança na posição do centrômero, desde uma localização mediana/submediana para uma posição terminal/subterminal (mudanças intracromossômicas), e/ou pelo acúmulo de diferenças no tamanho dos cromossomos do complemento devido à adição ou deleção diferencial de cromatina (mudanças intercromossômica). Estas duas tendências, segundo Stebbins (1971), não estariam relacionadas, porém em alguns grupos de plantas parecem ser. O mesmo autor distinguiu entre doze categorias com respeito à assimetria cariotípica, embora

só dez delas são conhecidas em plantas superiores. A classificação deste autor é a mais frequentemente utilizada para avaliar a simetria cariotípica, porém existem várias outras medidas que tem sido sugeridas como mais úteis em alguns grupos de plantas (revisadas em Paszko 2006; Peruzzi et al. 2009).

As diferenças em assimetria têm sido utilizadas para inferir o sentido da evolução desde que Stebbins (1971) propôs que os cariótipos simétricos são ancestrais enquanto os assimétricos são derivados. No entanto, Jones (1998) analisando vários grupos de plantas sugeriu que a interpretação contrária também é possível, e que cariótipos assimétricos podem chegar a ser a condição primitiva dando origem a cariótipos mais simétricos por fusão de acrocêntricos.

2.2.2. Disploidia e Poliploidia

Existem dois tipos de mudanças no número cromossômico que estão relacionados com a filogenia e a evolução cariotípica, as quais são a poliploidia e a disploidia, enquanto as aneuploidias não possuem implicações na evolução (Guerra 2000). A disploidia é uma mudança gradativa no número cromossômico haploide observado entre espécies evolutivamente próximas. Esta mudança pode resultar no aumento ou na diminuição do número cromossômico, sendo denominadas disploidia ascendente e descendente, respectivamente. Essas mudanças têm como consequência a formação de uma série cromossômica (série disploide) e têm sido observadas em vários gêneros de plantas. Um exemplo bem estudado é o do gênero *Melampodium*, no qual existe uma série disploide $n = 9, 10, 11, 12, 14$, sendo um dos maiores padrões de variação dentro de Asteraceae. Análises moleculares recentes neste gênero tem mostrado que $x = 11$ seria o número cromossômico basal e, portanto, disploidia ascendente e descendente teriam ocorrido durante sua evolução (Stuessy et al. 2011).

Estas mudanças em número são devidas principalmente a translocações Robertsonianas, fissões centroméricas de cromossomos bibrâquiais (disploidia ascendente) ou fusões cêntricas dos braços longos de dois cromossomos acrocêntricos ou telocêntricos (disploidia descendente). Um exemplo disso ocorre no gênero *Nothoscordum*, com espécies apresentando $2n = 8$, todos metacêntricos, e $2n = 10$, com seis pares metacêntricos e dois acrocêntricos. Em outros casos, os mecanismos relacionados com a mudança de número não são claros e envolvem distintos tipos de reestruturações cromossômicas (Schubert e Rieger

1985; Schubert 2007, Schubert e Lysak 2011). As disloidias descendentes parecem ter sido mais frequentes durante a evolução das plantas (Guerra 2000).

Atualmente, o uso de técnicas mais especializadas, tanto citogenéticas como moleculares, têm possibilitado determinar exatamente as diferentes reestruturações cromossômicas que levaram à mudança de número e ordem das mesmas. Na família Brassicaceae, estudos citogenéticos permitiram mostrar que as mudanças de números cromossômicos dentro da família são mais complexas do que apenas a ocorrência de simples translocações Robertsonianas. Os números cromossômicos em Brassicaceae variam desde $2n = 8$ até $2n = 256$ (Lysak et al. 2006). *Arabidopsis thaliana* apresenta $2n = 10$ e este número representa um caráter derivado do ancestral do clado ao qual pertence ($n = 8$) e no qual podem ser encontrados também *A. lyrata* e *Capsella rubella* com $2n = 16$. Lysak et al. (2006), utilizando pintura cromossômica comparativa, determinaram que na redução do número cromossômico de *A. thaliana* para $n = 5$ estiveram envolvidos vários rearranjos cromossômicos que incluíram quatro inversões, duas translocações e três eventos de fusão cromossômica. No gênero *Brassica*, no entanto, as análises de Mandáková e Lysak (2008) mostraram uma translocação entre dois cromossomos na origem de algumas espécies com $x = 7$ e que a redução de $x = 8$ para $x = 7$ teria ocorrido mais de uma vez na evolução do gênero, envolvendo diferentes inversões e fusões cromossômicas.

Muitos dos rearranjos ocorridos durante a evolução têm sido também detectados mediante a comparação de sequências de DNA. Por exemplo, Luo et al. (2009) demonstraram, mediante a análise de sintenia de determinadas regiões cromossômicas, que em Triticeae o número cromossômico básico $x = 7$ derivou de $x = 12$ pela inserção de quatro cromossomos nas regiões centroméricas de outros quatro cromossomos, além de um outro evento de fusão e translocação. Recentemente, o sequenciamento de duas espécies de *Solanum*, *S. pimpinellifolium* e *S. lycopersicum*, e a comparação destes com o genoma de *S. tuberosum*, tem mostrado a existência de onze inversões entre os genomas do tomate e da batata (The tomato genome consortium 2012).

Outra importante fonte de variação de número de cromossomos é a poliploidia, a qual consiste na duplicação de todo o complemento cromossômico de uma espécie (Wendel 2000), sendo um evento importante para plantas, animais, fungos e protozoários, como vem sendo evidenciado por duplicações genômicas antigas que têm sido observadas nos genomas desses grupos. Nas angiospermas se acredita que entre 50 e 70% das espécies são poliploides, e se

forem considerados os eventos antigos de duplicação essa porcentagem chega a 100% (Masterson 1994, Wendel 2000; Cui et al. 2006, Soltis e Soltis 2009).

Estudos recentes têm sugerido que as espécies poliploides possuem uma maior adaptabilidade e um aumento da tolerância a diferentes condições ambientais, provavelmente devido à presença de maiores combinações de alelos disponíveis para a seleção, permitindo adaptações a mudanças drásticas ocorridas no ambiente (Fawcett et al. 2009). Isso pode estar relacionado com alterações na morfologia, fenologia, fisiologia e ecologia que são inerentes à poliploidia e podem ocorrer em poucas gerações (Levin 2002). Baseado nisso tem sido proposto que a poliploidia teria contribuído na sobrevivência, propagação e êxito evolutivo de várias linhagens de plantas durante os eventos de extinção que ocorreram entre o Cretáceo e Terciário (Fawcett et al. 2009; Soltis e Burleigh 2009).

Os poliploides podem ser classificados de duas formas diferentes e em quatro tipos principais: neopoliploides, paleopoliploides, alopoliploides e autopoliploides (Guerra 2008). Os conceitos de paleo e neopoliploide estão relacionados com o tempo de formação dos poliploides, entre aqueles de uma origem antiga e recente, respectivamente. Os paleopoliploides são aqueles nos quais os ancestrais são desconhecidos ou estão extintos, sendo difíceis de caracterizar, mas análises de sequenciamento do genoma de plantas têm auxiliado na detecção dos eventos de paleopoliploidia, levando inclusive à constatação de que muitas espécies teriam sofrido uma ou mais duplicações do genoma durante a evolução. Por exemplo, o sequenciamento de *Arabidopsis thaliana* confirmou duas duplicações recentes compartilhadas com a linhagem das Brassicaceae e um terceiro evento provavelmente compartilhado com o resto das eudicotiledôneas (ver Barker et al. 2009). Para o milho também foram detectadas duas duplicações genômicas antigas, uma no ancestral que deu origem às gramíneas e um outro evento mais recente na linhagem do milho (Paterson et al. 2003). Eventos mais recentes de duplicação ocorreram no ancestral das solanáceas, nas leguminosas *Glycine* e *Medicago* e no ancestral comum ao gênero *Gossypium* (ver Adams e Wendel 2005). Por outro lado, os neopoliploides, por serem de origem recente, são mais fáceis de reconhecer e caracterizar (Stebbins 1971).

A outra forma de classificação da poliploidia está baseada na similaridade genética dos genomas envolvidos na origem do poliploide, sendo reconhecidos dois tipos principais, alo e autopoliploides (Stebbins 1971). Os alopoliploides são aqueles surgidos por hibridização interespecífica, em alguns casos intergenérica, enquanto os autopoliploides são originados a

partir do cruzamento entre ou dentro de populações pertencentes a uma mesma espécie (Soltis e Soltis 2000b). Tradicionalmente tem sido aceito que a aloploidia seja a via mais frequente para a formação de poliploides em plantas (Veilleux 1985; Carputo et al 2003), embora análises recentes sugiram que autopoliploides também apresentem uma alta frequência na natureza (Soltis et al. 2007). Tanto em alo- como em autopoliploides a produção de gametas não-reduzidos tem sido a via mais frequente para a formação do poliploide. A produção de gametas não-reduzidos é uma condição herdada e governada por poucos genes e aumenta com o estresse, o que pode favorecer a formação de poliploides durante mudanças climáticas (Parisod et al. 2010).

A aloploidia é um dos mecanismos mais frequentes de especiação em angiospermas, sendo um dos principais responsáveis pela diversidade deste grupo de plantas, e na sua formação podem estar envolvidos gametas não-reduzidos ou a hibridização pode ser seguida por duplicação somática. A maioria dos eventos ocorre entre espécies filogeneticamente próximas e existem registros de aloploides na maioria das famílias das angiospermas. Estes eventos de aloploidia podem ser extremamente recentes, em alguns casos surgindo nos últimos 150 anos, como observado em *Spartina anglica*, *Senecio cambrensis*, *Cardamine schultzii*, *Tragopogon mirus* e *T. miscellus* (ver referências em Soltis e Soltis 2009). Um dos casos mais conhecidos e estudados é o evento de aloploidização que deu origem ao trigo, *Triticum aestivum*, aproximadamente 8500 anos atrás (Levy e Feldman 2004). O mesmo surgiu a partir da hibridização entre uma espécie tetraploide e uma espécie diploide pertencentes aos gêneros *Triticum* e *Aegilops*, respectivamente (Feldman 2001).

Os casos do trigo, algodão e *Arabidopsis* teriam surgido a partir de um ou poucos eventos de hibridização. No entanto, para a maioria dos casos tem sido demonstrado que os aloploides são formados através de múltiplas origens (Soltis e Soltis 2009) e por cruzamentos recíprocos (diferentes combinações de citoplasma-núcleo, materno e paterno), como nos casos dos gêneros *Tragopogon* e *Brassica* (Chen e Ni 2006). Esta formação recorrente que envolve, em geral, diploides geneticamente distintos, tem como consequência a produção de uma série de populações geneticamente diferentes, e o fluxo gênico entre estas populações independentes pode permitir recombinação e formação de genótipos adicionais (Soltis e Soltis 2000b).

Já os autopoliploides são caracterizados por uma redundância no genoma, pela presença de herança polissômica e pela formação de multivalentes durante a meiose (Ramsey e Shemske 2002). Por essas razões, por muito tempo a autopoliploidia foi considerada como um evento raro e representando um “beco sem saída” na evolução. Além disso, a autopoliploidia é mais difícil de ser detectada pois, em geral, os autopoliploides são morfológicamente similares aos progenitores diploides (Soltis et al. 2009). Entretanto, estudos recentes comprovaram que a frequência dos autopoliploides é maior do que foi considerada (Soltis et al. 2009; Ramsey e Shemske 1998), sugerindo que a simples duplicação do genoma representa uma vantagem evolutiva (Parisod et al. 2010).

Os eventos de poliploidização, tanto aloploidia como autopoliploidia, acarretam frequentemente, como consequência, em incompatibilidades em vários níveis, desde um desenvolvimento anormal e *fitness* reduzido até falhas na reprodução. Todas essas incompatibilidades têm que ser resolvidas no poliploide recente, de maneira a permitir a sua sobrevivência e seu estabelecimento e assegurar o êxito evolutivo a longo prazo (Liu et al. 2009). Os estudos citogenéticos foram os primeiros a mostrar o choque genômico e a instabilidade genômica nos híbridos e poliploides recém formados (ver Gaeta e Pires 2010). Um dos trabalhos pioneiros mostrou que rearranjos genômicos podem ocorrer imediatamente após a duplicação genômica em alotetraplóides sintéticos de *Brassica* (Song et al. 1995). A partir desse trabalho, e baseados em várias técnicas de análise, diversos pesquisadores têm mostrado que as mudanças genéticas e epigenéticas são uma consequência comum do mecanismo de poliploidização, tanto em eventos naturais como em artificiais (Wendel 2000; Doyle et al. 2008; Leitch e Leitch 2008). A resposta a cada evento de poliploidização, entretanto, parece ser diferente entre diferentes organismos e inclusive dentro de um mesmo taxa, podendo ser encontrado desde uma grande reestruturação do genoma até uma estase genômica. Além disso, a resposta pode ser imediata ou ao longo de várias gerações, indicando que não existem regras que possam prever a reação do genoma a esses eventos (Hufton e Panopoulus 2009).

As mudanças no genoma dos poliploides têm sido explicadas por diferentes mecanismos, incluindo recombinação, ativação de elementos transponíveis, defeitos na meiose e mitose, alterações epigenéticas que levam a mudanças nos padrões de expressão, deleção de DNA, entre outros rearranjos cromossômicos (Madlung et al. 2005; Hufton e Panopoulus 2009). Em aloploidias do gênero *Brassica* têm sido observados ganhos e

perdas frequentes de marcadores moleculares nas primeiras gerações logo depois da poliploidização, indicando rearranjos genômicos dramáticos. A maioria dos mesmos parece ser devida à recombinação entre os cromossomos homoeólogos que resulta do pareamento meiótico irregular. No caso do trigo, os mecanismos envolvidos nas mudanças parecem ser diferentes, pois tanto em poliploides naturais como em sintéticos tem sido observada uma perda de DNA entre 5-15% em poucas gerações (Liu et al. 2009; Qi et al. 2010). No caso do milho tem sido observado que aproximadamente a metade dos genes duplicados foram perdidos durante os 11 milhões de anos posteriores ao evento de poliploidia que deu origem ao progenitor dessa espécie (Messing et al. 2004). A eliminação de DNA tem sido observada em outros poliploides como *Spartina* e *Tragopogon* (Tate et al. 2006; Salmon et al. 2005; Lim et al. 2008). Essa perda de DNA estaria relacionada com a manutenção ou estabelecimento de pareamento cromossômico em bivalentes durante a meiose e, portanto, seria mais prevalente nos alopoliploides do que nos autopoliploides (Parisod et al. 2010). No caso de *Arabidopsis* tem sido observada uma perda preferencial de algumas classes de genes. Por exemplo, aqueles genes envolvidos na transcrição e tradução de sinais têm sido mantidos, mas outros, como os relacionados com o reparo do DNA ou proteínas de organelas, têm sido preferencialmente perdidos (Blanc e Wolfe 2004).

Além de rearranjos no genoma, podem ocorrer mudanças epigenéticas nos poliploides, as quais podem contribuir para aumentar a diversidade, plasticidade e heterose (no caso de alopoliploides) e gerar variação, que pode permitir adaptações a novas condições (Comai 2005). As taxas e direção das mudanças genéticas e epigenéticas são influenciadas pelo modo de poliploidização (alopoliploidia ou autopoliploidia) (Beest et al. 2012). As reorganizações epigenéticas e mudanças na expressão dos genes têm sido descritas para vários alopoliploides (Liu e Wendel 2003; Levy e Feldman 2004; Paun et al. 2006), mas não em autopoliploides (Parisod et al. 2009). Os alopoliploides, portanto, parecem precisar de maiores modificações epigenéticas para reestabelecer a compatibilidade entre genomas divergentes (Riesberg 2001). Embora existam muitos exemplos de mudanças logo depois dos eventos de poliploidia, existem outros casos em que tais mudanças não têm sido observadas. Por exemplo, alopoliploides sintéticos de *Gossypium* apresentam aditividade genômica dos parentais e uma estase epigenética, mostrando a diversidade de respostas à poliploidização entre diferentes organismos.

Aparentemente, as reestruturações do genoma de poliploides têm como objetivo a estabilidade do genoma, e este processo é denominado geralmente de diploidização. Este processo inclui todas as respostas à poliploidia, tanto os efeitos genéticos como os epigenéticos, e ocorre diferencialmente em autopoliploides e alopoliploides (Cifuentes et al. 2010). Isso porque, em geral, a duplicação do genoma seria um evento menos radical que a união de dois genomas diferentes (Chen e Ni 2006). Dessa forma, nos alopoliploides formados pela união de genomas mais divergentes, é esperado que ocorram várias das mudanças descritas acima (Doyle et al. 2008).

2.3. Evolução no tamanho do genoma

Cada espécie de planta possui um número específico de pares de bases de DNA em seu núcleo, o qual é referido como conteúdo de DNA nuclear ou tamanho do genoma. O conteúdo de DNA nuclear tanto em animais como em plantas foi durante muito tempo mensurado por meio da microdensitometria de Feulgen e na atualidade por citometria de fluxo. Na primeira, os núcleos, encontrados fixos numa lâmina e corados com o reativo de Schiff, tem seus conteúdos de DNA medidos ao microscópio de luz com base na quantidade de energia absorvida. Ao passo que, na citometria de fluxo, os núcleos se encontram em solução e são corados com diferentes fluorocromos. Neste caso é medida a intensidade da energia emitida quando os fluorocromos são excitados por um laser ou outra fonte de energia. Com o desenvolvimento destas técnicas muito mais rápidas e eficientes, um número cada vez mais alto de medições de conteúdo de DNA, em diferentes organismos, têm sido realizadas e os dados compilados em diferentes bases de dados para plantas (Bennett e Leitch, 2010; <http://data.kew.org/cvalues>) e animais (Gregory et al. 2007; <http://www.genomesize.com>).

Embora o conteúdo de DNA seja praticamente constante dentro de uma espécie (Greilhuber 2005), o mesmo varia em várias ordens de magnitude entre e dentro dos grupos filogenéticos (Narayan 1998). O maior registro entre plantas, e também para todos os eucariotos, é em *Paris japonica* (Melanthiaceae), um octaploide ($2n = 8x = 40$) que apresenta um valor 1C de 152,23 pg (Pellicer et al. 2010). Já o menor conteúdo de DNA nuclear entre plantas pertence à família Lentibulariaceae, *Genlisea margaretae* com um valor 1C de 0,06 pg (Greilhuber et al. 2006; Bennett e Leitch 2011). Apesar desta grande variação, a maioria das plantas apresenta um valor relativo pequeno e só algumas linhagens apresentam tamanhos elevados (Kelly e Leitch 2011). Interessantemente, as espécies com grandes genomas não estão distribuídas de forma uniforme na árvore evolutiva, mas restritas a alguns clados, como

o de Liliales (monocotiledôneas), Santalales (eudicotiledôneas) e Ophioglossales (Pteridófitas), (Leitch et al. 2005; Leitch et al. 2010) indicando que o aumento do genoma representa um evento recorrente e independente na evolução das plantas (Leitch et al. 2005).

As diferenças existentes no conteúdo de DNA entre diferentes grupos de plantas têm começado a ser utilizadas recentemente na sistemática. Embora as espécies de um gênero possam apresentar um mesmo número cromossômico e características cariotípicas, estas podem mostrar grande variação no conteúdo de DNA, podendo a mesma ser efetiva na delimitação infragenérica (Ohri 1998; Zonneveld 2001; Torrell e Vallés 2001; Zonneveld 2008; Hawkins et al. 2008). O tamanho do genoma também está relacionado com várias características fenotípicas e com alguns caracteres relevantes para melhoramento genético ou para estudos ecológicos (Bennett 1998).

Entre as principais causas do aumento no tamanho do genoma em plantas estão os eventos de poliploidização (Bennet e Leitch 2005). Em pteridófitas, por exemplo, a maioria das espécies apresentam grandes conteúdos de DNA, como é o caso de *Ophioglossum petiolatum* com um valor 1C de 65,6 pg e aproximadamente $2n = 960$ (Obermayer et al. 2002). Em outros grupos, entretanto, este aumento do genoma não mostra nenhuma relação direta com a poliploidia, como em *Pinus*, no qual as espécies são todas diploides ($2n = 24$) e o valor 1C pode ser igual e maior a 35 pg (Bennet e Leitch 2011) ou em *Fritillaria japonica*, espécie diploide ($2n = 22$) com $1C = 87,3$ pg (Ambrožová et al. 2011). Estas diferenças entre os tamanhos do genoma e a ausência de relação direta com a complexidade dos organismos foi denominada de paradoxo do valor C (Swift 1950). Atualmente é sabido que variações na fração não-codificante do genoma, tais como sequências satélite e elementos transponíveis, e, sobretudo os retrotransposons são um dos principais fatores envolvidos no paradoxo C (Bennet e Leitch 2005).

Os elementos repetitivos podem alcançar um alto número de cópias nos genomas vegetais, podendo, no caso dos retrotransposons, chegar a constituir mais da metade de um genoma (Bennetzen 2000), variando, por exemplo, entre 14% em mamão (Ming et al. 2008) até > 75% no milho (Baucom et al. 2009).

Em geral, os modelos de dinâmica evolutiva de elementos transponíveis assumem a ocorrência de uma amplificação em massa nas gerações seguintes ao evento de transposição, o qual é seguido pela estabilização no número de cópias quando a transposição replicativa é

equilibrada pela seleção natural contra as inserções (Boutin et al. 2012). Porém, análises de retrotransposons e outros elementos transponíveis em diferentes organismos têm mostrado que a taxa de transposição não é constante (Hawkins et al. 2009). A proliferação seria um processo dinâmico que ocorreria repetidamente e em pouco tempo durante a evolução (Hawkins et al. 2009), com diferentes famílias se alternando em picos de amplificação. O resultado é que as linhagens experimentam ganhos recorrentes de DNA, controlados por vários fatores como modificações nos padrões de metilação e taxas de recombinação, entre outras (Rabinowicz et al. 2003; Tsukahara et al. 2009; Grover e Wendel 2010; Boutin et al. 2012). Estes episódios estariam relacionados com uma resposta a fatores genômicos e ambientais, como eventos de hibridização, poliploidia ou estresse ambiental (Grandbastien 1998; Kashkush et al. 2003; Madlung e Comai 2004; Madlung et al. 2005; Yaakov e Kashkush 2011).

Proliferações recentes de elementos transponíveis têm sido observadas em milho, arroz e algodão. No primeiro caso, os estudos sugerem que o genoma foi duplicado em pouco mais de três milhões de anos devido somente a amplificação de elementos transponíveis (San Miguel et al. 1998). Esse mesmo padrão foi observado em *Oryza australiensis*, o qual experimentou uma duplicação no tamanho do genoma nos últimos dois milhões de anos, devido à rápida proliferação de três tipos de retrotransposons do tipo LTR (Long Terminal Repeat) (Piegu et al. 2006). No caso do algodão, as diferenças genômicas entre espécies distintas de *Gossypium* são devidas principalmente à variação no número de cópias de um retrotransposon tipo Ty3-Gypsy, ocorrida em distintos eventos (Hawkins et al. 2009). Outro exemplo de aumento no tamanho do genoma sem poliploidia é no pimentão, *Capsicum annuum*, que apresenta um elevado tamanho do genoma (2700 Mpb). Neste caso, a expansão está relacionada apenas ao acúmulo de uma única família de elemento repetitivo tipo Ty3 Gypsy (Park et al. 2012).

Nas pesquisas sobre tamanho do genoma em plantas, Bennetzen e Kellog (1997) propuseram que a evolução deste parâmetro seria unidirecional, com genomas pequenos tendendo ao processo de ‘engordamento’ por meio dos processos de poliploidia e amplificação de retrotransposons. Porém, agora é sabido que embora o genoma ancestral fosse provavelmente pequeno, ao longo da evolução das plantas ocorreram diversos eventos não somente de aumento do conteúdo de DNA mas também de redução (Devos et al. 2002; Leitch et al. 2005). Por exemplo, estudos em diferentes espécies de *Gossypium* mostraram que

a taxa de remoção dos elementos transponíveis é suficiente para compensar a proliferação dos mesmos, indicando que a taxa de perda de DNA pode ser extremamente variável dentro de um gênero e que os mecanismos de perda de DNA podem reverter um aumento do genoma. Os mecanismos de diminuição do tamanho do genoma são pouco conhecidos. Tem sido propostos principalmente dois como responsáveis das diminuições observadas, que são a recombinação homóloga desigual e recombinação ilegítima (Bennetzen et al. 2005; Hawkins et al. 2008). Estes mecanismos que permitem a eliminação de DNA, principalmente elementos transponíveis variam entre espécies. Por exemplo, em *Arabidopsis*, a recombinação ilegítima apresenta um maior impacto que a recombinação desigual não-homóloga, enquanto no arroz foi encontrado o contrário (Devos et al. 2002; Ma et al. 2004). Embora a recombinação desigual consiga remover uma quantidade maior de DNA, a recombinação ilegítima apresenta um alcance maior de ação, por não depender de homologia de sequências (Grover e Wendel 2010).

As diferenças encontradas no conteúdo de DNA entre espécies parecem, portanto, responder a um equilíbrio entre o aumento dos elementos transponíveis e a resposta do genoma à eliminação dos mesmos. Algumas espécies possuem uma baixa taxa de deleção dos elementos transponíveis e uma alta proliferação dos mesmos e, portanto, uma tendência a aumentar o tamanho do genoma. As que apresentam genomas pequenos, entretanto, como *Arabidopsis*, *Oryza* e *Gossypium raimondii*, apresentam pouca tolerância à proliferação ou um eficiente mecanismo de eliminação dos elementos transponíveis e por isto apresentam a tendência a diminuir ou manter um pequeno conteúdo de DNA (Grover e Wendel 2010).

2.4. Filogenia molecular, números cromossômicos e conteúdo de DNA nuclear

Recentemente, novas abordagens vêm sendo empregadas em estudos filogenéticos, o que tem permitido analisar e sugerir direções para mudanças cromossômicas. Por meio da combinação de dados cariotípicos e análises moleculares (Bakker et al. 2000; Martel et al. 2004; Enke e Gemeinholzer 2008; Stuessy et al. 2011), os estudos filogenéticos comparativos permitem inferir de maneira mais clara os eventos de hibridização ou mudanças nos números cromossômicos que levam à formação de novas espécies (Murray 2002). Em alguns casos, este tipo de estudo tem revelado tendências de evolução cromossômica não evidenciadas anteriormente. No gênero *Melampodium*, além de características morfológicas consideradas ancestrais, o número básico $x = 10$ era tido como ancestral, uma vez que era encontrado em mais de 50% dos representantes deste grupo (Stuessy 2009). Análises filogenéticas

moleculares, entretanto, permitiram reconstruir o estado cromossômico ancestral (plesiomórfico) e revelaram $x = 11$ como número mais provável, sendo os demais números resultantes de disploidias ascendentes ou descendentes (Blösch et al. 2009). Estas análises combinadas (filogenia molecular + citogenética) têm demonstrado também que as disploidias descendentes são mais frequentes que as ascendentes na maioria dos grupos de plantas analisados, embora, tanto casos de perdas como ganhos cromossômicos tenham ocorrido durante a evolução, como em *Melampodium* (Bakker et al. 2000; Stuessy et al. 2011; Cusimano et al. 2012).

Além dos números cromossômicos básicos ancestrais, as análises filogenéticas podem ser utilizadas para estudar a evolução nos padrões de bandamento cromossômico, bem como do número e distribuição dos sítios de DNA ribossomais 5S e 45S (Murray 2002, Dobigny et al. 2004). Análises filogenéticas no gênero *Clivia* quando combinadas com as informações de distribuição das bandas C permitiram reconhecer que as bandas associadas aos centrômeros de todos os cromossomos são evolutivamente derivadas e de origem recente (Ran et al. 2001). Em outros casos, quando combinadas com as análises de citogenética molecular, permitiram identificar eventos de aloploidização e sugerir possíveis parentais. Mais recentemente, essas análises combinadas com estudos de tamanho do genoma em plantas sugeriram que o tamanho do genoma ancestral em plantas seria pequeno mas tanto ganhos como perdas de DNA ocorreram ao longo da evolução, além de permitir reconhecer a direção das mudanças ocorridas. No caso da família Liliaceae há indícios de que o genoma ancestral fosse pequeno e que este, ao longo de sua evolução, teria sofrido grandes mudanças em alguns dos gêneros, tanto no sentido de aumento quanto a redução do tamanho do genoma (Leitch et al. 2007).

Na maioria das análises, os dados citogenéticos são plotados sobre as árvores filogenéticas (e.g. Peruzzi et al. 2009) ou ainda são analisados por métodos de reconstrução de caracteres ancestrais nos diferentes programas de análise filogenéticas, tais como o MacClade ou Mesquite (Chemisquy et al. 2010). Mais recentemente, análises baseadas em modelos probabilísticos têm permitido testar diferentes hipóteses de evolução cromossômica numa determinada filogenia, possibilitando a reconstrução dos números cromossômicos ancestrais, assim como estimar os eventos de poliploidização e disploidia ocorridos ao longo da evolução das plantas (Mayrose et al. 2010). Nas famílias *Araceae* e *Portulacaceae* (Cusimano et al. 2012; Ocampo e Columbus 2012) estes modelos permitiram propor um número cromossômico básico maior do que esperado no primeiro caso e confirmar um

daqueles anteriormente propostos para a segunda família. Além disso, eventos de poliploidia e dispoloidias foram identificados como recorrentes na evolução cariotípica das mesmas. Embora este método apresente algumas limitações, tais como em casos de múltiplos números cromossômicos para uma mesma espécie, bem como na inferência de eventos de poliploidia ímpar, ele representa uma forma rápida e relativamente simples de analisar números cromossômicos ancestrais e eventos cromossômicos ocorridos durante a evolução de espécies vegetais (ver Guerra 2012).

2.5. Introdução ao grupo de estudo

2.5.1. O gênero *Oxalis* (Oxalidaceae)

A família Oxalidaceae compreende cinco gêneros, *Sarcotheca*, *Dapania*, *Bryophytum*, *Averrhoa* e *Oxalis*, incluindo aproximadamente 950 espécies (Lourteig 1983, APG 2009). Apesar de poucas informações a respeito das relações entre estes gêneros, análises moleculares sugerem *Oxalis* como gênero irmão dos outros quatro (Oberlander et al. 2009). De acordo com o APG III (2009) a família encontra-se no clado da subclasse Eurosids I, constituindo a ordem Oxalidales junto com as famílias Brunelliaceae, Cephalotaceae, Connaraceae, Cunonuaceae e Elaeocarpaceae. Dentre estas famílias a mais próxima à Oxalidaceae é Connaraceae. A ordem Oxalidales apresenta uma alta variação morfológica incluindo árvores, arbustos, lianas, dentre outras. A distribuição da ordem está praticamente restrita ao hemisfério Sul, com um maior número de espécies na América do Sul e Australasia. *Oxalis* é o gênero mais diverso e com o maior número de espécies da família detendo aproximadamente 500 espécies (Knuth 1930; Lourteig 2000). Quase todas as espécies de *Oxalis* recebem o nome comum de azedinhas ou azedeiras pela acidez de toda a planta, devido à alta concentração do ácido oxálico que confere às folhas um aroma e sabor especial. A espécie mais valiosa economicamente dentro do gênero é *Oxalis tuberosa* (oca), cultivada desde a Venezuela até a Argentina e cujos tubérculos constituem fonte de alimento para as populações locais (Emshwiller e Doyle 1998). Outras são utilizadas na medicina popular como antipiréticas, havendo também espécies usadas como plantas ornamentais e na apicultura (Eiten 1963, Lourteig 1983). Há ainda algumas espécies consideradas ervas daninhas, principalmente *O. pes-caprae*, *O. debilis* e *O. corniculata*, as quais apresentam uma distribuição cosmopolita e fácil dispersão.

O gênero *Oxalis* está distribuído por quase todo o mundo, com dois principais centros de distribuição, América do Sul e África, com 280 e 210 espécies, respectivamente (Knuth 1930, Salter 1944, Lourteig 2000). Tanto na América como na África existe um grande número de espécies endêmicas, com distribuições muito restritas, o que faz com que estejam em constante risco de extinção (Emshwiller 2002). O gênero apresenta uma grande variação morfológica e de hábito, encontrando-se espécies anuais a perenes, herbáceas, subarborescentes ou arbustivas, e com diferentes tipos de caule (Lourteig 1983, 2000). A maior variação na morfologia do caule está presente nas espécies da América do Sul, as quais podem apresentar bulbos, tubérculos, rizomas e caules reptantes. Em contraste, todas as espécies da África do Sul são bulbosas perenes, apresentando bulbos do tipo tunicado (tipo cebola), sendo *Oxalis* um dos únicos gêneros dentro das não-monocotiledôneas que apresenta bulbos verdadeiros (Oberlander et al. 2009; Gardner et al. 2012). A maior variação morfológica nas espécies das Américas fez com que Lourteig (2000) e de Azkue (2000) sugerissem que este seria o centro de origem de *Oxalis*, a partir do qual o gênero teria se diversificado. Análises moleculares recentes sugerem a mesma origem que os dados morfológicos (Oberlander et al. 2009; Gardner et al. 2012) e uma radiação monofilética na África do Sul (Oberlander et al. 2004; 2009). Além disso, análises recentes moleculares têm sugerido ao menos para as espécies bulbosas uma origem no sul da América do Sul, na região compreendida por Uruguai, sul do Brasil, leste da Argentina e Paraguai (Gardner et al. 2012).

Outras características morfológicas que distinguem as espécies do gênero são a presença de folhas alternas, sub-opostas ou opostas, com ou sem estípulas, digitadas com três ou mais folíolos. As flores são de tamanho variável, com cinco pétalas, dez estames monoadelfos e unidos na base. O pistilo é único, o ovário súpero, 5-carpelar e 5-locular (Lourteig 2000).

Uma das características compartilhadas por todas as espécies de *Oxalis* é a heterostilia. A heterostilia é um tipo de polimorfismo floral geneticamente controlado e encontrado em aproximadamente 28 famílias de angiospermas. Em geral a heterostilia é interpretada como um mecanismo que promove a polinização cruzada. As espécies com heterostilia apresentam várias formas florais diferenciadas pela altura do estigma e posicionamento das anteras, sendo encontradas em diferentes espécies entre duas e três formas de pistilos (di e trimorfas). Os únicos cruzamentos compatíveis são os que ocorrem entre anteras e estigmas localizados ao mesmo nível, chamados de cruzamentos legítimos. Além da fecundação cruzada promovida

pela heterostilia, também existem registros de espécies autógamas e apomíticas (Eiten 1963; Lovett Dust et al. 1981), mas provavelmente a forma de reprodução mais comum no gênero seja a vegetativa por meio de bulbos, rizomas e tubérculos. As espécies do gênero *Oxalis* se apresentam como tristílicas (brevistilas, mesoestilas e longistilas), ou distílicas e análises moleculares tem sugerido múltiplas transições desde tristilia à distilia (Gardner et al. 2012).

A maioria das análises taxonômicas associa as espécies de *Oxalis* a grupos taxonômicos com base em caracteres morfológicos. Uma das classificações mais completas do século passado é a de Knuth (1930), que dividiu o gênero em 37 seções. Porém, a consistência dessas seções, os limites e a circunscrição desses grupos e a monofilia dos mesmos, foram questionados por trabalhos de diferentes autores que revelaram a artificialidade desses grupos com estudos moleculares, citogenéticos e com novos estudos morfológicos (Salter 1944, Eiten 1963, Lourteig 2000; de Azkue 2000; Emshwiller e Doyle 1998). Entre os trabalhos mais recentes e completos para o gênero são encontrados os de Lourteig (1979, 1982, 1994, 2000). O trabalho mais recente desta autora (Lourteig, 2000) representa o estudo taxonômico mais completo das espécies sul-americanas de *Oxalis*. Nos trabalhos de Lourteig são reconhecidos quatro subgêneros: *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Trifidus* Lourteig, *Thamnoxys* (Endl.) Reiche e *Oxalis* L. Os subgêneros *Monoxalis* e *Trifidus* são constituídos por duas espécies cada, enquanto *Oxalis* possui 204, divididas em 29 seções, e *Thamnoxys* com 71, agrupadas em nove seções. Os subgêneros estão caracterizados pelo número, forma e distribuição dos folíolos na raque (Lourteig 1994, 2000; Abreu 2011). As espécies de folhas digitadas e sem raques pertencem ao subgênero *Oxalis* (Figura 1), os taxa de folhas pinadas e raques presentes foram agrupadas no subgênero *Thamnoxys* (Figura 2), e aquelas com folhas simples foram incluídas nos subgêneros *Monoxalis* e *Trifidus* (Lourteig 1994, 2000). O subgênero *Oxalis* apresenta a maior distribuição geográfica, abrangendo as Américas e África do Sul, seguido pelo subgênero *Thamnoxys*, com espécies presentes na América do Sul e Central (Lourteig 1994). As espécies de *Trifidus* apresentam uma distribuição restrita ao norte do Chile, noroeste da Argentina e Bolívia e em regiões desérticas de mais de 5000 m de altitude. O subgênero *Monoxalis* também apresenta uma distribuição pequena, e as duas espécies podem ser encontradas no sul dos Estados Unidos e México (Lourteig 2000). A maioria dos estudos em *Oxalis* foi realizada nos maiores subgêneros, *Thamnoxys* e *Oxalis*, apesar de alguns estudos restritos à caracterização taxonômica terem sido realizados em *Monoxalis* e *Trifidus*.

2.5.2 Citogenética do grupo

Além da grande variação morfológica apresentada no gênero, intra e interespecífica, as espécies de *Oxalis* possuem uma grande variação citogenética. Apesar de somente 12% das espécies terem sido analisadas citogeneticamente, foi observada uma extensa série de ploides com $n = 5, 6, 7, 8, 9$ e 11 . Além disso, esses estudos mostraram variações não só em número, mas também em tamanho e morfologia cromossômica (Marks 1956, Naranjo et al. 1982; de Azkue e Martínez 1983, 1984, 1988, 1990; de Azkue 2000). A maior variação no número cromossômico básico ocorre nas espécies americanas enquanto que nas espécies africanas $n = 7$ é o número mais comum. As mudanças no número cromossômico básico parecem ter acompanhado a especiação das espécies americanas, resultando em uma maior diversidade e adaptabilidade (de Azkue 2000). O número cromossômico básico ancestral para o gênero ainda não é conhecido, mas foram sugeridos na literatura dois possíveis números: $x = 7$ e $x = 6$. O número cromossômico básico $x = 7$ está presente não somente nas espécies africanas, mas também em alguns grupos americanos, e por isto, esse foi considerado o número básico ancestral para o gênero (Marks 1956). Entretanto, segundo de Azkue (2000), a maior frequência de $x = 7$ não necessariamente indica ancestralidade, já que este número é característico somente das espécies geófitas bulbosas e rizomatosas do subgênero *Oxalis* e é raro fora destes grupos. Ao contrário, $x = 6$ está presente não só em várias seções do subgênero *Oxalis* (p. ex. *Corniculatae*, *Roseae*), como também é o mais frequente entre as espécies do subgênero *Thamnoxys*, aparecendo em várias das seções deste subgênero (*Thamnoxys*, *Robustae*, *Psoraleoideae*, *Polimorphae*). Por esta representação mais ampla no gênero, $x = 6$ poderia ser considerado um estado pleisiomórfico e, por isto, seria o número cromossômico básico ancestral de *Oxalis* (de Azkue 2000). Contudo, a hipótese de que o mesmo número $x = 6$ tenha surgido mais de uma vez durante a evolução do gênero, não pode ser descartada.

A diversidade cariotípica observada entre as espécies de *Oxalis* seria consequência de vários rearranjos cromossômicos ocorridos durante a evolução do gênero. Aneuploidias, fissões, fusões e outros rearranjos cromossômicos têm sido mencionados como possíveis causas da evolução cromossômica do gênero (Marks 1956, de Azkue 2000). A comparação dos números cromossômicos básicos com os agrupamentos morfológicos mostrou que várias espécies pertencentes a diferentes seções compartilham o mesmo número cromossômico básico (de Azkue 2000). No entanto, em alguns casos, também se observa diferenças no

número básico entre espécies pertencentes a um mesmo grupo (de Azkue e Martínez 1983, 1988), mostrando a necessidade de estudos mais detalhados para compreender as relações evolutivas entre e dentro das diferentes seções taxonômicas. A poliploidia parece também ter influenciado a evolução do gênero, uma vez que várias espécies são poliploides, com níveis de ploidia que variam desde diploides até octaploides (Marks 1956, Naranjo et al. 1982; de Azkue e Martínez 1983, 1984, 1988, 1990; de Azkue 2000).

Além dos estudos taxonômicos e citogenéticos, análises envolvendo espécies de *Oxalis* têm mostrado a existência de uma ampla variação no conteúdo de DNA nuclear (valor 2C) que acompanha a variação observada nos tamanhos cromossômicos (de Azkue e Martínez 1984, 1987; Emshwiller 2002). Os valores observados vão desde 0,83 pg na espécie *O. megalorrhiza* do subgênero *Oxalis* até 33 pg em *O. psoraloides* do subgênero *Thamnoxyis*, o que representa uma variação maior que 2000% ou de aproximadamente 40 vezes, no conteúdo de DNA nuclear no gênero, sendo uma das maiores diferenças intragenéricas conhecidas para angiospermas. De Azkue e Martínez (1983) sugeriram que estas grandes diferenças no conteúdo de DNA entre as espécies de *Oxalis* estariam relacionadas com as variações em morfologia e número cromossômico encontradas. Essas diferenças seriam devidas ao acúmulo diferencial de cromatina nos braços cromossômicos (de Azkue e Martinez 1987).

2.5.3. Estudos filogenéticos no gênero *Oxalis*

Atualmente, a revisão taxonômica de Lourteig (2000) é a mais utilizada para as espécies americanas. Embora o trabalho de Lourteig (2000) tenha melhor estruturado a taxonomia de *Oxalis*, e várias das seções taxonômicas reconhecidas pela autora parecem grupos naturais, análises moleculares recentes tem sugerido que várias das mesmas precisam de uma nova revisão taxonômica. No caso das espécies da África do Sul, poucas informações taxonômicas têm sido obtidas desde as revisões de Knuth (1930) e Salter (1944), sendo esta última a mais utilizada. Porém, assim como as espécies americanas, análises moleculares (Oberlander et al. 2011) têm mostrado que a grande maioria dos agrupamentos reconhecidos por Salter (1944) são artificiais. A delimitação intragenérica e interespecífica é complexa no gênero devido principalmente a três fatores: grande variação morfológica, alta plasticidade fenotípica e existência de hibridações interespecíficas (Emshwiller e Doyle 2002).

As análises filogenéticas moleculares no gênero *Oxalis* são relativamente recentes e estão baseadas essencialmente no estudo de sequências não codificantes de DNA plastidial e

de ITS nuclear, além de um gene de cópia única nuclear que codifica a enzima de expressão plastidial glutamina sintetase (ncpGS). Dentre as regiões plastidiais, têm sido analisados o intron *trnL* e as regiões espaçadores *trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *psbJ-petA*, *trnS-trnG* e *trnT-trnL* (Emshwiller e Doyle 1998, 2002; Oberlander et al. 2004, 2009; Gardner et al. 2012; Heibl e Renner 2012). Os maiores problemas encontrados nas análises moleculares de *Oxalis*, são a presença de híbridos interespecíficos e de poliploides e a adaptação radiativa observada em algumas das seções taxonômicas estudadas (Oberlander et al. 2004; Heibl 2005; Oberlander et al. 2009). Isto pode dificultar a delimitação das espécies e o estabelecimento das relações evolutivas baseadas somente em sequências de DNA (Baum 2007).

A maioria dos estudos filogenéticos no gênero estão focados em grupos de espécies ou seções específicas, por exemplo, aquelas relacionadas com *O. tuberosa* (oca) e distribuídas nos Andes centrais (Emshwiller e Doyle 1998, 2002). Os trabalhos nas espécies relacionadas com a oca tinham como objetivo estabelecer as relações filogenéticas entre a mesma com várias espécies relacionadas morfologicamente, citogeneticamente e com distribuição geográfica similar. Os trabalhos mais extensos em filogenia molecular no gênero são os de Oberlander et al. (2004, 2009, 2011), os quais contribuíram para o entendimento da evolução nas distintas formas de geofitismo no gênero e as relações filogenéticas entre as espécies sul-africanas. Nesses trabalhos, além da maioria das espécies africanas, foram incluídas algumas espécies da América do Sul pertencentes a diferentes seções e subgêneros descritos por Lourteig (2000). Mais recentemente foi publicado um trabalho no qual os eventos de especiação das espécies chilenas de *Oxalis* foram datados e caracterizados (Heibl e Renner 2012).

Embora até o momento as análises filogenéticas estejam restritas a grupos específicos, a filogenia molecular para todo o gênero *Oxalis* está sendo construída por colaboradores de distintos grupos de pesquisa. O trabalho mais recente publicado em colaboração incluiu espécies bulbosas das Américas, do subgênero *Oxalis*, visando determinar as relações filogenéticas, local de origem e dispersão das mesmas, assim como analisar a origem da heterostilia (Gardner et al. 2012). Resultados preliminares para a filogenia de todo o gênero (Emshwiller et al. 2009; Gardner et al. 2011) têm mostrado que as primeiras espécies a divergirem teriam sido as arbustivas do subgênero *Thamnoxys* e que dentro do subgênero *Oxalis* as mais basais seriam as espécies rasteiras da seção *Corniculatae*. No entanto, os estudos combinando dados moleculares e citogenéticos que permitam determinar a relação

entre as grandes variações cromossômicas e a diversidade taxonômica não foram ainda realizados.

Este trabalho teve por objetivo analisar as relações filogenéticas e de evolução cromossômica em espécies pertencentes a diferentes seções dos subgêneros *Oxalis* e *Thamnoxys* do gênero *Oxalis* (Oxalidaceae), assim como contribuir para o melhor entendimento da taxonomia das mesmas. Foram analisadas as seções *Corniculatae*, *Ripariae* e *Articulatae* do subgênero *Oxalis* e várias seções do subgênero *Thamnoxys*, todas as quais apresentam grandes variações cromossômicas e relações filogenéticas ainda não estudadas.

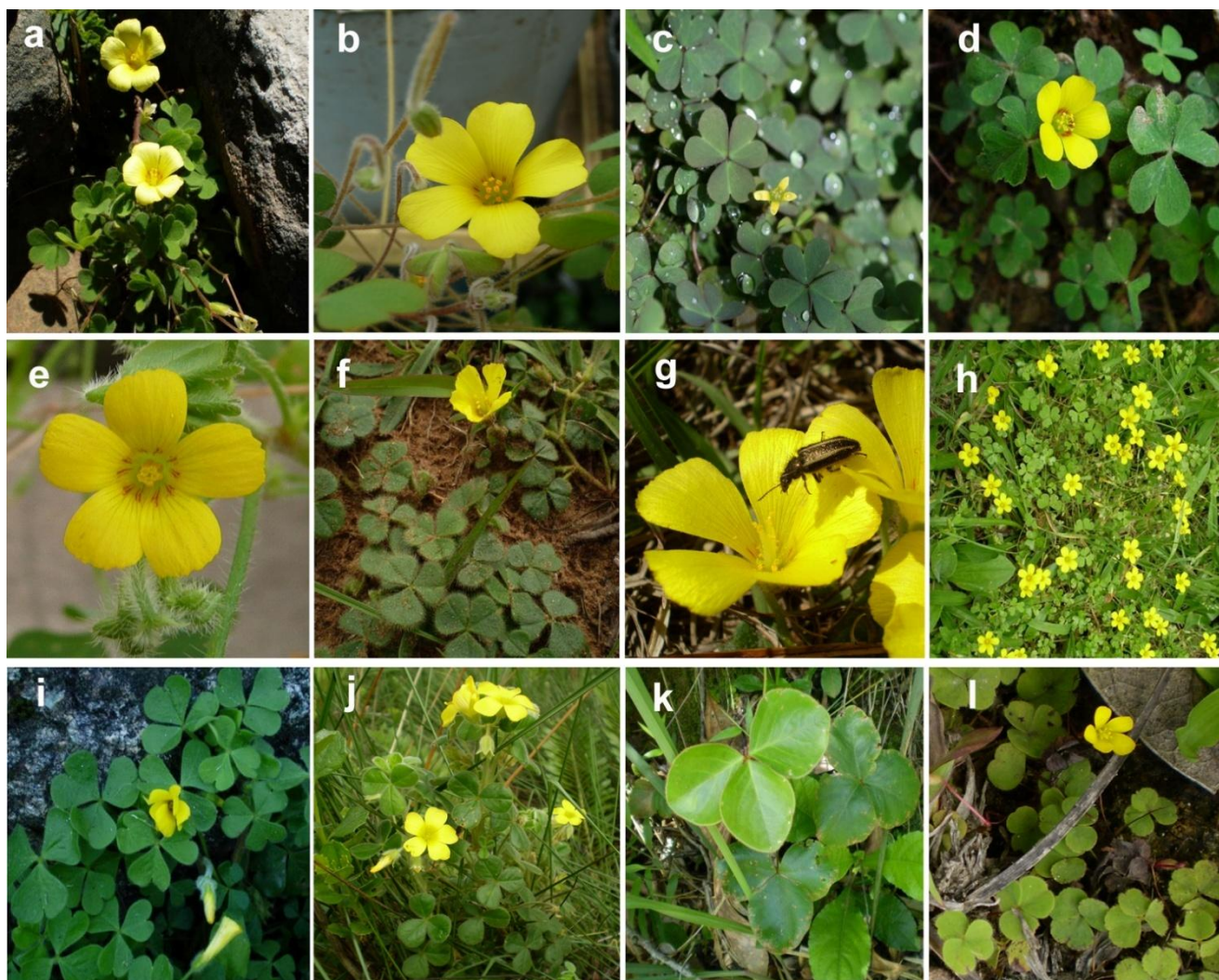


Figura 1. Espécies das seções *Corniculatae* (C) e *Ripariae* (R) do subgênero *Oxalis*. **a-b.** *O. conorrhiza* (C); **c.** *O. corniculata* var. *atropurpurea* (C); **d.** *O. tenerrima* (C); **e.** *O. paludosa* (C); **f-g.** *O. eriocarpa* (C); **h.** *O. niederleinii* (C); **i.** *O. refrata* (C); **j.** *O. paranaensis* (R); **k.** *O. sarmentosa* (R); **l.** *O. serpens* (R).

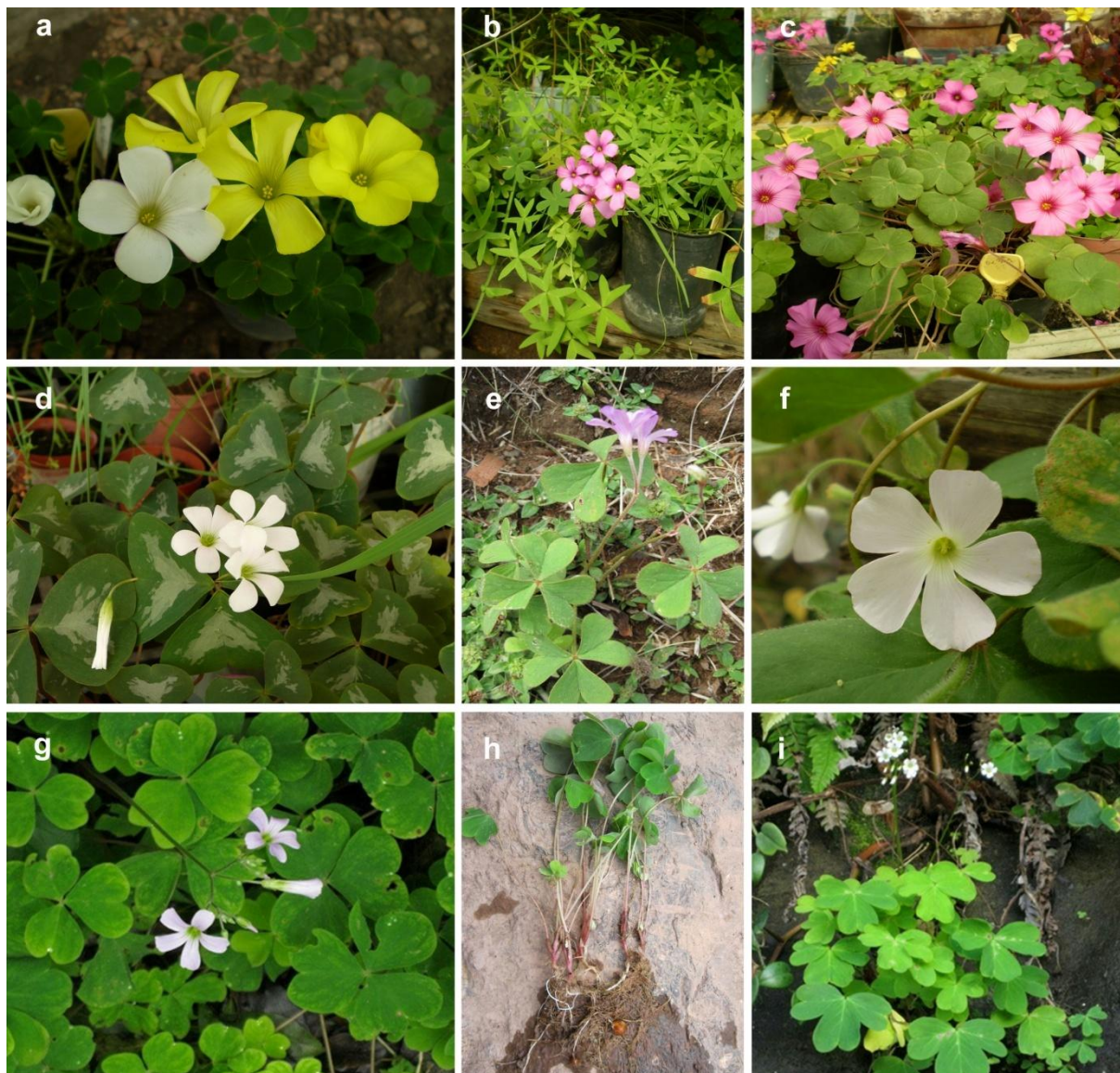


Figura 2. Espécies das seções *Ionoxalis* (I), *Pseudobulbosae* (P) e *Articulatae* (A) do subgênero *Oxalis*. **a.** *O. sellowiana* e *O. sellowiana* var. *alba* (I); **b.** *O. bipartita* (I); **d.** *O. brasiliensis* (I); **d.** *O. triangularis* (P); **e.** *O. floribunda* (A); **f.** *O. floribunda* ssp. *ostenii* (A); **g-h.** *O. linarantha* (A); **i.** *O. geralensis* (P).



Figura 3. Espécies das seções *Polymorphae* (Ph), *Psoraleoidae* (P), *Thamnoxys* (T) e *Pleiocarpae* (Pl) do subgênero *Thamnoxys*. **a-b.** *O. umbraticola* (Ph); **c.** *O. neuweidii* (Ph); **d.** *O. psoraleoides* (P); **e.** *O. alstonii* (Ph) abaixo e *O. frutescens* (T) acima; **f.** *O. cratensis* (T); **g-h.** *O. cytisoides* (T); **i.** *O. glaucescens* (Pl).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu MC. 2011.** Sistemática de *Oxalis sect. Thamnoxys* (Endl.) Progel no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Brasil. 151 pp.
- Adams KL, Wendel JF. 2005.** Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion on Plant Biology* 8: 135-141.
- Álvarez I, Wendel JF. 2003.** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 417-434.
- Ambrožová K, Mandáková T, Bureš P, Neumann P, Leitch IJ, Koblížová A, Macas J, Lysák MA. 2011.** Diverse retrotransposon families and an AT-rich satellite DNA revealed in giant genomes of *Fritillaria* lilies. *Annals of Botany* 107: 255–268.
- Angiosperm Phylogeny Website.** APG. Version 9, June 2009. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Archibald JK, Mort ME, Crawford DJ. 2003.** Bayesian inference of phylogeny: a non-technical primer. *Taxon* 52: 187-191.
- Bailey CD, Doyle JJ. 1999.** Potential Phylogenetic Utility of the Low-Copy Nuclear Gene *pistillata* in Dicotyledonous Plants: Comparison to nrDNA ITS and *trnL* Intron in *Sphaerocardamum* and Other Brassicaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 20-30.
- Bailey CD, Koch MA, Mayer M, Mummenhoff K, O’Kane Jr S, Warwick S, Windham M, Al-Shehbaz I. 2006.** Toward a global phylogeny of the Brassicaceae. *Molecular Biology and Evolution* 23:2142–2160.
- Bakker FT, Culham A, Pankhurst CE, Gibby M. 2000.** Mitochondrial and chloroplast DNA-based phylogeny of *Pelargonium* (Geraniaceae). *American Journal of Botany* 87: 727-734.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. 1995.** The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82: 247–277.
- Barker MS, Vogel H, Schranz ME. 2009.** Paleopolyploidy in the Brassicales: Analyses of the *Cleome* Transcriptome Elucidate the History of Genome Duplications in *Arabidopsis* and Other Brassicales. *Genome Biology and Evolution* 1: 391-399.

- Baucom RS, Estill JC, Chaparro C, Upshaw N, Jogi A, Deragon JM, Westerman RP, Sanmiguel PJ, Bennetzen JL. 2009.** Exceptional diversity, non-random distribution, and rapid evolution of retroelements in the B73 maize genome. *PLoS Genet.* 5, e1000732.
- Baum DA. 2007.** Concordance trees, concordance factors, and the exploration of reticulate genealogy. *Taxon* 56: 417-426.
- Baumel A, Ainouche ML, Bayer RJ, Ainouche AK, Misset MT. 2002.** Molecular phylogeny of hybridizing species from the genus *Spartina* Schreb. (Poaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 303–314.
- Beckert S, Muhle H, Pruchner D, Knoop V. 2001.** The mitochondrial *nad2* gene as a novel marker locus for phylogenetic analysis of early land plants: a comparative analysis in mosses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18:117–126.
- Beest Mt, Le Roux JJ, Richardson DM, Brysting AK, Suda J, Kubesova M, Pysek P. 2012.** The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany* 109: 19-45.
- Bennett MD. 1998.** Plant genome values: How much do we know? *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 2011-2016.
- Bennett MD, Leitch IJ. 2005.** Nuclear DNA amounts in Angiosperms: progress, problems and prospects. *Annals of Botany* 95: 45-90.
- Bennett MD, Leitch IJ. 2011.** Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Annals of Botany* 107: 467-590.
- Bennetzen JL. 2000.** Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology* 42: 251–269.
- Bennetzen JL, Ma J, Devos KM. 2005.** Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Annals of Botany* 95:127-132.
- Bennetzen JL, Kellogg KA. 1997.** Do plants have a one-way ticket to genomic obesity? *The Plant Cell* 9: 1509–1514.
- Blanc G, Wolfe KH. 2004.** Functional divergence of duplicated genes by polyploidy during *Arabidopsis* evolution. *The Plant Cell* 16: 1679-1691.

- Blösch C, Weiss-Schneeweiss H, Schneeweiss GM, Barfuss MHJ, Rebernig CA, Villaseñor JL, Stuessy TF. 2009.** Molecular phylogenetic analyses of nuclear and plastid DNA sequences support dysploid and polyploid chromosome number changes and reticulate evolution in the diversification of *Melampodium* (Millerieae, Asteraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 220-33.
- Borsch T, Quandt D. 2009.** Mutational dynamics and phylogenetic utility of noncoding chloroplast DNA. *Plant Systematic and Evolution* 282: 169-199.
- Bos DH, Posada D. 2005.** Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. *Developmental and Comparative Immunology* 29: 211-227.
- Boutin TS, Le Rouzic A, Capy P. 2012.** How does selfing affect the dynamics of selfish transposable elements? *Mobile DNA Journal* 3:5 doi:10.1186/1759-8753-3-5.
- Calonje M, Martín-Bravo S, Dobes C, Gong W, Jordon-Thaden I, Kiefer C, Kiefer M, Paule J, Schmickl R, Koch MA. 2009.** Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction. *Plant Systematics and Evolution* 282: 257-280.
- Carputo D, Frusciante L, Peloquin SJ. 2003.** The Role of 2n Gametes and Endosperm Balance Number in the Origin and Evolution of Polyploids in the Tuber-Bearing Solanums. *Genetics* 163: 287-294.
- Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N, Savolainen V. 2005.** Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transaction Society of Botany* 360: 1889-1895.
- Chase MW et al. 1993.** Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri botanical garden* 80: 528-580.
- Chemisquy MA, Giussani LM, Scatagliini MA, Kellogg EA, Morrone O. 2010.** Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combinations in *Cenchrus*. *Annals of Botany* 106: 107–130
- Chen ZJ, Ni Z. 2006.** Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *Bioessays* 28: 240-252.
- Chiu WL, Stubbe W, Sears BB. 1988.** Plastid inheritance in *Oenothera*: organelle genome modifies the extent of biparental transmission. *Current Genetics* 13: 181–189.

- Christelová P, Valárik M, Hnbova E, De Langhe E, Dolezel J. 2011.** A multi gene sequence-based phylogeny of the Musaceae (banana) family. *BMC Evolutionary Biology*. 11: 103.
- Cifuentes M, Grandont L, Moore G, Chevre AM, Jenczewski E. 2010.** Genetic regulation of meiosis in polyploid species: new insights into an old question. *New Phytologist* 186: 39-36.
- Clarkson JJ, Knapp S, Garcia VF, Olmstead RG, Leitch AR, Chase MW. 2004.** Phylogenetic relationships in *Nicotiana* (Solanaceae) inferred from multiple plastid DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 75-90.
- Cohen JI, Davis JI. 2012.** Molecular Phylogenetics, Molecular Evolution, and Patterns of Clade Support in *Lithospermum* (Boraginaceae) and Related Taxa. *Systematic Botany* 37: 490-506.
- Comai L. 2005.** The advantages and disadvantages of being a polyploidy. *Nature Review Genetics* 6: 836-846.
- Cui L, Wall K, Leebens-Mack JH, Lindsay BG, Soltis DE, Doyle JJ, Soltis PS, Carlson JE, Arumuganathan K, Barakat A, Albert VA, Ma H, dePamphilis CW. 2006.** Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research* 16: 738-749.
- Cusimano N, Sousa A, Renner SS. 2012.** Maximum likelihood inference implies a high, not low, ancestral haploid chromosome number in Araceae, with a critique of the bias introduced by "x". *Annals of Botany* 109: 681-692.
- de Azkue D. 2000.** Chromosome diversity of South American *Oxalis* (Oxalidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 132: 143–152.
- de Azkue D, Martínez A. 1983.** The chromosome complements of shrubby *Oxalis* species from South America. *Plant Systematics and Evolution* 141: 187–197.
- de Azkue D, Martínez A. 1984.** Variación del cariotipo, volumen nuclear y contenido de ADN en siete especies de *Oxalis*. *Darwiniana* 25: 267–277.
- de Azkue D, Martínez A. 1988.** DNA content and chromosome evolution in the shrubby *Oxalis*. *Genome* 30: 52–57.

- de Azkue D, Martínez A. 1990.** Chromosome numbers of the *Oxalis tuberosa* alliance (Oxalidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 169: 25–29.
- Degnan JH, Rosenberg NA. 2009.** Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 332-340.
- Delsuc F, Brinkmann H, Philippe H. 2005.** Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nature Review Genetics* 6: 361- 375.
- Devos KM, Brown JKM, Bennetzen JL. 2002.** Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*. *Genome Research* 12: 1075-1079.
- Dobigny G, Ducroz J, Robinson T, Volobouev V. 2004.** Cytogenetics and cladistics. *Systematic Biology* 53: 470-484.
- Doyle JJ, Flagel LE, Paterson AH, Rapp RA, Soltis DE, Soltis PS, Wendel JF. 2008.** Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annual Review Genetics* 42: 443-461.
- Drew BT, Sytsma KJ. 2012.** Phylogenetics, biogeography, and staminal evolution in the tribe Mentheae (Lamiaceae). *American Journal of Botany* 99: 933-953.
- Eisen JA, 1998.** Phylogenomics: improving functional predictions for uncharacterized genes by evolutionary analysis. *Genome research* 8: 163-167.
- Eiten G. 1963.** Taxonomy and regional variation of *Oxalis* section *Corniculatae*. I. Introduction, Keys, and Synopsis of the Species. *The American Midland Naturalist* 69: 257-309.
- Emshwiller E. 2002.** Biogeography of the *Oxalis tuberosa* Alliance. *The Botanical Review* 68 (1): 128.152.
- Emshwiller E, Doyle JJ. 1998.** Origins of domestication and polyploidy in oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae): NRDNA ITS data. *American Journal of Botany* 85 (7): 975–985.
- Emshwiller E, Doyle JJ. 2002.** Origins of domestication and polyploidy in Oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae). 2. Chloroplast expressed glutamine synthetase data. *American Journal of Botany* 89: 1042-1056.

- Emshwiller E, Gardner A, Oberlander KC, Vaio M, Heibl C, Dreyer L. 2009.** Phylogeny and biogeography of *Oxalis*: preliminary results based on plastid loci. In: *Botany and Mycology Congress*, Snowbird Utah, USA.
- Enke N, Gemeinholzer B. 2008:** Babcock revisited: New insights into generic delimitation and character evolution in *Crepis* L. (Compositae: Cichorieae) from ITS and matK sequence data. *Taxon* 57: 1-12.
- Fawcett JA, Maere S, Van de Peer Y. 2009.** Plants with doublé genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 106: 5737-5742.
- Feldman M. 2001.** The origin of cultivated wheat. in *The World Wheat Book*. eds Bonjean A, Angus W (Lavoisier Publishing, Paris)
- Felsenstein J. 1981.** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.
- Fitch WM. 1971.** Toward defining the course of evolution: minimum change for specific tree topology. *Systematic Zoology*. 20: 406-416.
- Gaeta RT, Pires JC. 2010.** Homoeologous recombination in allopolyploids: the polyploid ratchet. *New Phytologist* 186: 18-28.
- Gardner A, Emshwiller E, Vaio M, Guerra M, Oberlander K, Dreyer L, Heibl C. 2011.** From woody shrubs to weedy, succulent, and bulb-bearing herbs: an updated phylogeny for *Oxalis*. *Botany Congress*, 9-13 July, St. Louis, Missouri, USA.
- Gardner A, Vaio M, Guerra M, Emshwiller E. 2012.** Diversification of the American bulb-bearing *Oxalis* (Oxalidaceae): Dispersal to North America and modification of the tristylous breeding system. *American Journal of Botany* 99:152-164.
- Grandbastien MA. 1998.** Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends in Plant Science* 3: 181-187.
- Gregory TR, Nicol JA, Tamm H, Kullman B, Kullman B, Leitch IJ, Murray BG, Kapraun DF, Greilhuber J, Bennett MD. 2007.** Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Research*. 35: D332-D338.
- Greilhuber J. 2005.** Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Annals of Botany* 95: 91–98.

- Greilhuber J, Borsch T, Muller K, Worberg A, Porembski S, Barthlott W. 2006.** Smallest Angiosperm Genomes Found in Lentibulariaceae, with Chromosomes of Bacterial Size. *Plant Biology* 8: 770-777.
- Grover CE, Wendel JF. 2010.** Recent insights into the mechanisms of genome size change in plants. *Journal of Botany* Volume 2010, Article ID 382732 doi:10.1155/2010/382732.
- Guerra M. 1986.** Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. *Revista Brasileira de Genetica* IX 4: 741-743.
- Guerra M. 2000.** Chromosome number variation and evolution in monocots, in Wilson KL, Morrison DA (eds): *Monocots: Systematics and Evolution*, pp 127–136 (CSIRO, Melbourne).
- Guerra M. 2008.** Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenetics and Genome Research* 120: 339-350.
- Guerra M. 2012.** Cytotaxonomy: The end of childhood. *Plant Biosystems*. 146: 703-710.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova MA, Hordijk W, Gascuel O. 2010.** New Algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59: 307-321.
- Hansen AK, Escobar LK, Gilbert LE, Jansen RK. 2007.** Paternal, maternal, and biparental inheritance of the chloroplast genome in *Passiflora* (Passifloraceae): implications for phylogenetic studies. *American Journal of Botany* 94: 42-46.
- Hanson RE, Islam-Faridi MN, Percival EA, Crane CF, Ji Y, McKnight TD, Stelly DM, Price HJ. 1996.** Distribution of 5S and 18S–28S rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* 105:55–61.
- Havananda T, Brummer EC, Maureira-Butler IJ, Doyle JJ. 2010.** Relationships among diploid members of the *Medicago sativa* (Fabaceae) species complex based on chloroplast and mitochondrial DNA sequences. *Systematic Botany* 35: 140-150.
- Hawkins JS, Grover CE, Wendel JF. 2008.** Repeated big bangs and the expanding universe: Directionality in plant genome size evolution. *Plant Science* 174: 557-562.

- Hawkins JS, Proulx SR, Rapp RA, Wendel JF. 2009.** Rapid DNA loss as a counterbalance to genome expansion through retrotransposon proliferation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 17811-17816.
- Heibl C. 2005.** Studies on the systematics, evolution, and biogeography of *Oxalis* sections *Caesia*, *Carnosae*, and *Giganteae*, endemic to the Atacama Desert of northern Chile. Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie. Universität München. 110p.
- Heibl C, Renner S. 2012.** Distribution models and a dated phylogeny for Chilean *Oxalis* species reveal occupation of new habitats by different lineages, not rapid adaptive radiation. *Systematic Biology* 61: 823-834.
- Henning W. 1966.** Phylogenetic systematics. Urbana: University of Illinois Press.
- Helfgott M, Mason-Gamer RJ. 2004.** The Evolution of North American *Elymus* (Triticeae, Poaceae) Allotetraploids: Evidence from Phosphoenolpyruvate Carboxylase Gene Sequences. *Systematic Botany* 29: 850-861.
- Holder M, Lewis PO. 2003.** Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. *Nature Review Genetics* 4: 275-284.
- Huften AL, Panopoulou G. 2009.** Polyploidy and genome restructuring: a variety of outcomes. *Current Opinion in Genetics and Development* 19: 600-606.
- Hughes CE, Eastwood RJ, Bailey DC. 2006.** From famine to feast? Selecting nuclear DNA sequence loci for plant species-level phylogeny reconstruction. *Philosophical Transaction of Royal Society of Botany* 361: 211-225.
- Ilut DC, Doyle JJ. 2012.** Selecting Nuclear Sequences for Fine Detail Molecular Phylogenetic Studies in Plants: A Computational Approach and Sequence Repository. *Systematic Botany* 37: 7-14.
- Jansen RK, Palmer JD. 1987.** A chloroplast inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Science USA* 84: 5818-5822.
- Jones K. 1998.** Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution in higher plants. *Botanical Review* 64: 273-289.
- Jukes TH, Cantor RC. 1969.** in *Mammalian Protein Metabolism* (ed. Munro HN) 21-23 Academic Press, New York.

- Kashkush K, Feldman M, Levy A. 2003.** Transcriptional activation of retrotransposons alters the expression of adjacent genes in wheat. *Nature Genetics* 33: 102–106.
- Kelly LJ, Leitch IJ. 2011.** Exploring giant plant genomes with next-generation sequencing technology. *Chromosome Research* 19: 939-953.
- Kimura MA. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Knuth R. 1930.** Oxalidaceae. In ENGLER, A., (Ed): *Das Pflanzenreich* 4, pp. 130- 131. Berlin- Leipzig: W. Engelmann.
- Kolaczkowski B, Thornton JW. 2009.** Long-Branch Attraction Bias and Inconsistency in Bayesian Phylogenetics. *PLoS ONE* 4 (12): e7891.
- Kumagai M, Wang L, Ueda S. 2010.** Genetic diversity and evolutionary relationships in genus *Oryza* revealed by using highly variable regions of chloroplast DNA. *Gene* 462: 44-51.
- Lai Z, Nakazato T, Salmaso M, Burke JM, Tang S, Knapp SJ, Riesberg LH. 2005.** Extensive chromosomal repatterning and the evolution of sterility barriers in hybrid sunflower species. *Genetics* 171: 291-303.
- Lanave C, Preparata G, Saccone C, Serio G. 1984.** A new method for calculating evolutionary substitution rates. *Journal of Molecular Evolution* 20: 86–93.
- Langlet O. 1927.** Beitrage zur Zytologie der Ranunculaceen. *Svensk Botanisk Tidskrift* 21: 1–17.
- Larget B, Simon DL. 1999.** Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 16: 750-759.
- Lee DJ, Blake TK, Smith SE. 1988.** Biparental inheritance of chloroplast DNA and the existence of heteroplasmic cells in alfalfa. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 545–549.
- Leitch IJ, Beaulieu JM, Chase MW, Leitch AR, Bennett MD. 2010.** Genome size dynamics and evolution in monocots. *Journal of Botany* doi:10.1155/2010/862516.
- Leitch IJ, Beaulieu JM, Cheung K, Hanson L, Lysak MA, Fay MF. 2007.** Punctuated genome size evolution in Liliaceae. *Journal of Evolutionary Biology*. 20: 2296-2308.

- Leitch AR, Leitch IJ. 2008.** Genomic plasticity and the diversity of polyploidy plants. *Science* 320: 481-483.
- Leitch IJ, Soltis DE, Soltis PS, Bennett MD. 2005.** Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). *Annals of Botany* 95: 207-217.
- Levin DA. 2002.** The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford series in Ecology and Evolution. Ed. PH Harvey & RM May. New York. 228 p.
- Levy AA, Feldman M. 2004.** Genetic and epigenetic reprogramming of the wheat genome upon allopolyploidization. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 607-613.
- Lewis PO. 2001.** Phylogenetic systematics turns over a new leaf. *TRENDS in Ecology and Evolution* 16: 30-37.
- Lewis CE, Doyle JJ. 2001.** Phylogenetic Utility of the Nuclear Gene Malate Synthase in the Palm Family (Arecaceae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 19: 409-420.
- Lim KY, Soltis DE, Soltis PS, Tate J, Matyasek R, Srubarova H, Kovarik A, Pires JC, Xiong Z, Leitch AR. 2008.** Rapid chromosome evolution in recently formed polyploids in *Tragopogon* (Asteraceae). *PLoS ONE*. 3: 10: e3353.
- Liu B, Wendel JF. 2003.** Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 365-379.
- Liu B, Xu C, Zhao N, Qi B, Kimatu JN, Pang J, Han F. 2009.** Rapid genomic changes in polyploid wheat and related species: implications for genome evolution and genetic improvement. *Journal of Genetics and Genomics*. 36: 519-528.
- Lourteig A. 1979.** Oxalidaceae section extra-austroamericanae 2. *Oxalis* section *Corniculatae*. *Phytologia*. 42: 57–198.
- Lourteig A. 1982.** Oxalidaceae extra-austroamericanae IV: *Oxalis* L. sectio *Articulatae* Knuth *Phytologia* 30: 130-142.
- Lourteig A. 1983.** Oxalidaceae. In: Reitz R, ed. *Flora Illustrada Caterinense*, 3–174.
- Lourteig A. 1994.** *Oxalis* L. subgénero *Thamnoxys* (Endl.) Reiche emend. Lourteig. *Bradea*. 7, 1-199.
- Lourteig A. 2000.** *Oxalis* L. Subgénero *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Oxalis* y *Trifidus* Lourteig. *Bradea* 7: 201-629.

- Lovett Doust L, Lovett Doust J, Cavers PB. 1981.** Fertility relationships in closely related taxa of *Oxalis*, section Corniculatae. *Canadian Journal of Botany* 59: 2603- 2609.
- Luo MC et al. 2009.** Genome comparisons reveal a dominant mechanism of chromosome number reduction in grasses and accelerated genome evolution in Triticeae. *Proceedings of the Academy of Science USA* 106: 15780-15785.
- Lysak Ma, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, McBreen K, Schubert I. 2006.** Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proceedings in the National Academy of Science* 103: 5224-5229.
- Ma J, Devos KM, Bennetzen JL. 2004.** Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. *Genome Research* 14: 860–869.
- Madlung A, Comai L. 2004.** The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of Botany* 94: 481-495.
- Madlung A, Tyagi AP, Watson B, Jiang H, Kagochi T, Doerge R, Martienssen R, Comai L. 2005.** Genomic changes in synthetic *Arabidopsis* polyploids. *The Plant Journal* 41: 221-230.
- Mandáková T, Lysak MA. 2008.** Chromosomal Phylogeny and Karyotype Evolution in $x=7$ Crucifer Species (Brassicaceae). *The Plant Cell* 20: 2559-2570.
- Marks GE. 1956.** Chromosome numbers in the genus *Oxalis*. *New Phytologist*. 55: 120–129.
- Martel E, Poncet V, Lamy F, Siljak-Yakolev S, Lejeune B, Sarr A. 2004.** Chromosome evolution of *Pennisetum* species (Poaceae): implications of ITS phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* 249: 139-149.
- Masterson J. 1994.** Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264:421–423.
- Mayrose I, Barker MS, Otto SP. 2010.** Probabilistic Models of Chromosome number evolution and the inference of polyploidy. *Systematic Biology* 59: 132-144.
- Messing J, Bharti AK, Karlowski WM, Gundlach H, Kim HR, Yu Y, et al. 2004.** Sequence composition and genome organization of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101:14349-14354

- Metzlaff MT, Boerner T, Hagemann R. 1981.** Variations of chloroplast DNA in the genus *Pelargonium* and their biparental inheritance. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 37–41.
- Ming et al. 2008.** The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature* 42: 993-997.
- Mort ME, Archibald JK, Randle CP, Levens ND, O'leary TR, Topalov K, Wiegand CM, Crawford DJ. 2007.** Inferring phylogeny at low taxonomic levels: utility of rapidly evolving cpDNA and nuclear ITS loci. *American Journal of Botany* 94: 173-183.
- Mort ME, Crawford DJ. 2004.** The continuing search: low-copy nuclear sequences for lower-level plant molecular phylogenetic studies. *Taxon* 53: 257-261.
- Murray BG. 2002.** Trees, maps and FISH: the application of genome based technologies to the analysis of chromosome evolution. *Current Genomics* 3: 539-550.
- Naranjo CA, Mola LM, Poggio L, Múlgura M. 1982..** Estudios citotaxonómicos y evolutivos de *Oxalis* (Oxalidaceae) I. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 20: 183–200.
- Narayan RKJ. 1998.** The role of Genomic Constraints upon Evolutionary Changes in Genome Size and Chromosome Organization. *Annals of Botany* 82(suppA): 57-66.
- Nieto Feliner G, Rosselló JA. 2007.** Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 911-919.
- Oberlander KC, Emshwiller E, Bellstedt DU, Dreyer LL. 2009.** A model of bulb evolution in the eudicot genus *Oxalis* (Oxalidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 54-63.
- Oberlander KC, Dreyer LL, Bellstedt DU. 2011.** Molecular phylogenetics and origins of southern African *Oxalis*. *Taxon* 60: 1667-1677.
- Oberlander KC, Dreyer LL, Bellstedt DU, Reeves G. 2004.** Systematic relationships in southern African *Oxalis* L. (Oxalidaceae): Congruence between palynological and plastid *trnL* - F evidence. *Taxon* 53: 977-985.

- Obermayer R, Leitch IJ, Hanson L, Bennett MD. 2002.** Nuclear DNA C-values in 30 species double the familial representation in pteridophytes. *Annals of Botany* 90: 209-217.
- Ocampo G, Columbus JT. 2012.** Molecular phylogenetics, historical biogeography, and chromosome number evolution of *Portulaca* (Portulacaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63: 97-112.
- Ohri D. 1998.** Genome size variation and plant systematic. *Annals of Botany* 82 (supp. A): 75-83.
- Olmstead RG, Sweere JA. 1994.** Combining data in phylogenetic systematic: and empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. *Systematic Biology* 43: 467-481.
- Palmer JD, Adams KL, Cho Y, Parkinson CL, Wiu YL, Song K. 2000.** Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proceedings of the National Academy of Science* 97: 6960-6966.
- Palmer JD, Thompson WF. 1981.** Rearrangements in the chloroplast genomes of mung bean and pea. *Proceedings of the Natural Academy of Science*. 78: 5537-5544.
- Park M, Park J, Kim S, Kwon JK, Park HM, Bae IK, Yang TJ, Lee YH, Kang BC, Choi D. 2012.** Evolution of the large genome in *Capsicum annuum* occurred through accumulation of single-type long terminal repeat retrotransposons and their derivatives. *The Plant Journal* 69: 1018-1029.
- Parisod C, Holderegger R, Brochmann C. 2010.** Evolutionary consequences of autopoliploidy. *New Phytology*. 186: 5-17.
- Paterson AH, Bowers JE, Peterson DG, Estill JC, Chapman BA. 2003.** Structure and evolution of cereal genomes. *Current Opinion of Genetics Development* 13: 644-650.
- Paun O, Greilhuber J, Temsh EM, Horandl E. 2006.** Patterns, sources and ecological implications of clonal diversity in apomictic *Ranunculus carpaticola* (*Ranunculus auricomus* complex, Ranunculaceae). *Molecular Ecology* 15: 897-910.
- Pazko B. 2006.** A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution* 258: 39-48.

- Pellicer J, Fay MF, Leitch IJ. 2010.** The largest eukaryotic genome of them all?. *Botanical Journal of the Linnean Society* 164: 10–15.
- Peralta IE, Spooner DM. 2001.** Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany* 88: 1888-1902.
- Perry AS, Wolfe KH. 2002.** Nucleotide substitution rates in legume chloroplast DNA depend on the presence of the inverted repeat. *Journal of Molecular Evolution* 55: 501-508.
- Peruzzi L, Leitch IJ, Caparelli KF. 2009.** Chromosome diversity and evolution in Liliaceae. *Annals of Botany* 103: 459-475.
- Piegu B, Guyot R, Picault N, Roulin A, Saniyal A, Kim H, Collura K, Brar DS, Jackson S, Wing RA, Panaud O. 2006.** Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice *Genome Research* 16: 1262-1269.
- Porter JM, Johnson LA, Wilken D. 2010.** Phylogenetic Systematics of *Ipomopsis* (Polemoniaceae): Relationships and Divergence Times Estimated from Chloroplast and Nuclear DNA Sequences. *Systematic Botany* 35: 181-200.
- Rabinowicz PD, Palmer LE, May BP, Hemann MT, Lowe SW, McCombie R, Martienssen RA. 2003.** Genes and Transposons Are Differentially Methylated in Plants, but Not in Mammals. *Genome Research* 13: 2658-2664.
- Qi B, Zhong X, Zhu B, Zhao N, Xu L, Zhang L, Zhang H, Yu X, Liu B. 2010.** Generality and characteristics of genetic and epigenetic changes in newly synthesized allotetraploid wheat lines. *Journal of Genetics and Genomics* 37: 737-748.
- Ramsey J, Schemske DW. 1998.** Pathways, mechanisms, and rates of polyploidy formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology Systems* 29: 467-501.
- Ramsey J, Schemske DW. 2002.** Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology System.* 33: 589-639.
- Rannala B, Yang Z. 1996.** Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Biology* 43: 304-311.
- Ran Y, Hammet KRW, Murray BG. 2001.** Phylogenetic analysis and karyotype evolution in the genus *Clivia* (Amaryllidaceae). *Annals of Botany.* 87: 823-830.

- Raubeson LA, Jansen RK. 2005.** Chloroplast genomes of plants. In *Plant Diversity and Evolution: Genotypic and Phenotypic Variation in Higher Plants*. CAB International ed RJ Henry. 45-67.
- Ravi V, Khurana JP, Tyagi AK, Khurana. 2008.** An update on chloroplast genomes. *Plant Systematic and Evolution* 271: 101-122.
- Riesberg LH. 2001.** Chromosomal rearrangements and speciation. *TRENDS in Ecology and Evolution* 16: 351-357.
- Rodríguez F, Spooner DM. 2009.** Nitrate Reductase Phylogeny of Potato (*Solanum* sect. *Petota*) Genomes with Emphasis on the Origins of the Polyploid Species. *Systematic Botany* 34: 207-219.
- Rønsted N, Yektaei-Karin E, K. Turk K, J. J. Clarkson JJ, Chase MW. 2006.** Species-Level Phylogenetics of Large Genera: Prospects of Studying Coevolution and Polyploidy. In *Reconstructing the tree of life*. Ed T Hodkinson and JAN Parnell. 368 p.
- Salmon A, Ainouche ML, Wendel JF. 2005.** Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (Poaceae). *Molecular Ecology* 14:1163-1175.
- Salter TM. 1944.** The genus *Oxalis* in South Africa: A taxonomic revision. *J. S. African Bot.*, suppl. vol. 1: 1-355.
- SanMiguel, P, Gaut BS, Tikhonov A, Nakajima Y, Bennetzen JL. 1998.** The paleontology of intergene retrotransposons of maize. *Nature Genetics* 20: 43-5.
- Sang T. 2002.** Utility of Low-Copy Nuclear Gene Sequences in Plant Phylogenetics. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 37:121-147.
- Savolainen V, Chase MW. 2003.** A decade of progress in plant molecular phylogenetics. *TRENDS in Genetics* 19: 717-724.
- Savolainen V, Fay MF, Albach DC, Backlund A, van der Bank M, Cameron KM, Johnsom SA, Lledó MD, Pintaud JC, Powell M, Sheahan MC, Soltis DE, Soltis PS, Weston P, Whitten WM, Wurdack KJ, Chase MW. 2000.** Phylogeny of the Eudicots: a nearly complete familial analysis based on *rbcL* gene sequences *Kew Bulletin* 55: 257-309.
- Schubert I. 2007.** Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 109-115.

- Schubert I, Lysak MA. 2011.** Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics* 27: 207-216.
- Schubert I, Rieger R. 1985.** A new mechanism for altering chromosome number during karyotype evolution. *Theoretical and Applied Genetics* 70: 213-221.
- Seberg O, Petersen G, Davis JI, Pires JC, Stevenson DW, Chase MW, Fay MF, Devey DS, Jorgensen T, Sytsma KJ, Pillon Y. 2012.** Phylogeny of the Asparagales based on three plastid and two mitochondrial genes. *American Journal of Botany* 99: 875-889.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Stripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL. 2005.** The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007.** Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- Shneyer VS. 2009.** DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants. *Russian Journal of Genetics* 45: 1267-1278.
- Shore JS, Mcqueen KL, Little SH. 1994.** Inheritance of plastid DNA in the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). *American Journal of Botany* 81: 1636-1639.
- Small RL, Cronn RC, Wendel JF. 2004.** Use of nuclear genes of phylogeny reconstruction in plants. *Australian Systematic Botany* 17: 145-170.
- Small RL, Ryburn JA, Cronn RC, Seelanan T, Wendel JF. 1998.** The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear *ADH* sequences for phylogeny reconstruction un a recently diverged plant group. *American Journal of Botany* 85: 1301-1315.
- Small RL, Wendel JF. 2000.** Phylogeny, duplication, and intraspecific variation of Adh sequences in New World diploid cottons (*Gossypium* L., Malvaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 73-84.
- Soltis DE, Albert VA, Leebens-Mack J, Bell CD, Paterson AH, Zheng C, Sankoff D, dePamphilis CW, Wall PK, Soltis PS. 2009.** Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* 96: 336-348.

- Soltis DE, Burleigh JG. 2009.** Surviving the K-T mass extinction: New perspectives of polyploidization in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 106: 5455-5456.
- Soltis PS, Plunkett GM, Novak SJ, Soltis DE. 1995.** Genetic variation in *Tragopogon* species: additional origins of the allotetraploids *T. mirus* and *T. miscellus* (Compositae). *American Journal of Botany* 82: 1329–1341.
- Soltis DE, Soltis PS. 2000a.** Contribution of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. *Plant molecular Biology* 42: 45-75.
- Soltis PS, Soltis DE. 2000b.** The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 97: 7051-7057.
- Soltis DE, Soltis PS. 2009.** Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *TREE* 14: 348-352.
- Soltis DE, Soltis PS, Mort ME, Chase MW, Savolainen V, Hoot SB, Morton CM. 1998.** Inferring complex phylogenies using parsimony: an empirical approach using three large DNA data sets for angiosperms. *Systematic Biology* 47:32–42.
- Soltis DE, Soltis PS, Schemske DW, Hancock JF, Thompson JN, Husband BC, Judd WS. 2007.** Autopoliploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species? *Taxon* 56: 13-30.
- Song KM, Lu P, Tang KL, Osborn TC. 1995.** Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 92: 7719–7723.
- Stebbins GL. 1971.** Chromosomal evolution in higher plants. Reading: Addison-Wesley, 1971. 216 p.
- Steele PR, Guisinger-Bellian M, Linder CR, Jansen RK. 2008.** Phylogenetic utility of 141 low-copy nuclear regions in taxa at different taxonomic levels in two distantly related families of rosids. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 1013-1026.
- Steele PR, Pires JC. 2011.** Biodiversity assessment: state-of-the-art techniques in phylogenomics and species identification. *American Journal of Botany* 98: 415-425.

- Strauss SH, Palmer JD, Howe GT, Doerk AH. 1988.** Chloroplast genomes of two conifers lack a large inverted repeat and are extensively rearranged. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 85: 3898-3902.
- Stuessy TF. 2009.** Plant taxonomy: the systematic evaluation of comparative data, 2nd edn. New York: Columbia University Press.
- Stuessy TF, Blösch C, Villaseñor JL, Rebernig CA, Weiss-Schneeweiss H. 2011.** Phylogenetic analyses of DNA sequences with chromosomal and morphological data confirm and refine sectional and series classification within *Melampodium* (Asteraceae, Millerieae). *Taxon* 60: 436-449.
- Swift H. 1950.** The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 36: 643-654.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouver J. 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Tate JA, Ni Z, Scheen AC, Koh J, Gilbert CA, Lefkowitz D, Chen ZJ, Soltis PS, Soltis DE. 2006.** Evolution and expression of homeologous loci in *Tragopogon miscellus* (Asteraceae), a recent and reciprocally formed allopolyploid. *Genetics* 173: 1599-1611.
- Torrell M, Vallés J. 2001.** Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary, and ecological implications. *Genome* 44: 231-238.
- Tsukahara S, Kobayashi A, Kawabe A, Mathieu O, Miura A, Kakutani T. 2009.** Burst of retrotransposition reproduced in *Arabidopsis*. *Nature* 461: 423-427.
- Venema J, Tollervey D. 1999.** RIBOSOME SYNTHESIS IN *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review Genetics* 33: 261-311.
- Veilleuz R. 1985.** Diploid and polyploidy gametes in crop plants: mechanisms of formation and utilization in plant breeding. *Plant Breeding Review* 3: 253-288.
- Walsh BM, Hoot SB. 2001.** Phylogenetic relationships of *Capsicum* (Solanaceae) using DNA sequences from two noncoding regions: the chloroplast *atpB-rbcL* spacer region and nuclear waxy introns. *International Journal Plant Science* 162: 1409-1418.

- Warwick SI, Sauder CA, Al-Shehbaz IA, Jacquemoud F. 2006.** Phylogenetic relationships in the Brassicaceae tribes of Ancho- niae, Chorisporeae, Euclidieae, and Hesperideae based on nuclear ribosomal ITS DNA sequences. *Ann Missouri Bot Gard* 94: 56–78.
- Wendel JF. 2000.** Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology* 42: 225-249.
- Wendel JF, Schnabel A, Seelanan T. 1995.** An unusual ribosomal DNA sequence from *Gossypium gossypoides* reveals ancient, cryptic, intergenomic introgression. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 4: 298–313
- Whelan S, Liò P, Goldman N. 2001.** Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *TRENDS in Genetics* 17: 262-272.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. 1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York.
- Yaakov B, Kashkush K. 2011.** Methylation, transcription, and rearrangements of transposable elements in synthetic allopolyploids. *International Journal of Plant Genomics* Volume 2011, Article ID 569826 doi:10.1155/2011/569826
- Yang Z, Rannala B. 2012.** Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Review Genetics*. 303-314.
- Yang JY, Yoon HS, Pak JH. 2012.** Phylogeny of Korean *Rubus* (Rosaceae) based on the second intron of the LEAFY gene. *Canadian Journal of Plant Science* 92: 461-472.
- Zonneveld BJM. 2001.** Nuclear DNA contents of all species of *Helleborus* (Ranunculaceae) discriminate between species and sectional divisions. *Plant Systematics and Evolution* 229: 125–130.
- Zonneveld BJM. 2008.** The systematic value of nuclear DNA content for all species of *Narcissus* L. (Amaryllidaceae). *Plant Systematic and Evolution* 275:109–132.
- Zou XH, Zhang FM, Zhang JG, Zang LL, Tang L, Wang J, Sang T, Ge S. 2008.** Analysis of 142 genes resolves the rapid diversification of the rice genus. *Genome Biology* 9: R49.

4. CAPÍTULO I. Molecular phylogeny and chromosome evolution among the creeping herbaceous *Oxalis* species of sections *Corniculatae* and *Ripariae* (Oxalidaceae).

Vaio M^{a, b}, Gardner A^c, Emshwiller E^c, Guerra M^{a, *}

^a Laboratory of Plant Cytogenetics and Evolution, Department of Botany, Federal University of Pernambuco Brazil; ^bLaboratory of Genetics, Department of Plant Biology, College of Agronomy, University of the Republic, Montevideo, Uruguay; ^cDepartment of Botany, University of Wisconsin-Madison, USA.

ABSTRACT

Oxalis sections *Corniculatae* DC. and *Ripariae* Lourteig are composed mainly of creeping herbs. They not only share strong morphological similarities, such as the presence of a reptant stem but also some cytogenetic characteristics. Several species in section *Corniculatae* share a base chromosome number $x = 5$ with species in section *Ripariae*, while other species in the former have a $x = 6$. We used a molecular and cytogenetic approach to determine the phylogenetic relationships, test the previous taxonomic classification and study the genome rearrangements that led to the differences in chromosome size and basic chromosome number between both sections. Phylogenetic relationships were inferred based on DNA sequences from chloroplast and nuclear ribosomal ITS. The molecular phylogenetic analyses found that neither of the sections are monophyletic, but do support two clades. The first group contains diploid species with $x = 5$, large chromosomes and high DNA content and the second diploid and polyploidy species with $x = 6$, small chromosomes and low DNA content. The $x = 5$ clade comprises species of both sections, while the $x = 6$ clade was formed mainly by section *Corniculatae* species and *O. serpens* from section *Ripariae*. Our results suggest that $x = 5$ and high DNA content are derived conditions, which may have resulted from descendent dispolidy and proliferation of transposable elements. Thus, cytogenetic data superimposed on the phylogeny have shown two different modes of chromosome evolution in both lineages: 1. chromosome rearrangements and increase in genome size in the $x = 5$ lineage and 2. polyploidy with a main role in chromosome evolution among species in the $x = 6$ clade. A taxonomic revision for the two sections is suggested.

Key words: *Oxalis*, creeping herbs, molecular phylogeny, chromosome base number evolution, nuclear DNA content

*Author for correspondence: msfguerra@hotmail.com

1. Introduction

Oxalis L. is a cosmopolitan genus comprising at least 500 species, most of them native to South America and southern Africa. There is wide morphological variation among the ~ 250 species found in South America, where the genus seems to have originated and diversified (Denton, 1973; Lourteig, 2000; de Azkue, 2000). Aside from its trimorphic heterostylous breeding system, which has fascinated biologists since Darwin (1877), one of the most outstanding variations is in the morphology of their stems. Besides creeping herbs, succulents and small shrubs, different types of geophytes are found, producing tubers, rhizomes and true bulbs. Taxonomic studies in the genus include many systematic treatments (Lourteig, 2000 and references therein) but probably the most comprehensive studies were undertaken by Knuth (1930) for *Oxalis* in general, Salter (1944) for the South African species and Lourteig (1994; 2000) for the South American ones. The most recent taxonomic treatment of the genus is that of Lourteig (1994, 2000), in which she recognized four subgenera and several sections based mostly on morphology. Although Lourteig's work (2000) has greatly improved the complex and confused taxonomy of South American *Oxalis*, species delimitation in several taxa and relationships among sections remain an extremely difficult task, mainly because of a high morphological variation, phenotypic plasticity, as well as the putative occurrence of interspecific hybridizations (de Azkue, 2000; Emshwiller and Doyle, 2002).

Oxalis sections *Corniculatae* DC. and *Ripariae* Lourteig are both composed mainly of creeping herbs. Section *Corniculatae* has a large geographical distribution, although most species occur in the humid and temperate regions of North and South America (Lourteig, 1979). Morphologically, species in the section share the presence of a caulescent habit with reptant stems, absence of setose hairs on any part of the plant, trifoliate leaves, sessile leaflets, presence of stipules, and homo-, semihomo-, or heterostylous yellow or rarely orange flowers (Eiten 1955; Lourteig 2000). It includes 35 species and several subspecies and varieties (Lourteig, 1979, 2000). One of the most important species included in this section is *O. corniculata* L. with three subspecies and four varieties. It is a cosmopolitan weed that Eiten (1963) believed to have originated in the Australasian region and migrated to the American tropics, acting as a geographical link among section *Corniculatae* species. Based on its distribution, Eiten (1963) proposed that it was the one from which the remaining species evolved. Only four species of section *Corniculatae* from North America and three others from

South America have been included in previous phylogenetic analyses (Oberlander et al., 2004, 2009; Heibl and Renner, 2012). In results of those analyses the species formed a monophyletic group that was early-diverging in the genus. Cytogenetically, section *Corniculatae* seems to be divided in two subgroups: 1) a larger number of diploid and polyploid species with a base chromosome number of $x = 6$, symmetrical karyotypes and small and medium size chromosomes, and 2) a smaller number of diploid species with $x = 5$, more asymmetrical karyotypes, and medium to large chromosomes (Marks, 1956; Naranjo et al., 1982; de Azkue and Martinez, 1984; de Azkue, 2000). The latter subgroup comprises only three species (*O. niederleinii* R. Knuth, *O. refracta* A. St.-Hil. and *O. eriocarpa* DC.), which are all distributed in southern South America.

All other creeping herbs of *Oxalis* are included in Section *Ripariae*. They share the morphological characteristic of reptant stems with species in section *Corniculatae*, but includes diploid species with a base chromosome number of $x = 5$ and large chromosomes. The nine species included in section *Ripariae* have been less well-studied, probably because they have a very restricted distribution: most are only in south-eastern Brazil and one species is endemic to Paraguay. The section was first proposed by Lurteig (2000), whereas Knuth (1930) had included these species in sections *Clematodes* (most species), and *Austro-Americanae* (just *O. serpens*). They share the presence of a long stem, reduced or absent stipules, obtuse or subacute leaflets and a di- or tristylous breeding systems (Lurteig 2000). The latter author distinguished the section *Corniculatae* from *Ripariae* mainly by the presence and absence of stipules, respectively.

Molecular phylogenetic analyses have been widely used to test previous taxonomic classifications and to study evolutionary processes. Cytogenetic data, such as chromosome number and nuclear DNA content, have been often associated with phylogenetic trees in order to understand the karyological changes involved in the diversification of a group (see e.g. Köehler et al., 2008; Stuessy et al., 2011). Our study generated a phylogenetic analysis of *Oxalis* sections *Corniculatae* and *Ripariae* using chloroplast and nuclear DNA sequences. We compared the resultant phylogeny with cytological data, such as chromosome number, size and morphology, fluorochrome banding and nuclear DNA content, to determine: 1) the phylogenetic relationships between the two sections; 2) whether Lurteig's (2000) taxonomic classification reflects phylogenetic relationships among the species; 3) what genome rearrangements led to the difference in chromosome size and basic chromosome number; 4)

how the difference in nuclear DNA content affects chromosome morphology and percentage of heterochromatin.

2. Material and methods

2.1 Taxon sampling

Plant accession numbers and origin as well as GenBank accession codes for all taxa in our phylogenies are shown in Appendix A1. Sequences were selected to include species from South America and the Northern Hemisphere. For *O. corniculata*, which has a cosmopolitan distribution, we included sequences from accessions belonging to different regions of the world. Data for plant material included in the cytogenetic and flow cytometric analyses are shown in Table 1. Cytogenetic analyses were performed for species of section *Corniculatae* and *O. serpens* from section *Ripariae*. Vouchers are deposited at the Bernardo Rosengurt Herbarium (MVFA, Facultad de Agronomía, Uruguay) or at the UFP Herbarium (Universidade Federal de Pernambuco, Brazil).

2.2 DNA sequence sampling

Total genomic DNA was isolated from fresh or silica-dried leaf material or from herbarium specimens. For the fresh and silica-dried leaves the CTAB-procedure of Doyle and Doyle (1987) was followed, whereas for the herbarium specimens the protocol described in Gardner et al. (2012) was used. Universal primers were used to amplify the plastid spacer regions *trnL-trnL-trnF*, *trnT-trnL*, and *psbJ-petA* (Taberlet et al., 1991; Shaw et al., 2007) and the nrITS region (White et al., 1990). Polymerase chain reaction amplifications were performed either in a 25 µL reaction containing 0.4 units of *Taq* polymerase, 1.5mM MgCl₂, 0.4µM of each primer and 0.1mM of each dNTP in the manufacturer's buffer, or as described in Gardner et al. (2012). Amplifications were performed in a Mastercycler thermocycler (Eppendorf). Programs consisted of an initial 5 min at 95°C, followed by one cycle of 1 min at 94°C, 1 min at 56°C (*trnL-trnL-trnF* and *trnL-trnT*) or 50°C (ITS), and 2 min 30 sec at 72°C, and a final elongation step of 5 min at 72°C. The thermocycling program conditions suggested by Shaw et al. (2007) were followed for the *petA-psbJ* region.

PCR products were purified using a Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and submitted for sequencing to Macrogen Inc. (Seoul, Korea), or processed as described in Gardner et al. (2012) and sequenced on an ABI 3730 automated

sequencer at the University of Wisconsin-Madison Biotechnology Center. All regions were sequenced in both directions. Sequences of additional species were retrieved from GenBank (Appendix A.1).

2.3 Sequence Alignments and phylogenetic analyses

Alignments were generated using ClustalW (Thompson et al., 1994) as implemented in the program Bioedit 6.0.5 (Hall 1999) using default settings. Manual adjustments were made to improve the alignments with the use of MacClade 4.05 (Maddison and Maddison, 2002). For the nrITS and combined alignments more than one sequence, generated or downloaded from GenBank (see Appendix A.1), was used for *O. corniculata* (10-7), *O. conorrhiza* (3), *O. tenerrima* (2), *O. sarmentosa* (2), *O. stricta* (2), *O. calachaccensis* (2) and *O. dillenii* (2). Sequences were submitted to GenBank and the alignments to Treebase. The plastid regions were concatenated and analyzed together. Maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) optimality criteria were used to analyze the plastid and nrITS data separately. Indels were treated as missing data. Both dataset were also merged for a combined analysis.

Maximum parsimony analyses were performed using PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2001) treating all characters as equally weighted and treating gaps as missing data. For each dataset we performed a heuristic parsimony search using a set of 1,000 random taxon-addition starting trees, tree bisection- reconnection branch swapping, with Multrees on, limiting the arrangements to 100,000 and permitting only one tree to be held in each step. Strict consensus topologies were computed from the resultant phylogenies and trees were rooted with *Oxalis grisea* based on the preliminary results obtained for the genus-wide phylogeny (Gardner et al. unpublished results). Parsimony bootstrap support for clades (Felsenstein, 1985) was calculated in PAUP* 4.0b10 with 1,000 bootstrap replicates with the same search conditions described above except that 100 random-addition starting trees were used for each replicate.

For the ML and Bayesian analyses, the most appropriate model of sequence evolution for each molecular marker was determined using the Akaike information criterion (AIC) as implemented in the program jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008; Guindon and Gascuel, 2003). Best fit models were: TPM1uf + G for *psbJ-petA* and *trnL-trnL-trnF*, TIM1+G for *trnT-trnL* and GTR + I + G for nrITS. The GTR+I+G model most closely resembles those selected by JModelTest, and was used for the ML and Bayesian inferences. The maximum likelihood

analysis and bootstrap measurements (1,000 replicates) were performed in the program GARLI v.0.96 (Zwickl, 2006) while Bayesian inference was performed using Mr. Bayes v3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) under a partitioned model as implemented on CIPRES Science Gateway V.3.1 (www.phylo.org). The analysis using the chosen model was conducted for two independent runs and for 5,000,000 generations, sampling every 1,000 trees. The first quarter of sampled trees were discarded as burn-in. The subsequent trees were retained and posterior probabilities (PP) were estimated by constructing a 50% majority-rule consensus tree in PAUP*. Trees were visualized using TreeView (Page, 1996) and FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2009).

2.4 Cytogenetic studies

For the cytogenetic and flow cytometric analyses young flower buds and leaves were taken from a living collection maintained at the College of Agronomy, Montevideo, Uruguay, or at the experimental garden in the Department of Botany, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. Other leaf samples were collected in the field and maintained in moist paper and low temperature for the flow cytometry studies. For mitotic analyses young flower buds were pretreated with 0.002 M 8-hydroxyquinoline or colchicine 0.2% at 10°C for 20-24 h. Samples were then fixed in Carnoy 3:1 (ethanol/glacial acetic acid) for 2 to 24 h at room temperature and later stored at -20°C. Young flower buds were digested with 2% cellulase and 20% pectinase (both w/v) for 4 hours at 37°C, left in 60% acetic acid for at least 30 min and then squashed in 45% acetic acid. After removing the cover-slips by freezing in liquid nitrogen, slides were air-dried and aged for 3 days at room temperature and then stored at -20°C until used.

For chromosome banding the fluorochromes chromomycin A3 (CMA; Sigma) and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma) were used as described by Cabral et al. (2006). Briefly, aged slides were stained with 0.5 mg/ml CMA for 1 h and 2 mg/ml DAPI for 30 min and mounted in 1:1 (v/v) McIlvaine's pH 7 buffer/glycerol. Images of the best cells were acquired with a Leica DMLB microscope equipped with a Cohu CCD camera and the Leica QFISH software. Final images were processed with Adobe Photoshop CS3 for brightness and contrast only and idiograms were built using Corel Draw Graphic Suite X5.

2.5 Nuclear DNA content determinations

Nuclear DNA measurements were performed according to Doležel and Göhde (1995). Briefly, small pieces of fresh young leaves from the sample and appropriate standard were mixed in a glass Petri dish with 0.6 mL ice-cold Otto buffer I (0.1 M citric acid + 0.5% Tween 20), co-chopped with a sharp razor blade, filtered through a 30 µm nylon mesh membrane into a cytometry tube. Finally, after addition of 0.6 mL Otto II buffer (0.4 M Na₂HPO₄·12H₂O) supplemented with RNase (50 µg/mL) and propidium iodide (50 µg/mL), samples were immediately analysed by flow cytometry. DNA content analysis was carried out in a Partec CyFlow SL cytometer and Flomax software (Partec). At least three DNA content estimations were performed for each plant (5,000 to 10,000 cells per analysis) and three individuals of different origins were analyzed. *Raphanus sativus* L. “Saxa” (2C = 1.11 pg), *Solanum lycopersicum* L. “Stupické polnírané” (2C = 1.96 pg), *Glycine max* (L.) Merr. “Polanka” (2C = 2.55 pg), *Zea mays* L. “CE-777” (2C = 5.43 pg) and *Pisum sativum* L. “Ctirad” (2C = 9.09 pg) were used as internal reference standards (Doležel et al., 2007). For each plant analyzed, internal standard was selected so that its genome size was close to but not overlapping with that of the analyzed sample. Nuclear DNA content (2C value) was calculated as: (Sample peak mean/ standard peak mean) x 2C DNA content of standard (pg).

2.6 Estimation of the basic chromosome number

The ancestral state reconstruction of the basic chromosome number was performed in Mesquite v.2.75 (Maddison and Maddison 2011). The trace character history function was used with the 50% majority-rule consensus tree from the Bayesian inference analyses. The ancestral state was inferred using maximum likelihood under the Markov k-state one-parameter (Mk1) model, in which all changes are equally probable. The basic number of each section or genus is one of the haploid chromosome number observed in each taxon that most parsimoniously explains the chromosomal variability of that group. It also has to show a clear relationship with the base number of the closest related groups (Guerra 2000). Haploid chromosome numbers of putative diploid species were taken from the literature (Table 2), or from this work, and they were treated as an unordered, multistate character with six states ($n = 5, 6, 7, 8, 9, 11$) and coded from 0 to 5. Missing data was coded with a question mark.

3. Results

3.1 DNA sequences and phylogenetic analyses

The combined plastid matrix consisted of 41 accessions corresponding to 32 *Oxalis* species, and it comprised 2,661 aligned sites (*trnL-trnL-trnF*: 947 sites; *trnT-trnL*: 859 sites; *psbJ-petA*: 855 sites) among which 2,039 were constant, 266 uninformative and 356 parsimony-informative characters (13.38%). The aligned matrix for nrITS sequences comprised 46 accessions from 32 *Oxalis* taxa. The data matrix had 765 characters, of which 335 were constant, 128 uninformative and 302 parsimony-informative (39.48%). Parsimony analyses of the plastid and nrITS datasets yielded topologies with 845 steps (consistency index [CI] = 0.844, retention index [RI] = 0.941) and 1,095 steps (consistency index [CI] = 0.646, retention index [RI] = 0.819), respectively. The resulting topologies from the phylogenetic analyses were very similar to each other (Fig.1), although there was incongruence in the placement of *O. aureoflava*.

The results of analyses of the combined dataset led to tree topologies that had the same general structure for MP, BI and ML. The only incongruence was found in the location of *O. serpens* in the ML tree compared to the other two analytical frameworks (Fig. 2). Most of the recovered clades showed high support in terms of both posterior probability values (PP) $\geq$ 0.95 and bootstrap values (BS) $\geq$ 80%.

All of the creeping *Oxalis* species in our sample joined together as a monophyletic group in the results of all analyses. This large clade of creeping *Oxalis* was divided in two clades which we designate as “C + R” and “C” clades (Fig. 3). Clade C + R comprised species from both sections *Corniculatae* and *Ripariae* and is further subdivided into two subclades. One of these subclades contained only species from sect. *Corniculatae* and had weak BS support (65 MP and 78 ML), but a moderately good PP support (83). It included *O. niederleinii* and *O. refracta*, which always appeared as sister species with high support (BS = 100; PP = 100), and *O. eriocarpa*. The second subclade was composed of species from section *Ripariae*, i.e., *O. bifrons*, *O. sarmentosa* and *O. paranaensis*, with a high support (BS = 98 MP, BS=100 ML, PP = 100). Clade C was composed almost exclusively of section *Corniculatae* species, plus only *O. serpens* from section *Ripariae*; this clade had high PP support (100) and BS values ranging from high for ML (98) to moderately weak for MP (61). The earliest divergent taxon in clade C was the Chilean endemic species *O. dumetorum*. The

rest of the taxa were divided into a subclade composed exclusively of South American species (here designated the *O. conorrhiza* complex) and another subclade containing cosmopolitan species, the Northern Hemisphere species, and Andean *O. calachaccensis* (the *O. corniculata* complex) (Fig. 3). The placement of *Oxalis serpens* conflicted among the MP, ML and BI trees. In our results of combined analyses under MP and Bayesian inference it appears as a sister species to clade C, whereas under ML it was sister to the *O. corniculata* complex.

3.2 Chromosome numbers, chromosome banding and DNA content

Chromosome numbers and nuclear DNA content (2C value) analyzed in the present study are summarized in Table 2 together with the pertinent previously published data. We determined *O. paludosa* and *O. serpens* to be diploid species with $2n = 12$ (Fig. 4 a-b). Both species displayed symmetric karyotypes with small metacentric and submetacentric chromosomes. Chromosome number determinations were also performed for some other section *Corniculatae* species to confirm their published somatic chromosome numbers and to assess ploidy levels. For *O. conorrhiza*, two tetraploids ($2n = 4x = 24$) and a hexaploid ($2n = 6x = 36$) accession were found (Fig. 4e). The *O. corniculata* plants sampled were octoploids with $2n = 8x = 48$, whereas the only studied accession for *O. stricta* was a tetraploid with $2n = 4x = 24$ (Fig. 4 c-d). As in *O. serpens* and *O. paludosa* they all showed small metacentric and submetacentric chromosomes and a base chromosome number $x = 6$. In the case of *O. refracta*, *O. niederleinii* and *O. eriocarpa* all analyzed accessions were diploids ($2n = 10$), with large metacentric, submetacentric and acrocentric chromosomes (Fig. 4 f-h). *Oxalis niederleinii* and *O. refracta* had the same asymmetric karyotype with one metacentric and eight acrocentric chromosome pairs, whereas *O. eriocarpa* showed two metacentrics, two submetacentrics and only one acrocentric chromosome pair.

CMA⁺ bands varied in the $x = 6$ species from two terminal in the diploid *O. paludosa* and the tetraploid *O. stricta* to 12 in the hexaploid *O. conorrhiza*. For this latter species terminal and proximal CMA⁺ bands were observed. Among the $x = 5$ species, CMA⁺ bands were always located in the terminal position of the short arm of acrocentric chromosomes. In *O. eriocarpa* the only CMA⁺ band was observed in the acrocentric chromosome pair, whereas in *O. refracta* they were located in three acrocentrics and in *O. niederleinii* in only two acrocentric pairs. In this latter species a CMA⁺ block was located terminally in the long arm of one of the acrocentric chromosomes (Fig. 4 and 5). Idiograms for the $n = 5$ species are shown in Fig. 5 together with species from section *Ripariae*. Chromosome measurements for

O. sarmentosa and *O. paranaensis* were based on the figures published by de Azkue and Martinez (1984).

Nuclear DNA content (2C values) in the *Oxalis* species studied ranged from 1.21 pg in *O. paludosa* (2x) to 14.15 pg in *O. eriocarpa* (2x), which also represents the extremes of the Cx-values range (2C nuclear DNA content/ploidy level) from 0.61 pg to 7.07 pg, an almost 12-fold variation. The highest 2C values were found among the $x = 5$ species varying from 8.44 pg in *O. refracta* (2x) to 14.15 pg in *O. eriocarpa* (2x). The remaining taxa studied showed lower DNA contents (Table 2).

3.3 Estimation of the ancestral basic chromosome number

Estimating ancestral basic chromosome number using maximum likelihood suggested that $x = 6$ is the most likely character state for the common ancestor to both major clades. Figure 6 presents the reconstruction based on maximum likelihood analyses. Proportional likelihoods for nodes indicated on Fig. 6 are provided in Appendix A2. All ancestral nodes including clade 8 are inferred to retain the ancestral character state. Our results suggested that chromosome numbers $n = 5$ and $n = 7, 8, 9$ and 11 are derived conditions in clades leading to section *Ripariae* species plus *O. niederleinii*, *O. refracta* and *O. eriocarpa* and the bulbous and non-bulbous clades, respectively.

4. Discussion

The boundaries of *Oxalis* section *Corniculatae* have varied widely based on the different taxonomic treatments of the genus (Knuth, 1930; Eiten, 1963; Lourteig, 2000). Its representatives share several morphological characteristics with taxa placed in section *Ripariae*, a small section first recognized by Lourteig (2000). Both taxonomic groups comprise creeping species, and taxonomic keys to separate the sections are based almost exclusively on the presence or absence of stipules. In this study, the results indicate that neither of the sections are monophyletic as previously delimited, but rather that their species are intermixed in two main lineages.

The phylogenetic analyses yielded a well-resolved topology, exhibiting a major clade split into two subclades, each with high support and each containing species with either base chromosome number $x = 6$ or $x = 5$. The separation between the two clades is further supported by other cytogenetic characteristics. The $x = 6$ lineage has small chromosomes, low

nuclear DNA content, and diploid and polyploid species or cytotypes while all taxa in the $x = 5$ lineage have large chromosomes, high 2C values and only diploid representatives.

4.1 The *O. corniculata* and *O. conorrhiza* complexes (clade C, $x = 6$)

Oxalis corniculata is a cosmopolitan species with an uncertain range for which several varieties and forms have been described (Sykes, 2009). All of our samples and the GenBank accessions from different geographical regions included in this study grouped together in a single clade. They also formed a clade with *O. calachaccensis*, which is found in the central Andes and is morphologically separated only slightly from *O. corniculata* (Eiten, 1963). The phylogenetic evidence presented here suggests that the taxonomic status of *O. calachaccensis* should be re-evaluated.

The close phylogenetic relationship of *O. corniculata* with *O. stricta*, *O. dillenii* and *O. fontana* was not surprising (see Oberlander et al., 2009; Heibl and Renner, 2012), since they also presented strong morphological and chromosomal similarities (Eiten, 1955; 1963; Lourteig, 1979; Nesom, 1999). They have been considered by several authors as part of a large complex of species morphologically similar to *O. corniculata* (Eiten, 1963; Sykes, 2009). *Oxalis stricta* and *O. dillenii* are both native to North America, the former is also widespread in Europe, while the latter is very rare in that continent (Eiten, 1955). It is important to realize that the taxon names are applied differently by different authors, and here we follow Eiten (1955) and Watson (1989), rather than Lourteig (1979). *Oxalis fontana* is an east Asian taxon that has also been considered a synonym or a variety of *O. stricta* (Eiten, 1955, 1963; Lourteig, 1979; Watson, 1989; Nesom, 1999). Interspecific crosses between the four taxa have shown inter-taxon compatibility (Lovett Doust et al., 1981) and natural hybrids seem to be common, making the species boundaries more confusing (Lourteig, 1979). Analyses of more specimens are necessary to fully understand complex relationships among these taxa.

Chromosome counts reported in the literature indicate large variability for these species. Ploidy levels for *O. corniculata* range from $2x$ ($2n = 12$) to $8x$ ($2n = 48$) and for *O. dillenii* and *O. stricta* from $3x$ ($2n = 18$) to $4x$ ($2n = 24$). Other uncommon and unconfirmed chromosome numbers have also been reported for the three taxa, $2n = 16, 20, 22, 38, 46$ (Mathew, 1958; Eiten, 1963; Xu et al., 1992), but they were not included in this analysis because they may represent miscounts or botanical misidentifications rather than important chromosome number variations. For *O. fontana*, only tetraploid and octoploid chromosome

counts were found in the literature (Table 2). Although the only published diploid count was $2n = 12$ for *O. corniculata* (Xu et al., 1992), the existence of diploids for the other taxa cannot be ruled out mainly due to the occurrence of triploid plants that could be acting as a bridge between different ploidy levels (Ramsey and Schemske 1998). Another possibility is extinction of diploids as seen in other polyploid complexes.

Another complex of species is that formed by *O. conorrhiza* and related species *O. tenerrima*, *O. paludosa*, *O. gyrorrhiza*, *O. aureo-flava* and *O. bisfracta*. The "*O. sexenata* Savigny complex" was first described by Eiten (1963) to include several South American species that share the characteristic of "septate stem-hairs with colorless septae" (Eiten, 1963). As *O. sexenata* was synonymized under *Oxalis conorrhiza* (Lourteig 2000), and based on our molecular results, we refer to it here as the *O. conorrhiza* complex. *Oxalis conorrhiza* has a widespread distribution: from central Chile to central Bolivia, northern Argentina, Paraguay, Uruguay and southeastern Brazil (Eiten, 1963; Lourteig, 2000). It is morphologically very variable and several variants were considered as different taxa before Lourteig (2000) reduced them to synonyms. However, the sequences of *O. conorrhiza* do not form a monophyletic group on the trees based on our analysis of cpDNA data or the combined analyses in this study. Each of the three accessions included in the analysis is placed as sister to three different taxa (*O. paludosa*, *O. tenerrima* and *O. bisfracta*), which may mean that they represent more than one taxon, that they are products of hybridization events, that they reflect retained polymorphism, or that the sequences do not coalesce within species. Polyploidy seems to have played an important role in the evolution of the *O. conorrhiza* complex; ploidy levels for the complex range from $2x$ to $8x$ (Table 2), and for *O. bisfracta* only octoploid accessions are known. Although we know of no chromosome counts for *O. tenerrima*, its DNA content, when compared to that of closely related species, suggests that it is hexaploid.

Little is known about *O. dumetorum* and *O. serpens*, the most early diverging species among the $x = 6$ species. They are both diploids (de Azkue, 2000; Lourteig, 2000; this work), and each has a restricted distribution. *Oxalis dumetorum* is endemic to central Chile and grows in *Nothofagus* forests in the Biobio region (C. Heibl pers. comm.). It was previously reported as a sister species to species in the *O. corniculata* complex (Heibl and Renner 2012). *Oxalis serpens* has a restricted distribution to the States of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul in southern Brazil (Lourteig, 2000), where it grows in sympatry with *O. tenerrima* and *O. corniculata*. *Oxalis serpens* was placed in section *Ripariae* by Lourteig and

before that in section *Austro-Americanae* by Knuth (1930). Unlike other species in the $x = 6$ clade, *O. serpens* has a subglobose capsule like those of the $x = 5$ species, instead of the elongated capsule observed in all other included $x = 6$ species. Stipules are mainly reduced or inconspicuous (de Azkue and Martínez, 1984; Lourteig, 2000). However, it shares the same $x = 6$ base number and similar $1Cx-$ value with the rest of the species in the clade. Thus, both phylogenetic and karyological evidence suggest that *O. serpens* was wrongly placed in section *Ripariae*. A new taxonomic revision and the inclusion of more section *Corniculatae* taxa in phylogenetic analyses would help to elucidate if *O. serpens* should be included into this latter section.

Our molecular phylogenetic analyses suggest a South American origin for section *Corniculatae*, contrary to Eiten's hypothesis suggesting an Australasian one. Previous studies of the American bulb-bearing *Oxalis* suggested a southern South American origin for that clade specifically a region including Uruguay, eastern Argentina and southern Brazil (Gardner et al., 2012). Our results are compatible with the idea that the latter might possibly be the center of origin for the *O. corniculata* and *O. conorrhiza* complexes as well. The extra-South American distributions of members of the *O. corniculata* complex may have been facilitated by the apparent transition(s) to semihomo- and homostylous floral morphologies (accompanied by loss of the self-incompatibility system) among some members of the complex (Ornduff, 1972). Multiple other *Oxalis* lineages, usually extending the geographic range of their putative progenitors, have experienced breeding system transitions. Examples of this are the sky-island populations of *O. alpina*, many of which are transitioning from tristylous to distylous and have been the subject of considerable study (Weller et al., 2007, Sosenski et al., 2009, Pérez- Alquicira et al., 2010), and the extra-South American populations of *O. debilis*, which display anisoplethous floral morph ratios and even sterility (Luo et al., 2006).

4.2 Section *Ripariae* (clade C + R, $x = 5$)

The $x = 5$ lineage is composed of species included by Lourteig (2000) in section *Ripariae* (*O. sarmentosa*, *O. bifrons* and *O. paranensis*) and others placed in section *Corniculatae* (*O. niederleinii*, *O. refracta* and *O. eriocarpa*). *Oxalis niederleinii*, *O. refracta* and *O. eriocarpa* were placed in section *Corniculatae* based mainly on stem characteristics. However, all of our molecular phylogenetic results are congruent with the cytological data,

indicating the $x = 5$ species as a monophyletic group with high support. Moreover, the three species *Oxalis refracta*, *O. niederleinii* and *O. eriocarpa* share with species in section *Ripariae* the presence of a globular fruit and a dichasium inflorescence, flavonoid characteristics, as well as a high nuclear DNA content (de Azkue and Martínez, 1984; del Pero and de Azkue, 1984; this work). Thus, not only the phylogenetic results but also cytogenetic and morphological data suggest that these three species should be reclassified in section *Ripariae*.

4.3 Chromosome evolution

Polyploidy seems to have played an important role among the $x = 6$ species, and different ploidy levels have been reported in almost all species belonging to this group. Chromosome morphology is constant, with symmetrical karyotypes and only metacentric and submetacentric chromosomes, which indicates that chromosome rearrangements have been limited in the speciation of these taxa. Hybridization seems to have accompanied polyploidy, as intermediate morphologies have been described for most of the species and could explain the difficulty in delimiting species boundaries. Most of the species exhibit morphological and chromosomal diversity that suggests they are part of a polyploid complex of species, consisting generally in at least two morphologically distinct diploid species that give rise to a series of auto- and allotetraploids spanning the range of morphological features and distribution of the diploid parents (Stebbins 1971). In mature polyploid complexes even higher ploidy levels could be found (Bayer, 1998), such as the hexaploids and octoploids in *O. corniculata*, *O. tenerrima*, and *O. conorrhiza* and other section *Corniculatae* species.

In the $x = 5$ species no polyploid cytotypes have been found, although species in this clade present a much higher nuclear DNA content than those in the $x = 6$ lineage. In other parts of the large genus *Oxalis* 2C DNA content varies from 0.81 pg in *O. megalorrhiza* to 33.00 pg in *O. psoraleoides* (Emshwiller, 2002; de Azkue and Martínez, 1988) but most of the species have small genomes (mean 5.16 pg/2C; RBG Kew DNA C-values database). The comparisons of Cx-values to the phylogeny (Fig. 3) suggests that the high content of nuclear DNA in section *Ripariae* is a derived condition. As in other plant genera (review in Grover and Wendel, 2010), differential proliferation of transposable elements (TEs) might explain the majority of genome size differences among *Oxalis* species not related to polyploidy, although no transposable element has been characterized yet for the genus. Retrotransposons are ubiquitous in plants and it is now well-known that they are important players in the evolution

of plant genome size. Moreover, recent publications have shown that plant genomes undergo genome size increases through bursts of retrotransposition events and that they can reach such high numbers of copies that they constitute more than half the genome of a species (Bennett and Leitch, 2005). For example, in maize more than 75% of the nuclear genome is occupied by retroelements and a duplication of the genome in species such as *Capsicum annuum* L. and *Oryza australiensis* Domin. have been shown to be due to amplification of different retrotransposon families (Park et al., 2012; Baucom et al., 2009; Piegu et al., 2006). Thus, massive amplifications of retrotransposons could account for the highest C-values observed in section *Ripariae* lineage, reaching an almost 30-fold difference between this section and species in section *Corniculatae*.

A negative correlation between genome size and polyploidy has already been reported in other groups of angiosperms mainly at the family level (Grif, 2000; Peruzzi et al., 2009), where genera with high DNA content exhibit fewer polyploid events. The existence of a certain limit on the DNA amount per diploid genome may restrict polyploidy mainly because of a structural and-or functional incapacity of the nucleus to deal with such large DNA amounts (Grif, 2000). Thus, it is possible that the high 2C values in the $x = 5$ lineage have imposed some constraints to a whole-genome duplication in these taxa.

Heterochromatin percentage in both groups does not seem to account for major difference in nuclear DNA content as species in section *Ripariae* have only a few CMA⁺ bands in the short arm of acrocentric chromosomes. Moreover, some species in section *Corniculatae* such as *O. conorrhiza* seem to have a higher amount of heterochromatin in relation to nuclear DNA content.

4.4 From $n = 6$ to $n = 5$: descending disploidy and chromosome changes

The genus *Oxalis* has a great chromosome diversity and a fairly wide range of haploid chromosome numbers among diploid species: $n = 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11$ (Marks, 1956; de Azkue and Martinez, 1984; de Azkue, 2000). Chromosome base number has recently been defined as the one that most parsimoniously explains the chromosomal variability of a group of species and shows a clear relationship with the base number of the closest related groups (Guerra, 2000). Among the species of *Oxalis* $n = 7$ appears mainly in the bulbous species from South America and Africa. Based on its high frequency it was the first to be proposed as the basic number for the whole genus (Marks 1956). Later, $n = 6$ was found in a greater number of

Oxalis sections and is the most frequent in species of subgenus *Thamnoxys* (de Azkue, 2000). Subgenus *Thamnoxys* forms an early diverging grade or clade in *Oxalis* (Gardner and Emshwiller unpublished) supporting the idea that $n = 6$ is plesiomorphic and might represent the base number of the whole genus.

In this study, both the plotting of the chromosome data onto the combined phylogenetic tree, as well as the ancestral state reconstruction, support $x = 6$ as the most probable ancestral base chromosome for the group. Two kinds of chromosome number variation are related to phylogenetics and chromosome evolution: polyploidy and dysploidy. Whereas polyploidy is related to a multiplication of the entire haploid set, dysploidy implies a stepwise increase (ascending dysploidy) or decrease (descending dysploidy) of the original chromosome number (Guerra, 2000). Descending dysploidy in some genera is a consequence of the fusion of the long arms of acrocentric chromosomes (Robertsonian exchanges), various types of tandem fusion (Schubert and Lysak, 2011) or the consequence of more complex mechanisms (Guerra, 2000, 2008). In *Oxalis*, centromeric fusion events alone could not explain the variation in chromosome number and morphology observed in the extant karyotypes of section *Ripariae*. Among the species with $x = 5$, *O. sarmentosa*, *O. eriocarpa* and *O. paranaensis* showed a more symmetrical karyotype, in which the majority of the chromosomes were metacentric or submetacentric and only one or two pairs were acrocentrics, while *O. niederleinii* and *O. refracta* presented an asymmetric karyotype with just one pair of metacentric chromosomes and four pairs of acrocentrics (Naranjo et al., 1982; de Azkue, 2000; this work). These latter two species have an annual life cycle, which is considered a derived state. This leads to the proposal that there was an increase in the karyotype asymmetry during the karyological evolution of this lineage (de Azkue and Martínez, 1984). Our cytogenetic and molecular results suggest that symmetric karyotypes composed only of metacentric and submetacentric chromosomes are probably an ancestral condition in *Oxalis* whereas asymmetric ones, with one to four acrocentric chromosome pairs, appear to be derived, based on our results. The observed changes cannot be explained by simple reciprocal translocations but rather by a series of complex chromosome rearrangements, as observed for example in *Arabidopsis* (Lysak et al., 2006), and extensive genome amplification.

Further cytogenetic analyses considering additional samples within *Oxalis* as well as complementary phylogenetic data are necessary for an accurate inference of the evolution of

cytogenetic patterns in the whole genus. Nevertheless, our analyses have shown that chromosome and DNA content data in species of sections *Ripariae* and *Corniculatae* are more informative than the morphological characteristics used for establishing sectional boundaries. Moreover, phylogenetic analyses compared with cytogenetic data have shown that there are two different evolutionary trajectories in the two clades. Chromosome rearrangements and increase in genome size, possibly by retrotransposon amplifications probably occurred early in the diversification of section *Ripariae*, whereas polyploidy seems to have played the main role in chromosome evolution among members of section *Corniculatae*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. We are also grateful to the Program 'Programa de Estudante Convenio-Posgraduação' (PEC-PG, Brazil) and the InterAmerican Network of Academies of Science (IANAS, USA) for fellowships to MV. We would like to thank Jaroslav Doležal for the internal standard seeds that he kindly provided for this work, Dr. Pedro Fiaschi and people from the Museu Botânico Municipal de Curitiba, Paraná, Brazil, for the help and collaboration during field trips.

REFERENCES

- Bai, C., Alverson, W.S., Follansbee, A., Waller, D.M., 2012. New reports of nuclear DNA content for 407 vascular plant taxa from the United States. *Ann. Bot.* 110, 1623–1629.
- Baucom, R.S., Estill, J.C., Chaparro, C., Upshaw, N., Ansuya, J., Deragon, J-M., Westerman, R.P., SanMiguel, P.J., Bennetzen, J.L., 2009. Exceptional diversity, non-random distribution, and rapid evolution of retroelements in the B73 maize genome. *PLoS Genet.* 5(11): e1000732. doi:10.1371/journal.pgen.1000732.
- Bennett, M.D., Leitch, I., 2005. Nuclear DNA in angiosperm: progress, problems and prospects. *Ann. Bot.* 95, 45–90.
- Bayer, R.J., 1998. New perspectives into the evolution of polyploidy complexes. *Proc. VIIth Symp. IOPB, Amsterdam* LWD van Raamsdonk & JCM den Nijs, editors. 359–373.
- Cabral, J.S., Felix, L.P., Guerra, M., 2006. Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genet. Mol. Biol.* 29, 659–664.

- De Azkue, D., 2000. Chromosome diversity of South American *Oxalis*. Bot. J. Linn. Soc.. 132, 143–152.
- De Azkue, D., Martínez, A., 1984. Variación del cariotipo, volumen nuclear y contenido de ADN en siete especies de *Oxalis*. Darwiniana 25, 267–277.
- De Azkue, D., Martínez, A., 1988. DNA content and chromosome evolution in the shrubby *Oxalis*. Genome 30, 52–57.
- Del Pero, M., de Azkue, D., 1984. Flavonoides en especies de *Oxalis*: su interpretación taxonómica y filogenética. Parodiana. 3, 151–168.
- Denton, M.F., 1973. A monograph of *Oxalis* section *Ionoxalis* (Oxalidaceae) in North America. Publ. Mus., Michigan State University Biological Series. 4, 455–615.
- Doležel, J., Godhde, W., 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. Cytometry 19, 103–106.
- Doležel, J., Greilhuber, J., Suda, J., 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. Nat. Protoc. 2, 2233–2244.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America 19, 11–15.
- Eiten, G., 1955. The typification of the names "*Oxalis corniculata* L." and "*Oxalis stricta* L.". Taxon 4, 99–105.
- Eiten, G., 1963. Taxonomy and regional variation of *Oxalis* section *Corniculatae*. I. Introduction, Keys, and Synopsis of the Species. Am. Midl. Nat. 69, 257–309.
- Emshwiller, E., 2002. Biogeography of the *Oxalis tuberosa* alliance. Bot. Rev. 68, 128–152.
- Emshwiller, E., Doyle, J.J., 2002. Origins of domestication and polyploidy in Oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae). 2. Chloroplast expressed glutamine synthetase data. Am. J. Bot. 89, 1042–1056.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence-limits on phylogenies—an approach using the bootstrap. Evolution 39, 783–791.
- Gardner, A., Vaio, M., Guerra, M., Emshwiller, E., 2012. Diversification of the American bulb-bearing *Oxalis* (Oxalidaceae): Dispersal to North America and modification of the tristylous breeding system. Am. J. Bot. 99, 152–164.
- Grif, V.G., 2000. Some aspects of plant karyology and karyosystematics. Int. Rev. Cytol. 196, 131–175.
- Grover, C.E., Wendel, J.F., 2010. Recent insights into mechanisms of genome size change in plants. Journal of Botany Article ID 382732, doi:10.1155/2010/382732.

- Guerra, M., 2000. Chromosome number variation and evolution in monocots. In Wilson KL, Morrison DA (eds): *Monocots: Systematics and Evolution*. pp 127–136 (CSIRO, Melbourne).
- Guerra, M., 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet. Genome Res.* 120, 339–350.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Heibl, C., Renner, S., 2012. Distribution models and a dated phylogeny for Chilean *Oxalis* species reveal occupation of new habitats by different lineages, not rapid adaptive radiation. *Syst. Biol.* 61, 823–834.
- Kapoor, B.M., Ramcharitar, S., 1982. In IOBP chromosome number reports LXXVI. *Taxon* 31, 596–597.
- Knuth, R., 1930. Oxalidaceae. In: A. Engler (ed.) *Das Pflanzenreich*. IV 130, Leipzig. 481pp.
- Köehler, S., Cabral, J., Whitten, W.M., Williams, N.H., Singer, R.B., Neubig, K.M., Guerra, M., Souza, A.P., Amaral, M.C.E., 2008. Molecular phylogeny of the neotropical genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): species delimitation and insights into chromosome evolution. *Ann. Bot.* 102, 491–507.
- Kubešová, M., Moravcová, L., Suda, J., Jarošík, V., Pyšek, P., 2011. Naturalized plants have smaller genomes than their non-invading relatives: a flow cytometric analysis of the Czech alien flora. *Preslia* 82, 81–96.
- Lourteig, A., 1979. Oxalidaceae section extra-austroamericanae 2. *Oxalis* section *Corniculatae*. *Phytologia* 42, 57–198.
- Lourteig, A., 1994. *Oxalis* L. subgénero *Thamnoxys* (Endl.) Reiche emend. Lourteig. *Bradea* 7, 1–199.
- Lourteig, A., 2000. *Oxalis* L. subgenera *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Oxalis* y *Trifidus* Lourteig. *Bradea* 7, 201–629.
- Lovett Doust, L., Lovett Doust, J., Cavers, P.B., 1981. Fertility relationships in closely related taxa of *Oxalis*, section *Corniculatae*. *Can. J. Bot.* 59, 2603–2609.
- Luo, S., Zhang, D., Renner, S. S., 2006. *Oxalis debilis* in China: Distribution of flower morphs, sterile pollen and polyploidy. *Ann. Bot.* 98, 459–464.

- Lysak, M., Berr, A., Pecinka, A., Schmidt, R., McBreen, K., Schubert, I., 2006. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 103, 5224–5229.
- Maddison, D.R., Maddison, W.P., 2002 MacClade 4.05. Sinauer, Sunderland Massachusetts, USA.
- Maddison, W.P., Maddison D.R., 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>.
- Marks, G.E., 1956. Chromosome numbers in the genus *Oxalis*. *New Phytol.* 55, 120–126.
- Mathew, P.M., 1958. Cytology of Oxalidaceae. *Cytologia* 23, 200–210.
- Mulligan, G.A., 1984. Chromosome numbers of some plants native and naturalized in Canada. *Naturaliste Canad.* 111, 447–449.
- Nair, B.R., Kuriachan, P., 2004. Cytogenetic evidence of the evolution of *Oxalis corniculata* var. *atropurpurea* Planchón. *Cytologia* 69, 149–153.
- Naranjo, C.A., Mola, L.M., Poggio, L., Múlgura, M., 1982. Estudios citotaxonómicos y evolutivos de *Oxalis* (Oxalidaceae) I. *Bol. Soc. Arg. Bot.* 20, 183–200.
- Nesom, G.L., 2009. Again: taxonomy of yellow-flowered caulescent *Oxalis* (Oxalidaceae) in eastern North America. *J. Bot. Res. Inst. Tex.* 3, 727–738.
- Nishikawa, T., 2004. Chromosome counts of flowering plants of Hokkaido (24). *Journal of Hokkaido University of Education (Natural Sciences)* 55, 43–51.
- Oberlander, K.C., Emshwiller, E., Bellstedt, D.U., Dreyer, L.L., 2009. A model of bulb evolution in the eudicot genus *Oxalis* (Oxalidaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 51, 54–63.
- Oberlander, K.C., Dreyer, L.L., Bellstedt, D.U., Reeves, G., 2004. Systematic relationships in southern African *Oxalis* L. (Oxalidaceae): Congruence between palynological and plastid *trnL* - F evidence. *Taxon* 53, 977–985.
- Ornduff, R., 1972. The breakdown of trimorphic compatibility in *Oxalis*, section *Corniculatae*. *Evolution* 26, 52–65.
- Page, R.D.M., 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12, 357–358.
- Park, M., Park, J., Kim, S., Kwon, J.K., Park, H.M., Bae, I.K., Yang, T.J., Lee, Y.H., Kang, B.C., Choi, D., 2012. Evolution of the large genome in *Capsicum annuum* occurred through accumulation of single-type long terminal repeat retrotransposons and their derivatives. *The Plant Journal* 69, 1018–1029.

- Pérez-Alquicira, J., Molina-Freaner, F. E., Piñero, D., Weller, S. G., Martínez-Meyers, E., Rozas, J., Domínguez, C. A., 2010. The role of historical factors and natural selection in the evolution of breeding systems of *Oxalis alpina* in the Sonoran desert “Sky Islands”. *J. Evol. Biol.* 23, 2163–2175.
- Peruzzi, L., Leitch, I.J., Caparelli, K.F., 2009. Chromosome diversity and evolution in Liliaceae. *Ann. Bot.* 103, 459–475.
- Piegu, B., Guyot, R., Picault, N., Roulin, A., Saniyal, A., Kim, H., Collura, K., Brar, D.S., Jackson, S., Wing, R.A., Panaud, O., 2006. Doubling the genome size without polyploidization: dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. *Genome Res.* 16, 1262–1269.
- Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256.
- Rambaut, A., 2009. FigTree, tree figure drawing tool v1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Ramsey, J., Schemske, D.W., 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29, 467–501.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics.* 19, 1572–1574.
- Rutland, J.P., 1941. The Merton catalogue. A list of chromosome numbers of British plants, Supplement no. 1. *New Phytol.* 40, 210.
- Salter, T.M., 1944. The genus *Oxalis* in South Africa: A taxonomic revision. *S. Afr. J. Bot.* (Supplement 1), 1–355.
- Sarkar, A.K., Datta, N., Chatterjee, U., Hazra, D., 1982. IOPB chromosome number reports LXXVI. *Taxon* 31, 576–579.
- Schubert, I., Lysak, M.A., 2011. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends Genet.* 27, 207–216.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., Small, R.L., 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose non coding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *Am. J. Bot.* 94, 275–288.
- Sosenski, P., J. Fornoni, F. E. Molina-Freaner, S. G. Weller, and C. Domínguez. 2009. Changes in sexual organ reciprocity and phenotypic floral integration during the tristylous–distylous transition in *Oxalis alpina*. *New Phytologist* 185: 829–840.
- Stebbins, G.L., 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley, Reading, MA.

- Stuessy, T.F., Blösch, C., Villaseñor, J.L., Rebernig, C.A., Weiss-Schneeweiss, H., 2011. Phylogenetic analyses of DNA sequences with chromosomal and morphological data confirm and refine sectional and series classification within *Melampodium* (Asteraceae, Millerieae). *Taxon* 60, 436–449.
- Swofford, D.L., 2001. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4.0b.10 for 32-Bit Microsoft Windows. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Sykes, W.R., 2009. The *Oxalis corniculata* group. *N. Z. J. Bot.* 47, 107–113.
- Taberlet, P.L., Geilly, G., Bouvet, J., 1991. Universal primers for amplification on three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17, 1105–1109.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673–4680.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: a guide to methods and applications*, eds. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White. San Diego: Academic Press, Pp. 315–322.
- Watson, M.F., 1989. Nomenclatural aspects of *Oxalis* section *Corniculatae* in Europe. *Bot. J. Linn. Soc.* 101, 347–362.
- Weller, S. G., Domínguez, C. A., Molina-Freaner, F. E., Fornoni, J., LeBuhn, G., 2007. The evolution of distyly from tristyly in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the Sky Islands of the Sonoran Desert. *Am. J. Bot.* 94, 972–985.
- Xu, B.S., Weng, R.F., Zhang, M.Z., 1992. Chromosome numbers of Shanghai plants I. *Invest. Stud. Nat.* 12, 48–65.
- Zwickl, D.J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence data sets under the maximum likelihood criterion. PhD dissertation, University of Texas, Austin, Texas, USA.

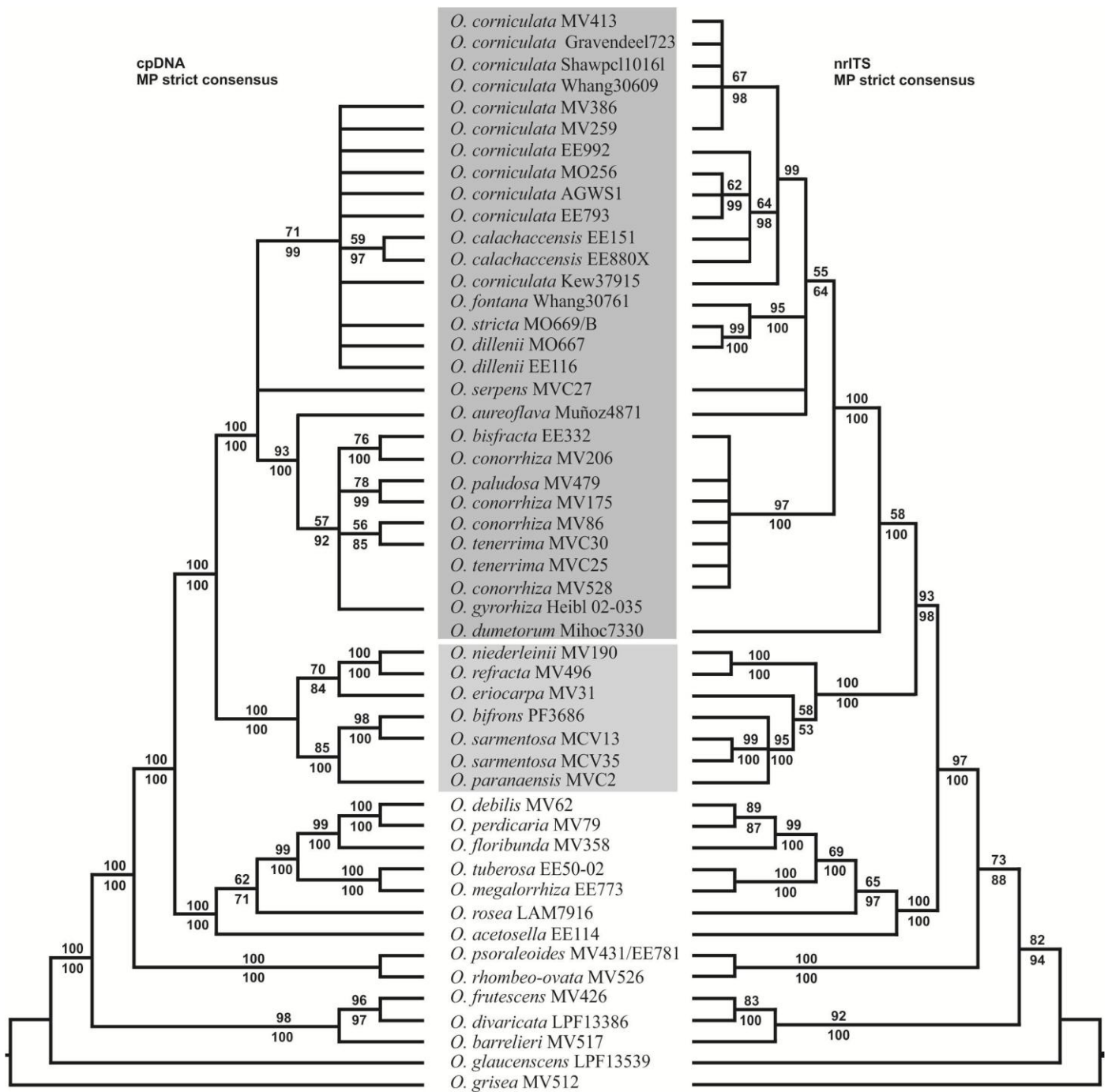


Figure 1. Maximum parsimony (MP) strict consensus topologies from plastid (cpDNA) and nuclear ribosomal transcribed spacer (nrITS) data for species of *Oxalis* sections *Ripariae* and *Corniculatae* and related taxa. Parsimony bootstrap scores are shown above branches and Bayesian posterior probabilities are below. Different gray tones indicate the two main clades retrieved for the species analyzed.

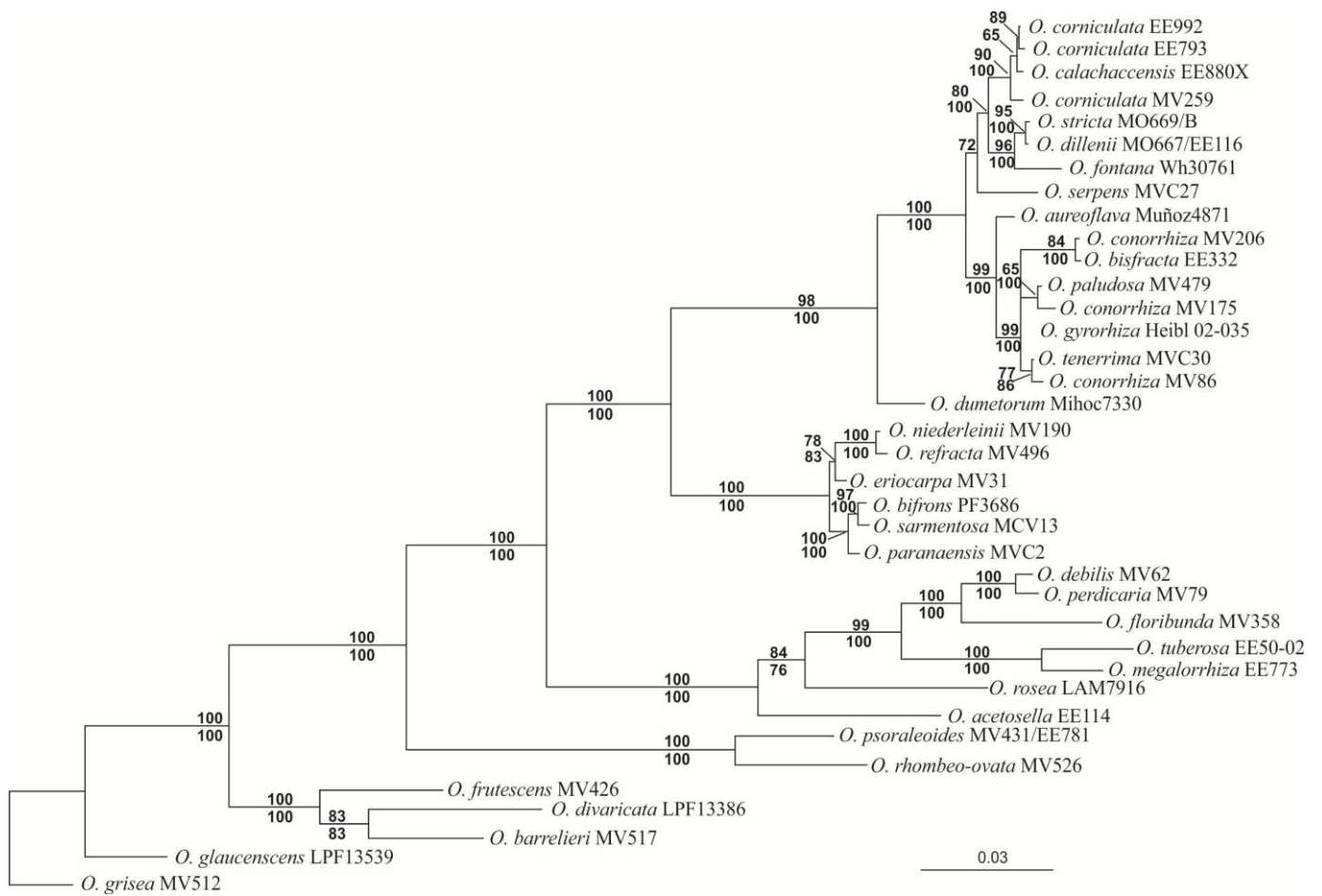


Figure 2. Maximum likelihood phylogeny of combined nuclear ribosomal internal transcribed spacer (nrITS) and plastid data set for species of *Oxalis* sections *Ripariae* and *Corniculatae* and related taxa. Parsimony bootstrap values are shown above branches and Bayesian posterior probabilities are below.

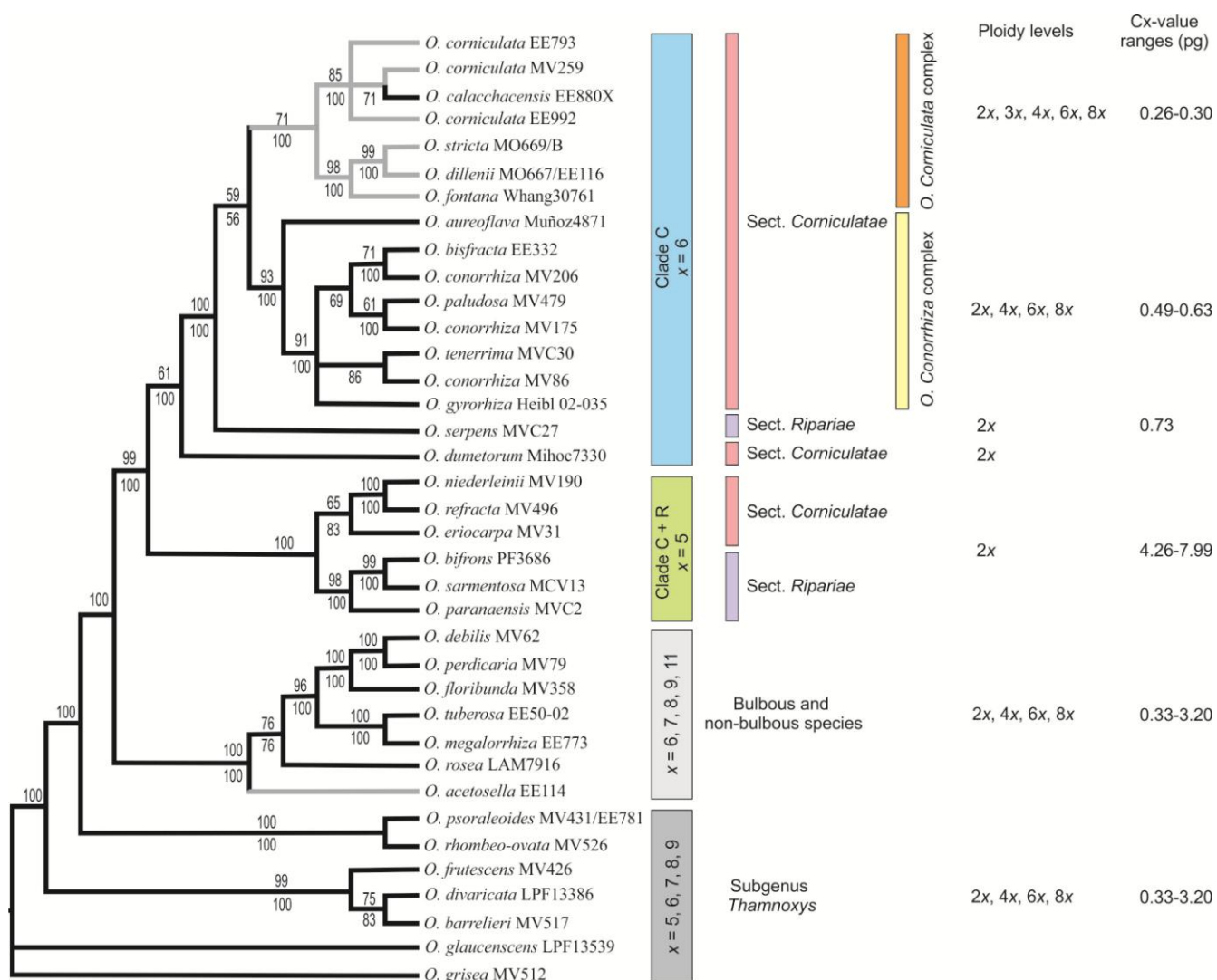


Figure 3. Bayesian inference (BI) majority-rule consensus topology of combined nuclear internal transcribed spacer (nrITS) and plastid data set for species of *Oxalis* from sections *Ripariae* and *Corniculatae*. Chromosome base number (x), ploidy levels, average Cx-values are presented for each group. Grey branches represent Northern Hemisphere and cosmopolitan species while black branches represent Southern Hemisphere ones.

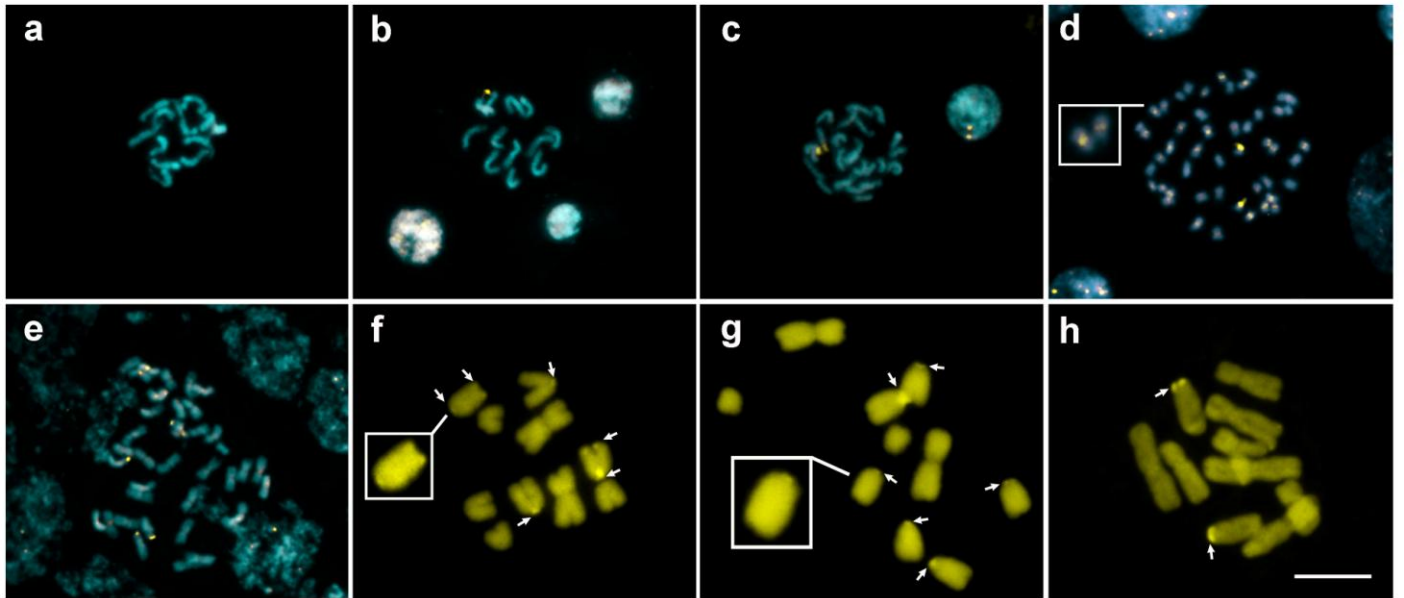


Figure 4. Heterochromatin pattern observed with CMA (b-h) and DAPI (a-e) fluorochromes in species from *Oxalis* section *Ripariae* (R) and *Corniculatae* (C). a. *Oxalis serpens* (R) $2n = 2x = 12$; b. *O. paludosa* (C) $2n = 2x = 12$; c. *O. stricta* (C) $2n = 4x = 24$; d. *O. corniculata* (C) $2n = 8x = 48$; e. *O. conorrhiza* (C) $2n = 6x = 36$; f. *O. niederleinii* (C) $2n = 2x = 10$; g. *O. refracta* (C) $2n = 2x = 10$; h. *O. eriocarpa* (C) $2n = 2x = 10$. Arrows in f-h point at CMA⁺ bands. Insert in e, f, and g shows small CMA⁺ bands. Bar represents 10 μ m.

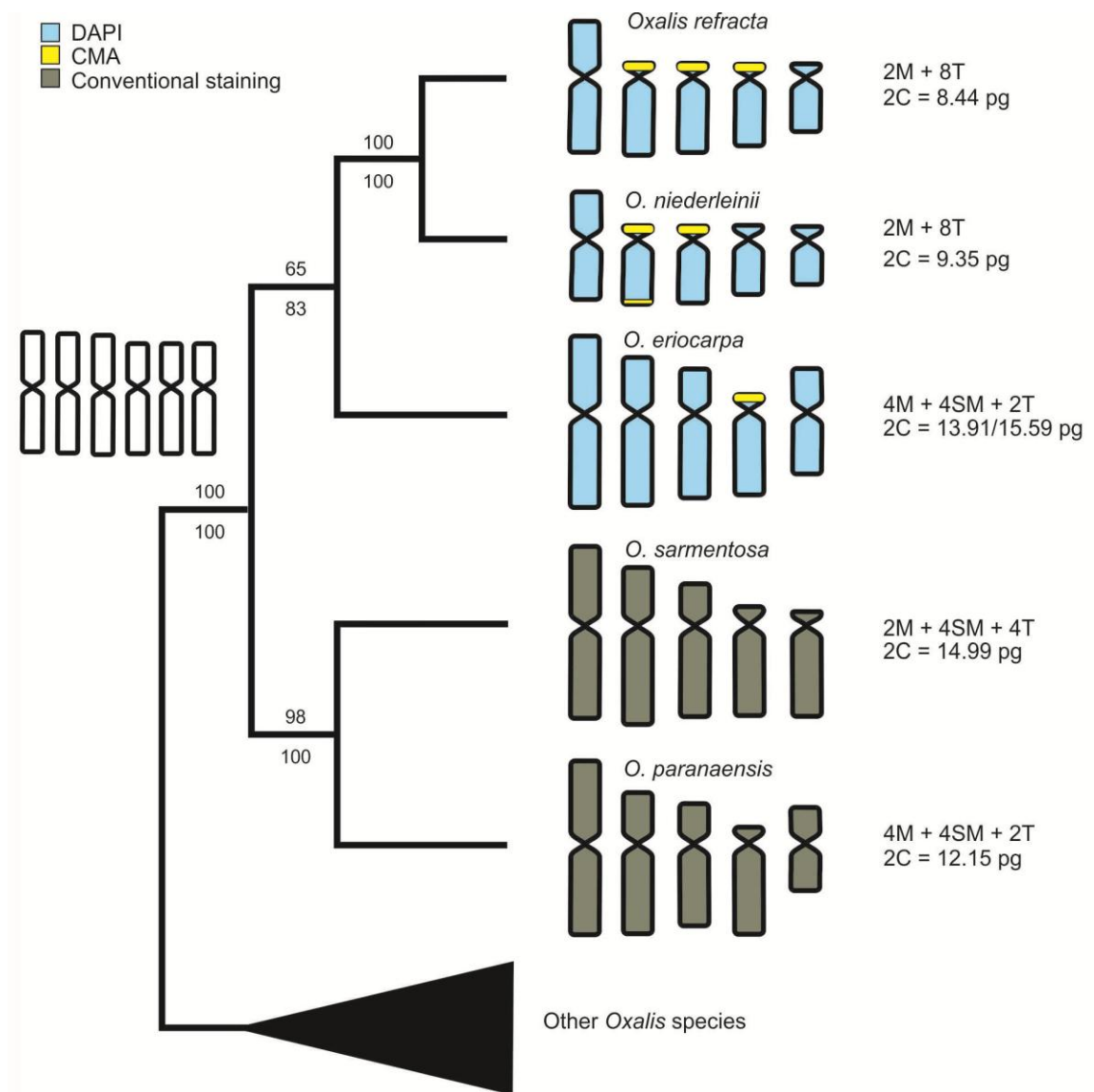


Figure 5. Phylogenetic relationships among different karyotype formulae and nuclear DNA content (2C values) for *Oxalis* species with $x = 5$. *Oxalis sarmentosa* and *O. paranaensis* idiograms, in light grey, are based on images from de Azkue and Martínez (1984). Blue and yellow in the idiograms of *O. refracta*, *O. eriocarpa* and *O. niederleinii* represent DAPI staining and CMA⁺ bands, respectively. Grey represents conventional staining for *O. paranaensis* and *O. sarmentosa* for which CMA/DAPI pattern is unknown. Idiogram for hypothetical ancestral karyotype ($x = 6$) is represented in white.

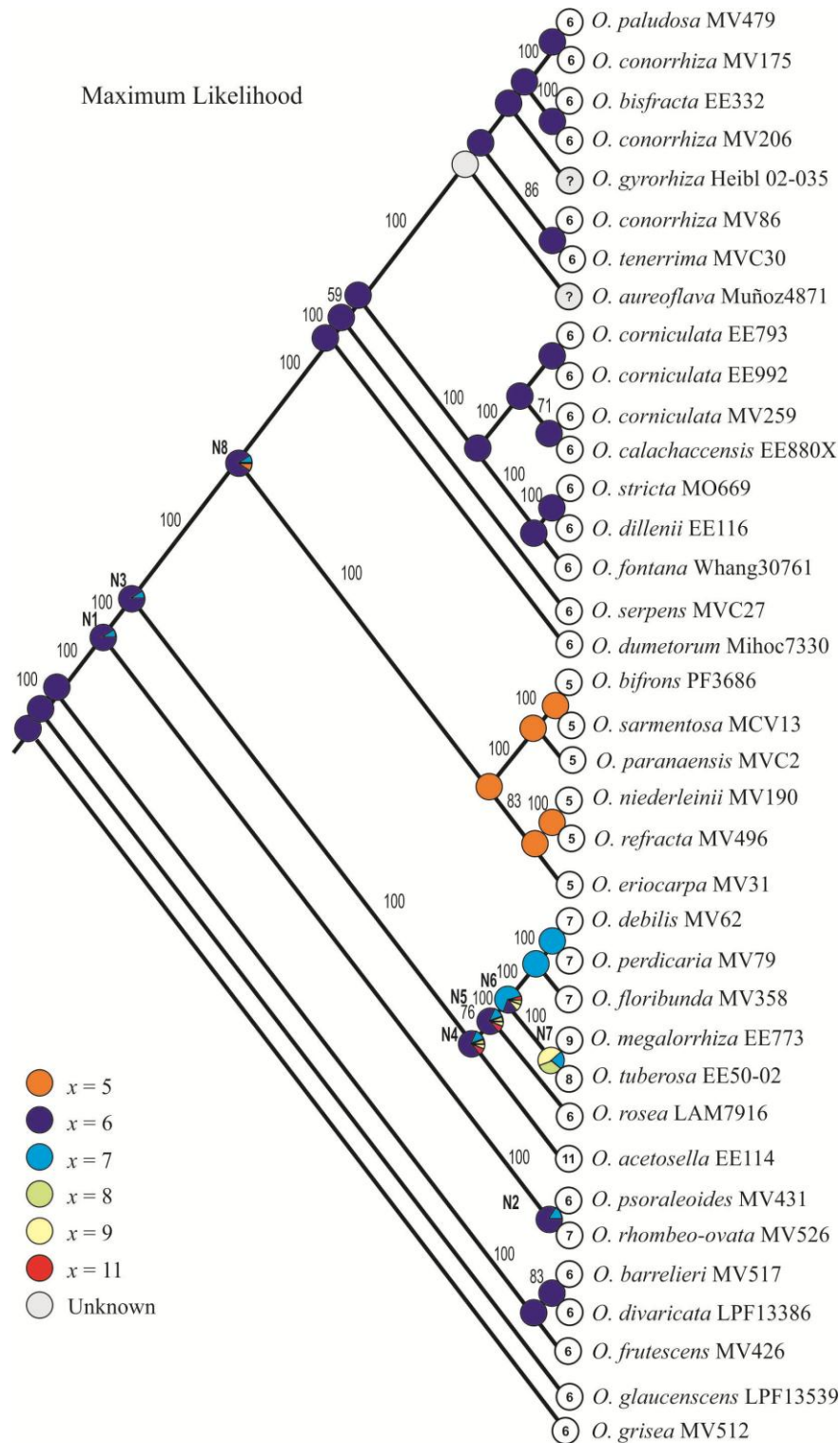


Figure 6. Ancestral state reconstruction of chromosome number for sections *Corniculatae* and *Ripariae*. The model of reconstruction used was maximum likelihood under the Markov k- state one- parameter (Mk1) model in Mesquite software. Ancestral state reconstruction was estimated using the 50% majority-rule topology obtained by Bayesian analysis of the three plastid and nuclear (nrITS) regions. Bayesian posterior probabilities are shown above branches. Node numbers are indicated in bold and proportional likelihoods for each of them are indicated in table A2. Chromosome numbers (n) are given for each species while hypothetical basic chromosome numbers (x) are represented by different colors.

Table 1. Species of sections *Corniculatae* and *Ripariae* analyzed cytogenetically and by flow cytometry with respective voucher and provenance information.

Species	Voucher	Provenance
<i>O. tenerrima</i> R. Knuth	PF3605	SC414, Mun. Luís Alvez, Santa Catarina, Brazil
	PF3653	Serra do Corvo branco, Urubici, Santa Catarina, Brazil
	MVSJ	São Joaquim, Urubici, Santa Catarina, Brazil
<i>O. serpens</i> A. St.-Hil.	PF3597	São José dos Pinhães, Paraná, Brazil
<i>O. corniculata</i> L.	MVRecife	CCB, Recife, Brazil
	MVFagro	Montevideo, Facultad de Agronomía, Uruguay
	MV386	Montevideo, Uruguay
<i>O. niederleinii</i> R. Knuth	MV190	Paysandú, R26 Km 40, Uruguay
	MV186	Paysandú, R26 Km 40, Uruguay
<i>O. paludosa</i> A. St.-Hil.	MVAn1	Rio Negro, Arroyo Negro, Uruguay
	MVAn2	Rio Negro, Arroyo Negro, Uruguay
	MVAn3	Rio Negro, Arroyo Negro, Uruguay
<i>O. eriocarpa</i> DC.	MV31	Cerro Largo, Sierra de Aceguá, Uruguay
	MV112	Rocha, R15 Km 36, Uruguay
<i>O. conorrhiza</i> Jacq.	MV206	Paysandú, R26 Km 154, Uruguay
	MV86	Rivera, FYMNSA, Uruguay
	MV175	Salto, R4 Km 90, Uruguay
<i>O. stricta</i> L.	MVMad	Madison, WI, USA

^a. MV Magdalena Vaio; PF Pedro Fiaschi.

Table 2. Chromosome number (2n), ploidy level (x), 2C-values and monoploid genome size data (Cx), in picograms for species of sections *Corniculatae* and *Ripariae*. Standard deviation for 2C-values are presented only for data determined in this study.

Species	2n	Ploidy level (x)	2C-values $\pm$ SD(pg)	1-Cx value (pg)
x = 6				
<i>O. corniculata</i> L.	12 ^a	2	--	--
	24 ^{b, c}	4	--	--
	36 ^d	6	--	--
	42 ^d	7	--	--
	48 ^{e, f, g}	8	2.28 $\pm$ 0.19 ^g	0.26 ⁱ - 0.29 ^g
<i>O. corniculata</i> var. <i>atropurpurea</i> Planch.	48 ^{f, g}	8	2.20 $\pm$ 0.03 ^g	0.28 ^g
<i>O. fontana</i> Bunge	24 ^h	4	--	--
	48 ^{i, d}	8	1.22 ⁱ	0.30 ⁱ
<i>O. stricta</i> L.	18 ^d	3	--	--
	24 ^{d, j, k, g}	4	1.10 ^l	0.27 ^g
<i>O. dillenii</i> Jacq.	18 ^d	3	--	--
	24 ^d	4	1.01 ⁱ	0.26 ⁱ
<i>O. paludosa</i> A. St. -Hil.	12 ^g	2	1.21 $\pm$ 0.04 ^g	0.61 ^g
<i>O. tenerrima</i> R. Knuth	--	--	3.99 $\pm$ 0.17 ^g	0.49 ^g
<i>O. bisfracta</i> Turcz.	36 ^m	6	--	--
<i>O. conorrhiza</i> [Feuillée] ex Jacq.	12 ^{m, n}	2	--	--
	24 ^{g, m, n}	4	2.53 $\pm$ 0.20 ^g	0.63 ^g
	36 ^{g, l, m}	6	3.73 $\pm$ 0.20 ^g	0.62 ^g
<i>O. serpens</i> A. St.-Hil.	12 ^{g, k}	2	1.47 $\pm$ 0.06 ^g	0.73 ^g
<i>O. dumetorum</i> Barnéoud	12 ^l	2	--	--
x = 5				
<i>O. niederleinii</i> R. Knuth	10 ^{g, o}	2	9.35 $\pm$ 0.11 ^g	4.68 ^g -5.57 ^o
<i>O. refracta</i> A. St.-Hil.	10 ^{g, n, o}	2	8.44 $\pm$ 0.11 ^g	4.22 ^g -4.62 ^o
<i>O. eriocarpa</i> DC.	10 ^{g, n, o}	2	13.91 $\pm$ 0.03 ^g	6.95 ^g -7.99 ^o
<i>O. sarmentosa</i> Zucc.	10 ^o	2	14.99 ^o	7.49 ^o
<i>O. paranaensis</i> Lourteig*	10 ^o	2	12.15 ^o	6.08 ^o

*Referred as *Oxalis* sp. in de Azkue and Martinez (1984) and described by Lourteig (2000) as *O. paranaensis*. **a.** Xu et al. (1992); **b.** Rutland (1941); **c.** Sarkar et al. (1982); **d.** Eiten (1963); **e.** Marks (1956) ; **f.** Nair and Kuriachan (2004); **g.** This work; **h.** Nishikawa (2004); **i.** Kubešová et al. (2011); **j.** Kapoor and Ramcharitar (1982); **k.** Mulligan (1984); **l.** Bai et al. (2012); **m.** de Azkue (2000); **n.** Naranjo et al. (1982); **o.** de Azkue and Martinez (1984). Chromosome numbers suggesting miscounts were excluded from the table.

Appendix A.1 *Oxalis* species, provenance, voucher and GenBank accession numbers.

Species	Provenance and voucher number	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnT-trnL</i>	<i>psbJ-petA</i>	ITS
<i>Section Corniculatae</i> DC.					
<i>O. corniculata</i> L.	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay; MV386	KC602060	KC602088	KC602036	---
<i>O. corniculata</i> L.	Bonança, Pernambuco, Brazil; MV413	---	---	---	KC602003
<i>O. corniculata</i> L.	Chachapoyas, Amazonas, Perú; EE793	EU437126	JN836851	JN836781	JN603192
<i>O. corniculata</i> L.	Madison, WI, USA; AGWS1	KC602056	KC602085	KC602032	KC602004
<i>O. corniculata</i> L.	Western Cape, South Africa; MO256, K. Oberlander 0025; Oberlander et al 2011	---	EU437361	---	EU436867
<i>O. corniculata</i> L.	Korea. CNU Whang 30690 ; Koo et al 2007.	---	---	---	EU274619
<i>O. corniculata</i> L.	Netherlands; Gravendeel 723; Heibl and Renner 2012	---	---	---	JN634730
<i>O. corniculata</i> L.	Hong Kong China; isolate shawpc1016I; Chan WH, Li M, Wong KL 2011.	---	---	---	JN407499
<i>O. corniculata</i> L.	Tucumán, Argentina; EE992	KC602057	KC602086	KC602033	KC602005
<i>O. corniculata</i> L.	Australia; KEW 37915	KC602058	---	KC602034	KC602006
<i>O. corniculata</i> var. <i>atropurpurea</i> Planch.	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay; MV259	KC602059	KC602087	KC602035	KC602007
<i>O. fontana</i> Bunge	Korea; CNU Whang 30761; Koo et al 2007.	---	---	---	EU274622
<i>O. stricta</i> L.	MO669; J. Walter 6518; Oberlander et al 2009.	EU437035	---	---	EU436869
<i>O. stricta</i> L.	Madison, US; strictaB	KC602061	KC602089	KC602037	---
<i>O. calachaccensis</i> R. Knuth	Manco Kapac, Copacabana, La Paz, Bolivia; EE151	EU437127	---	---	KC602008
<i>O. calachacensis</i> R. Knuth	Calca, Cusco, Perú; EE880X	KC602063	---	KC602038	KC602009
<i>O. bisfracta</i> Turcz.	Toralapa, Tiraque, Cochabamba, Bolivia; EE232	KC602065	KC602091	KC602039	KC602010
<i>O. dillenii</i> Jacq.	MO667; J. Walter 6565; Oberlander et al. 2009	EU437034	---	---	EU436868
<i>O. dillenii</i> Jacq.	Cook County, Illinois, Chicago. US; EE1160	KC602064	KC602090	---	---
<i>O. aureoflava</i> Steud.	Los Lagos, Chile; Munoz 4871; Heibl and Renner 2012	JN620122	---	---	JN634725
<i>O. paludosa</i> A. St.-Hil.	Orilla del Arroyo Negro, Río Negro, Uruguay; MV479	KC602066	KC602092	KC602040	KC602011
<i>O. tenerrima</i> R. Knuth	Colonia Johanisdorf, Paraná, Brazil; MVC30	KC602067	KC602093	KC602041	KC602012
<i>O. tenerrima</i> R. Knuth	Serra São Luiz de Purunua, Paraná, Brazil; MVC25	---	---	---	KC602013
<i>O. conorrhiza</i> [Feuillée] ex Jacq.	Predio de FYMNSA, Rivera, Uruguay; MV86	---	KC602094	---	KC602014
<i>O. conorrhiza</i> [Feuillée] ex Jacq.	R26 Km 154, Paysandú, Uruguay; MV206	KC602068	KC602095	KC602042	---
<i>O. conorrhiza</i> [Feuillée] ex Jacq.	R4 Km 90, Salto, Uruguay; MV175	KC602069	KC602096	---	KC602015
<i>O. conorrhiza</i> [Feuillée] ex Jacq.	Corrientes, Argentina; MV528	---	---	---	KC602016

A1. cont.

Species	Provenance and voucher number	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnT-trnL</i>	<i>psbJ-petA</i>	ITS
<i>O. gyrorhiza</i> Bertero ex Colla	Bio-Bio, Chile; Heibl 02-035; Heibl and Renner 2012	JN620129	---	---	---
<i>O. niederleinii</i> R. Knuth	R26 Km 40.4, Arroyo Araújo, Paysandú; MV190	KC602071	KC602098	KC602044	KC602018
<i>O. refracta</i> A. St.-Hil.	Pan de Azúcar, Maldonado, Uruguay; MV496	KC602072	KC602099	KC602045	KC602019
<i>O. eriocarpa</i> DC.	Sierra de Aceguá, Cerro Largo, Uruguay; MV31	KC602073	KC602100	KC602046	KC602020
<i>O. dumetorum</i> Barnéoud	Bio-Bio, Chile; Mihoc et al. 7330; Heibl and Renner 2012	---	---	---	JN634731
Section <i>Ripariae</i> Lourteig					
<i>O. serpens</i> A. St.-Hil.	BR-476, Km 204, Paraná, Brazil; MVC27	KC602070	KC602097	KC602043	KC602017
<i>O. bifrons</i> Progel	São Joaquim, Urubici, Santa Catarina, Brazil; PF3633	KC602074	KC602101	KC602047	KC602021
<i>O. sarmentosa</i> Zucc.	Ponta Grossa, Itaiacoaca, Paraná, Brazil; MVC13	KC602075	KC602102	KC602048	KC602022
<i>O. sarmentosa</i> Zucc.	Colonia Johanisdorf, Paraná, Brazil; MVC35	---	---	---	KC602023
<i>O. paranaensis</i> Lourteig	São José dos Pinhars, Paraná, Brazil; MVC2	KC602076	KC602103	KC602049	KC602024
Outgroups					
<i>O. debilis</i> Kunth	Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay; MV62	JN836760	JN836876	JN836806	JN836774
<i>O. perdicaria</i> (Molina) Bertero	R98, Treinta y Tres, Uruguay; MV79	JN836762	JN836878	JN836808	JN836772
<i>O. floribunda</i> Lehm.	Arroyo del Campamento, Rio Negro, Uruguay; MV358	JN836758	JN836861	JN836790	JN836767
<i>O. acetosella</i> L.	Ithaca, Tompkins, NY, US; EE114 Gardner et al. 2012	JN639537	JN836853	JN836783	JN836783
<i>O. tuberosa</i> Molina	Pisac, Cusco, Perú; voucher EE97:50-02	KC602077	KC602104	JN836787	JN603198
<i>O. rosea</i> [Feuillée] Jacq.	Chile; LAM7916	JN639538	JN836854	JN836784	JN603194
<i>O. megalorrhiza</i> [Feuillée] Jacq.	Ancash, Yungay, Perú; EE773	KC602078	JN836856	+++	JN603196
<i>O. psoraleoides</i> Kunth	Areia, Paraíba, Brazil; MV431	---	KC602109	KC602054	KC602030
<i>O. psoraleoides</i> Kunth.	Celendín, Cajamarca, Perú; EE781	EU437128	---	---	---
<i>O. rhombeo-ovata</i> A. St.-Hil.	Poços Azuis, Iguaçu, Paraná; MV526	KC602084	KC602110	---	KC602031
<i>O. frutescens</i> L.	BR101, Sergipe, Brazil; MV426	KC602080	KC602106	KC602051	KC602026
<i>O. divaricata</i> Mart. ex Zucc.	Morro do Chapéu, Bahia, Brazil; LPF13386	KC602082	KC602111	KC602055	KC602028
<i>O. grisea</i> A. St.-Hil. et Naudin	Ceará, Brazil; MV512	KC602079	KC602105	KC602050	KC602025
<i>O. glaucescens</i> Norlind	São Sebastião de Umbuzeiro, Paraíba, Brazil; LPF13539	KC602083	KC602108	KC602053	KC602029
<i>O. barrelieri</i> L.	Ilhéus, Bahia, Brazil; MV517	KC602081	KC602107	KC602052	KC602027

A.2 Ancestral character state reconstruction on the combined plastid and ITS Bayesian inference analyses. Node numbers refer to numbers indicated in bold on the tree in Figure 6. Proportional likelihoods of reconstructions are indicated for each node.

node	$x = 5$	$x = 6$	$x = 7$	$x = 8$	$x = 9$	$x = 11$
1	0.01	0.95	0.02	0.01	0.01	0.01
2	0.01	0.83	0.13	0.01	0.01	0.01
3	0.03	0.91	0.02	0.01	0.01	0.01
4	0.01	0.71	0.12	0.02	0.03	0.10
5	0.01	0.71	0.13	0.02	0.03	0.08
6	0.01	0.28	0.48	0.07	0.10	0.04
7	0.01	0.07	0.11	0.31	0.48	0.01
8	0.10	0.84	0.02	0.01	0.01	0.01

5. CAPÍTULO II. Relações filogenéticas e citogenéticas entre as espécies de *Oxalis* da seção *Articulatae* (Oxalidaceae) com ênfase em *O. linarantha* Lourteig

Vaio M^{1,2}, Gardner A³, Emshwiller E³, Speranza P², Guerra M^{1,*}

¹ Laboratório de Citogenética e Evolução Vegetal, CCB, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil; ²Universidad de la República, Laboratorio de Genética, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguai; ³Department of Botany, University of Wisconsin-Madison, U.S.

RESUMO

A seção *Articulatae* Knuth do gênero *Oxalis* (Oxalidaceae) compreende um pequeno grupo de espécies com uma distribuição restrita ao sul da América do Sul. Ela foi originalmente composta por apenas quatro espécies (duas subespécies e uma forma), todas com caules rizomatosos subterrâneos e suculentos. Posteriormente, *Oxalis linarantha*, com bulbos tunicados, também foi incluída na seção. Para testar a monofilia da seção nós utilizamos três regiões de DNA cloroplastidial e uma nuclear (ITS) para construir uma filogenia molecular. Uma análise citogenética do grupo incluindo número cromossômico, distribuição da heterocromatina e determinação do conteúdo de DNA nuclear também foi realizada. Dados moleculares sugerem que a seção *Articulatae* deveria ser redefinida para incluir apenas aquelas espécies com caule rizomatozo enquanto o posicionamento de *O. linarantha* não foi resolvido. Citogeneticamente, todas as espécies apresentaram cariótipo simétrico, à exceção de *O. linarantha*, que possui um par cromossômico duas vezes maior, apesar de ter mantido o mesmo número haploide que as demais espécies diploides ($n = 7$). A poliploidia é comum na seção, com níveis de ploidia variando de $2x$ a $7x$ e um número cromossômico básico $x = 7$. Os conteúdos de DNA nuclear encontrados nas espécies da seção *Articulatae* estão entre os mais baixos para o gênero, enquanto o valor $2C$ de *O. linarantha* (0,58 pg) representa o valor mais baixo conhecido para o *Oxalis*. Esse novo valor estendeu a abrangência do tamanho de genoma para o gênero de 0,58 pg a 41,14 pg, representando uma diferença de mais de 70 vezes, uma das maiores variações infragenéricas conhecidas para angiospermas. Todos os dados sugerem que a seção *Articulatae* como definida aqui compõe um complexo poliploide de espécies de origem recente.

PALAVRAS-CHAVE ADICIONAIS: *Oxalis*, caules rizomatosos e bulbosos, filogenia, cariótipos, conteúdo de DNA nuclear.

*Autor para correspondência: msfguerra@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Oxalis é o maior gênero da família Oxalidaceae, com cerca de 500 espécies distribuídas principalmente em dois centros de diversidade, América do Sul e África do Sul (Lourteig 2000; de Azkue 2000). O estudo taxonômico mais recente das espécies Sul-americanas de *Oxalis* foi realizado por Lourteig (2000), que reconheceu dentro de *Oxalis* quatro subgêneros, *Monoxalis*, *Trifidus*, *Thamnoxys* (com 9 seções), e *Oxalis* (com 29 seções) baseadas principalmente em características morfológicas. Várias das seções de Lourteig para os subgêneros *Oxalis* e *Thamnoxys* pareceriam formar grupos naturais não apenas pela morfologia mas também por compartilhar características citogenéticas. A delimitação de seções e de espécies, entretanto, é uma atividade extremamente difícil, principalmente devido à plasticidade fenotípica e à ocorrência de hibridizações interespecíficas (Emshwiller and Doyle 2002). Por outro lado, dados moleculares provaram que ao menos alguns dos grupos taxonômicos de Lourteig (2000) necessitam de revisões taxonômicas. Por exemplo, análises moleculares de regiões de DNA plastidial e de sequências ITS mostraram que as seções *Corniculatae* e *Ripariae* do subgênero *Oxalis* não são monofiléticas e várias espécies incluídas anteriormente em *Corniculatae* por Lourteig são na verdade parte de *Ripariae* (Vaio et al. submetido). Dados citogenéticos e de conteúdo de DNA nuclear dão suporte às análises moleculares.

A seção *Articulatae* Knuth do subgênero *Oxalis* tem uma distribuição restrita ao sul da América do Sul (Uruguai, leste da Argentina e sul do Brasil e do Paraguai). No entanto, diversos taxa foram introduzidos em outras partes do mundo por conta do valor ornamental de suas flores e folhas (Lourteig 2000). A seção *Articulatae* como originalmente descrita por Knuth (1913, 1930) era confusa, incluindo diversas espécies que variavam na morfologia do caule (bulbos, pseudobulbos e rizomas), uma das principais características taxonômicas utilizadas na delimitação das seções. Lourteig (1982) redefiniu a seção *Articulatae* para incluir apenas aquelas espécies que possuem caules rizomatozos subterrâneos e suculentos, reduzindo a seção a quatro espécies, duas subespécies e uma forma: *O. monticola* Arechav., *O. lasiopetala* Zucc., *O. floribunda* Lehm., *O. floribunda* subsp. *ostenii* (Arechav.) Lourteig, *O. articulata* Savigny, *O. articulata* Savigny subsp. *rubra* (A. St. -Hil.) Lourteig e a forma *O. articulata* f. *crassipes* (Urb.) Lourteig. Depois, a mesma autora incluiu *Oxalis linarantha* Lourteig na seção *Articulatae* (Lourteig 2000), muito embora a morfologia do seu caule seja

bem diferente da do resto das espécies da seção. Além disso, análises moleculares recentes sugeriram que *O. linarantha* provavelmente não é proximamente relacionada pelo menos a algumas espécies da seção *Articulatae* (Gardner et al. 2012).

Números cromossômicos básicos são uma característica valiosa para delimitação infragenérica em *Oxalis* (Vaio et al. submetido; Emshwiller 1998; de Azkue and Martínez 1990). Porém, para as espécies da seção *Articulatae*, existem apenas algumas poucas contagens cromossômicas, restritas a acessos da distribuição oeste do grupo. Para as espécies *O. articulata* subsp. *articulata*, *O. floribunda* subsp. *floribunda* e *O. monticola* (Naranjo et al. 1992; de Azkue 2000), foram descritos citótipos com $2n = 14$ e um número cromossômico básico $x = 7$. Apenas duas contagens poliploides foram reportadas: a hexaploide *O. articulata* subsp. *rubra* ($2n = 6x = 42$) com $x = 7$ (Heitz 1927; Marks 1956) e a tetraploide *O. lasiopetala* ($2n = 4x = 24$) com $x = 6$ (Naranjo et al. 1982). A última possui um número cromossômico básico diferente daquele descrito para o resto da seção. Níveis de ploidia que variam de diploides a octaploides têm sido descritos para espécies de outras seções de *Oxalis* e tem sido sugerido que a poliploidia teve um papel importante na evolução do gênero como um todo (Naranjo et al. 1982; de Azkue 2000). A poliploidia é proeminente na especiação de plantas e em muitos casos é em parte responsável pela relação complexa de alguns grupos de plantas. Recentemente, trabalhos moleculares utilizando uma combinação dos marcadores uniparentalmente herdados de DNA de cloroplasto e os biparentalmente herdados de genes nucleares permitiram alcançar uma delimitação mais precisa de diversos grupos de espécies taxonomicamente complexos e ajudaram a elucidar as relações evolutivas entre espécies (Hörandl et al 2009). Regiões de DNA nuclear e plastidial também foram utilizadas para acessar a existência de evolução reticulada e até mesmo sugerir possíveis progenitores (Ramdhani et al. 2009). Dados citogenéticos são uma importante fonte de informação que podem auxiliar estudos filogenéticos (Guerra 2008). Eles não apenas permitem determinar a diferença nos níveis de ploidia, como também são ferramentas valiosas na determinação de espécies e gêneros (Stuessy et al. 2011). O conhecimento dos níveis de ploidia de materiais vegetais incluídos em análises filogenéticas é fundamental principalmente porque muitas das incongruências observadas em filogenias de múltiplos genes são devidas à aloploidia.

O presente trabalho objetiva 1) testar a monofilia da seção *Articulatae* do gênero *Oxalis* como definida por Lourteig e investigar a posição de *O. linarantha* em particular; 2) estudar as relações evolutivas entre todos os taxa na seção; e 3) investigar o papel dos

caracteres cariotípicos na evolução da seção. Para alcançar esses objetivos nós utilizamos análises filogenéticas moleculares de três regiões do DNA plastidial e uma do DNA nuclear, e análises citogenéticas do número cromossômico, da distribuição da heterocromatina e determinação do conteúdo de DNA nuclear.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal

A tabela suplementar 1 indica as espécies incluídas nas análises moleculares, procedência e número de acesso de todos os taxa. Todas as espécies, subespécies e variedades reconhecidas na seção *Articulatae* de *Oxalis* foram incluídas nas análises moleculares e citogenéticas. Além das cinco espécies reconhecidas foram incluídos também dois materiais identificados como prováveis novas espécies para a seção *Oxalis* sp. “Cuervos” e *Oxalis* sp. “Betete” (*E. Marchesi* comunicação pessoal). Os grupos externos incluídos, pertencentes a outras seções do subgênero *Oxalis*, foram selecionados baseados nas análises de Oberlander et al. (2009), Gardner et al. (2012) e Heibl e Renner (2012). As sequências para esses taxa foram baixados do GenBank. No caso das espécies *O. articulata* e *O. floribunda* nas análises da região nuclear foram incluídos vários acessos. Os materiais utilizados nas análises citogenéticas e de citometria de fluxo se apresenta na tabela 1. As plantas utilizadas nessas análises foram mantidas como uma coleção viva na Faculdade de Agronomia, Montevideú, Uruguai ou no jardim experimental do Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil e exsiccatas de todas as espécies se encontram mantidas no herbário Bernardo Rosengurt (Montevideú, Uruguai).

Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento

O DNA genômico total foi isolado a partir de folhas frescas ou mantidas em sílica-gel utilizando o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Três regiões plastidiais (*trnL-trnL-trnF*, *trnT-trnL*, e *psbJ-petA*) e uma região nuclear (nrITS) foram amplificadas utilizando os primers desenvolvidos por Taberlet et al. (1991) e Shaw et al. (2007) para as regiões plastidiais e por White et al. (1990) para a região nuclear.

Em resumo, as reações de PCR foram realizadas em uma reação de 25 µL contendo 0,4 unidades de Taq polymerase, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 µM de cada *primer* e 0,1mM de cada dNTP e num termociclador Eppendorf Mastercycler. Os programas consistiram em uma

etapa inicial de 5 min a 95°C, seguido de um ciclo de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C (*trnL-trnF* and *trnL-trnT*) ou 50°C (ITS) e 2 1/2 min a 72°C, a etapa final de elongação foi realizada por 5 min a 72°C. Para a região *petA-psbJ* se utilizou as condições descritas em Shaw et al. (2007). Os produtos da PCR foram purificados utilizando um kit de limpeza Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) e sequenciados pela MacroGen Inc. (Seoul, Korea) ou na plataforma de sequenciamento - LABCEN/CCB (Recife, Brasil). Todas as regiões foram sequenciadas em ambos os sentidos e as sequências foram submetidas ao GenBank.

No caso da espécie *Oxalis floribunda* ssp. *ostenii*, as sequências da região nuclear ITS se apresentaram como picos duplos e por tanto os produtos da PCR foram clonados no vetor pCR2.1-TOPO (Invitrogen) e transformados utilizando o kit para clonagem TOPO TA (Invitrogen). Oito colônias recombinantes foram selecionadas com base na amplificação de seus insertos por *colony PCR* (Sambrook et al. 1989) e sequenciados em ambos os sentidos.

Alinhamento das sequências e análises filogenéticas

Os alinhamentos das sequências foram gerados utilizando o programa ClustalW (Thompson et al. 1994) incluído no programa Bioedit 6.0.5 (Hall 1999). Posteriormente foram realizados ajustes manuais para melhorar os alinhamentos. Os alinhamentos para as três regiões plastidiais foram unidos e analisados em conjunto. As regiões plastidiais e nucleares foram analisadas isoladamente ou em combinação por máxima parcimônia (MP) e inferência Bayesiana (BI). As análises de máxima parcimônia foram realizadas no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2001) e todos os caracteres foram considerados como apresentando o mesmo peso. Para cada conjunto de dados foi realizada uma busca heurística utilizando 1.000 "*random taxon-addition starting trees*", "*tree bisection- reconnection branch swapping*" e "*Multrees on*", limitando os rearranjos a 100.000 e permitindo que somente uma árvore seja mantida em cada passo. Os suportes dos cladogramas foram analisados por bootstrap (BS) (Felsenstein 1985), calculados no PAUP* 4.0b10 com 1.000 réplicas de bootstrap e seguindo as condições de busca descritas anteriormente, com a exceção de 100 "*random-addition starting trees*" para cada réplica. Para as análises de inferência Bayesiana, foi determinado o modelo de evolução das sequências para cada marcador molecular utilizando o critério Akaike (AIC) implementado no programa jModelTest 0.1.1 (Posada 2008; Guindon and Gascuel 2003). As análises Bayesianas foram realizadas no programa Mr. Bayes v 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). Foram realizadas duas corridas independentes de

5.000.000 gerações. O primeiro 25% das árvores amostradas foi descartado como *burn-in*, e o resto das árvores foram combinadas e as probabilidades posteriores foram estimadas construindo uma árvore de consenso de maioria no PAUP* (Swofford 2001). As árvores foram visualizadas utilizando os programas TreeView (Page 1996) e FigTree v1.3.1 (Rambaut 2009).

Construção da rede filogenética

A rede de haplótipos foi construída baseada nas regiões de DNA plastidial no programa NETWORK v4.5.1.6 e baseada na função de Máxima Parcimônia. Na análise foram incluídas sequências para cada um dos representantes da seção *Articulatae* e *O. perdicaria* como grupo externo. *Oxalis linarantha* não foi incluída na matriz.

Análises citogenéticas

As espécies incluídas nas análises citogenéticas estão indicadas na tabela 1. Para as análises mitóticas botões florais jovens foram coletados e pré-tratados com 0,002 M 8-hidroxiquinoline, a 10°C por 20-24 h, fixados em Carnoy 3:1 (etanol/ácido acético glacial), por 2 a 24 h à temperatura ambiente, e estocados a -20°C. Para realizar as preparações citológicas os botões florais foram digeridos com uma mistura de 2% celulase e 20% pectinase (w/v), por uma a quatro horas a 37 °C, tratados com ácido acético 60%, por pelo menos 30 min, e esmagados em ácido acético 45%. Depois da remoção da lamínula por nitrogênio líquido, as lâminas foram secadas ao ar, envelhecidas por três dias à temperatura ambiente e estocadas no freezer a -20 °C.

Para a dupla coloração com os fluorocromos cromomicina A3 (CMA) e 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) foi seguido o protocolo descrito em Cabral et al. (2006). Exceto que as preparações citológicas foram coradas com 0,1 mg/ml CMA e 2 µg/ml DAPI por meia hora. As imagens das melhores células foram adquiridas utilizando um microscópio Leica DMLB equipado com câmera Cohu CCD e o software Leica QFISH. As imagens foram processadas com o programa Adobe Photoshop CS3 somente para brilho e contraste.

Determinação do conteúdo de DNA nuclear

As medições do conteúdo de DNA nuclear (valor 2C) foram realizadas seguindo o protocolo descrito em Doležel e Göhde (1995). Resumidamente, pequenos fragmentos de

folhas jovens foram cortados com uma lâmina de barbear junto com folhas da espécie utilizada como padrão vegetal interno numa placa de Petri contendo 0,6 mL do tampão Otto I (0,1 M ácido cítrico + 0,5 % Tween 20). Posteriormente foram filtradas com uma malha de 30 µm de poro num tubo de citômetro e adicionados 0,6 mL do tampão Otto II (0,4 M Na₂HPO₄.12H₂O) contendo RNase (50 µg/mL) e iodeto de propídeo (50 µg/mL). As amostras foram analisadas num citômetro de fluxo Partec CyFlow SL equipado com o programa Flomax (Partec). Para estimar o conteúdo de DNA foram realizadas medições em um a três acessos de cada espécie sendo cada material medido três vezes em dias consecutivos. No caso de *Oxalis* sp. "Betete" e *Oxalis* sp. "Cuervos" foram realizadas medições somente num indivíduo. Os padrões internos utilizados foram *Solanum lycopersicum* "Stupické polní rané" (2C = 1,96 pg), *Glycine max* "Polanka" (2C = 2,55 pg) e *Zea mays* "CE-777" (2C = 5,43 pg). Os padrões internos foram selecionados para cada espécie analisada de maneira que o conteúdo de DNA nuclear estivesse próximo, mas não superposto ao pico da amostra de *Oxalis* analisada. O valor 2C foi calculado como: (Média do pico da amostra/ Média do pico do padrão) x valor 2C do padrão interno (pg).

RESULTADOS

Relações filogenéticas evidenciadas pelo DNA plastidial

A matriz combinada, das três regiões plastidiais, estava constituída por 23 acessos representando 17 espécies pertencentes ao gênero *Oxalis* e foi formada por um total de 2443 sítios (*trnL-trnL-trnF*: 888 sítios; *trnT-trnL*: 721 sítios; *psbJ-petA*: 834 sítios) dos quais 2175 foram constantes, 154 não-informativos e 143 (aproximadamente 5%) informativos para a análise de parcimônia. Todas as árvores reconstruídas com as regiões de DNA plastidial, utilizando máxima parcimônia (MP) e inferência Bayesiana (IB), apresentaram a mesma topologia, exceto pelo clado *Articulatae*. Os modelos de evolução para os loci plastidiais foram: TIM1+G para *trnL-trnL-trnF*, TIM1 para *psbJ-petA* e TPM1uf + G para *trnT-trnL*. Com o tratamento dos *gaps* como dados faltantes as análises de parcimônia produziram árvores de 304 passos, com índice de consistência [IC] de 0,924 e índice de retenção [IR] de 0,937.

A árvore consenso de bootstrap recuperou dois cladogramas principais (A e B; Figura 1a) que apresentaram um suporte relativamente alto (BS = 90-84; PP = 97). O clado A incluiu os taxa bulbosos da África do Sul, enquanto que o clado B estava constituído por espécies das

seções *Articulatae*, *Palmatifoliae* juntamente com espécies bulbosas das Américas do Sul e do Norte (seções *Ionoxalis* e *Pseudobulbosae*). Dentro do clado B foram recuperados três subclados (C, D e F) porém as relações dentro dos mesmos não foram resolvidas. As espécies bulbosas americanas das seções *Ionoxalis* e *Pseudobulbosae* foram agrupadas em um clado (subclado C) com bom suporte (BS = 85; PP = 100). Já a seção *Articulatae* se apresentou como parafilética (subclados D e F). *Oxalis linarantha* (seção *Articulatae*) apareceu como uma espécie irmã dos taxa bulbosos da seção *Palmatifoliae* (BS = 68 e PP = 100; subclado E) enquanto que os demais representantes formaram um grupo monofilético com um alto suporte (subclado F; BS e PP = 100) sem resolver as relações entre as mesmas. Porém, as análises Bayesianas mostraram uma maior resolução para este grupo de espécies. As espécies da seção *Articulatae*, exceptuando *O. linarantha*, foram divididas em dois clados (Figura 1b) sendo o primeiro formado por *Oxalis articulata* subsp. *rubra*, *O. articulata* f. *crassipes* e *Oxalis* sp. "Betete" (PP = 72) e o segundo constituído por *O. articulata* subsp. *articulata*, *Oxalis* sp. "Cuervos", *O. lasiopetala*, *O. floribunda* subsp. *floribunda* e *O. floribunda* subsp. *ostenii* (PP = 65). As duas subespécies de *O. floribunda* se apresentaram como espécies irmãs (PP = 71). A relação entre os dois clados e *O. monticola* não foi resolvida.

Devido a falta de resolução nas análises filogenéticas das regiões plastidiais e as diferenças observadas entre as análises de MP e BI para as espécies da seção *Articulatae* foi contruída uma rede de haplótipos baseada nas sequências de DNA plastidial. A rede mostrou os mesmos agrupamentos observados nas análises Bayesianas e revelou que os haplótipos presentes em *O. lasiopetala*, *Oxalis* sp. "Cuervos" e *O. floribunda* subsp. *floribunda* e *O. floribunda* subsp. *ostenii* são derivados daquele presente em *O. articulata* subsp. *articulata*. Os taxa *Oxalis* sp. "Betete" e *O. articulata* subsp. *rubra* compartilham o mesmo haplótipo ancestral presente na variedade de flores brancas de *O. articulata*. Todos estes haplótipos aparecem como derivados daquele de *O. monticola*. (Figura 1c).

Região nuclear ITS (nrITS)

A matriz para a região nuclear ITS (nrITS) incluiu 36 acessos, representando as mesmas 17 espécies analisadas para as regiões plastidiais, que quando alinhadas as sequências, apresentaram um comprimento de 661 caracteres dos quais 446 foram constantes, 61 não-informativos e 154 (23,3%) informativos para a análise de parcimônia. As análises de MP resultaram em topologias com 347 passos, com IC de 0,766 e IR de 0,870. As análises de MP e IB apresentaram a mesma topologia. O modelo de evolução para a região nrITS foi TIM3ef + G. A maioria dos clados (A, C, E e F) evidenciados com as regiões de cpDNA foram identificados nas análises da região nuclear. Porém a relação encontrada entre os diferentes clados mostrou-se menos resolvida (Figura 2).

Os taxa pertencentes à seção *Articulatae* formaram uma linhagem bem suportada (clado F; Figura 3) tanto para MP (BS = 100) como IB (PP = 100), com exceção de *O. linarantha* que, em relação com aos demais representantes da seção e os taxa analisados, não foi resolvida. Para o clado F a árvore consenso estrito revelou dois clados principais (I e II) e *O. monticola*. O clado I apresentou um suporte baixo de 64% para parcimônia e moderado para IB (PP = 86) e está constituído pelos acessos diploides de *O. articulata* subsp. *rubra*, *Oxalis* sp. Betete, *O. articulata* subsp. *articulata*, *O. articulata* f. *crassipes*, *O. floribunda* subsp. *floribunda* e *Oxalis* sp. Cuervos. As três últimas espécies formaram um clado com baixo suporte de bootstrap (BS = 59) e alto IB (PP = 97). O clado II foi bem suportado tanto nas análises de MP como IB (100), tendo sido identificados dois subclados dentro deste clado. Um dos subclado incluiu as sequências para *O. floribunda* subsp. *ostenii* e um acesso tetraploide de *O. floribunda* subsp. *floribunda* (BS = 58 e PP = 51). O segundo subclado apresentou um alto suporte (BS = 86; PP = 99) sendo formado pelo diploide de *O. lasiopetala*, o tetraploide *O. floribunda* subsp. *floribunda* e o pentaploide *O. articulata* subsp. *articulata*.

As análises combinadas das regiões nrITS e cpDNA apresentaram as mesmas topologias que para a região nuclear quando analisadas com MP (resultados não apresentados). No entanto as análises de inferência Bayesiana recuperaram os mesmos clados e resolução que os observados para as regiões plastidiais (Figura 3).

Números cromossômicos, heterocromatina e conteúdo de DNA nuclear

Os dados citogenéticos e de conteúdo de DNA dos representantes da seção *Articulatae* são apresentados na Tabela 2. Todos os taxa analisados mostraram cariótipos simétricos

formado por cromossomos meta- e submetacêntricos (Figura 4) e um número cromossômico básico $x = 7$. Em *O. lasiopetala*, *O. articulata*, *O. monticola* e *O. floribunda* foi difícil distinguir os pares cromossômicos devido a similaridade observada nos tamanhos. No entanto, *O. linarantha* apresentou um cariótipo bimodal com um par cromossômico submetacêntrico duas vezes maior que os demais cromossomos do complemento (Figura 4a). Três níveis de ploidia ($2x$, $4x$ e $5x$) foram observados em *O. articulata* subsp. *articulata* e *O. floribunda* (Figura 4 g, h-i, Tabela 2). Todos os acessos de *O. floribunda* subsp. *ostenii* foram tetraploides com $2n = 28$ enquanto os acessos de *O. monticola*, *O. articulata* subsp. *rubra*, *O. articulata* f. *crassipes*, *O. lasiopetala*, *Oxalis* sp. "Cuervos" assim como *Oxalis* sp. "Betete" e *O. linarantha* foram diploides com $2n = 14$.

Os acessos das espécies *O. articulata* subsp. *articulata* (PF3656) e *O. floribunda* subsp. *floribunda* (PF3612) apresentaram um conteúdo de DNA nuclear correspondentes a citótipos pentaploides e heptaploides. Os diferentes níveis de ploidia não apresentaram uma distribuição geográfica específica. No centro da distribuição, no Uruguai, foram encontrados materiais diploides, tetraploides e pentaploides. Nos materiais coletados no sul do Brasil (no oeste da distribuição) foram observados somente acessos poliploides de *O. floribunda* e *O. articulata* subsp. *articulata*.

As bandas CMA⁺ foram observadas na região proximal dos cromossomos, geralmente ocupando a região centromérica de todas as espécies da seção *Articulatae*. Com exceção de *O. monticola* e *O. articulata* f. *crassipes*, que apresentaram bandas proximais em dois pares cromossômicos diferentes (Figura 4 b, f), todos os outros diploides apresentaram um par de bandas CMA⁺. Em *O. linarantha* a banda CMA⁺ foi localizada na região proximal do braço curto do maior par cromossômico do complemento, assim como uma região cromossômica marcada mais fortemente com DAPI, situada no braço longo deste par cromossômico (Figura 4 a). Foi observada uma correspondência entre número de bandas CMA⁺ e níveis de ploidia em um acesso tetraploide de *O. floribunda* subsp. *floribunda*, no tetraploide *O. floribunda* subsp. *ostenii* e em acessos tetraploides e pentaploides de *O. articulatae* subsp. *articulata* com quatro e cinco bandas respectivamente (Figura 4 g, i).

O conteúdo de DNA nuclear (valor $2C$) variou de 0,58 pg na espécie *O. linarantha* a 3,16 pg em um acesso de *O. articulata* subsp. *articulata* (Tabela 2). Entre os taxa diploides o conteúdo de DNA nuclear variou de 0,58 pg a 1,18 pg representando uma diferença de aproximadamente 600 Mbp (1pg = 978 Mbp; Doležel et al. 2003). Os valor Cx variaram de

0,29 pg no diploide *O. linarantha* a 0,59 pg no diploide de *O. lasiopetala*. Os acessos poliploides apresentaram valores de Cx similares situados entre 0,43 pg para o tetraploide de *O. floribunda* subsp. *floribunda* a 0,49 pg num pentaploide de *O. articulata* subsp. *articulata*.

DISCUSSÃO

Novos (mas antigos) limites para a seção *Articulatae* de *Oxalis*

A taxonomia da seção *Articulatae* de *Oxalis* foi esclarecida por Lourteig (1982) ao incluir somente aquelas espécies com caules caudiciformes. Posteriormente a mesma autora incluiu *O. linarantha* na seção baseada principalmente na presença de um rizoma nas amostras de herbário o qual descreveu como um rizoma fino e de cor marrom, com raízes longas e fibrosas, levando um pequeno bulbo também de cor marrom no extremo (Lourteig 2000). A presença de rizomas em *O. linarantha* não pode ser confirmada nas nossas observações realizadas em campo e análises em amostras de herbário. Além disso, todas as plantas coletadas apresentaram pequenos bulbos tunicados. Com exceção de uma amostra de herbário, todas as outras herborizadas estavam incompletas, incluindo os materiais previamente analisados por Lourteig. Isto pode ter levado a descrição equivocada do tipo de caule desta espécie e portanto sua inclusão na seção *Articulatae*. As análises moleculares prévias (Gardner et al. 2012) já tinham sugerido que *O. linarantha* provavelmente não faz parte desta seção. Porém, nessas análises prévias poucas espécies foram incluídas da seção *Articulatae*, formando ainda uma politomia basal com espécies de outras seções, de maneira que sua relação não foi totalmente resolvida. Todos os taxa reconhecidos por Lourteig (1982, 2000) para a seção *Articulatae* foram incluídos no presente trabalho e somente as espécies que apresentam um caule rizomatoso formaram um grupo monofilético, enquanto que *O. linarantha* apareceu num clado separado.

O número cromossômico básico para *O. articulata*, *O. floribunda*, *O. lasiopetala*, *O. monticola* é $x = 7$ com valores 2C variando entre 0,77 a 1,18 pg entre os acessos diploides. *Oxalis linarantha* compartilha o mesmo número cromossômico básico, característico da linhagem que contém espécies bulbosas e pseudobulbosas. As informações cariotípicas e de conteúdo de DNA nuclear (2C = 0,58 pg) separam claramente *O. linarantha* dos demais representantes da seção, sendo seu cariótipo classificado como bimodal, com um par cromossômico relativamente maior, característica que não foi observada nos demais taxa. Além disso, o valor 2C observado nesta espécie foi o menor dentre as espécies de *Articulatae*.

Desta maneira, tanto os dados moleculares, citogenéticos e de morfologia caulinar dão suporte às hipóteses prévias estabelecida para delimitar esta seção (Lourteig 1982), e sugerindo que *O. linarantha* seja excluída deste grupo.

O valor 2C obtido para *O. linarantha* corresponde ao menor conteúdo de DNA nuclear conhecido para o gênero. Previamente, o menor valor 2C conhecido em *Oxalis* era 0,81, tendo sido determinado em *O. megalorrhiza* ($2n = 2x = 16$) (Emshwiller 2002). Portanto, *O. linarantha* bem como os diploides da seção *Articulatae* analisados neste trabalho (2C = 0,77-1,20 pg) estão entre os menores genomas do gênero. Além disso, estes valores ampliam as diferenças conhecidas para o gênero de 0,58 pg em *O. linarantha* até 41, 14 pg em *O. psoraleoides* (Vaio et al. em preparação 3), que corresponde a uma diferença de mais de 70 vezes. Esta variação no tamanho do genoma representa uma enorme diferença no conteúdo de DNA nuclear sendo a maior variação infragênerica conhecida em angiospermas. Em geral, a variação média do conteúdo de DNA nuclear de um gênero é de cerca de três vezes, como observado em *Gossypium*, até 5-10 vezes como encontrado em *Scilla* ou *Vicia* (ver Bennet e Leitch 2005). Outra grande diferença foi reportada no gênero *Cuscuta* (Bennet e Leitch 2010) com valores 2C situados entre 1,16 e 65,54 pg, o que representa uma variação de aproximadamente 57 vezes. As diferenças encontradas no conteúdo de DNA nuclear em *Oxalis* são ainda mais impressionantes quando se considera que esta diferença é observada ao nível das espécies diploides *O. linarantha* ($2n = 14$) e *O. psoraleoides* ($2n = 12$). As mudanças no conteúdo de DNA nuclear são causadas principalmente por diferenças na proporção de sequências de DNA repetitivo, particularmente retroelementos, as quais parecem ter causado um impacto mais significativo no tamanho do genoma (Hawkins et al. 2009). As recentes análises filogenéticas e de conteúdo de DNA no gênero *Oxalis* têm sugerido que o conteúdo de DNA nuclear deste gênero era pequeno (Vaio et al. em preparação 2) sendo portanto, o tamanho do genoma em *O. linarantha* e do resto da seção *Articulatae* considerado uma condição plesiomórfica.

Em qual seção deveria ser incluída Oxalis linarantha?

Vários autores têm sugerido uma estreita relação entre as espécies bulbosas da África do Sul e as espécies bulbosas das Américas (seções *Ionoxalis* e *Oxalis*) assim como com os representantes pertencentes às seções *Articulatae*, *Palmatifoliae* e *Pseudobulbosae* que apresentam, respectivamente, caules caudiciformes, rizomiformes, bulbosos e bulbos rizomiformes, (Lourteig 2000; Estelita-Teixeira 1982). Essas sugestões de relações evolutivas

estão suportadas em várias sinapomorfias morfológicas como os ápices das sépalas e folíolos, dos nodos comprimidos e dos eixos simples dos caules (Gardner et al. 2012), além do mesmo número cromossômico básico $x = 7$ (de Azkue 2000) e dos dados moleculares (Oberlander et al. 2009; Gardner et al. 2012; Heibl e Renner 2012). Entre estas espécies, podem ser reconhecidos dois tipos de bulbos: bulbos tunicados (tipo cebola) característicos das espécies da África do Sul e bulbos imbricados (tipo lírio) característicos das espécies Americanas (Gardner et al. 2012). Os bulbos presentes em *Oxalis linarantha* são mais similares aos encontrados nos taxa africanos do que aqueles observados nas espécies das Américas. Porém, nem as regiões plastidiais ou ITS mostraram uma relação clara entre as espécies africanas e *O. linarantha*. Além disso, os dados plastidiais e as análises de inferência Bayesiana para as regiões nuclear e plastidial combinadas, sugerem que haja uma relação entre essa espécie com aquelas pertencentes à seção *Palmatifoliae*, confirmando a relação destas espécies com *O. adenophylla*, conforme relatado por Gardner et al. (2012).

As análises de outros genes nucleares poderiam fornecer informações adicionais sobre a posição de *O. linarantha* no gênero e esclarecer as relações evolutivas entre as diferentes estruturas de armazenamento. A determinação dos cariótipos e o conteúdo de DNA nas espécies da seção *Palmatifoliae* e Africanas poderiam também auxiliar no entendimento das relações entre estes grupos evolutivamente próximos.

A seção Articulatae, um complexo poliploide de origem recente

As contagens cromossômicas prévias para a seção *Articulatae* demonstraram que a maioria dos representantes eram diploides ($2n = 2x = 14$), exceto por poliploides para *Oxalis articulata* subsp. *rubra* ($2n = 6x = 42$) e *O. lasiopetala* ($2n = 4x = 24$) (Heitz 1927; Marks 1956; Naranjo et al. 1982; de Azkue 2000). Porém, nossas análises demonstraram que a poliploidia é comum na seção e que os níveis de ploidia podem variar de di- a pentaploide, com número cromossômico básico de $x = 7$. A contagem cromossômica prévia para *O. lasiopetala* ($2n = 4x = 24$; $x = 6$; Naranjo et al. 1982) são provavelmente resultantes de um erro de identificação taxonômica ou de contagem, uma vez que o número cromossômico básico sugerido não é encontrado nesta seção *Articulatae* nem em espécies bulbosas evolutivamente próximas. Interessantemente, todas as contagens cromossômicas revelaram que *O. articulata* subsp. *rubra* possui $2n = 2x = 14$ inclusive para a variedade de flores brancas, *O. articulata* subsp. *rubra* f. *crassipes*, que foi introduzida em outras partes do mundo e a diferença das contagens cromossômicas prévias de tetraploides. Em *O. articulata*, foram

observadas populações diploides, tetraploides e pentaploides enquanto que em *O. floribunda* foram encontrados diploides e tetraploides. Além disso, nossas análises de conteúdo de DNA sugeriram a presença de heptaploides em *O. articulata* mostrando que a poliploidia é comum na seção como observado no resto do gênero.

Os valores para conteúdo de DNA nuclear têm sido utilizados nas análises sistemáticas, demonstrando ser úteis na delimitação de espécies em vários gêneros de plantas (por exemplo, Zonneveld 2009). Nas nossas análises, as maiores diferenças observadas no conteúdo de DNA entre as espécies diploides, desconsiderando-se *O. linarantha*, foi entre *O. monticola* e *O. lasiopetala*, as quais apresentam evidentes características morfológicas que as distinguem do resto das espécies da seção. *Oxalis monticola* é uma espécie endêmica do Uruguai e restrita ao morro "Cerro Pan de Azúcar" localizado na região leste do país. Ela é morfológicamente diferente do resto das espécies principalmente devido à sua robustez e ausência de *calli* em todos os órgãos (Lourteig 2000). Cariotipicamente, apresenta o menor conteúdo de DNA da seção *Articulatae*, 0,77 pg (753 Mpb), bem como um padrão de heterocromatina caracterizado pela presença de quatro bandas CMA⁺ em vez de somente duas, como observadas nos demais taxa diploides. Baseado na morfologia, Lourteig (2000) sugeriu que estaria proximalmente relacionada com *O. articulata*, embora nenhuma similaridade em particular foi evidenciada neste trabalho. *Oxalis lasiopetala* é facilmente identificada em campo pelos seus folíolos bipartidos e glabros. Apresenta o maior valor 2C entre os diploides da seção *Articulatae* com 1,18 pg (1154 Mbp) e encontra-se distribuída do sul do Paraguai, Brasil, no leste e centro da Argentina e em todo o Uruguai (Lourteig 2000).

As filogenias consenso para as regiões plastidial e nuclear obtidas para os taxa da seção *Articulatae* mostraram baixa resolução ou baixo suporte de bootstrap, sugerindo que tenha ocorrido uma especiação recente e rápida neste grupo. Além disso, as incongruências entre os limites das espécies inferidas pelos marcadores moleculares e dados morfológicos são comuns em eventos recentes de especiação (Carstens e Knowles 2007). Essa especiação recente pode também resultar em espécies morfológicamente diferentes que apresentam mais de um citotipo (Ramdhani et al. 2009). Os padrões heterocromáticos observados nos citotipos poliploides revelaram que as bandas de CMA⁺ são proporcionais ao nível de ploidia, sugerindo também um evento de poliploidização recente. A baixa resolução molecular e as incongruências observadas também podem ser devido à existência de barreiras reprodutivas incompletas entre os taxa. A complexidade morfológica observada nas espécies da seção

Articulatae pode sofrer aumento se o fluxo gênico não for completamente interrompido por barreiras reprodutivas e estiver presente entre diferentes níveis de ploidia e linhagens (Ma et al. 2010).

As redes filogenéticas permitem visualizar informações conflitantes num determinado conjunto de dados e representar eventos evolutivos de uma forma mais realista que uma árvore filogenética (Ferrerri et al. 2011). Redes filogenéticas devem ser empregadas principalmente quando ocorrem eventos reticulados, como hibridização e transferência gênica horizontal (Huson e Bryant 2006). A rede filogenética mostrou que as sequências presentes nos diferentes taxa da seção *Articulatae* estariam aninhadas e todos os haplótipos seriam derivados do haplótipo presente em *O. monticola*. Isso sugere uma origem recente para a seção, como observado, por exemplo, no complexo de espécies poliploides de *Achillea millefolium* (Guo et al. 2012).

Outras análises ao nível populacional, com marcadores moleculares mais informativos (ex.: loci para microssatélites) são necessários para esclarecer as relações entre os diferentes componentes do complexo.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil. Agradecidos também ao "Programa de Estudante Convênio - Pós-graduação" (PEC-PG, Brasil), ao Fundo de Pesquisas em Sistemática (Systematic Research Fund -SRF, The Linnean Society of London) e a Rede Interamericana de Academias de Ciências (IANAS fellowships, USA) pelas bolsas à MV. Agradecemos também a Jaroslav Doležel pelas sementes utilizadas como padrões internos para as análises de citometria de fluxo, bem como a Eduardo Marchesi e a Pedro Fiaschi pela ajuda durante as viagens de coleta.

REFERENCIAS

- Bennett MD, Leitch IJ. 2005. Nuclear DNA amounts in Angiosperms: progress, problems and prospects. *Annals of Botany* 95: 45-90.
- Bennett MD, Leitch IJ. 2010. Plant DNA C-values database (release 5.0, Dec. 2010) <http://www.kew.org/cvalues/>.

- Cabral JS, Felix LP, Guerra M. 2006. Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology*. 29: 659–664.
- Carsten BC, Knowles LL. 2007. Estimating species phylogeny from gene-tree probabilities despite incomplete lineage sorting: an example from *Melanoplus* grasshopper. *Systematic Biology* 56: 400-411.
- de Azkue D. 2000. Chromosome diversity of South American *Oxalis*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 132: 143-152.
- Doležel J, Göhde W. 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry* 19, 103–106.
- Doležel J, Greilhuber J, Suda J. 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2, 2233 – 2244.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America* 19: 11–15.
- Emshwiller E. 2002. Biogeography of the *Oxalis tuberosa* alliance. *The Botanical Review* 68: 128-152.
- Emshwiller E, Doyle JJ. 2002. Origins of domestication and polyploidy in Oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae). 2. Chloroplast expressed glutamine synthetase data. *American Journal of Botany* 89: 1042-1056.
- Estelita-Teixeira ME. 1982. Shoot anatomy of three bulbous species of *Oxalis*. *Annals of Botany* 49: 805-813.
- Felsenstein J. 1985. Confidence-limits on phylogenies—an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Ferreri M, Qu W, Han B. 2011. Phylogenetic networks: a tool to display character conflict and demographic history. *African Journal of Biotechnology* 10: 12799-12803.
- Gardner A, Vaio M, Guerra M, Emshwiller E. 2012. Diversification of the American bulb-bearing *Oxalis* (Oxalidaceae): Dispersal to North America and modification of the tristylous breeding system. *American Journal of Botany* 99:152-164.
- Guerra M. 2008. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet Genome Res* 120: 339-350.
- Guo YP, Wang SZ, Vogl C, Ehrendorfer F. 2012. Nuclear and plastid haplotypes suggest rapid diploid and polyploidy speciation in the N hemisphere *Achillea millefolium* complex (Asteraceae). *BMC Evolutionary Biology* 12: 1471-2148.

- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Heibl C, Renner S. 2012. Distribution models and a dated phylogeny for Chilean *Oxalis* species reveal occupation of new habitats by different lineages, not rapid adaptive radiation. *Syst Biol* advance access DOI:10.1093/sysbio/sys034.
- Heitz E. 1927. Über multiple und aberrante chromosomzahlen. *Abh. Geb. Nature* 21: 47.
- Hörandl E, Greilhuber J, Klímová K, Paun O, Temsch E, Emadzade K, Hodálová I. 2009. Reticulate evolution and taxonomic concepts in the *Ranunculus auricomus* complex (Ranunculaceae): insights from analysis of morphological, karyological and molecular data. *Taxon* 58: 1194-1215.
- Huson DH, Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254-267.
- Knuth R. 1913. Drei neue Arten von ioxalis aus Süd Amerika. *Repert. Sp. Nov.* 12: 36.
- Knuth R. 1930. Oxalidaceae. In: A. Engler (ed.) *Das Pflanzenreich*. IV 130, Leipzig. 481pp.
- Lourteig A. 2000. *Oxalis* L. subgénero *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Oxalis* y *Trifidus* Lourteig. *Bradea* 7: 201-629.
- Lourteig A. 1982. Oxalidaceae extra-austroamericanae IV: *Oxalis* L. sectio *Articulatae* Knuth *Phytologia* 30(2): 130-142
- Lourteig A. 1982. Oxalidáceas. *Flora Ilustrada Catarinense*. Ed. R Reitz. 176pp
- Ma JX, Li YN, Vogl C, Ehrendorfer F, Guo YP. 2010. Allopolyploid speciation and ongoing backcrossing between diploid progenitor and tetraploid progeny lineages in the *Achillea millefolium* species complex: analyses of single-copy nuclear genes and genomic AFLP. *BMC Evolutionary Biology*. 10:100.
- Marks GE. 1956. Chromosome numbers in the genus *Oxalis*. *New Phytologist* 55: 120–126.
- Naranjo CA, Mola LM, Poggio L, Múlgura M. 1982. Estudios citotaxonómicos y evolutivos de *Oxalis* (Oxalidaceae) I. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 20: 183–200.
- Oberlander KC, Emshwiller E, Bellstedt DU, Dreyer LL. 2009. A model of bulb evolution in the eudicot genus *Oxalis* (Oxalidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51: 54-63.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.

- Ramdhani S, Barker NP, Baijnath H. 2009. Rampant non-monophyly of species in *Kniphofia* Moench (Asphodelaceae) suggests a recent Afromontane radiation. 2009. *Taxon* 58: 1141-1152.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- Sambrook, J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- Stuessy TF, Blösch C, Villaseñor JL, Rebernig CA, Weiss-Schneeweiss H. 2011. Phylogenetic analyses of DNA sequences with chromosomal and morphological data confirm and refine sectional and series classification within *Melampodium* (Asteraceae, Millerieae). *TAXON* 60 (2): 436–449.
- Swofford DL. 2001. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4.0b.10 for 32-Bit Microsoft Windows. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Taberlet PL, Geilly G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification on three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22: 4673-4680.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322 in *PCR protocols: a guide to methods and applications*, eds. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White. San Diego: Academic Press.
- Zonneveld BJM. 2009. The systematic value of nuclear genome size for all species of *Tulipa* L. (Liliaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 281: 217-245.

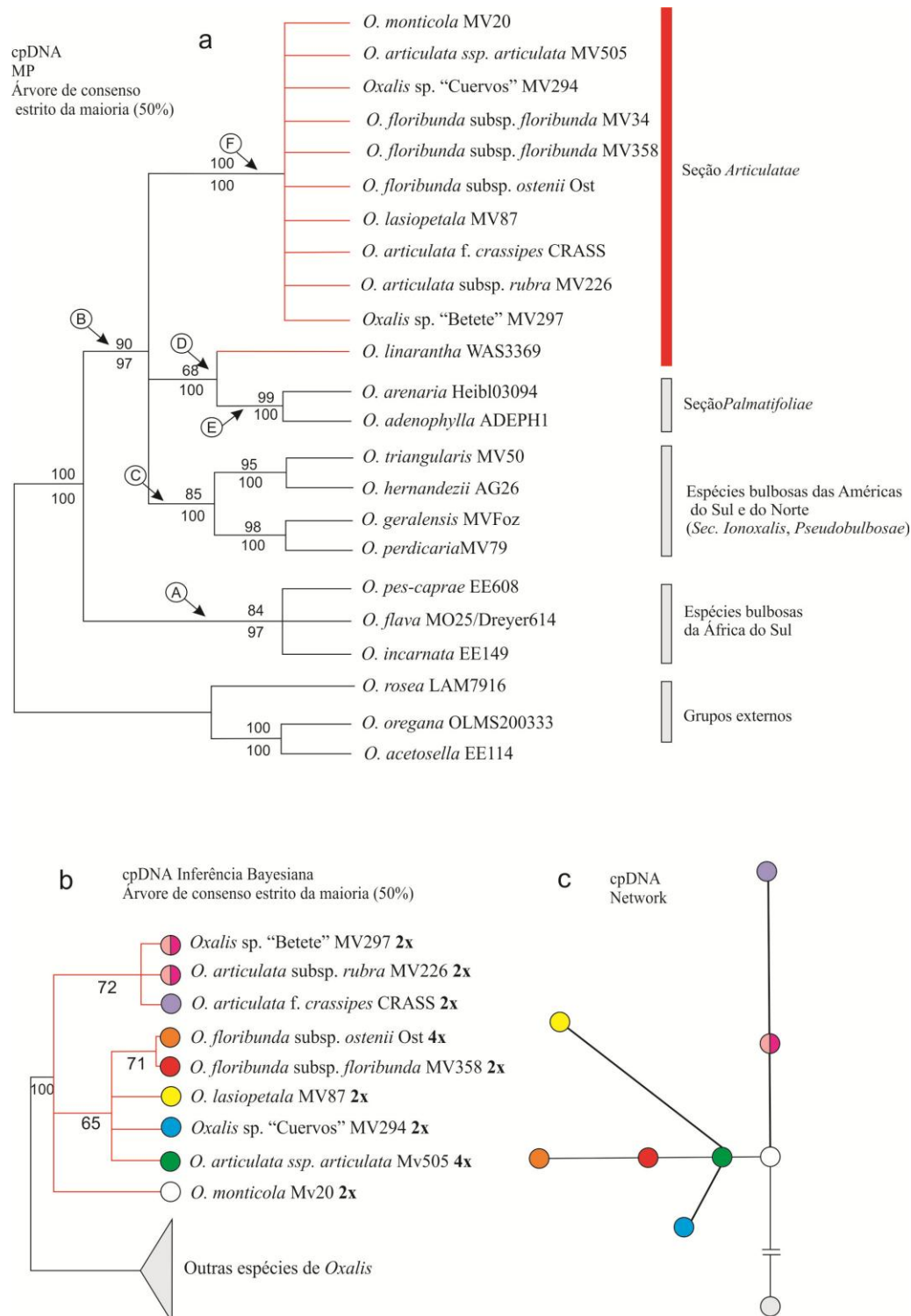


Figura 1. a. Árvore consenso da maioria (50%) obtida via análise de máxima parcimônia das regiões de DNA plastidial em espécies da seção *Articulatae* e outras seções de *Oxalis* que apresentam caules bulbosos e rizomatosos **b.** Árvore consenso da maioria resultado das análises de inferência Bayesiana (IB das regiões plastidiais). Os valores de bootstrap são apresentados acima dos ramos e as probabilidades posteriores das análises Bayesianas abaixo desses. As letras acima dos ramos indicam os clados discutidos no texto. **c.** Rede de haplótipos baseada nas regiões de DNA plastidial para as espécies do clado F.

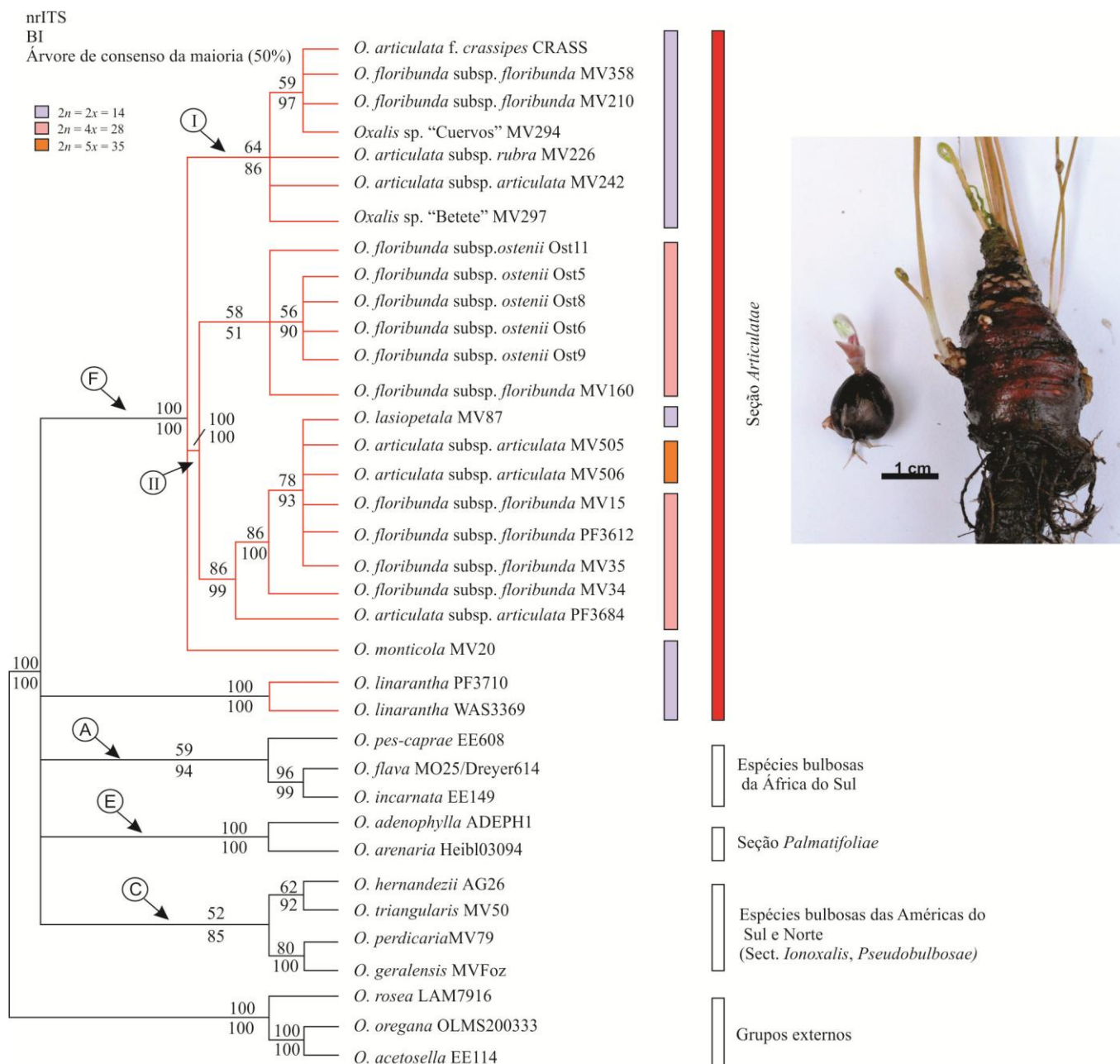


Figura 2. Inferências Bayesianas (IB) para a região nuclear ITS de taxa de *Oxalis* (seção *Articulatae*) e espécies relacionadas. Os níveis de ploidia estão indicados em cada acesso e representados por diferentes cores. Os suportes de bootstrap das análises de máxima parcimônia estão indicados acima dos ramos enquanto que as análises de probabilidade posterior das inferências bayesianas abaixo dos mesmos. As letras acima dos ramos se referem aos clados discutidos no texto. A foto ilustra a morfologia do bulbo para *Oxalis linarantha* (esquerda) e caule rizomatozo em *O. articulata* (direita).

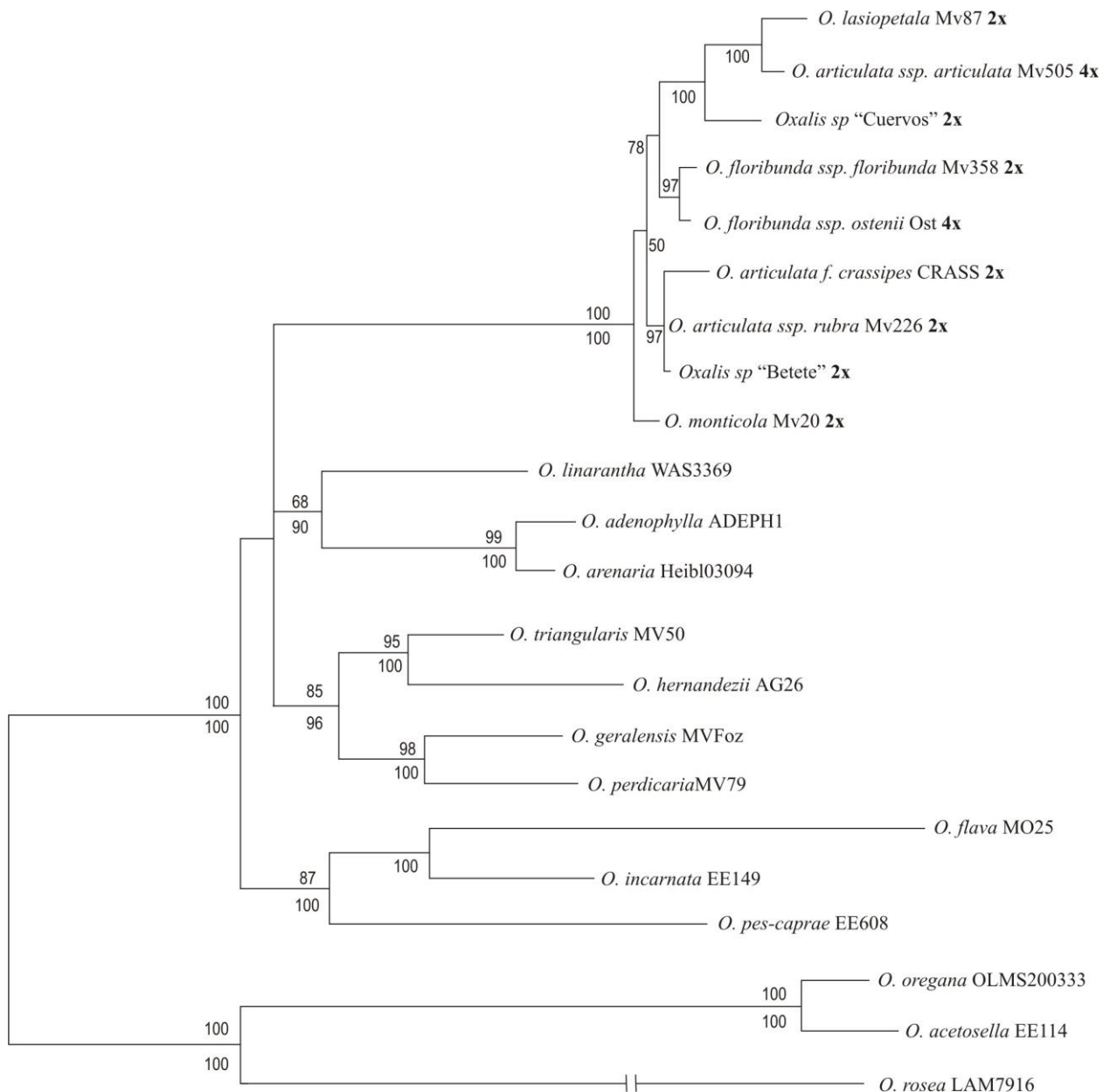


Figura 3. Inferências Bayesianas (IB) para as regiões plastidiais e a região nuclear ITS da seção *Articulatae* e espécies de *Oxalis* relacionadas. Os suportes de bootstrap das análises de máxima parcimônia estão indicados acima dos ramos enquanto que as análises de probabilidade posterior das inferências bayesianas aparecem abaixo.

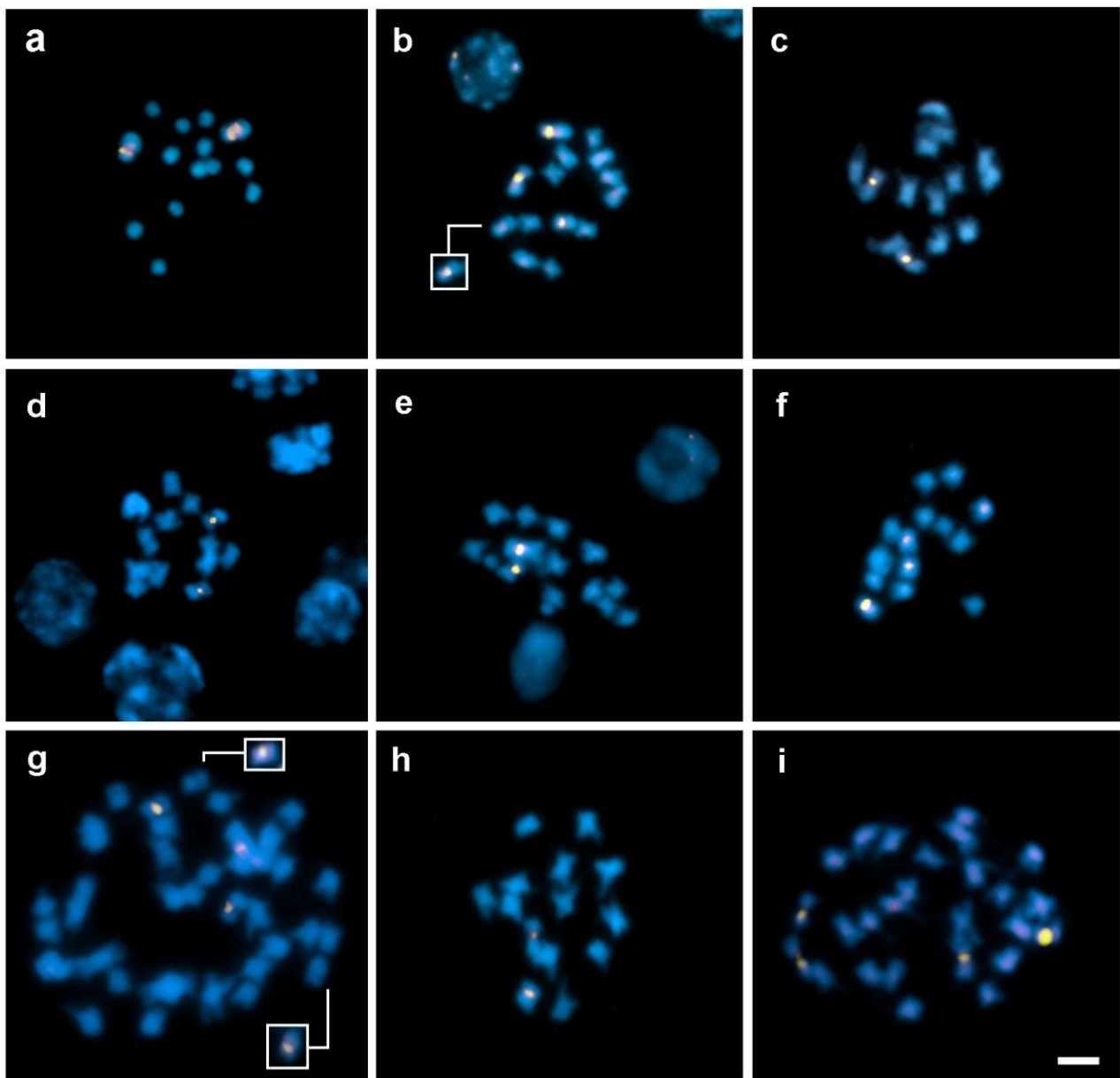


Figura 4. Padrão de heterocromatina observado com os fluorocromos CMA/DAPI presentes nas espécies da seção *Articulatae* **a)** *O. linarantha* $2n = 2x = 14$; **b)** *O. monticola* $2n = 2x = 14$; **c)** *O. lasiopetala* $2n = 2x = 14$; **d)** *Oxalis* sp. "Cuervos" $2n = 2x = 14$; **e)** *O. articulata* subsp. *rubra* $2n = 2x = 14$; **f)** *O. articulata* subsp. *rubra* f. *crassipes* $2n = 2x = 14$; **g)** *O. articulata* subsp. *articulata* $2n = 5x = 35$; **h)** *O. floribunda* subsp. *floribunda* $2n = 2x = 14$; **i)** *O. floribunda* subsp. *floribunda* $2n = 4x = 28$. Insertos em b e g representam bandas CMA⁺ pequenas. Barra em i representa 2.5 μm .

Tabela 1. Espécies da seção *Articulatae* de *Oxalis* utilizadas nas análises citogenéticas e de citometria de fluxo, com informação dos vouchers e procedências.

Espécie	Número do voucher	Procedência
<i>O. articulata</i> subsp. <i>articulata</i> Savigny	MV242	Sierra de Mahoma, San José, Uruguai
	MV158	Estancia Laureles, Rivera, Uruguai
	MV120	R15 Km 59, Rocha, Uruguai
	PF3691	Vacaría, Rio Grande do Sul, Brazil
	MV505	Desconhecido, Uruguai
	MV506	Desconhecido, Uruguai
	PF3684	Montenegro, Rio Grande do Sul, Brasil
	PF3656	Passo de Torres, Santa Catarina, Brasil
<i>O. articulata</i> subsp. <i>rubra</i> (A. St. - Hil.) Lourteig	PF3632	São Joaquim, Santa Catarina, Brasil
	MV226/MV227	Punta Gorda, Colonia, Uruguai
	MV483	Arroyo Negro, Rio Negro, Uruguai
<i>O. articulata</i> f. <i>crassipes</i> (Urb.) Lourteig	EECRAS2	Cultivada, Madison, WI, USA
<i>O. floribunda</i> subsp. <i>floribunda</i> Lehm.	MV15	Arroyo Sauce, Rivera, Uruguai
	MV358	Arroyo Campamento, Rio Negro, Uruguai
	MV243	Sierra de Mahoma, San José, Uruguai
	MV160	Estancia Laureles, Rivera, Uruguai
	MV210	R90 Km 70, Rio Negro, Uruguai
	MV258	R60, Km 27.7, Maldonado, Uruguai
	MV34/35	R8 Km 376, Cerro Largo, Uruguai
	PF3612	Santa Cecília, Santa Catarina, Brazil
<i>O. floribunda</i> subsp. <i>ostenii</i> (Arechav.) Lourteig	MVost	Paysandú, Uruguai
	MVGuichón	Guichón, Paysandú, Uruguai
	MVUru	R5 Km 487, Rivera, Uruguai
<i>O. linarantha</i> Lourteig	PF3688	Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil
	PF3710	Serra da Rosinha, Santa Catarina, Brasil
<i>O. lasiopetala</i> Zucc.	MV87	FYMNSA, Rivera, Uruguai
	MV361	El Ombú, Rio Negro, Uruguai
<i>O. monticola</i> Arechav.	MV19, MV20, MV21	Cultivada, Montevideo, Uruguai
<i>Oxalis</i> sp. 'Cuervos'	MV294	Quebrada de los Cuervos, Treinta y Tres, Uruguai.
<i>Oxalis</i> sp. 'Betete'	MV297	Cerro Betete, Maldonado, Uruguai

Tabela 2. Números cromossômicos, níveis de ploidia, conteúdo de DNA nuclear (valores 2C e Cx) nos acessos analisados da seção *Articulatae*.

Espécie	2n	Nível de ploidia	Valor 2C±SD (pg)	Valor Cx* (pg)	Acessos analisados**
<i>O. articulata</i> subsp. <i>articulata</i> Savigny	14	2	0,91±0.02	0,45	<u>MV242</u>
	28	4	1,77±0.06	0,44	<u>MV158</u> , MV120, PF3691
	35	5	2,44±0.06	0,49	MV505, <u>MV506</u> , PF3684
	--	--	3,16±0.07	--	PF3656
<i>O. articulata</i> subsp. <i>rubra</i> (A. St. - Hil.) Lourteig	14	2	0,97±0.08	0,48	PF3632, <u>MV226</u> , <u>MV227</u> , MV483
<i>O. articulata</i> f. <i>crassipes</i> (Urb.) Lourteig	14	2	--	--	<u>EECRAS2</u>
<i>O. floribunda</i> subsp. <i>floribunda</i> Lehm	14	2	0,91±0.06	0,45	<u>MV358</u> , MV210, MV258
	28	4	1,72±0.11	0,43	<u>MV15</u> , <u>MV34/35</u> , MV160, MV258
	--	--	2,43±0.03	0,49	PF3612
<i>O. floribunda</i> subsp. <i>ostenii</i> (Arechav.) Lourteig	28	4	1,72±0.11	0,44	<u>MVost</u> , <u>MVGuichón</u> , <u>MVUru</u>
<i>Oxalis monticola</i> Arechav.	14	2	0,77±0.04	0,38	<u>MV19</u> , <u>MV20</u> , MV21
<i>Oxalis lasiopetala</i> Zucc.	14	2	1,18±0.07	0,59	<u>MV87</u> , MV361
<i>Oxalis</i> sp. “ <i>Betete</i> ”	14	2	0,80±0.04	0,40	<u>MV297</u>
<i>Oxalis</i> sp. “ <i>Cuervos</i> ”	14	2	0,83±0.01	0,41	<u>MV294</u>
<i>O. linarantha</i> Lourteig	14	2	0,58±0.03	0,29	<u>PF3688</u> , PF3710

* Valor Cx: Valor 2C/ nível de ploidia; **Os acessos sublinhados representam aqueles com contagens cromossômicas. Os demais o nível de ploidia foi determinado por citometria de fluxo.

Tabela 1 suplementar. Espécies, número do voucher, procedência e número de acesso no GenBank (+++) de cada taxa de *Oxalis* incluídos no presente estudo.

Espécie (nível de ploidia)	Procedência, número de colecta	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnL-trnT</i>	<i>petA-psbJ</i>	ITS
<i>O. articulata ssp articulata</i> (5x)	Uruguai; MV505	+++	+++	+++	+++
<i>O. articulata ssp articulata</i> (5x)	Uruguai; MV506	+++	---	---	+++
<i>O. articulata ssp articulata</i> (2x)	R60, Km 29.5, Lavalleja, Uruguai; MV315	+++	---	---	+++
<i>O. articulata ssp articulata</i> (6x-4)	Montenegro, Rio Grande do Sul, Brazil; PF3684	---	---	---	+++
<i>O. articulata ssp articulata</i> (2x)	Sierra de Mahoma, R3 Km 126, San José, Uruguai; MV242	+++	---	---	+++
<i>O. articulata ssp articulata</i> (2x)	R9 Km 70, Rio Negro, Uruguai; MV210	+++	---	---	+++
<i>O. articulata f. crassipes</i> (2x)	EE463, Cultivada Madison, WI, USA	---	JN836859	JN836788	JN618506
<i>O. articulata f. crassipes</i>	CRAS2; Oberlander et al. 2009	EU437146	---	---	---
<i>O. articulata subsp. rubra</i> (2x)	Punta Gorda sobre o Río Uruguai R21, Colonia, Uruguai; MV226	+++	+++	+++	+++
<i>O. floribunda ssp floribunda</i> (2x)	Arroyo del Campamento, Rio Negro, Uruguai; MV358	JN836758	JN836861	JN836790	JN836767
<i>O. floribunda ssp floribunda</i> (5x)	R8 Km 376, Cerro Largo, Uruguai; MV34	+++	+++	---	+++
<i>O. floribunda ssp floribunda</i> (5x)	Mun. Santa Cecilia, Santa Catarina, Brazil; PF3612	+++	---	---	+++
<i>O. floribunda ssp floribunda</i> (4x)	Arroyo Sauce, Rivera; MV15	+++	---	---	+++
<i>O. floribunda ssp floribunda</i> (4x)	Estancia Laureles, Rivera; MV160	---	---	---	+++
<i>O. floribunda ssp floribunda</i> (4x)	R8 Km 376, Cerro Largo, Uruguai; MV35	---	---	---	+++
<i>O. “Cuervos”</i> (2x)	Quebrada de los Cuervos, Treinta y Três, Uruguai; MV294	+++	+++	+++	+++
<i>O. “Betete”</i> (2x)	Cerro Betete, Maldonado, Uruguai; MV297	+++	+++	+++	+++
<i>O. lasiopetala</i> (2x)	FYMNSA, Rivera, Uruguai; MV87	+++	+++	+++	+++
<i>O. floribunda subsp. ostenii</i> (4x)	Palmares de Yatay, Guichón, Paysandú, Uruguai	+++	+++	+++	+++
<i>O. linarantha</i> (2x)	Serra da Rocinha, Timbé do Sul, Santa Catarina, Brasil; PF3710	---	---	---	+++
<i>O. linarantha</i>	WAS3369	JN639541	JN836862	JN618508	+++
<i>O. monticola</i> (2x)	Cultivated, Uruguai; MV20	+++	+++	+++	+++
<i>O. triangularis</i>	Cultivated, Uruguai	+++	+++	+++	+++
<i>O. geralensis</i>	Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil	+++	+++	+++	+++
<i>O. perdicaria</i>	R98, Treinta y Tres, Uruguai; MV79	JN836762	JN836878	JN836808	JN836772
<i>O. hernandezii</i>	Gardner et al. 2012	JN639567	JN836896	JN836828	JN618533
<i>O. flava</i>	Oberlander et al. 2009, 2011	AJ582318	EU437372	---	EU436924
<i>O. incarnata</i>	Gardner et al. 2012	JN639542	JN836863	JN836791	JN618509
<i>O. pes-caprae</i>	Gardner et al. 2012	EU437145	---	JN836792	JN618510
<i>O. adenophylla</i>	Gardner et al. 2012	JN639550	JN836872	JN836802	JN618511
<i>O. arenaria</i>	Heibl and Renner 2012	JN620120	JN620087	---	JN634723

6. CAPÍTULO III. Diversificação cromossômica e evolução em espécies de *Oxalis*, subgênero *Thamnoxys* (Oxalidaceae).

Vaio M^{a, b}, Emshwiller E^c, Gardner A^c, Báez M^a, Felix LP^d, Guerra M^{a,*}

^a Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Vegetal, CCB, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil; ^bUniversidad de la República, Laboratorio de Genética, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay; ^cDepartment of Botany, University of Wisconsin-Madison, WI, USA. ^d Laboratório de Citogenética, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil.

RESUMO

Justificativa e objetivos- Entre as Angiospermas o subgênero *Thamnoxys* de *Oxalis* apresenta uma excepcional variação em números cromossômicos, números básicos, morfologia cromossômica e conteúdo de DNA. O objetivo do trabalho foi analisar essa variação num contexto filogenético.

Métodos- Analisamos os cariótipos de várias espécies do subgênero *Thamnoxys* segundo número cromossômico e bandeo com CMA/DAPI e o conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo. Os dados obtidos foram plotados numa árvore filogenética baseada na análise de três regiões plastidiais e uma nuclear (ITS).

Resultados principais- As análises citogenéticas, moleculares e uma análise de reconstrução do caráter ancestral sugerem que os números cromossômicos básicos ancestrais do subgênero seriam $x = 5$ ou $x = 6$ enquanto os demais números haploides ($n = 7, 8, 9, 11$) seriam derivados. A maioria das espécies do subgênero é diploide sendo o número mais frequente $2n = 12$ e a poliploidia parece estar restrita às espécies com cariótipos simétricos e baixo conteúdo de DNA. O conteúdo de DNA ancestral do subgênero aparentemente seria pequeno, tendo sofrido pelo menos dois grandes aumentos durante a evolução. Os resultados aqui obtidos para o valor 2C ampliam os extremos conhecidos para o grupo (1,19 a 41,14 pg), resultando em uma variação de aproximadamente 35 vezes.

Conclusões- O número ancestral para o subgênero seria $x = 6$ e os demais números seriam resultado de dispoloidias ascendentes. As diferenças no conteúdo de DNA parecem acompanhar a variação cromossômica observada e estariam relacionadas com o aumento da assimetria junto com combinações complexas de rearranjos cromossômicos.

Palavras chaves: *Oxalis*, *Thamnoxys*, evolução cromossômica, filogenia molecular, número cromossômico básico, assimetria cariotípica, rearranjos cromossômicos, conteúdo de DNA nuclear

INTRODUÇÃO

O gênero *Oxalis* L. está distribuído por quase todo o mundo, com aproximadamente 500 espécies e dois principais centros de diversidade: América do Sul e África, com 280 e 210 espécies, respectivamente (Knuth 1930, Salter 1944, Lourteig 2000). Os trabalhos taxonômicos mais recente reconhecem os subgêneros *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Trifidus* Lourteig, *Thamnoxys* (Endl.) Reich, e *Oxalis* diferenciados exclusivamente por características morfológicas (Lourteig 1983; 1994; 2000). Embora esses últimos trabalhos tenham estruturado melhor a taxonomia de *Oxalis*, a delimitação interespecífica continua difícil devido principalmente a três fatores: grande variação morfológica, alta plasticidade fenotípica e existência de hibridações interespecíficas (Emshwiller e Doyle 2002).

As espécies de *Oxalis* possuem também uma extensa variação cariotípica, embora somente 12% das espécies tenham sido analisadas. Foram encontrados números cromossômicos haplóides $n = 5, 6, 7, 8, 9$ e 11 e diversos poliploides relacionados, além de extensa variação no tamanho e morfologia cromossômica (Marks 1956, Naranjo et al. 1982; De Azkue e Martínez 1983, 1984, 1988, 1990; De Azkue 2000). As análises citogenéticas têm sido realizadas principalmente nos subgêneros *Oxalis* e *Thamnoxys* e embora os dois apresentem uma grande diversidade citogenética, o segundo destaca-se pela presença de uma maior variação na morfologia, assimetria cariotípica e conteúdo de DNA nuclear (De Azkue e Martínez 1983).

Os trabalhos de De Azkue e Martínez (1983; 1987; 1988; De Azkue 2000) mostraram uma grande variação cariotípica em espécies do subgênero *Thamnoxys* com cromossomos pequenos a grandes, acrocêntricos a metacêntricos e conteúdo de DNA nuclear desde 1,76 pg, em *O. alstonii*, até 33 pg em *O. psoraleoides* (syn. *O. dispar*). Segundo estes autores as diferenças no conteúdo de DNA estariam relacionadas tanto com as variações no tamanho cromossômico quanto com as diferentes morfologias cromossômicas. O aumento da assimetria nos cariótipos das espécies de *Thamnoxys* parece relacionado principalmente com o aumento no conteúdo de DNA (De Azkue e Martínez 1983). Dos seis números cromossômicos haplóides reportados para o gênero, cinco $n = 5, 6, 7, 8$ e 9 , ocorrem no subgênero *Thamnoxys*. Dentre estes números $x = 6$ foi proposto como o número ancestral do subgênero e do gênero pela sua maior representação nos taxa (De Azkue e Martínez 1983; De

Azkue 2000). Por outro lado, o número cromossômico básico $x = 7$ também foi sugerido como provável número ancestral baseado na sua maior frequência no gênero (Marks 1956). Entretanto, esta última hipótese não foi suportada nas análises posteriores tanto citogenéticas quanto nas análises moleculares (De Azkue 2000; Vaio et al. em preparação 1). Além disso, $n = 7$ não é mais considerado frequente no gênero (De Azkue 2000).

O último tratamento taxonômico para as espécies do subgênero *Thamnoxys* foi proposto por Lourteig (1994) baseado exclusivamente em dados morfológicos e de distribuição geográfica, sem tomar em consideração os dados cariológicos existentes. Esta autora reconheceu 71 espécies organizadas em nove seções: *Thamnoxys* Progel (27 espécies), *Foliosae* Progel (5), *Pleiocarpae* Knuth (1), *Robustae* (Progel) Lourteig (9), *Psoraleoideae* Lourteig (5), *Polymorphae* (Progel) Lourteig (8), *Hedysaroideae* DC. (6), *Phyllodoxys* Endl. (2) e *Holophyllum* Progel (8). Todas as seções são formadas por plantas arbustivas ou subarbustivas, com folhas trifolioladas, pinadas ou unifolioladas distribuídas pelas Américas Central e do Sul, tendo sido proposto como centro de origem para o subgênero os "campos" e "cerrados" do Brasil onde se apresenta mais diversificado (Lourteig 1994). As seções se diferenciam basicamente no tamanho das folhas, hábito, forma da cápsula e disposição das flores na inflorescência (Abreu 2011).

Os estudos filogenéticos moleculares para o gênero *Oxalis* são relativamente recentes e baseados essencialmente na análise de sequências não-codificantes de DNA plastidial e de ITS nuclear, além de um gene de cópia única que codifica para a enzima de expressão plastidial glutamina sintetase (*ncpGS*) (Emshwiller e Doyle 1998; 2002; Oberlander et al. 2004, 2009, 2011; Gardner et al. 2012; Heibl e Renner 2012). Nessas análises apenas uma espécie do subgênero *Thamnoxys* (*O. barrelieri*) havia sido incluída. Contudo, essas análises mostraram que as primeiras espécies a divergir seriam arbustos do subgênero *Thamnoxys* (Oberlander et al. 2004, 2009).

O entendimento das relações filogenéticas entre as espécies de um grupo é fundamental para determinar os possíveis mecanismos de evolução cariotípica e interpretar de forma correta o papel desses mecanismos na diversificação do grupo (Guerra 2012). Estas análises moleculares associadas a dados cromossômicos são relativamente recentes e têm permitido entender como as variações cariotípicas estão relacionadas com a diversificação de vários grupos de espécies (Vaio et al. 2005; Köehler et al. 2008; Souza et al. 2012). A evolução cromossômica do gênero *Oxalis* foi analisada num contexto filogenético apenas nas

seções *Corniculatae* e *Ripariae* do subgênero *Oxalis* permitindo sugerir que o número cromossômico ancestral para esses grupos seria $x = 6$ (Vaio et al. em preparação¹).

Neste trabalho foi construída uma filogenia baseada em sequências de DNA plastidial e nuclear e foi avaliado o papel das mudanças cromossômicas observadas no subgênero *Thamnoxyis* num contexto filogenético, incluindo espécies de seis seções do subgênero. Além das análises moleculares, foram realizadas análises do número, morfologia e tamanho cromossômico, distribuição da heterocromatina e conteúdo de DNA nuclear para a maioria das espécies incluídas na filogenia. Essas análises visaram: 1) avaliar como os diferentes parâmetros citogenéticos estão relacionados com a filogenia e a classificação taxonômica de Lourteig (1984); 2) avaliar a relação entre variação morfológica e o conteúdo de DNA nuclear, e 3) estimar a relação entre percentagem de heterocromatina e valor 2C.

MATERIAL e MÉTODOS

Material Vegetal

Foram incluídas nas análises moleculares 17 espécies pertencentes a seis das 11 seções do subgênero *Thamnoxyis* para as quais existiam dados citogenéticos ou os mesmos foram gerados neste trabalho. A tabela 1 indica a procedência e o número de acesso de cada um dos taxa. Sequências para as espécies de outros gêneros de *Oxalidaceae* foram baixadas do GenBank. Análises citogenéticas e de conteúdo de DNA foram feitas em 14 dessas espécies, tendo uma delas (*O. frutescens*) dois citótipos. As plantas foram mantidas no jardim experimental do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco e exsicatas de todas as espécies se encontram mantidas nos herbários UFP (UFPE) e EAN (UFPB).

Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento

O DNA genômico total foi isolado a partir de folhas frescas ou mantidas em sílica-gel utilizando o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Foram amplificadas três regiões plastidiais (*trnL-trnL-trnF*, *trnT-trnL*, e *psbJ-petA*) e uma região nuclear (nrITS). Para as amplificações foram utilizados os primers desenvolvidos por Taberlet et al. (1991) e Shaw et al. (2007) para essas regiões plastidiais e por White et al. (1990) para a região nuclear. As amplificações por reação da polimerase foram realizadas segundo Gardner et al. (2012). Em resumo, as reações de PCR foram realizadas em 25 µL contendo 0,4 unidades de Taq

polymerase, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 µM de cada *primer* e 0,1mM de cada dNTP, num termociclador Eppendorf Mastercycler. Os programas consistiram em uma etapa inicial de 5 min a 95°C, seguido de um ciclo de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C (*trnL-trnF* and *trnL-trnT*) ou 50°C (ITS) e 2 1/2 min a 72°C, a etapa final de elongação foi realizada por 5 min a 72°C. Para a região *petA-psbJ* se utilizou as condições descritas em Shaw et al. (2007). Os produtos da PCR foram purificados utilizando um kit de limpeza Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) e sequenciados pela MacroGen Inc. (Seoul, Korea) ou na plataforma de sequenciamento - LABCEN/CCB (Recife, Brasil). Todas as regiões foram sequenciadas em ambos os sentidos.

Alinhamento das sequências e análises filogenéticas

Os alinhamentos das sequências foram gerados utilizando o programa ClustalW (Thompson et al. 1994) incluído no programa Bioedit 6.0.5 (Hall 1999). Posteriormente foram realizados ajustes manuais para melhorar os alinhamentos. As sequências serão enviadas ao GenBank. Os alinhamentos para as três regiões plastidiais foram unidos e analisados em conjunto. As regiões plastidiais e nucleares foram analisadas isoladamente ou em combinação por máxima parcimônia (MP). As análises de máxima parcimônia foram realizadas no programa PAUP* 4.0b10 (Swofford 2001) e todos os caracteres foram considerados como apresentando o mesmo peso. Para cada conjunto de dados foi realizada uma busca heurística utilizando 1.000 "*random taxon-addition starting trees*", "*tree bisection- reconnection branch swapping*" e "*Multrees on*", limitando os rearranjos a 100.000 e permitindo que somente uma árvore seja mantida em cada passo. Os suportes dos clados foram analisados por bootstrap (Felsenstein 1985), calculados no PAUP* 4.0b10 com 1.000 réplicas de bootstrap e seguindo as condições de busca descritas anteriormente, com a exceção de 100 "*random-addition starting trees*" para cada réplica. Todas as árvores foram visualizadas utilizando os programas TreeView (Page 1996) e FigTree v1.3.1 (Rambaut 2009).

Análises citogenéticas

As espécies incluídas nas análises citogenéticas estão indicadas na tabela 2. Para as análises mitóticas, botões florais jovens ou raízes foram pré-tratados com 0,002 M 8-hidroxiquinoline, ou colchicina 0,2% a 10°C por 20-24 h, fixados em Carnoy 3:1 (etanol/ácido acético glacial), por 2 a 24 h à temperatura ambiente, e posteriormente estocadas a -20°C. Para realizar as preparações citológicas os botões florais foram digeridos com uma mistura de 2% celulase e 20% pectinase (w/v), por uma a quatro horas a 37 °C, tratados com ácido acético 60%, por pelo menos 30 min, e esmagados em ácido acético 45%. Depois da remoção da lamínula por nitrogênio líquido, as lâminas foram secadas ao ar, envelhecidas por três dias à temperatura ambiente e estocadas no freezer a -20 °C.

Para a dupla coloração com os fluorocromos cromomicina A3 (CMA) e 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma) foi seguido o protocolo descrito em Cabral et al. (2006). As preparações citológicas foram coradas com 0,1 mg/ml CMA por uma hora e 2 µg/ml DAPI por meia hora. Posteriormente foram montadas no tampão McIlvaine's pH 7/glicerol, 1:1 (v/v). As imagens das melhores células foram obtidas utilizando um microscópio Leica DMLB equipado com câmera Cohu CCD e o software Leica QFISH. As imagens foram processadas com o programa Adobe Photoshop CS3 somente para brilho e contraste. Para algumas das espécies foram construídos idiogramas baseados nas medidas de metáfases obtidas neste trabalho ou nas imagens publicadas na bibliografia (De Azkue e Martínez 1983, 1987; De Azkue 2000).

Determinação do conteúdo de DNA nuclear

As medições do conteúdo de DNA nuclear (valor 2C) foram realizadas seguindo o protocolo descrito em Doležel e Göhde (1995). Resumidamente, pequenos fragmentos de folhas jovens foram cortadas com uma lâmina de barbear junto com folhas da espécie utilizada como padrão interno numa placa de Petri contendo 0,6 mL do tampão Otto I (0,1 M ácido cítrico + 0,5 % Tween 20). Posteriormente foram filtradas com uma malha com poros de 30 µm num tubo de citômetro e adicionados 0,6 mL do tampão Otto II (0,4 M Na₂HPO₄.12H₂O) contendo RNase (50 µg/mL) e iodeto de propídeo (50 µg/mL). As amostras foram analisadas num citômetro de fluxo Partec CyFlow SL equipado com o programa Flomax (Partec). Para estimar o conteúdo de DNA foram realizadas medições em 1 a 3 acessos de cada espécie sendo cada material medido 3 vezes em dias consecutivos. Os

padrões internos utilizados foram *Solanum lycopersicum* “Stupické polní rané” (2C = 1,96 pg), *Glycine max* “Polanka” (2C = 2,55 pg), *Zea mays* “CE-777” (2C = 5,43 pg) e *Vicia faba* var. *equina* cv. “Inovec” (2C = 26,90 pg). Os padrões internos foram selecionados para cada espécie analisada de maneira que o conteúdo de DNA nuclear estivesse próximo mas não superposto ao pico da amostra de *Oxalis*. O valor 2C foi calculado como: (Média do pico da amostra/ Média do pico do padrão) x valor 2C do padrão interno (pg).

Reconstrução do estado de carácter ancestral

Para a reconstrução de estado de carácter dos números cromossômicos e do conteúdo de DNA foi utilizado o programa Mesquite v.2.75 (Maddison e Maddison 2011) utilizando a função '*trace character history*' sobre a árvore de consenso estrito resultado das análises de máxima parcimônia das regiões plastidiais. Os dados de números cromossômicos foram analisados neste programa por Máxima parcimônia e Máxima verosimilhança. Foram utilizados os números cromossômicos e de conteúdo de DNA nuclear obtidos neste trabalho ou os reportados na literatura (Tabela 3). Os números cromossômicos foram tratados como caracteres não-ordenados e de estado múltiplo com 6 estados ($n = 5, 6, 7, 8, 9, 11$) e codificados desde 0 - 6. Os dados faltantes foram marcados com interrogação. Entretanto os dados de conteúdo de DNA foram tratados como dados contínuos. No análise de máxima verosimilhança foi utilizado o modelo Markov-k1.

RESULTADOS

Análises filogenéticas

A matriz combinada para as regiões plastidiais consistiu em 24 espécies e 2.580 caracteres alinhados, dos quais 1.965 foram constantes, 325 não informativos e 290 parcimoniosamente informativos (11,24%). A matriz para a região nuclear nrITS foi constituída de 23 espécies do gênero *Oxalis*. Esta matriz de dados estava formada por 795 caracteres dos quais 299 resultaram constantes, 136 não-informativos e 360 informativos (45,28%). Todos os *gaps* foram tratados como dados faltantes e as análises de parcimônia das regiões plastidiais e nucleares resultaram em 148 árvores e topologias com 857 (índice de consistência [IC] = 0,827, índice de retenção [IR] = 0,828) e 3 árvores com 1495 passos (índice de consistência [IC] = 0,605, índice de retenção [IR] = 0,635), respectivamente. As topologias resultantes foram altamente congruentes para os dois conjuntos de dados (Figura 1), embora as análises plastidiais tenham resultado em uma maior resolução entre os

diferentes clados. A região nuclear, no entanto, resultou numa maior resolução dentro do clado que inclui as espécies da seção *Thamnoxys*. Devido à alta congruência entre os resultados obtidos com as regiões plastidial e nuclear, ambas as regiões foram combinadas e analisadas juntas. A topologia das análises combinadas foi similar a obtida nas análises da região nuclear porém com maior suporte dos ramos (resultados não mostrados).

As espécies do subgênero *Thamnoxys* se apresentaram formando três grandes clados (I, II e III Figura 1). O clado A está constituído pelas espécies *O. dombeii* e *O. hedysaroides*, incluídas nas seções *Thamnoxys* e *Hedysaroidea*, respectivamente. Ambas aparecem como espécies irmãs com um bom suporte de *bootstrap* (BS = 71; 69). O clado formado por estas espécies aparece como grupo irmão do resto das espécies do subgênero nas análises da região plastidial (BS = 89) enquanto para ITS e na análise combinada se apresenta como grupo irmão das espécies do clado II. O clado II (BS = 100) foi constituído por espécies pertencentes a três seções: *Phyllodoxys*, *Psoraleoideae* e *Polymorphae*. As espécies de *Psoraleoideae* apareceram como espécies irmãs de *O. rhombeo-ovata* da seção *Polymorphae* (BS = 100). As demais espécies desta última seção formaram um clado irmão incluindo *O. fruticosa* da seção *Phyllodoxys*. O terceiro clado (clado III) foi formado por espécies das seções *Thamnoxys*, *Pleiocarpae* e *Robustae*. As espécies da seção *Thamnoxys* incluídas neste clado formaram um grupo monofilético com alto suporte (BS = 99) e irmãs (BS = 100) do clado que inclui *O. glaucescens* da seção *Pleiocarpae* (monotípica) e *O. grisea* da seção *Robustae* (BS = 100; Figura 1).

Números cromossômicos, padrão de heterocromatina e conteúdo de DNA nuclear

Os resultados das análises citogenéticas e de conteúdo de DNA estão resumidos na tabela 2 e Figura 2 e 3. Os números cromossômicos para as espécies *O. glaucescens* e *O. umbraticola* (Figura 2) foram determinadas pela primeira vez neste estudo. A maioria das espécies analisadas eram diploides com dois números cromossômicos básicos diferentes. *Oxalis alstonii*, *O. neuwiedii*, e *O. umbraticola* (Figura 2 d, e-f, h) apresentaram $2n = 10$, com cromossomos metacêntricos e acrocêntricos (*Oxalis alstonii*, *O. neuwiedii*) ou somente cromossomos acrocêntricos em *O. umbraticola*. As demais espécies apresentaram $2n = 12$, sendo que *O. frutescens* apresentou um acesso diploide e três hexaploides, com $2n = 36$ (Figura 3 d-e). A morfologia cromossômica também foi variável nas espécies com $x = 6$ observando-se alguns cariótipos constituídos unicamente por acrocêntricos (*O. grisea*, *O. glaucescens* e *Oxalis* sp.; Figura 2 b, c, g respectivamente), outros por acrocêntricos e um

único par metacêntrico (*O. psoraleoides*; Figura 2 i) e vários com cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos (*O. hedysarifolia*, *O. cratensis*, *O. barrelieri*, *O. cytisoides*, e *O. divaricata*; Figura 2 a e 3). A espécie *O. frutescens* foi a única em apresentar somente cromossomos submetacêntricos e metacêntricos (Figura 2 d-e).

Na maioria das espécies as bandas CMA⁺ estavam localizadas na posição terminal do braço curto, em número variável de cromossomos (Tabela 2). Nas espécies que apresentaram exclusivamente cromossomos acrocêntricos essas bandas se localizaram sempre nos braços curtos (Tabela 2). *Oxalis psoraleoides* foi a única espécie com bandas CMA⁺ localizadas terminalmente em todos os braços cromossômicos longos dos acrocêntricos, e na posição terminal e intersticial no braço curto do único par de metacêntricos.

Os valores de conteúdo de DNA nuclear (valor 2C) se apresenta na tabela 2. Nas espécies com $x = 6$ o valor 2C variou desde 1,19 pg em *O. glaucescens* até 41,14 pg em *O. psoraleoides* (Tabela 2), representando uma variação de aproximadamente 35 vezes. As três espécies com $x = 5$ variaram desde 1,76 pg em *O. alstonii* até 16,50 pg em *O. umbraticola* representando uma diferença de aproximadamente 9 vezes.

Foi feita uma estimativa do estado ancestral para os números cromossômicos básicos e conteúdo de DNA nuclear, apresentada na Figura 4. A reconstrução foi baseada na árvore de consenso estrito obtida das análises de parcimônia das regiões plastidiais, que apresentaram uma maior resolução. Os números cromossômicos básicos 5 e 6 apareceram como os ancestrais do subgênero *Thamnoxys* nas análises de máxima parcimônia. Enquanto que as análises de máxima verosimilhança (Figura 4) mostraram probabilidades distintas para esses números, sendo maior a de $x = 6$ para ser o número cromossômico ancestral de *Thamnoxys*.

A reconstrução do tamanho nuclear do genoma mostrou que o estado plesiomórfico seria um genoma de tamanho pequeno a médio e o aumento no conteúdo de DNA nuclear teria ocorrido pelo menos duas vezes, i. na evolução de *O. grisea*; e ii. no nó que deu origem a *O. rhombeo-ovata*, *O. erosa* e *O. psoraleoides* (Figura 5).

DISCUSSÃO

Relações filogenéticas no subgênero Thamnoxys

As poucas espécies do subgênero *Thamnoxys* incluídas previamente em análises moleculares revelaram que estas teriam sido as primeiras a divergir dentro do gênero (Gardner et al. 2011; Heibl e Renner 2012; Gardner et al. 2012). As nossas análises sugerem que o algumas das seções do subgênero *Thamnoxys* não constituem grupos naturais, como as seções *Thamnoxys* e *Polymorphae*, aparecendo como parafiléticas em todas as análises. De fato, tanto as características cromossômicas quanto as de conteúdo de DNA já sugeriam incongruências na monofilia dessas seções. *Oxalis dombeii*, por exemplo, apresenta $n = 8$ diferentemente das demais espécies da seção *Thamnoxys* com $n = 6$. *Oxalis rhombo-ovata* possui $n = 7$, enquanto o restante das espécies de *Polymorphae* apresenta $n = 5$. Em geral, a variação cromossômica desempenha um papel importante no processo de especiação em plantas (Riesberg 2001). No caso do gênero *Oxalis*, os números cromossômicos básicos tem mostrado uma correlação com os agrupamentos encontrados nas análises filogenéticas, sendo ao menos em alguns grupos mais informativos que as características morfológicas (Vaio et al. submetido).

Evolução cromossômica: disploidias e poliploidia

As análises citogenéticas confirmaram os números cromossômicos publicados previamente, com exceção de *O. neuwiedii* com $2n = 10$, reportado por De Azkue e Martínez (1983) com $2n = 12$. Essa divergência de resultados pode se dever a erro de identificação taxonômica, dada a elevada similaridade morfológica de várias espécies do subgênero e ao fato de que as duas amostras diferiam também na fórmula cariotípica e no valor 2C. De Azkue e Martínez (1983, 1987) reportaram a fórmula $2n = 12A$ e uma quantidade de $2C = 13$ pg enquanto na presente análise foi observado $2n = 3M + 2A$ e um valor $2C = 5,24$ pg.

Todas as espécies analisadas foram diploides com $2n = 10$ e $2n = 12$, ocorrendo apenas um citotipo hexaploide em *O. frutescens*. Citotipos poliploides são conhecidos na seção *Thamnoxys* para *O. barrelieri*, *O. sellowii* e *O. sepium*, variando desde $4x$ até $12x$ (De Azkue e Martínez 1983, 1987; De Azkue 2000). Estas três espécies e *O. frutescens* compartilham também a presença de cromossomos e cariótipos relativamente pequenos e simétricos.

O número básico para todo o gênero *Oxalis* é ainda incerto. Inicialmente, foram propostos os números $x = 6$ e $x = 7$ (Marks 1956; De Azkue e Martínez 1983, 1987; De Azkue 2000), porém as análises citogenéticas e filogenéticas posteriores (de Azkue 2000; Vaio et al. em preparação 1) revelaram que $x = 7$ seria derivado, resultado de disploidia ascendente, enquanto $x = 6$ seria o número básico mais provável. O que também é sugerido pelas estimativas nas análises de máxima verosimilhança. Entretanto, a estimativa dos dados de máxima parcimônia do presente trabalho indicam $x = 5$ ou $x = 6$ como os números básicos para o subgênero *Thamnoxys* e para o gênero *Oxalis*. No subgênero *Thamnoxys* $x = 5$ e $x = 6$ estão representados em um número similar de seções, porém $x = 6$ ocorre em um número maior de espécies.

Espécies com características citológicas consideradas derivadas, como cariótipos assimétricos e conteúdo de DNA alto (Vaio et al. em preparação) ocorrem em espécies do subgênero *Thamnoxys* tanto com $x = 5$ quanto com $x = 6$. Porém, todas as espécies com $x = 5$ apresentam cariótipos assimétricos (e.g.: *O. alstonii*) e/ou conteúdo de DNA elevado (e.g. *O. umbraticola*), favorecendo a hipótese de que essas tenham cariótipos derivados e $x = 6$ seja o número básico do gênero. Em qualquer caso, a distribuição dos dois números básicos nos subgêneros *Thamnoxys* e *Oxalis* indica que um ou outro deve ter surgido pelo menos duas vezes, de forma independente, durante a evolução do gênero.

Considerando que o número cromossômico básico do gênero seria $x = 5$ ou $x = 6$, a evolução teria ocorrido principalmente por disploidia ascendente seguida por poliploidia, a diferença do observado na maioria dos grupos de plantas analisados num contexto filogenético nos quais a evolução ocorreu por disploidia descendente (ver por exemplo Levin 2002, Blösch et al. 2010; Mayrose et al. 2010).

Simetria cariotípica

Alteração na morfologia cromossômica pode ocorrer por mudança na posição do centrômero ou pela adição ou deleção desigual de cromatina em um dos braços cromossômicos (Schubert e Lysak 2011). O aumento da assimetria cariotípica em espécies de *Oxalis* tem sido atribuído principalmente às variações no conteúdo de DNA nuclear e à distribuição desigual desse DNA extra nos cromossomos (De Azkue e Martínez 1983). Levin (2002) propõe que a assimetria cariotípica seria frequentemente causada por adição ou deleção de DNA extra nos braços cromossômicos e não por acumulação de grupos de genes

ligados co-adaptados em um determinado braço ou cromossomo, como proposto por Stebbins (1971). Um exemplo de distribuição desigual de DNA seriam os cariótipos assimétricos de *O. neuweidii* e *O. alstonii* com dois e um par cromossômico acrocêntrico grande, respectivamente que parece ter surgido por acumulação diferencial de DNA num dos braços cromossômicos. Considerando que o clado onde se encontra *O. neuweidii* apresenta valores 2C crescentes em relação ao grupo irmão (*O. alstonii*), a distribuição do DNA extra foi maior em um dos braços longos dessa espécie que nos demais, passando o número de acrocêntricos grandes de um em *O. alstonii* para dois em *O. neuweidii*. Igualmente, entre *O. rhombeo-ovata* (6A longos) e *O. psoraleoides* (1M + 5A longos) houve uma distribuição de DNA extra desigual, modificando claramente a simetria cariotípica dessas espécies. Outra possibilidade é o aumento generalizado e rearranjos cromossômicos que podem não estar sendo detectados.

No subgênero *Oxalis* parece também ter ocorrido outros tipos de mudanças cromossômicas que podem gerar assimetria cariotípica, como inversões pericêntricas, translocações, ou fissões/fusões Robertsonianas. No subgênero *Thamnoxys* no entanto, o cariótipo de *O. rhombeo-ovata*, por exemplo, com $x = 7$ e fórmula cariotípica 14A, parece ter surgido de um cariótipo de fórmula 2M + 10M, reportado para *O. erosa* e *O. psoraleoides* (De Azkue e Martínez 1983). Na presente análise filogenética a fórmula 14A aparece como um estado derivado. Nesse caso, o cariótipo de *O. rhombeo-ovata* teria surgido da fissão do par metacêntrico presente nas outras duas espécies. Nas demais espécies de *Thamnoxys*, como em outras espécies de *Oxalis* (Vaio et al. em preparação 1), os diferentes graus de assimetria cariotípica parecem também ter surgido de rearranjos cromossômicos complexos, como sugerido para espécies de *Arabidopsis* (Lysak et al. 2006).

Distribuição da heterocromatina e conteúdo de DNA nuclear

A análise da distribuição da heterocromatina nas espécies de *Oxalis* revelou um outro tipo de alteração cariotípica estrutural não detectado anteriormente. Espécies filogeneticamente próximas e com a mesma fórmula cariotípica, mostraram variação no número de bandas CMA⁺, como *O. glaucescens* e *O. grisea* com quatro e oito bandas respectivamente. O maior número de bandas heterocromáticas (14) apareceu em *O. psoraleoides*, com o maior conteúdo de DNA. Porém, não parece existir uma correlação entre número de bandas e conteúdo de DNA nas espécies do subgênero *Thamnoxys*. *Oxalis grisea*, por exemplo, apresentou maior número de bandas e menor conteúdo de DNA que *O. glaucescens*. *Oxalis divaricata* com um dos mais baixos conteúdos de DNA nuclear (1,88 pg)

está entre as espécies com o maior número de bandas heterocromáticas detectadas. Em vários outros gêneros a variação na quantidade de heterocromatina parece ser independente do conteúdo de DNA (Greilhuber 1977; Narayan 1987; Pringle e Murray 1993).

Das 12 espécies que tiveram o valor 2C estimado neste trabalho sete já haviam sido previamente quantificadas e dessas houve discordância significativa apenas para *O. psoraleoides*. Neste caso, o valor conhecido 2C = 27,28 pg (De Azkue e Martínez 1987) diferiu em 1,5 vezes do obtido no presente trabalho (2C = 41,14 pg). Deve destacar-se que esses mesmos autores (De Azkue e Martínez, 1987) reportaram um valor 2C = 33 pg para *O. dispar*, taxa que foi posteriormente sinonimizada para *O. psoraleoides* (Lourteig 1994). Esta última apresenta uma ampla distribuição geográfica desde o sul até o nordeste do Brasil, norte do Paraguai, Bolívia e noroeste da Argentina. Nesse caso, é possível que diferenças intraespecíficas no conteúdo de DNA reflitam a existência de espécies crípticas adaptadas a distintos ambientes. Como variações intraespecíficas no conteúdo de DNA em espécies diploides são geralmente pequenas (Lysak e Dolezel 1998; Eilam et al 2008), é provável que *O. psoraleoides* forme um complexo de espécies com pouca variação morfológica.

O valor 2C obtido para *O. psoraleoides* (41,14 pg) e para *O. glaucescens* (1,19 pg) ampliam os limites de variação para o conteúdo de DNA no subgênero para quase 35 vezes. No gênero *Oxalis*, a variação no conteúdo de DNA nuclear é de quase 70 vezes entre espécies diploides (0,58 pg em *O. linarantha* e 41,14 pg em *O. psoraleoides*) sendo assim a maior diferença intragenérica conhecida no conteúdo de DNA para angiospermas (Vaio et al. em preparação 2). Outro gênero com uma alta variação no conteúdo de DNA nuclear é o gênero *Cuscuta* com diferenças de 57 vezes nos seus valores 2C (Bennett e Leitch 2010).

A reconstrução do estado de caráter de conteúdo de DNA nuclear para as espécies do subgênero *Thamnoxys* (Figura 3) sugere um tamanho pequeno para o genoma ancestral, tendo sofrido pelo menos três aumentos importantes do valor 2C durante a evolução. A tendência geral do conteúdo de DNA nuclear na evolução das angiospermas é de valores de menores a maiores (Soltis et al. 2003). Porém, em vários gêneros de plantas diversos eventos de aumento e diminuição do conteúdo de DNA parecem ter ocorrido durante a história evolutiva dos mesmos (Leitch et al. 2005).

Os maiores valores 2C em *Oxalis* não se devem à poliploidia nem à presença de grandes blocos de heterocromatina. Portanto, é possível que a variação observada no valor 2C esteja associada à presença de retrotransposons tipo LTR, os quais podem alcançar um grande

número de cópias e formar parte de mais da metade do genoma de várias espécies vegetais (ver Grover e Wendel 2010). O aumento da quantidade de retrotransposons por transição e replicação reversa seguida de reinserção no genoma e a deleção dos mesmos por recombinação desigual seria uma das principais causas das diferenças no valor 2C em plantas (Hawkins et al. 2009; Park et al 2012).

A alta variabilidade cariológica presente no subgênero *Thamnoxys* de *Oxalis*, tanto no complemento cromossômico quanto no conteúdo de DNA e simetria cariotípica, é provavelmente uma das maiores entre as angiospermas. Análises combinadas de citogenética e filogenética molecular incluindo um maior número de espécies de ambos os subgêneros de *Oxalis* são ainda necessárias para elucidar o número cromossômico básico ancestral do gênero e a direção evolutiva das mudanças cromossômicas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil. Agradecemos ao Programa de Estudante Convênio Pós-graduação (PEC-PG, Brasil), e a Academia Interamericana de Ciências (InterAmerican Network of Academies of Science- IANAS fellowships, USA) pelas bolsas concedidas a MV. Os autores são gratos a Luiz Gustavo Sousa Rodrigues pela ajuda na elaboração das figuras, a Pedro Fiaschi, Maria Carolina de Abreu e James Lucas Lima pela colaboração na identificação dos diferentes taxa e coleta de material vegetal e a Jaroslav Doležal pelo envio das sementes dos padrões internos utilizados nas análises de citometria.

REFERENCIAS

- Abreu MC. 2011. Sistemática de *Oxalis* L. sect. *Thamnoxys* (Endl.) Progel no Brasil. Tese de doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil. 151 pp.
- Bennett MD, Leitch IJ. 2005. Nuclear DNA amounts in Angiosperms: progress, problems and prospects. *Annals of Botany* 95: 45-90.
- Bennett MD, Leitch IJ. 2011. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Annals of Botany* 107: 467-590.
- Blösch C, Weiss-Schneeweiss H, Schneeweiss GM, Barfuss MHJ, Rebernig CA, Villaseñor JL, Stuessy TF. 2009. Molecular phylogenetic analyses of nuclear and plastid DNA sequences support dysploid and polyploid chromosome number changes and reticulate

- evolution in the diversification of *Melampodium* (Millerieae, Asteraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 220-33.
- Cabral JS, Felix LP, Guerra M. 2006. Heterochromatin diversity and its co-localization with 5S and 45S rDNA sites in chromosomes of four *Maxillaria* species (Orchidaceae). *Genetics and Molecular Biology*. 29: 659–664.
- De Azkue D. 2000. Chromosome diversity of South American *Oxalis*. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 132: 143-152.
- De Azkue D. and Martinez, A., 1984. Variación del cariotipo, volumen nuclear y contenido de ADN en siete especies de *Oxalis*. *Darwiniana* 25 (1-4), 267-277.
- De Azkue, D., Martínez, A., 1988. DNA content and chromosome evolution in the shrubby *Oxalis*. *Genome*. 30, 52–57.
- De Azkue D, Martínez A. 1990. Chromosome numbers of the *Oxalis tuberosa* alliance (Oxalidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 169: 25–29.
- Doležel, J. Godhde W. 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry*. 19: 103–106.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin of the Botanical Society of America*. 19: 11–15.
- Eilam T, Anikster E, Millet J, Manisterski J, Saqi-Assif O, Feldman M. 2007. Genome size and genome evolution in diploid Triticeae species. *Genome* 50: 1029-1037.
- Emshwiller E, Doyle JJ. 2002. Origins of domestication and polyploidy in Oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae). 2. Chloroplast expressed glutamine synthetase data. *American Journal of Botany* 89: 1042-1056.
- Emshwiller E, Doyle JJ. 2002. Origins of domestication and polyploidy in Oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae). 2. Chloroplast expressed glutamine synthetase data. *American Journal of Botany*. 89: 1042-1056.
- Felsenstein J. 1985. Confidence-limits on phylogenies—an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39: 783–791.
- Gardner A, Emshwiller E, Vaio M, Guerra M, Oberlander K, Dreyer L, Heibl C. 2011. From woody shrubs to weedy, succulent, and bulb-bearing herbs: an updated phylogeny for *Oxalis*. *Botany Congress*, 9-13 July, St. Louis, Missouri, USA.
- Gardner A, Vaio M, Guerra M, Emshwiller E. 2012. Diversification of the American bulb-bearing *Oxalis* (Oxalidaceae): Dispersal to North America and modification of the tristylous breeding system. *American Journal of Botany*. 99: 152-164.

- Greilhuber J. 1977. Nuclear DNA and heterochromatin contents in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica* and *Puschkinia scilloides* (Liliaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 128: 243-257.
- Grover CE, Wendel JF. 2010. Recent insights into mechanisms of genome size change in plants. *Journal of Botany* vol. 2010, Article ID 382732, 8 pages, doi:10.1155/2010/38273.
- Guerra M. 2012. Cytotaxonomy: The end of childhood. *Plant Biosystems*. 146: 703-710.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98.
- Hawkins JS, Proulx SR, Rapp RA, Wendel JF. 2009. Rapid DNA loss as a counterbalance to genome expansion through retrotransposon proliferation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 17811-17816.
- Heibl C, Renner S. 2012. Distribution models and a dated phylogeny for Chilean *Oxalis* species reveal occupation of new habitats by different lineages, not rapid adaptive radiation. *SystBiol* advance access DOI:10.1093/sysbio/sys034.
- Knuth R. 1930. Oxalidaceae. In: A. Engler (ed.) *Das Pflanzenreich*. IV 130, Leipzig. 481pp.
- Köehler S, Cabral J, Whitten WM, Williams NH, Singer RB, Neubig KM, Guerra M, Souza AP, Amaral MCE. 2008. Molecular phylogeny of the neotropical genus *Christensonella* (Orchidaceae, Maxillariinae): species delimitation and insights into chromosome evolution. *Annals of Botany* 102: 491–507.
- Leitch IJ, Soltis DE, Soltis PS, Bennett MD. 2005. Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). *Annals of Botany* 95: 207-217.
- Levin DA. 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. *Oxford series in Ecology and Evolution*. Ed. PH Harvey & RM May. New York. 228 p.
- Lourteig A. 1983. Oxalidaceae. In: Reitz R, ed. *Flora Ilustrada Catarinense*, 3–174.
- Lourteig, A.. 1994. *Oxalis* L. subgénero *Thamnoxys* (Endl.) Reiche emend. Lourteig. *Bradea*. 7: 1-199.
- Lourteig, A.. 2000. *Oxalis* L. subgenera *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Oxalis* y *Trifidus* Lourteig. *Bradea*. 7: 201-629.
- Lysak M, Berr A, Pecinka A, Schmidt R, McBreen K, Schubert I. 2006. Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proceedings of the National Academy of Science US*. 103: 5224-5229.
- Lysak MA, Dolezel J. Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (Poaceae). *Caryologia* 52: 123 - 132 (1998)

- Maddison WP, Maddison DR. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>.
- Marks GE. 1956. Chromosome numbers in the genus *Oxalis*. New Phytologist. 55: 120–126.
- Mayrose I, Barker MS, Otto SP. 2010. Probabilistic Models of Chromosome number evolution and the inference of polyploidy. Systematic Biology 59: 132-144.
- Naranjo CA, Mola LM, Poggio L, Múlgura M. 1982. Estudios citotaxonómicos y evolutivos de *Oxalis* (Oxalidaceae) I. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 20: 183–200.
- Narayan RKJ. 1987. Nuclear DNA changes, genome differentiation and evolution in *Nicotiana* (Solanaceae). Plant Systematics and Evolution 157: 161–180.
- Oberlander KC, Dreyer LL, Bellstedt DU. 2011. Molecular phylogenetics and origins of southern African *Oxalis*. Taxon: 1667-1677.
- Oberlander KC, Emshwiller E, Bellstedt DU, Dreyer LL. 2009. A model of bulb evolution in the eudicot genus *Oxalis* (Oxalidaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution. 51: 54-63.
- Oberlander KC, Dreyer LL, Bellstedt DU, Reeves G. 2004. Systematic relationships in southern African *Oxalis* L. (Oxalidaceae): Congruence between palynological and plastid *trnL* - F evidence. Taxon. 53: 977-985.
- Page RDM. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences. 12: 357-358.
- Park M, Park J, Kim S, Kwon JK, Park HM, Bae IK, Yang TJ, Lee YH, Kang BC, Choi D. 2012. Evolution of the large genome in *Capsicum annuum* occurred through accumulation of single-type long terminal repeat retrotransposons and their derivatives. The Plant Journal 69: 1018-1029.
- Pringle GJ, Murray BG. 1991. Karyotype diversity and nuclear DNA variation in *Cyphomandra*. In: Hawkes JG, Lester RN, Nee M, Estrada N, eds. Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution. London: The Royal Botanic Gardens Kew for The Linnean Society of London, 247–252.
- Rambaut A. 2009. FigTree, tree figure drawing tool v1.3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Riesberg LH. 2001. Chromosomal rearrangements and speciation. Trends in Ecology and Evolution. 16: 351-358.
- Salter TM. 1944. The genus *Oxalis* in South Africa: A taxonomic revision. J. S. African Bot., suppl. vol. 1: 1–355.

- Schubert I. 2007. Chromosome evolution. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 109-115.
- Soltis DE, Soltis PS, Bennett MD, Leitch IJ. 2003. Evolution of genome size in the angiosperms. *American Journal of Botany*. 90: 1596-1603.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose non coding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*. 94: 275-288.
- Souza LG, Crosa O, Speranza P, Guerra M. 2012. Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of Botany* doi: 10.1093/aob/mcs020.
- Stebbins GL. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Reading: Addison-Wesley, 1971. 216 p.
- Swofford DL. 2001. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4.0b.10 for 32-Bit Microsoft Windows. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Taberlet PL, Geilly G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification on three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17: 1105–1109.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*. 22: 4673-4680.
- Vaio M, Speranza P, Valls JF, Guerra M, Mazzella C. 2005. Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the Quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Annals of Botany*. 96: 191-200.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322 in *PCR protocols: a guide to methods and applications*, eds. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, and T. White. San Diego: Academic Press.

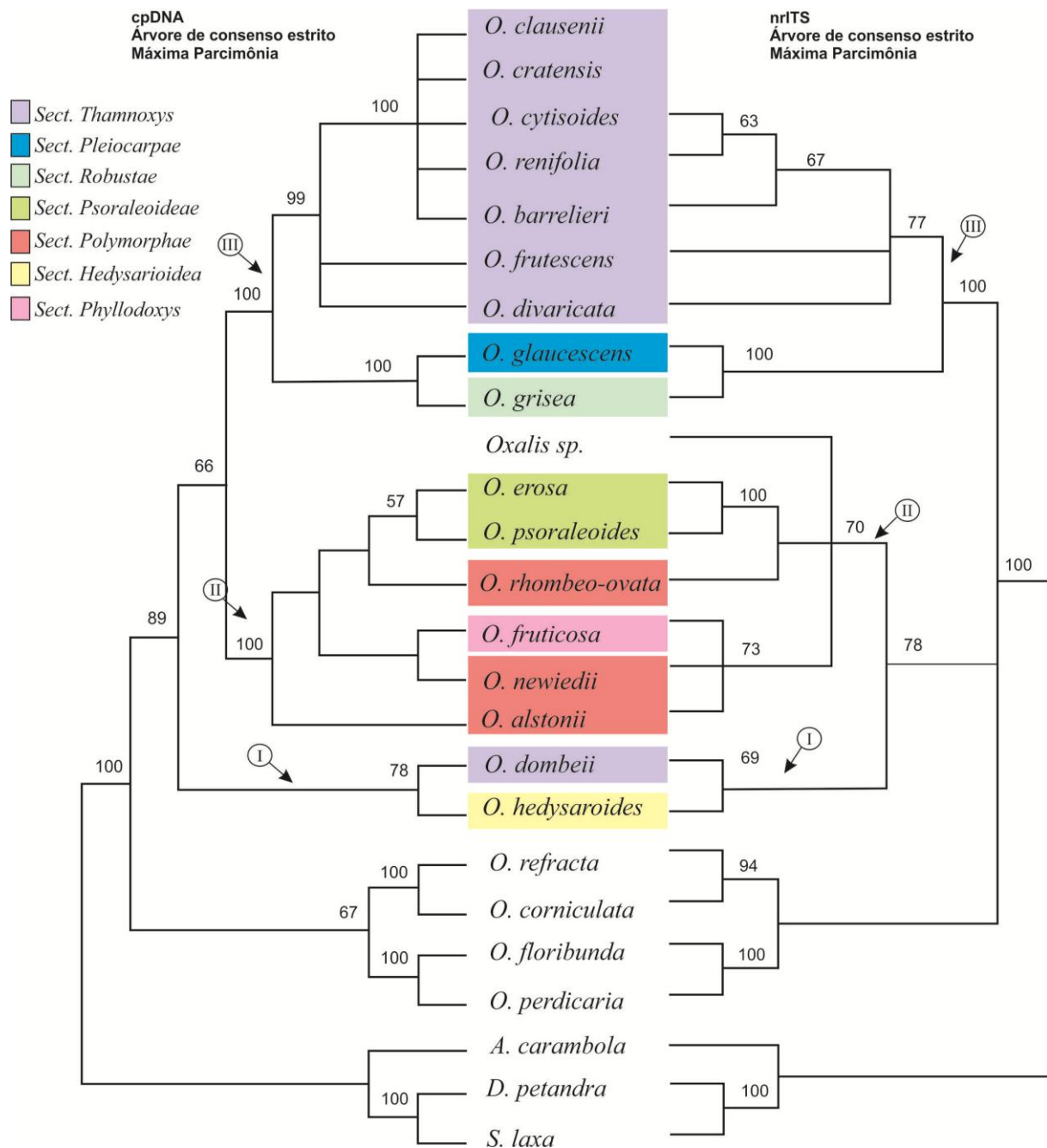


Figura 1. Árvores de consenso estrito obtidas das análises por Máxima Parcimônia das regiões plastidiais e nucleares das espécies analisadas do subgênero *Thamnoxys*. Números acima dos ramos representam o suporte de bootstrap. As letras acima dos ramos se referem aos clados discutidos no texto. As diferentes seções taxonômicas estão representadas por cores diferentes.

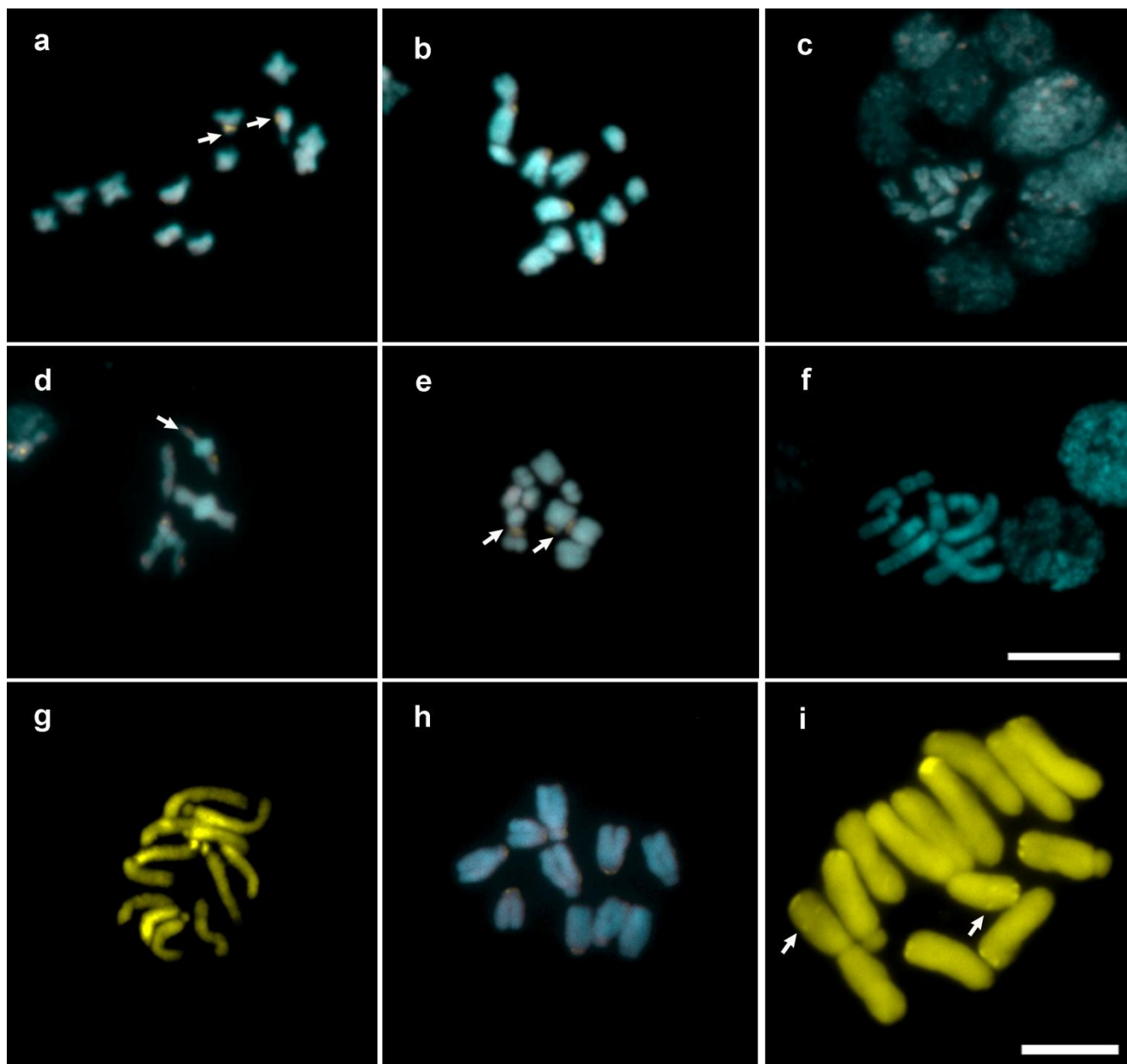


Figura 2. Complemento cromossômico e distribuição da heterocromatina observada com a coloração CMA/DAPI. **a.** *Oxalis hedysarifolia* $2n = 12$; **b.** *O. grisea* $2n = 12$; **c.** *O. glaucescens* $2n = 12$; **d.** *O. alstonii*, $2n = 10$, Metáfase meiótica I com 5II; **e-f.** *O. neuwiedii* $2n = 10$; **g.** *Oxalis* sp. $2n = 12$; **h.** *O. umbraticola* $2n = 10$; **i.** *O. psoraleoides* $2n = 12$. Fotos obtidas com a sobreposição das imagens obtidas com DAPI e CMA, exceto em **f** (DAPI) e em **g** e **i** (CMA). Setas sinalizam bandas CMA pequenas. Barras representam 10 μ m. Barra em **f** corresponde à a-f, Barra em **i** corresponde desde g-i.

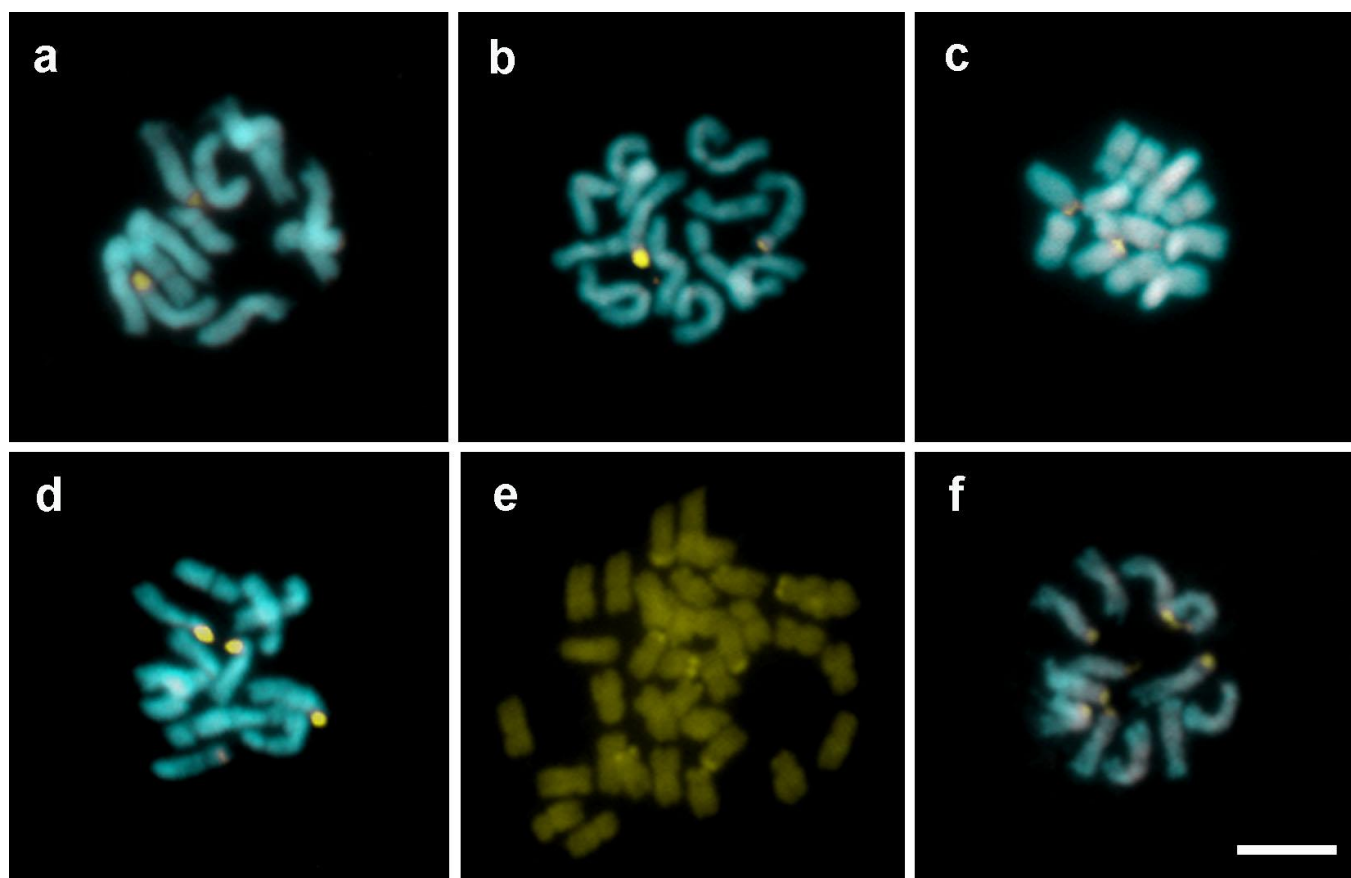


Figura 3. Complemento cromossômico e distribuição da heterocromatina observada com a coloração CMA/DAPI.(a-d, f) e CMA (e) **a.** *Oxali. cratensis* $2n = 12$; **b.** *O. cytisoides* $2n = 12$; **c.** *O. barrelierii* $2n = 12$; **d.** *O. frutescens* $2n = 12$; **e.** *O. frutescens* $2n = 36$; **f.** *O. divaricata* $2n = 12$. Fotos obtidas com a sobreposição das imagens obtidas com DAPI e CMA, exceto em e (CMA). Barra representa 5 μm .

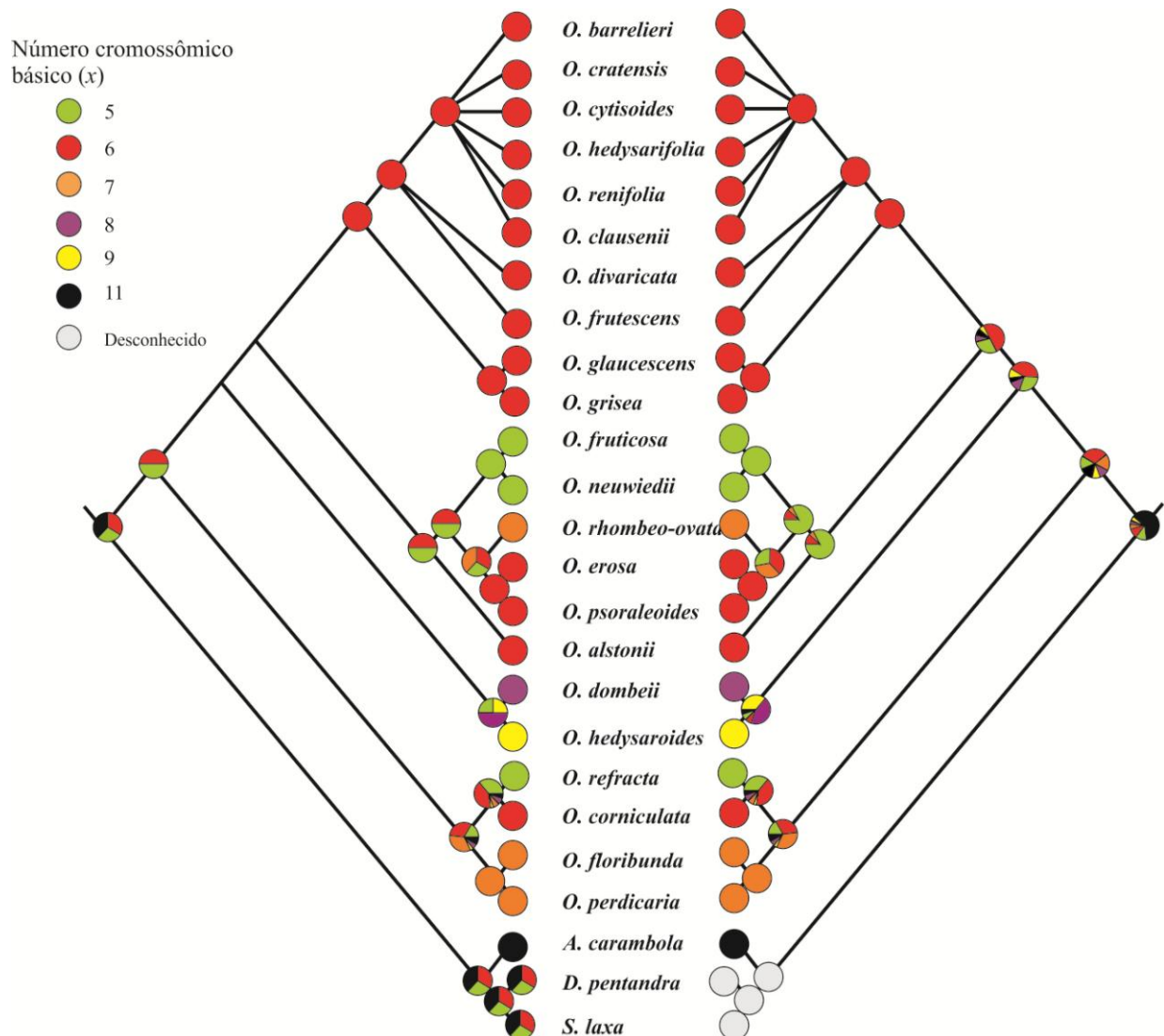


Figura 4. Reconstrução do estado de caractere para o número cromossômico básico (x) em espécies do subgênero *Thamnoxys* de *Oxalis*. Os modelos de reconstrução utilizados foram o de Máxima parcimônia (direita) e Máxima verossimilhança utilizando o modelo MK-1 (esquerda) no programa Mesquite. A reconstrução foi baseada na árvore de consenso estrito obtida da análise de máxima parcimônia das regiões de DNA plastidial. As cores indicam os números básicos mais prováveis para cada nó do cladograma.

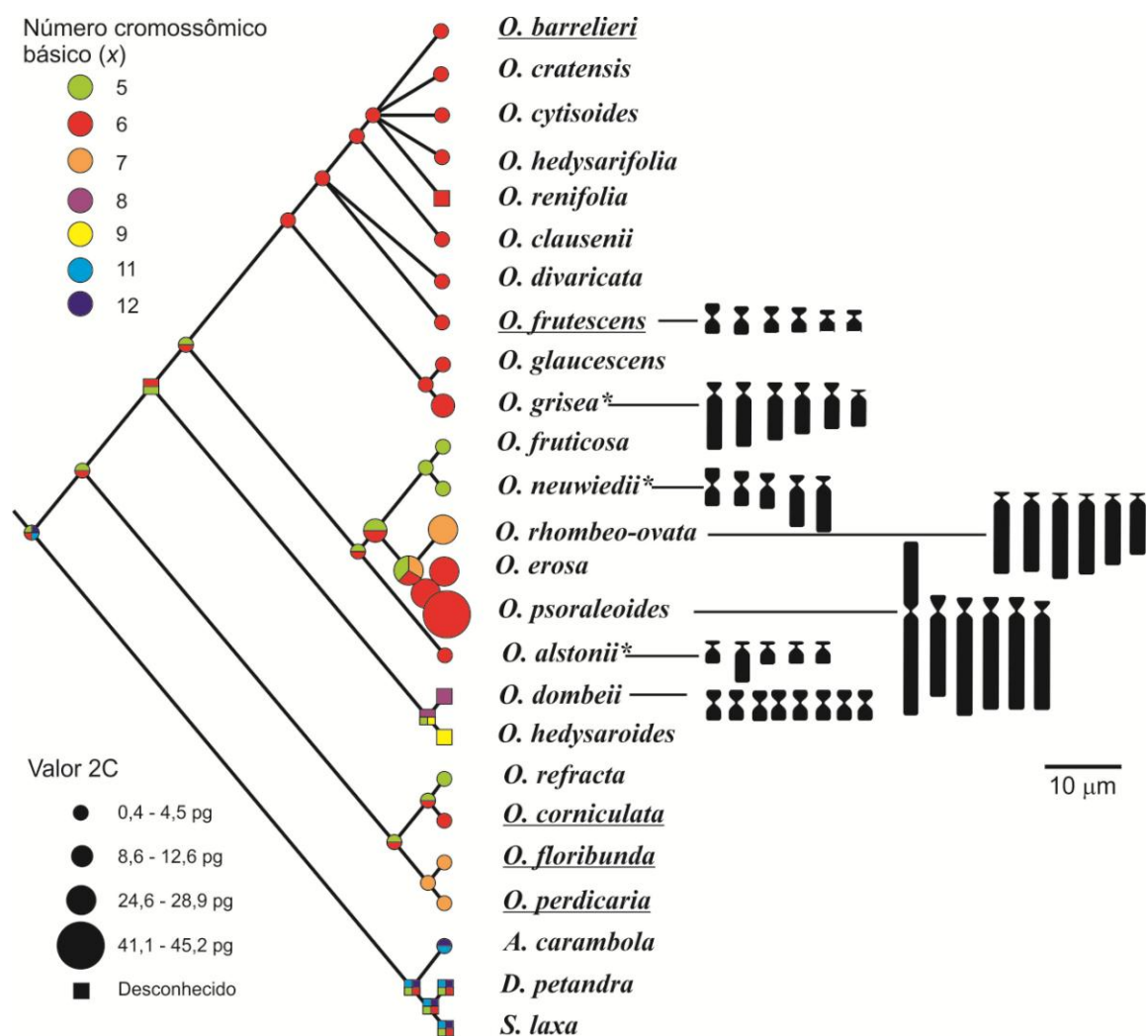


Figura 5. Reconstrução do estado de caractere para o conteúdo de DNA nuclear (valor 2C) junto com dados cromossômicos em espécies do subgênero *Thamnoxys* de *Oxalis*. Os idiogramas foram baseados em medições de metáfases obtidas neste trabalho (*) e em imagens dos trabalhos de De Azkue e Martínez (1983, 1987) e De Azkue (2000). As cores indicam os números básicos mais prováveis para cada nó do cladograma. As espécies sublinhadas representam aquelas nas quais são conhecidos materiais poliploides.

Tabela 1. Espécies do subgênero *Thamnoxys* analisadas neste trabalho com os respectivos dados de herbário e sequências de DNA analisadas (+).

Espécie	Procedência, número de coleção	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnL-trnT</i>	<i>petA-psbJ</i>	ITS
<i>Hedysarioideae</i>					
<i>O. hedysaroides</i> Kunth	Brasil	---	---	+++	+++
<i>Thamnoxys</i>					
<i>O. frutescens</i> L.	131 entre Pindobaçu e Saúde - Bahia, Brasil; JPCastro29*	---	---	---	---
<i>O. frutescens</i> L.	BR101, Sergipe, Brasil; MV426*	+++	+++	+++	+++
<i>O. frutescens</i> L.	Itaitim, Bahia, Brasil; MV514*	---	---	---	---
<i>O. divaricata</i> Mart. ex Zucc.	Morro do Chapéu, Bahia, Brasil; LPF13386*	+++	+++	+++	+++
<i>O. divaricata</i> Mart. ex Zucc.	BR – 407 Km 7, Jaguarari, Bahia, Brasil; LPF13437*	---	---	---	---
<i>O. barrelieri</i> L.	Ilhéus, Bahia, Brasil*	---	+++	+++	+++
<i>O. barrelieri</i> L.	GenBank	EU437033	---	---	---
<i>O. cratensis</i> Hook.	Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife, Brasil; MV404, MV409, MV407*	+++	+++	+++	---
<i>O. hedysarifolia</i> Raddi	Garanhuns, Pernambuco, Brasil; MV415*	+++	+++	+++	---
<i>O. cytisoides</i> C. Mart. & Zucc.	Jardim Botânico Municipal de Curitiba, Paraná, Brasil; PF3596*	+++	+++	+++	+++
<i>O. renifolia</i> R. Knuth	Brasil	+++	+++	+++	+++
<i>O. dombeii</i> A. St. -Hil.	Desconhecido	+++	+++	+++	
<i>Psoraleoideae</i>					
<i>O. psoraleoides</i> Kunth	Triunfo, Pernambuco, Brasil*	---	+++	+++	+++
<i>O. psoraleoides</i> Kunth	Areia, Paraíba, Brasil*	---	---	---	---
<i>O. psoraleoides</i> Kunth	GenBank	EU437128			
<i>O. erosa</i> R. Knuth	Brasil	+++		+++	
<i>Pleiocarpa</i>					
<i>O. glaucescens</i> Norlind	São Sebastião de Umbuzeiro, Paraíba, Brasil; LPF13539*	+++	+++	+++	+++

*. Acessos para os quais foi analisado o número cromossômico e determinado o conteúdo de DNA nuclear.

Tabela 1 continuação.

Espécie	Procedência, número de coleção	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnL-trnT</i>	<i>petA-psbJ</i>	ITS
<i>Polymorphae</i>					
<i>O. alstonii</i> Lourteig	Feira de Santana, Bahia, Brasil*	+++	---	+++	+++
<i>O. neuwiedii</i> Zucc.	Bahia, Brasil*	+++	---	+++	+++
<i>O. rhombo-ovata</i> A. St. -Hil.	Poços Azuis, Paraná, Brasil	+++	+++	+++	+++
<i>O. umbraticola</i> A. St. -Hil.	Jaqueira, RPPN Frei Caneca. Pernambuco, Brasil*	---	---	---	---
<i>O. polymorpha</i> Mart. ex Zucc.	Entre Caêm e Saúde, Bahia, Brasil*	---	---	---	---
<i>Robustae</i>					
<i>O. grisea</i> A. St. -Hil. & Naudin	Ceará, Brasil*	+++	+++	+++	+++
<i>Phyllodoxys</i>					
<i>O. fruticosa</i> Raddi	Brasil	+++	---	+++	+++
<i>Sem determinar</i>					
<i>Oxalis</i> sp.	Cultivada	---	---	+++	
<i>Grupos externos</i>					
<i>O. refracta</i> A. St.-Hil.	Pan de Azúcar, Maldonado, Uruguay; MV496	+++	+++	+++	+++
<i>O. floribunda</i> Lehm.	Arroyo del Campamento, Rio Negro, Uruguay; MV358	JN836758	JN836861	JN836790	JN836767
<i>O. perdicaria</i> (Molima) Bertero	R98, Treinta y Tres, Uruguay; MV79	JN836762	JN836878	JN836808	JN836772
<i>Averrhoa carambola</i> L.	GenBank	JN620114	---	---	AF479127
<i>Dapania pentandra</i> Capuron	GenBank	JN620116	---	---	EU436861
<i>Sarcotheca laxa</i> (Ridl.) Knuth	GenBank	AJ582366	---	---	EU436859

*. Acessos para os quais foi analisado o número cromossômico e determinado o conteúdo de DNA nuclear.

Tabela 2. Números cromossômicos e conteúdo nuclear de DNA nas espécies de *Thamnoxyis* (*Oxalis*) analisadas

Espécie	Seção taxonômica	2n	Nível de ploidia	2C±SD (pg)	Nº bandas CMA+	Nº acessos analisados
<i>O. cytisoides</i> C. Mart. & Zucc.	<i>Thamnoxyis</i>	12	2	3,10±0,02	2	1
<i>O. barrelieri</i> L.		12	2	2,99±0,07	4	1
<i>O. cratensis</i> Hook.		12	2	2,98±0,13	2	3
<i>O. frutescens</i> L.		36	6	4,21±0,16	10	3
<i>O. frutescens</i> L.		12	2	2,78±0,04	4	1
<i>O. divaricata</i> Mart. ex Zucc.		12	2	1,88±0,03	8	2
<i>O. hedysarifolia</i> Raddi		12	2	---	2	1
<i>O. glaucescens</i> Norlind	<i>Pleiocarpa</i>	12	2	1,19±0,02	4	1
<i>O. psoraleoides</i> Kunth	<i>Psoraleoideae</i>	12	2	41,14±0,71	14	4
<i>O. grisea</i> A. St. -Hil. & Naudin	<i>Robustae</i>	12	2	---	8	1
<i>O. polymorpha</i> Mart. ex Zucc.	<i>Polymorphae</i>	---	---	8,95±0,01	---	---
<i>O. umbraticola</i> A. St. -Hil.		10	2	16,50±0,01	6	2
<i>O. neuwiedii</i> Zucc.		10	2	5,24±0,50	6	2
<i>O. alstonii</i> Lourteig		10	2	1,76±0,01	6	1
<i>Oxalis</i> sp.	---	12	2	---	2	1

Tabela 3. Números cromossômicos e conteúdo de DNA em espécies do subgênero *Thamnoxys* de *Oxalis*.

Espécie	Seção	2n	n	2C
<i>O. tessmanii</i> R. Knuth	<i>Hedysarioidea</i>	18a	9	---
<i>O. fruticosa</i> R. Knuth	<i>Phyllodoxys</i>	10b		4,6; 5,82b
<i>O. alstonii</i> Lourteig	<i>Polymorphae</i>	10b,c	5	1,76b,c
<i>O. aff. rosolata</i> A. St.-Hil		10a	5	---
<i>O. neuwiedii</i> Zucc.		10c, 12 d	5c, 6d	5,24c; 13d
<i>O. rhombeo-ovata</i> A. St.-Hil.		14b, d	7	19,04b
<i>O. umbraticola</i> A. St. -Hil.		10c	5	16,50
<i>O. polymorpha</i> Mart. ex Zucc.		---	---	8,95c
<i>O. erosa</i> R. Knuth	<i>Psoraleoideae</i>	12 b, d	6	24,20b
<i>O. chartacea</i> Norlind		12a	6	---
<i>O. phaseolifolia</i> (Rusby) R. Knuth		12a	6	---
<i>O. psoraleoides</i> Kunth		12b,c,d,e	6	27,28b; 33b; 41,14c
<i>O. grisea</i> A. St.-Hil. & Naudin	<i>Robustae</i>	12a,b,d	6	10,48b
<i>O. juruensis</i> Diels		12a	6	---
<i>O. lespedezioides</i> G. Don		12a	6	---
<i>O. praetexta</i> Progel		10f	5	---
<i>O. barrelieri</i> L.	<i>Thamnoxys</i>	12c; 24a	6	2,99c; 14,28a
<i>O. cratensis</i> Hook.		12b, c	6	2,98c; 3,50b
<i>O. cytisoides</i> C. Mart & Zucc.		12c,d	6	3,10c
<i>O. divaricata</i> Mart. ex Zucc.		12c,d	6	1,88c
<i>O. dombeii</i> A. St. -Hil.		16a	8	--
<i>O. frutescens</i> L.		12a,c, 36c	6	2,36b; 2,78c; 2,96b; 4,20c
<i>O. hedysarifolia</i> Pohl ex Progel		12b,c,d	6	2,6b
<i>O. renifolia</i> R. Knuth		12b		2,84b
<i>O. sellowii</i> Spreng.		12b, d 36d,36+2Bd, 7b	6	2,28b; 7,68b; 15b
<i>O. sepium</i> A. St. -Hil.		12d, 36b		2,34b
<i>O. trianae</i> R. Knuth		36a	6	--
<i>Oxalis</i> sp.	--	12c	6	--

a. De Azkue 2000; b. De Azkue e Martínez 1987; c. presente trabalho; d. De Azkue e Martínez 1983; e. Marks 1956; f. De Azkue e Martínez 1984.

7. RESUMO

O gênero *Oxalis* L. está constituído por aproximadamente 500 espécies, com dois principais centros de distribuição, América do Sul e África do Sul. As espécies de *Oxalis* apresentam uma alta variação morfológica e de forma de vida desde anuais ou perenes, e de hábito arbóreo, geófito à arbustivo. Com base nas características morfológicas foram definidos quatro subgêneros: *Trifidus*, *Monoxalis*, *Oxalis* e *Thamnoxys*. Estes dois últimos foram por sua vez subdivididos em 29 e nove seções, respectivamente. Análises moleculares recentes tem mostrado que várias dessas seções não constituem grupos naturais. O uso simultâneo de dados cariotípicos e de conteúdo de DNA nuclear em combinação com as análises filogenéticas moleculares têm permitido entender melhor a evolução de diferentes linhagens, eventos de hibridização e poliploidia, e auxiliar no entendimento da evolução cromossômica dentro de determinados grupos de plantas. *Oxalis* apresenta uma grande variação citogenética com extensa variação dispoloide $n = 5, 6, 7, 8, 9$ e 11 , e diversos poliploides. Os números cromossômicos básicos $x = 6$ ou 7 foram sugeridos como possíveis números ancestrais para o gênero. O presente trabalho teve como objetivo analisar as relações filogenéticas e evolução cromossômica em espécies de três seções taxonômicas (*Corniculatae*, *Ripariae* e *Articulatae*) do subgênero *Oxalis* e entre seis seções do subgênero *Thamnoxys*. Para isto, foram construídas filogenias moleculares de regiões de DNA plastidial e a região nuclear, ITS. Paralelamente, foram realizadas análises citogenéticas para determinar o número e morfologia cromossômica, os padrões de distribuição da heterocromatina e o conteúdo de DNA nas mesmas espécies. Os resultados indicam que as três seções analisadas do subgênero *Oxalis* não formam grupos naturais precisando de futuras revisões taxonômicas. Nesse subgênero, as características citogenéticas variam de acordo com os clados obtidos na análise filogenética. Os dados cromossômicos sugerem a ocorrência de uma complexa evolução cariológica com recorrência do mesmo número cromossômico em clados e subgêneros diferentes e grande diversidade na morfologia e tamanho cromossômico. A variação do conteúdo de DNA nuclear observada entre $2C = 0,58$ a $41,14$ pg, representa uma das maiores variações intragenéricas conhecidas para angiospermas. A ampla variação no conteúdo de DNA nuclear, associada com o restante da variação cariotípica, parece estar associada com a elevada diversidade taxonômica do grupo.

8. ABSTRACT

Oxalis L. is a large cosmopolitan genus comprising at least 500 species, most of them native to South America and southern Africa. Species from the genus display a wide morphological and habit variation from annual to perennial species, from shrubs and subshrubs to bulbous species. Four different subgenera were recognized in *Oxalis*: *Trifidus*, *Monoxalis*, *Oxalis* e *Thamnoxys*; based mainly on morphological data. The latter two subgenera were subdivided in 29 and nine taxonomic sections respectively. Recent molecular analyses have shown that several taxonomic sections do not form natural groups. Cytogenetic and nuclear DNA content data combined with molecular phylogenetic analyses have started to be used for a better understanding of the evolution of different lineages, hybridization events, and polyploidy and to elucidate chromosome evolution in different plant groups. *Oxalis* presents huge cytogenetic variation and $n = 5, 6, 7, 8, 9, 11$ have been reported for the genus. Chromosome number $x = 6$ and 7 were proposed as possible ancestral basic numbers for the whole genus. The aims of the present work were to analyse the phylogenetic relationships and chromosome evolution in three taxonomic sections (*Corniculatae*, *Ripariae* and *Articulatae*) from subgenus *Oxalis* and species from six sections from subgenus *Thamnoxys*. To accomplish this we built molecular phylogenies based on three plastid and one nuclear regions and conducted cytogenetic analyses as determination of chromosomes number, heterochromatin pattern and nuclear DNA content. Our phylogenetic results suggest that the three sections from subgenus *Oxalis* do not form natural groups and further taxonomic revisions are necessary. In that subgenus cytogenetic characteristics are in agreement with phylogenetic data. Cytogenetic data results suggest that a complex chromosome evolution has occurred in the genus leading to the same basic chromosome numbers in different clades and subgenera and a huge diversity in chromosome morphology and number. The observed nuclear DNA content and karyotype variation seems to be correlated with the high taxonomic diversity observed in *Oxalis*.

9. CONCLUSÕES

1. As análises filogenéticas moleculares nas seções *Corniculatae* e *Ripariae* do subgênero *Oxalis* sugerem que as mesmas não constituem grupos naturais. Para tornar esses grupos monofiléticos a espécie *Oxalis serpens* deve ser transferida para a seção *Corniculatae* enquanto *O. niederleinii*, *O. refracta*, *O. eriocarpa* devem ser consideradas parte da seção *Ripariae*.

2. Os dois clados principais, nos quais foram divididas as espécies das seções *Ripariae* e *Corniculatae* de *Oxalis*, são consistentes com características citogenéticas como número cromossômico básico, morfologia cromossômica, nível de ploidia e quantidade de DNA nuclear.

3. Os dados citogenéticos observados em ambas as seções sugerem duas tendências na evolução cromossômica destes grupos: i, rearranjos cromossômicos e aumento no conteúdo de DNA gerando espécies com $x = 5$ na seção *Ripariae*; ii, eventos de poliploidização na seção *Corniculatae*.

4. As espécies com $x = 5$ da seção *Ripariae* apresentaram unicamente citotipos diploides, sugerindo que o maior conteúdo de DNA nestas espécies estaria limitando a ocorrência de eventos de poliploidia.

5. A evolução cromossômica nestas duas seções envolveria disploidia descendente, passando de $x = 6$ a $x = 5$, possivelmente resultante de complexos rearranjos cromossômicos.

6. Nas seções *Corniculatae* e *Ripariae*, $x = 5$ aparece como derivado, uma vez que as espécies com esse número básico apresentam características citogenéticas consideradas como derivadas, como cariótipos assimétricos e um elevado conteúdo de DNA nuclear.

7. As análises filogenéticas moleculares sugerem uma origem na América do Sul para a seção *Corniculatae*, diferentemente da proposta de Eiten (1956) de uma origem australásica.

8. As análises filogenéticas das espécies da seção *Articulatae* mostraram que a mesma, como definida por Lourteig (2000), não constitui um grupo natural. Para constituir um grupo monofilético deveria incluir somente as espécies com caules rizomatosos. Portanto, *O. linarantha*, com bulbos tunicados, deveria ser excluída da seção. Nesse caso, deveriam ser considerados os limites propostos anteriormente por Lourteig (1982).

9. *Oxalis linarantha* apresenta bulbos tunicados e um cariótipo bimodal, diferentemente do resto das espécies de *Articulatae*, com caules rizomatosos e cromossomos de igual tamanho. A posição filogenética dessa espécie é incerta porém a análise das regiões plastidiais sugere que seria irmã das espécies bulbosas da seção *Palmatifoliae*.

10. *Oxalis linarantha* com um conteúdo de DNA nuclear de 0,59 pg representa o menor valor 2C conhecido para o gênero. O conteúdo de DNA nuclear observado nesta espécie amplia as diferenças conhecidas para o tamanho do genoma em *Oxalis* entre 0,59 a 41,14 pg em *O. psoraleoides*, representando uma variação de mais de 70 vezes, sendo a maior variação conhecida para angiospermas.

11. Os níveis de ploidia nas espécies da seção *Articulatae* variam de diploides a heptaploides, e as análises filogenéticas bem como as similaridades citogenéticas e morfológicas sugerem que estas espécies constituam um complexo poliploide de origem recente.

12. As análises de reconstrução do estado ancestral dos números cromossômicos básicos no subgênero *Thamnoxys* sugerem $x = 6$ como o mais provável número ancestral para *Thamnoxys*.

13. A reconstrução do estado de caráter ancestral relacionado ao conteúdo de DNA nuclear para as espécies do subgênero *Thamnoxys* sugere um tamanho entre pequeno a mediano do genoma ancestral com pelo menos dois aumentos neste parâmetro durante a evolução.

14. A alta variabilidade cariológica presente no subgênero *Thamnoxys* de *Oxalis*, tanto no complemento cromossômico quanto no conteúdo de DNA e simetria cariotípica, é das maiores observadas entre as espécies de angiospermas.

15. A distribuição dos números cromossômicos básicos $x = 5$ e $x = 6$ nos subgêneros *Thamnoxys* e *Oxalis* sugere que um ou outro poderiam ter surgido pelo menos duas vezes e de forma independente durante a evolução.

16. A poliploidia é um evento comum no subgênero *Oxalis* porém em *Thamnoxys* estaria restrita a espécies da seção *Thamnoxys*.

17. A análise da distribuição da heterocromatina nas espécies de *Oxalis* revelou um outro tipo de alteração cariotípica estrutural não detectado anteriormente, apresentando diferenças em número e localização entre as distintas espécies do gênero.

18. Os maiores valores 2C em *Oxalis* não se devem à poliploidia nem à presença de grandes blocos de heterocromatina, mas mais provavelmente à abundância de retrotransposons.

19. As análises filogenéticas moleculares realizadas mostraram que a maioria das seções taxonômicas analisadas precisam de uma revisão taxonômica, embora poucas espécies necessitem ser transferidas a outras seções.

10.2 ANEXO: Normas das Revistas



MOLECULAR
PHYLOGENETICS
& EVOLUTION



Molecular Phylogenetics and Evolution

<http://www.elsevier.com/journals/molecular-phylogenetics-and-evolution/1055-7903/guide-for-authors>

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections.

Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also

for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Botanical Journal of the Linnean Society

© The Linnean Society of London, Botanical Journal of the Linnean Society



Author Guidelines

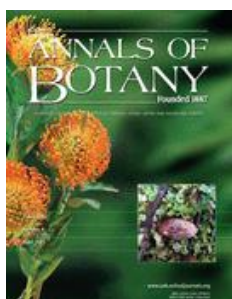
Instructions for Authors

The Linnean Society publishes four periodicals: the *Biological*, *Botanical* and *Zoological Journals*, and *The Linnean*, the Society's newsletter and proceedings.

The *Botanical Journal of the Linnean Society* publishes original papers on systematic and evolutionary botany and comparative studies of both living and fossil plants. Review papers are also welcomed which integrate fields such as cytology, morphogenesis, palynology and phytochemistry into a taxonomic framework. The Journal will only publish new taxa in exceptional circumstances as part of larger monographic or phylogenetic revisions.

Submissions to the Botanical Journal are now made on-line using ScholarOne Manuscripts. To submit to the journal go to <http://mc.manuscriptcentral.com/botjls>. If this is the first time you have used the system you will be asked to register by clicking on 'create an account'. Full instructions on making your submission are provided. You should receive an acknowledgement within a few minutes. Thereafter, the system will keep you informed of the process of your submission through refereeing, any revisions that are required, and a final decision.

Manuscripts submitted by other methods will not be considered.



http://www.oxfordjournals.org/our_journals/annbot/for_authors/index.htm
//INTRODUCTION

Scope of the journal

Annals of Botany is published for the Annals of Botany Company by Oxford University Press. Experimental, theoretical and applied papers on all aspects of plant science are welcome. The submitted manuscript or its essential content must not have been published previously or be under consideration for publication elsewhere. To merit publication in *Annals of Botany*, contributions should be substantial, written in clear English and combine originality of content with potential general interest. Submission of manuscripts that report small incremental advances or are of geographically local interest only is discouraged unless the implications of the findings are wide-reaching. Agronomic papers are expected to contain a substantial amount of basic plant biology. In general, a paper is unlikely to be accepted unless the referees and editors involved in its evaluation are enthusiastic about the science. The Covering Letter is an essential part of all submissions. It should include an ~60 word summary of the scientific strengths of the paper that the author(s) believe qualify it for consideration by *Annals of Botany*.