

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Departamento de Genética

20930

Instituto de Biociências

Rubrica

Nº. Série

Nº. Opaco

Editor

Nº. Chamada

Cód. Barra

**Caracterização populacional de onze espécies de *Passiflora* L.
(Passifloraceae) através do marcador molecular ITS**

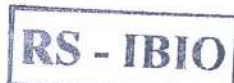
Digit.

Geraldo Mäder

Orientadora: Dr^a Loreta Brandão de Freitas
Co-orientadora Aline P. Lorenz Lemke

Trabalho apresentado como requisito para
obtenção do grau de Bacharel no Curso de
Ciências Biológicas, Ênfase Molecular,
Celular e Funcional.

Porto Alegre, junho de 2005



AGRADECIMENTOS

Essê trabalho marca o fim dos meus quatro anos de graduação, fica difícil dizer o nome de todas as pessoas que me ajudaram nesse período, entretanto não posso deixar de agradecer a algumas delas:

A minha orientadora Loreta B. de Freitas, pela atenção em tirar minhas dúvidas e por acreditar em mim e no meu trabalho desde o início.

A Aline P. Lorenz Lemke, pela dedicação nos ensinamentos desde técnicas de laboratório até a análise dos resultados, além de fotos e dicas fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório pela amizade no dia-dia: Aline, Carlos André, Cláudia, Clênio, Dana, Fran, Jéferson, Joana, Laci, Lúcia, Pakisa, Pati, Priscilla, e Valéria.

Ao professor Francisco M. Salzano, pelo exemplo de profissional a ser seguido.

A minha mãe por ter que me agüentar na frente do computador quase 24 horas por dia nesses últimos meses e a família em geral. Aos colegas de graduação e do futebol pelos momentos de descontração durante a composição deste trabalho. A Juli, que foi neste ano muito importante para mim, e tenho certeza continuará me fazendo muito feliz. A Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino gratuito e de qualidade e ao apoio financeiro da CNPq/PIBIC.

SUMÁRIO

1. Introdução

1.1 A família Passifloraceae e o gênero <i>Passiflora</i> L.	5
1.2 Morfologia e ecologia	5
1.3 Modelos de especiação	7
1.4 Filogenia do gênero <i>Passiflora</i> L.	8
1.5 Filogeografia	8
1.6 Os marcadores moleculares ITS1 e ITS2	9

2. Objetivos 11

3. Material e Métodos

3.1 Coleta	12
3.2 Extração do DNA	24
3.3 Amplificação das seqüências	25
3.4 Purificação dos produtos de PCR com PEG	27
3.5 Seqüenciamento automático	27
3.6 Análise das seqüências de DNA	28

4. Resultados

4.1 Características das seqüências	30
4.2 Variabilidade intraespecífica	30
4.3 Dinâmica populacional	42
4.4 Relacionamento entre as seqüências	42

5. Discussão

5.1 Variabilidade em ITS	54
5.2 Variação no gene 5.8 S	56
5.3 Estruturação das populações	56
5.4 <i>Passiflora foetida</i> L. e <i>Passiflora tricuspis</i> Mast., dois casos especiais	58
5.5 Dinâmica Populacional	59

6. Referências

60

1. INTRODUÇÃO

1.1 A família Passifloraceae e o gênero *Passiflora* L.

A família Passifloraceae pertence à ordem Malpighiales (APG II, 2003) e distribui-se principalmente por regiões tropicais nas Américas, África e Ásia. Esta família possui mais de 600 espécies distribuídas em 18 gêneros (Judd *et al.*, 1999), dos quais quatro ocorrem no Brasil: *Passiflora*, *Dilkea*, *Mitostemma* e *Tetrastylis*. A família Passifloraceae caracteriza-se por alguns marcadores morfológicos como: filotaxia alterna, nós trilacunares, estigmas secos, gineceu tricarpelar e placentação parietal (Milward-de-Azevedo & Baumgratz, 2004).

O gênero *Passiflora* L. é o mais representativo da família, com pelo menos 523 espécies (Feuillet & MacDougal, 2003), sendo que boa parte delas são naturais da região neotropical. A descoberta do gênero ocorreu durante a colonização da América, e a denominação de *Passiflora* (flor da paixão) foi dada por católicos que relacionaram as estruturas florais com alguns instrumentos da paixão de Cristo (Cervi, 1997). A grande maioria das espécies de *Passiflora* são lianas herbáceas, porém existem algumas exceções, árvores e arbustos, causadoras de controvérsias quanto à classificação taxonômica (Vecchia, 2001).

1.2 Morfologia e ecologia

Alguns representantes do gênero *Passiflora* são conhecidos pelo alto grau de heterofilia, podendo ocorrer folhas de lâminas inteiras até pentalobadas em uma mesma espécie (Figura 1). Essas plantas são caracterizadas por gavinhas axilares e nectários extraflorais peciolares ou oclares. As estípulas, de variadas formas, representam um elemento importante na diferenciação das espécies (MacDougal, 1994). As flores, comumente hermafroditas e solitárias, apresentam coloração desde branca, até vermelha e púrpura (Figura

2). As dimensões florais variam bastante no gênero, num intervalo de 5 mm (*P. suberosa* L.) a 95 cm (*P. macrophila* L.) (Ulmer & MacDougal, 2004).

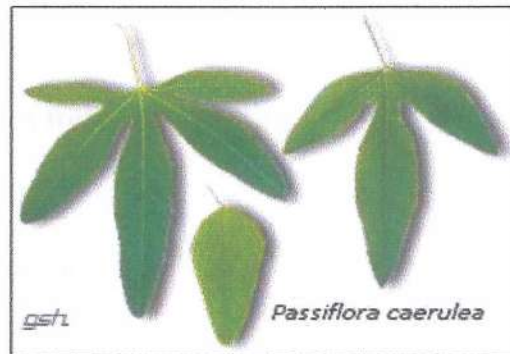


Figura 1 - Heterofilia em *P. caerulea* L.



Figura 2 – Diferentes padrões de coloração em espécies de *Passiflora*.

Outra característica floral importante é a presença de uma corona de filamentos, cujas variações morfológicas constituem um caráter taxonômico importante (Judd *et al.* 1999). Os frutos, conhecidos como maracujás, nome de origem tupi-guarani que significa fruta de sugar (Giavina-Bianchi *et al.* 1997), geralmente são bagas e raramente cápsulas (*P. capsularis* L.) (Deginani, 2001). Algumas espécies têm grande importância econômica por possuírem frutos comestíveis, propriedades medicinais e serem admiradas como plantas ornamentais.

A grande diversidade nas estruturas florais apresentada pelo gênero *Passiflora* pode ser interpretada como resultado da seleção natural, sendo os agentes polinizadores um dos fatores seletivos (Koschnitzke 1993). O sistema reprodutivo preferencial é a fecundação cruzada. A autofecundação não é um processo eficiente, pois mesmo quando ocorre a formação de frutos o número de sementes é bastante reduzido (Suassuna *et al.* 2002). Várias classes de animais servem como agentes polinizadores, mas em geral a melitofilia (abelhas de

grande porte) é a síndrome floral predominante; também podem ocorrer, em um número menor de espécies, as síndromes da ornitofilia (beija-flores), quiropterofilia (morcegos) e esfingofilia (mariposas) (Koschnitzke 1993; Varassin *et al.* 2001). A dispersão das sementes é frequentemente feita por aves, morcegos, ou até mesmo pequenos mamíferos que são atraídos pela coloração e pelo cheiro dos frutos.

1.3 Modelos de especiação

É muito difícil se chegar a um conceito de espécie consenso em plantas porque, quanto ao isolamento reprodutivo, o nível de infertilidade nos cruzamentos entre diferentes grupos é bastante variável (desde 0 até 100%). Além disso, diferentes genes podem apresentar diferentes padrões de coalescência, o que dificulta o reconhecimento das espécies através do critério de descendência.

No modelo de especiação alopátrico, as populações começam a se diferenciar quando o fluxo gênico é interrompido, seja por barreiras ambientais, ou até mesmo pela própria distância geográfica entre as populações. Sem o fluxo gênico, as populações expostas à seleção divergente evoluem independentemente, podendo ocasionar uma eventual formação de barreiras reprodutivas. Porém, a divergência genética não é resultado direto da separação geográfica, e sim de mecanismos transformantes como o fluxo gênico em si e a seleção natural (Judd *et al.*, 1999). Se a seleção favorece diferentes alelos em duas populações adjacentes, padrões distintos nas frequências alélicas são estabelecidos. Quando a seleção é suficientemente forte, sobre locos responsáveis pelo o isolamento reprodutivo, as populações podem se diferenciar em espécies isoladas reprodutivamente (Lorenz, 2002).

A especiação simpátrica ocorre quando duas ou mais populações coexistem em um mesmo território sem entrecruzarem-se. Para isso é necessário que modificações genéticas ou ecológicas impeçam estes cruzamentos. Alterações nos períodos de floração e modificações na estrutura floral podem levar ao isolamento reprodutivo entre populações de plantas.

1.4 Filogenia do gênero *Passiflora* L.

Segundo Killip (1938), o gênero *Passiflora* divide-se em 22 subgêneros. Porém, a sistemática clássica, baseada em aspectos morfológicos, devido à grande complexidade das estruturas florais e vegetativas, nem sempre demonstra as relações filogenéticas mais apropriadas. Estudos mais recentes, aliando aspectos evolutivos aos marcadores morfológicos, têm sugerido a redução para apenas quatro subgêneros: *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora* (Feuillet & MacDougal, 2003). Diversos estudos com marcadores moleculares têm sido desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, objetivando o esclarecimento das relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Passiflora*. Muschner *et al.* (2003) analisaram os marcadores ITS, *trnL-trnF*, e *rps4* para 63 espécies, de 13 subgêneros, utilizando diversos métodos de análise filogenética (“neighbor-joining” parcimônia, e máxima verossimilhança). Neste estudo, foi verificada a evidente separação entre as espécies dos subgêneros *Decaloba*, *Astrophea* e *Passiflora*, em concordância com a taxonomia morfológica dos grupos proposta por Feuillet & MacDougal (2003). Além disso, a separação dos subgêneros *Decaloba* e *Passiflora* é amplamente sustentada por caracteres morfológicos, especialmente no que se refere ao tamanho da flor.

1.5 Filogeografia

A filogeografia é o campo de estudo relativo à distribuição geográfica das linhagens genealógicas, onde tempo e espaço são os eixos principais. Muitas espécies com distribuição geográfica ampla podem ser compostas por populações cujos membros ocupam diferentes ramos de uma árvore filogenética intraespecífica. Quanto maior o tempo desde o isolamento geográfico, mais o grau de diferenciação entre grupos genealógicos tende a aumentar. Estudos

que não apresentam coerência entre o relacionamento genético e o padrão geográfico podem revelar a recente história evolutiva da espécie analisada ou a presença de eventos de dispersão e fluxo gênico a longas distâncias. Por outro lado, espécies com grupos monofiléticos bastante distintos geralmente experimentaram longos períodos de barreira ao fluxo gênico (Koehler-Santos, 2005). Análises filogeográficas propiciam uma nova percepção do papel do fluxo gênico na estruturação de populações vegetais.

Muitos estudos baseiam-se na variabilidade dos genomas de organelas. Porém, estes genomas geralmente são mais conservados quando comparados ao genoma nuclear. Além disso, eles não apresentam recombinação, pois são herdados de maneira uniparental (Hare, 2001). Desta forma, espera-se que a estrutura genética do genoma nuclear (herdado biparentalmente) seja mais influenciada por fatores históricos como o fluxo gênico no passado, eventos geológicos e mudanças climáticas, desta forma sofrendo maior ação de fatores seletivos (Avice *et al.*, 1987; Schaal *et al.*, 1998).

1.6 Os marcadores moleculares ITS1 e ITS2

Os marcadores moleculares são ferramentas de grande valia quando se deseja analisar relações filogenéticas entre táxons ou populações. Para isso, a escolha dos marcadores utilizados deve ser adequada aos objetivos do trabalho a ser realizado. Em trabalhos que utilizam a técnica de seqüenciamento, a região do DNA a ser analisada deve variar de acordo com o nível taxonômico que está sendo considerado (Lorenz, 2002). Em estudos onde se deseja comparar níveis taxonômicos elevados, os marcadores moleculares devem ser seqüências correspondentes a regiões codificadoras, ou seja, regiões bastante conservadas (Rahmanzadeh *et al.*, 2005). Nas regiões não codificadoras, por sofrerem baixa pressão seletiva, as seqüências tendem a possuir maior variabilidade, isso permite que sejam utilizadas até mesmo em estudos intraespecíficos (Kropf *et al.*, 2002).

O DNA ribossomal nuclear (nrDNA) de plantas superiores apresenta centenas a milhares de cópias (ou parálogos) em *tandem* em uma ou mais regiões cromossômicas e geralmente é bastante conservado, exercendo uma função essencial para a manutenção da célula na tradução do RNA em proteínas. Os genes que formam as subunidades 18 S, 5,8 S e 26 S dos ribossomos estão separados no DNA por duas regiões espaçadoras que são transcritas junto com o gene, porém não incorporadas ao transcrito maduro (Koehler-Santos, 2005). Estas regiões são conhecidas como *Internal Transcribed Spacers* (ITSs), mais precisamente ITS1 e ITS2 (Figura 3).

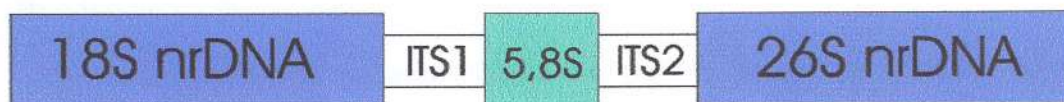


Figura 3 – Organização da região ITS.

Mutações nas regiões ITS são individualmente homogeneizadas através de evolução em concerto, na qual *crossing-over* desigual e conversão gênica são os principais mecanismos envolvidos. O modo e o tempo da evolução em concerto do nrDNA varia muito entre diferentes grupos de plantas e, por isto, os espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal (ITS) podem apresentar variação interespecífica, interpopulacional e até intraindividual (Mayer & Soltis 1999). Altos graus de variabilidade são verificados quando o processo de homogeneização não é suficientemente rápido nas diferentes cópias, devido à hibridação recente, às altas taxas de mutação, à formação de pseudogenes, ao grande número de *loci*, à presença em cromossomos não homólogos, ou à ausência de recombinação sexual (Zhang & Sang 1999). Quando as seqüências de ITS não estão bem homogeneizadas, o seqüenciamento pode revelar um padrão de heterozigose, sinal de que, em uma mesma posição na seqüência, os parálogos possuem diferentes nucleotídeos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho, como parte de um programa de investigação do gênero *Passiflora*, é contribuir para o entendimento da biologia e evolução das passifloras através de análises de sua estrutura molecular.

Objetivos específicos:

-determinar o grau de variabilidade intraespecífica do marcador ribossomal nuclear ITS nas diferentes espécies analisadas;

-verificar a presença ou ausência de estruturação geográfica entre as populações estudadas;

-auxiliar na determinação da filogenia molecular do gênero *Passiflora* a partir do estudo de populações dentro dos diferentes clados;

-compreender a evolução do marcador ITS em espécies do gênero *Passiflora*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta

O material analisado foi obtido através de coletas em campo. Foram coletadas folhas jovens de forma a não danificar os indivíduos amostrados. Estas folhas foram armazenadas em sílica gel para secagem e posterior extração do DNA. Para a análise da estrutura genética das populações das diferentes espécies de *Passiflora* foi feita a identificação do local de coleta através de coordenadas geográficas, usando o sistema de posicionamento global (GPS).

Para este trabalho, foi coletado material de diversas regiões do Brasil, totalizando 125 plantas das 11 espécies analisadas*: *P. capsularis* (Tabela 1, Figura 4), *P. cincinnata* Mast. (Tabela 2, Figura 5), *P. edulis* Sims (Tabela 3, Figura 6), *P. eichleriana* Mast. (Tabela 4, Figura 7), *P. foetida* L. (Tabela 5, Figura 8), *P. haematostigma* Mast. (Tabela 6, Figura 9), *P. morifolia* Mast. (Tabela 7, Figura 10), *P. organensis* Gardner (Tabela 8, Figura 11), *P. sidaefolia* M. Roem. (Tabela 9, Figura 12), *P. tricuspis* Mast. (Tabela 10, Figura 13), *P. urubiciensis* Cervi (Tabela 11, Figura 14).

* *P. capsularis*, *P. morifolia*, *P. organensis* e *P. tricuspis*: subgênero *Decaloba*; *P. cincinnata*, *P. edulis*, *P. eichleriana*, *P. foetida*, *P. sidaefolia* e *P. urubiciensis*: subgênero *Passiflora*; *P. haematostigma*: subgênero *Astrophea*.

Tabela 1. Locais de coleta de *Passiflora capsularis*.

Indivíduos	Origem	Latitude	Longitude
CAPS 03	Quatro Barras/PR	25° 20' 16" S	48° 54' 49" W
CAPS 05	Antonio Prado/RS	28° 51' 00" S	51° 16' 60" W
CAPS 07	Laguna/SC	28° 28' 60" S	48° 46' 60" W
CAPS 08	Serra do Pinto/RS	29° 36' 00" S	50° 18' 00" W
CAPS 09	São José dos Pinhais/PR	25° 32' 05" S	49° 12' 23" W
CAPS 11	Derrubadas/RS	27° 15' 00" S	53° 52' 00" W
CAPS 13	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
CAPS 14	José Velho/RS	29° 28' 00" S	50° 40' 00" W
CAPS 15	Mirante/RS	29° 27' 00" S	50° 41' 00" W
CAPS 16	São José dos Pinhais/PR	25° 32' 05" S	49° 12' 23" W
CAPS 17	Munhoz/MG	22° 37' 00" S	46° 22' 00" W
CAPS 18	Caraá/RS	29° 48' 00" S	50° 17' 60" W
CAPS 21	Serra do Pinto/RS	29° 36' 00" S	50° 18' 00" W
CAPS 22	Campo Grande/MS	20° 26' 60" S	54° 37' 00" W
CAPS 23	Timbé do Sul/SC	28° 49' 00" S	49° 51' 00" W
CAPS 24	Belo Horizonte/MG	19° 55' 00" S	43° 55' 60" W
CAPS 25	São Marcos/RS	29° 06' 00" S	51° 00' 00" W
CAPS 26	Foz do Iguaçu/PR	25° 33' 00" S	54° 34' 60" W
CAPS 27	Quatro Barras/PR	25° 20' 16" S	48° 54' 49" W
CAPS 28	Canela/RS	29° 22' 00" S	50° 49' 60" W
CAPS 29	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
CAPS 32	Petrolândia/SC	27° 30' 00" S	49° 44' 00" W
CAPS 35	Belo Horizonte/MG	19° 55' 00" S	43° 55' 60" W
23 indivíduos	18 localidades		



Figura 4 - *P. capsularis*.

Tabela 2. Locais de coleta de *Passiflora cincinnata*.

Indivíduos	Origem	Latitude	Longitude
CINC 01	Jardim/MS	21° 28' 49" S	56° 08' 17" W
CINC 02	Brumadinho/MG	20° 08' 36" S	44° 11' 59" W
CINC 03	Abaíra/BA	13° 14' 59" S	41° 39' 49" W
CINC 04	Casa Nova/BA	09° 09' 43" S	40° 58' 15" W
CINC 06	Petrolina/PE	09° 23' 55" S	40° 30' 03" W
CINC 07	Caetité/BA	14° 07' 36" S	42° 26' 05" W
CINC 08	Brumadinho/MG	20° 08' 36" S	44° 11' 59" W
07 indivíduos	06 localidades		



Figura 5 – *P. cincinnata*.

Tabela 3. Locais de coleta de *Passiflora edulis*.

Indivíduos	Origem	Latitude	Longitude
EDUL 02	Porto Alegre/RS	30° 01'59" S	51° 13'48" W
EDUL 04	Santa Maria/RS	29° 40' 60" S	53° 47' 60" W
EDUL 05	Santa Maria/RS	29° 40' 60" S	53° 47' 60" W
EDUL 06	Portão/RS	29° 42' 06" S	51° 14' 31" W
EDUL 07	Arroio do Sal/RS	29° 33' 05" S	49° 53' 55" W
EDUL 08	Capão Novo/RS	29° 40' 39" S	49° 58' 08" W
EDUL 09	Caraá/RS	29° 48' 00" S	50° 17' 60" W
EDUL 10	Taquara/RS	29° 39' 02" S	50° 46' 50" W
EDUL 12	Petrolândia/SC	27° 30' 00" S	49° 44' 00" W
EDUL 14	BR-116/RS	30° 38' 23" S	51° 33' 24" W
EDUL 15	(Pto1) Camanducaia/MG	22° 41' 41" S	45° 53' 28" W
EDUL 16	(Pto2) Camanducaia/MG	22° 42' 10" S	45° 58' 33" W
12 indivíduos	11 localidades		



Figura 6 – *P. edulis*.

Tabela 4. Locais de coleta de *Passiflora eichleriana*.

Indivíduos	Origem	Latitude	Longitude
EICH 01	Três Cachoeiras/RS	29° 27' 20" S	49° 55' 28" W
EICH 02	Caraá/RS	29° 48' 00" S	50° 17' 60" W
EICH 03	Barra do Ouro/RS	29° 40' 30" S	50° 12' 26" W
EICH 04	(Pto 1) Petrolândia/SC	27° 35' 31" S	49° 44' 15" W
EICH 05	(Pto 1) Petrolândia/SC	27° 35' 31" S	49° 44' 15" W
EICH 06	(Pto 1) Petrolândia/SC	27° 35' 31" S	49° 44' 15" W
EICH 07	(Pto 2) Petrolândia/SC	27° 38' 59" S	49° 45' 36" W
07 indivíduos	05 localidades		



Figura 7 – *P. eichleriana*.

Tabela 5. Locais de coleta de *Passiflora foetida*.

Indivíduos	Origem	Latitude	Longitude
FOET 01	Recife/PE	08° 03' 14" S	34° 52' 52" W
FOET 02	Petrolina/PE	09° 23' 55" S	40° 30' 03" W
FOET 03	Bom Jardim da Serra/SC	28° 20' 13" S	49° 37' 29" W
FOET 04	Lavras do Sul/RS	30° 48' 47" S	53° 53' 42" W
FOET 06	Petrolina/PE	09° 23' 55" S	40° 30' 03" W
FOET 07	João Pessoa/PB	07° 06' 54" S	34° 51' 47" W
FOET 08	(Pto1) São Bento do Sul/SC	26° 12' 29" S	49° 18' 46" W
FOET 09	(Pto2) São Bento do Sul/SC	26° 10' 51" S	49° 14' 43" W
FOET 15	Bonito/MS	21° 07' 60" S	56° 28' 00" W
09 indivíduos	08 localidades		

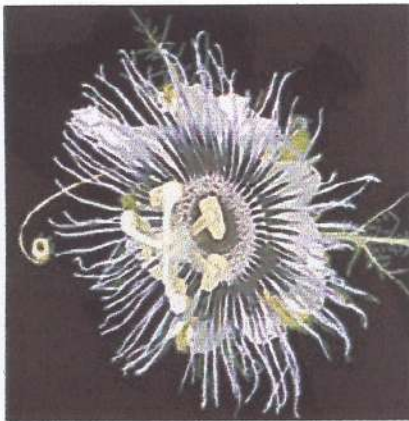


Figura 8 – *P. foetida*.

Tabela 6. Locais de coleta de *Passiflora haematostigma*.

Indivíduos	Origem	Latitude	Longitude
HAEM 01	Guaratuba/PR	25° 52' 58" S	48° 34' 29" W
HAEM 02	Rancho Queimado/SC	27° 40' 60" S	49° 01' 60" W
HAEM 03	Caeté/MG	19° 53' 60" S	43° 40' 00" W
HAEM 04	Delfim Moreira/MG	22° 30' 33" S	45° 16' 48" W
HAEM 05	Belo Horizonte/MG	19° 55' 00" S	43° 55' 60" W
HAEM 06	Serra do Tabuleiro/MG	19° 06' 48" S	43° 35' 06" W
HAEM 07	(Pto1) Catas Altas/MG	20° 06' 09" S	43° 29' 34" W
HAEM 08	(Pto2) Catas Altas/MG	20° 07' 05" S	43° 31' 17" W
HAEM 09	(Pto2) Catas Altas/MG	20° 07' 05" S	43° 31' 17" W
HAEM 10	(Pto3) Catas Altas/MG	20° 06' 48" S	43° 29' 15" W
HAEM 11	(Pto3) Catas Altas/MG	20° 06' 48" S	43° 29' 15" W
HAEM 12	(Pto4) Catas Altas/MG	20° 05' 34" S	43° 29' 56" W
HAEM 13	(Pto1) São Gonçalo do Rio Preto/MG	18° 09' 51" S	43° 19' 17" W
HAEM 14	(Pto2) São Gonçalo do Rio Preto/MG	18° 00' 15" S	43° 23' 27" W
14 indivíduos	12 localidades		



Figura 9 – *P. haematostigma*.

Tabela 7. Locais de coleta de *Passiflora morifolia*.

Indivíduos	Origem	Latitude	Longitude
MORI 01	Porto Alegre/RS	30° 01' 59" S	51° 13' 48" W
MORI 02	Porto Alegre/RS	30° 01' 59" S	51° 13' 48" W
MORI 03	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
MORI 04	Ijuí/RS	28° 23' 16" S	53° 54' 53" W
MORI 05	Ijuí/RS	28° 23' 16" S	53° 54' 53" W
MORI 06	São Paulo/SP	23° 32' 51" S	46° 38' 10" W
MORI 07	Barracão/RS	27° 40' 18" S	51° 27' 38" W
07 indivíduos	05 localidades		



Figura 10 – *P. morifolia*.

Tabela 8. Locais de coleta de *Passiflora organensis*.

Indivíduos	Origem	Latitude	Longitude
ORGA 01	Quatro Barras/PR	25° 20' 16" S	48° 54' 49" W
ORGA 02	Timbé do Sul/SC	28° 49' 00" S	49° 51' 00" W
ORGA 03	Bom Jardim da Serra/SC	28° 20' 13" S	49° 37' 29" W
ORGA 04	Três Cachoeiras/RS	29° 27' 20" S	49° 55' 28" W
ORGA 05	Praia Grande/SC	29° 11' 48" S	49° 57' 01" W
ORGA 06	Munhoz/MG	22° 37' 00" S	46° 22' 00" W
ORGA 07	Munhoz/MG	22° 37' 00" S	46° 22' 00" W
ORGA 08	Caeté/MG	19° 53' 60" S	43° 40' 00" W
ORGA 09	Barra do Ouro/RS	29° 40' 30" S	50° 12' 26" W
ORGA 10	Barra do Ouro/RS	29° 40' 30" S	50° 12' 26" W
ORGA 11	Barra do Ouro/RS	29° 40' 30" S	50° 12' 26" W
ORGA 13	Petrolândia/SC	27° 35' 31" S	49° 44' 15" W
ORGA 14	Petrolândia/SC	27° 35' 31" S	49° 44' 15" W
ORGA 15	Petrolândia/SC	27° 35' 31" S	49° 44' 15" W
ORGA 16	Petrolândia/SC	27° 35' 31" S	49° 44' 15" W
ORGA 17	Petrolândia/SC	27° 35' 31" S	49° 44' 15" W
ORGA 18	Campina Grande do Sul/PR	25° 18' 20" S	49° 03' 19" W
17 indivíduos	10 localidades		



Figura 11 – *P. organensis*.

Tabela 9. Locais de coleta de *Passiflora sidaefolia*.

Indivíduos	Origem	Latitude	Longitude
SIDA 01	Munhoz/MG	22° 37' 00" S	46° 22' 00" W
SIDA 02	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
SIDA 03	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
SIDA 04	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
SIDA 05	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
SIDA 06	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
SIDA 07	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
SIDA 08	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
SIDA 09	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
SIDA 10	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
SIDA 11	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
SIDA 12	Águas de Lindóia/SP	22° 28' 60" S	46° 38' 60" W
12 indivíduos	02 localidades		



Figura 12 – *P. sidaefolia*.

Tabela 10. Locais de coleta de *Passiflora tricuspis*.

Indivíduos	Origem	Latitude	Longitude
TRIC 01	São José do Rio Preto/SP	20° 49' 11" S	49° 22' 46" W
TRIC 02	São Miguel das Missões/RS	28° 33' 46" S	54° 33' 15" W
TRIC 03	São Miguel das Missões/RS	28° 33' 46" S	54° 33' 15" W
TRIC 04	Corumbá/MS	19° 00' 33" S	57° 39' 12" W
TRIC 06	BR-386/RS	28° 49' 58" S	52° 30' 00" W
TRIC 07	BR-386/RS	28° 49' 58" S	52° 30' 00" W
TRIC 08	BR-386/RS	28° 49' 58" S	52° 30' 00" W
TRIC 09	BR-386/RS	28° 49' 58" S	52° 30' 00" W
TRIC 10	BR-386/RS	28° 49' 58" S	52° 30' 00" W
TRIC 11	Pitangui/MG	19° 40' 58" S	44° 53' 25" W
TRIC 14	Bonito/MS	21° 07' 60" S	56° 28' 00" W
11 indivíduos	06 localidades		



Figura 13 – *P. tricuspis*.

Tabela 11. Locais de coleta de *Passiflora urubiciensis*.

Indivíduos	Origem	Latitude	Longitude
URUB 01	(Pto1) Urubici/SC	28° 00' 54" S	49° 35' 30" W
URUB 02	(Pto1) Urubici/SC	28° 00' 54" S	49° 35' 30" W
URUB 04	(Pto2) Urubici/SC	28° 03' 18" S	49° 29' 22" W
URUB 05	(Pto2) Urubici/SC	28° 03' 18" S	49° 29' 22" W
URUB 06	(Pto2) Urubici/SC	28° 03' 18" S	49° 29' 22" W
URUB 07	(Pto3) Urubici/SC	28° 02' 52" S	49° 29' 32" W
06 indivíduos	05 localidades		



Figura 14 – *P. urubiciensis*.

3.2 Extração do DNA

As folhas do material coletado, após secas em sílica gel, foram pulverizadas com nitrogênio líquido em gral e o DNA foi extraído pela técnica de Roy *et al.* (1992), modificada e adaptada para espécies de *Passiflora* e *Petunia* Juss., como será descrito a seguir:

- 20 mg de material pulverizado;
- Adição de 600 µl de tampão de extração (100 mM TRIS-HCl; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% CTAB; 0,2% β-mercaptoetanol; 2% PVP 40), 60 µl de β-mercaptoetanol e 6 µl de Proteinase K (10mg/ml);
- Incubação a 65°C por 30 minutos;
- Emulsão com 600 µl de fenol-clorofórmio (1:1);
- Centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm;
- Recolhimento da fase aquosa e estimativa do seu volume;
- Precipitação do DNA com um volume de isopropanol e 1/10 do volume de acetato de sódio;
- Armazenamento por 24 horas em freezer-18°C;
- Centrifugação por 20 minutos e descarte do sobrenadante;
- Lavagem do "pellet" com 200 µl de etanol 70% e secagem a temperatura ambiente por 20 minutos;
- Eluição do "pellet" em 200 µl de água ultra-pura estéril e 2 µl de RNase (10 mg/ml).

Os produtos de extração foram testados através de eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Para a quantificação, os produtos foram comparados com um DNA padrão (λ DNA, Invitrogen).

3.3 Amplificação das seqüências

Para a amplificação dos espaçadores internos dos genes ribossomais nucleares (ITS) foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) universais, descritos na literatura. As PCRs foram desenvolvidas em termociclador automático MJ Res. Inc., com protocolo padrão adaptado para o marcador (Tabela 12).

A quantificação dos produtos de PCR foi realizada com o marcador de peso molecular "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen). Foram utilizados 4 µl da amostra (produto de PCR) + 1 µl de BFB (com glicerol), e 4 µl do marcador + 1 µl de BFB (com glicerol). As amostras foram submetidas à eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador de luz UV. Para a quantificação do DNA dos produtos de PCR, a banda das amostras foi comparada com as do marcador de peso molecular.

3.4 Purificação dos produtos de PCR com PEG

Os produtos de PCR foram purificados por precipitação dos *primers* e dNTPs não incorporados utilizando Polietilenoglicol (PEG) segundo o protocolo de Dunn & Blattner (1986):

- Adição de igual volume de PEG 20% (p/v) ao produto de PCR e homogeneização;
- Incubação a 37 °C por 30 min;
- Centrifugação a 14000 rpm por 20 min;
- Descarte cuidadoso do sobrenadante;
- Adição de 125 µl de EtOH 80% gelado. Incubação por 1 min e centrifugação por 2 min;
- Descarte do sobrenadante;
- Repetição dos passos 5 e 6, porém agora com etanol absoluto;
- Evaporação do EtOH residual a 70°C por 10 min;
- Ressuspensão do produto de PCR em 15 µl de H₂O pura estéril e incubação à temperatura ambiente por 12 horas.

3.5 Seqüenciamento automático

O seqüenciamento do DNA amplificado por PCR foi realizado em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences), seguindo os protocolos que acompanham o aparelho e o *DYEnamicTM ET terminator sequencing premix kit*, com marcação terminal fluorescente. As condições da reação de seqüenciamento estão detalhadas na Tabela 13. As reações foram preparadas diretamente nas placas destinadas ao seqüenciador.

Tabela 13. Condições das reações de seqüenciamento.

<u>Reação</u>	
<i>DYEnamicTMET terminator sequencing premix</i>	4 µl
Produto de PCR purificado	40 ng
<i>Primer</i>	5 µM
Água estéril	Até completar 10 µl
<i>DYEnamicTMET terminator sequencing premix</i>	4 µl

Condições de amplificação

35 ciclos	{	95 °C por 20 seg.
		50 °C por 15 seg.
		60°C por 1 min

3.6 Análise das seqüências de DNA

As seqüências obtidas foram alinhadas pelo programa Clustal X 1.81 (Thompson *et al.*, 2001) e corrigidas manualmente, quando necessário, com auxílio do programa GeneDoc (Nicholas e Nicholas, 1997). Os sítios variáveis e a diversidade nucleotídica foram analisados com o programa MEGA 2.1 – "Molecular Evolutionary Genetics Analysis" (Kumar *et al.*, 2001). Os tipos de seqüências foram determinados usando o programa PHASE 1.0 (Stephens, Smith & Donnelly, 2001). As relações entre as seqüências foram inferidas pelo método de

"median-joining" ($\epsilon=0$, Bandelt *et al.*, 1999) realizadas pelo programa NETWORK 4.1.0.9 (disponível no sítio: <http://www.fluxus-engineering.com>). Para verificar se houve expansão populacional recente nas espécies estudadas, foram feitas as seguintes análises no programa DNAsp 3.99 (Rozas e Rozas, 2003): "pairwise mismatch distribution" e o cálculo dos índices D de Tajima (Tajima, 1989) e D^* de Fu e Li (Fu e Li, 1993).

Com o objetivo de uma melhor compreensão dos dados obtidos, os resultados deste trabalho foram comparados com os obtidos em outras espécies de *Passiflora* analisadas por nosso grupo de pesquisa, são elas: *P. actinia* Hook. e *P. elegans* Mast. (Lorenz-Lemke *et al.*, 2005); *P. alata* Curtis (Koehler-Santos, 2005; Koehler-Santos *et al.*, submetido); *P. suberosa* L. (Muschner, 1999), *P. misera* Kunth (Longo, 2003), *P. caerulea* e *P. tenuifila* Killip (dados não publicados).

4. RESULTADOS

4.1 Características das seqüências

As seqüências analisadas apresentaram conteúdo de GC (guaninas e citosinas) variando entre 48,7 e 64,4 % (Tabela 14), tendo como média entre as 11 espécies analisadas 59,2 %. O tamanho dos fragmentos de ITS1 variou entre 225 pb (*P. eichleriana*) e 278 pb (*P. organensis*) e em ITS2, 184 pb (*P. sidaefolia*) e 219 pb (*P. edulis*, *P. eichleriana*) (Tabela 14). Como os *primers* utilizados amplificam também a região do gene ribossomal 5.8 S, as características destas seqüências também foram verificadas. O tamanho do gene 5.8 S se manteve constante em todas espécies analisadas, 160 pb. Os sítios heterozigotos foram mais freqüentes nas amostras originárias do Rio Grande do Sul, quando comparadas às de outras localidades ($0,02 > P > 0,01$, teste T para amostras independentes). O subgênero *Decaloba* apresentou fragmentos de ITS maiores ($P < 0,001$) e menor percentual de GC ($P < 0,001$) quando comparado com espécies do subgênero *Passiflora*. A diversidade nucleotídica, assim como o número de sítios heterozigotos, foi numericamente maior no subgênero *Passiflora*, porém essa variação não foi estatisticamente significativa.

4.2 Variabilidade intraespecífica

Entre as espécies analisadas, 10 apresentaram algum grau de variabilidade intraespecífica (exceto *P. urubiciensis*). Nelas foram detectados eventos de inserção/deleção e substituições, sendo que muitas destas foram caracterizadas pela presença de mais de um nucleotídeo na mesma base (sítios heterozigotos) (Tabela 14). Os sítios polimórficos apresentaram-se, em média, com maior freqüência em ITS1 (54,6% de todos os sítios polimórficos analisados). Ao contrário, as espécies *P. capsularis* e *P. eichleriana*

apresentaram maior número de sítios variáveis em ITS2. Nas regiões nucleares, um sítio é classificado como heterozigoto quando mais de um pico se apresenta na mesma posição no cromatograma e, o menor, alcança ao menos 25% do tamanho do pico maior quando ambas as fitas são seqüenciadas (Fuertes-Aguilar & Nieto-Feliner, 2003) (Figura 15). Como já foi dito anteriormente, regiões de seqüências codificadoras são bastante conservadas e por isso não são comumente utilizadas em estudos de níveis taxonômicos baixos. Surpreendentemente, nas espécies *P. capsularis*, *P. foetida* e *P. tricuspis* foram encontrados polimorfismos intraespecíficos na região do gene 5.8 S: o indivíduo CAPS 26 apresentou um sítio heterozigoto na posição 356 e o indivíduo CAPS 27 duas transições (C-T) nos sítios 405 e 406 (Figura 16), quando comparados aos demais da mesma espécie. *P. foetida* e *P. tricuspis* também apresentaram transições C-T, a primeira espécie no sítio 373, e a segunda nos sítios 377 e 407.

Apenas os indivíduos das espécies *P. morifolia* e *P. urubiciensis* foram totalmente homozigotos, enquanto *P. eichleriana*, *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. edulis*, *P. tricuspis*, *P. organensis*, *P. haematostigma*, *P. sidaefolia* e *P. foetida* apresentaram pelo menos um indivíduo com sítios heterozigotos.

Os índices de diversidade nucleotídica intraespecíficos (avaliados com o auxílio do programa Mega, por neighbor-joining a partir de matrizes de distância p e 1000 replicações de *bootstrap*) variaram entre zero (*P. urubiciensis*) e 0,05263 (*P. foetida*) (Tabela 14).

Tabela 14. Principais características das seqüências analisadas.

Espécie	Nº de Individuos	Tamanho do fragmentoITS1	Tamanho do fragmentoITS2	%CG	Sítios polimórficos	Sítios heterozigotos	Diversidade nucleotídica
<i>P. capsularis</i>	23	271	203	48,7	32	3	0,00736
<i>P. cincinnata</i>	07	234	216	64,0	19	3	0,01202
<i>P. edulis</i>	12	227	219	62,8	15	5	0,01040
<i>P. eichleriana</i>	07	225	219	64,3	06	1	0,00400
<i>P. foetida</i>	11	230	214	60,5	92	22	0,05263
<i>P. haematostigma</i>	14	271	208	63,2	33	8	0,01324
<i>P. morifolia</i>	07	275	198	55,0	08	0	0,00400
<i>P. organensis</i>	17	278	198	53,8	21	8	0,00684
<i>P. sidaefolia</i>	12	226	184	62,5	12	10	0,00586
<i>P. tricuspis</i>	11	277	201	52,2	30	5	0,02101
<i>P. urubiciensis</i>	06	226	217	64,4	0	0	0
<i>P. actinia</i> * ¹	32	228	175	66,7	14	8	0,00600
<i>P. elegans</i> * ¹	20	228	175	66,7	4	3	0,00200
<i>P. caerulea</i> * ²	28	217	207	63,0	6	2	0,00077
<i>P. tenuifila</i> * ²	26	215	203	65,9	18	4	0,00914
<i>P. alata</i> * ³	85	232	180	65,0	25	-	0,00439
<i>P. misera</i> * ⁴	35	140	170	54,3	8	0	-
<i>P. suberosa</i> * ⁵	32	150	184	-	0	0	0,00000

*1-Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; *2 - dados não publicados; *3- Koehler-Santos, 2005; *4- Longo, 2003; *5- Muschner, 1999.

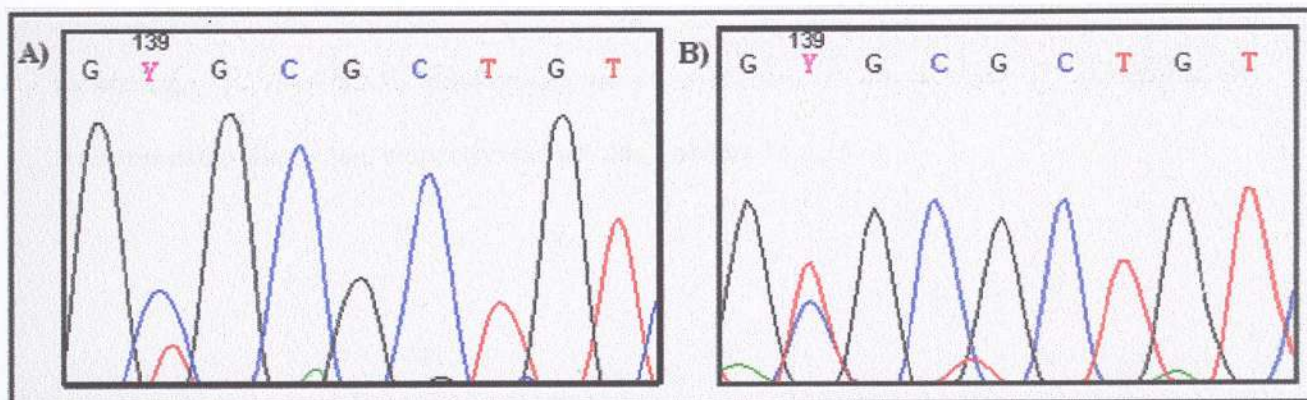


Figura 15 – Fragmento de cromatograma mostrando sítio heterozigoto (Y=C+T). ORGA 01, sítio 139. A) Fita 5' → 3' B) Fita 3' → 5'.

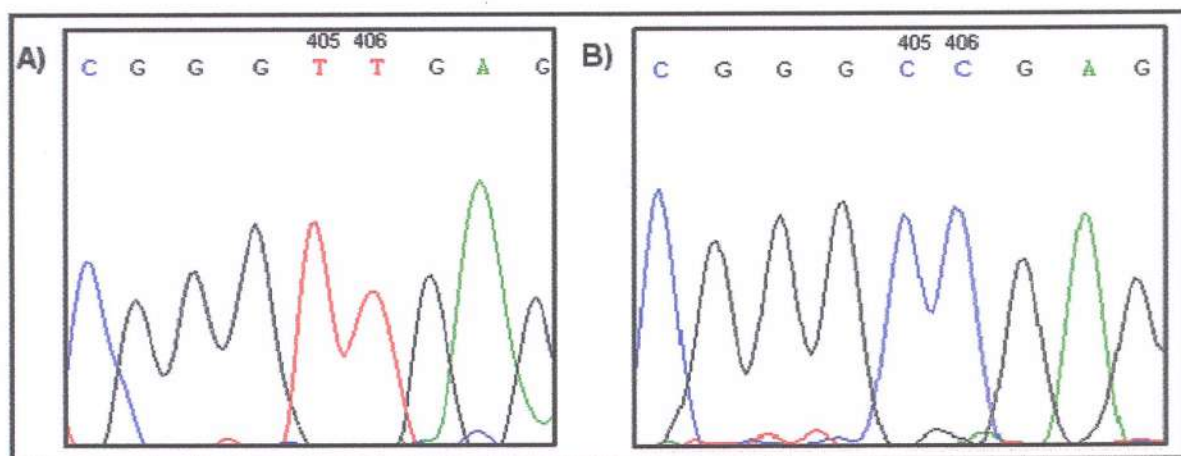


Figura 16 – Fragmento de cromatograma mostrando polimorfismos (transições) em 5.8 S, sítios 405 e 406. A) CAPS 27, B) CAPS 23.

A partir do seqüenciamento, foram identificados para cada espécie diversos “tipos de seqüências” baseados nos polimorfismos encontrados. É importante ressaltar que, neste caso, o termo *haplótipo* não se aplica adequadamente, pois tal denominação é usada para designar um alelo ou um conjunto de alelos que estão presentes em um genoma haplóide ou estão ligados em um único cromossomo nuclear, diferentemente do que acontece na região ITS, como já descrito na seção 1.6. Nas espécies que apresentaram mais de dois sítios heterozigotos, os tipos de seqüências foram inferidos com o auxílio do programa PHASE 1.0 (Stephens, Smith & Donnelly, 2001).

Os tipos de seqüências encontrados para *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. edulis*, *P. eichleriana*, *P. foetida*, *P. haematostigma*, *P. morifolia*, *P. organensis*, *P. sidaefolia*, *P. tricuspis* estão ilustrados, respectivamente, nas Tabelas 15 a 24.

Tabela 15. Tipos de seqüências obtidos em *P. capsularis*.

Tipo de seqüência	Posição Nucleotídica																								Nº observado									
	ITS 1										5.8 S			ITS 2																				
	7	9	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	6		6	6	6	6	6	6	6	6	6
	9	5	2	2	3	3	1	1	2	4	6	5	0	0	5	7	7	3	5	8	8	8	9	0	0	0	2	2	2	2	2	2		
			0	8	6	9	2	6	2	0	0	6	5	6	0	1	2	4	3	0	4	6	1	0	3	6	2	3	5	6	7	8		
S1	G	T	A	C	C	G	T	T	A	C	G	C	C	C	C	C	C	C	A	T	A	T	C	C	A	G	G	C	C	T	C	T	8	
S2	G	7
S3	A	4	
S4	G	.	.	T	1	
S5	.	C	2	
S6	.	C	C	4	
S7	.	C	C	T	2	
S8	.	C	C	T	T	T	2	
S9	.	C	C	C	T	T	4	
S10	.	C	.	T	.	.	C	C	T	T	2	
S11	.	C	C	C	T	T	1	
S12	.	C	.	.	.	A	C	C	T	T	1	
S13	.	C	.	.	T	.	C	T	2	
S14	.	C	.	T	.	.	C	T	T	T	.	A	2	
S15	A	.	G	.	.	A	.	C	.	T	T	.	.	.	G	A	G	C	G	2	
S16	C	2

Tabela 16. Tipos de seqüências obtidos em *P. cincinnata*.

Tipo de seqüência	Posição Nucleotídica																	Nº observado		
	ITS 1											ITS 2								
	4	4	5	7	7	8	8	9	1	1	1	1	4	4	4	4	4		5	57
	3	4	8	6	8	2	4	4	1	3	6	6	3	4	5	8	8	1	1	
								7	2	3	4	4	2	2	0	6	8			
S1			G	G	G	C	G	C	A	C	C	G	T	A	G	A	A	A	G	1
S2								T											A	1
S3														G			C	G		2
S4					C					A				G			C	G		1
S5					C					A				G			C	G	A	1
S6					C						T	A			A	C	C	G		2
S7	C	G							G					G			C	G		2
S8	C	G	T					T	G					G			C	G		2
S9	C	G	T	C	T	G	C	T	G	A	T	A	A	G	A		C	G		1
S10	C	G	T	C	T	G	C	T	G	A	T	A	A	G	A	C	C	G		1

Tabela 17. Tipos de seqüências obtidos em *P. edulis*.

Tipo de seqüência	Posição Nucleotídica															Nº observado
	ITS1									ITS2						
	2	2	3	6	8	9	2	0	1	3	4	4	5	5	5	
	2	7	9	9	2	8	6	3	6	9	0	3	5	6	7	
										9	0	9	9	0	7	
S1	C	C	C	C	C	A	G	G	C	T	C	C	C	C	T	2
S2				T												2
S3			T												G	2
S4	A		T	T											G	2
S5	A															1
S6	A		T												G	1
S7	A		T										T		A	2
S8	A		T				T						T		A	1
S9	A		T	T			T								A	1
S10	A		T			C	T		T				T	T	A	2
S11	A		T			C			T				T	T	A	6
S12		G	T		T		T	A				A			G	2

Tabela 18. Tipos de seqüências obtidos em *P. eichleriana*.

Tipo de seqüência	Posição Nucleotídica								Nº observado
	ITS 1				ITS 2				
	141	143	407	433	548	561			
S1	A	A	T	G	A	C		11	
S2						T		1	
S3	C	G	G	C	T			2	

Tabela 19. Tipos de seqüências obtidos em *P. foetida*.

Tipo de Seqüência	Posição Nucleotídica																									
	ITS1																									
	2	2	3	4	4	4	4	5	5	5	5	6	6	6	7	7	7	7	8	8	9	9	9	9	1	
S1	C	C	C	C	G	T	C	T	C	G	G	A	A	A	-	G	T	T	A	C	T	G	T	G	C	T
S2				T																						
S3			T																							
S4	T	T		T																						T
S5	T	T		T																						T
S6	T			T																						T
S7	T			T																						T
S8				T																						
S9																										
S10					G	T						G		G	C	A	C	C	C		T	C	C	C	G	
S11				T	G	T						G		G	C	C	C	C		C	T	C	C		G	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
	0	0	1	1	2	3	4	5	6	6	6	7	7	8	8	9	9	0	0	0	0	1	2	2	2	2
S1	C	G	T	C	C	T	T	C	T	G	T	T	C	C	T	G	A	-	G	A	A	C	T	C	T	
S2					T			T					T													
S3																										
S4	T											C	C												T	T
S5	T											C	C												T	T
S6	T											C	C												T	T
S7	T			T			C		C	C	C														T	T
S8	T				T			T		C	C														T	T
S9	T				T			T		C	C														T	T
S10		C	A			G				G	C	G		A	C	A	-	T	T	G	C		G	T	C	
S11		C	A			G				G	C	G		A	C	A	-	T	T	G	C		G	T	C	

Tabela 19 (continuação)

Tipo de Seqüência	Posição Nucleotídica																								Nº observado	
	5.8 S		ITS2																							
	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		4
S1	C	T	G																				A	A	G	A
S2																										
S3																										
S4																										
S5																										
S6																										
S7																										
S8																										T
S9																										T
S10	T	C		T	A	C	T	C	C	C	C	C	C	C	G	A	G	G	G	G	G	G	G	T		
S11	T	C		T	A	C	T	C	C	C	C	C	C	C	G	A	G	G	G	G	G	G	T			
	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	4	4	4	4	5	8	1	1	1	5	5	6	6	7	8	8	8	8	8	8	8	6	0	6	6	
S1	C	G		C	T	G	C	C	A	G	A	T	T	A	A	G	T	C	T	C	T	G			6	
S2				T																					1	
S3																									1	
S4						A															C	T			1	
S5						A															C	T			1	
S6						A																			1	
S7	T					A																			1	
S8						A	T	T	T																1	
S9						A	T	T	T																1	
S10		A	A		C					A	T	C	C	G	G						C		A		2	
S11		A	A		C					A	T	C	C	G	G						C		A	A	2	

Tabela 20. Tipos de seqüências obtidos em *P. haematostigma*.

Tipo de seqüência	Posição Nucleotídica																												Nº observado					
	ITS 1														ITS 2																			
	1	1	5	6	8	8	9	9	1	1	1	1	1	1	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		5	5	6	6	6
S1	4	5	8	3	8	9	2	7	0	1	4	5	9	9	0	2	6	3	3	5	5	5	5	5	7	7	8	6	6	0	1	2	2	2
S2																	2	3	3	4	5	6	7	2	7	9	8	9	9	2	0	7	1	
S3																																		1
S4																																		2
S5																																		2
S6																																		1
S7																																		2
S8																																		4
S9																																		1
S10																																		1
S11																																		1
S12																																		1
S13																																		1
S14																																		2
S15																																		1
S16																																		2
S17																																		1
S18																																		1
S19																																		1

Tabela 21. Tipos de seqüências obtidos em *P. morifolia*.

Tipo de seqüência	Posição Nucleotídica									Nº observado
	ITS 1					ITS 2				
	196	220	239	240	259	507	513	583		
S1	G	C	C	C	T	C	G	T	12	
S2	T	T	T	T	C	T	C	A	2	

Tabela 22. Tipos de seqüências obtidos em *P. organensis*.

Tipo de seqüência	Posição Nucleotídica																			ITS 2		Nº observado	
	ITS 1																						
	4	6	7	7	8	8	8	8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2		2
S1	A	G	C	A	T	G	C	A	G	T	T	C	C	T	T	A	C	C	T	C	G	1	
S2	T	.	.	1
S3	.	.	.	G	C	.	.	T	.	C	.	.	.	A	A	G	1	
S4	.	.	.	G	C	.	.	T	.	C	A	.	.	A	A	G	1	
S5	.	.	.	G	C	C	A	T	C	C	A	.	.	A	A	G	2	
S6	.	.	T	G	C	.	.	T	T	A	A	1	
S7	.	.	T	G	C	.	.	T	A	A	3	
S8	.	.	.	G	C	.	.	T	A	A	.	T	T	.	T	A	1
S9	.	.	.	G	C	.	.	T	A	A	.	T	T	.	T	.	1
S10	.	.	T	G	C	.	.	T	A	A	G	.	2
S11	.	.	T	G	C	.	A	T	A	A	G	.	2
S12	.	.	T	G	C	.	A	T	A	A	G	A	2
S13	G	.	T	G	C	.	A	T	A	A	G	.	9
S14	G	.	.	G	C	.	A	T	A	A	G	.	4
S15	G	.	.	G	C	.	A	T	T	.	A	A	G	.	1
S16	G	C	.	G	C	.	A	T	A	A	G	.	1
S17	G	C	.	G	C	.	A	T	A	A	.	T	.	G	.	1	

Tabela 23. Tipos de seqüências obtidos em *P. sidaefolia*.

Tipo de seqüência	Posição Nucleotídica												Nº observado
	ITS1									ITS2			
	31	33	51	53	79	94	100	104	162	394	402	403	
S1	C	A	G	C	C	C	C	C	A	C	A	T	5
S2	T	2
S3	T	A	2
S4	G	T	A	1
S5	T	A	.	.	C	C	2
S6	.	T	T	A	C	.	.	.	1
S7	T	T	.	T	.	.	T	A	1
S8	T	.	T	A	.	T	C	C	5
S9	A	.	.	C	C	1
S10	T	A	.	T	C	C	3
S11	T	A	.	T	.	.	1

Tabela 24. Tipos de seqüências obtidos em *P. tricuspis*.

Tipo de seqüência	Posição Nucleotídica																											Nº observado				
	ITS 1													5,8S	ITS 2																	
	2	7	8	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	
	6	8	9	0	3	3	4	4	4	6	1	2	4	5	7	0	4	0	1	1	1	1	5	5	5	7	8	1	2	3		
				8	1	8	0	1	2	9	7	0	0	2	0	7	1	8	0	1	2	6	0	5	7	2	3	6	5	3		
S1	G	C	A	T	A	T	A	T	A	-	G	A	G	T	G	C	C	T	G	T	-	T	C	T	A	T	C	C	C	C	7	
S2	G	1
S3	G	T	2	
S4	T	2	
S5	T	T	1	
S6	G	T	T	.	1	
S7	T	G	T	T	.	1	
S8	T	T	.	1	
S9	.	G	C	G	C	G	G	C	G	C	A	C	A	C	A	.	T	C	C	C	C	C	T	C	G	C	T	G	T	T	4	
S10	.	G	C	G	C	G	G	C	G	C	A	C	A	.	A	.	.	C	C	C	C	C	T	C	G	C	T	G	T	.	1	
S11	.	G	C	G	C	G	G	C	G	C	A	C	A	C	A	.	.	C	C	C	C	C	T	C	G	C	T	G	T	T	1	

4.3 Dinâmica populacional

As análises da distribuição *mismatch* apresentaram um padrão unimodal apenas para *P. sidaefolia*, o que indica uma provável expansão populacional recente nas amostras dessa espécie (Figura 17).

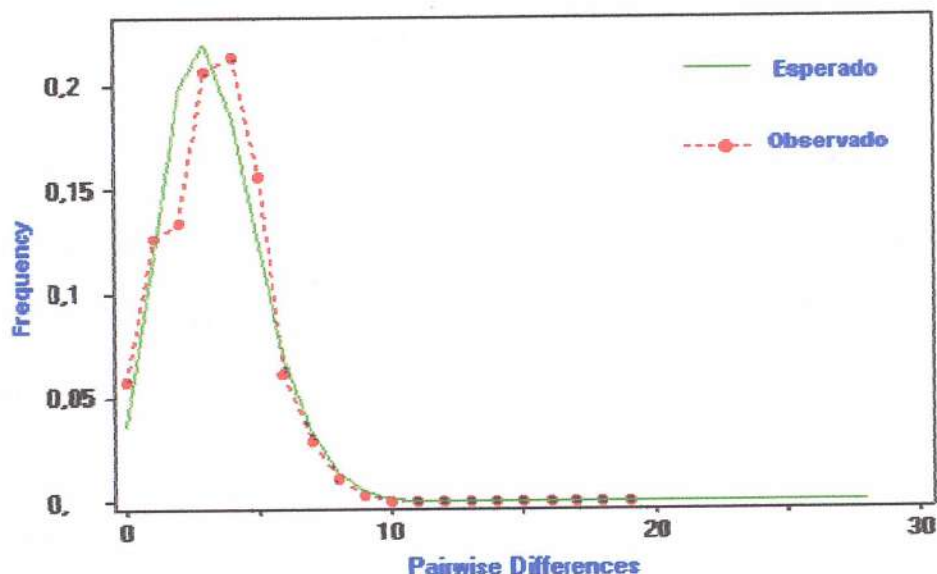


Figura 17 - Distribuição *mismatch* em seqüências de *P. sidaefolia*. O eixo x indica o número de sítios diferentes entre pares de indivíduos comparados, e o eixo y representa suas freqüências. A linha verde indica o esperado (em uma população em expansão), e a vermelha o observado.

Os índices de neutralidade foram significativos apenas em *P. tricuspis*, 2, 56043, $P < 0.01$ (D de Tajima) e 1,68778, $P < 0.02$ (D^* de Fu e Li).

4.4 Relacionamento entre as seqüências

As relações entre as seqüências foram inferidas pelo método de "median-joining" ($\epsilon=0$, Bandelt *et al.*, 1999) no programa NETWORK 4.1.0.9. Para facilitar a compreensão, os códigos S1, S2,... Sn, representados nos *networks*, são os mesmos das Tabelas 15 a 24, da espécie correspondente.

Em *P. cincinata* (Figura 18), *P. capsularis* (Figura 19) e *P. organensis* (Figura 20) foi possível verificar uma tendência de estruturação geográfica, separando geneticamente os indivíduos das diferentes populações. Em *P. haematostigma* (Figura 21) essa estruturação também ocorreu, inclusive separando dois grupos distintos morfologicamente de Minas Gerais. Em *P. morifolia* (Figura 22) uma das amostras do estado de São Paulo (MORI 03) se diferenciou das do Rio Grande do Sul, porém a outra (MORI 06) compartilhou o mesmo tipo de seqüência com os demais. Em *P. sidaefolia* (Figura 23) as amostras são provenientes de localizações muito próximas, dessa forma não é possível analisar padrões de estruturação geográfica, devendo estas pertencer a uma mesma população. As seqüências de *P. tricuspis* (Figura 24) do Rio Grande do Sul e Minas Gerais mostraram-se bastante distintas das do resto do Brasil. *P. eichleriana* (Figura 25) e *P. edulis* (Figura 26) não apresentaram estruturação geográfica. As seqüências *P. foetida*, apesar da alta diversidade, não se relacionaram com a localização geográfica. (Figura 27).

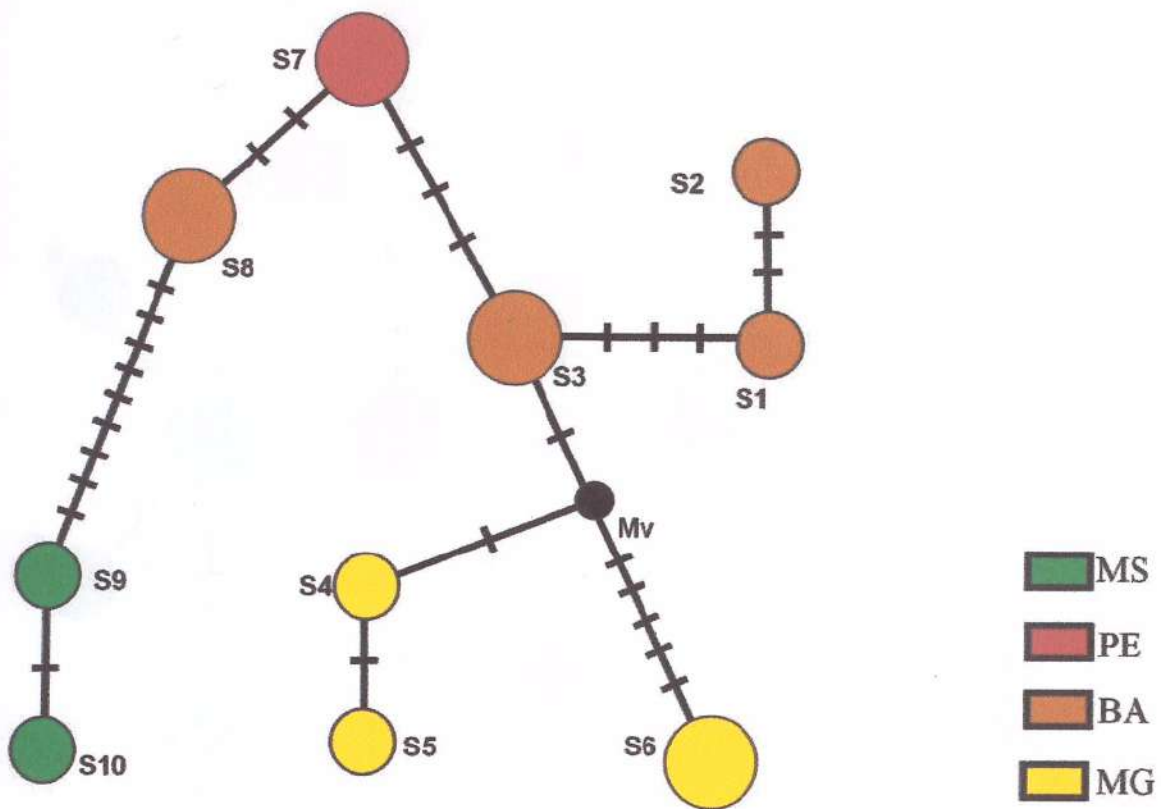


Figura 18 - Median-joining *network* ($\epsilon=0$) a partir das seqüências de ITS de *P. cincinata*. O tamanho dos círculos corresponde à freqüência das seqüências. Os sítios polimórficos que separam as seqüências estão representados pelas linhas transversais. As cores dos círculos indicam a localização geográfica. Mv = vetor médio. Amostras onde foram encontrados os tipos de seqüências – S1: CINC3; S2: CINC3; S3: CINC7; S4: CINC2; S5: CINC2; S6: CINC8; S7: CINC6; S8: CINC4; S9: CINC1; S10: CINC1.

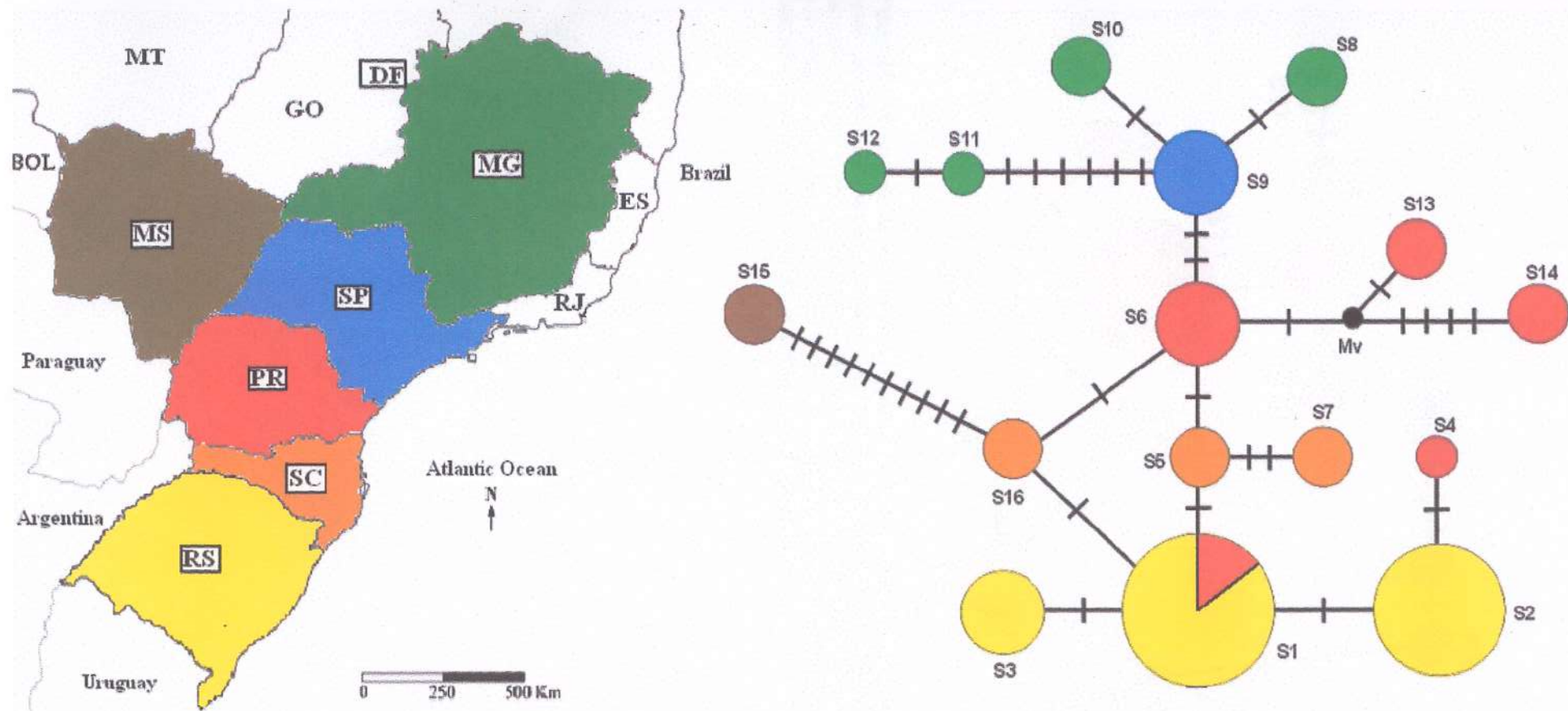


Figura 19 - Median-joining network ($\epsilon=0$) a partir das seqüências de ITS de *P. capsularis*. Amostras onde foram encontrados os tipos de seqüências - S1: CAPS5, CAPS8, CAPS11, CAPS14, CAPS21, CAPS25 e CAPS26; S2: CAPS5, CAPS8, CAPS14, CAPS15, CAPS21, CAPS25 e CAPS26; S3: CAPS18 e CAPS28; S4: CAPS26; S5: CAPS32; S6: CAPS9 e CAPS16; S7: CAPS23; S8: CAPS35; S9: CAPS13 e CAPS29; S10: CAPS24; S11: CAPS17; S12: CAPS17; S13: CAPS3; S14: CAPS27; S15: CAPS 22.

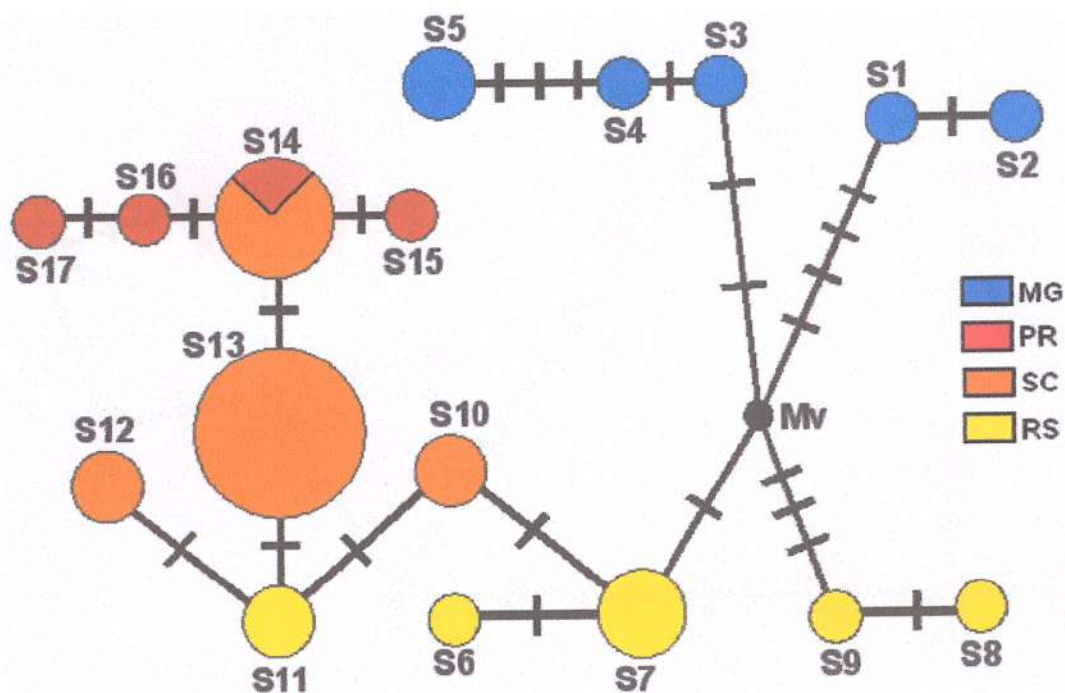


Figura 20 - Median-joining network ($\epsilon=0$) a partir das seqüências de ITS de *P. organensis*. Amostras onde foram encontrados os tipos de seqüências - S1: ORGA8; S2: ORGA8; S3: ORGA6; S4: ORGA6; S5: ORGA7; S6: ORGA11; S7: ORGA9, ORGA10 e ORGA11; S8: ORGA9; S9: ORGA10; S10: ORGA15; S11: ORGA4; S12: ORGA5; S13: ORGA2, ORGA3, ORGA13, ORGA14, ORGA16 e ORGA17; S14: ORGA1, ORGA13, ORGA14 e ORGA16; S15: ORGA1; S16: ORGA18; S17: ORGA18.

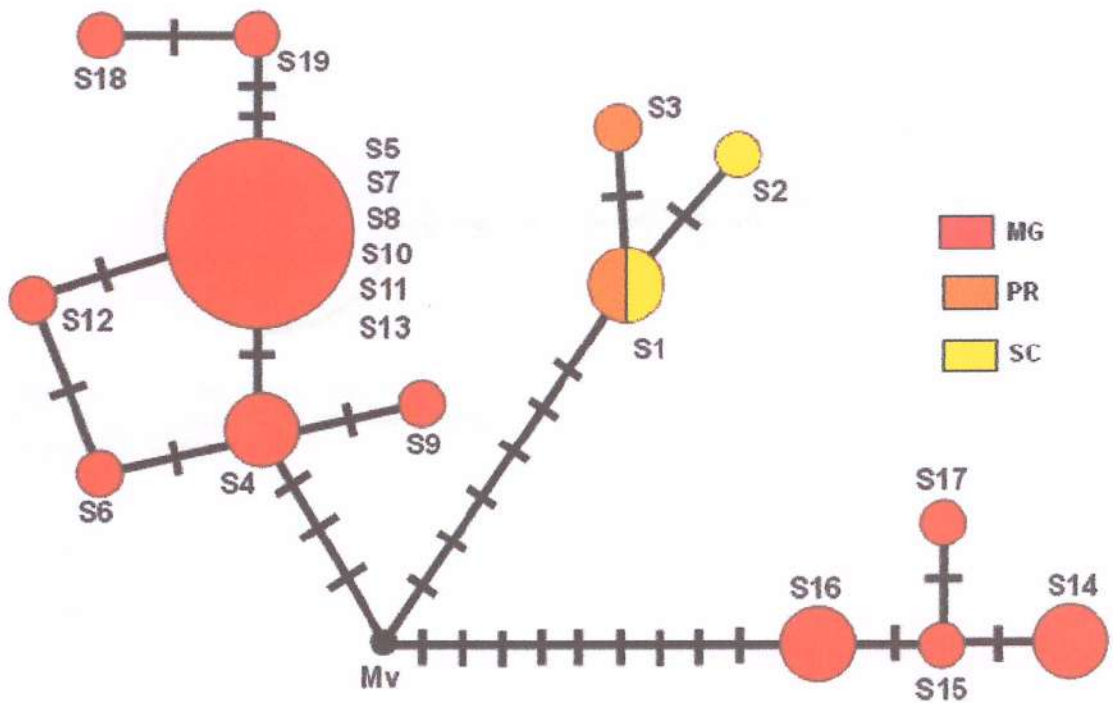


Figura 21 - Median-joining *network* ($\epsilon=0$) a partir das seqüências de ITS de *P. haematostigma*. Os sítios 63, 101, 226 e 612 foram retirados da confecção do *network* por variarem três ou mais vezes. Amostras onde foram encontrados os tipos de seqüências – S1: HAEM1 e HAEM2; S2: HAEM2; S3: HAEM1; S4: HAEM13; S5: HAEM7 e HAEM14; S6: HAEM10; S7: HAEM10 e HAEM12; S8: HAEM3, HAEM7 e HAEM12; S9: HAEM14; S10: HAEM8; S11: HAEM8; S12: HAEM9; S13: HAEM9; S14: HAEM4; S15: HAEM6; S16: HAEM5; S17: HAEM6; S18: HAEM11; S19: HAEM11.

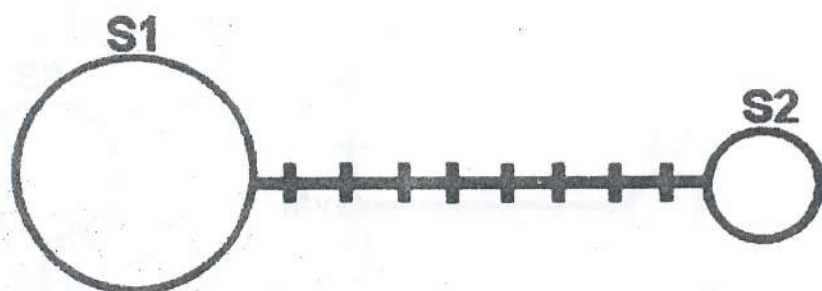


Figura 22 - Median-joining *network* ($\epsilon=0$) a partir das seqüências de ITS de *P. morifolia*. Amostras onde foram encontrados os tipos de seqüências – S1: MOR11, MOR12, MOR14, MOR15, MOR16 e MOR17; S2: MOR13.

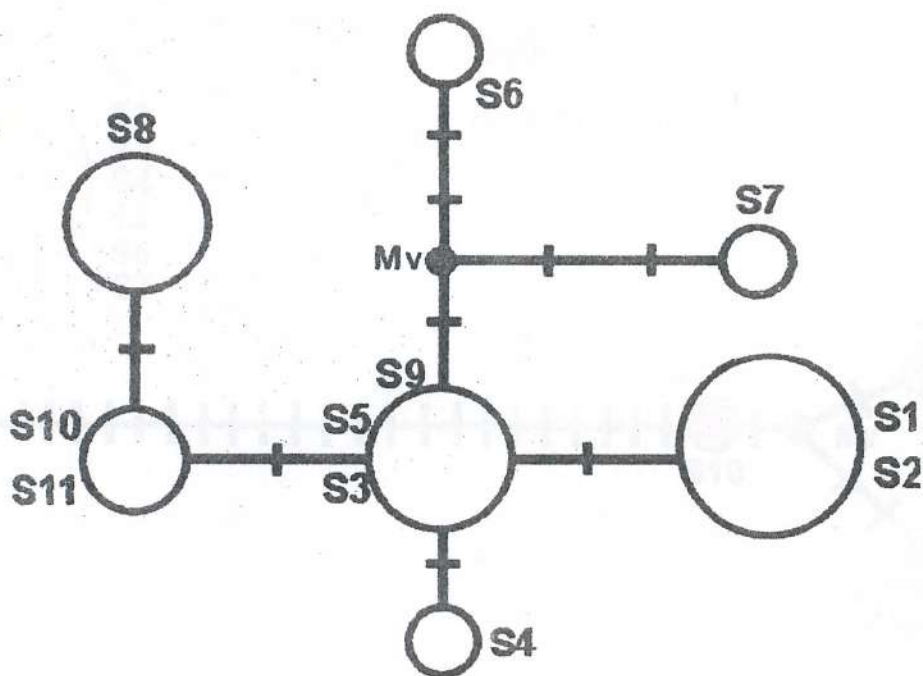


Figura 23 - Median-joining network ($\epsilon=0$) a partir das seqüências de ITS de *P. sidaefolia*. Os sítios 100, 402 e 403 foram retirados da confecção do network por variarem três ou mais vezes. Amostras onde foram encontrados os tipos de seqüências - S1: SIDA7, SIDA9, SIDA10, SIDA11 e SIDA12; S2: SIDA9 e SIDA11; S3: SIDA5 e SIDA10; S4: SIDA8; S5: SIDA5 e SIDA12; S6: SIDA6; S7: SIDA3; S8: SIDA3, SIDA4, SIDA6 e SIDA8; S9: SIDA7; S10: SIDA1 e SIDA2; S11: SIDA1.

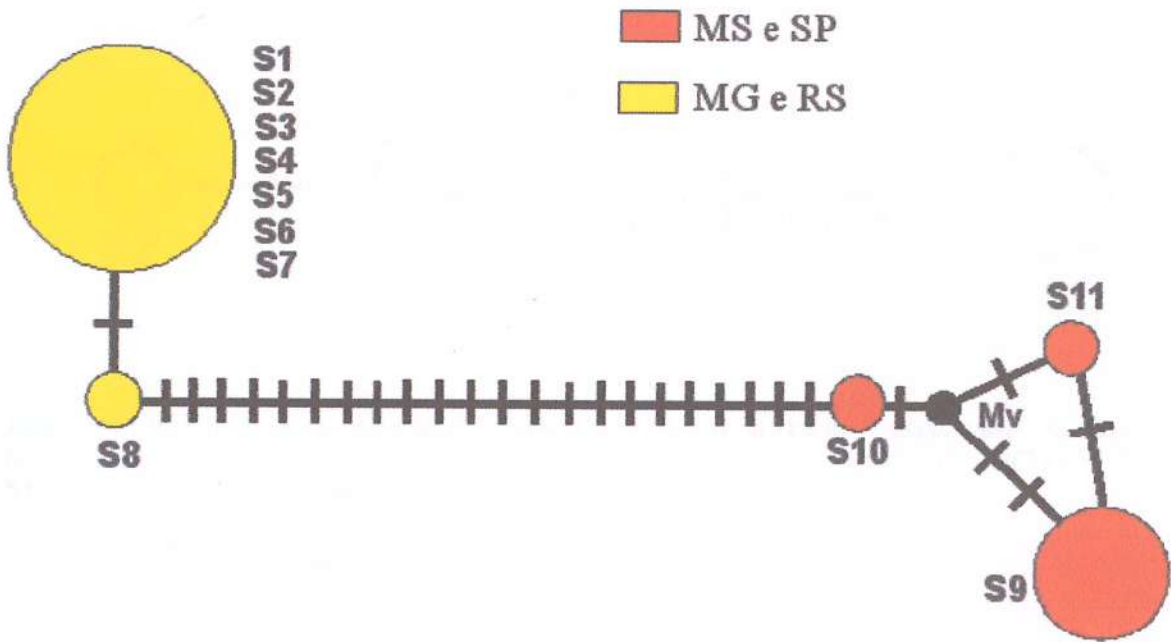


Figura 24 - Median-joining network ($\epsilon=0$) a partir das seqüências de ITS de *P. tricuspid*. Os sítios 26, 138, 407 e 625 foram retirados da confecção do network por variarem três ou mais vezes. Amostras onde foram encontrados os tipos de seqüências – S1: TRIC2, TRIC3, TRIC9 e TRIC11; S2: TRIC3; S3: TRIC6 e TRIC7; S4: TRIC6 e TRIC7; S5: TRIC10; S6: TRIC10; S7: TRIC8; S8: TRIC8; S9: TRIC1 e TRIC 14; S10: TRIC4; S11: TRIC4.

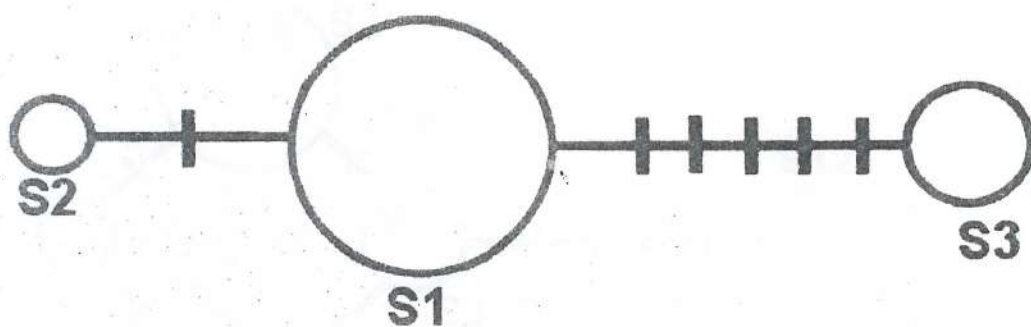


Figura 25 - Median-joining network ($\epsilon=0$) a partir das seqüências de ITS de *P. eichleriana*. Amostras onde foram encontrados os tipos de seqüências - S1: EICH1, EICH2, EICH3, EICH4, EICH5 e EICH6; S2: EICH1; S3: EICH7.

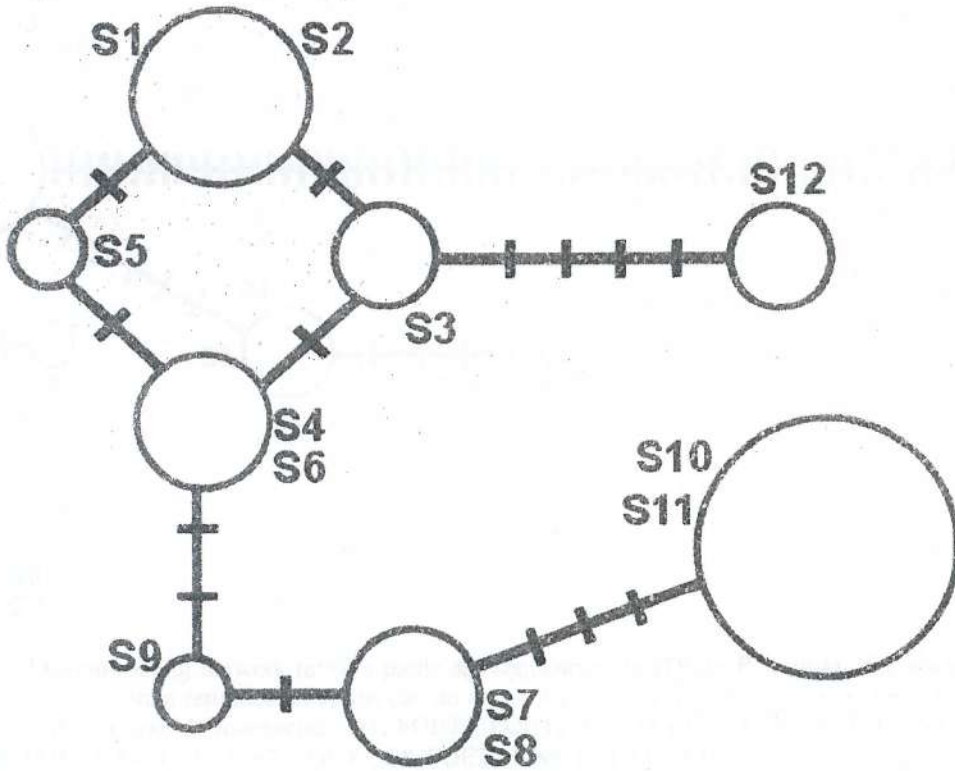


Figura 26 - Median-joining network ($\epsilon=0$) a partir das seqüências de ITS de *P. edulis*. Os sítios 69, 126 e 577 foram retirados da confecção do network por variarem três ou mais vezes. Amostras onde foram encontrados os tipos de seqüências - S1: EDUL12 e EDUL14; S2: EDUL7 e EDUL12; S3: EDUL7 e EDUL8; S4: EDUL8 e EDUL9; S5: EDUL14; S6: EDUL9; S7: EDUL15; S8: EDUL16; S9: EDUL16; S10: EDUL5; S11: EDUL2, EDUL4 e EDUL6; S12: EDUL10.

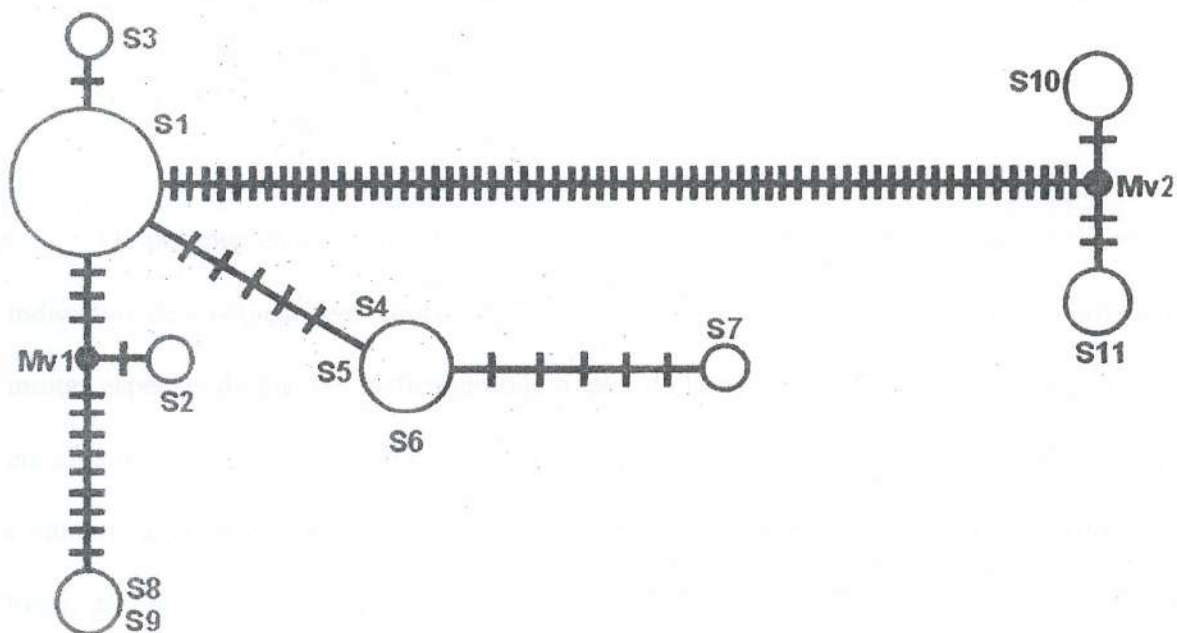


Figura 27 - Median-joining network ($\epsilon=0$) a partir das seqüências de ITS de *P. foetida*. Os sítios 29, 41, 99, 168, 223, 556 e 585 foram retirados da confecção do *network* por variarem três ou mais vezes. Amostras onde foram encontrados os tipos de seqüências – **S1**: FOET1, FOET2, FOET6 e FOET7; **S2**: FOET2; **S3**: FOET7; **S4**: FOET3; **S5**: FOET3; **S6**: FOET4; **S7**: FOET7; **S8**: FOET15; **S9**: FOET15; **S10**: FOET8; **S11**: FOET9.

5. DISCUSSÃO

5.1 Variabilidade em ITS

Os polimorfismos intraindividuais encontrados em ITS (sítios heterozigotos) são um indicativo de evolução em concerto incompleta. Essa variabilidade já foi encontrada em muitas espécies de plantas, indicando que a taxa de homogeneização dessa região não é alta em algumas espécies. O tempo de homogeneização depende número de cópias das seqüências e número de cromossomos onde a região ITS é encontrada, bem como a localização do *loci* ao longo do cromossomo e a taxa de permuta no DNA entre os cromossomos (Quijada *et al.*, 1998). Em posições terminais dos cromossomos, as permutas intercromossômicas são facilitadas, como pode ser visto em *Gossypium* e *Thinopyrum* (Wendel, Schnabel & Seelanan, 1995; Li & Zhang, 2002). Melo & Guerra (2003) mapearam o gene 45S (região que inclui ITS) em diversas espécies de *Passiflora*. Nenhuma das espécies analisadas neste estudo (entre elas *P. capsularis*, *P. cincinnata*, *P. edulis*, *P. haematostigma* e *P. morifolia*.) apresentaram sítios terminais de nrDNA, um indício de que a posição cromossômica pode estar dificultando a homogeneização destas seqüências. O exemplo mais ilustrativo desta situação seria *P. foetida*, que possui seis sítios proximais de nrDNA e apresenta a maior variabilidade na região ITS entre as espécies estudadas. Nestas regiões, o *crossing-over* é menos freqüente, o que reforça a hipótese acima levantada.

Existem, três diferentes maneiras para duas diferentes cópias de ITS evoluírem dentro de um único indivíduo: (1) a evolução em concerto unidirecional, que conduz à perda de uma cópia e à fixação da outra; (2) a evolução em concerto, que conduz a um novo tipo de ITS que representa uma mistura do original das duas seqüências; e (3) ambas as cópias de ITS estão presentes, fato decorrente de uma hibridização recente.

Espécies que possuem um ciclo de vida longo e fecundação cruzada levam mais tempo para homogeneizar suas seqüências, esse é o caso do subgênero *Passiflora*. Quando comparamos a diversidade nucleotídica e o número de sítios heterozigotos em relação ao total de sítios polimórficos, vemos que o subgênero *Passiflora* possui valores relativamente maiores, porém não significativos quando comparados com *Decaloba*, subgênero com plantas autocompatíveis. Espécies autocompatíveis são propensas a apresentar baixa diversidade genética intrapopulacional quando comparadas com espécies de fecundação cruzada; além disso, a diferenciação entre as populações tende a ser maior em espécies autofecundantes, porque o fluxo de pólen é mais limitado nessas plantas (Maki *et al.* 1999).

O marcador ITS mostrou-se adequado para o desenvolvimento de estudos populacionais no gênero *Passiflora*. No entanto, o grande número de sítios heterozigotos em algumas espécies como *P. foetida* e *P. sidaefolia* dificultou a inferência exata das seqüências na falta de experimentos que determinem a fase haplóide correta, demandando experimentos laboriosos e específicos, não incluídos neste trabalho.

Foi observado que a freqüência de sítios heterozigotos foi maior no Rio Grande do Sul, quando comparada com os outros estados brasileiros. As espécies de *Passiflora* presentes no Rio Grande do Sul, com exceção de *P. foetida* que é campestre, estão associadas a formações florestais. Segundo Rambo (1951), as formações florestais do RS teriam seu centro de irradiação no Norte: a Mata do Alto Uruguai teria surgido como um prolongamento meridional da Amazônia, através da bacia Paraná-Uruguai, e a Mata Atlântica teria como centro de irradiação a região entre a Serra da Mantiqueira e o Oceano. Os eventos de formação da vegetação no Estado podem ter propiciado o contato recente entre diferentes linhagens destas espécies, que aliados aos fatores que retardam a homogeneização das cópias de ITS podem ter estabelecido o quadro aqui apresentado: um maior número de sítios heterozigotos nas populações do RS em comparação com as demais. Corroborando estas hipóteses, o estudo realizado com *P. alata*, espécie subespontânea no RS (Koehler-Santos,

2005), mostrou homogeneização incompleta da região ITS relacionada com a recente propagação desta espécie no Estado (a partir da década de 1950).

A ausência de variabilidade em *P. urubiciensis* deve-se possivelmente ao fato dessa espécie ser endêmica e adaptada a uma região geográfica muito restrita, a serra de Santa Catarina (Urubici). Nos casos de espécies endêmicas, a baixa variabilidade genética pode ser uma adaptação à sobrevivência em ambientes limitados, com a finalidade de manter as modificações que as habilitaram a sobreviver nestes ambientes (Primack & Rodrigues, 2001).

5.2 Variação no gene 5.8 S

Os genes ribossomais, como 5.8 S, são regiões bastante conservadas do genoma nuclear, com baixa variação até mesmo entre táxons diferentes (García, Nicholson & Nickrent, 2004). A variação de 5.8 S encontrada em amostras de *P. capsularis*, *P. foetida* e *P. tricuspis* foi inesperada, pois são poucas as referências de variação intraespecífica neste gene em plantas, embora Ruggiero & Procaccini (2004) tenham encontrado polimorfismos nesta região em *Halophila stipulacea*, atribuindo estas variações à presença de pseudogenes. Em *Passiflora*, as mutações encontradas no gene 5.8 S eram conservadas, ou seja, não alteram a estrutura mRNA que vai ser formado.

5.3 Estruturação das populações

Nas espécies *P. capsularis*, *P. cincinnata*, e *P. organensis* a distância geográfica, tornou-se uma barreira, impedindo o fluxo gênico entre as populações. Dessa maneira, mutações são acumuladas e populações que divergiram por último estão mais afastadas geneticamente das populações precursoras (Burban & Petit, 2003).

P. haematostigma apresenta formas morfológicas que diferem por características como: comprimento e espessura dos ramos, tamanho e quantidade de flores e frutos e dimensões das folhas (Fernando C. Campos Neto, comunicação pessoal). Esses diferentes morfotipos de *P. haematostigma*, podem ser encontrados em diferentes localidades de Minas Gerais. A distância geográfica entre os estados da região sul (Santa Catarina e Paraná) e Minas Gerais, pode ser a razão provável da diversidade genética encontrada entre as amostras analisadas. Quanto aos grupamentos formados pelas amostras obtidas em Minas Gerais, todas as amostras identificadas como a forma “grande” ficaram nitidamente separadas das demais quanto ao tipo de seqüência. A partir desses dados, pode-se pensar, que os dois morfotipos encontrados em Minas Gerais são, possivelmente, derivados de linhagens evolutivas diferentes.

As espécies *P. morifolia* e *P. eichleriana* não apresentaram nenhum padrão de estruturação geográfica. Uma explicação plausível é o fato de ter sido avaliada apenas um pequeno número de indivíduos, embora oriundos de diferentes localidades. Já a não estruturação das seqüências de *P. sidaefolia* pode ser atribuída ao pequeno número de populações amostradas (apenas duas e de localização muito próxima).

P. edulis é uma espécie bastante cultivada e, com isso, o transporte de sementes, tanto com o objetivo de plantio como pelo consumo dos frutos, pode causar uma incongruência na análise filogeográfica devido à recombinação das seqüências de diferentes origens e fluxo gênico recente. Embora a forma cultivada (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.) não tenha sido amostrada, o cruzamento entre ela e a forma nativa (*P. edulis* f. *edulis* Sims.) pode ocorrer naturalmente. Esse tipo de dificuldade na análise é o mesmo que foi descrito para *P. alata* (Koehler-Santos, 2005), a qual no Rio Grande do Sul também não apresenta uma estruturação geográfica de suas populações.

5.4 *Passiflora foetida* L. e *Passiflora tricuspis* Mast., dois casos especiais

A análise das seqüências de *P. foetida* revelou um alto grau de variabilidade, muito maior que o encontrado nas outras espécies estudadas. Essa variação pode ser resultado dos fatores que retardam a homogeneização das cópias de ITS decorrentes da localização cromossômica destas seqüências, aliados a outros fatores taxonômicos e ecológicos. Nesta espécie existem relatos da existência de diferentes subespécies, descritas através do exame das características morfológicas (Ulmer & MacDougal, 2004). Além disso, esta espécie apresenta populações bastante reduzidas e isoladas, estando adaptada a ambientes bem específicos.

As seqüências 1 a 9 de *P. tricuspis* diferiram amplamente das demais. Essas seqüências foram obtidas a partir de sete amostras do Rio Grande do Sul e uma de Minas Gerais. Através da análise posterior das plantas coletadas no Rio Grande do Sul, pôde-se perceber que essas diferiam morfológicamente da descrição de *P. tricuspis*. A. Cervi (comunicação pessoal) já havia percebido algumas dessas diferenças e, aliando os resultados obtidos com as análises moleculares aqui descritas, está sugerido que as plantas encontradas na região Sul do Brasil e descritas por Sacco (1962) e Mondin (2001) como *P. tricuspis* na verdade seriam *P. urnaeifolia* Rusby, enquanto que *P. tricuspis* ocorreria, predominantemente, na região Centro-Oeste do Brasil. Os filamentos da corona de *P. tricuspis* (Figura 13) são espessos e capitados, enquanto que *P. urnaeifolia* possui filamentos finos, embaraçados e não capitados, da mesma forma que as plantas coletadas no Rio Grande do Sul (Figura 28). Essa possivelmente é a explicação para a grande diferença encontrada entre os tipos de seqüência de *P. tricuspis* neste trabalho. Análises mais detalhadas sobre a morfologia, o aumento da amostragem para marcadores moleculares e a comparação com representantes de *P. urnaeifolia* coletados nos estados da Bahia e São Paulo deverão ser realizadas.

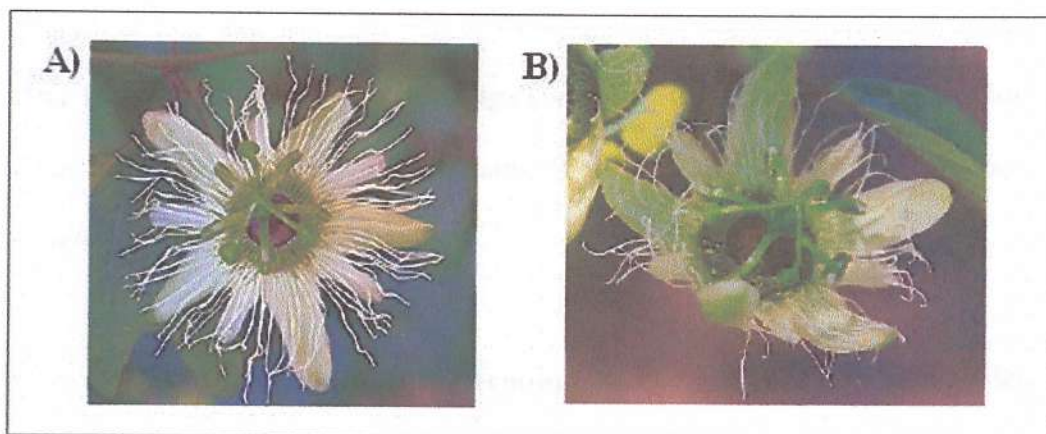


Figura 28 - Comparação morfológica das flores. A) *P. urnaeifolia* e B) *P. tricuspis* coletada no RS.

5.5 Dinâmica Populacional

O padrão unimodal encontrado na distribuição *mismatch* de *P. sidaefolia* indicando uma provável expansão populacional recente pode ser atribuído ao fato de que as 12 amostras foram coletadas em apenas duas populações de uma região bastante limitada. Isso pode ter induzido um resultado falso-positivo, pois as plantas amostradas podem ter um relacionamento de parentesco próximo e estarem colonizando uma região, sendo o padrão de expansão o reflexo da colonização e o aumento do número de indivíduos num mesmo local.

Os índices de neutralidade foram significativos em *P. tricuspis*, provavelmente devido à mistura das amostras de duas espécies diferentes, como já descrito na seção anterior.

6. REFERÊNCIAS

APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 399–436.

Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 489-522.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 37-48. Available from <http://www.fluxus-engineering.com>.

Burban C, Petit RJ. 2003 Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers having contrasted inheritance. *Molecular Ecology* **12**: 1487-1495.

Cervi AC. 1997. Passifloraceae do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. *Fontqueria* **45**: 1-92.

Deginani NB. 2001. Las especies argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). *Darwiniana* **39**: 43-129.

Dunn IS, Blattner FR. 1986. Sharons 36 to 40: multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Res.* **15:** 2677-2698.

Feuillet C, MacDougal JM. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Passiflora* **13:**34-38.

Fu YX, Li WH. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* **133:** 693-709.

Fuertes Aguilar J, Nieto Feliner G. 2003. Additive polymorphisms and reticulation in an ITS phylogeny of thrifts (*Armeria*, Plumbaginaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **28:** 430-447.

García MA, Nicholson EH, Nickrent DL. 2004 Extensive Intraindividual Variation in Plastid rDNA Sequences from the Holoparasite *Cynomorium coccineum* (Cynomoriaceae). *Journal of Molecular Evolution* **58:** 322-332.

Giavina-Bianchi PF, Castro FFM, Machado MLS, Duarte AJS. 1997. Occupational respiratory allergic disease induced by *Passiflora alata* and *Rhamnus purshiana*. *Annals of Allergy, Asthma, & Immunology* **79:** 449-454.

Hare MP. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution* **16** (12): 700-706.

Judd WS, Campbell CS, Kellogg EA, Stevens PF. 1999. *Plant Systematics. A phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Sunderland. P. 278-280.

Killip EP. 1938. The American Species of Passifloraceae. *Botanical Series, Field Museum of Natural History* **19**: 1-613.

Koehler-Santos P. 2005. *Estrutura Populacional, Filogeografia e Evolução de Passiflora alata Curtis (Passifloraceae) no Estado do Rio Grande do Sul*. Dissertação de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Koschnitzke C. 1993. *Morfologia e biologia floral de cinco espécies de Passiflora L. (Passifloraceae)*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, São Paulo.

Kropf M, Kadereit JW, Comes HP. 2002. Late Quaternary distributional stasis in the submediterranean mountain plant *Anthyllis montana* L. (Fabaceae) inferred from ITS sequences and amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* **11** (3) 447-463.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*. Arizona State University, Tempe, Arizona, USA. Available from <http://www.megasoftware.net>.

- Li D, Zhang X. 2002.** Physical localization of the 18S-5.8S-26S rDNA and sequence analysis of ITS regions in *Thinopyrum ponticum* (Poaceae: Triticaceae): implications for concerted evolution. *Annals of Botany* **90**: 445-452.
- Longo D. 2003.** *Especiação em Passiflora misera HBK (Passifloraceae)*. 2003. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Lorenz AP. 2002.** *Relações evolutivas entre Passiflora actinia Hooker e Passiflora elegans Masters (Passifloraceae)*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
- Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Salzano FM, Freitas LB. 2005.** Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Annals of Botany* **95**: 799-806.
- MacDougal JM. 1994.** Revision of *Passiflora*, subgenus Decaloba, Section Pseudodysosmia (Passifloraceae). *Systematic Botany Monographs* **41**: 1-146.
- Maki M, Morita H, Oiki S, Takahashi H. 1999.** The effect of geographic range and dichogamy of genetic variability and population genetic structure in *Tricyrtis* section *Flavae* (Liliaceae). *American Journal of Botany* **86**: 287-292.
- Mayer MS, Soltis PS. 1999.** Intraspecific phylogeny analysis using ITS sequences: insights from studies of the *Streptanthus glandulosus* complex (Cruciferae). *Systematic Botany*, **24**: 47-61.

Melo NF, Guerra M. 2003. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* **92**: 309-316.

Milward-de-Azevedo MA, Baumgratz JFA, 2004. *Passiflora* L. Subgênero Decaloba (Dc.) Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil. *Rodriguésia* **55** (85): 17-54.

Mondin CA. 2001. *Passiflora organensis* Gardner (Passifloraceae), primeira citação de ocorrência para o Rio Grande do Sul. *Pesquisas-Botânica* **51**: 147-150.

Muschner VC. 1999. *Análise filogenética das seqüências ITS1 e ITS2 de duas formas de Passiflora suberosa (Passifloraceae).* Relatório apresentado à Comissão de Bacharelado em Ciências Biológicas ênfase em Genética – UFRGS, Porto Alegre, 28p.

Muschner VC, Lorenz AP, Cervi AC, Bonatto SL, Souza-Chies TT, Salzano FM, Freitas LB. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *American Journal of Botany* **90**: 1229-1238.

Nicholas KB, Nicholas HBJ. 1997. GeneDoc: atool for editing and annotating multiple sequences alignments. Programa disponível no sitio: www.psc.edu/biomed/genedoc

Primack, RB, Rodrigues E. 2001. *Biologia da conservação.* Editora Vida, Londrina, 328 p.

Quijada A, Liston A, Delgado P, Vázquez-Lobo A, Alvarez-Buylla ER. 1998. Variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region of

Pinus rzedowskii revealed by PCR-RFLP. *Theoretical and Applied Genetics* **96**: 539-544.

Rahmanzadeh R, Muller K, Fischer E, Bartels D, Borsch T. 2005. The Linderniaceae and Gratiolaceae are further lineages distinct from the Scrophulariaceae (Lamiales). *Plant Biol (Stuttg)* **7**: 67-78.

Rambo B. 1951. A imigração da selva higrófila no rio Grande do Sul. *Sellowia* **3**: 55-91.

Roy A, Frascaria N, Mackay J, Bousquet J. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical and Applied Genetics* **85**: 173-180.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**: 2496-2497.

Ruggiero MV, Procaccini G. 2004. The rDNA ITS Region in the Lessepsian Marine Angiosperm *Halophila stipulacea* (Forssk.) Aschers. (Hydrocharitaceae): Intra-genomic Variability and Putative Pseudogenic Sequences. *Journal of Molecular Evolution* **58**: 115-121.

Sacco JC, 1962, Passifloraceae, pp. 7-29. In: A.R. Schultz (ed), *Flora ilustrada do Rio Grande do Sul*, Instituto de Ciências Naturais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre.

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCÊNCIAS

Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT, Smith WA. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* **7**: 465-474.

Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* **68**: 978-989.

Suassuna TMF, Bruckner CH, Carvalho CR, Borém A. 2002. Self-incompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. *Theor. Appl. Genet.* **106**:298-302.

Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 585-595.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **24**: 4876-4882. Available from <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/clustalx>.

Ulmer T, MacDougal JM. 2004. *Passiflora: Passionflowers of the World*. Timber Press, Portland OR. 430p.

Varassin IG, Trigo JR, Sazima M. 2001. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **136**: 139-152.

Vecchia M. 2001. Il genere *Passiflora*. (meio eletrônico: www.passiflora.it).

Wendel JF, Schnabel A, Seelanan T. 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 280-284.

White TJ, Burns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: A guide to methods and applications*, p.315-322, Academic Press, San Diego, California.

Zhang D, Sang T. 1999. Physical mapping of ribosomal RNA genes in Paeonies (*Paeonia*, Paeoniaceae) by fluorescent in situ hybridization: implications for phylogeny and concerted evolution. *American Journal of Botany* **86**: 735-740.