



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

WILLIAM SANTANA ALVES

**NÚMERO CROMOSSÔMICO E HETEROCROMATINA EM ESPÉCIES
DO GÊNERO *Oxalis* L. (OXALIDACEAE R.BR.)**

AREIA
2020

WILLIAM SANTANA ALVES

**NÚMERO CROMOSSÔMICO E HETEROCROMATINA EM ESPÉCIES
DO GÊNERO *Oxalis* L. (OXALIDACEAE R.BR.)**

Dissertação submetida como requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Orientação: Drº Leonardo Pessoa Felix e Co-orientação: Drª Angeline Maria da Silva Santos.

**AREIA
2020**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A474n Alves, William Santana.

Número cromossômico e heterocromatina em espécies do gênero *Oxalis* L. (Oxalidaceae R.Br.) / William Santana Alves. - Areia, 2020.

43 f. : il.

Orientação: Leonardo Pessoa Felix.

Coorientação: Angeline Maria da Silva Santos.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Agronomia. 2. Oxalidaceae. 3. Heterocromatina. 4. Thamnoxys. 5. CMA/DAPI. 6. Evolução cromossômica. I. Felix, Leonardo Pessoa. II. Santos, Angeline Maria da Silva. III. Título.

UFPB/BC

CDU 631(043)

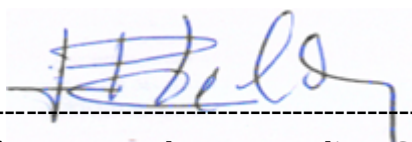
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**Número cromossômico e heterocromatina em espécies do gênero *Oxalis* L.
(Oxalidaceae R.Br.)**

AUTOR: WILLIAM SANTANA ALVES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em AGRONOMIA
(Agricultura Tropical) pela comissão Examinadora:



Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix – CCA/UFPB
Orientador

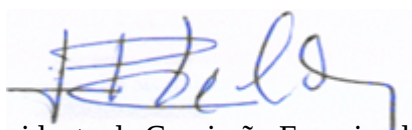


Prof. Dr. Marcelo dos Santos Guerra Filho – UFPE
Examinador



Profª. Drª. Ana Emilia Barros e Silva – UFPB
Examinadora

Data da realização: 19/02/2020



Presidente da Comissão Examinadora
Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix Orientador

A Deus, por ser um pai maravilhoso. À minha família, que esteve sempre ao meu lado em todos os momentos, em especial a meus avós maternos (Francisca Dantas Brito e Francisco Santana Brito).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria Santana Alves e Lenildo Severino Alves (*In Memoriam*), a minha irmã Wilma Santana Alves, aos meus avós maternos Francisca Dantas Brito e Francisco Santana Alves e a todos os meus familiares que incentivaram durante esta caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), pelo apoio institucional e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo Pessoa Felix, por aceitar ter me orientado, pelos conhecimentos científicos e pela confiança, meu muito obrigado.

A melhor coorientadora Dr^a. Angeline Maria da Silva Santos, pelos ensinamentos no desenvolvimento do trabalho, disponibilidade, pelos conhecimentos científicos, pela confiança, amizade, pelos melhores conselhos tanto na vida a pessoal como acadêmica, uma irmã, que a pesquisa me propiciou, um exemplo de profissional e pessoa.

A todos os membros do laboratório de Citogenética vegetal da UFPB, e a equipe do herbário professor Jayme Coelho de Moraes (EAN) pelo suporte à pesquisa Angeline Santos, Jose Lourivaldo, Achilles Neves, Saulo Alves, Enoque Medeiros Neto, Felipe Nollet, Amanda Santos, Luciana Ledra, Ana Emília Barros e Silva, Cláudio Cesar, Erton Mendonça, Maria José, Ronimeire Torres, Rodrigo Garcia, Cattleya do Monte, Sibelle Dias, Karla, Talita e Rosimeire, a todos agradeço pelo companheirismo e apoio no decorrer dos estudos e pesquisas. Muito obrigado.

A meu companheiro Adailton Junior, por sempre estar ao meu lado, pelo apoio e carinho.

Aos amigos conquistados nessa jornada da pós-graduação: Wilma Celedonio, Eleonora Santiago, Andressa Kamila, Jackson Lobo, Ítala, Fatima, Joana, Francisco Edson, Nabor Galvão, Hilda, Mirelly, Andressa, Aparecida.

Agradeço as amigas da graduação (Taiane, Carla, Kamila, Erika e Karem) por me estimular e ajudar na vida acadêmica. A Joenia Leal e a Toshik Iarley, pela amizade, apoio e estímulo a fazer o mestrado em Areia-PB.

As todas as pessoas que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste sonho e para a construção de quem sou hoje.

Obrigado a todos!

RESUMO

Oxalis L. é o maior gênero da família Oxalidaceae, com aproximadamente 500 espécies, dividido em quatro subgêneros: *Trifidus*, *Monoxalis*, *Oxalis* e *Thamnoxys*. O subgênero *Thamnoxys* apresenta uma ampla diversidade morfológica, acompanhada por uma variação cariotípica incomum, com a maioria das espécies diploide, com $n = 5, 6, 7, 8, 9$ e 11 . As relações filogenéticas do grupo ainda não foram na sua totalidade elucidadas. Neste trabalho foram analisadas através da coloração CMA/DAPI, o cariótipo de 13 espécies e uma subespécie de *Oxalis* das seções *Polymorphae*, *Thamnoxys* e *Holophyllum*, *Hedysarioideae* e *Phyllodoxys*, com o objetivo de caracterizar o cariótipo desses táxons, buscando marcas cromossômicas que possam contribuir para entender a evolução cromossômica do grupo. Pontas de raízes foram pré-tratadas com 8HQ, por 24 horas e depois fixadas em Carnoy. As lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento em ácido acético a 60% e envelhecidas em temperatura ambiente. Em seguida, as melhores lâminas foram coradas com Chromomycin (CMA) e 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) e fotografadas. O número cromossômico predominante entre as espécies analisadas foi $2n = 10$, exceto em *O. puberula* com $2n = 20$ (sect. *Polymorphae*) e nas espécies *O. hedysarifolia* com $2n = 12$ e *O. frutescens* com $2n = 24$, ambas pertencentes a seção *Thamnoxys*. No geral, as espécies apresentaram fórmula cariotípica semelhantes com cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e acrocêntricos. A dupla coloração com os fluorocromos revelou apenas bandas CMA^+ , na posição terminal do braço curto. O número básico $x = 5$ é sugerido, devido a frequência que é encontrado nas espécies neste trabalho nas espécies do subgênero *Thamnoxys*. Assim, sugere-se que entre as angiospermas, as espécies do subgênero *Thamnoxys* é uma das que mais apresentam assimetria cariotípica. O enriquecimento de dados citotaxonômicos vegetais das espécies pertencentes ao subgênero *Thamnoxys*, incluindo a determinação do número cromossômico e análises filogenéticas mais completas, ainda se torna necessário para elucidar o número básico ancestral do gênero e quais seriam os principais mecanismos envolvidos na evolução cromossômica do grupo.

Palavras-chave: Bandas heterocromáticas. CMA/DAPI. Evolução cromossômica. *Oxalis*. Subgênero *Thamnoxys*.

ABSTRACT

Oxalis L. is the largest genus of the Oxalidaceae family, with approximately 500 species, divided into four subgenera: *Trifidus*, *Monoxalis*, *Oxalis* and *Thamnoxys*. The subgenus *Thamnoxys* has a wide morphological diversity, accompanied by an unusual karyotype variation, with most diploid species, with $n = 5, 6, 7, 8, 9$ and 11 . The phylogenetic relationships of the group have not yet been fully elucidated. In this work, we analyzed through the CMA/DAPI staining, the karyotype of 13 species and a subspecies of *Oxalis* from the sections *Polymorphae*, *Thamnoxys* and *Holophyllum*, *Hedysarioideae* and *Phyllodoxys*, with the objective of characterizing the karyotype of these taxa, looking for chromosomal marks understand the chromosomal evolution of the group. Root tips were pre-treated with 8Hq for 24 hours and then fixed in Carnoy. The slides were prepared using the 60% acetic acid crushing method and aged at room temperature. Then, the best slides were stained with Chromomycin (CMA) and 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) and photographed. The predominant chromosome number among the species analyzed was $2n = 10$, except in *O. puberula* with $2n = 20$ (sect. *Polymorphae*) and in *O. hedysarifolia* species with $2n = 12$ and *O. frutescens* with $2n = 24$, both belonging to the section *Thamnoxys*. In general, the species presented similar karyotype formula with metacentric, submacentric and acrocentric chromosomes. The double staining with fluorochromes revealed only CMA⁺ bands, in the terminal position of the short arm. The basic number $x = 5$ is suggested, due to the frequency that is found in the species in this work in the species of the subgenus *Thamnoxys*. Thus, it is suggested that among angiosperms, the species of the subgenus *Thamnoxys* is one of the ones that most show karyotype asymmetry. The enrichment of plant cytotaxonomic data of species belonging to the subgenus *Thamnoxys*, including the determination of the chromosome number and more complete phylogenetic analyzes, is still necessary to elucidate the basic ancestral number of the genus and what are the main mechanisms involved in the chromosome evolution of the group.

Keywords: Chromosomal evolution. CMA/DAPI. Heterochromatic bands. *Oxalis*. subgenus *Thamnoxys*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Distribuição geográfica do gênero *Oxalis*, dividido em seus quatro subgêneros de acordo com as cores indicadas na legenda. Fonte: Lourteig (2000)5

FIGURA 2. Células metafásicas coradas com os fluorocromos CMA e DAPI. Espécies da seção ***Polymorphae*** com $2n = 10$ em *Oxalis alstonii* (A); *O. blackii* (B); *O. colatinensis*, PF 4631 (C) e PF 4625 (D); *O. kollmannii* (E); *O. neuwiedii* (F). *O. neuwiedii* subsp. *Neuwiedii*, PF 4617 (G) e TS 102 (H); *O. polymorpha* (I); $2n = 20$ em *O. puberula* (J). Espécies da seção ***Thamnoxys***, com $2n = 24$ em *O. frutescens* (K); com $2n = 12$ em *O. hedysarifolia* (L). Espécie da seção ***Hedysarioideae***, com $2n = 10$ em *O. hedysaroides* (M). Espécies da seção ***Holophyllum***, $2n = 10$ em *O. alata* (N); *O. mandioccana* (O). Espécie da seção ***Phyllodoxys***, com $2n = 10$ em *O. fruticosa* (P). Barra em I corresponde a $10\mu\text{m}$32

FIGURA 3. Espécies das seções ***Polymorphae***: *O. alstonii* (A); *O. blackii* (B); *O. colatinensis*, PF4631 (C) e PF4625 (D); *O. kollmannii* (E); *O. neuwiedii* (F); *O. neuwiedii* subsp. *Neuwiedii*, PF4617 (G) e TS 102 (H); *O. polymorpha* (I); *O. puberula* (J). ***Thamnoxys***: *O. frutescens* (K); *O. hedysarifolia* (L). ***Hedysarioideae***: *O. hedysaroides* (M). ***Holophyllum***: *O. alata* (N); *O. mandioccana* (O). ***Phyllodoxys***: *O. fruticosa* (P). Fonte: da figura B, Cristiane Snak.....33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Espécies da família Oxalidaceae analisadas por meio de dupla coloração com fluorocromos CMA/DAPI. Espécie, local de coleta, Voucher, fórmula cariotípica (FC), contagens cromossômicas prévias (CP), números cromossômicos determinados no presente trabalho (PT), bandas heterocromáticas.	29
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

8-HQ – 8-hidroxiquinoleína

APG – Angiosperm Phylogeny Group

CCDB – Chromosome Counts Database

CMA – Cromomicina A3

DAPI – 4'6-diamino-2-fenilindol

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EAN – Escola Agrônômica do Nordeste

ER – Everton Richetti

LPF – Leonardo Pessoa Felix

mg – Miligrama

ml – Mililitro

PF – Pedro Fiaschi

TS –Tiago Souza Costa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	111
2 REFERENCIAL TEÓRICO	112
2.1 Sistemática, taxonomia e importância econômica	112
2.2 Distribuição geográfica e diversidade do gênero <i>Oxalis</i>	114
2.3 Número cromossômico	115
2.4 Displóidia e poliploidia	117
2.5 Padrões de heterocromatina em <i>Oxalis</i>	119
2.6 Simetria cariotípica e cariótipos bimodais	21
REFERÊNCIAS	22
Capítulo I - Evolução cromossômica de <i>Oxalis</i> L. subgênero <i>Thamnoxys</i> (Endl.) Reiche (Oxalidaceae R.Br.)	29
Anexo A: Normas do periódico <i>Acta Botânica Brasilica</i>	44

1 INTRODUÇÃO GERAL

Oxalidaceae é uma família que compreende cinco gêneros: *Sarcotheca*, *Dapania*, *Bryophytum*, *Averrhoa* e *Oxalis* (APG IV, 2016). O gênero *Oxalis* L. é o que apresenta maior diversidade e número de espécies da família com cerca de 500 espécies (KNUTH 1930; LOURTEIG, 2000; THE PLANT LIST, 2019), e dividido em quatro subgêneros: *Trifidus* (duas espécies), *Monoxalis* (duas espécies), *Oxalis* (205 espécies) e *Thamnoxys* (71 espécies), sendo esta a última classificação para *Oxalis* proposta por Lourteig (2000).

Algumas espécies de *Oxalis* são utilizadas na alimentação (*Oxalis tuberosa*), outras na medicina popular como antipiréticas, ornamentais e na apicultura (EITEN, 1963). As espécies da América do Sul apresentam variação na morfologia do caule (bulbos, tubérculos, rizomas e caules reptantes). Já as espécies que se encontram na África do Sul apresentam exclusivamente caules bulbosas (GARDNER et al., 2012). No Brasil, o subgênero predominante é o *Thamnoxys* (LOURTEIG, 1994; ABREU & FIASCHI, 2012).

O subgênero *Thamnoxys* é dividido em nove seções com base em características morfológicas, diversidade de hábito e em sua distribuição geográfica restrita a América do Sul e Central (LOURTEIG, 2000). Há espécies do gênero *Oxalis* subgênero *Thamnoxys* que contem relações filogenéticas que ainda não foram esclarecidas, tais espécies se encontra no Mato Grosso do Sul (FIASCHI, 2018) e em demais localidades.

A análise da variação cariotípica, tem contribuído de forma significativa para o estabelecimento de delimitações taxonômicas filogeneticamente mais coerentes, pois a mesma, gera conhecimento sobre os grupos de plantas que ainda não são considerados suficientemente bem conhecidos para que possam ser utilizados em estudos evolutivos e de conservação (RAPINI, 2010; SOUZA et al., 2012).

A citotaxonomia vegetal pode revelar informações de grande relevância para a filogenia de grupo por meio da análise de números cromossômicos, padrões de distribuição de bandas heterocromáticas e quantificação do material genético. A informação do cariótipo é a primeira expressão fenotípica do genótipo, que não é influenciado por condições ambientais, estágio de desenvolvimento ou diferentes níveis de expressão gênica (GUERRA, 2012).

Os parâmetros mais frequentes na citotaxonomia vegetal clássica é a determinação do número básico, morfologia cromossômica e análise do comportamento meiótico, sendo que a determinação do número cromossômico é o mais comum em plantas (GUERRA, 2000). Além do número cromossômico, informações sobre a distribuição e quantidade da heterocromatina constitutiva avaliadas por meio de diferentes técnicas de bandeamento, a diferenciação da

heterocromatina por fluorocromos, especialmente o CMA/DAPI, vem sendo bastante útil na caracterização cariotípica de famílias, nos mais variados níveis hierárquicos (GREILHUBER, 1984).

Diante disso, o objetivo do trabalho foi o estudo citotaxonômico do subgênero *Thamnoxys*, analisando a variabilidade cromossômica numérica, níveis de ploidia, localização e composição da heterocromatina por meio da coloração com os fluorocromos CMA/DAPI em espécies ocorrentes no Brasil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sistemática, taxonomia e importância econômica

A família Oxalidaceae encontra-se no clado da subclasse Eurosids I, constituindo a ordem Oxalidales junto com as famílias Brunelliaceae, Cephalotaceae, Connaraceae, Cunoniaceae e Elaeocarpaceae. Dentre as quais a família mais próxima à Oxalidaceae é Connaraceae (APG, 2016). Oxalidaceae é uma família que compreende cinco gêneros: *Sarcotheca*, *Dapania*, *Bryophytum*, *Averrhoa* e *Oxalis*, incluindo aproximadamente 950 espécies (LOURTEIG, 2000; APG IV, 2016). *Oxalis* é o gênero que apresenta grande diversidade e com o maior número de espécies da família, que compreende aproximadamente 500 espécies (KNUTH, 1930; LOURTEIG, 2000).

A classificação mais completa para o gênero *Oxalis* foi realizada por Knuth (1930), que organizou o gênero em 37 seções. Sendo este questionado por alguns trabalhos realizados posteriormente, os estudos com análises moleculares, citogenéticos e com novos estudos morfológicos revelaram a artificialidade desses grupos (EITEN, 1963; EMSHWILLER E DOYLE, 1998; LOURTEIG, 2000; DE AZKUE, 2000). Os estudos mais recentes sobre a taxonomia do gênero foram realizados por Lourteig (1979, 1982, 1994 e 2000), que desenvolveu o estudo taxonômico mais completo das espécies sul-americanas de *Oxalis*. Além disso, estudos sobre *Oxalis* foram desenvolvidos por diversos autores, por exemplo Fiaschi & Conceição (2005), Fiaschi (2006) e Abreu et al. (2008).

A classificação do gênero *Oxalis* em quatro subgêneros foi proposta por Lourteig (1979, 1982, 1994, 2000) formado por: *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Trifidus* Lourteig, *Thamnoxys* (Endl.) Reiche e *Oxalis* L. Os subgêneros *Monoxalis* e *Trifidus* são formados por duas espécies cada, enquanto *Oxalis* possui 204 (divididas em 29 seções) e *Thamnoxys* com 71, (dividida em

nove seções). As espécies de folhas digitadas e sem ráquis pertencem ao subgênero *Oxalis*, as de folhas pinadas e raque presentes foram agrupadas no subgênero *Thamnoxyis*, e aquelas com folhas simples foram incluídas nos subgêneros *Monoxalis* e *Trifidus* (LOURTEIG, 1994; 2000). Uma característica compartilhada por todas as espécies de *Oxalis* é a heterostilia (LOVETT DOUST et al., 1981). Heterostilia é um polimorfismo floral geneticamente controlado, que é encontrado em aproximadamente 28 famílias de angiospermas (BARRET, 1992). Para sua caracterização, é necessário que uma espécie apresente hercogamia recíproca (estratégia realizada pelas angiospérmicas hermafroditas para reduzir a interferência sexual entre a função masculina e feminina através da separação espacial entre as anteras e o estigma), altura recíproca dos verticilos reprodutivos entre morfos, e um sistema de auto e intramorf incompatibilidade (GANDERS, 1979). A heterostilia pode ser expressa na forma de distília, que consiste na existência de dois morfos florais: brevistilo e longistilo, respectivamente, estigma abaixo do nível das anteras e estigma acima do nível das anteras (BARRET & RICHARDS, 1990). Tal evento é interpretado como um sistema que promove a polinização cruzada (BARRET et al., 2000; LI & JOHNSTON, 2001).

Nas *Oxalis*, além da fecundação cruzada promovida pela heterostilia, existem registros de espécies autógamas e apomíticas (EITEN, 1963; LOVETT DOUST 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 (brevistilo e longistilo) (GARDNER et al., 2012). Já as características que distinguem morfologicamente 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).

A espécie que apresenta maior valor econômico dentro do gênero é *Oxalis tuberosa* Molina (oca), cultivada do território Venezuelano até a Argentina e cujos tubérculos são utilizados como alimento (EMSHWILLER & DOYLE, 1998). Outras espécies são utilizadas na medicina popular como antitérmico, havendo também espécies usadas como plantas ornamentais e na apicultura (EITEN, 1963). Há ainda algumas espécies que apresentam uma distribuição cosmopolita e fácil dispersão, sendo analisadas como ervas daninhas, das quais podemos citar *O. pes-caprae* L., *O. debilis* Kunth e *O. corniculata* L.

2.2 Distribuição geográfica e diversidade do gênero *Oxalis*

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 África como na América há um grande número de espécies endêmicas, grupos taxonômicos que se desenvolveram numa região restrita, o que faz com que estejam em constante risco de desaparecimento (EMSHWILLER, 2002). O gênero apresenta a maior diversidade e o maior número de espécies da família, com cerca de 504 espécies (KNUTH 1930; LOURTEIG 2000; THE PLANT LIST, 2019).

Lourteig (2000) e De Azkue (2000) sugeriram que a América seria o centro de origem das *Oxalis*, a partir do qual o gênero teria se diversificado, pois nesta região ocorre a maior variação morfológica nas espécies do gênero. Estudos mais recentes realizados com análises moleculares demonstraram 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). Contudo, as análises moleculares revelaram que as espécies bulbosas apresentam uma origem no território do sul da América do Sul (GARDNER et al., 2012).

O subgênero *Oxalis* apresenta quatro seções (*Oxalis*, *Thamnoxys*, *Trifidus* e *Monoxalis*) distribuídas geograficamente nas Américas do Sul, Central e do Norte e África do Sul (Figura 1). O subgênero *Oxalis* com espécies nas Américas do Norte e Central, O subgênero *Thamnoxys*, apresenta espécies na América do Sul e Central (LOURTEIG, 1994). Os outros dois subgêneros apresentam uma distribuição restrita. As espécies de *Trifidus* compreende uma distribuição restrita ao norte do Chile, noroeste da Argentina e Bolívia e em regiões desérticas de mais de 5000 m de altitude. E o subgênero *Monoxalis* é encontrado no sul dos Estados Unidos e México (LOURTEIG, 2000).



Figura 1: Distribuição geográfica do gênero *Oxalis*, dividido em seus quatro subgêneros de acordo com as cores indicadas na legenda. Fonte: Lourteig (2000).

Morfologicamente, *Oxalis* possui uma ampla variabilidade de caule, hábito (herbáceas, subarbusivas ou arbustivas) e espécies com ciclo anuais a perenes, ocorrendo em habitats temperados e tropicais, crescendo do nível do mar a mais de 3700 m de altitude (LOURTEIG, 1983, 2000). Nas espécies da América do Sul é encontrada a maior variação na morfologia do caule, sendo estes no formato de bulbos, tubérculos, rizomas e caules reptantes. As espécies que se encontram na África do Sul apresentam exclusivamente caules bulbosas perenes (bulbos do tipo tunicado) sendo *Oxalis* um dos únicos gêneros dentro das não-monocotiledôneas que apresenta bulbos verdadeiros (GARDNER et al., 2012).

2.3 Número cromossômico

A determinação do número cromossômico é o parâmetro mais empregado na citotaxonomia vegetal (RAVEN, 1975). A análise citogenética é uma técnica simples e rápida, que fornece informações substanciais sobre o genoma da espécie. Além disso, não é influenciado pela idade da planta, fase de desenvolvimento e condições externas (GUERRA, 2008). A análise citogenética possibilita realizar comparações dos números cromossômicos em um grande número de espécies de um táxon (GUERRA, 1990). Há famílias vegetais que apresentam uma alta diversidade cariotípica em relação aos números cromossômicos (Commelinaceae, Euphorbiaceae, Apocynaceae, Orchidaceae) e há outras que possuem

estabilidade cromossômica numérica como as espécies pertencentes a família Rutaceae, subfamília Aurantioideae (GUERRA et al., 2000; BARROS & SILVA et al., 2010).

As alterações do número cromossômico podem ocorrer devido a dois processos principais: poliploidia, que é definida como multiplicação do conjunto cromossômico e a disploidia, que é o aumento ou diminuição de um ou poucos cromossomos (STEBBINS, 1971). Com a determinação do número cromossômico é possível reconhecer o número básico ancestral do grupo, proporcionando um melhor entendimento sobre as diferentes linhas evolutivas que são marcadas pelas variações graduais envolvendo eventos de disploidia e poliploidia (GUERRA, 1990). O gênero *Oxalis* possui uma grande variação cromossômica. Cerca de 12% das espécies de *Oxalis* foram analisadas citogeneticamente, apresentando uma ampla série dispoloide $n = 5, 6, 7, 8, 9$ e 11 . Além disso, esses estudos mostraram variações não só em número, mas também em tamanho e morfologia cromossômica (NARANJO et al., 1982; DE AZKUE & MARTÍNEZ 1983, 1984, 1988, 1990; DE AZKUE, 2000).

Os números $x = 6$ e $x = 7$ são sugeridos na literatura como os dois prováveis números cromossômicos básicos ancestrais para o gênero, pois ainda não é definido um número padrão. 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, do número básico $x = 6$ que está presente em várias seções do subgênero *Oxalis* e também é o mais encontrado entre as espécies do subgênero *Thamnoxyis*, aparecendo em quatro das nove das seções, deste subgênero. O número básico $x = 6$ apresentou o aspecto mais amplo no gênero, podendo ser considerado um estado pleisiomórfico, de tal maneira que seria o número cromossômico básico ancestral de *Oxalis* (DE AZKUE, 2000).

Ainda são necessários estudos detalhados sobre as relações evolutiva do gênero, pois 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). Também há casos em que se observam diferenças no número básico entre espécies pertencentes a um mesmo grupo (DE AZKUE & MARTÍNEZ, 1983, 1988), evidenciando assim a importância de se compreender as relações evolutivas entre e dentro das diferentes seções taxonômicas.

O cariótipo das espécies de *Oxalis* apresenta uma variação que são consequência de vários rearranjos (numéricos e estruturais) cromossômicos ocorridos durante a evolução do

gênero (MARKS, 1956; DE AZKUE, 2000). A poliploidia, assim como em quase todas as angiospermas, fez parte da evolução do gênero *Oxalis*, sendo constatado no gênero níveis de ploidia que variam desde diploides (Ex.: *O. conorrhiza* Jacq.) até octaploides (Ex.: *O. corniculata* L.) (MARKS, 1956; NARANJO et al., 1982; DE AZKUE & MARTÍNEZ, 1983, 1984, 1988, 1990; DE AZKUE, 2000). A técnica mais utilizada na determinação do número cromossômico em vegetais com cariótipos semelhantes são métodos convencionais, que fornecem o número e morfologia do cromossomo (GUERRA, 2000a). Entretanto, com o uso da técnica de bandeamento cromossômico com o fluorocromo CMA/DAPI é possível identificar a região do cromossomo rica em GC e AT.

2.4 Displóidia e Poliploidia

Há duas formas de mudanças no número cromossômico que estão relacionadas com a filogenia e a evolução cariotípica, que são a poliploidia e a displóidia, enquanto as alterações realizadas por aneuploidias não possuem implicações na evolução (GUERRA, 2000). O número cromossômico é o parâmetro fundamental citogenético e sua comparação permite inferir eventos de poliploidia e displóidia, ambos claramente implicadas na evolução cariotípica em eucariotos (GUERRA, 2000).

A poliploidia, é a obtenção de no mínimo três conjuntos completos de cromossomos, e pode ser definida como a formação de números cromossômicos elevados (GRANT, 1981), sendo por multiplicação ou duplicação de um complemento cromossômico inteiro (GUERRA, 2008), aumentando o nível de ploidia em algumas espécies, estando comumente associada à especiação e a origem de novas adaptações (LEVIN, 2002). Nas Angiospermas se acredita que entre 50 e 70% das espécies são poliploides, mas se forem considerados os eventos antigos de duplicação essa porcentagem chega a 100% (CUI et al., 2006).

A displóidia é um fenômeno genético que direciona os cariótipos ao aumento (ascendente) ou o decréscimo (descendente) no número cromossômico haploide, podendo incluir um único cromossomo, um par de cromossomos ou mais de um par cromossômico (GRANT, 1981; GUERRA, 2008). Sendo este mecanismo importante na evolução e diferenciação dos cariótipos em grupos relacionados filogeneticamente, bem como nos níveis de simetria do complemento cromossômico (GUERRA, 2008). A variação displóide pode ser originada por translocações Robertsonianas, fusões ou fissões cêntricas e translocações

recíprocas (GUERRA, 2008). O evento das disploidias descendentes em plantas é mais comum que as disploidias ascendentes (LEVIN, 2002; GUERRA, 2012), mas nem sempre é fácil determinar a natureza e a direção destes eventos. Em virtude das estruturas cariótipos serem dinâmicas, é imprescindível a reconstrução de cariótipos ancestrais, com base na caracterização detalhada de cariótipos atuais a fim de que a direção da variação cariotípica seja compreendida (HU et al., 2011). A principal diferença entre disploidia e os outros mecanismos de evolução cariotípica (poliploidia) é que nela pode haver redução ou aumento no número cromossômico sem promover alterações quantitativas ou qualitativas nos genes (GUERRA, 1988). Tais alterações podem ocorrer devido aos rearranjos estruturais como translocação, fusão e fissão cêntrica (GUERRA, 1988; SUMNER, 2003).

As espécies que apresentam genomas 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). As alterações que ocorrem na morfologia, fenologia, fisiologia e ecologia são inerentes à poliploidia e podem acontecer em poucas gerações (LEVIN, 2002). A poliploidia possibilita que as espécies vegetais colonizem habitats pioneiros e evolua mais rapidamente, pois o maior número de cromossomos promove mudanças evolutivas adaptativas (OTTO & WHITTON, 2000; SILVEIRA et al., 2016).

Há ocorrência de citótipos diploides e poliploides da mesma espécie em regiões geográficas distintas, com diferenças de temperatura, precipitação e níveis de radiação (OTTO & WHITTON, 2000; LEVIN, 2002; SCHIFINO-WITTMANN, 2004). No entanto, não se sabe se existe um padrão de condições ambientais relacionadas à ocorrência de poliploidia ou quais condições ambientais influenciariam a persistência e distribuição natural de poliplóides (JOHNSON et al., 2003). Estudos de espécies amplamente distribuídas em diversos ambientes, podem fornecer informações que auxiliem no entendimento de como a poliploidia influencia a diversificação e distribuição geográfica de táxons proximalmente relacionados, de tal forma que se possa determinar as características de condições ambientais em que os poliploides são encontrados (SILVEIRA et al., 2016).

Locais como os de afloramentos rochosos, formações geológicas graníticas ou gnáissicas do pré-cambriano que se destacam em uma paisagem plana (SARTHOU et al., 2010), são conhecidas por ter condições edafoclimáticas (características definidas através de fatores, como o relevo, a litologia, a temperatura, a humidade do ar, a radiação, o tipo de solo, o vento entre outros) mais severas em relação ao ambiente do entorno, exercendo uma função seletiva

importante para a evolução e especiação vegetal. Tal fato acontece por isolamento geograficamente em relação a outros habitats, a flora dos inselbergues que pode apresentar diferenciação morfológica e cromossômica, possibilitando assim a avaliação de hipóteses relacionadas aos mecanismos envolvidos na diversificação das espécies (DODSWORTH et al., 2016 e SANTOS, 2017). Os poliploides podem ser classificados em duas formas diferentes e em quatro tipos principais: neopoliploides, paleopoliploides, aloploploides e autoploploides (GUERRA, 2008). Os conceitos de paleopoliploides e neopoliploides estão relacionados com o tempo de formação dos poliploides. Os paleopoliploides são aqueles nos quais os ancestrais são desconhecidos ou estão extintos, e os neopoliploides, por serem de origem recente, são mais fáceis de distinguir e caracterizar (STEBBINS, 1971).

Os aloploploides são aqueles surgidos por hibridização interespecífica, em alguns casos intergenérica, enquanto os autoploploides são originados a partir do cruzamento entre ou dentro de populações pertencentes a uma mesma espécie (SOLTIS & SOLTIS, 2000). A aloploploidia é a via mais frequente para a formação de poliploides em plantas (CARPUTO et al., 2003), porém autoploploides também apresentem uma considerável frequência na natureza (SOLTIS et al., 2007).

2.5 Padrões de heterocromatina em *Oxalis*

A heterocromatina e a eucromatina são diferenciadas com base na compactação diferencial na interfase (GREWAL & JIA, 2007). Heterocromatina é altamente condensada, compactada através da organização dos nucleossomos, transcricionalmente silenciada (GREWAL & MOAZED, 2003; DJUPEDAL & EKWALL, 2008), e a eucromatina menos condensada em relação a heterocromatina, consequentemente mais acessível à maquinaria da transcrição, sendo composta principalmente por regiões gênicas (DJUPEDAL & EKWALL, 2008). Recentes análises citogenéticas indicam que a heterocromatina em plantas pode ter origem muito diferente, composição e dinâmica (FRANSZ et al., 2000).

A constituição e manutenção da heterocromatina unificam diversos tipos de informação, incluindo a localização cromossômica, localização nuclear e a ocorrência de elementos de DNA repetitivo (WEILER & WAKIMOTO, 1995; BIRCHLER et al., 2000; GREWAL & JIA, 2007). Estas regiões são encontradas nos centrômeros, telômeros, e algumas vezes formando blocos intersticiais (HALL et al., 2002). A região da heterocromatina constitutiva caracteriza-se por permanecer condensada através do ciclo celular, pelo tempo de replicação ocorrer na fase S tardia, rica em sequências repetidas em tandem e transposons, e seu estado heterocromático é

uma característica cromossômica herdável, recombinação meiótica indetectável, extensiva metilação do DNA, baixa acetilação da histona, espaçamentos dos nucleossomos regular e baixa acessibilidade da nuclease (PEDROSA et al., 2001; PARTRIDGE et al., 2002; EISSENBERG & ELGIN, 2005).

Heterocromatina pode ser encontrada em loci regulados pelo desenvolvimento, onde o estado da cromatina pode mudar em respostas aos sinais e atividade genética (GREWAL & JIA, 2007), quando não é necessariamente restrita a um cromossomo do par, são consideradas regiões que são epigeneticamente reprimidas (i.e. termo referido como uma informação genética extra que com ajuda de modificações de cromatina e DNA ajudam ou inibem determinado genes) e são heterocromáticas apenas durante uma parte do ciclo de vida, é também chamada de heterocromatina facultativa (SUMNER, 2003). Em contrapartida, as regiões que permanecem condensadas ao longo do ciclo celular, ricas em sequências repetidas em tandem e transposons onde seu estado heterocromático é uma característica cromossômica herdável, ocorrendo no par cromossômico homólogo, recebe o nome de heterocromatina constitutiva (PEDROSA et al., 2001; PARTRIDGE et al., 2002; GREWAL & JIA, 2007).

A análise da distribuição e composição da heterocromatina é uma ferramenta importante na análise citotaxonômica, pois esta permite diferenciar cariótipos através do número, tamanho e morfologia similares em grupos vegetais que apresentam números cromossômicos constantes, cariótipos simétricos e cromossomos tamanho pequenos (inferior a 2 µm), os quais apresenta difícil visualização do centrômero (ALMEIDA et al., 2007; BARROS & SILVA et al., 2010; CORDEIRO et al., 2017). A heterocromatina apresentar coloração diferenciada, devido a suas regiões eucromáticas no cariótipo das espécies, podendo estas regiões variar em número, tamanho e localização nos cromossomos (BENNETZEN, 2000; GUERRA, 2000).

Um das técnicas mais difundidas na análise do padrão de heterocromatina é o emprego dos fluorocromos Chromomicina A3 (CMA) e 4'6-diamidino-2-phenilindol (DAPI), que se ligam preferencialmente a regiões do genoma ricas em pares de base GC e AT, respectivamente (BARROS & SILVA et al., 2010). A identificação das bandas heterocromáticas, foi utilizada na caracterização citogenética das espécies *O. psoraleoides* Kunth e *O. rhombeo-ovata* A. St.-Hil., observado que ambas apresentaram diferentes padrões de bandas CMA terminais, sendo bandas positivas para (CMA⁺) nos braços longos (VAIO et al., 2018). As espécies *Oxalis monticola* Arechav. e *O. articulata* subsp. *rubra* St. Hil. exibiram dois pares de cromossomos com bandas CMA⁺ e para *O. linarantha* Lourteig, a região proximal e todo o braço longo no par maior de cromossomos submetacêntricos eram positivos para CMA (VAIO et al., 2016).

2.6 Simetria e Assimetria Cariotípica e Cariótipos Bimodais

A simetria cariotípica tem sido utilizada para inferir a direção da evolução em plantas superiores, assim como para a sua classificação. Um cariótipo simétrico consiste de cromossomos que apresentam um tamanho relativamente parecido e os centrômeros se encontram na posição mediana ou submediana, também conhecido como metacêntrico. 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, também conhecidos como submetacêntrico, acrocêntrico ou telocêntrico (STEBBINS JR, 1950). A classificação realizada por Stebbins (1971) é a mais frequentemente utilizada para avaliar a simetria cariotípica, porém existem várias outras medidas que tem sido sugerida como mais úteis em alguns grupos de plantas (PASZKO, 2006; PERUZZI et al., 2009).

Stebbins (1971) propôs que os cariótipos simétricos são ancestrais enquanto os assimétricos são derivados. Desta forma as diferenças em assimetria seriam utilizadas para inferir o sentido da evolução. Porém, Jones (1998) analisando vários grupos de plantas sugeriu que a interpretação oposta também é possível, e que cariótipos assimétricos podem chegar a ser a condição primitiva dando origem a cariótipos mais simétricos por fusão de acrocêntricos.

A maioria dos cariótipos exibe cromossomos de tamanhos iguais, mas há cariótipos de espécies que apresentam tamanhos diferentes e são chamados de bimodais, estes cromossomos se dividem em duas classes de tamanho distinto frequentemente descrito como S para pequeno e L para grande ($n = S + L$) (MCKAIN et al., 2012). Os cariótipos bimodais geralmente envolvem pares de cromossomos metacêntricos e submetacêntrico (GOLDBLATT, 1982). Cariótipos assimétricos do tipo bimodal são ditos como sendo de evolução recente, resultado de fusões cêntricas entre cromossomos do provável genoma ancestral (GOLDBLATT & TAKEI, 1997).

A bimodalidade ocorre em muitas plantas sendo considerada uma forma cariotípica altamente especializada e derivada, podendo ser utilizada para caracterizar grupos de gêneros ou espécies (NARANJO et al., 1998; KENTON et al., 1990; MORENO et al., 2009). Medeiros-Neto et al., (2017) analisaram metáfases de 64 espécies de Orchidaceae distribuídas em quatro subfamílias (Cypripedioideae, Epidendroideae, Orchidoideae e Vanilloideae), realizando cinco testes de índices de assimetria cromossômica, observaram assim que o cariótipo mais assimétrico encontrado foi em *Christensonella pachyphylla* (Schltr. Ex Hoehnl.), com (20S + 18A). Vale ressaltar que o ponto crítico para a eficácia de um índice assimétrico é a morfologia

cromossômica bem preservada e a definição precisa da posição do centrômero e não o tamanho dos cromossomos.

A grande diversidade morfológica no subgênero *Thamnoxys* é acompanhada por uma variação incomum do cariótipo, tanto em números cromossomos, em tamanho e morfologia, incluindo alguns cariótipos bimodais (MARKS, 1956; DE AZKUE & MARTÍNEZ, 1983, 1984, 1988, 1990). Em *Oxalis*, foi observado cariótipo bimodal com um par de cromossomos duas vezes maior que o restante dos pares em estudo realizado por Vaio et al., (2018) na espécie *Oxalis alstonii*.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. C. D.; CARVALHO, R. D.; SALES, M. F. D. *Oxalis* L. (Oxalidaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 22, p. 399-416, 2008.
- ABREU, M. C.; FIASCHI, P. Lista de espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do>. 2012.
- ALMEIDA, C. C. S.; CARVALHO, P. C. L. & GUERRA, M. Karyotype differentiation among *Spondias* species and the putative hybrid Umu-cajá (Anacardiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 155, p. 541-547, 2007.
- APG IV. The Angiosperm Phylogeny Group. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, p.1-20, 2016.
- BARRET, S. C. H.; RICHARDS, J. H. Heterostyly in tropical plants. **Memoirs of the New York Botanical Garden** v. 55, p. 35-61, 1990.
- BARRET, S. C. H. Heterostylous genetic polymorphism: model systems for evolutionary analysis. In: **Evolution and Function of Heterostyly**. S.C.H. BARRETT (Ed.). SpringerVerlag, Berlin. p. 1-29, 1992.
- BARRET, S. C. H.; WILKEN, D. H. & COLE, W. W. Heterostyly in the Lamiaceae: the case of *Salvia brandegeei*. **Plant Systematics and Evolution** v. 223, n. 3-4, p. 211-219, 2000.
- BARROS & SILVA, A. E.; GUERRA, M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 85, n. 2, p. 115–125, 2010.
- BARROS E SILVA, A. E.; MARQUES, A.; SANTOS, K. G. B.; GUERRA, M. The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. **Chromosome Research**, v. 18, p. 503– 514, 2010.
- BENNETZEN, J. L. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. **Plant Molecular Biology**, v.42, n.1, p. 251–269, 2000.

- BIRCHLER, J. A.; BHADRA, M. P.; BHADRA, U. Making noise about silence: repression of repeated genes in animals. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 10, n. 2, p. 211–216, 2000.
- CARPUTO, D.; FRUSCIANTE, L.; PELOQUIN S. J. The Role of $2n$ Gametes and Endosperm Balance Number in the Origin and Evolution of Polyploids in the Tuber-Bearing Solanums. **Genetics**, v. 163, n.1, p. 287-294, 2003.
- CORDEIRO, J. M. P.; KAEHLER, M.; SOUZA, G.; FELIX, L. F. Karyotype analysis in Bignoniaceae (Bignoniaceae): chromosome numbers and heterochromatin. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, p. 2697-2706, 2017.
- CUI, L.; WALL, K.; LEEBENS-MACK, J. H.; LINDSAY, B. G.; SOLTIS DE, DOYLE J. J.; SOLTIS, P. S.; CARLSON, J. E.; ARUMUGANATHAN, K.; BARAKAT, A.; ALBERT, V. A; MA, H.; DEPAMPHILIS, C. W. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. **Genome Research**, v. 16, n. 6, p. 738-749, 2006.
- DE AZKUE, D.; MARTÍNEZ, A. The chromosome complements of shrubby *Oxalis* species from South America. **Plant Systematics and Evolution**, v. 141, p. 187–197, 1983.
- DE AZKUE, D.; MARTÍNEZ, A. Variación del cariotipo, volumen nuclear y contenido de ADN en siete especies de *Oxalis*. **Darwiniana**, v. 25, p. 267–277, 1984.
- DE AZKUE, D.; MARTÍNEZ, A. DNA content and chromosome evolution in the shrubby *Oxalis*. **Genome**, v. 30, p. 52–57, 1988.
- DE AZKUE, D.; MARTÍNEZ, A. Chromosome numbers of the *Oxalis tuberosa* alliance (Oxalidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v.169, p. 25–29, 1990.
- DE AZKUE, D. Chromosome diversity of South American *Oxalis* (Oxalidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 132, p. 143–152, 2000.
- DJUPEDAL, I.; EKWAL, K. The paradox of silent heterochromatin. **Science**. v. 5876, p. 624-625, 2008.
- DODSWORTH, S.; CHASE, M. W.; LEITCH, A. R. Is post-polyploidization diploidization the key to the evolutionary success of angiosperms? **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 180, p. 1-5, 2016.
- EISSENBERG, J. C.; ELGIN, S. C. R. Heterochromatin and Euchromatin. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2005, 7p.
- EITEN, G. Taxonomy and regional variation of *Oxalis* section Corniculatae. I. Introduction, Keys, and Synopsis of the Species. **The American Midland Naturalist**, v. 69, p. 257-309, 1963.
- EMSHWILLER, E. Biogeography of the *Oxalis tuberosa* Alliance. **The Botanical Review**, v. 68, n. 1, p. 128.152, 2002.
- EMSHWILLER, E.; DOYLE, J. J. Origins of domestication and polyploidy in Oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae). 2. Chloroplast expressed glutamine synthetase data. **American Journal of Botany**, v. 89, p. 1042-1056, 2002.
- EMSHWILLER, E.; DOYLE, J.J. Origins of domestication and polyploidy in Oca (*Oxalis tuberosa*: Oxalidaceae): NRDNA ITS data. **American Journal of Botany**, v. 85, n. 7, p. 975–985, 1998.

FAWCETT, J. A.; MAERE, S.; VAN DE PEER, Y. Plants with doublé genomes might have had a better chance to survive the Cretaceous-Tertiary extinction event. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 106, n 14, p. 5737-5742, 2009.

FIASCHI, P.; CONCEIÇÃO, A. A. Oxalidaceae. In: MGL Wanderley, GL Shepherd, TS Melhem & AM Giullietti (orgs.), **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, FAPESP e RiMa, São Paulo. v. 4, p. 301-315. 2005.

FIASCHI, P. Oxalidaceae. In: TB Cavalcanti (org.), **Flora do Distrito Federal, Brasil**, Embrapa, Brasília. v. 5, p. 93-105. 2006.

FIASCHI, P. Check-list da Família Oxalidaceae no estado do Mato Grosso do Sul. **Iheringia. Série Botânica**. v. 73, p. 297-300, 2018.

FRANSZ, P. F.; ARMSTRONG, S.; DE JONG, J. H.; PARNELL, L. D.; VAN DRUNEN, C.; DEAN, C.; ZABEL, P.; BISSELING, T.; JONES, G. H. Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromere region. **Cell**, v. 100, p. 367-376, 2000.

GANDERS, F. R. The biology of heterostyly. **New Zealand Journal of Botany**, v.17, n. 4, p. 607-635, 1979.

GARDNER, A.; VAIO, M.; GUERRA, M.; EMSHWILLER, E. Diversification of the American bulb-bearing *Oxalis* (Oxalidaceae): Dispersal to North America and modification of the tristylous breeding system. **American Journal of Botany**, v.99, n.1, p. 152-164, 2012.

GOLDBLATT, P. Chromosome cytology in relation to suprageneric systematics of Neotropical Iridaceae. **Systematic Botany**, v. 7, p. 186-198, 1982.

GOLDBLATT, P.; TAKEI, M. Chromosome cytology of Iridaceae – patterns of variation, determination of ancestral base numbers, and modes of karyotype change. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 84, p. 285–304, 1997.

GRANT, V. Plant speciation. New York, **Columbia University Press**, 1981.

GREILHUBER, J. Chromosomal evidence in taxonomy. In: HEYWOOD, V. H.; MOORE, D M., eds. **Current Concepts in Plant Taxonomy**. Academic Press, London, 1984. p. 157-180. 1984.

GREWAL, S. I.; MOAZED, D. Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. **Science**, v. 301, p. 798-802, 2003.

GREWAL, S. I.; JIA, S. Heterochromatin revisited. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 1, p. 35-46, 2007.

GUERRA, M. **Introdução à Citogenética Geral**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1988. 142p.

GUERRA, M. A situação da citotaxonomia de angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, n. 2, p. 75 – 86, 1990.

GUERRA, M. Chromosome number variation and evolution in monocots. **Monocots: Systematics and Evolution**, Eds. K.L.Wilson and D.A. Morrison. (CSIRO: Melbourne), p.127-136, 2000a.

GUERRA, M. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 1029-1041, 2000.

GUERRA, M. Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 120, p. 339-350, 2008.

GUERRA, M. Cytotaxonomy: The end of childhood. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**. v.146, n. 3, p. 703-710. 2012.

HALL, I. M.; SHANKARANARAYANA, G.D.; NOMA, K.; AYOUB, N.; COHEN, A.; GREWAL, S. I. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. **Science**, v. 297, p. 2232-2237, 2002.

HU, T. T.; PATTYN, P.; BAKKER, E. G.; CAO, J.; CHENG, J.F.; CLARK, R. et al., The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change. **Nature Genetics**. v. 43, p. 476-481, 2011.

JOHNSON, M. T. J.; HUSBAND, B. C.; BURTON, T. L. Habitat differentiation between diploid and tetraploid *Galax urceolata* (Diapensiaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, p. 703-710, 2003.

JONES, K. Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution in higher plants. **Botanical Review**, v. 64, p. 273-289, 1998.

KENTON, A.; DICKIE, J. B.; LANGTON, D. H.; BENNETT, M. D. Amount of karyotype nuclear DNA karyotype in *Cypella* and *Hesperoxiphion* (Tigridieae: Iridaceae). **Evolutionary Trends in Plants**, v. 4, p. 59-69, 1990.

KNUTH, R. Oxalidaceae. In ENGLER, A., (Ed): Das Pflanzenreich Berlin- Leipzig: W. Engelmann, v. 4, p. 130 - 131, 1930.

LEVIN, D. A. **The role of chromosomal change in plant evolution**. Oxford: Oxford University Press, 2002. 230p.

LI, P.; JOHNSTON, M. O. Comparative floral morphometrics of distyly and homostyly in three evolutionary lineages of *Amsinckia* (Boraginaceae). **Canadian Journal of Botany**, v. 79, p. 1332-1348, 2001.

LOURTEIG, A. Oxalidaceae section extra-austroamericanae 2. *Oxalis* section *Corniculatae*. **Phytologia**, v. 42, p. 57-198, 1979.

LOURTEIG, A. Oxalidaceae extra-austroamericanae IV: *Oxalis* L. sectio *Articulatae* Knuth. **Phytologia**, v. 30, v. 130-142, 1982.

LOURTEIG, A. *Oxalis* L. subgénero *Thamnoxys* (Endl.) Reiche emend. Lourteig. *Bradea*. **Herbarium Bradeanum**, v. 7, p. 1-199, 1994.

LOURTEIG, A. *Oxalis* L. Subgénero *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Oxalis* y *Trifidus* Lourteig. **Bradea**, v.7, p. 201-629, 2000.

LOVETT DOUST, L.; LOVETT DOUST, J.; CAVERS, P. B. Fertility relationships in closely related taxa of *Oxalis*, section *Corniculatae*. **Canadian Journal of Botany**, v. 59, p. 2603-2609, 1981.

MARKS, G. E. Chromosome numbers in the genus *Oxalis*. **New Phytologist**, v. 55, n. 1, p. 120-129, 1956.

- MCKAIN, M. R.; WICKETT, N.; ZHANG, Y.; AYYAMPALAYAM, S.; MCCOMBIE, W. R. et al.; CHASE, M. W.; ... & LEEBENS-MACK, J. Phylogenomic analysis of transcriptome data elucidates co-occurrence of a paleopolyploid event and the origin of bimodal karyotypes in Agavoideae (Asparagaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 2, p. 397-406. 2012.
- MEDEIROS-NETO, E., NOLLET, F., MORAES, A. P., FELIX, L. P. Intrachromosomal karyotype asymmetry in Orchidaceae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 40, p. 610-619. 2017.
- MORENO, N.; PEÑAS, M. L.; BERNARDELLO, G.; ROITMAN, G. Cytogenetic studies in *Herbertia* Sw. (Iridaceae). **Caryologia**, v. 62, n. 1, p. 37-42, 2009.
- NARANJO, C. A.; MOLA, L. M.; POGGIO, L.; MÚLGURA, M. Estudios citotaxonómicos y evolutivos de *Oxalis* (Oxalidaceae) I. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 20, p. 183-200, 1982.
- NARANJO, C. A.; FERRARI, M. R.; PALERMO, A. M.; POGGIO, L. Karyotype, DNA content and meiotic behavior in five South American *Vicia* (Fabaceae) species. **Annals of Botany**, v. 82, n. 6, p. 757-764, 1998.
- OBERLANDER, K. C.; DREYER, L. L.; BELLSTEDT, D. U.; REEVES, G. Systematic relationships in southern African *Oxalis* L. (Oxalidaceae): Congruence between palynological and plastid trnL - F evidence. **Taxon**, v. 53, n. 4, p. 977-985, 2004.
- OBERLANDER, K. C.; EMSHWILLER, E.; BELLSTEDT, D. U.; DREYER, L. L. A model of bulb evolution in the eudicot genus *Oxalis* (Oxalidaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, n. 1, p. 54-63, 2009.
- OTTO, S. P.; WHITTON, J. Polyploid incidence and evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 34, p. 401-437, 2000.
- PARTRIDGE, J. F.; SCOTT, K. S. C.; BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T.; ALLSHIRE, R. C. Cisacting DNA from fission yeast centromeres mediates histone H3 methylation and recruitment of silencing factors and cohesin to an ectopic site. **Current biology**, v. 12, p. 1652-1660, 2002.
- PASZKO, B. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. **Plant Systematics and Evolution**, v. 258, p. 39-48, 2006.
- PEDROSA, A.; JANTSCH, M. F.; MOSCONE, E. A.; AMBROS, P. F.; SCHWEIZER, D. Characterisation of pericentromeric and sticky intercalary heterochromatin in *Ornithogalum longibracteatum* (Hyacinthaceae). **Chromosoma**, v. 110, p. 203-213, 2001.
- PERUZZI, L.; LEITCH, I. J.; CAPARELLI, K. F. Chromosome diversity and evolution in Liliaceae. **Annals of Botany**, v. 103, n.3, p. 459-475, 2009.
- RAPINI, A. Revisitando as Asclepiadoideae (Apocynaceae) da Cadeia do Espinhaço. **Boletim de Botanica**, v. 28, n. 2, p. 97-123, 2010.
- RAVEN, P. The bases of Angiosperm phylogeny: Cytology. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 62, p. 724-764, 1975.
- SALTER, T. M. The genus *Oxalis* in South Africa: A taxonomic revision. **Journal of South African Botany**, suppl. v. 1, p. 1-355. 1944.

SANTOS, A. M. S. **Evolução cromossômica em plantas de inselbergues com ênfase na família Apocynaceae Juss.** 137f. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba. 2017.

SARTHOU, C., LARPIN, D., FONTY, E., PAVOINE, S., & PONGE, J. F. Stability of plant communities along a tropical inselberg ecotone in French Guiana (South America). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 205, p. 682-694, 2010.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Poliploidia e seu impacto na origem e evolução das plantas silvestres e cultivadas. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 10, p. 151-157, 2004.

SILVEIRA, R. M.; MACHADO, R. M.; FORNI-MARTINS, E. R.; VEROLA, C. F.; COSTA, I. R. Environmental variations drive polyploid evolution in neotropical *Eugenia* species (Myrtaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1-19, 2016.

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 97, p. 7051-7057, 2000.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; SCHEMSKE, D.W.; HANCOCK, J.F.; THOMPSON, J.N.; HUSBAND, B. C.; JUDD, W. S. Autopoliploidy in angiosperms: Have we grossly underestimated the number of species? **Taxon**, v. 56, n. 1, p. 13-30, 2007.

STEBBINS JR, C. L. 1950. **Variation and evolution in plants**. Columbia Univ. Press, New York. 643p.

STEBBINS, G. L. 1971. **Chromosomal evolution in higher plants**. London: Edward Arnold. 216p.

SUMNER, A. T. 2003. **Chromosomes: organization and function**. Blackwell Publishing Ltd, United Kingdom. 287p.

THE PLANT LIST. **A working list of all plant species**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=oxalis>> acesso em 10 de Jan. 2019.

VAIO, M., GARDNER, A., SPERANZA, P., EMSHWILLER, E., GUERRA, M. Phylogenetic and cytogenetic relationships among species of *Oxalis* section *Articulatae* (Oxalidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 302, p. 1253-1265, 2016.

VAIO, M.; NASCIMENTO, J.; MENDES, S.; IBIAPINO, A.; FELIX, L. P.; GARDNER, A. Et al., Multiple karyotype changes distinguish two closely related species of *Oxalis* (*O. psoraleoides* and *O. rhombo-ovata*) and suggest an artificial grouping of section *Polymorphae* (Oxalidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 188, n.3, p. 269-280, 2018.

WEILER, K. S.; WAKIMOTO, B. T. Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. **Annual Review of Genetics**, v. 29, p. 577-605, 1995.

CAPÍTULO I

A ser submetido ao periódico *Acta Botanica Brasilica*

Evolução cromossômica de *Oxalis* L. subgênero *Thamnoxys* (Endl.) Reiche (Oxalidaceae R.Br.)

Resumo

O subgênero *Thamnoxys* apresenta ampla diversidade morfológica e cariotípica, com a maioria das espécies com $n = 5, 6, 7, 8, 9$ e 11 . O objetivo deste trabalho foi caracterizar o cariótipo de 13 espécies desse subgênero, através da coloração CMA/DAPI, buscando entender a evolução cromossômica do grupo. O número predominante foi $2n = 10$ em todas as seções analisadas, exceto para *O. puberula* com $2n = 20$ (sect. *Polymorphae*) e nas duas espécies da secção *Thamnoxys* com $2n = 12$ para *O. hedysarifolia* e $2n = 24$ para *O. frutescens*. A fórmula cariotípica das espécies da secção *Polymorphae* foi $2M + 4SM + 4A$, exceto para o tetraploide *O. puberula* com $4M + 8SM + 8A$. As demais secções, apresentaram $4M + 6SM + 2A$ para *O. hedysarifolia* (sect. *Thamnoxys*), $2SM + 8A$ para *O. mandioccana* (sect. *Holophyllum*) e $2M + 8A$ para *O. hedysaroides* (sect. *Hedysarioideae*) e *O. fruticosa* (sect. *Phyllodoxys*). A coloração com os fluorocromos revelou apenas bandas CMA^+ , variando de duas a oito bandas no terminal do braço curto de um a quatro pares de cromossomos acrocêntricos, exceto para uma das duas populações de *O. colatinesis* e *O. newiedii* e para *O. hedysarifolia* (Secção *Thamnoxys*) e *O. fruticosa* (*Phyllodoxys*). Em geral as espécies estudadas do subgênero *Thamnoxys* foram citótipos com $2n = 10$, fórmula cariotípica estável especialmente na secção *Polymorphae* e um único padrão de bandas $CMA^+/DAPI^-$ terminais. Quatro espécies apresentaram pelo menos um citótipo sem bandas heterocromáticas.

Palavras-chave: Citogenética, CMA/DAPI, Fluorocromos, Perda de Heterocromatina, Poliploidia.

Abstract

The subgenus *Thamnoxys* presents morphological diversity and wide karyotype variation, with the majority of diploid species with $n = 5, 6, 7, 8, 9$ and 11 . The objective of this study was to characterize the karyotype of species of the subgenus *Thamnoxys*, using CMA/DAPI fluorochromes and understand the chromosomal evolution of the group. Fourteen species and a subspecies of *Oxalis* were analyzed cytogenetically, where the root tips were pre-treated with 8HQ and then fixed in Carnoy. The slides were prepared using the acetic acid crushing method (60%), aged at room temperature and the best slides were stained with CMA/DAPI. The predominant number was $2n = 10$ in all analyzed sections, except in *O. puberula* with $2n = 20$ (sect. *Polymorphae*) and in the two species of the *Thamnoxys* section with $2n = 12$ for *O. hedysarifolia* and $2n = 24$ for *O. frutescens*. The karyotype formula of the species in the *Polymorphae* section was $2M + 4SM + 4A$, except in *O. puberula* with $4M + 8SM + 8A$ which is a polyploid species. The remaining sections presented $4M + 6SM + 2A$ for *O. hedysarifolia* (sect. *Thamnoxys*), $2SM + 8A$ for *O. mandioccana* (sect. *Holophyllum*) and $2M + 8A$ for *O. hedysaroides* (sect. *Hedysarioideae*) and *O. fruticosa* (sect. *Phyllodoxys*). In general, the studied species of the subgenus *Thamnoxys* presented mainly diploid cytotypes with $2n = 10$, a stable karyotype formula especially in the *Polymorphae* section and a single $CMA^+/DAPI^-$ terminal band pattern. Four species showed at least one cytotype without the formation of heterochromatic bands.

Keywords: Cytogenetics, CMA/DAPI, Fluorochromes, Heterochromatin loss, Polyploidy.

Introdução

Oxalis é o maior gênero da família Oxalidaceae, incluindo cerca de 500 espécies distribuídas pelas regiões temperadas e tropicais (Lourteig, 2000). Os dois maiores centros de diversidade são encontrados na América do Sul e na África do Sul com cerca de 280 e 210 espécies, respectivamente (Salter, 1944; De Azkue, 2000; Lourteig, 2000). No continente americano ocorrem quatro subgêneros: *Trifidus* Lourteig (duas espécies da América do Norte), *Monoxalis* (Small) Lourteig (duas espécies da América do Sul), *Oxalis* L. (205 espécies nas Américas do Norte e Central) e *Thamnoxys* (Endl.) Reiche (71 espécies, América do Sul e Central) (Lourteig, 2000). Contudo, mais recentemente, alguns aspectos da taxonomia e evolução do gênero *Oxalis* da América do Sul têm sido esclarecidos (Fiaschi, 2006; Abreu & Fiaschi, 2012; Fiaschi, 2012, 2014; Vaio et al., 2013, 2016, 2018).

O subgênero *Thamnoxys* compreende 94 espécies, das quais, 54 são referidas para o Brasil (Abreu & Fiaschi, 2012). É subdividido em nove seções (Lourteig, 2000): *Foliosae* Progel, *Hedysaroideae* DC., *Holophyllum* Progel., *Phyllodoxys* Endl., *Pleiocarpae* Knuth, *Polymorphae* (Progel) Lourteig, *Psoraleoideae* Lourorig, *Robustae* (Progel) Lourteig, e *Thamnoxys* Progel. As seções são caracterizadas com base no hábito, distribuição geográfica e características morfológicas, especialmente dimensão das folhas, forma da cápsula e disposição das flores na inflorescência (Lourteig, 1994; Lourteig, 2000; Abreu, 2011). Contudo, as relações filogenéticas entre espécies de *Oxalis* subgênero *Thamnoxys* ao sul da Região Centro-Oeste do Brasil, ainda não foram na sua totalidade elucidadas (Fiaschi, 2018).

Os subgêneros *Oxalis* e *Thamnoxys* são os que apresentam o maior número de espécies cromossomicamente analisadas. Embora os dois subgêneros exibam uma ampla diversidade cariológica, *Thamnoxys* destaca-se pela presença de maior variação na morfologia cromossômica, assimetria cariotípica e conteúdo de DNA nuclear (De Azkue & Martínez, 1988; De Azkue, 2000; Vaio et al., 2018). A ampla diversidade morfológica conhecida para o subgênero *Thamnoxys* é acompanhada por uma variação cariotípica incomum, embora a maioria das espécies seja diploide, com $n = 5, 6, 7, 8, 9$ e 11 (Naranjo et al., 1982; De Azkue & Martínez, 1983, 1984, 1988, 1990, De Azkue, 2000; Vaio et al., 2018). Dentre estes números haploides, $x = 6$ e $x = 7$ foram propostos como os números básicos ancestrais para o subgênero e para o próprio gênero *Oxalis* (Marks, 1956; De Azkue, 2000). Todavia, a hipótese de $x = 7$ não obteve suporte em análises moleculares posteriores, além de $n = 7$ não ser um número frequente para o gênero (De Azkue, 2000; Vaio et al., 2013).

A poliploidia desempenhou um papel importante na evolução cromossômica do gênero. Em algumas seções do subgênero *Thamnoxys* há registro na variação do número cromossômico desde $2n = 10$ em *Oxalis alstonii* Lourteig, a $2n = 72$ em *Oxalis sellowii* var. *latifolia* (Chodat & Hassl.) R. Knuth) (De Azkue & Martinez, 1988; Vaio et al., 2018). Além disso, o subgênero também apresenta uma ampla variação no tamanho e morfologia cromossômica, incluindo a ocorrência de cariótipos bimodais (De Azkue & Martínez, 1983, 1988; De Azkue, 2000; Vaio et al., 2018).

Análises cariotípicas utilizando técnicas de bandeamento cromossômicos têm sido de grande importância para a investigação das relações evolutivas e taxonômicas em muitos grupos de plantas (Barros & Silva et al., 2010; Souza et al., 2012; Oliveira et al., 2015, Vaio et al., 2018). A dupla coloração com fluorocromos fornece informações adicionais sobre a organização e composição da heterocromatina, que não pode ser observada por meio das técnicas de coloração convencional (Guerra, 2000b). Para espécies do subgênero *Thamnoxys* são raras as abordagens utilizando técnicas de coloração diferencial. Até o momento, é conhecido apenas o trabalho de Vaio et al., (2018) que estudou sete espécies do subgênero distribuídas pelas seções *Psoraleoideae* e *Polymorphae* através de coloração CMA/DAPI, hibridização *in situ* e quantificação de DNA nuclear. Duas espécies relacionadas apresentaram características cromossômicas distintas, enquanto as demais espécies da seção *Polymorphae* apresentaram o mesmo número cromossômico, mesma fórmula cariotípica e similares padrões de bandas heterocromáticas. Assim como em *Oxalis*, marcas citotaxonômicas utilizando a coloração CMA/DAPI têm contribuído para diferenciar taxonomicamente espécies ou grupos de espécies de outras famílias, como em Orchidaceae (Oliveira et al., 2015; Cordeiro et al., 2018), Linderniaceae (Almeida et al., 2016) e Leguminosae (Van-Lume et al., 2017).

Neste trabalho foram analisadas através da coloração CMA/DAPI, o cariótipo de 13 espécies e uma subespécie de *Oxalis* das seções *Polymorphae* (sete espécies e um subespécie), *Thamnoxys* e *Holophyllum* (duas espécies cada), *Hedysarioideae* e *Phyllodoxys* (uma espécie cada), objetivando entender a evolução cromossômica do subgênero *Thamnoxys*.

Material e Métodos

Coleta e documentação botânica

A análise citogenética em representantes da família Oxalidaceae envolveu 13 espécies e uma subespécie do gênero *Oxalis* subgênero *Thamnoxyis*. A lista de espécies, vouchers e procedência são listadas na Tabela 1. Exsicatas com material testemunha das espécies encontram-se depositadas no herbário Professor Jayme Coelho de Moraes (EAN).

Análise citogenética

A análise de metáfases mitóticas foi feita a partir de pontas de raízes de plantas cultivadas em vasos no jardim experimental do Laboratório de Botânica e Citogenética Vegetal da UFPB - Universidade Federal da Paraíba, Campus II. As pontas de raízes foram pré-tratadas com 8 hidroxiquinoleína (8-HQ) 0,002 M por 24 horas, fixadas em etanol absoluto/ácido acético glacial (v/v) 3:1 por 2 horas a temperatura ambiente e estocada em freezer a – 20°C. Para o preparo das lâminas as raízes foram digeridas em solução contendo 2% de celulase (Onozuka) e 20% de pectinase (Sigma) (w/v) a 37°C por 120 minutos. O material foi esmagado em ácido acético 60% e congelado em nitrogênio líquido para remoção da lamínula. As lâminas foram coradas com DAPI glicerol (2µg/mL) (1:1, v/v) para seleção das melhores lâminas. Subsequentemente, as lâminas foram descoradas em Carnoy por 30 minutos e mantidas em etanol absoluto à temperatura ambiente por duas horas (Guerra & Souza, 2002).

Coloração com CMA e DAPI

As lâminas foram envelhecidas por três dias e então coradas por uma hora com 10µL de CMA (0,1 mg/mL) e depois com 10µL de DAPI (1µg/mL) com glicerol/tampão McIlvaine (pH 7,0) (1:1, v/v), montadas e estocadas por três dias no escuro para estabilização dos fluorocromos (Barros e Silva et al., 2010). As melhores metáfases foram capturadas em fotomicroscópio Zeiss com câmera de vídeo Axio Cam MRC5 usando o software Axiovision 4.8. As imagens foram processadas em brilho e contraste por meio do software Adobe Photoshop CS6 Extended Version 10.0. Os tipos de bandas heterocromáticas foram determinados com base na seguinte propriedade de coloração nos cromossomos: bandas CMA⁺/DAPI⁻ (forte coloração brilhante com CMA/ausência de coloração com DAPI).

Resultados

Número e morfologia cromossômica

O número cromossômico predominante entre as espécies analisadas foi $2n = 10$ observado em todas as espécies, exceto em *O. puberula* da seção *Polymorphae* que teve $2n = 20$ e em duas espécies da seção *Thamnoxys*, com $2n = 12$ para *O. hedysarifolia* e $2n = 24$ para *O. frutescens* (Tabela 1, figura 1). A morfologia cromossômica foi igualmente estável, especialmente para a seção *Polymorphae*, a mais extensamente amostrada, que apresentou todas as espécies com a fórmula cariotípica $2M + 4SM + 4A$, exceto *O. puberula* com $2n = 20$, que entretanto, apresentou fórmula cariotípica correspondente ao nível tetraploide: $4M + 8SM + 8A$. As demais seções tiveram as seguintes fórmulas cariotípicas: $4M + 6SM + 2A$ para *O. hedysarifolia* de Brejo da Madre de Deus (Sect. *Thamnoxys*), $2SM + 8A$ para *O. mandioccana* (Sect. *Holophyllum*) e $2M + 8A$ para *O. hedysaroides* (Sect. *Hedysarioideae*) e $2M + 8A$ para *O. fruticosa* (Sect. *Phyllodoxys*).

Bandeamento cromossômico

A dupla coloração com os fluorocromos CMA e DAPI revelou apenas bandas CMA⁺ para todas as espécies analisadas, nos braços curtos de pelo menos um par de cromossomos acrocêntricos. Contudo, uma das populações de Marilândia (PF4625) de *O. colatinensis* (Fig. 1D), a população de Linhares (TS102) de *O. neuwiedii* Zucc. subsp. *neuwiedii* (Fig. 1G), para *O. frutescens* (Fig. 1K) da seção *Thamnoxys* e para *O. fruticosa* (Fig. 1P) da seção *Phyllodoxys*, não foram observadas bandas CMA. Entre as espécies que apresentaram heterocromatina detectável pela técnica da coloração CMA/DAPI, o número foi variável entre e dentro de uma mesma seção. Para a seção *Polymorphae*, duas bandas terminais foram observadas em *O. colatinensis* (Fig. 1C), enquanto três bandas ocorreram em *O. kollmannii* (Fig. 1E). Quatro bandas CMA⁺, foram observadas em *O. neuwiedii* (Fig. 1F) e na população de Porto Seguro de *O. neuwiedii* subsp. *neuwiedii* (Fig. 1G), em *O. polymorpha* (Fig. 1I), em *O. alstonii* (Fig. 1A) e em *O. blackii* (Fig. 1B). Ainda na seção *Polymorphae*, oito bandas CMA terminais ocorreram na população tetraploide de *O. puberula*. Quatro bandas CMA terminais também foram observadas em *O. alata* (Fig. N) e *O. mandioccana* Fig. 1O) da seção *Holophyllum*.

Discussão

Número e morfologia cromossômica

Os números cromossômicos neste estudo, confirmaram contagens prévias de $2n = 10$ para *O. alstonii*, *O. blackii*, *O. colatinensi*, *O. neuwiedii* e para *O. fruticosa*, assim como de $2n = 12$ para *O. hedysarifolia*. Todavia, a contagem de $2n = 20$ para uma população de Pacotí, Ceará, de *O. puberula*, divergiu do registro prévio de $2n = 10$ para uma população de Feira de Santana, Bahia (Vaio et al., 2018). Especiação por poliploidia tem sido referida como uma das mais importantes vias de especiação em plantas, especialmente porque plantas poliploides exibem geralmente forte diferenciação ecológica, elevada fecundidade, autofecundação e/ou reprodução assexuada (Rieseberg & Willis, 2007). A população analisada de Pacotí, coletada em floresta úmida relictual conhecida como Brejo de Altitude, possui condições ambientais claramente distintas da população de Feira de Santana, coletada em vegetação semiúmida da Bahia. Essa divergência ecológica e geográfica em relação a populações diploide separada por uma ampla área de vegetação semiárida isola geograficamente esse citótipo. Provavelmente a plasticidade genômica observada em poliploides contribuiu para o estabelecimento desse citótipo em um ambiente ecologicamente diferenciado (veja Dubcovsky & Dvorak, 2007).

Embora a poliploidia seja de importância fundamental para a diversificação de *Oxalis*, especialmente do subgênero *Oxalis*, para o subgênero *Thamnoxys* essa contribuição parece ser mais discreta. Há registro de poliploidia para aproximadamente 10% das espécies do subgênero com dados numéricos conhecidos (De Azkue, 2000; Vaio et al., 2018). Em nossa amostra, pela primeira vez foi registrada a ocorrência de poliploidia em uma espécie pertencente à seção *Polymorphae*, notável pela variabilidade em número, tamanho e simetria cariotípica. Todavia, com relação as espécies analisadas aqui, a seção foi relativamente estável em termos de morfologia cromossômica com a maioria das espécies apresentando fórmula cariotípica $2M + 4SM + 4A$. Essa fórmula, divergiu ligeiramente da maior parte das espécies analisadas por De Azkue (2000) e Vaio et al., (2018). Discrepâncias como estas, observadas algumas vezes em uma mesma espécie, podem ser decorrentes de problemas técnicos relacionados ao espalhamento e condensação cromossômica. Todavia, espécies próximas de *Oxalis* da seção *Polymorphae* podem apresentar número e morfologia cromossômica claramente distintas decorrentes de múltiplas alterações estruturais (Vaio et al., 2018). Estas alterações estruturais podem estar relacionadas a dispoloidia e alterações na morfologia cromossômica observado nessa e em outras seções do subgênero *Thamnoxys*. Analisando a filogenia de espécies das

seções *Corniculatae* e *Ripariae* do subgênero *Oxalis*, Vaio et al., (2016) concluíram que apesar de polifiléticas, as espécies que compõem essas seções formaram dois grupos com dois modos especiação distintos: Um ramo originou espécies com rearranjos cromossômicos e maior conteúdo de DNA nuclear, enquanto o outro ramo evoluiu por poliploidia e aumento na quantidade de DNA. Para o subgênero *Thamnoxys*, embora a poliploidia não tenha tanto destaque na evolução desse subgênero, em várias linhagens ocorreram rearranjos estruturais com pequenas alterações nos números cromossômicos e amplificação do conteúdo de DNA nuclear via proliferação de elementos transponíveis (Vaio, comunicação pessoal).

Heterocromatina

Ao contrário da elevada diversidade em números cromossômicos entre espécies e seções do subgênero *Thamnoxys*, o padrão de bandas fluorescentes foi menos variável para o subgênero, que revelou apenas bandas $\text{CMA}^+\text{DAPI}^-$ nos braços de alguns cromossomos na maioria das espécies. Esse padrão de distribuição da heterocromatina foi comum a outras espécies e populações da seção *Polymorphae* (Vaio et al., 2018). Contudo, essas plantas em geral, apresentaram maior número de bandas do que aquelas observadas nos materiais analisados aqui. Essas discrepâncias podem estar relacionadas a pequena quantidade de heterocromatina observada em algumas espécies da seção *Polymorphae* tornando as vezes difícil sua visualização. Por outro lado, em contraste com a estabilidade na distribuição da fração heterocromática, no subgênero *Thamnoxys* ocorre uma notável variação na quantidade da heterocromatina. Evidência nesse sentido é a ocorrência de bandas CMA em uma, mas não em outra população de *O. colatinensis* e *O. newviedii* subsp. *newviedii*.

Bandas CMA^+ revelam regiões do genoma ricas em pares de base GC, sendo importantes na caracterização de espécies e populações (Guerra, 2000b; Almeida et al., 2016). A não visualização da heterocromatina rica em GC pode estar relacionada a uma redução da fração heterocromática ou a uma alteração na estrutura molecular da cromatina ao ponto de não ser detectável pela técnica de coloração utilizada no presente trabalho. Espécies com elevada densidade de heterocromatina tendem a formar bandas similares a bandas C, mesmo utilizando-se fluorocromos sem especificidade de bases como o Iodeto de Propídio (IP), conforme relatado para *Muraya paniculata* (Barros e Silva & Guerra, 2010). Espécies com menores quantidades de heterocromatina necessitam de um tratamento que retire boa parte da eucromatina, a técnica de bandeamento C, para se obter uma visualização mais clara da fração heterocromática, conforme observado por Feitoza et al. (2010) para *Echinodorus*.

Perda de cromatina (incluindo heterocromatina) parece ser um evento comum, tendo sido observada em diferentes grupos de plantas (Kopecký et al., 2019). Para as espécies do subgênero *Thamnoxys*, a perda da heterocromatina CMA⁺ em duas populações em duas espécies de *Oxalis*, indica a ocorrência de citótipos em áreas geograficamente próximas como nas duas populações de Marilândia de *O. colatinensis*. A perda de segmentos heterocromáticos tem sido observada citogeneticamente através do bandeamento como em *Secale* e *Triticosecale* (Gustafson et al., 1983) e caracterizou uma subseção de *Acianthera* (Oliveira et al., 2015). Embora não se conheça o significado evolutivo da perda de heterocromatina em uma mesma espécie de *Oxalis*, é possível, assim como em *Acianthera*, a formação de linhagens com heterocromatina não detectável pelo bandeamento CMA/DAPI.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Brasil pela bolsa concedida. Ao Dr. Pedro Fiaschi que gentilmente forneceu as plantas para a realização deste trabalho.

Referências

- Abreu MC, Fiaschi P. 2012. Lista de espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/ConsultaPublicaUC.do>.
- Abreu MC. 2011. Sistemática de *Oxalis* sect. *Thamnoxys* (Endl.) Progel no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Brasil. p. 151.
- Almeida EM, Wanderley AM, Nollét F, Costa FR, Souza LGR, & Felix LP. 2016. A new species of *Ameroglossum* (Scrophulariaceae) growing on inselbergs in northeastern Brazil. *Systematic Botany* 41: (2), 423-429.
- Barros e Silva AE, Guerra M. 2010. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. *Biotechnic & Histochemistry*, 85: (2), 115-125.
- Barros e Silva AE, Marques A, Santos KGB, Guerra M. 2010. The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera. *Chromosome Research*, 18: 503-514.
- Cordeiro JM, Nollét F, Buril MT, Chase MW, & Felix LP. 2018. A new species of *Gomesa* (Oncidiinae, Orchidaceae) from inselbergs in Brazilian caatinga: Morphological and karyological evidence. *Phytotaxa*, 374: (2), 147-154.
- 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.
- De Azkue D. 2000. Chromosome diversity of South American *Oxalis* (Oxalidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 132: 143–152.
- Dubcovsky J, Dvorak J. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316: (5833), 1862-1866.
- Feitoza LL, Martins MIG, Castro AAJF, Félix LP, Carvalho R. 2010. Cytogenetics of Alismataceae and Limnocharitaceae: CMA/DAPI banding and 45S rDNA sites. *Plant Systematics and Evolution*, 286: (3-4), 199-208.
- Fiaschi P. 2006. Oxalidaceae. In: T. B. Cavalcanti (org.), *Flora do Distrito Federal, Brasil* Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. 5: 93-105.
- Fiaschi P. 2012. Two new species of *Oxalis* sect. *Polymorphae* (Oxalidaceae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Kew Bulletin*, 67: 33-38.

- Fiaschi P. 2014. Three new species and a revised key to species of *Oxalis* section *Polymorphae* (Oxalidaceae). *Brittonia* 66: 134–150.
- Fiaschi P. 2018. Check-list da Família Oxalidaceae no estado do Mato Grosso do Sul. *Iheringia, Série Botânica* 73: 297-300.
- Guerra M, Souza MJ. 2002. Como observar cromossomos. Ribeirão Preto: Ed. Funpec, p 131
- Guerra M. 2000a. Chromosome number variation and evolution in Monocots. *Monocots: Systematics and Evolution*. CSIRO: Melbourne 127-134.
- Guerra M. 2000b. Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. *Genetics and Molecular Biology*, 234: 1029-1041.
- Gustafson JP, Lukaszewski A J, & Bennett MD. 1983. Somatic deletion and redistribution of telomeric heterochromatin in the genus *Secale* and in *Triticale*. *Chromosoma*, 88: (4), 293-298.
- Kopecký D, Horáková L, Duchoslav M, Doležel J. 2019. Selective elimination of parental chromatin from introgression cultivars of x*Festulolium* (*Festuca*×*Lolium*). *Sustainability*, 11: (11), 3153.
- Lourteig A. 1994. *Oxalis* L. subgénero *Thamnoxys* (Endl.) Reiche emend. Lourteig. *Bradea. Herbarium Bradeanum* 7: 1-199.
- Lourteig A. 2000. *Oxalis* L. Subgénero *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Oxalis* y *Trifidus* Lourteig. *Bradea* 7: 201-629.
- Marks GE. 1956. Chromosome numbers in the genus *Oxalis*. *New Phytologist* 55: 120–129.
- 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.
- Oliveira IG, Moraes AP, Almeida EM de. et al., 2015. Chromosomal evolution in Pleurothallidinae (Orchidaceae: Epidendroideae) with an emphasis on the genus *Acianthera*: chromosome numbers and heterochromatin. *Botanical Journal of the Linnean Society* 178: 102–120.
- Rieseberg LH, Willis JH. 2007. Plant speciation. *Science* 317: (5840), 910-914.
- Rice et al. 2015. The Chromosome Counts Database (CCDB) – a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytologist* 206: 19-26.
- Salter TM. 1944. The genus *Oxalis* in South Africa: A taxonomic revision. *Journal of South African Botany.*, suppl 1: 1–355.
- Souza LGR, Crosa O, Speranza P, Guerra M. 2012. Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae). *Annals of Botany* 109: 987-999.

Vaio M, Gardner A, Emshwiller E, Guerra M. 2013. Molecular phylogeny and chromosome evolution among the creeping herbaceous *Oxalis* species of sections *Corniculatae* and *Ripariae* (Oxalidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68: 199–211.

Vaio M, Gardner A, Speranza P, Emshwiller E, & Guerra M. 2016. Phylogenetic and cytogenetic relationships among species of *Oxalis* section *Articulatae* (Oxalidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 302: 1253-1265.

Vaio M, Nascimento J, Mendes S, et al., 2018. Multiple karyotype changes distinguish two closely related species of *Oxalis* (*O. psoraleoides* and *O. rhombo-ovata*) and suggest an artificial grouping of section *Polymorphae* (Oxalidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 188: 269-280.

Van-Lume B, Esposito T, Diniz-Filho JAF, Gagnon E, Lewis GP, Souza G. 2017. Heterochromatic and cytomolecular diversification in the *Caesalpinia* group (Leguminosae): Relationships between phylogenetic and cytogeographical data. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 29: 51-63.

Tabela 1. Espécies de *Oxalis* subg. *Thamnoxys* analisadas por meio de dupla coloração com fluorocromos CMA/DAPI e seus respectivos locais de coleta, material testemunho (voucherses), fórmulas cariotípicas (FC), contagens cromossômicas prévias (CP), números cromossômicos determinados no presente trabalho (PT), bandas heterocromáticas e figuras ilustrativas dos cariótipos.

Secções/espécies	Local de coleta	Voucher	FC	CP* 2n	PT 2n	Bandas CMA ⁺ /DAPI ⁺	Figuras
<i>Polymorphae</i> (Prog.)							
Lourteig							
<i>O. alstonii</i> Lourteig	Simão Dias – SE.	LPF 18050	2M + 4SM + 4A	10	10	Quatro terminais	1A, 2A
<i>O. blackii</i> Lourteig	Castelo – ES.	TS 119	2M + 4SM + 4A	10	10	Quatro terminais	1B, 2B
<i>O. colatinensis</i> Fiaschi	Marilândia – ES.	PF 4631	2M + 4SM + 4A	10	10	Duas terminais	1C, 2C
	Marilândia – ES.	PF 4625	2M + 4SM + 4A		10	Sem bandas	1D, 2D
<i>O. kollmannii</i> Fiaschi	Cachoeiro de Itapemirim –ES.	PF 4663	2M + 4SM + 4A	–	10**	Três terminais	1E, 2E
<i>O. neuwiedii</i> Zucc.	Ibicuí – BA.	PF 4598	2M + 4SM + 4A	12, 10	10	Quatro terminais	1F, 2F
<i>O. neuwiedii</i> Zucc. subsp. <i>neuwiedii</i>	Porto Seguro – BA.	PF 4617	2M + 4SM + 4A		10	Quatro terminais	1G, 2G
	Linhares – ES.	TS 102	2M + 4SM + 4A		10	Sem bandas	1H ,2H
<i>O. polymorpha</i> Mart. ex Zucc.	Marliéria –MG.	ER 64	2M + 4SM + 4A	–	10**	Quatro terminais	1I, 2I
<i>O. puberula</i> Nees & Mart.	Pacoti – CE.	LPF 16098	4M + 8SM + 8A	10	20**	Oito terminais	1J, 2J
<i>Thamnoxys</i> Progel							
<i>O. frutescens</i> L.	Morro do Chapéu – BA.	LPF 18197	–	12,36	24**	Sem bandas	1K, 2K
<i>O. hedysarifolia</i> Raddi	Brejo da Madre de Deus – PE.	LPF 17784	4M + 6SM + 2A	12	12	Duas terminais	1L, 2L
<i>Hedysarioideae</i> DC.							
<i>O. hedysaroides</i> Kunth	Florianópolis – SC.	PF 5180	2M + 8A	–	10**	Duas terminais	1M, 2M

***Holophyllum* Progel**

<i>O. alata</i> Mart. ex Zucc.	Itamaraju – BA.	PF 4657	-	—	10**	Quatro terminais	1N, 2N
<i>O. mandioccana</i> Raddi	Cultivada	Cultivada	2SM + 8A	—	10**	Quatro terminais	1O, 2O

***Phyllodoxys* Endl.**

<i>O. fruticosa</i> Raddi	Itamaraju – BA.	PF 4658	2M + 8A	10	10	Sem bandas	1P, 2P
---------------------------	-----------------	---------	---------	----	----	------------	--------

† Estados Brasileiros referentes aos locais de coleta: ES, Espírito Santo; BA, Bahia; CE, Ceará; SC, Santa Catarina; PE, Pernambuco. Coletores: Leonardo Pessoa Felix (LPF), Pedro Fiaschi (PF), Everton Richetti (ER) e Tiago Souza Costa (TS) *Fonte para as contagens cromossômicas prévias: De Azkue e Martínez (1987), Vaio et al. (2018), Rice et al., (2015),

**Contagem inédita para a espécie. Morfologia cromossômica de acordo com Guerra (1986): M = metacêntrico, SM = submetacêntrico, AC = acrocêntrico, TC = telocêntrico

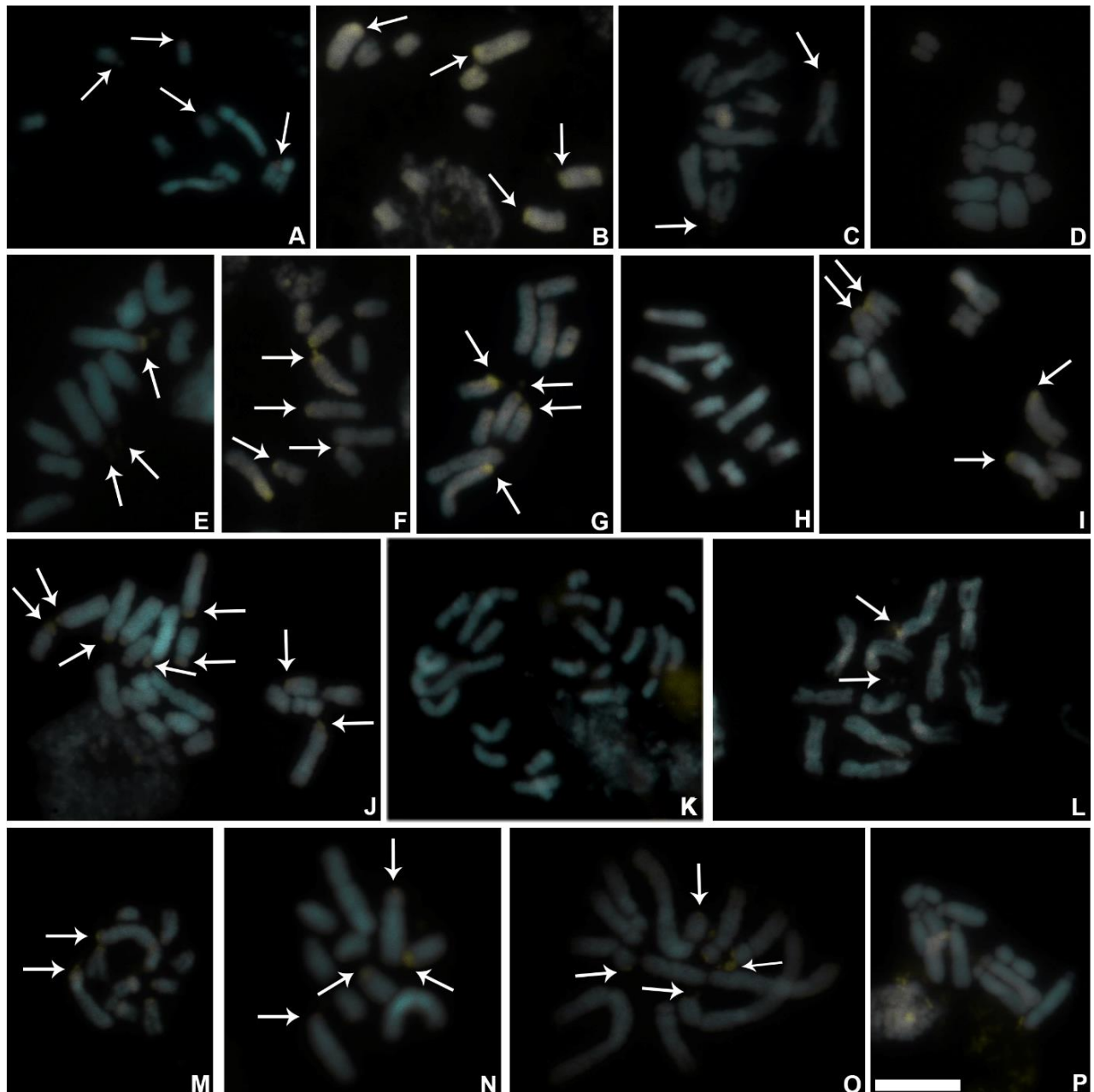


Figura 1: Células metafásicas coradas com os fluorocromos CMA e DAPI. Espécies da seção **Polymorphae** com $2n = 10$ em *Oxalis alstonii* (A); *O. blackii* (B); *O. colatinensis*, PF 4631 (C) e PF 4625 (D); *O. kollmannii* (E); *O. neuwiedii* (F). *O. neuwiedii* subsp. *Neuwiedii*, PF 4617 (G) e TS 102 (H); *O. polymorpha* (I); $2n = 20$ em *O. puberula* (J). Espécies da seção **Thamnoxys**, com $2n = 24$ em *O. frutescens* (K); com $2n = 12$ em *O. hedysarifolia* (L). Espécie da seção **Hedysarioideae**, com $2n = 10$ em *O. hedysaroides* (M). Espécies da seção **Holophyllum**, $2n = 10$ em *O. alata* (N); *O. mandioccana* (O). Espécie da seção **Phyllodoxys**, com $2n = 10$ em *O. fruticosa* (P). Barra em I corresponde a $10\mu\text{m}$.

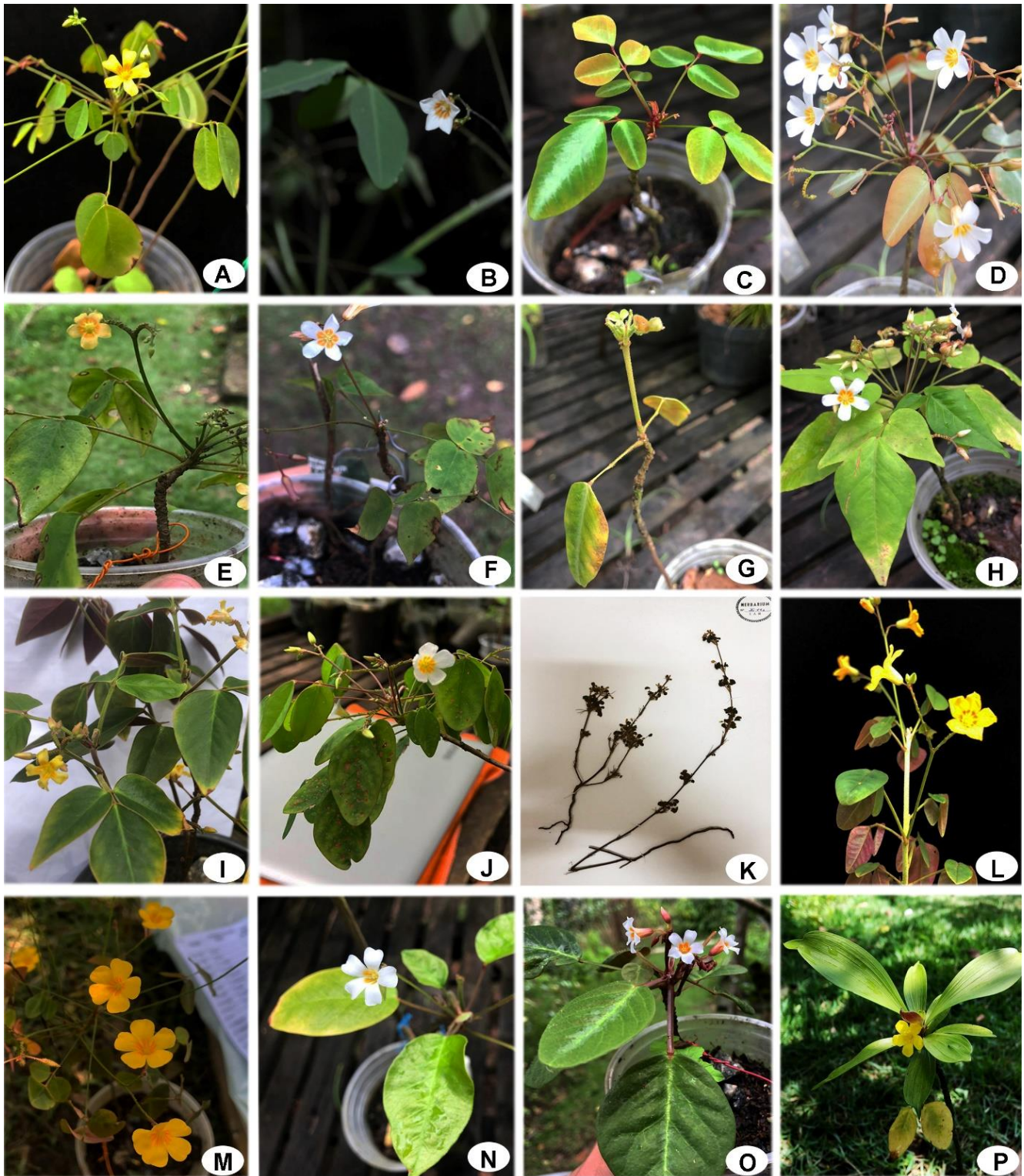


Figura 2: Espécies das seções **Polymorphae**: *O. alstonii* (A); *O. blackii* (B); *O. colatinensis*, PF4631 (C) e PF4625 (D); *O. kollmannii* (E); *O. neuwiedii* (F); *O. neuwiedii* subsp. *neuwiedii*, PF4617 (G) e TS 102 (H); *O. polymorpha* (I); *O. puberula* (J). **Thamnoxys**: *O. frutescens* (K); *O. hedysarifolia* (L). **Hedysarioideae**: *O. hedysaroides* (M). **Holophyllum**: *O. alata* (N); *O. mandioccana* (O). **Phyllodoxys**: *O. fruticosa* (P). Fonte: da figura B, Cristiane Snak.

Anexo A: Normas do periódico Acta Botânica Brasilica



**ACTA
BOTANICA
BRASILICA**

Published on behalf of Sociedade Botânica do Brasil

Language editing

If English is not your first language, it is strongly recommended to have your manuscript edited for language before submission. This is not a mandatory step.

All manuscripts must follow these guidelines: the text should be in Times New Roman font, size 12, double-spaced throughout and with 25 mm margins; the paper size should be set to A4 (210 x 297 mm). All pages should be numbered sequentially. Each line of the text should also be numbered, with the top line of each page being line 1. For text files .doc, .docx and .rtf are the only acceptable formats. Files in Adobe® PDF format (.pdf files) will not be accepted. When appropriate, the article file should include a list of figure legends and table heads at the end. This article file should not include any illustrations or tables, all of which should be submitted in separate files. Do not include field code either.

Abstract not exceeding 200 words in a single paragraph without references. The Abstract should outline the essential content of the manuscript, especially the results and discussion, highlighting the relevance of main findings. The Abstract should be followed by between five and ten **Keywords**. Note that essential words in the title should be repeated in the key words.

Materials and methods and **Results** should be clear and concise. The **Discussion** section should avoid extensive repetition of the results and must finish with some conclusions. This section can be combined with results (**Results and Discussion**), however, we recommend authors consult the Editorial Board for a previous evaluation.

Plant names must be written out in full in the abstract and again in the main text for every organism at first mention but the genus is only needed for the first species in a list within the same genus (e.g. *Hymenaea stigonocarpa* e *H. stilbocarpa*). The authority (e.g., L., Mill., Benth.) is required only in Materials and methods section. Use The International Plant Names Index (www.ipni.org) for correct plants names. Cultivars or varieties should be added to the scientific name (e.g. *Solanum lycopersicum* ‘Jumbo’). Authors must include in Materials and methods a reference to voucher specimen(s) and voucher number(s) of the plants or other material examined.

Units of Measurement. *Acta bot. bras.* adopts the *Système International d’Unités* (SI). For volume, use the cubic metre (e.g. 1×10^{-5} m³) or the litre (e.g. 5 µL, 5 mL, 5 L). For concentrations, use µM, µmol L⁻¹ or mg L⁻¹. For size and distance use meters (cm, mm, µm, etc) and be consistent in the manuscript.

Citations in the text should take the form of Silva (2012) or Ribeiro & Furr (1975) or (Mayer & Wu 1987a;

b; Gonzalez 2014; Sirano 2014) and be ordered chronologically. Papers by three or more authors, even on first mention, should be abbreviated to the name of the first author followed by *et al.* (e.g. Simmons *et al.* 2014). If two different authors have the same last name, and the article have the same year of publication, give their initials (e.g. JS Santos 2003). Only refer to papers as ‘in press’ if they have been accepted for publication in a named journal, otherwise use the terms ‘unpubl. res.’, giving the initials and last name of the person concerned (e.g., RA Santos unpubl. res.).

References should be arranged alphabetically based on the surname of the author(s). Where the same author(s) has two or more papers listed, these papers should be grouped in year order. Letters ‘a’, ‘b’, ‘c’, etc., should be added to the date of papers with the same citation in the text. Please provide DOI of ‘in press’ papers whenever possible.

For papers with **six** authors or fewer, please give the names of all the authors. For papers with **seven** authors or more, please give the names of the first three authors only, followed by *et al.*

Acknowledgements should be in fewer than 80 words. Be concise: “we thank...” is preferable to “The present authors would like to express their thanks to...”. Funding information should be included in this section.

Preparing Figures, Tables and Supplementary material All figures (photographs, maps, drawings, graphs, diagrams, etc.) and tables must be cited in the text, in ascending order. Citations of figures in the text should appear in an abbreviated, capitalized form (e.g., Fig. 1, Fig. 2A-D, Fig. 3A, Figs. 3A, 4C, Tab.1). The maximum dimensions of individual figures should be 170 × 240 mm. The width of an individual component can be 170 mm or 85 mm, without exception, whereas the height can be ≤ 240 mm. For continuous tone images (e.g., photographs), please supply TIFF files at 300 dpi. More complex drawings, such as detailed botanical illustrations will not be redrawn and should be supplied as 600 dpi TIFF files. Grouping of related graphics or images into a **single figure** (a plate) is strongly encouraged. When a block of illustrative material consists of several parts, each part should be labelled with sequential capital letters, in the order of their citation in the text (A, B, C, etc.). The letters that identify individual images should be inserted within white circles in the lower right-hand corner. For separate the grouped images, authors should insert white bars (1mm thickness).

Tables should be preceded by titles, indicated with sequential Arabic numerals (Table 1, 2, 3, etc.; do not abbreviate). Tables should be created using the Table function of Microsoft Word™. Columns and rows should be visible, although no dark lines should be used to separate them. Horizontal rules should be used only at the top (below the title) and bottom (below the final row) of the table. Do not use fills, shading or colors in the tables.