



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS TRINDADE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS, ALGAS E
PLANTAS

Fernando Santos Cabral

**Sistemática Molecular de *Oxalis* subg. *Thamnoxys* (Endl.) Reiche emend. Lourteig
(Oxalidaceae)**

Florianópolis

2021

Fernando Santos Cabral

**Sistemática Molecular de *Oxalis* subg. *Thamnoxys* (Endl.) Reiche emend. Lourteig
(Oxalidaceae)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Orientador: Prof. Pedro Fiaschi, Dr.

Florianópolis

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos Cabral, Fernando
Sistemática Molecular de Oxalis subg. Thamnoxys (Endl.)
Reiche emend. Lourteig (Oxalidaceae) / Fernando Santos
Cabral ; orientador, Pedro Fiaschi, 2021.
47 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas,
Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2. Sistemática
Vegetal. 3. Oxalis. I. Fiaschi, Pedro . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biologia de Fungos, Algas e Plantas. III. Título.

Fernando Santos Cabral

**Sistemática Molecular de *Oxalis* subg. *Thamnoxys* (Endl.) Reiche emend.
Lourteig (Oxalidaceae)**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Duane Fernandes Lima, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Madalena Vaio, Dr.(a)
Universidad de la Republica

Prof.(a) Mayara Krasinski Caddah, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos Algas e Plantas.

Profa. Dra. Mayara Krasinski Caddah
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Pedro Fiaschi, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2021.

Este trabalho é dedicado à minha mãe, irmãos e estimados amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor e Orientador Pedro Fiaschi, por me aceitar como seu aluno, por toda sua confiança e ajuda que fizeram com que esse trabalho fosse possível.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas, especialmente à Professora Dr. Mayara Caddah, por todo seu conhecimento, pelas avaliações em etapas prévias e por disponibilizar seu equipamento para a execução de uma etapa do trabalho.

A equipe de Pós Doutores do Laboratório de Biologia Molecular, Olga Camacho, Rafael Cruz e Duane Lima.

A Eduardo Nery, por sua amizade em todos os momentos, pelo apoio e companhia e por me auxiliar no início de minha vida de laboratório, pelos debates científicos e pelas cervejas, cafés e por toda alegria e felicidade por ter sua amizade.

A Leonardo Macagnan, por todos os debates científicos, pela ajuda com as filogenias, as conversas, cafés e cervejas que partilhamos.

A Patricia Padilha, por sua amizade, carinho, incentivo e por me ajudar a encontrar forças mesmo quando eu achava que não as tinha.

A Letícia Mesacasa, por sua amizade, companheirismo, apoio e acolhimento, pelo chimarrão e por nunca me deixar esquecer das coisas que realmente importam.

A Luciana Silva, por sua amizade e por ser a pessoa que sempre nos conecta a realidade e a luta diária que precisamos vencer.

A Janaína Vedana, por sua alegria contagiante, amizade e por todos os cafés e cervejas.

A Piera Ostroski por todo o apoio, alento e alegrias que compartilhamos.

A Equipe Técnica do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia - LAMEB, em especial William Oliveira e Laise Becker por seu auxílio e prontidão.

A Davis da Silva, por seu companheirismo e apoio nessa jornada.

A minha família, em especial a meu irmão William e minha mãe por todo o apoio, carinho e compreensão.

Aos Curadores/as dos Herbários FLOR, HCF, HUFU, HUPG, MBM e QCA, por sua disponibilidade e por sua contribuição para a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores Benedito Silva, Eber Alcantara e Vinicius, pela companhia em campo e por todo o conhecimento disponibilizado.

A Alexandra Elbakian, por sua plataforma de compartilhamento de conhecimento que foi de enorme ajuda não só a este trabalho, mas como em toda minha jornada no mundo das Ciências.

Ao café, por sua presença em todas as etapas desse estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

“All that we see or seem
Is but a dream within a dream.” (Edgar Allan Poe, 1849)

RESUMO

Oxalis é um gênero amplamente distribuído pelo mundo, com uma grande variabilidade de morfologias dos órgãos vegetativos e reprodutivos, e com várias seções atualmente reconhecidas. No Brasil, encontramos espécies subordinadas a *Oxalis* subg. *Oxalis*, reconhecido pelas folhas trifolioladas digitadas, e *Oxalis* subg. *Thamnoxys*, reconhecido pelas folhas uni a trifolioladas pinadas ou filodiais. Quando buscamos entender a história evolutiva de *Oxalis*, encontramos estudos que avaliam relações entre seções de *O.* subg. *Oxalis*, porém nenhum deles focado em *O.* subg. *Thamnoxys* e, mesmo entre aqueles com alguma representação de *O.* subg. *Thamnoxys*, não apresentam consenso sobre as relações evolutivas entre as seções e entre as espécies do grupo. Este estudo busca utilizar uma abordagem da sistemática molecular para explicar as relações das seções e das espécies de *O.* subg. *Thamnoxys* e para esse fim, realizamos coletas de amostras de *O.* subg. *Thamnoxys* em seis estados do Brasil, nas regiões Centro-Oeste e Sul. Além disso, contamos com um banco de amostras previamente obtidas em diversas expedições. Desta forma, obtivemos amostras para sete das nove seções listadas em *O.* subg. *Thamnoxys*. Estas foram levadas ao laboratório para a realização dos procedimentos de extração e amplificação de DNA e posteriormente terceirizamos o sequenciamento de DNA das amostras obtidas. Obtivemos sucesso com 31 terminais (26 táxons) sequenciados para três marcadores: nrITS, *trnL-trnF* e *petA-psbJ*. Com as sequências obtidas, realizamos análises filogenéticas bayesianas e de Máxima Verossimilhança obtivemos quatro topologias, sendo três delas com marcadores isolados e uma com todos os marcadores sequenciados. Dentre as seções amostradas, *O.* sect. *Holophyllum* e *O.* sect. *Psoraleoideae* foram recuperadas como monofiléticas, contendo dois terminais cada em nossa amostragem, enquanto *O.* sect. *Polymorphae*, *O.* sect. *Robustae* e *O.* sect. *Thamnoxys*, com cinco, seis e doze terminais, respectivamente, não mostraram monofiletismo, sendo consideradas parafiléticas ou polifiléticas.

Palavras-chave: Brasil. Cerrado. Evolução. Filogenia.

ABSTRACT

Oxalis is a widely distributed genus in the world, with a large morphological variation of vegetative and reproductive organs, and with several sections currently recognized. In Brazil there are species from *Oxalis* subg. *Oxalis*, which can be recognized by trifoliolate, palmately compound leaves, and *Oxalis* subg. *Thamnoxys*, which are recognized by unifoliolate, pinnate trifoliolate or phyllodial leaves. When we try to understand the evolutionary history of the genus, there are several studies focusing on the relationship of species of *O.* subg. *Oxalis*, but there is none focusing on the relationship of sections and species of *O.* subg. *Thamnoxys* and, even those studies with sampled species of *O.* subg. *Thamnoxys*, there was no consensus about evolutionary relationships of species and sections of this group. The present study proposed a molecular systematics approach to explain the relationships of sections and species of *O.* subg. *Thamnoxys* and, for this purpose, we carried out fieldwork sampling of *O.* subg. *Thamnoxys* on six Brazilian states from Midwest and Southern regions. Moreover, we counted on samples previously gathered in other expeditions. Thereby, we obtained samples from seven of the nine sections of *O.* subg. *Thamnoxys*. The samples had the DNA extracted and amplified, and afterwards sent to DNA sequencing. We obtained sequences for three molecular markers (nrITS, *trnL-trnF* e *petA-psbJ*) from 31 terminals (26 taxa). After that, we performed bayesian phylogenetic and maximum likelihood analyses and produced four topologies, one for each marker and one for all markers combined. Among the sampled sections, *O.* sect. *Holophyllum* and *O.* sect. *Psoraleoideae*, each with two samples, were recognized as monophyletic. *Oxalis* sect. *Polymorphae*, *O.* sect. *Robustae*, and *O.* sect. *Thamnoxys*, with five, six, and twelve samples respectively, were not recovered as monophyletic.

Keywords: Brazil. Cerrado. Evolution. Phylogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação das seções de <i>Oxalis</i> subg. <i>Thamnoxys</i> .	16
Figura 2 – Sumário das relações filogenéticas de <i>Oxalis</i> .	18
Figura 3 – Árvore de maior credibilidade para o marcador nrITS.	30
Figura 4 – Árvore de maior credibilidade para o marcador <i>trnL-F</i> .	32
Figura 5 – Árvore de maior credibilidade para o marcador <i>petA-psbJ</i> .	34
Figura 6 – Árvore de maior credibilidade elaborada para matriz combinada nrITS, <i>trnL-trnF</i> e <i>petA-psbJ</i> .	35
Figura 7 – Árvore de Máxima Verossimilhança para a matriz combinada nrITS, <i>trnL-trnF</i> e <i>petA-psbJ</i> .	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de espécies e distribuição geográfica das seções de <i>Oxalis</i> subg. <i>Thamnoxys</i> .	15
Tabela 2 – Amostras de <i>Oxalis</i> subg. <i>Thamnoxys</i> e marcadores sequenciados.	24
Tabela 3 – Amostras de <i>Oxalis</i> utilizadas nas análises filogenéticas.	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	19
1.1.1	OBJETIVO GERAL	19
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
2	MATERIAL E MÉTODOS	21
2.1	AMOSTRAGEM TAXONÔMICA	21
2.2	AMOSTRAGEM DE CARACTERES MOLECULARES	22
2.3	ANÁLISES FILOGENÉTICAS	25
3	RESULTADOS	26
3.1	CARACTERES MOLECULARES	26
4	DISCUSSÃO	37
5	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A sistemática é um ramo da ciência que se ocupa de estudar as relações evolutivas de um grupo de organismos (Sober, 1991); e pode fazer uso, dentre outros métodos, da abordagem molecular. A abordagem molecular nos concede acesso a um número bastante elevado de caracteres para explorar, pois nos permite tratar cada sequência de DNA como uma fonte de informação muito maior do que as que podemos conseguir com a morfologia, podendo ser reanalisadas e combinadas com em estudos independentes (Blaxter, 2004).

Estudos filogenéticos são empregados em muitos grupos de organismos, como algas (e.g. Gurgel et al. 2020; Hu et al. 2020.), plantas (e.g. Bárcenas et al. 2011; Delprete, 2020; Machado et al. 2020), animais aquáticos (e.g. Bektas et al. 2020; Rogers & Aguilar, 2020) e animais terrestres (e.g. Quah et al. 2020; Doyle et al. 2020) a fim de reconhecer as relações evolutivas entre representantes do grupo estudado. Há também estudos que utilizam das técnicas da sistemática molecular para resolver questões relacionadas à diversidade críptica das espécies de alguns grupos de organismos (e.g. Fontaneto et al. 2009; Yahr et al. 2016) ou ainda estudos que usam as técnicas da sistemática molecular combinadas à anatomia, macro e micromorfologia para facilitar a resolução e identificação de espécimes em um complexo de espécies (e.g. Caddah et al. 2011).

Oxalidaceae é composta por cinco gêneros: *Averrhoa* L., *Biophytum* Candolle, *Dapania* Korthals, *Oxalis* L. e *Sarcotheca* Blume. O número de espécies pode variar de acordo com os diferentes autores mas flutua entre 500 a 770 , com hábitos variando de herbáceo a arboreo, geralmente com folhas compostas (exceto em algumas espécies de *Oxalis*), *Oxalis* é o que possui o maior número de espécies (Stevens, 2021).

Oxalis é um gênero que conta com cerca de 500 espécies amplamente distribuídas pelo globo terrestre (Frodin, 2004; Judd et al., 2009; Stevens, 2018). Estas são atualmente divididas em quatro subgêneros: *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Oxalis* L., *Thamnoxys* (Endl.) Reiche e *Trifidus* Lourteig (Lourteig, 1994, 2000; Abreu et al., 2012) e 29 seções (Lourteig, 1994, 2000; Fiaschi, 2012, 2014). No Brasil existem 103 spp. de *Oxalis* (Fiaschi et al. 2020) encontradas desde o nível do mar até altitudes superiores a 2200 m (Lourteig, 2000; Fiaschi, 2014).

Dos quatro subgêneros atualmente reconhecidos em *Oxalis*, *O.* subg. *Monoxalis* e *O.* subg. *Trifidus* possuem, cada um, apenas duas espécies, respectivamente na América do Norte

e em regiões desérticas em altitudes próximas a 5000 m na Cordilheira dos Andes (Lourteig, 2000). Dos demais, *O.* subg. *Oxalis* é formado por ca. 400 spp. geralmente com folhas digitadas trifolioladas, distribuídas principalmente no sul da África, com cerca de 200 spp. (Oberlander et al., 2011), muitas endêmicas dos *hotspots* da Região Florística do Cabo e do Karoo (Myers et al., 2000), e em áreas montanhosas das Américas, onde são encontradas grande parte das espécies bulbosas americanas (Gardner et al., 2012).

Oxalis subg. *Thamnoxys* (Endl.) Reiche abrange entre 70 e 80 spp. (Lourteig, 1994; Fiaschi, 2012, 2014) caracterizadas pelo hábito herbáceo a arbustivo, com folhas unifolioladas (p.e., *O. praetexta* Progel e *O.* sect. *Holophyllum*), trifolioladas pinadas ou com pecíolos filodiais (p.e., *O. fruticosa* Raddi) e distribuídas na região tropical das Américas Central e do Sul, principalmente em altitudes inferiores a 1000 m, tanto em florestas quanto em fitofisionomias mais abertas de cerrado ou campos rupestres.

No Brasil, os estudos taxonômicos de *Oxalis* têm focado mais em floras estaduais (Lourteig, 1983; Fiaschi & Conceição, 2005; Fiaschi, 2006; Abreu et al., 2008; Fiaschi, 2018; Lima & Alves, 2013), na atualização taxonômica de *O.* sect. *Polymorphae* (Fiaschi, 2012, 2014) e em estudos integrados que buscaram combinar dados morfológicos e citogenéticos, tais como número cromossômico, distribuição da heterocromatina e conteúdo de DNA nuclear, como base para testar o monofiletismo das seções *Ripariae* e *Corniculatae* (Vaio et al., 2013) e da seção *Articulatae* (Vaio et al., 2016), todas pertencentes a *O.* subg. *Oxalis*.

Estudos filogenéticos ainda são escassos em *Oxalis*. Para *O.* subg. *Oxalis*, estudos prévios corroboraram o monofiletismo das seções *Ionoxalis* + *Articulatae* + *Pseudobulbosae* + *Palmatifoliae*, denominadas como Clado bulboso (Gardner et al., 2012), das espécies pertencentes ao sul da África (Oberlander et al., 2004, 2009, 2011) e da seção *Palmatifoliae* (López et al., 2013). Vaio e colaboradores (2013) realizaram análises filogenéticas de marcadores moleculares plastidiais e nucleares (nrITS) aliadas à reconstrução de caráter ancestral e análises do cariótipo de espécies de *Oxalis* sect. *Corniculatae* DC. e *O.* sect. *Ripariae* Lourteig e concluíram que estas seções só seriam monofiléticas caso algumas espécies fossem transferidas de uma para a outra e vice e versa.

Oberlander e colaboradores (2011) mencionaram as relações entre as seções de *Oxalis* da Região florística do Cabo como sendo artificiais. Os marcadores moleculares usados mostraram relações filogenéticas próximas entre espécies do Cabo, mas fracamente

sustentadas entre espécies não originárias desta região. Além disso, houve incongruência nas inferências obtidas pelos autores a partir dos dados de marcadores plastidiais e do nrITS.

Aoki et al. (2017) realizaram análises com populações de *Oxalis* subsect. *Oxalis* de diferentes localidades na Ásia, além de populações da Alemanha, Canadá, EUA e Rússia utilizando dados de quatro marcadores moleculares (nrITS, *psbJ-petA*, *trnT-trnL*, *trnL-trnL-trnF*) combinados a análises citológicas e morfológicas. Neste estudo foi observado que populações de localidades distintas formavam clados que compartilhavam o mesmo nível de ploidia e distribuição geográfica (tetraploides cresciam em altitudes de até 1000 metros, enquanto diploides ocorriam somente até 500 metros de altitude), e apontaram que em um dos clados encontrados ocorria a formação de híbridos.

Em um dos mais completos estudos no que tange à taxonomia de *O.* subg. *Thamnoxys*, Lourteig (1994) propôs a delimitação de nove seções (Tabela 1), que foram assim divididas com base em caracteres morfológicos como hábito, tamanho das folhas, forma da cápsula e disposição das flores na inflorescência: *Foliosae* (Progel) Lourteig, com cápsulas eretas e folhas adensadas e curtamente pecioladas que “ocultam” os ramos; *Hedysaroideae* DC. emend. Lourteig, que inclui subarbustos ou arbustos com folíolos ovados ou elípticos e carpelos oblíquos; *Holophyllum* Progel, com folhas unifolioladas de pecíolos alados e pedúnculos geralmente alados com cápsulas eretas e carpelos uniseminados; *Phyllodoxys* Endl., com duas espécies com pecíolos filodiais; *Pleiocarpa* Knuth, que inclui ervas prostradas com raque encurtada e cápsulas achatadas e eretas; *Polymorphae* (Prog.) Lourteig, com folhas agrupadas em pseudoverticilos e carpelos uniseminados; *Psoraleoideae* Lourteig, com arbustos com folhas distribuídas por todo o ramo, cimeiras umbeliformes e cápsulas urceoladas; *Robustae* (Progel) Lourteig, que inclui arbustos ou subarbustos com folíolos cartáceos ou subcoriáceos, cápsulas eretas e lóculos internamente pilosos; e *Thamnoxys* (Endl.) Progel., a maior de todas, com desde ervas a arbustos com folhas distribuídas ao longo do ramo e cápsulas nutantes (Lourteig, 1994; Abreu et al., 2012). Na figura 1 temos exemplos das seções de *Oxalis* sub. *Thamnoxys*.

Tabela 1: Número de espécies e distribuição geográfica das seções de *Oxalis* subg. *Thamnoxys*, segundo Lourteig (1994), com acréscimos de Fiaschi (2012, 2014)

Seção	Nº spp.	Distribuição Geográfica
<i>Foliosae</i>	5	Campos e cerrados (GO, MS, TO)

<i>Hedysaroidae</i>	6	Andes
<i>Holophyllum</i>	8	Mata Atlântica (BA, ES, MG, RJ)
<i>Phyllodoxys</i>	2	Mata Atlântica e Amazônia (AC, BA, RJ)
<i>Pleiocarpa</i>	1	Caatinga e Pantanal (Nordeste, MT)
<i>Polymorphae</i>	13	Mata Atlântica e Caatinga (CE, BA, ES, MG, RJ, SP, PR)
<i>Psoraleoideae</i>	5	Caatinga e Chaco
<i>Robustae</i>	9	Campos e cerrados (SP, MG, GO, TO, MS, MT)
<i>Thamnoxys</i>	28	Distribuição ampla – América Central e do Sul

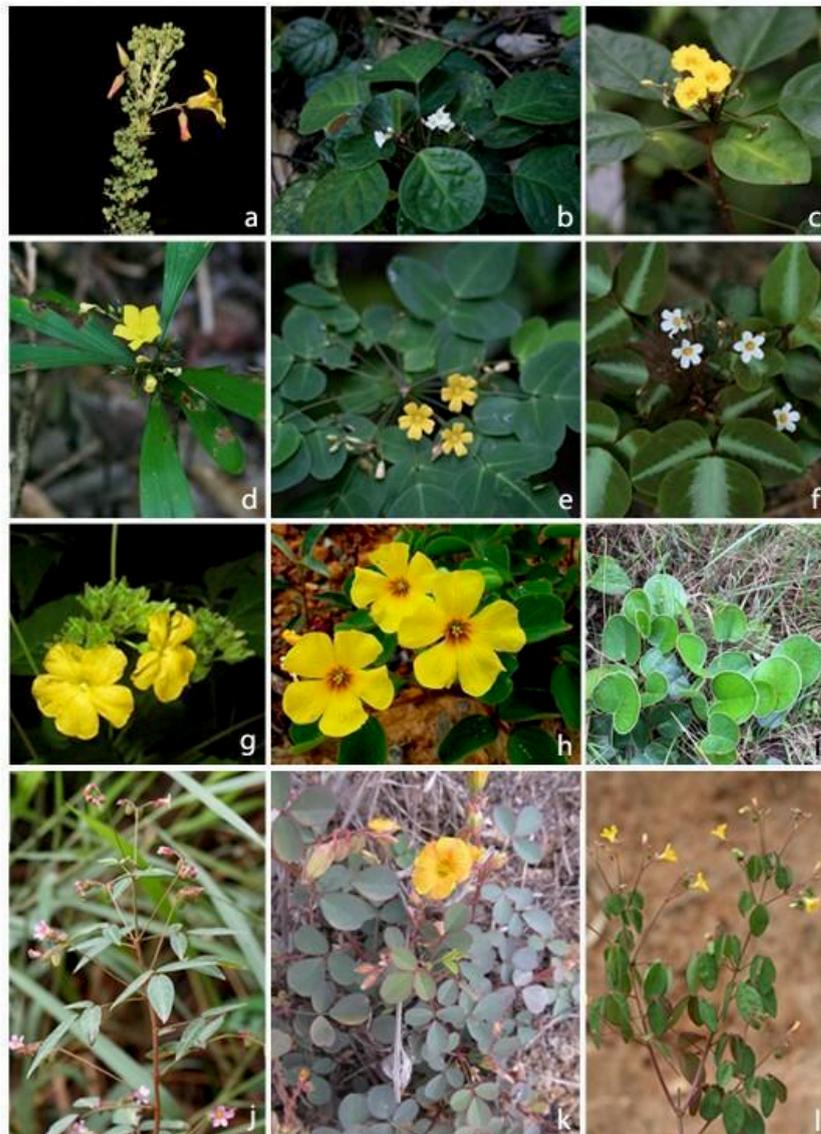


Figura 1: Representação das seções de *Oxalis* subg. *Thamnoxys*. A: *O. sect. Foliosae* - *O. densifolia* (D. Gonzaga); B, C: *O. sect. Holophyllum*, B) *O. kuhlmannii* (P. Fiaschi); C) *Oxalis* sp. (P. Fiaschi); D: *O. sect. Phyllodoxys* - *O. fruticosa* (P. Fiaschi); E, F: *O. sect. Polymorphae*, E) *O. cipoensis* (P. Fiaschi); F) *O. colatinensis* (P. Fiaschi); G: *O. sect. Psoraleoideae* - *O. jasminifolia* (X. Cornejo); H, I: *O. sect. Robustae*, H) *O. hirsutissima* (E. Lemes); I) *O. praetexta* (P. Fiaschi); J-L: *O. sect. Thamnoxys*, J) *O. cytisoides* (P. Fiaschi); K) *O. dombeii* (X. Cornejo); L) *O. sepium* (P. Fiaschi).

Gardner (2013) incluiu 26 espécies de *O.* subg. *Thamnoxys* para esclarecer as divergências mais antigas do gênero, partindo da premissa de que espécies deste subgênero apresentam características consideradas plesiomórficas dentro do gênero. A hipótese filogenética resultante de suas análises apontou a formação de um grado composto por três cladogramas, por ele nomeados Clado 1, incluindo a seção *Hedysaroideae* e *Oxalis dombeii*, da seção *Thamnoxys*, Clado 2 (seções *Holophyllum*, *Psoraleoideae*, *Polymorphae* e *Phyllodoxys*), e Clado 3 (seções *Foliosae*, *Pleiocarpa*, *Robustae* e *Thamnoxys*) (Figura 1). Gardner (2013) apontou que *O.* subg. *Oxalis* só é monofilético se incluir os representantes de *O.* subg. *Trifidus* (Gardner, 2013) e sugeriu que o monofilatismo de *O.* subg. *Thamnoxys* seja objeto de teste mais rigoroso, com a inclusão de mais representantes de seções pouco amostradas, como *Robustae* e *Holophyllum*.

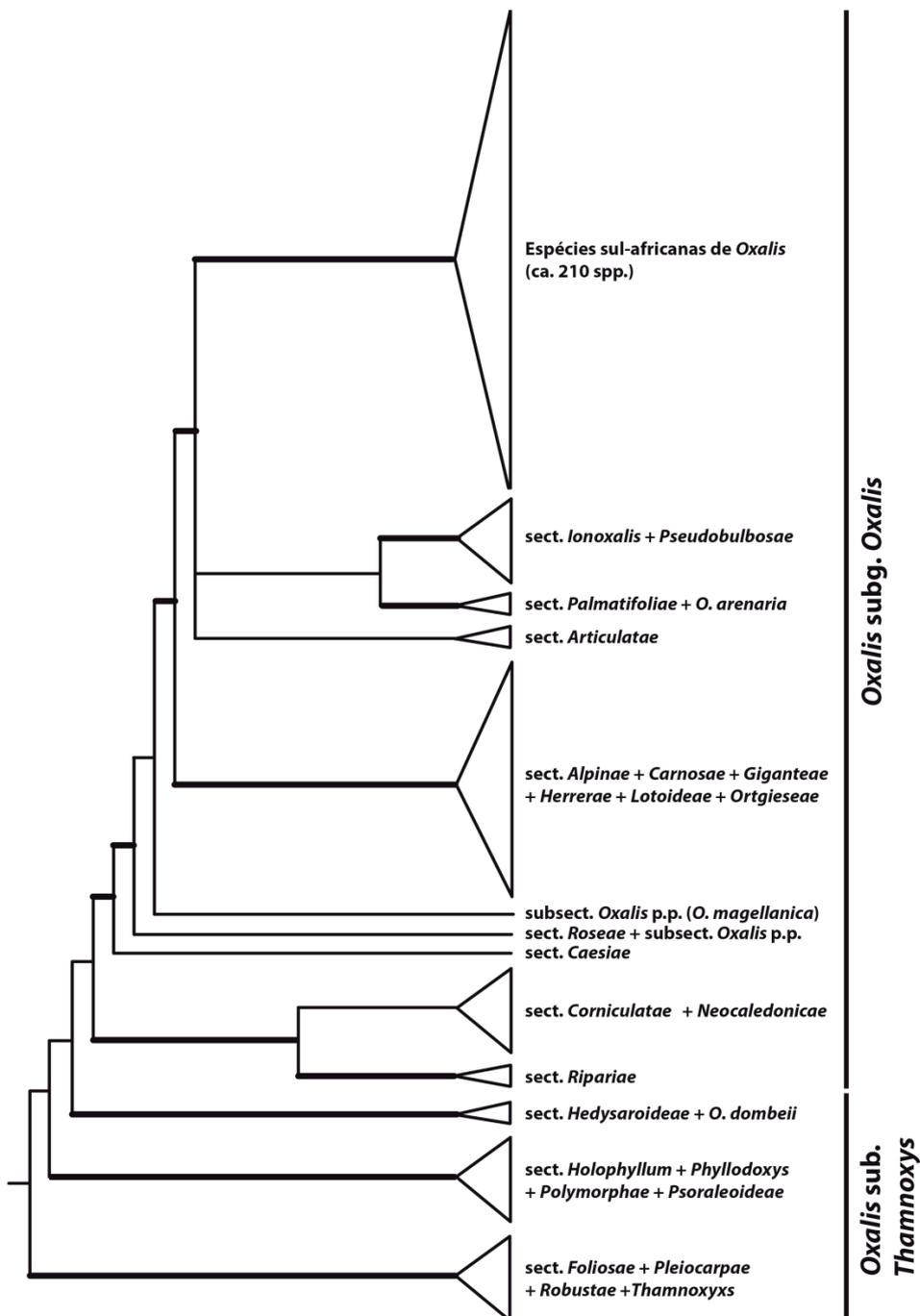


Figura 2: Sumário das relações filogenéticas de *Oxalis*. Modificada de filogenia consenso baseada em dados plastidiais e nucleares combinados (Gardner 2013). Não estão representados os subgêneros *Monoxalis* e *Trifidus* e as seções *Dimidiatae*, *Myriophyllum* e *Rhombifoliae* de *O.* subg. *Oxalis*. Os triângulos brancos são proporcionais à riqueza dos táxons terminais indicados e os ramos mais espessos indicam valores de bootstrap > 75%.

Outros estudos mais direcionados a *O.* subg. *Thamnoxys* apontaram seu monofiletismo com base em caracteres morfológicos (Abreu et al., 2012), porém não obtiveram dados que corroborassem o monofiletismo de *O.* sect. *Thamnoxys*, a não ser que esta incluísse representantes de outras seções, como *Holophyllum*, *Phyllodoxys*, *Pleiocarpa*, *Polymorphae*, *Psoraleoideae* e *Robustae* (Abreu et al., 2012).

Há poucos estudos, até o momento, que fundamentam as relações entre seções de *O.* subg. *Thamnoxys* e que investiguem relações interespecíficas dentro dessas seções. Em uma tentativa de aliar dados morfológicos, moleculares e análise cariotípica de espécies das seções *Polymorphae* e *Psoraleoideae*, Vaio et al. (2018) indicaram que essas duas seções não são monofiléticas, já que *Oxalis rhombo-ovata* A.St.-Hil. (*O.* sect. *Polymorphae*) se revelou mais próxima de *O. psoraleoides* Kunth (*O.* sect. *Psoraleoideae*) do que das demais espécies amostradas de *O.* sect. *Polymorphae*.

Apesar dos recentes esforços de pesquisadores nos continentes Africano, Americano e Asiático visando a produção de estudos filogenéticos sobre *Oxalis*, ainda existem dúvidas quanto às relações filogenéticas dos quatro subgêneros atualmente reconhecidos, quanto ao posicionamento de *O.* subg. *Thamnoxys* na história evolutiva do grupo como um todo e até mesmo quanto ao monofiletismo de *O.* subg. *Thamnoxys*. Como evidenciado acima, existe a necessidade de um tratamento mais abrangente e aprofundado das relações filogenéticas entre as seções de *O.* subg. *Thamnoxys*, visto que isto ainda foi pouco explorado nos trabalhos existentes. Visando preencher esta lacuna de conhecimento, buscamos estabelecer as relações filogenéticas entre as nove seções de *O.* subg. *Thamnoxys* (Lourteig 1994), testar o monofiletismo das mesmas bem com testar o monofiletismo de *O.* subg. *Thamnoxys*. Esta hipótese filogenética servirá de base à futura elaboração de uma nova classificação infragenérica do subgênero e à proposição de caracteres morfológicos importantes para a delimitação de seções monofiléticas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Produzir uma hipótese filogenética para espécies de *Oxalis* subg. *Thamnoxys*, a fim de testar o monofiletismo do grupo como um todo e as relações evolutivas de suas seções (sensu AUTOR).

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Produzir sequências de DNA das espécies de *Oxalis* subg. *Thamnoxys*.

Otimizar e padronizar os procedimentos de extração e amplificação de DNA de espécies de *Oxalis* subg. *Thamnoxys*.

Investigar o monofiletismo ou ausência deste nas seções de *Oxalis* subg. *Thamnoxys* reconhecidas por Lourteig (1994).

Realizar uma comparação com resultados de estudos anteriores, utilizando *Oxalis* como modelo.

Contribuir com o fornecimento de sequências de DNA de *Oxalis* ao banco de dados do Genbank.

2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2 AMOSTRAGEM TAXONÔMICA

Levando em consideração o grande número de espécies encontradas nas nove seções do subgênero *Thamnoxys* citadas em Lourteig (1994) e o fato de que as espécies se encontram em ambientes distintos e geograficamente muito distantes, ocorrendo desde o litoral até o Cerrado e Pantanal, além de espécies com distribuições restritas a regiões bastante específicas como Cuba, Hispaniola, Equador, Peru e Bolívia, o trabalho em campo seria demasiadamente dispendioso em questão financeira e de tempo. Soma-se a isso o fato de os ciclos de floração diferirem entre espécies de *Oxalis*, a ocasionalidade do fogo no Cerrado (ambiente onde se encontram parte das espécies) e a crescente destruição de habitats naturais por ação antrópica.

Logo, optamos por utilizar material coletado previamente em sílica-gel pelo Professor Pedro Fiaschi e outros colaboradores, incluindo três amostras de *O. seção Ripariae* (*O. subg. Oxalis*) que integraram o grupo externo; amostras retiradas de coleções herborizadas com a devida autorização dos curadores para casos de espécies raras ou com distribuição restrita a ambientes de difícil acesso, como as de *O. sect. Hedysaroidae*, obtidas da coleção do Herbário da Pontificia Universidad Católica del Ecuador, em Quito (QCA).

Além disso, utilizamos amostras recentemente coletadas em expedições de campo realizadas pelos autores em diferentes épocas do ano, em outubro de 2018 nos estados de Minas Gerais, Goiás, Tocantins e Distrito Federal, em novembro de 2018 no estado do Mato Grosso do Sul e uma terceira pelos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul e Santa Catarina, nas quais obtivemos 54 amostras, que futuramente serão incorporadas ao acervo do herbário FLOR (abreviação seguindo Thiers, 2020).

Para amostragem de grupos externos a *O. subg. Thamnoxys*, utilizamos sequências de *O. subg. Oxalis* e de *Averrhoa* L. referentes a estudos realizados por Gardner et al. (2012), Vaio et al. (2016) e Oberlander et al. (2009) e disponibilizadas no Genbank, com o intuito de testar o monofiletismo ou ausência dele nas seções classificadas como componentes do subgênero *Thamnoxys*.

2.2 AMOSTRAGEM DE CARACTERES MOLECULARES

Após a aquisição de novas amostras, triagem e escolha de amostras fornecidas previamente por colaboradores, iniciei os procedimentos de extração de DNA seguindo o protocolo de CTAB adaptado de Doyle & Doyle (1987), descrito abaixo:

1. Separar a porção do folíolo (mínimo 0,2 g e máximo 0,4 g) para a extração e acomodá-lo no tubo eppendorf com capacidade total de 2 ml.
2. Acrescentar no mesmo tubo cerca de 0,2 g de areia autoclavada.
3. Adicionar o nitrogênio líquido e esperar o congelamento da amostra, macerar em seguida com um micropistilo.
4. Adicionar 700 μ L de solução de CTAB, previamente aquecida em banho maria a 65 °C.
5. Adicionar 2,5 μ L de β mercapto-etanol, fechar o tubo e agitar com cuidado.
6. Incubar a amostra em banho maria com temperatura de 60°C por uma hora, agitando suavemente por 30 segundos a cada 15 minutos.
7. Acrescentar 700 μ L de solução clorofórmio e álcool isoamílico em proporção 24:1 e misturar vigorosamente.
8. Centrifugar por 10 minutos.
9. Pipetar o somente o sobrenadante em um tubo eppendorf novo, com capacidade de 1,5 mL.
10. Acrescentar 400 mL de isopropanol gelado no tubo com o sobrenadante e deixar descansar até o dia seguinte.
11. Centrifugar por 3 minutos e, ao final, descartar o líquido e manter o *pellet* no tubo.
12. Acrescentar 700 μ L de etanol 70% gelado e agitar.
13. Centrifugar por 2 minutos em velocidade máxima e descartar o líquido ao final.
14. Acrescentar 700 μ L de etanol 90% gelado e agitar.
15. Centrifugar por 2 minutos e descartar o líquido ao final.
16. Acrescentar etanol 95% gelado e agitar.

17. Centrifugar por 2 minutos e descartar o líquido ao final.
18. Secar o *pellet* com tubo aberto, com auxílio de uma placa quente ou similar.
19. Ressuspender o pellet em 100 µL de tampão TE.

As amostras de DNA genômico obtidas foram armazenadas em freezer a -20°C e posteriormente diluídas na proporção de 1 µL de DNA molde para 19 µL de água ultrapura e empregados na amplificação.

A etapa de amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada para todas as amostras obtidas na fase anterior, em termociclador Thermofisher modelo 2720. Utilizamos cinco marcadores moleculares, sendo dois nucleares e três plastidiais. Os iniciadores escolhidos para estes marcadores foram aqueles de White et al. (1990) para o nrITS, Oberlander et al. (2010) para o ncpGS, Taberlet et al. (1991) para o *trnL-trnL-trnF*, *trnL-trnT* e Shaw et al. (2007) para o *petA-psbJ*. As reações de amplificação foram realizadas em microtubos com capacidade para 200 µL, cada uma delas realizadas com volume total de 25 µl, dos quais 12,5 µl de mastermix M7052 Promega, 3 µl de DNA, 1 µl de iniciador *forward*, 1 µl de iniciador *reverse* e 7,5 µl de água ultrapura.

Os ciclos da PCR foram ajustados para cada marcador individualmente, visto que a sequência do iniciador determina as condições ideais para as fases de desnaturação, anelamento e extensão das fitas de DNA. Para o nrITS utilizamos 40 ciclos de 5 min. a 95°C, 1 min. a 94°C, 1 min. a 50°C, 2 min. e 30 segundos a 72°C e 5 min. a 72°C; para ncpGS utilizamos dois programas distintos, o primeiro seguindo Oberlander et al. (2010) com 40 ciclos de 5 min. a 96°C, 30 segundos a 96°C, 1 min. a 52°C, 1 min. a 72°C e 7 min. a 72°C, o segundo com adaptações dos autores visando melhoria nos resultados, sendo composto por 40 ciclos de 2 min. a 92°C, 30 segundos a 92°C, 1 min. e 30 segundos a 55°C, 2 min a 72°C e 7 min a 72°C; o *trnL-trnL-trnF* foi amplificado em duas etapas por ser um segmento de DNA longo com ca. 1400 bp (Taberlet et al. 1991) com o seguinte programa: 40 ciclos de 5 min. a 94°C, 1 min. a 94°C, 1 min. a 56°C, 2 min. a 72°C e 5 min. a 72°C; o *trnL-trnT* com programa de 40 ciclos de 5 min. a 94°C, 1 min. a 56°C, 2 min. a 72°C e 5 min. a 72°C; o *petA-psbJ* com 40 ciclos de 5 min. a 80°C seguidos por 1 min. a 95°C, 1 min. a 50°C, 4 min. a 64°C e 5 min a 65°C. Todas as reações foram verificadas por eletroforese em gel de agarose a 2% com o programa de 85 volts, 150 miliampères por 30 a 45 min.

Os amplicons obtidos foram purificados utilizando o kit Wizard SV gel and PCR clean-up System (Promega) seguindo as recomendações do fabricante ou utilizando o protocolo de limpeza com polietilenoglicol (PEG), ressuspensos em água ultrapura e utilizados na preparação das reações de sequenciamento.

As amostras para o sequenciamento foram preparadas em tubos eppendorf com capacidade de 200 µL, cada reação com 3 µL de DNA molde, 1 µL do iniciador e 3,5 µL de água ultrapura. As sequências foram geradas pela Myleus Facility (Plataforma ABI3730 Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) através do método de Sanger (Sanger, 1977.) Na tabela 2, listamos as amostras utilizadas para extração, amplificação e sequenciamento.

Tabela 2: Amostras de *Oxalis* subg. *Thamnoxys* e marcadores sequenciados.

Amostra	Seção	Espécie	nrITS	trnL-trnL-trnF	petA-psbJ
J.P.M. Cordeiro 911	<i>Foliosae</i>	<i>O. densifolia</i>	X	-	-
F.S. Cabral CRI01	<i>Foliosae</i>	<i>O. densifolia</i>	X	X	X
H. van den Werff 19145	<i>Hedysaroideae</i>	<i>O. caucensis</i>	-	X	-
F.S. Cabral Rip01	<i>Hedysaroideae</i>	<i>O. hedysaroides</i>	X	X	X
T.S. Croat 99618	<i>Hedysaroideae</i>	<i>O. hedysaroides</i>	-	X	-
G.L. Webster 28753	<i>Hedysaroideae</i>	<i>O. jamesonii</i>	-	X	X
C.E. Cerón 12409	<i>Hedysaroideae</i>	<i>O. jamesonii</i>	-	-	X
H. Baslev 6515	<i>Hedysaroideae</i>	<i>O. zamorana</i>	-	X	-
J.E. Madsen 75130	<i>Hedysaroideae</i>	<i>O. zamorana</i>	-	X	X
P. Fiaschi 5058	<i>Holophyllum</i>	<i>O. alata</i>	X	X	X
P. Fiaschi 4657	<i>Holophyllum</i>	<i>O. alata</i>	X	-	X
P. Fiaschi 4597	<i>Holophyllum</i>	<i>O. alvimii</i>	X	X	X
P. Fiaschi 4606	<i>Holophyllum</i>	<i>O. bela-vitoriae</i>	X	-	X
P. Fiaschi 4662	<i>Holophyllum</i>	<i>O. kuhlmannii</i>	X	-	-
E. Richetti 29	<i>Holophyllum</i>	<i>O. mandioccana</i>	X	X	X
T.S. Costa 122	<i>Holophyllum</i>	<i>Oxalis</i> sp.	X	X	X
T.S. Costa 117	<i>Holophyllum</i>	<i>Oxalis</i> sp.	X	X	-
T.S. Costa 118	<i>Holophyllum</i>	<i>Oxalis</i> sp.	X	X	-
P. Fiaschi 4588	<i>Phyllodoxys</i>	<i>O. fruticosa</i>	X	X	-
Melo 6630	<i>Pleiocarpa</i>	<i>O. glaucescens</i>	X	X	X
I.G. Costa 882	<i>Polymorphae</i>	<i>O. alstonii</i>	X	X	X
P. Fiaschi 4663	<i>Polymorphae</i>	<i>O. kollmannii</i>	X	X	X
D.C. Zappi 3335	<i>Polymorphae</i>	<i>O. cf. rosolata</i>	-	X	X
P. Fiaschi 4631	<i>Polymorphae</i>	<i>O. colatinensis</i>	X	X	X
P. Fiaschi 4591	<i>Polymorphae</i>	<i>O. polymorpha</i>	X	X	X
E. Richetti 65	<i>Polymorphae</i>	<i>O. polymorpha</i>	X	X	X

F.S. Cabral MS22	<i>Psoraleoideae</i>	<i>O. erosa</i>	X	X	X
F.S. Cabral IS4	<i>Psoraleoideae</i>	<i>O. psoraleoides</i>	X	X	X
G. Antar 1317	<i>Psoraleoideae</i>	<i>O. psoraleoides</i>	-	X	X
L.P. Felix 16002	<i>Robustae</i>	<i>O. cf. juruensis</i>	-	X	X
F.S. Cabral CRA14	<i>Robustae</i>	<i>O. ciliata</i>	X	X	X
F.S. Cabral COR14	<i>Robustae</i>	<i>O. cordata</i>	X	X	X
J.P.M. Cordeiro 987	<i>Robustae</i>	<i>O. hirsutissima</i>	-	X	-
F.S. Cabral CRI08	<i>Robustae</i>	<i>O. grisea</i>	X	X	X
F.S. Cabral TE07	<i>Robustae</i>	<i>O. goyazensis</i>	X	X	X
Melo 6953	<i>Robustae</i>	<i>O. physocalyx</i>	X	X	X
F.S. Cabral IS3	<i>Robustae</i>	<i>O. physocalyx</i>	X	X	X
F.S. Cabral PG3	<i>Robustae</i>	<i>O. praetexta</i>	X	X	X
F.S. Cabral MS19	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. cratensis</i>	-	X	X
F.S. Cabral MS23	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. cytisoides</i>	X	X	X
G. Antar 1280	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. divaricata</i>	X	X	X
J.E. Madsen 63324	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. dombeii</i>	X	X	X
Melo 4854	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. hyalotricha</i>	X	X	X
F.S. Cabral RP1	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. hyalotricha</i>	X	X	X
E. Richetti 61	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. nigrescens</i>	X	X	X
F.S. Cabral CRI04	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. pilulifera</i>	X	X	X
F.S. Cabral TE01	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. pyrenea</i>	-	X	X
F.S. Cabral TE08	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. sellowii</i>	X	X	X
F.S. Cabral TE13	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. suborbiculata</i>	X	X	X
F.S. Cabral TE10	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. suborbiculata</i>	X	X	X
F.S. Cabral TE09	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. suborbiculata</i>	X	X	X
E.M.A. 1980	<i>Thamnoxys</i>	<i>Oxalis cf. hedysarifolia</i>	X	X	X
J.P.M. Cordeiro 642		<i>Oxalis</i> sp.	-	-	X
A. Nuernberg 1875	<i>Ripariae*</i>	<i>O. bifrons</i>	X	X	X
A. Nuernberg 1800	<i>Ripariae*</i>	<i>O. hepatica</i>	X	X	X
A. Nuernberg 1849	<i>Ripariae*</i>	<i>O. sarmentosa</i>	X	X	X

Legenda: * = Grupos externos; X = amostras sequenciadas com sucesso; - = amostras não sequenciadas com sucesso

2.3. ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As sequências obtidas foram verificadas e editadas no programa Geneious 7.1.5 (Biomatters, 2005); a região correspondente ao primer foi retirada de todas as sequências e os pares correspondentes foram alinhados para gerar sequências de consenso (i.e., incluindo *forward* e *reverse*). Após isto, as sequências foram reunidas em arquivo fasta e utilizadas nas

etapas seguintes. Verificamos todas as sequências usando o BLAST, e as sequências com baixa correspondência com espécies de *Oxalis* foram descartadas, tais como aquelas com elevada similaridade com sequências homólogas de grupos de fungos, já que poderiam indicar contaminação em algum passo do processo (seja no momento da coleta, extração de DNA, amplificação ou ainda no sequenciamento).

O alinhamento final com todas as sequências foi feito com o software MEGA X, utilizando o pacote ClustalW (Kumar et al. 2018), em matriz individual para cada marcador e em uma matriz combinada, sendo que nesta última, os dados foram concatenados após ter os blocos de alinhamento individuais para cada marcador.

Foram conduzidas análises separadas para cada um dos marcadores e de uma matriz conjunta dos dados plastidiais e nucleares. O modelo de substituição de pares de bases nitrogenadas utilizado nas análises foi obtido através do JmodelTest, implementado na plataforma CIPRES (Miller et al. 2010), definimos como critério para a escolha o modelo AIC. Após isso, realizamos análises de Inferência Bayesiana com o BEAST, utilizando um arquivo preparado no BEAUti, com dez milhões de gerações, amostrando a cada 1000 árvores com modelo de substituição de base GTR com as taxas obtidas no JmodelTest, com relógio estrito e modelo de Yule.

Os arquivos de log foram verificados no Tracer e demonstraram que as análises tiveram o número de gerações necessárias (cerca de oito milhões) para atingir a estabilidade; após isso, os arquivos do tipo “tree” produzidos pelo BEAST foram utilizados no TreeAnnotator para busca da árvore de maior credibilidade, e as árvores resultantes foram inspecionadas no FigTree.

Com a matriz de dados combinados, produzimos uma árvore de Máxima Verossimilhança, por meio do programa RaxML-NG implementado na plataforma CIPRES, implementamos os modelos que mais se aproximavam dos apontados pelo JmodelTest, e o bootstrap foi calculado usando 2000 réplicas.

3 RESULTADOS

1.3 CARACTERES MOLECULARES

Dos 5 marcadores escolhidos, três apresentaram resultados satisfatórios na fase de amplificação e sequenciamento, enquanto dois deles não obtiveram bons resultados de amplificação.

Para o *trnL-trnT*, não obtivemos sucesso na fase de amplificação, mesmo utilizando o programa descrito em Taberlet et al. (1991), além de modificações e otimizações que resultaram no incremento positivo para os demais marcadores. Este marcador já foi utilizado com sucesso em estudos anteriores com espécies de *Oxalis*, como Gardner et al. (2012) e Vaio et al. (2016). Devido às limitações de tempo, descontinuamos as tentativas de otimização do procedimento de amplificação deste marcador.

Para o ncpGS, descrito inicialmente como uma alternativa promissora em Oberlander (2010) para as espécies de *Oxalis* sul-africanas, os ensaios iniciais apontaram a formação de bandas múltiplas nas espécies brasileiras testadas. Após a realização de tentativas de ajuste na temperatura de anelamento, tempo de alongamento e tempo de desnaturação, nenhum dos ensaios conduzidos demonstrou melhora significativa dos resultados e, por esse motivo, resolvemos abandonar esse marcador e trabalhar com os outros três cujos resultados foram satisfatórios, nrITS, *trnL-trnF* e *petA-psbJ*.

Para o nrITS, obtivemos 43 sequências, com tamanho variando entre 462 pares de bases (pb) (*O. suborbiculata* Lourteig, FSCTE 09) e 741 pb (*O. kuhlmanii* Lourteig, PF 4662); para o *trnL-trnF*, obtivemos 50 sequências, com tamanho variando entre 426 pb (*O. hedysaroides* Kunth, Croat 99618) e 1185 pb (*O. alvimii* Lourteig, PF 4597); para o *petA-psbJ*, obtivemos 47 sequências com 580 pb (*O. polymorpha* Mart. ex Zucc., PF 4591) a 762 pb (*O. sellowii* Spreng., FSC TE08 e *O. cratensis* Hook., FSC MS19).

Com a etapa de conferência final, visando retirar qualquer amostra que apresentasse contaminação ou não estivesse em condições ótimas de uso, obtivemos 31 acessos para cada marcador. Tanto as amostras sequenciadas neste trabalho, quanto aquelas disponíveis no Genbank para compor o grupo externo, estão listadas na tabela 3. A seção *Pleiocarpa*, que é constituída por uma espécie, foi amostrada porém o acesso para o marcador nrITS mostrou contaminação por fungos, sendo assim, esta foi descartada das análises filogenéticas.

Tabela 3: Amostras de *Oxalis* utilizadas nas análises filogenéticas.

Amostra	Seção	Espécie
M. Vaio 505*	<i>Articulatae</i>	<i>O. articulata</i> KX249662.1

M. Vaio 386*	<i>Corniculatae</i>	<i>O. corniculata</i> KC602036.1
F.S. Cabral CRI01	<i>Foliosae</i>	<i>O. densifolia</i>
J.E. Madsen 75130**	<i>Hedysaroideae</i>	<i>O. zamorana</i>
T.S. Costa 117	<i>Holophyllum</i>	<i>Oxalis</i> sp.
T.S. Costa 118	<i>Holophyllum</i>	<i>Oxalis</i> sp.
A. Gardner 66*	<i>Ionoxalis</i>	<i>O. nelsonii</i> JN836841.1
A. Gardner 29*	<i>Ionoxalis</i>	<i>O. decaphylla</i> JN836813.1
P. Fiaschi 4658	<i>Phyllodoxys</i>	<i>O. fruticosa</i>
I.G. Costa 882	<i>Polymorphae</i>	<i>O. alstonii</i>
P. Fiaschi 4663	<i>Polymorphae</i>	<i>O. kollmannii</i>
P. Fiaschi 4631	<i>Polymorphae</i>	<i>O. colatinensis</i>
P. Fiaschi 4591	<i>Polymorphae</i>	<i>O. polymorpha</i>
E. Richetti 70	<i>Polymorphae</i>	<i>Oxalis polymorpha</i>
E. Emshwiller 456*	<i>Pseudobulbosae</i>	<i>O. triangularis</i> JN836793.1
F.S. Cabral MS22	<i>Psoraleoideae</i>	<i>O. erosa</i>
F.S. Cabral IS4	<i>Psoraleoideae</i>	<i>O. psoraleoides</i>
A. Nuernberg 1849*	<i>Ripariae</i>	<i>O. sarmentosa</i>
F.S. Cabral COR14	<i>Robustae</i>	<i>O. cordata</i>
F.S. Cabral CRI08	<i>Robustae</i>	<i>O. grisea</i>
F.S. Cabral TE07	<i>Robustae</i>	<i>O. goyazensis</i>
Melo 6953	<i>Robustae</i>	<i>O. physocalyx</i>
F.S. Cabral IS3	<i>Robustae</i>	<i>O. physocalyx</i>
F.S. Cabral PG3	<i>Robustae</i>	<i>O. praetexta</i>
F.S. Cabral MS23	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. cytisoides</i>
G. Antar 1280	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. divaricata</i>
J.E. Madsen 63374**	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. dombeii</i>
Melo 4854	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. hyalotricha</i>
F.S. Cabral RP1	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. hyalotricha</i>
E. Richetti 61	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. nigrescens</i>
F.S. Cabral CRI04	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. pilulifera</i>
F.S. Cabral TE08	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. sellowii</i>
F.S. Cabral TE13	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. suborbiculata</i>
F.S. Cabral TE10	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. suborbiculata</i>
F.S. Cabral TE09	<i>Thamnoxys</i>	<i>O. suborbiculata</i>
E.M.A. 1980	<i>Thamnoxys</i>	<i>Oxalis</i> cf. <i>hedysarifolia</i>
Z. Xi		<i>Averrhoa carambola</i> JX664077.1

*Amostra de *Oxalis* subg. *Oxalis* incluída como parte do grupo externo.

**Amostra retirada do voucher depositado no Herbário QCA

Futuramente, todas as amostras citadas na tabela 3 serão submetidas ao Genbank para integrar o banco de dados de *Oxalis*. Dentre as amostras citadas na tabela 2, existem aquelas que não estavam elegíveis às análises devido à falta de um dos marcadores, mas que apresentaram qualidade satisfatória para o uso em futuros trabalhos, portanto, estão aptas para submissão ao Genbank.

Para cada marcador, realizamos uma análise do JmodelTest para buscar qual modelo de substituição de pares de base era o mais adequado para cada conjunto de dados. O arquivo BEAUti foi preparado e rodamos a análise bayesiana no BEAST, o arquivo log foi conferido no Tracer e atingiu a suficiência amostral. Após essa verificação, o arquivo de árvores foi exportado para o TreeAnnotator, implementado na plataforma CIPRES, definimos o *burn in* em 20%, e o critério de escolha foi o da árvore de maior credibilidade. Para o nrITS, o alinhamento final possuía 1026 sítios e o modelo de substituição apontado como melhor escolha foi TPM2uf+G. O resultado pode ser conferido na figura 3.

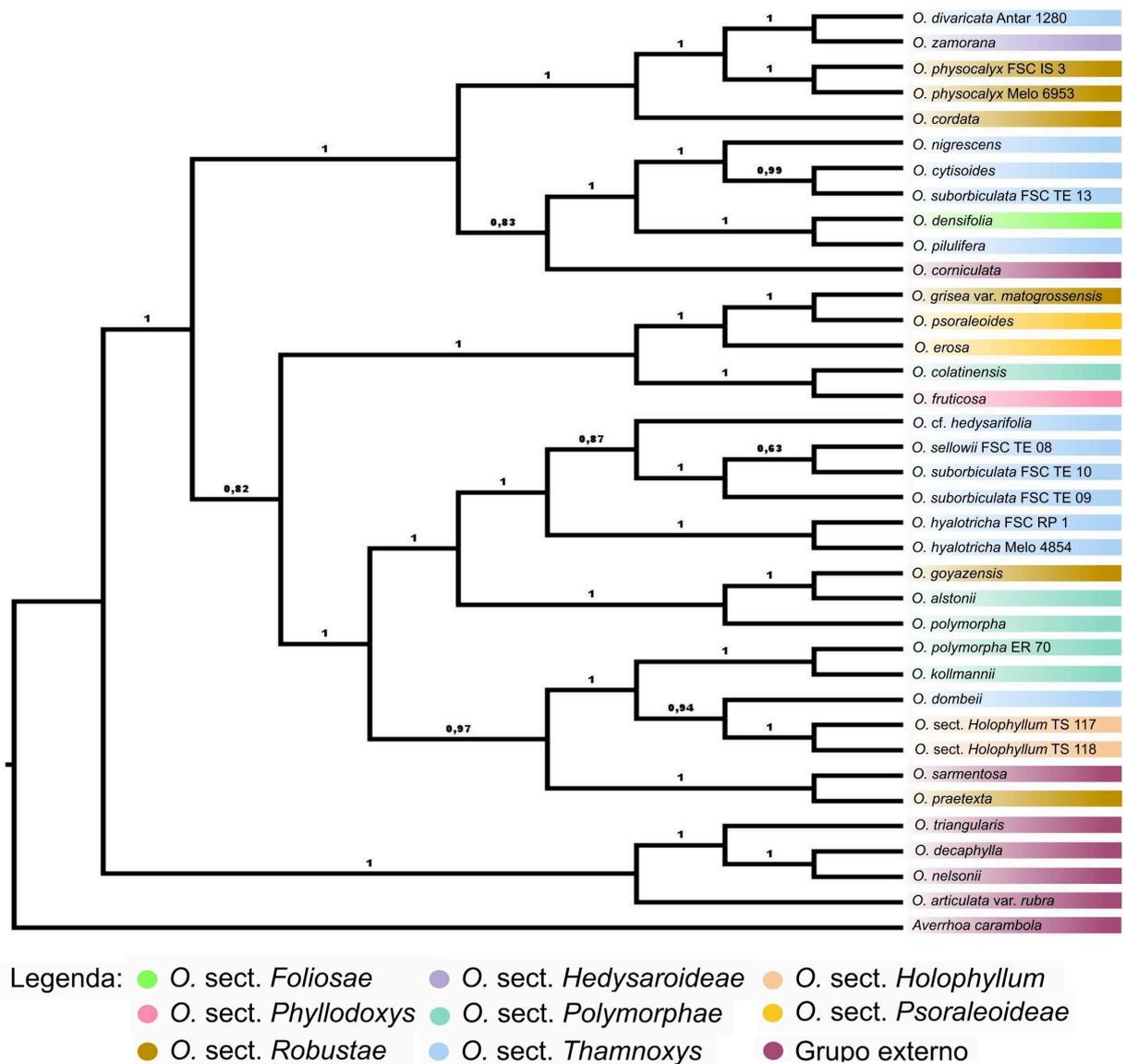


Figura 3: Árvore de maior credibilidade para o marcador nrITS. Os números acima dos ramos indicam a probabilidade posterior.

Nesta representação gráfica, nota-se que a maior parte dos ramos tem sustentação alta e sugerem o não monofiletismo das seções de *O. subg. Thamnoxys* reconhecidas por Lourteig (1994). Formam-se dois clados logo após a separação de *Averrhoa carambola* como grupo irmão a todas as amostras de *Oxalis*, um deles é composto pelas amostras do grupo externo com as amostras de *O. articulata* Savigny, *O. decaphylla* Kunth, *O. nelsonii* (Small) R. Knuth e *O. triangularis* A.St.-Hil e o outro composto por todas as outras amostras. A seguir, vemos a formação de dois grupos irmãos, um formado por acessos das seções *Foliosae*, *Hedysaroidae*, *Robustae*, *Thamnoxys* e uma espécie de *O. sect. Corniculatae*, pertencente a *O. subg. Oxalis*,

indicando que o subgênero não é monofilético; neste grupo todas as relações, com exceção ao ramo e ao nó onde está inserida *O. corniculata* L., possuem suporte alto. O outro grupo formado divide-se novamente em dois clados, um deles é formado por espécies das seções *Phyllooxys*, *Polymorphae*, *Psoraleoideae* e *Robustae*, e o outro divide-se novamente em dois clados, um formado por acessos de *O. sect. Thamnoxys* mais dois acessos de *O. sect. Polymorphae* e um acesso de *O. sect. Robustae*, e o outro clado possui acessos de *O. sect. Polymorphae* mais um acesso de *O. sect. Thamnoxys*, dois acessos de *O. sect. Psoraleoideae*, um acesso de *O. sect. Thamnoxys*, um acesso de *O. praetexta* (*O. sect. Robustae*) como irmã de *O. sarmentosa* (*O. sect. Ripariae*, *O. subg. Oxalis*)

No segmento de *trnL-F*, o alinhamento final teve 1196 pb. Os modelos de evolução molecular apontados pelo JmodelTest foi o TPM1uf+G. A representação gráfica foi produzida conforme citado anteriormente e os resultados podem ser conferidos na figura 4.

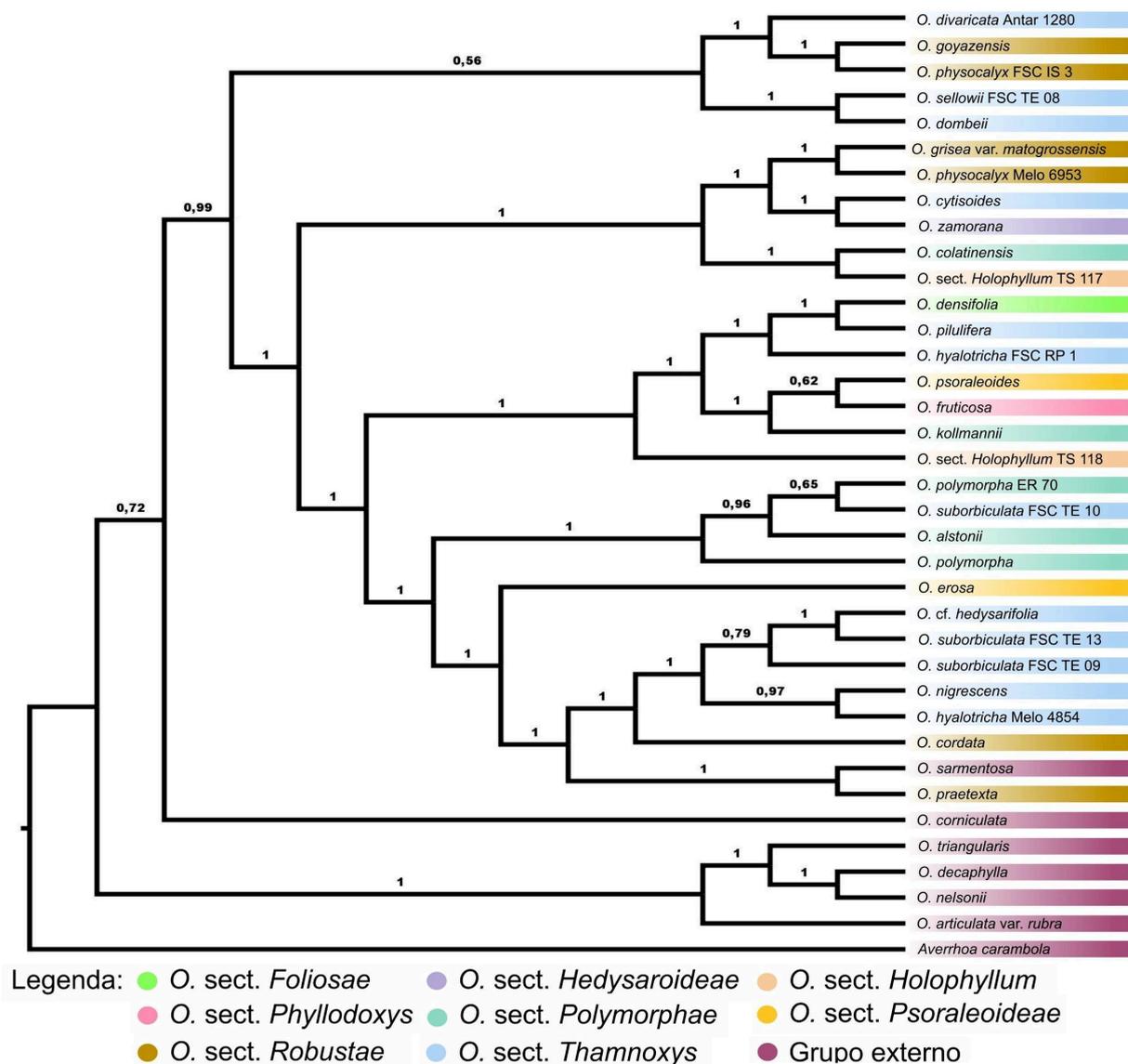


Figura 4: Árvore de maior credibilidade para o marcador *trnL-F*. Os números acima dos ramos indicam a probabilidade posterior.

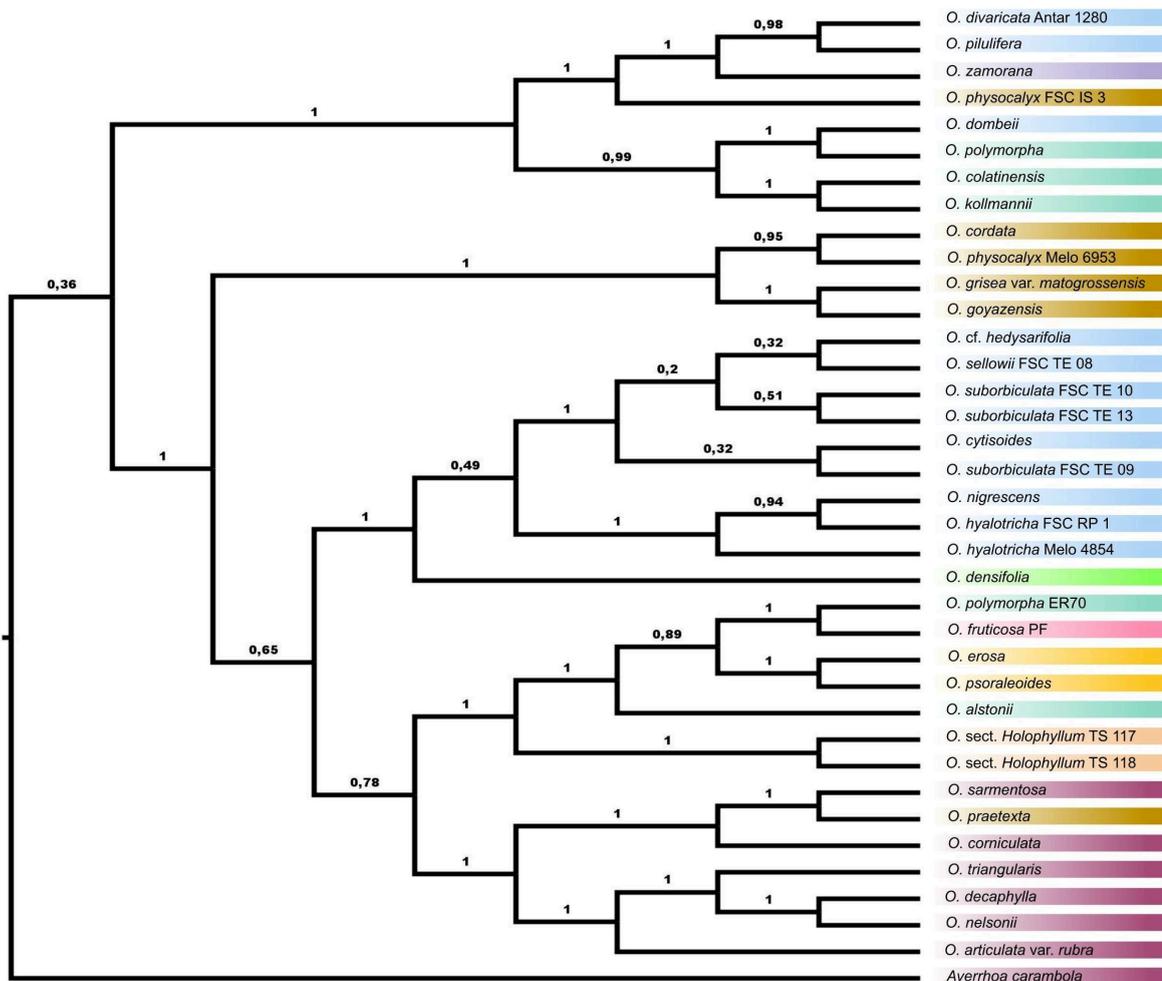
Para este marcador plastidial, percebemos uma maior incerteza na separação dos grandes grupos, e obtivemos alguns ramos com suporte abaixo do ideal. Vemos o grupo composto pelas espécies de *O. subg. Oxalis* (*O. articulata*, *O. decaphylla*, *O. nelsonii* e *O. triangularis*) novamente surgindo como grupo irmão de todos os acessos de *O. subg. Thamnoxys* + *O. corniculata* + *O. sarmentosa*. A seguir podemos ver que *O. corniculata* surge em um ramo irmão ao grupo composto por todas as outras amostras de *Oxalis subg. Thamnoxys* + *O. sarmentosa*.

Em seguida, observamos a formação de dois clados irmãos, um deles formado por espécies de *O. sect. Thamnoxys* (*O. divaricata* Mart. ex Zucc., *O. dombeyi* A.St.-Hil. e *O.*

sellowii Spreng.) e *O. sect. Robustae* (*O. goyazensis* Turcz. e *O. physocalyx* Zucc. ex Progel) e o outro divide-se em alguns clados menores. Observamos a formação de dois ramos irmãos e em um deles um clado formado por espécies das seções *Hedysaroidae*, *Holophyllum*, *Polymorphae*, *Robustae* e *Thamnoxys* e o outro com mais ramificações.

A cladogênese seguinte origina mais dois grupos: um composto por espécies das seções *Foliosae*, *Holophyllum*, *Phyllodoxys*, *Polymorphae*, *Thamnoxys* e *Psoraleoideae* e um ramo com uma nova divisão, onde podemos reconhecer um clado formado por acessos de *O. sect. Polymorphae* + *O. suborbiculata* (*O. sect. Thamnoxys*) e um ramo que passa por mais uma divisão onde *O. erosa* surge como grupo irmão do clado formado por acessos de *O. sect. Robustae*, *O. sect. Thamnoxys* e *O. sect. Ripariae*, sendo novamente recuperada a relação entre *O. praetexta* Progel e *O. sarmentosa* Zucc.

No segmento *petA-psbJ*, obtivemos um alinhamento final com 935 sítios, sendo o modelo de substituição TPM1uf+G apontado por unanimidade pelos critérios do JmodelTest. A árvore resultante pode ser conferida na figura 5.



Legenda: ● *O. sect. Foliosae* ● *O. sect. Hedysaroideae* ● *O. sect. Holophyllum*
 ● *O. sect. Phyllodoxys* ● *O. sect. Polymorphae* ● *O. sect. Psoraleoideae*
 ● *O. sect. Robustae* ● *O. sect. Thamnoxys* ● Grupo externo

Figura 5: Árvore de maior credibilidade para o marcador *petA-psbJ*. Os números acima dos ramos indicam a probabilidade posterior.

Nesta representação temos, de modo geral, suporte baixo em ramos que separam grandes grupos contidos na representação. A primeira cladogênese separa um grupo formado por espécies das seções *Hedysaroideae*, *Polymorphae*, *Robustae* e *Thamnoxys* de um ramo que agrupa as demais espécies amostradas, que passa por outra cladogênese, onde um dos novos ramos originados é um clado formado por acessos de *O. sect. Robustae* e o outro ramo divide-se novamente, originando um clado composto por um acesso de *O. sect. Foliosae* como grupo irmão de todos os acessos de *O. sect. Thamnoxys* e um outro ramo com uma nova divisão originando dois cladros, um composto por acessos de *O. sect. Holophyllum*, *O. sect. Phyllodoxys*, *O. sect. Polymorphae* e *O. sect. Psoraleoideae* e o outro composto por terminais

de *O.* subg. *Oxalis* e por *O. praetexta* da seção *Robustae*, como ponto destoante das demais apresentadas até o momento, o grande grupo onde se insere o clado formado por estas duas espécies é composto por acessos de *O.* subg. *Oxalis* e não por acessos de *O.* subg. *Thamnoxys*, como nas demais topologias.

Para a matriz combinada de todos os marcadores, obtivemos um alinhamento com 3157 sítios, com modelo de substituição TPMuf1+G. O resultado pode ser conferido na figura 6.

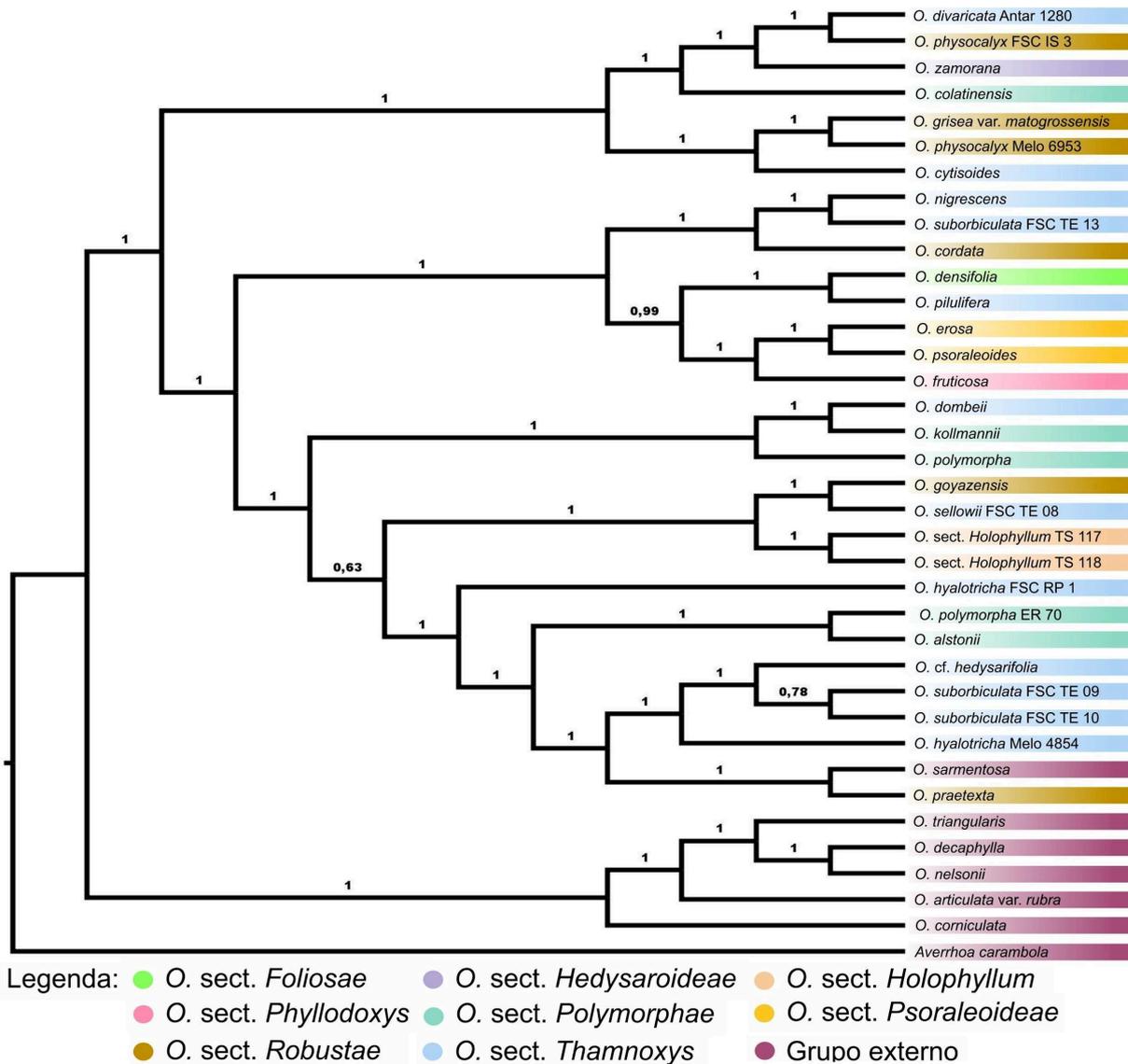
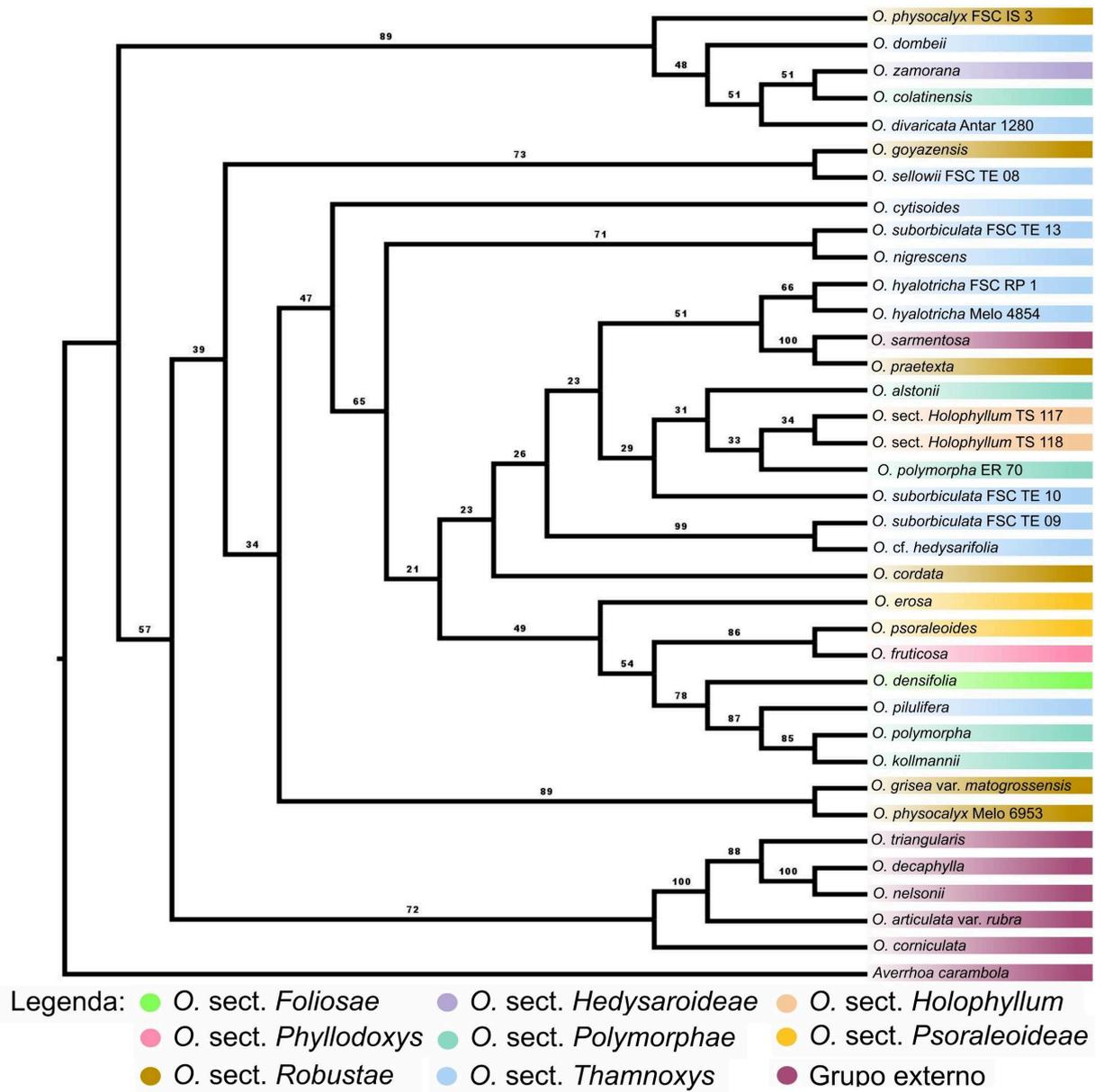


Figura 6: Árvore de maior credibilidade elaborada para a matriz combinada nrITS, *trnL-F* e *petA-psbJ*. Os números acima dos ramos indicam as probabilidades posteriores.

Neste caso, temos pouquíssimos ramos com sustentação baixa e a formação de grupos com espécies de diferentes seções da delimitação feita por Lourteig (1994). A primeira cladogênese resulta na formação de um grupo com as amostras de *O.* subg. *Oxalis* divergindo do grande grupo formado por todas as amostras de *O.* subg. *Thamnoxys* + *O. sarmentosa*. A divisão seguinte resulta no surgimento de um grupo heterogêneo com acessos das seções *Hedysaroideae*, *Polymorphae*, *Robustae* e *Thamnoxys* e de um novo ramo passa por mais uma cladogênese, originando os dois últimos grupos, o primeiro composto pelas seções *Foliosae*, *Phyllodoxys*, *Psoraleoideae*, *Robustae* e *Thamnoxys* e o segundo com mais acessos, formado pelas seções *Holophyllum*, *Polymorphae*, *Robustae*, *Thamnoxys* e por uma espécie de *Ripariae* (*O. sarmentosa*), associada a *O. praetexta*.

A figura 7 representa a árvore filogenética produzida no RaxML-NG, com valores de bootstrap indicado nos ramos. Nesta análise foi indicado *Averrhoa carambola* como grupo externo a priori para a corrida. A primeira cladogênese após a separação do grupo externo origina dois ramos, sendo um deles composto por terminais de *O.* sect. *Hedysaroideae*, *O.* sect. *Polymorphae*, *O.* sect. *Robustae* e *O.* sect. *Thamnoxys* e o outro com todos demais acessos, que passa por uma cladogênese posterior que gera mais dois ramos, um formando o clado composto por terminais de *O.* subg. *Oxalis*, já o outro ramo passa por outra cladogênese, originando um grupo composto por um terminal de *O.* sect. *Robustae* e um terminal de *O.* sect. *Thamnoxys* e um outro ramo com todos os terminais restantes. Este ramo tem uma nova divisão, onde originam-se dois ramos, sendo um deles composto por dois terminais de *O.* sect. *Robustae* e o outro ramo, que se divide novamente, originando um ramo com um único terminal de *O.* sect. *Thamnoxys* e outro com divisões posteriores. Neste ramo mencionado anteriormente, ocorre mais uma cladogênese, formam-se dois novos ramos, um composto por dois terminais de *O.* sect. *Thamnoxys* e o outro que se divide em dois grupos, um com terminais de *O.* sect. *Foliosae*, *O.* sect. *Phyllodoxys*, *O.* sect. *Polymorphae*, *O.* sect. *Psoraleoideae* e *O.* sect. *Thamnoxys*; e um outro ramos composto por acessos de *O.* sect. *Holophyllum*, *O.* sect. *Polymorphae*, *O.* sect. *Ripariae*, *O.* sect. *Robustae* e *O.* sect. *Thamnoxys*.



1.

Figura 7: Árvore de máxima verossimilhança para a matriz combinada nrITS, *trnL-F* e *petA-psbJ*.

4 DISCUSSÃO

A representação gráfica onde são combinados os dados dos três marcadores (figura 6) indica que a maioria das seções de *O.* subg. *Thamnoxys* que tiveram mais de uma amostra analisadas não são monofiléticas. Dentre as seções amostradas representadas por mais de uma amostra, somente *Holophyllum* e *Psoraleoideae* foram recuperadas como monofiléticas na árvore resultante da análise combinada. A seção *Thamnoxys* precisa ser reavaliada e passar por estudos mais aprofundados e que utilizem abordagens combinadas ao estudo molecular, bem como as seções *Robustae* e *Polymorphae*.

Abreu et al. (2012) elaboraram uma análise cladística baseada em dados morfológicos das espécies de *O.* subg. *Thamnoxys* visando testar o monofiletismo da seção *Thamnoxys*. Para isso, analisaram cerca de 2000 amostras de *Oxalis* distribuídas em 28 espécies, das quais 16 spp. pertenciam à seção *Thamnoxys*, duas spp. pertenciam à seção *Robustae*, duas spp. pertenciam à seção *Holophyllum*, duas spp. à seção *Polymorphae* e uma espécie cada das seções *Foliosae*, *Hedysaroideae*, *Phyllodoxys*, *Pleiocarpae* e *Psoraleoideae*; além destas, compuseram o grupo externo as seções *Pseudobulbosae* e *Ionoxalis* (*O.* subg. *Oxalis*), com uma espécie cada. Os pesquisadores construíram uma matriz de dados com 72 caracteres morfológicos e utilizaram o critério de máxima parcimônia para construir um cladograma onde se evidenciava que a seção *Thamnoxys* poderia ser, na verdade, polifilética. Outra conclusão apontada no estudo é que as seções *Robustae* e *Holophyllum* seriam monofiléticas, tendo como grupos irmãos *O. frutescens* L. (*O.* sect. *Thamnoxys*) e *O. rhombo-ovata* A.St.-Hil. (*O.* sect. *Polymorphae*), respectivamente.

Apesar de ter sido realizado com técnicas bastante diferentes das aplicadas no estudo presente e de se valer unicamente de dados morfológicos para sugerir mudanças taxonômicas em um grupo que historicamente é tido com desafiador ou mesmo confuso, o trabalho realizado por Abreu et al. (2012) pode nos conceder pontos importantes para a comparação e elaboração de discussões para nosso estudo.

Em nosso estudo são computadas 31 espécies, das quais as seções *Foliosae*, *Hedysaroideae* e *Phyllodoxys* são representadas por uma espécie cada, as seções *Holophyllum* e *Psoraleoideae* são representadas por duas espécies cada, a seção *Polymorphae* é representada por quatro espécies (cinco terminais), a seção *Robustae* é representada por cinco espécies (seis terminais), a seção *Thamnoxys* é representada por nove espécies (12 terminais) e o grupo externo é composto por sete espécies (sete terminais). Temos como matriz de dados a tabela com as sequências de três marcadores moleculares, totalizando 3157 sítios e

aplicamos a busca de relações evolutivas por meio de estatística bayesiana e máxima verossimilhança.

Diferente do que foi apontado em Abreu et al. (2012), nosso estudo demonstra a ausência de monofiletismo em *Oxalis* subg. *Thamnoxys*, e além disso aponta que a seção *Thamnoxys* muito provavelmente não é monofilética e necessita passar por uma revisão bastante criteriosa em um futuro próximo. Na figura 6, apresentada no item anterior, utilizando os dados dos três marcadores moleculares, fica claro que as espécies atribuídas por Lourteig (1994) à seção *Thamnoxys* encontram-se em clados menores juntamente com espécies de outras seções e não formam um grupo homogêneo entre si. O agrupamento de espécies da seção *Thamnoxys* em um ramo comum somente ocorre no caso da árvore construída unicamente com o marcador *petA-psbJ* e ainda assim possui ramos com probabilidades posteriores bastante baixas.

No caso da seção *Robustae*, percebemos em nosso estudo que o monofiletismo também não pode ser atribuído, já que mesmo na árvore produzida com os dados dos três marcadores não há formação de apenas um clado com todas as espécies amostradas desta seção. São recuperados somente pequenos grupos formados por duas espécies-irmãs, enquanto as demais estão dispostas em outros agrupamentos. Novamente, o único marcador que indica a formação de um grupo conciso contendo os membros de uma única seção é *petA-psbJ*, onde um clado é composto por quatro espécies (*O. cordata* A.St.-Hil., *O. goyazensis* Turcz., *O. grisea* A.St.-Hil. & Naudin var. *matogrossensis* (Fredr.) Lourteig e *O. physocalyx* Zucc. ex Progel). Ainda nessa seção, temos o caso de *O. praetexta* que demonstrou estar mais intimamente relacionada a *O. sarmentosa* (*O.* subg. *Oxalis* sect. *Ripariae*), apesar da classificação de Lourteig (1994) posicioná-la com componente da seção *Robustae* devido a algumas características morfológicas, como folíolos cartáceos, inflorescência umbeliforme e carpelos com sementes únicas, grandes e costadas. No entanto, acreditamos que *O. praetexta* deveria ser reclassificada como componente de *O.* subg. *Oxalis*, provavelmente como parte da seção *Ripariae*, devido à presença de inflorescências do tipo dicásio com ramos alongados, que diferem daquelas observadas em *O.* sect. *Robustae*. Além disso, em *O. praetexta* os carpelos não são setosos internamente, mas glabros (Lourteig 1994) e as pétalas possuem tricomas glandulares, apontados como caracteres importantes na identificação de espécies de *O.* sect. *Ripariae* (Silva, 2018). Também podemos citar que *O. praetexta* é encontrada na região do Segundo Planalto do Paraná, com clima subtropical,

assim como as demais espécies da seção *Ripariae*, comumente encontradas na orla de matas com araucária, diferente das demais espécies da seção *Robustae*, que são encontradas no Cerrado, com clima tropical. Além disso, observamos que em um exemplar sob cultivo na casa de vegetação do departamento de Botânica, ocorreu a formação de uma folha com três folíolos e sem raque, que seria uma característica esperada se ela fosse afim de espécies da seção *Ripariae*.

Vaio et al. (2018) utilizaram uma abordagem integrativa e apresentaram uma filogenia produzida com base nos marcadores nrITS, *trnL-trnL-trnF*, *trnT-trnL* e *petA-psbJ*, além da citometria de fluxo para medir o tamanho dos cromossomos e a posição do centrômero em espécies das seções *Polymorphae*, *Psoraleoideae* e *Thamnoxys*. Os resultados encontrados mostram que há uma maior afinidade de *O. rhombeo-ovata* A.St.-Hil com espécies da seção *Psoraleoideae* do que com espécies da seção *Polymorphae*, constituindo mais uma evidência de que as seções de Lourteig (1994) não são monofiléticas e consolidando a importância de análises baseadas em mais de uma técnica para desvendar a confusa taxonomia do grupo.

A seção *Psoraleoideae*, representada no presente estudo por duas espécies (*O. erosa* Knuth e *O. psoraleoides* Kunth) pode ser considerada monofilética, entretanto, como observado em Vaio (2018) a seção necessita da inclusão de *O. rhombeo-ovata*. As espécies desta seção, de modo geral, possuem morfologias bastante similares, adaptações a ambientes xerofíticos facilmente observáveis, como o indumento denso, e uma ocupação territorial bastante específica, ocorrendo nos vales secos interandinos da Colômbia até a Argentina, na região chaquenha entre o Paraguai e o Brasil, além da Caatinga (*O. psoraleoides* ssp. *insipida*), tendo como única exceção *O. rhombeo-ovata* que não manifesta a característica de indumento denso e ocorre nas matas litorâneas.

A seção *Holophyllum* foi apontada como monofilética por Abreu e colaboradores (2012) e em nossos estudos encontramos dados similares. Os acessos de *Holophyllum* se comportaram como um grupo único em nossas análises, com exceção do marcador isolado *trnL-F*; entretanto, as amostras não foram identificadas a nível específico, logo pode ser precipitado em assumir o monofiletismo desta. As espécies descritas por Lourteig (1994) e demais pesquisadores posteriores possuem uma morfologia bastante particular e ocupam uma porção territorial bastante restrita de Mata Atlântica entre os estados do Rio de Janeiro, o sul da Bahia e o leste de Minas Gerais.

Gardner (2013) buscou investigar a evolução morfológica e a ocupação de diferentes biomas e áreas geográficas em *Oxalis* utilizando dados obtidos a partir das sequências de DNA de cinco marcadores (*trnL-trnL-trnF*, *trnS-trnG*, *trnT-trnL*, *psbJ-petA* e nrITS) em uma amostragem de 196 espécies de *Oxalis*, entre as quais se encontravam representados cerca de 40% de todas as seções citadas em Lourteig (1994, 2000). Com exceção de *Oxalis* subg. *Monoxalis*, e das seções *Foliosae* (*O.* subg. *Thamnoxys*) e *Rhombifolia* (*O.* subg. *Oxalis*).

Através da análise por parcimônia e da estatística bayesiana, Gardner constatou que *O.* subg. *Thamnoxys* compreende três grupos monofiléticos situados em um grado, do qual emerge um grande clado que agrupa espécies de *O.* subg. *Oxalis*. Os três cladogramas encontrados na topologia construída a partir da matriz combinando os cinco marcadores utilizados são referidos pelo pesquisador como Clado 1, formado por *O. dombeii* (pertencente à seção *Thamnoxys*) e *O.* sect. *Hedysaroideae*; o Clado 2, formado por espécies das seções *Holophyllum*, *Psoraleoideae*, *Polymorphae* e *Phyllodoxys*; e o Clado 3, formado por espécies pertencentes às seções *Thamnoxys*, *Robustae* e *Pleiocarpa*.

Ao contrário do afirmado por Abreu e colaboradores (2012), Gardner (2013) aponta para o não monofilatismo de *O.* subg. *Thamnoxys* conforme delimitado por Lourteig (1994). Em nosso estudo, mesmo com uma amostragem menor que a de Gardner (2013), percebemos que o monofilatismo não pode ser creditado a *O.* subg. *Thamnoxys* e nem mesmo para a maioria das seções deste grupo. Entretanto, não obtivemos neste estudo o mesmo arranjo de cladogramas mostrado em Gardner (2003) e sim de um rearranjo bastante distinto daqueles encontrados por este pesquisador, mesmo quando consideramos as diferentes possibilidades com marcadores isolados e combinados.

Na árvore de máxima verossimilhança, podemos notar que os suportes não alcançaram números satisfatórios. De modo geral, não foram recuperadas seções monofiléticas por esta análise, mas seria bastante leviano afirmar ou inferir qualquer relação evolutiva baseando-se nesta última análise citada.

5 CONCLUSÃO

Este estudo produziu 93 sequências de DNA para três marcadores moleculares distintos, referentes a 26 espécies de *Oxalis* subg. *Thamnoxys*. Estes dados serão disponibilizados ao Genbank para dar suporte a estudos futuros.

A delimitação de *Oxalis* subg. *Thamnoxys* apresentada por Lourteig (1994) se mostrou artificial, proveniente de um arranjo morfológico que não foi corroborado pelos dados moleculares produzidos neste estudo. Nossas investigações apontam que mesmo as seções precisarão passar por uma reformulação quanto às suas delimitações.

Dentre as seções examinadas em nossos estudos, somente *Holophyllum* e *Psoraleoideae* demonstraram possuir tendência ao monofiletismo, o que poderia ser suposto dado suas distribuições geográficas restritas, suas afinidades a habitats específicos e suas morfologias bastante homogêneas. Ainda assim, é necessário realizar mais estudos, com amostragens maiores e metodologias complementares para investigar com maior profundidade a história evolutiva desses dois grupos.

A seção *Thamnoxys* se mostrou polifilética em nossos estudos, resultado semelhante ao encontrado por estudos anteriores.

Oxalis praetexta, que é tradicionalmente associada a *O.* sect. *Robustae*, não demonstrou relacionar-se a outros membros desta seção e parece estar mais filogeneticamente próxima de espécies de *O.* sect. *Ripariae*, do subgênero *Oxalis*.

Apesar dos esforços realizados neste estudo, ainda é necessário realizar análises com maior amostragem de *O.* subg. *Thamnoxys*, bem como a diversificação das frentes de estudo, visando produzir um maior volume de dados para realização de análises combinadas.

REFERÊNCIAS

- Abreu, M.C., R. Carvalho e M.F. Sales. 2008. *Oxalis* L. (Oxalidaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 22(2) 399-416.
- Abreu, M.C. de, M.J. da Silva e M.F. de Sales. 2012. Análise cladística de *Oxalis* sect. *Thamnoxys* (Oxalidaceae) baseada em dados morfológicos. *Rodriguésia* 63(4): 755-761.
- Aoki, S., T. Ohi-Toma, P. Li, C. Fu, and J. Murata. 2017. Phylogenetic, cytological and morphological comparisons of *Oxalis* subsect. *Oxalis* (Oxalidaceae) in East Asia. *Phytotaxa*, 324(3), 266-278.
- Bárceñas, R.T., C. Yesson, and J.A. Hawkins. 2011: "Molecular systematics of the Cactaceae." *Cladistics* 27(5) 470-489.
- Bektas, Y., I. Aksu, C. Kaya, E. Bayçelebi, F. Küçük, and D. Turan. 2020. Molecular systematics and phylogeography of the genus *Alburnus* Rafinesque, 1820 (Teleostei, Leuciscidae) in Turkey. *Mitochondrial DNA Part A*, 31(7), 273-284.
- Biomatters. 2005. Geneious - Molecular Biology and NGS Analysis Tools. Available at: <https://www.geneious.com/> [Accessed April 13, 2018].
- Caddah, M. K., J. L. S. MAYER, V. Bittrich, and M.D.C.E.D. AMARAL. 2012. Species limits in the *Kielmeyera coriacea* complex (Calophyllaceae)—a multidisciplinary approach. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 168(1), 101-115.
- Delprete, P.G. 2020. A new revision of *Capirona* (*Rubiaceae*, *Ixoroideae*, *Condamineae*), with a new combination and additional notes on typification of the names involved. *Phytotaxa* 443(1), 101-106.
- Doyle, J.J., and J.L. Doyle. 1991. DNA Isolation from Small Amount of Plant Tissue. *Phytochemical Bulletin* 57: 13–15.
- Doyle, E. D., I. Prates, I. Sampaio, C. Koiffmann, W.A. Silva, A.C. Carnaval, and E.E. Harris. 2020. Molecular phylogenetic inference of the howler monkey radiation (Primates: *Alouatta*). *Primates*, 1-12.
- Fiaschi, P. 2006. Oxalidaceae. Pp. 93-105 In T.B. Cavalcanti (org.) *Flora do Distrito Federal, Brasil*, vol. 5.
- Fiaschi, P. 2012. Two new species of *Oxalis* sect. *Polymorphae* (Oxalidaceae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Kew Bulletin* 67(1) 33-38.
- Fiaschi, P. 2014. Three new species and a revised key to species of *Oxalis* section *Polymorphae* (Oxalidaceae). *Brittonia* 66(2), 134-150.
- Fiaschi, P. 2018. Checklist de Oxalidaceae no Estado do Mato Grosso do Sul (Brasil). *Iheringia série Botânica* 73, 297-300.
- Fiaschi, P., e A.A. Conceição. 2005. Oxalidaceae. In M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd, T.S. Melhem & A.M. Giuliatti (eds.) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*, vol. 4, p. 301-315.

- Fiaschi, P., J.L. Costa-Lima, M.C. de Abreu & T.S. Costa. Oxalis in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12439>>. Acesso em: 11 Jan. 2021
- Fontaneto, D., M. Kaya, E. Herniou, and T.G. Barraclough. 2009. Extreme levels of hidden diversity in microscopic animals (*Rotifera*) revealed by DNA taxonomy. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(1), 182-189.
- Frodin, D.G. 2004. History and concepts of big plant genera. *Taxon* 53: 753–776.
- Gardner, A.G. 2013. Using molecular phylogenetics to unravel morphological shifts, niche transitions, and geographic expansion at two different scales in the plant genus *Oxalis* (Oxalidaceae). Ph.D. Thesis. University of Wisconsin-Madison.
- Gardner, A.G., M. Vaio, M. Guerra & E. Emshwiller. 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(1), 152-164.
- Gurgel, C.F.D., L.P. Soares, J.N. Norris, M.T. Fujii, W.E. Schmidt & S. Fredericq. 2020. Molecular systematics of *Crassiphycus* and *Hydropuntia* (Gracilariales, Rhodophyta) with the description of poorly known taxa in the Western Atlantic Ocean. *European Journal of Phycology*, 1-14.
- Hu, Z., Z. Li, Y. Deng, M. Iwataki, Z. Luo, J. Wang, Y. Sun, Z. Zhao, H. Gu, H.H. Shin & Y.Z. Tang. 2020. Morphology, ultrastructure, and molecular phylogeny of the unarmoured dinoflagellate *Kirithra sigma* sp. nov. (*Ceratoperidiniaceae*, Dinophyceae). *Phycologia*, 59(5), 385-396.
- Jooste, M., L.L. Dreyer, and K.C. Oberlander. 2016. The phylogenetic significance of leaf anatomical traits of southern African *Oxalis*. *BMC Evolutionary Biology* 16(1), 1-19.
- Judd, W.S., C.S. Campbell, E.A. Kellog, P.F. Stevens, and M.J. Donoghue. 2009. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3. ed Artmed. Porto Alegre. 632 p.
- Kumar, Sudhir, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz and K. Tamura. 2018 MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution* 35(6), 1547-1549.
- Labiak, P., J.T. Mickel, and J.G. Hanks. 2015. Molecular phylogeny and character evolution of Anemiaceae (Schizaeales). *Taxon* 64(6), 1141-1158.
- Lima, J.L.C. & M. Alves 2013. Oxalidaceae. Pp. 491-499. In: A.P.N. Prata, M.C.E. Amaral, M.C.V. Farias & M.V. Alves (orgs.). *Flora de Sergipe*, Vol. 1. Gráfica e Editora Triunfo, Aracaju.
- López, A., A.F. Panseri, and E. Urtubey. 2013. Revision of *Oxalis* section *Palmatifoliae* DC. (Oxalidaceae). *Phytotaxa* 138(1), 1-14.
- Lourteig, A. 1983. Oxalidáceas. In: R. Reitz (ed.), *Flora Ilustrada Catarinense*. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, Santa Catarina, Brasil.
- Lourteig, A. 1994. *Oxalis* L. subgênero *Thamnoxys* (Endl.) Reiche emend. Lourt. *Bradea* 7, 1-199.

- Lourteig, A. 2000. *Oxalis* L. subgenera *Monoxalis* (Small) Lourteig, *Oxalis* and *Trifidus* Lourteig. *Bradea* 7, 201-629.
- Machado, T. M., O. Loiseau, M. Paris, A. Weigand, L.M. Versieux, J.R. Stehmann, C. Lexer & N. Salamin. 2020. Systematics of *Vriesea* (Bromeliaceae): phylogenetic relationships based on nuclear gene and partial plastome sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 192(4), 656-674.
- Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2018. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.51 <http://www.mesquiteproject.org>
- Miller, M.A., W. Pfeiffer, and T. Schwartz. (2010) "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 - 8.
- Myers, N., R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A.B. da Fonseca, and J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403(6772), 853-858.
- NCBI. 2018. National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2017 Apr 06]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Accessed April 13, 2018].
- Oberlander, K.C., L.L. Dreyer, D.U. Bellstedt, and G. Reeves. 2004. Systematic Relationships in Southern African *Oxalis* L. (Oxalidaceae): Congruence between Palynological and Plastid trnL-F Evidence. *Taxon* 53(4), 977-985.
- Oberlander, K.C., E. Emshwiller, D.U. Bellstedt, and L.L. Dreyer. 2009. A model of bulb evolution in the eudicot genus *Oxalis* (Oxalidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51(1), 54-63.
- Oberlander, K.C., L.L. Dreyer & F. Roets. 2010. New primers for single-copy nuclear-encoded chloroplast-expressed glutamine synthetase (ncpGS) in Oxalidaceae. *American Journal of Botany*, 97(12), 146-148.
- Oberlander, K.C., L.L. Dreyer, and D.U. Bellstedt. 2011. Molecular phylogenetics and origins of Southern African *Oxalis*. *Taxon* 60: 1667-1677.
- Quah, E.S., S. Anuar, L.L. Grismer, JR.P.L. Wood JR & S.A. Mohd Nor. 2020. Systematics and natural history of mountain reed snakes (genus *Macrocalamus*; *Calamariinae*). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 188(4), 1236-1276.
- Rambaut, A. 2018. FigTree v1. 4.3. Mol. Evol. phylogenetics Epidemiol.
- Ronquist, F., and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rogers, D.C., & A. Aguilar. 2020. Molecular evaluation of the fairy shrimp family *Branchinectidae* (Crustacea: Anostraca) supports peripatric Speciation and Complex Divergence Patterns. *Zoological studies*, 59.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.

- Silva, A.N. 2018. Redelimitação morfológica e revisão Taxonômica de *Oxalis* sect. *Ripariae* Lourteig (Oxalidaceae). Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina.
- Sober, E. 1991. *Reconstructing the past: parsimony, evolution, and inference*. MIT press.
- Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*. 22:2688–2690.
- Stevens, P.F. 2018. Angiosperm phylogeny website. 2017.<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Stevens, P. F. 2021. Angiosperm Phylogeny Website. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sunderland: Sinauer Associates. Available at: <http://paup.phylosolutions.com/> [Accessed April 13, 2018].
- Sytsma, K.J., J. Morawetz, J.C. Pires, M. Nepokroeff, E. Conti, M. Zjhra, J.C. Hall, and M.W. Chase. 2002. Urticalean rosids: circumscription, rosid ancestry, and phylogenetics based on *rbcL*, *trnL-F*, and *ndhF* sequences. *American Journal of Botany* 89: 1531–1546.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, and J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Thiers, B. 2020. [continuously updated]. Index Herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff. New York Botanical Garden's Virtual Herbarium. <http://sweetgum.nybg.org/ih/> (last accessed 17 December 2020)
- Vaio, M., A. Gardner, E. Emshwiller, and M. Guerra. 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., A. Gardner, P. Speranza, E. Emshwiller and M. Guerra. 2016. Phylogenetic and cytogenetic relationships among species of *Oxalis* Section *Articulatae* (Oxalidaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 302(9), 1253-1265.
- Vaio, M., J. Nascimento, S. Mendes, A. Ibiapino, L.P. Felix, P. Fiaschi and M. Guerra. 2018. Multiple karyotype changes distinguish two closely related species of *Oxalis* (*O. psoraleoides* Kunth and *O. rhombeo-ovata* A.St.-Hil.) and suggest an artificial grouping of section *Polymorphae* (Oxalidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 188(3), 269-280.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Yahr, R., C.L. Schoch, & B.T. Dentinger. 2016. Scaling up discovery of hidden diversity in fungi: impacts of barcoding approaches. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1702), 20150336.

