

**ANÁLISES GENÉTICAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *PASSIFLORA* L.  
COM BASE EM ABORDAGENS FILOGENÉTICAS, MORFOMÉTRICAS  
E EM MARCADORES MICROSSATÉLITES**

**JULIANO GOMES PÁDUA**

Tese apresentada à Escola Superior de  
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de  
São Paulo, para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia, Área de Concentração: Genética e  
Melhoramento de Plantas.

**P I R A C I C A B A**  
Estado de São Paulo - Brasil  
Julho - 2004

**ANÁLISES GENÉTICAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *PASSIFLORA* L.  
COM BASE EM ABORDAGENS FILOGENÉTICAS, MORFOMÉTRICAS  
E EM MARCADORES MICROSSATÉLITES**

**JULIANO GOMES PÁDUA**

Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Profa. Dra. **MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA**

Tese apresentada à Escola Superior de  
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de  
São Paulo, para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia, Área de Concentração: Genética e  
Melhoramento de Plantas.

**P I R A C I C A B A**

Estado de São Paulo - Brasil

Julho - 2004

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Pádua, Juliano Gomes

Análise genéticas de espécies do gênero Passiflora L. com base em abordagem filogenéticas, morfométricas e em marcadores microssatélites / Juliano Gomes Pádua. - Piracicaba, 2004.  
96 p. : il.

Tese (doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.  
Bibliografia.

1. Filogenia 2. Genética vegetal 3. Maracujá 4. Marcador molecular 5. Morfometria  
I. Título

CDD 634.425

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

A meu pai, Maurílio

Minha mãe, Ione

Meu irmão, Rodrigo

Minha tia Vera

E a meu avô Sebastião (*in  
memoriam*)

DEDICO

“As conexões podem ser invisíveis (...) mas estão enterradas logo abaixo da superfície.”

Dan Brown.

## AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, capaz de nos guiar pelos árduos caminhos com calma;

À toda minha família que mesmo distante está sempre ao meu lado;

À Profa. Dra. Maria Lucia C. Vieira e ao Prof. Dr. Giancarlo C. X. Oliveira por seus ensinamentos, motivação e orientação;

Ao Prof. Dr. Odemir M. Bruno, mestrando Rodrigo Plotze, mestrando Maurício Falvo e Dr. Luís Carlos Bernacci pelos frutos do trabalho em equipe;

Ao Sr. Mauro Peixoto colecionador, e às instituições Instituto Plantarum, Instituto Agrônômico de Campinas e Missouri Botanical Garden (EUA) pela doação de material vegetal;

Aos passifloristas Andrew Adair e Cor Laurens pelas “dicas” de coleta;

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Aranha Camargo pelo auxílio na etapa de seqüenciamento;

Aos técnicos Carlos Alberto Oliveira (Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas do Departamento de Genética), Daniela e Maria Cristina (Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola);

Aos funcionários do Departamento de Genética, em especial às secretárias Neusa e Léia e à bibliotecária Glória.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à CAPES pela concessão de bolsas de estudos;

A todos aqueles que de forma direta ou indireta, de alguma forma, tenham contribuído para com este trabalho.

Em especial aos amigos de Piracicaba: Douglas, Marcelo, Glauco, Estevão, Sílvio, Daniel, Zaqueu, Salete, Phellippe, Silvana Nascimento, Berdan e Sybelle do laboratório: Maria Rita, Frederico, Adriano, Ricardo e Teresa, Michel, Lucianinha, Monalisa, Francisco, Hanai, Maria Zucchi, Renato Rossin, Renato Nogueirol, Viviane, André e Luciane;

Aqueles amigos do peito e companheiros de DNA, que nunca mais sairão de minha vida: Elizabete Keiko Takahashi, Mariza Monteiro, Américo José dos Santos Reis, Aurélio Mendes Aguiar, Alexandre Alves Missiaggia, Eder Jorge de Oliveira, Tassiano Maxwell Marinho Câmara e Karem Guimarães Xavier.

Aos amigos do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1 O gênero <i>Passiflora</i> .....	3
2.1.1 Sistemática de <i>Passiflora</i> .....	5
2.1.2 Variabilidade no gênero e caracterização de germoplasma.....	8
2.2 Análises filogenéticas.....	9
2.3 Marcadores microssatélites.....	5
2.4 Morfometria.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 Análise filogenética.....	37
3.1.1 Material vegetal.....	37
3.1.2 Extração de DNA.....	37
3.1.3 Amplificação via PCR e seqüenciamento.....	38
3.2 Análises morfométricas.....	45
3.2.1 Material vegetal.....	45
3.2.2 Análise morfométrica.....	47
3.3 Marcadores microssatélites.....	51
3.3.1 Construção da biblioteca enriquecida.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1 Análise filogenética.....	54
4.2 Análise morfométrica.....	76
4.3 Marcadores microssatélite: um estudo preliminar.....	84
5 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97



**ANÁLISES GENÉTICAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *PASSIFLORA* L. COM  
BASE EM ABORDAGENS FILOGENÉTICAS, MORFOMÉTRICAS E EM  
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Autor: JULIANO GOMES PÁDUA

Orientadora: Profa. MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos estudar o relacionamento genético entre espécies do gênero *Passiflora*, utilizando análises filogenéticas, morfométricas e marcadores microssatélites. Na literatura, a variação no formato das folhas das passifloras é tida como uma estratégia de escape contra o ataque de borboletas da tribo *Heliconiinae*. As análises revelaram que a variação foliar é determinada basicamente pela inércia filogenética, porém fatores seletivos relacionados à estratégia de escape também agem nesta característica. Os microssatélites são, hoje, a classe mais informativa existente de marcadores moleculares. Assim, duas bibliotecas enriquecidas em seqüências contendo microssatélites, uma derivada de *P. pohlii* e outra de *P. alata*, foram construídas com o objetivo de desenhar *primers* que amplificassem essas regiões repetitivas. Os marcadores microssatélites apresentaram altas taxas de transferibilidade, revelando sua utilidade em estudos genéticos não apenas para as espécies utilizadas na construção da biblioteca, mas também para espécies da família *Passifloraceae*.

**GENETIC ANALYSIS OF SPECIES OF THE GENUS *PASSIFLORA* L.  
BASED ON PHYLOGENETIC AND MORPHOMETRIC APPROACHES AND  
ON MICROSATELLITE MARKERS**

Author: JULIANO GOMES PÁDUA

Adviser: Prof. MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA

**SUMMARY**

This work aims at studying the genetic relationship among species of the *Passiflora* genus, using phylogenetic, morphometric and microsatellite marker analyses. In the literature, variation in leaf shape of the passifloras is taken as a strategy of escape against butterflies from the *Heliconiinae* tribe. Analysis showed that variation in leaf shape is determined basically by phylogenetic inertia; however, selective factors related to escape strategy are acting on this character too. Microsatellites are the most informative class of molecular markers existing nowadays. So, two libraries enriched with microsatellite sequences, one derived from *P. pohlii* and other from *P. alata*, were constructed with the aim of designing primers to amplify those repetitive regions. The microsatellite markers did show a high transferability ratio, revealing their utility in genetic studies, not only for the species used on the library construction, but also to species of the *Passifloraceae* family.

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O gênero *Passiflora* abriga as espécies popularmente conhecidas por maracujás. Este é o gênero de maior importância da família *Passifloraceae*, tanto do ponto de vista de espécies economicamente exploráveis (ca. 81), quanto do ponto de vista de número de espécies (ca. 450).

O Brasil possui um grande número de espécies de *Passiflora* (ca. 120), o que o posiciona como grande possuidor de germoplasma. Apesar de abrigar quase um terço das espécies atualmente conhecidas, no país são exploradas comercialmente, apenas duas espécies: *P. edulis* (maracujá-roxo), e sua forma amarela *P. edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. (maracujá-amarelo) e *P. alata* (maracujá-doce). Cerca de 90% da produção de maracujá no Brasil refere-se ao maracujá-amarelo.

A despeito de sua importância agrícola, medicinal, uma vez que várias espécies são produtoras de fitoterápicos, ornamental, dada à beleza de suas flores, e principalmente, biológica, pela diversidade genética que apresenta e ampla área geográfica de ocorrência, o conhecimento sobre os aspectos evolutivos do gênero é escasso, o mesmo podendo ser dito para a quantificação e a exploração de sua variabilidade genética.

Os primeiros estudos sobre aspectos evolutivos do gênero enfocaram a coevolução entre *Passiflora* e borboletas da tribo *Heliconiinae*. Segundo estes estudos, a grande variabilidade foliar apresentada entre as espécies do gênero constitui-se em

uma estratégia de escape, ou seja, uma forma de evitar o ataque destas borboletas. Contudo, tais estudos não foram conclusivos, uma vez que não foi realizada qualquer análise que comprovasse tal hipótese.

Assim posto, a idéia central desta tese foi gerar informações que possam contribuir para um maior esclarecimento sobre a história filogenética do gênero, bem como testar se é verdadeira a hipótese de variabilidade foliar como estratégia de escape às *Heliconiinae*, postulada por de Gilbert *et al.* (1975).

Para a reconstrução filogenética, a região cloroplastidial, incluindo os espaçadores e intron, em que estão localizados os genes que transcrevem para os tRNA da Tirosina (trnT), da Leucina (trnL) e da fenilalanina (trnF) foi seqüenciada. Para as análises morfométricas, foi desenvolvido um conjunto de *softwares* para a análise das bordas e nervuras das folhas de *Passiflora*. Conjeturou-se que a análise comparativa dos resultados destas duas abordagens deve fornecer subsídios para a testar se a variação no formato das folhas das espécies de *Passiflora* constitui-se em vantagem evolutiva, sendo, como dito, uma estratégia de escape contra a herbivoria.

De modo detalhado, e segundo a hipótese de Gilbert *et al.* (1975), a seleção disruptiva seria favorecida pela pressão de predação. Para escolher os sítios de oviposição, as borboletas precisam identificar as plantas das espécies de *Passiflora* a cujas toxinas suas lagartas são resistentes, e essa identificação é feita em grande parte pela forma da folha. Variantes que se desviem da média da espécie podem deixar de ser reconhecidos pelas borboletas e, assim, escapar à predação.

Em processos de especiação relacionados casualmente ou não com este tipo de seleção disruptiva, seria freqüente encontrarem-se espécies irmãs com folhas bastante diferentes, como estratégia de escape da predação da espécie de borboleta que atacava a espécie ancestral de *Passiflora*. A hipótese de nulidade, portanto, assume que tal fenômeno não ocorre, e que as distâncias morfométricas entre as folhas das espécies de *Passiflora* sejam meramente proporcionais às respectivas distâncias evolutivas. Em outras palavras, a forma da folha seria um caráter neutro e a ancestralidade comum seria a única causa da semelhança entre as folhas de espécies próximas. Pela hipótese alternativa, tal proporcionalidade não seria observada e morfologias foliares diferentes seriam encontradas entre espécies próximas e morfologias similares espécies distantes.

Sem a reconstrução filogenética, o teste de tal hipótese teria de se limitar a análises envolvendo variáveis categóricas, como série, secção ou subgênero, para definir o grau de parentesco entre as espécies. Obviamente, essa estratégia embute uma mesma série, e as espécies podem ter distâncias evolutivas diferentes, que não seriam detectadas numa análise de variância simples. Da mesma forma, as séries dentro de uma secção podem ser mais divergentes que as séries em outra secção. Já usando filogenias, o parentesco entre espécies se transforma numa variável contínua, permitindo análises mais detalhadas.

Por outro lado, sem o uso da morfometria multivariada, a análise teria de usar uma variável categórica, classificando as folhas como lobada, oblonga, setácea, e perderia toda a informação referente aos estados intermediários, certamente

percebidos pelas borboletas. Os métodos morfométricos permitem que a forma se transforme também numa variável contínua.

A rigor, ao estimar a correlação entre as duas distâncias (filogenética e morfométrica), estão-se testando pelo método comparativo os efeitos acumulados no tempo da seleção disruptiva, e é esta a contribuição que se almeja.

Além deste objetivo geral, um outro foi desenvolver *primers* que amplifiquem regiões contendo microssatélites, clonados a partir de *P. alata* e *P. pohlii*, bem como avaliar o grau de transferibilidade destes *primers* entre espécies do gênero, de forma a gerar dados, ainda que preliminares, que pudessem vir a confirmar os resultados obtidos pela análise filogenética. Também, o desenvolvimento de *primers* de microssatélites visa estabelecer metodologia para futuros estudos de mapeamento genético e de genética ecológica de populações naturais de *Passiflora*, tais como a definição de centros de diversidade genética e a estimação de fluxo gênico entre populações.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora*, segundo Piza Júnior (1966) e Leitão Filho & Aranha (1974), é o de maior importância na família *Passifloraceae* e que conta com o maior número de espécies, aproximadamente 450, sendo que no Brasil já foram descritas cerca de 120. Além de *Passiflora*, no Brasil são encontrados ainda os gêneros *Dilkea*, *Mitostemma* e *Tetrastylis* (Cervi, 1986).

As plantas da *Passifloraceae* apresentam-se na forma de trepadeiras vigorosas. As folhas podem ser arredondadas ou partidas, com bordos serrados. Nota-se uma variação muito grande no tamanho e na forma das folhas, sendo as basais bem maiores que as folhas dos ramos terminais e florais (Jørgensen *et al.*, 1984). As flores também apresentam tamanhos e formas variadas, apresentando-se grandes e em forma de tubo (subgêneros *Passiflora* e *Tacsonia*) ou pequenas (subgênero *Decaloba*) (Jørgensen *et al.*, 1984). Ainda com relação às flores, estas apresentam uma ampla gama de coloração, podendo ser encontradas em tons de branco, laranja, vermelho, roxo, amarelo e azul. Os frutos são arredondados ou alongados de coloração verde, amarelada, alaranjada ou com manchas verde-claras. As sementes são achatadas e pretas, envolvidas por um arilo gelatinoso de coloração amarelada e translúcida. Segundo Puri (1947), uma característica bastante comum no gênero é a presença de

brácteas embaixo de cada flor, podendo ser pequenas e lineares (secções *Decaloba* e *Cieca*) ou grandes e semelhantes à folhas (secções *Passiflora* e *Calopathanthus*). Algumas espécies são comestíveis, cerca de 81, portanto, de valor econômico, sendo o gênero com o segundo maior número de espécies frutíferas (d'Eeckenbrugge, 2003). Na América Latina, destacam-se: *P. edulis* (maracujá-roxo) e sua forma *flavicarpa* (maracujá-azedo ou maracujá-amarelo), o mais importante deles, *P. alata* (maracujá doce), *P. tripartita* var. *mollissima* Holm-Nielsen & Jørgensen (curuba de Castilla), *P. tarminiana* Coppens & Barney (curuba quiteña), *P. cumbalensis* (Karst.) Harms (curuba vermelha), *P. ligularis* Juss. (granadilha), *P. quadrangularis* L. (maracujá-melão), *P. maliformis* L. (maracujá de osso) e *P. nitida* L. (maracujá-suspiro).

O Brasil é o principal produtor de maracujá, com uma área de plantio de aproximadamente 33.000 ha (FNP Consultoria e Comércio, 2004), baseada em praticamente uma única espécie, o maracujá-amarelo (Vieira, 1999). Contudo, nos últimos anos, o maracujá doce (*P. alata*) tem ganhado uma certa importância, uma vez que sua lucratividade é bem maior que aquela proporcionada pelo maracujá-amarelo (Bernacci, 2003).

Destacam-se como grandes regiões produtoras de maracujá-amarelo os Estados da Bahia (97.647 t), Alagoas (91.196 t) e São Paulo (70.835 t), com mais de 55 % da produção nacional, que é de 467.464 t (FNP Consultoria e Comércio, 2004), resultando em uma produtividade média de 14,15 t/ha.

No mercado internacional, principalmente na Europa Ocidental e nos Estados Unidos, existe um forte comércio de espécies e híbridos de valor ornamental como *P.*



'Adularia' (*P. sanguinolenta* x *P. caerulea*), *P.* 'Amethyst', *P.* x *beloti* (*P. alata* x *P. caerulea*), *P.* 'Byron Beauty' (*P. incarnata* x *P. edulis*).

Muitas das trepadeiras do gênero *Passiflora* fornecem frutos de várias utilidades alimentícias, culinárias e medicinais. O suco do maracujá é rico em vitaminas hidrossolúveis, especialmente A e C, sais minerais, fibras, cálcio e fósforo (Lima, 1994). Mas o principal prestígio do maracujá - talvez uma das plantas de uso medicinal mais conhecidas no Brasil - advém de suas propriedades calmantes e sedativas, devido à presença de passiflorina (Sousa e Meletti, 1997).

Apesar de sua importância econômica e diversidade de espécies, o gênero *Passiflora* é carente no que diz respeito a estudos genéticos e evolutivos. Estes estudos visam determinar os mecanismos genéticos e ecológicos associados às mudanças evolutivas.

## 2.2 Sistemática de *Passiflora*

A família *Passifloraceae* apresenta uma ampla variabilidade de espécies, sendo que geograficamente podem ser encontradas desde 40° de latitude norte até 35° de latitude sul (Löfgren, 1917), habitando as regiões mais quentes da América, África tropical, Ásia e Austrália (Puri, 1947). Todas as espécies que habitam o Velho Mundo (Ásia e África) pertencem ao subgênero *Decaloba* supersecção *Disemma* (Krosnick & Freudenstein, 2002).

A organização taxonômica da família se deu apenas no início do século XX (Killip, 1938). Este autor dividiu o gênero *Passiflora* em 22 subgêneros (SG), algumas secções (SE) e séries (SR) conforme esquema a seguir:

SG 1: *Apodogyne*

SG 2: *Astephia*

SG 3: *Tryphostemmatoides*

SG 4: *Deidamioides*

SG 5: *Decaloba*

SE 1: *Cieca*

SE 2: *Mayapathanthus*

SE 3: *Decaloba*

SR: *Auriculatae*

SR: *Heterophyllae*

SR: *Sexflorae*

SR: *Apetalae*

SR: *Lutae*

SR: *Organenses*

SR: *Miserae*

SR: *Punctatae*

SE 4: *Xerogona*

SE 5: *Pseudodysosmia*

SE 6: *Pseudogranadilla*

SE 7: *Haniopathanthus*

SG 6: *Chloropathanthus*

SG 7: *Murucuja*

SG 8: *Pseudomurucuja*

SG 9: *Psilanthus*

SG 10: *Adenosepala*

SG 11: *Tacsoniopsis*

SG 12: *Rathea*

SG 13: *Tacsonia*

SG 14: *Granadillastrum*

SG 15: *Distephana*

SG 16: *Calopanthus*

SG 17: *Tacsonioides*

SG 18: *Passiflora*

SR: *Quadrangulares*

SR: *Digitatae*

SR: *Teliaefoliae*

SR: *Marginatae*

SR: *Laurifoliae*

SR: *Serratifoliae*

SR: *Setaceae*

SR: *Pedatae*

SR: *Incarnatae*

SR: *Palmatisectae*

SR: *Kermesinae*

SR: *Imbricatae*

SR: *Simplicifoliae*

SR: *Lobatae*

SR: *Menispermifoliae*

SG 19: *Dysosmia*

SG 20: *Dysosmioides*

SG 21: *Polyanthea*

SG 22: *Astrophea*

SE 1: *Dolichostemma*

SE 2: *Cirrhipes*

SE 3: *Euastrophea*

SE 4: *Leptopoda*

SE 5: *Pseudoastrophea*

SE 6: *Botryastrophea*

Contudo, alguns autores como MacDougal & Feuillet<sup>1</sup> (comunicação pessoal) e de Melo *et al.* (2001) realizaram trabalhos que sugerem a reorganização taxonômica da família. Estes últimos autores, mesmo não tendo como objetivo apresentar uma nova organização sistemática para o gênero, apresentam dados consistentes baseados em análises citogenéticas que contribuem para a elucidação das relações genéticas entre as espécies de *Passiflora*, gerando informações para estudos de sistemática. Do trabalho de Melo *et al.* (2001) resulta a possível árvore de relações evolutivas entre complementos haplóides do gênero *Passiflora* (Figura 1).

---

<sup>1</sup> J. MacDougal e C. Feuillet (Missouri Botanical Garden)

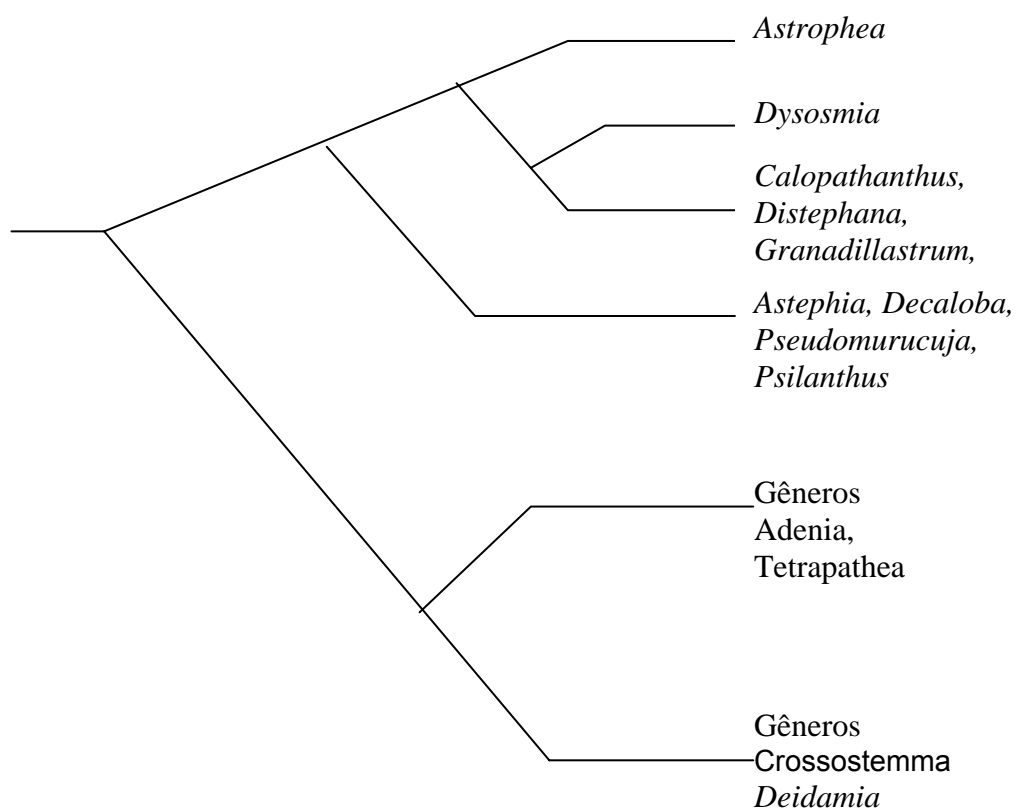


Figura 1- Prováveis relações entre os principais números haplóides conhecidos no gênero *Passiflora* e outros gêneros de *Passifloraceae*

Já MacDougal & Feuillet (Feuillet, comunicação pessoal), propõem uma classificação com número menor de subgêneros, apenas quatro, a saber: *Decaloba*, *Astrophea*, *Deidamioides* e *Passiflora*. A seguir, segue a correspondência entre a classificação proposta por MacDougal e Feuillet e a de Killip (1938):

1. *Decaloba*: composto pelos subgêneros *Apodogyne*, *Astephia*, *Decaloba* (exceto seção *Mayapathanthus*), *Chloropathanthus*, *Murucuja*, *Pseudomurucuja* e *Psilanthus*;
2. *Astrophea*: composto pelo subgênero *Astrophea*;
3. *Deidamioides*: composto pelos subgêneros *Tryphostemmatoides*, *Deidamioides*,  
Seção *Mayapathanthus* (subgênero *Decaloba*) e *Polyanthea*;
4. *Passiflora*: composto pelos subgêneros *Adenosepala*, *Tacsoniopsis*, *Rathea*,  
*Tacsonia*, *Granadillastrum*, *Distephana*, *Calopathanthus*, *Tacsonioides*,  
*Passiflora*, *Dysosmia*, *Dysosmioides*.

Contudo, d'Eeckenbrugge (2003) cita que apesar de parecer mais simplificada, esta classificação a ser proposta por MacDougal e Feuillet, torna-se extremamente complexa ao se tratar de níveis inferiores como seções e séries, além de admitir pressupostos filogenéticos de difícil verificação, uma vez que dados de relações filogenéticas na literatura são escassos.

Recentemente, Muschner *et al.* (2003) reconstruíram a filogenia do gênero baseado em seqüências ITS, *trnL-trnF* e *rps4*. As 61 espécies utilizadas nesta análise puderam ser divididas em três grandes clados, os quais foram denominados como *Decaloba*, *Astrophea* e *Passiflora* (Figura 2). Contudo, nenhum destes é monofilético e a posição do subgênero *Deidamioides* não pode ser resolvida.

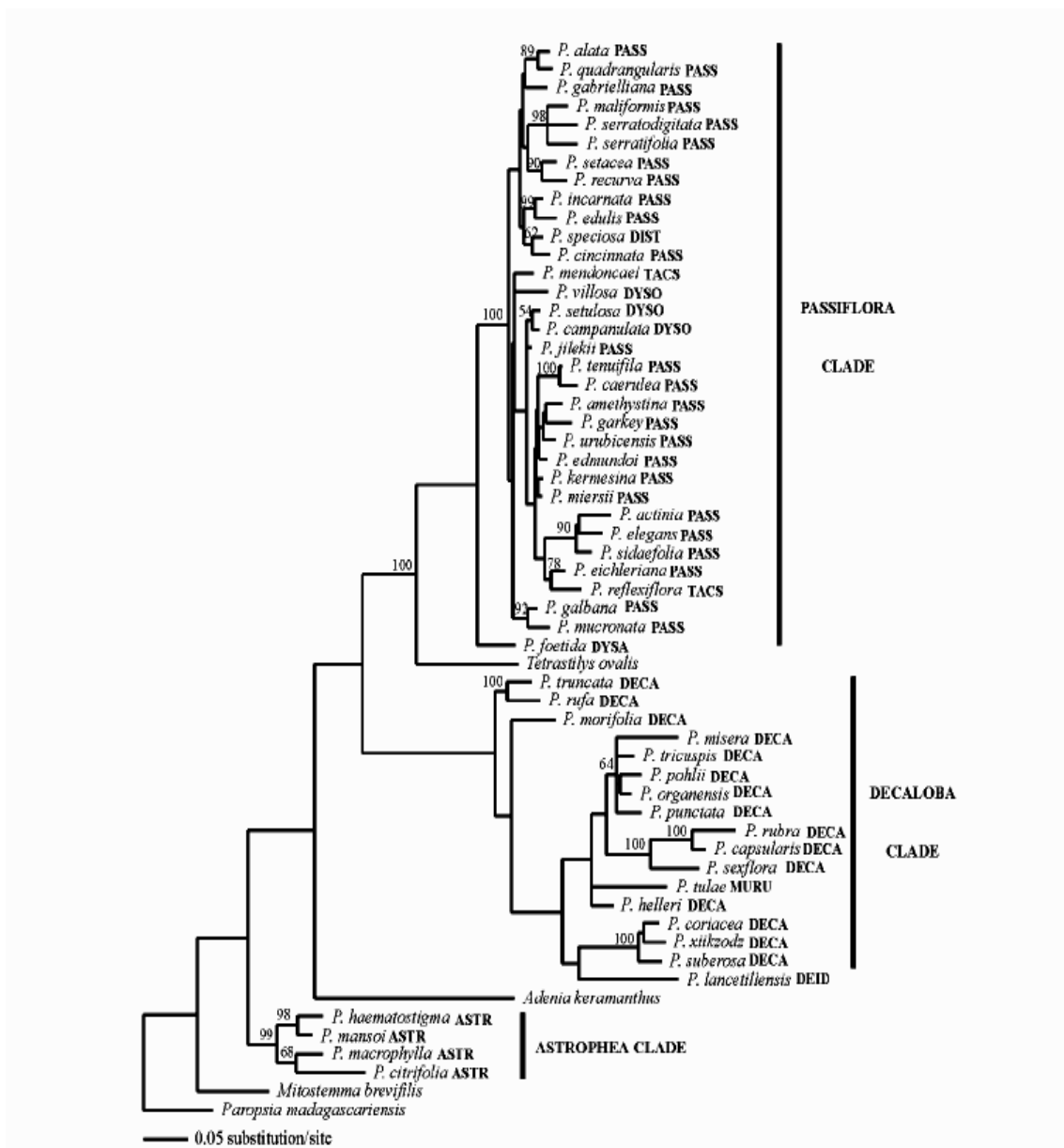


Figura 2 - Árvore filogenética obtida com base em marcadores ITS e trnL-F segundo Muschner *et al.* (2003)

Yockteng & Nadot (2004) utilizaram parte da seqüência do gene nuclear da glutamina sintetase expresso no cloroplasto para examinar o relacionamento filogenético existente entre 91 espécies de *Passiflora*. Estes autores sugerem que à



classificação a ser proposta por Feuillet & MacDougal, três novos subgêneros sejam adicionados: *Polyanthea*, *Dysosmia* e *Tetrapatheia*, apesar de o número básico de cromossomos indicar a presença de apenas quatro clados distintos que correspondem aos propostos por Feuillet & MacDougal.

Em termos de aplicação, as análises filogenéticas mostram-se importantes para traçar rotas de transmissão de doenças infecciosas, desenvolvimento de drogas para fins médicos e agrícolas e na detecção de restrições estruturais e funcionais de proteínas (Liò & Goldman, 1998).

No caso do gênero *Passiflora*, a reconstrução filogenética poderia elucidar alguns aspectos evolutivos como a origem de *P. edulis* f. *flavicarpa*, a determinação do número básico cromossômico ancestral, a provável vantagem adaptativa gerada pela variação no formato de suas folhas, validar a hipótese de coevolução com borboletas da tribo *Heliconiinae*, e mapear o surgimento de caracteres de importância agrônômica que possam vir a ser incorporados em espécies de valor comercial como *P. edulis* e *P. alata*.

### 2.1.3 Variabilidade no gênero e caracterização de germoplasma

A caracterização e a avaliação de populações silvestres e cultivadas de *Passiflora* é um passo importante para o desenvolvimento e diversificação de cultivos (Fajardo *et al.*, 1998).

Economicamente, no Brasil, destacam-se as seguintes espécies: *Passiflora edulis* Sims. (maracujá roxo), *P. edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. (maracujá-amarelo ou azedo), *P. alata* Curtis e *P. ligularis* Juss.

As espécies silvestres são de grande importância como fonte de variabilidade para programas de melhoramento, dentre as quais têm-se: *P. caerulea* L., utilizado na África do Sul como porta-enxerto do maracujazeiro amarelo, além de apresentar certa resistência contra nematóides e bacteriose; *P. quadrangularis* Mast., cujos frutos chegam a pesar 3 kg; *P. setacea*, que apresenta bom vigor e resistência à seca; *P. coccinea*; *P. gibertii* e *P. maliformis* (maracujá-maçã) (A biblioteca virtual do estudante brasileiro, 1998).

Apesar da flor do maracujazeiro ser completa, i. é, de ela apresentar todas as estruturas típicas de uma flor, o maracujá-amarelo é auto-incompatível e totalmente incompatível em certos cruzamentos (Ruggiero, 1987). Uma alternativa para a obtenção de híbridos foi proposta por Odland e Noll (1950), sendo viável a autofecundação no estágio de botão.

Estudos de herança de caracteres são raros, à exceção do caráter auto-incompatibilidade (Bruckner, 1994; Rego *et al.*, 1999; Suassuna *et al.*, 2003). Bruckner (1994) estudando o fenômeno da auto-incompatibilidade em *P. edulis* Sims. constatou a existência de três grupos auto-incompatíveis (auto-incompatibilidade homomórfica e esporofítica), sendo a característica controlada por um gene e três alelos com uma relação de dominância completa. Rego *et al.* (1999) encontraram novos grupos auto-incompatíveis, sugerindo a existência de um outro gene controlando a característica. Este resultado foi comprovado pelos experimentos de Suassuna *et al.* (2002) que detectaram um gene G, de ação gametofítica em associação ao gene S, de ação esporofítica.

Segundo Lopes (1994), do ponto de vista cromossômico, as diversas espécies de *Passiflora* podem ser agrupadas de acordo com o número básico de cromossomos

(x) de cada uma delas:  $x = 6$ ;  $x = 9$  e  $x = 10$ . Os diplóides apresentam-se com  $2n = 12$ , 18, 20, 22, 24, 36 e 84. Segundo estudos citogenéticos de Melo *et al.* (2003),  $x = 6$  seria o número básico principal de *Passiflora*, e os outros números básicos teriam se originado por poliploidização ( $x = 12$ ) e disploidia ( $x = 12, 10$  e  $9$ ).

Variações cromossômicas numéricas intraespecíficas são evidenciadas em *P. suberosa* ( $2n = 12, 24$  e  $36$ ) e *P. foetida* ( $2n = 18, 20$  e  $22$ ). Em espécies  $2n = 20$  ocorrem mudanças por aneuploidia. As espécies *P. suberosa*, *P. aurantia*, *P. herbetiana*, *P. cinnabarina*, *P. pulchella*, *P. capsularis* e *P. bryonoides* com  $2n = 12$ , segundo Stebbins (1950), citado por Lopes (1994), podem ser consideradas como ancestrais do gênero, o que contradiz as evidências citogenéticas obtidas por de Melo *et al.* (2003).

Lopes (1994) cita a hipótese de que espécies  $2n = 18$  evoluíram a partir de espécies  $2n = 24$  por sucessivas perdas de pares de cromossomos. Corroboram tal hipótese a existência de espécies com número cromossômico intermediário: 22 e 20 (*P. foetida* e *P. gracilis*).

Este mesmo autor ainda relata a existência de cinco tipos de cromossomos satélites (SAT), sendo quatro nas espécies *P. aurantia* ( $2n = 12$ ), *P. herbetiana* ( $2n = 12$ ) e *P. cinnabarina* ( $2n = 12$ ); oito em *P. maliformis* ( $2n = 18$ ); dez em *P. suberosa* ( $2n = 24$ ); doze em *P. quadrangularis* ( $2n = 18$ ) e quatorze em *P. seemanni* ( $2n = 18$ ). As espécies *P. maliformis*, *P. seemanni* e *P. quadrangularis* têm três pares de cromossomos SAT iguais, sugerindo um genoma comum.

Em estudo recente, Cuco *et al.* (2004) descrevem a presença de sítios de rDNA 45S localizados na constrição secundária e nos satélites de dois pares de cromossomos de *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. amethystina* e *P. cincinnata*; identificados

respectivamente e, também neste trabalho como 8 e 9. Um sítio adicional foi relatado na região terminal do braço longo do cromossomo 1 em *P. amethystina*. Um único sítio de rDNA 5S foi detectado no braço longo do cromossomo 4 das três espécies. Estes resultados diferem daqueles relatados por Melo e Guerra (2003), e a discrepância se deve aos critérios adotados para a identificação cromossômica.

Do ponto de vista molecular, estudos de diversidade genética do gênero *Passiflora* têm sido realizados utilizando-se RAPD (Fajardo *et al.*, 1998), sítios de restrição de cpDNA (Sánchez *et al.*, 1999), isoenzimas (Segura *et al.*, 2003) e AFLP (Segura *et al.*, 2002).

Marcadores microssatélites estão sendo desenvolvidos por Oliveira *et al.* (não publicado), o que poderá contribuir enormemente na caracterização da variabilidade genética disponível no gênero.

## 2.2 Análises filogenéticas

Uma das abordagens mais úteis no atual contexto da biologia é a análise filogenética (Soltis & Soltis 2003). O termo filogenia surgiu juntamente com a teoria de Darwin, aliado ao conceito de ancestralidade entre espécies (Miyaki *et al.*, 2001). O princípio genético que existe por trás de filogenias é que um grupo de indivíduos que compartilham alguns caracteres descende de um ancestral comum que era portador destes caracteres (Brinkman & Leipe, 2001).

Dessa forma, a filogenia é o ramo da ciência que estuda a relação de parentesco, ou ancestralidade, entre determinados indivíduos. Atualmente, com a facilidade de uso de modernas técnicas moleculares, análises filogenéticas têm contribuído em muito,

principalmente na área da sistemática. Como exemplo, pode-se citar o caso da alteração do nome científico do tomate de *Lycopersicon esculentum* para *Solanum lycopersicon* (Spooner *et al.*, 1993 e Olmstead *et al.*, 1999).

Existe ainda a aplicação das filogenias na elucidação de processos de especiação ou paralogia baseada na história evolutiva de determinados genes (Waters & Vierling, 1999; Mathews & Sharrock, 1997, Ma & dePamphilis, 2000). Mais recentemente, filogenias têm sido utilizadas em genômica comparativa (Doyle & Luckow, 2003; Pryer *et al.*, 2002).

Para se reconstruir a história evolutiva de um determinado táxon, baseado em dados moleculares (DNA, RNA ou proteínas) algumas pressuposições devem ser feitas segundo Brinkman & Leipe, 2001: (i) a seqüência foi corretamente determinada e pertence aquele táxon; (ii) as seqüências a serem comparadas devem ser homólogas; (iii) as seqüências devem ser filogeneticamente informativas.

Contudo, para que as etapas (ii) e (iii) possam ser satisfeitas, um correto alinhamento das seqüências obtidas deve ser realizado. Atualmente, nenhum programa de computador realiza tal tarefa com a perfeição necessária, sendo imprescindível a realização de uma avaliação do alinhamento e sua correção manual.

Além do emprego adequado das ferramentas computacionais de análise filogenética, é preciso ter em mente que um bom trabalho sobre filogenia está baseado nas seqüências de trabalho. Estas devem apresentar as seguintes características (Olmstead & Palmer, 1994):

1. Serem de tamanho suficientemente longo para prover a informação filogenética;
2. Apresentarem uma taxa de divergência adequada, entre 5 e 15%, entre os táxons comparados;

3. Apresentarem facilidade de alinhamento;
4. As seqüências devem ser ortólogas.

Um ponto problemático observado em seqüências nucleares é a diferenciação entre ortologia e paralogia. Tal problema não ocorre em genes de cloroplasto, já que estes evoluem como cópia única.

Em plantas, a utilização de regiões não codificadoras do DNA cloroplastidial (introns e espaçadores intergênicos) apresenta algumas vantagens relacionadas à facilidade de alinhamento das seqüências. Dentre as mais populares estão as regiões espaçadoras *trnT-L*, *trnL-F*, *rps1-rpoA-petD*, *atpB-rbcL*, *rbcL-psal*, *psb-trnH* e os introns dos genes *matK*, *rpoC1*, *rpl16*, *rps16*, *ndh* e *trnL* (Oliveira, 2003).

Uma vez que a melhor seqüência foi escolhida para o estudo, podem surgir dúvidas relacionadas à metodologia a ser utilizada para a reconstrução filogenética.

As inferências filogenéticas se dão basicamente através da construção de árvores filogenéticas. Segundo Meyer (1995), a obtenção das árvores pode ser feita por meio de métodos baseados em:

1. *Algoritmos*: que aplicam uma fórmula, isto é, uma seqüência de passos lógicos que determinam a união de táxons e o comprimento dos ramos que os unem. Apresentam a desvantagem de não serem baseados em hipóteses biológicas.
2. *Otimização de parâmetros*: um parâmetro é escolhido e com base nele, entre todas as topologias possíveis, a “melhor” é escolhida.

Brinkman e Leipe (2001) apresentam preocupações a respeito de qual método de análise usar e a este fato está associado o conhecimento do usuário acerca dos métodos. Atualmente, os métodos baseados na otimização de parâmetros são os mais

utilizados, como (i) *parcimônia*, cujo parâmetro é o número de passos na árvore e (ii) *mínimos quadrados* que analisa a aderência da árvore à matriz de dados. Porém, estes métodos trazem consigo a dificuldade, quando não raro a impossibilidade, de se examinar todas as topologias possíveis a fim de se encontrar a árvore ótima.

Para contornar essa limitação, Meyer (1995) cita a utilização conjunta destes dois tipos de métodos, de modo que inicialmente se usa o método algorítmico para se encontrar uma árvore semelhante à ótima e, em seguida, um método de otimização teria uma menor quantidade de árvores a serem analisadas, reduzindo enormemente a quantidade de comparações necessárias.

Swofford et al. (1996) cita ainda os métodos heurísticos, que buscam uma árvore próxima da ótima sem analisar todas as árvores possíveis. A partir de uma árvore de três táxons, busca-se aquela que minimiza o número de passos. Cada novo táxon inserido, sendo um de cada vez, é então avaliado em todos os possíveis locais onde ele poderia ser “encaixado”, sempre de modo a minimizar o número de passos.

Existem também as análises baseadas em matrizes de distâncias, como, por exemplo, os métodos de análise de *cluster*, mínimos quadrados e *neighbor-joining*.

A análise de *cluster*, segundo Sneath & Sokal (1973), é um conjunto de técnicas relacionadas que buscam medir a similaridade ou distância entre conjuntos de dados e expressá-la em uma árvore ultramétrica, isto é, supondo-se taxas evolutivas constantes, evidenciadas pela simetria dos ramos ao redor de um nó (Meyer, 1995).

O método mais comum de análise de *clusters* é o UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Means). Tem-se ainda o WPGMA, que utiliza pesos no cálculo. Outras variantes também são utilizadas, porém apresentam o mesmo resultado final se os dados são ultramétricos.

No método de mínimos quadrados, o critério de otimização, ou seja, o parâmetro usado para se encontrar a árvore ótima é a aderência da árvore às

$$E = \sum_{i=1}^T \sum_{j=1}^T w_{ij} [d_{ij} - P_{ij}]^{\alpha}$$

distâncias observadas entre os pares de táxons (Meyer, 1995):

em que:

$d_{ij}$  é a distância entre os táxons  $i$  e  $j$ ;

$P_{ij}$  é a soma dos ramos entre  $i$  e  $j$ ;

$W_{ij}$  e  $\alpha$  são constantes definidas pelas diferentes metodologias

$T$  é o número de táxons em análise

$E$  é a medida que quantifica a discrepância entre os táxons na árvore e na matriz, também chamado de variância residual.

Estabelecido o parâmetro a ser minimizado, deve-se buscar um algoritmo que seja capaz de encontrar a árvore ótima.

Como visto, os métodos de *cluster* dependem da ultrametricidade dos dados. Foi então criado por Saitou & Nei (1987) o método *neighbor joining* que dispensa esta premissa. Este método busca a árvore que apresente a menor soma de comprimento dos ramos.

Inicialmente, então, deve-se estudar o monofiletismo dos grupos, definindo qual era o estado primitivo, ou plesiomórfico, e qual o derivado, ou apomórfico. Neste contexto, o uso de grupos externos (Maddison *et al.*, 1984) na análise filogenética é imprescindível, uma vez que estes táxons componentes do grupo externo (*outgroup*) auxiliam na detecção dos estados de caráter primitivo.



Existe também um outro conjunto de métodos bastante usado: são os métodos de máxima verossimilhança, os quais definem como ótima a topologia que apresenta a maior probabilidade de ter gerado os dados observados, ou seja, a maior “probabilidade de ter ocorrido uma combinação de eventos evolutivos naquela topologia, capaz de resultar na distribuição de dados observada” (Meyer, 1995).

A grande vantagem de se utilizar métodos baseados em verossimilhança se deve à baixa variância das estimativas quando comparada a outros métodos, além de ser robusta a algumas violações de premissas dos modelos (Swofford *et al.*, 1996).

Nos métodos baseados em máxima verossimilhança, deve-se conhecer as probabilidades de substituição, ou seja, a probabilidade de uma base X passar a Y após um tempo evolutivo  $d_{XY}$ . Sendo que, durante este tempo, M mutações podem ter ocorrido, de forma que se chega à seguinte conclusão: tempo evolutivo não é sinônimo de tempo cronológico, mas sim de quantidade total de diferenciação ocorrida (Meyer, 1995).

Assumindo que os caracteres evoluem de forma independente, pode-se calcular a verossimilhança para cada posição nucleotídica (sítio) separadamente, a qual corresponde à probabilidade de um nucleotídeo localizado na raiz da árvore ter se mantido ou mutado para um outro estado (nucleotídeo) na ponta da árvore.

Como os sítios são considerados caracteres de evolução independente, a verossimilhança da árvore corresponde ao produto de probabilidade da verossimilhança estimada para cada sítio.

É neste ponto que surge um outro problema: em todos esses métodos pressupõe-se independência e aleatoriedade dos processos mutacionais. Porém, Kelchner (2000), em uma excelente revisão sobre a evolução das regiões não

codificadoras do cloroplasto, mostra que essas premissas dos métodos de análise filogenética não podem ser satisfeitas com este tipo de dados, além de revelar que existem profundas diferenças entre a evolução de regiões codificadoras e não codificadoras do cloroplasto e, principalmente, no tocante às restrições evolutivas.

Segundo Olmstead & Palmer (1994), a não-independência dos caracteres (no caso as mutações) resulta em uma atribuição de pesos não intencional de eventos evolutivos na análise.

Olmstead (1989) ressalta que esta não-independência faz com que a homoplasia seja distribuída conforme um padrão não aleatório. É menos provável que uma distribuição não aleatória de homoplasia (poucos caracteres com alto nível de homoplasia) dentro de um conjunto de dados cause problemas de resolução do que quando distribuída de maneira uniforme (Jansen *et al.*, 1991).

O conhecimento sobre os padrões e os processos de substituições nucleotídicas, segundo Bakker *et al.* (2000), é de extrema importância para se estimar o número de eventos de substituição entre seqüências de DNA desde sua divergência, bem como para métodos de reconstrução filogenética que baseiam-se em modelos de evolução de seqüências de DNA.

Os modelos de mutação podem ser escritos em forma matricial, segundo as probabilidades de um nucleotídeo mutar para outro qualquer. A matriz Q, a seguir, é uma forma geral de representação das probabilidades de mutação:

$$Q = \begin{pmatrix} -\mu(a\pi_C + b\pi_G + c\pi_T) & \mu a\pi_C & \mu b\pi_G & \mu c\pi_T \\ \mu g\pi_A & -\mu(g\pi_A + g\pi_G + e\pi_T) & \mu d\pi_G & \mu e\pi_T \\ \mu h\pi_A & \mu j\pi_C & -\mu(h\pi_A + j\pi_C + f\pi_T) & \mu f\pi_T \\ \mu i\pi_A & \mu k\pi_C & \mu l\pi_G & -\mu(i\pi_A + k\pi_C + l\pi_G) \end{pmatrix}$$

As linhas e colunas correspondem respectivamente aos nucleotídeos A, C, G e T. O termo  $\mu$  corresponde à média da taxa de substituição, que é modificada pelos parâmetros  $a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l$ , que correspondem a cada possível transformação de uma base em outra. O produto deste dois parâmetros é conhecido como parâmetro taxa. A frequência de cada base é representada pelos valores indexados de  $\pi$ .

Existe uma restrição nestes modelos: que o somatório das colunas seja zero, de forma que os elementos da diagonal são escolhidos para satisfazer tal condição. É conveniente decompor aquela matriz em outras duas, a saber, R e  $\Pi$ :

$$R = \begin{pmatrix} - & \mu a & \mu b & \mu c \\ \mu g & - & \mu d & \mu e \\ \mu h & \mu j & - & \mu f \\ \mu i & \mu k & \mu l & - \end{pmatrix}$$

$$\Pi = \begin{pmatrix} \pi_A & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \pi_C & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \pi_G & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \pi_T \end{pmatrix}$$

Desta forma, os elementos fora da diagonal de Q são iguais aos elementos do produto  $R\Pi$ , enquanto os elementos da diagonal de Q são utilizados para zerar as linhas.

Assim, praticamente, todos os modelos de substituição são casos especiais da matriz Q. Por exemplo: os modelos de reversibilidade temporal (GTR) são casos em que a mutação de uma base i para outra j tem a mesma probabilidade que a mutação reversa, isto é, de j para i. Neste caso, a matriz R pode ser escrita da seguinte forma:

$$R' = \begin{pmatrix} \text{—} & \mu a & \mu b & \mu c \\ \mu a & \text{—} & \mu d & \mu e \\ \mu b & \mu d & \text{—} & \mu f \\ \mu c & \mu e & \mu f & \text{—} \end{pmatrix}$$

e a matriz Q':

$$Q' = \begin{pmatrix} -\mu(a\pi_C + b\pi_G + c\pi_T) & \mu a\pi_C & \mu b\pi_G & \mu c\pi_T \\ \mu g\pi_A & -\mu(a\pi_A + d\pi_G + e\pi_T) & \mu d\pi_G & \mu e\pi_T \\ \mu h\pi_A & \mu d\pi_C & -\mu(b\pi_A + d\pi_C + f\pi_T) & \mu f\pi_T \\ \mu i\pi_A & \mu e\pi_C & \mu f\pi_G & -\mu(c\pi_A + e\pi_C + f\pi_G) \end{pmatrix}$$

Vários são os modelos derivados de GTR, resultado de restrições impostas à matriz  $Q'$ . Se dividirmos os tipos de substituição em transversões, transições entre purinas e transições entre pirimidinas, obtém-se o modelo proposto por Tamura-Nei TrN (1993) que matematicamente, corresponde a fazer  $a = c = d = f$ . Pressupondo-se que a frequência das quatro bases é igual, tem-se  $\pi_A = \pi_T = \pi_C = \pi_G = 0,25$ , correspondendo ao modelo descrito por Zharkikh (1994): SYM. Se a este modelo as substituições forem divididas em transições ( $b = e$ ), transversões do tipo  $A \leftrightarrow T$  ou  $C \leftrightarrow G$  ( $c = d$ ) e transversões do tipo  $A \leftrightarrow C$  ou  $G \leftrightarrow T$ , tem-se o modelo proposto por Kimura (1981) *three-substitution-type* K3ST.

Uma variedade de modelos de substituição são encontrados na literatura. Dessa forma, testes devem ser aplicados para que a escolha correta do modelo de substituição que melhor descreva um determinado conjunto de dados possa ser realizada.

O *software* Modeltest (Posada e Crandal, 1998) executa esta função aplicando testes de razão de verossimilhança para detectar o modelo que melhor representa o processo de substituição de um conjunto determinado de dados. O programa avalia a verossimilhança de 56 modelos de substituição e procede a razão entre estes valores com a maior estimativa de verossimilhança.

Primeiramente, antes de se iniciar o processo de análise filogenética propriamente dito, deve-se proceder ao alinhamento das seqüências, que é uma tarefa que os computadores ainda não realizam de forma satisfatória, sendo necessária a intervenção humana na aferição do trabalho. Deve-se portanto, nesta fase, ter alguns conhecimentos sobre os mecanismos evolutivos que atuam nas regiões não codificadoras.

Segundo Kelchner (2000) estes mecanismos estão divididos em cinco categorias:

1. *Slipped-strand mispairing* (SSM);
2. Inserções e deleções relacionadas à formação da estrutura secundária;
3. Inversões associadas a *hairpins* e estruturas *stem-loop*;
4. Recombinações intramoleculares localizadas ou extra-regionais;
5. Substituições nucleotídicas.

Estas mutações, parecem ser função do padrão e estrutura da seqüência, sendo altamente homoplásicas em uma topologia de parcimônia (Kelchner, 2000). É preciso então que sejam feitas algumas modificações na metodologia de reconstrução filogenética, uma vez que elas são baseadas em conhecimentos da sistemática evolutiva de regiões codificadoras. Este mesmo autor sugere, então, a identificação dos mecanismos de mutação no alinhamento das seqüências e avaliação da homologia de *indels*.

### 2.3 Marcadores microssatélites

Microssatélites são seqüências simples repetidas em tandem, as quais consistem de um a seis nucleotídeos (*repeats*), comuns em genomas tanto de eucariotos quanto de procariotos (Field & Wills, 1996; Tóth *et al.*, 2000). Essas regiões repetidas são também conhecidas como SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*).

Nos últimos anos, os microssatélites têm atraído a atenção dos pesquisadores devido a sua grande utilização na construção de mapas genéticos (Powell *et al.*, 1996;

Cregan *et al.*, 1999; Schuler *et al.*, 1996; Knapik *et al.*, 1998); à relação entre instabilidade do número de *repeats* e doenças genéticas (Stallings, 1994; Mahadevan *et al.*, 1992) à praticidade e facilidade que proporcionam aos estudos de genética de populações e conservação (Tautz, 1989; Daynadan *et al.*, 1997; Daynadan *et al.* 1999; Collevatti *et al.*, 1999; Gaiotto, 2001), e para a identificação de indivíduos e genótipos e análise de paternidade (Schlötterer, 2000).

Liu *et al.* (1996) observaram que em cevada as repetições (AC)<sub>10</sub> e (AG)<sub>10</sub> podem ser encontradas a cada 220 kb, enquanto em milho a frequência de microssatélites é de 1:58 kb.

Segundo Morgante & Olivieri (1993), a frequência de microssatélites em plantas é menor do que em humanos. Entretanto, pesquisas mais recentes baseadas em ESTs (*Expressed Sequence Tags*) sugerem que a frequência de microssatélites em plantas seja muito maior. Em comparação com outras espécies, as plantas possuem uma densidade menor de microssatélites em relação aos vertebrados, porém possuem maior proporção do que os invertebrados e os fungos (Morgante *et al.*, 2002). Condit & Hubbel (1991) estimaram para o milho e para cinco espécies de árvores tropicais um total de 10<sup>4</sup> a 10<sup>5</sup> microssatélites, relativamente às repetições AC ou AG.

Até poucos anos atrás pensava-se que os microssatélites eram marcadores seletivamente neutros, contudo hoje existem relatos sobre a interferência do número de repetições no controle de doenças humanas. Como exemplo pode-se mencionar a doença de Huntington, que está ligada ao número de repetições do motivo CAG (maior que 36 repetições) no cromossomo 4 (Moxon & Wills, 1999). Atualmente, sabe-se que 14 distúrbios neurológicos estão relacionados ao número de repetições de microssatélites, principalmente da classe dos trinucleotídeos. De modo geral, essas

doenças apresentam herança dominante ou estão ligadas ao cromossomo X (Goldstein and Schlotterer, 1999; Cummings and Zoghbi, 2000).

Apesar das seqüências de microssatélites variarem de uma espécie para outra, as regiões que as flanqueiam são bastante conservadas, possibilitando o desenho de *primers* para amplificar os alelos do loco de microssatélite.

Apesar da popularidade na utilização dos microssatélites em um grande número de estudos das mais variadas áreas da genética, a dinâmica mutacional destas regiões genômicas ainda não é bem compreendida. A taxa de mutação dos microssatélites está em torno de  $10^{-6}$  a  $10^{-2}$  bases por geração, que é significativamente mais alta que a taxa de mutação pontual (Strand *et al.*, 1993). Assim, pesquisas sistemáticas de taxas e processos de mutação são possíveis para DNA microssatélite (Schlötterer, 2000).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a alta taxa de mutação, como: *crossing-over* desigual, *slippage* ou deslizamento da polimerase na replicação ou no sistema de reparo e como consequência do processo de recombinação (Strand *et al.*, 1993). No *crossing-over* desigual (Figura 3) ocorrem mudanças no números de *repeats*. Já no processo de recombinação, Levinson & Gutman (1987), descobriram que estirpes de *Escherichia coli*, com e sem um sistema funcional de recombinação, tiveram uma taxa de mutação bem parecida, sugerindo que a recombinação não é o mecanismo predominante na geração da variabilidade de microssatélites.



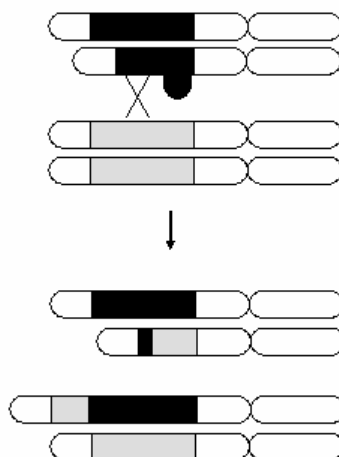


Figura 3 - Crossing-over desigual entre cromossomos homólogos. As regiões pretas correspondem às repetições microsatélite

No processo de *slippage* da polimerase, que ocorre durante a replicação do DNA (ou no sistema de reparo), uma das fitas de DNA se dissocia momentaneamente da outra, sendo reaneladas logo após em posições diferentes. Estes erros no pareamento ocorrendo na fita a ser sintetizada e com a continuação da elongação da síntese resultam em um aumento no comprimento do microsatélite, ao passo que se o erro ocorre na fita molde, haverá uma deleção de *repeats*. Assim, se a síntese de DNA continua nesta molécula, o número de *repeats* do microsatélite é alterado. Experiências *in vitro* têm demonstrado que o processo de *slippage* ocorre a altas taxas (Hentschel, 1982; Streisinger & Owen, 1985; Schlötterer & Tautz, 1991).

Uma pergunta que surge ao analisar dados de microsatélites é: qual o modelo teórico deve ser aplicado para a correta determinação dos parâmetros genéticos populacionais? Assim quatro modelos são utilizados para dados de microsatélites:

4.1) Modelo de alelos infinitos (*Infinite Alleles Model - IAM*):

Neste modelo, cada mutação cria um novo alelo aleatoriamente, isto é, as mutações dão origem a diferentes números de *repeats* que não existiam anteriormente, de forma que pode-se concluir que não há efeito de homoplasia. Um alelo com 15 *repeats* é tão geneticamente relacionado a um alelo de 10 *repeats* quanto a um de 11, ou seja, a semelhança do número de *repeats* não está relacionada a uma maior similaridade filogenética.

#### 4.2) Modelo de Mutação Stepwise (*SMM*):

Quando os microssatélites mutam, eles ganham ou perdem um *repeat*. Isto implica que dois alelos que diferem por apenas um *repeat* são mais relacionados (possuindo um ancestral comum mais recente) do que alelos que diferem por muitos *repeats*.

#### 4.3) Modelo de duas fases (*Two Phase Model - TPM*):

Di Rienzo *et al.* (1994) introduziram este modelo para estudo de microssatélites como uma extensão do Modelo de Mutação Stepwise. Ele assume que a maioria dos eventos mutacionais resulta no aumento ou diminuição de uma unidade do *repeat*, mas alterações menos freqüentes de grande número de *repeats* também acontecem.

#### 4.4) Modelo dos K-alelos

Proposto por Crow & Kimura em 1970, o modelo dos k-alelos pressupõe que existem k possíveis alelos em um dado loco, sendo que a probabilidade de mutação de um alelo para qualquer outro é constante e igual a  $\mu/(k-1)$ .

Estudos recentes (Estoup *et al.*, 1999; Ellegren, 2000 e Schlötterer, 2000) têm mostrado que os modelos mais realistas para microssatélites são o TPM e o GSM, um caso particular de TPM.

Vários fatores podem contribuir para as diferenças observadas na dinâmica evolutiva de microssatélites, tais como número de *repeats*, tipo de seqüência, comprimento do *repeat*, seqüência flanqueadora, interrupções no microssatélite, taxa de recombinação e taxa de transcrição.

Dados de pedigris (Weber & Wong, 1993; Brinkmann *et al.*, 1998; Schlötterer, 1998; Schug *et al.*, 1998) têm mostrado que a taxa de mutação em regiões de microssatélites aumenta com o número de *repeats*. Diferenças na taxa de mutação também têm sido detectadas entre diferentes tipos de *repeats* (Weber & Wong, 1993). Estudos *in vitro* de *slippage* sugerem uma correlação negativa entre o comprimento do *repeat* e a taxa de *slippage* (Schlötterer & Tautz, 1992).

De acordo com Morgante *et al.* (2002), a freqüência de microssatélites no DNA genômico de algumas plantas (*arabidopsis*, milho, soja, trigo e arroz) difere significativamente, sendo alto em *Arabidopsis* e incrivelmente menor em espécies com genomas bastante grandes como o do milho e trigo. Os autores observaram uma relação linear e positiva entre freqüência de microssatélites (perfeitos e imperfeitos) e porcentagem de DNA cópia única. A conclusão mais marcante deste trabalho é que para essas espécies, a freqüência de microssatélites é função não do tamanho do genoma como um todo, mas sim da proporção relativa de DNA de cópia única e que os microssatélites são mais abundantes em DNA de cópia única do que em DNA repetitivo.

De certa forma, este resultado contradiz trabalhos que afirmam que os microssatélites são derivados de seqüências repetitivas e que o aumento na densidade de microssatélites está diretamente relacionado com o aumento no tamanho do genoma, pelo menos em animais (Schlötterer & Harr, 2000).

É esperado que regiões codantes sejam pobres em microssatélites, devido a alta taxa de mutação destes elementos, estas regiões seriam bastante alteradas, o que poderia resultar em perda de funcionalidade. Recentemente, Metzgar *et al.* (2000) confirmaram esta hipótese mostrando que, para diferentes espécies, somente tri e hexanucleotídeos são encontrados em excesso numa grande variedade de tamanhos de unidades repetitivas, tanto em regiões codantes quanto não codantes. Em contraste, outros tipos de *repeats* foram muito menos freqüentes em regiões codantes do que em regiões não codantes. Isto indica que a seleção contra mutações que mudam o quadro de leitura dos genes limitam a presença de microssatélites em regiões codantes, enquanto microssatélites com *repeats* contendo número de nucleotídeos múltiplos de três, estão evoluindo de forma equilibrada em ambas regiões.

Recentemente, Morgante *et al.* (2002), estudando a densidade de microssatélites perfeitos e imperfeitos em regiões genômicas aleatórias e ESTs no genoma de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* (arroz), *Glycine max* (soja), *Zea mays* (milho) e *Triticum aestivum* (trigo), confirmaram os dados de Metzgar *et al.* (2000), pois todos os microssatélites, com exceção dos trinucleotídeos, foram menos freqüentes nas 25.762 seqüências, presumivelmente codificando proteínas. Estes autores mostraram que uma pressão seletiva desigual parece agir nas três regiões da unidade de transcrição (5' UTR, 3' UTR e ORF).

Numa análise feita com 5.000 seqüências completas de cDNA, a região 3' UTR tem uma alta freqüência de microssatélites, com tri e tetranucleotídeos contribuindo marcadamente para este aumento, ao passo que a região 5' UTR possui uma freqüência muito maior do que as outras frações genômicas, devido principalmente a

presença de di e trinucleotídeos. As repetições AG/CT e AAG/CTT contribuem marcadamente para esta classe. Diferenças em termos de pressão seletiva entre as regiões 3'e 5' UTR são evidentes devido à super representação das repetições CT e CTT sobre AG e AAG na região 5', mas não na 3'.

As repetições de dinucleotídeos AG/CT apresentam uma alta frequência em ESTs, enquanto AT/TA apresenta-se em baixa frequência. Já os dinucleotídeos AC/GT são mais abundantes em genomas de mamíferos do que em plantas. Os microssatélites de trinucleotídeos são significativamente mais freqüentes em ESTs, particularmente em arroz. A repetição CCG/CGG representa mais da metade das repetições de trinucleotídeos no genoma de arroz, sendo menos freqüentes em dicotiledôneas (*Arabidopsis* e soja). As monocotiledôneas são mais ricas em trinucleotídeos ricos em GC comparadas com as dicotiledôneas. O alto conteúdo G+C e, conseqüentemente, o codon preferencial em ESTs de monocotiledôneas pode interferir nesta diferença (Morgante *et al.*, 2002).

Apesar de todas as vantagens citadas em relação aos marcadores microssatélites, a grande desvantagem que realmente limita o seu uso é o alto custo para o desenvolvimento de *primers* específicos para amplificação via PCR.

Contudo, alguns estudos têm mostrado a possibilidade da utilização de *primers* para espécies distintas dentro do mesmo gênero (Isagi & Suhandono, 1997; Cipriani *et al.*, 1999) ou mesmo de gêneros diferentes de uma mesma família (White & Powell, 1997; Roa *et al.*, 2000; Zucchi *et al.*, 2002). Esta característica dos microssatélites é denominada como transferibilidade ou amplificação heteróloga. A transferibilidade entre espécies aparentadas é possível graças à natureza homóloga da sequência de nucleotídeos das regiões flaqueadoras.

Esta característica pode ser utilizada para minimizar os custos de implementação destes marcadores em espécies que apresentam uma baixa frequência de microssatélites ou naquelas em que as sequências de DNA repetitivo são de difícil isolamento.

A literatura tem descrito altas taxas de transferibilidade de locos SSR entre espécies arbóreas aparentadas: *Fabaceae* (Dayanadan *et al.*, 1997), *Meliaceae* (White & Powell, 1997), espécies do gênero *Eucalyptus* (Brondani *et al.*, 1998) e *Caryocar* (Collevati *et al.*, 1999).

Tem sido detectado que quanto maior a distância genética entre as espécies, menor é o nível de transferibilidade e vice-versa (Steinkellner *et al.*, 1997; Roa *et al.*, 2000). Porém, cerca de 50% dos *primers* desenvolvidos para pássaros foram transferíveis para bovinos, que são taxa que divergiram há cerca de 300 milhões de anos (Moore *et al.*, 1991; Primmer *et al.*, 1996).

Lillandt *et al.* (2002) obtiveram sucesso no uso de *primers* originalmente desenvolvidos para corvídeos (Corvidae) em *Perisoreus infaustus*. Alguns *primers* que não amplificaram foram redesenhados e permitiram amplificação do loco original. Este resultado mostra que a transferibilidade não depende somente da distância filogenética, mas sim da taxa de mutação associada à região flaqueadora do microssatélite.

Prince *et al.* (2002) isolou 11 locos de microssatélite em *Peromyscus polionotus subgriseus*, observando níveis satisfatórios de transferibilidade entre espécies, porém não obteve sucesso ao tentar utilizar estes *primers* na subespécie *Peromyscus polionotus leucocephalus*.

Em alguns gêneros a amplificação heteróloga é difícil, como por exemplo em anfíbios *Triturus* e *Rana* (Garner *et al.*, 2003; Primmer and Merillä, 2002). Este fato pode ser explicado pelo tamanho do genoma dos anfíbios, que é duas vezes maior que de mamíferos e quatro vezes maior que o das aves

#### 2.4 Morfometria

Morfometria pode ser definida como a descrição quantitativa, análise e interpretação de formatos e sua variação em biologia (Rohlf, 1990), sendo considerada uma área de fronteira entre a biologia, a estatística e a geometria (Monteiro e Reis, 1999). Estudos morfométricos são ferramentas de grande valia para várias áreas das ciências biológicas como genética, fisiologia, ecologia, sistemática e evolução (McLellan e Endler, 1998).

Neste trabalho, em que se intenciona estudar estatisticamente a variação morfológica entre espécies cujas distâncias evolutivas são conhecidas, a técnica morfométrica tem a função de transformar a forma em quantidades passíveis de análise biométrica, incluindo a comparação com a filogenia.

Várias técnicas têm sido propostas para análises morfométricas, podendo estas ser divididas em dois grupos: o primeiro, e mais antigo, emprega pontos pré-determinados, chamados como marcos anatômicos; o segundo considera a forma biológica como um todo, utilizando o seu contorno como fonte de dados.

A dimensão fractal é uma medida da fragmentação de objetos fractais, podendo ser compreendida como uma caracterização de auto-similaridade (Mandelbrot, 1983). Na geometria fractal existem diversas abordagens para estimar a dimensão fractal de um objeto, dentre as quais as mais usuais são baseadas na dimensão de Hausdorff (Shroeder, 1996). Na dimensão de Hausdorff ( $df$ ), uma forma ou um objeto em um

espaço de dimensão  $D$  pode ser preenchido por  $N(\varepsilon)$  pequenos cubos com dimensão  $D$  e lado  $\varepsilon$ . Deste modo  $d_f$  pode ser definida como:

$$d_f = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln N(\varepsilon)}{\ln(1/\varepsilon)}$$

A aplicação do conceito de dimensão fractal para objetos não fractais é comum em análise de imagens e reconhecimento de padrões. A  $d_f$  tem sido utilizada para quantificar a complexidade, textura e composição geométrica de formas. (Carlin, 2000; Bruno, 2001). Alguns exemplos da aplicação desta abordagem são: em botânica (Bruno & Costa, 2001), medicina (Dougherty & Henebry, 2001), física (López *et al.*, 2001), neuromorfologia (Costa *et al.*, 2002), análise de páginas *web* (Consularo, 2000), densidade de multidões (Nilceu *et al.*, 1999), entre outros.

A literatura apresenta vários métodos para a determinação da dimensão fractal de um objeto ou imagem. Um dos mais populares é o método de contagem de caixas ou *box counting* (Mandelbrot, 1983; Serra & Karas, 1997). Outro tipo de método simples e popular é o *Divider-step*, o qual é baseado na proporcionalidade da régua de tamanho  $r$ , utilizada para a tomada de um comprimento de um contorno, elevada à dimensão  $d$ :  $L(r) \approx c \cdot r^d$ . Entretanto este método só é aplicável para estruturas fractais auto-similares. Neste trabalho, foi adotado o método de determinação da dimensão fractal através da soma de Minkowsky, uma vez que é um dos métodos mais precisos encontrados na literatura (Tricot, 1995).

O método de estimativa da dimensão fractal de Minkowsky é baseado na análise da interação entre a interface do objeto e o espaço que este ocupa. A dimensão é obtida através da soma de Minkowsky e utiliza a transformada exata da distância como base para o processo de dilatação consecutiva (Serra, 1982). O valor



da dimensão fractal é estimado usando-se o coeficiente angular da reta resultante da regressão linear do conjunto de pontos do gráfico bi-log:  $\log(d) \times \log A(d)$ , aplicando-o

na expressão:  $df \sim 2 - \frac{\log A(d)}{\log d}$ , sendo que  $A(d)$  corresponde à área total resultante

da soma de todos os pontos que estão à distância  $d$  da região de dilatação.

Embora muito utilizada em análise de imagens e reconhecimento de padrões, a medida de dimensão fractal apresenta uma grande limitação, pois podem ser encontrados objetos e padrões com natureza geométrica distinta que apresentam dimensão fractal equivalente ou próxima. Considerando três caracteres como as letras **c**, **z** e **d** que, mesmo apresentando formas distintas, possuem a mesma medida de dimensão fractal, aproximadamente 1,34. Este exemplo mostra como o uso isolado da dimensão fractal pode ser insuficiente para a identificação de diferenças morfológicas e o reconhecimento de padrões. Uma das razões para que isto ocorra é a adoção de uma única medida para caracterizar um determinado padrão, objeto ou forma.

Uma solução para adequar a dimensão fractal ao reconhecimento de padrões é a utilização da dimensão fractal multiescala derivada da dimensão fractal de Minkowsky. O método consiste em considerar como curva característica a derivada de  $f(d)$  em escala bi-log. Para calcular a sua derivada se usa a propriedade derivativa da transformada de Fourier (Papoulis, 1962). Sejam  $q(t) \Leftrightarrow Q(f)$  pares de Fourier no domínio do tempo e da frequência, respectivamente, e  $k$  um real não negativo, que define a ordem da derivação. A propriedade derivativa de Fourier é definida por:

$$\frac{d^k q(t)}{dt^k} = D_k(f)Q(f)$$

em que

$$D_k(f) = (j2\pi f)^k$$

Com base na curva fractal multiescala é obtida a assinatura ou vetor de características do objeto analisado. Esta técnica acrescenta informações à tradicional medida de dimensão fractal, adequando a técnica ao reconhecimento de padrões.

As curvas de dimensão fractal multiescala são utilizadas como assinaturas digitais para caracterizar objetos. A própria assinatura pode ser utilizada como vetor de características ou então podem ser adotados critérios para sua análise e extração de características.

A adoção de critérios na extração de características apresenta como vantagem a redução da dimensionalidade do vetor de características, uma vez que a curva de dimensão fractal pode ser vista como um vetor com milhares de elementos. Se adotássemos toda a curva como vetor de características, o espaço dos *clusters* apresentaria uma dimensão da ordem de milhar, inviabilizando o desenvolvimento de métodos para proceder à identificação e análise de *clusters*. Um bom critério de extração de característica deve caracterizar a curva com o máximo de informações e o menor número possível de elementos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Análise filogenética

##### 3.1.1 Material vegetal

Foram utilizadas 64 espécies de *Passifloraceae* (Tabelas 1 e 2), oito destas perfazendo o *outgroup*. Algumas das espécies fazem parte da coleção do Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Plantas do Departamento de Genética da ESALQ, sendo que as demais foram obtidas junto ao Instituto Plantarum (Nova Odessa, SP), Instituto Agrônomo de Campinas (IAC – Campinas, SP), Sr. Mauro Peixoto (coleção particular) e Missouri Botanical Garden (Saint Louis, MO, EUA) ou por meio de coletas realizadas a campo (São Paulo e Minas Gerais).

##### 3.1.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído de folhas frescas ou armazenadas em ultrafreezer a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , ou ainda de folhas liofilizadas. Foi utilizado o método CTAB (Doyle & Doyle, 1988), porém com uma etapa adicional de lavagem com fenol e clorofórmio (1:1). A quantificação do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio ( $200\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) por comparação com padrões conhecidos do DNA de fago  $\lambda$  (Invitrogen<sup>®</sup>).

### 3.1.3 Amplificação via PCR e seqüenciamento

Os *primers* utilizados para amplificar as três sequências cloroplastidiais não codantes da região *trnT-L-F* foram descritos por Taberlet *et al.* (1991). Para amplificação do espaçador *trnT-trnL* foi utilizado como *primer* direto 5' CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT 3' e reverso: 5' TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC; do intron do *trnL* como *primer* direto a sequência 5' CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG 3' e reverso 5' GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC 3'; para a amplificação do espaçador *trnL-trnF* foi empregado como *primer* direto: 5' GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC 3' e reverso 5' ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG 3'.

A reação de PCR foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research) utilizando-se 10 mM Tris pH 8,3; 7,5 mM KCl; 0,1  $\mu$ M de cada *primer* a 2,5 mM; 25 ng de DNA genômico; 25 mM de dNTP; 25 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen<sup>®</sup>, Promega<sup>®</sup> e Fermentas<sup>®</sup>) em um volume total de 100  $\mu$ l. As condições da PCR foram: 94° C por 5 minutos seguido de 30 ciclos a 94° C por 1 minuto, 62° C por 1 minuto e a 72° C por 1 minuto. Foi realizado um passo de extensão final a 72° C por 5 minutos.

Os fragmentos foram então eluídos do gel e purificados com o kit Concert (Gibco<sup>®</sup>), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Após a purificação, os amplicons foram quantificados. Para a reação de seqüenciamento foi utilizado o kit DYEnamic ET Terminator Cycle sequencing (Amersham<sup>®</sup>) conforme recomendado pelo manual do produto, a não ser pela diminuição da quantidade de fluoróforos de 8  $\mu$ l para 2  $\mu$ l. A precipitação foi feita com etanol (95% e 70%) para purificação do material a ser seqüenciado. O seqüenciamento foi feito em seqüenciador ABI Prism 377 (Perkin

Elmer) no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Fitopatologia, Entomologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP.

Tabela 1. Espécies que foram utilizadas no estudo filogenético e respectivos subgêneros, secções e séries

Espécie	Subgênero	Secção	Série
<i>P. deidamioides</i> Harms	Deidamioides (Harms) Killip		
<i>P. microstipula</i> L.E.Gilbert & J.M.MacDougal	Deidamioides (Harms) Killip		
<i>P. coccinea</i> Aubl.	Distephana (Juss.) Killip		
<i>P. speciosa</i> Gardner	Distephana (Juss.) Killip		
<i>P. foetida</i> L.	Dysosmia (DC.) Killip		
<i>P. palmeri</i> Rose	Dysosmia (DC.) Killip		
<i>P. campanulata</i> Mast.	Dysosmioides Killip		
<i>P. setulosa</i> Killip	Dysosmioides Killip		
<i>P. villosa</i> Vell.	Dysosmioides Killip		
<i>P. manicata</i> (Juss.) Pers.	Granadillastrum (Tr. & Planch.) Killip		
<i>P. tulae</i> Urb.	Murucuja (Medic.) Mast.		
<i>P. mendoncae</i> Harms	Tacsonioides (DC.) Killip		
<i>P. reflexiflora</i> Cav.	Tacsonioides (DC.) Killip		
<i>P. macrophylla</i> Mast.	Astrophea (DC.) Mast.	Astrophea DC.	
<i>P. coriacea</i> Juss.	Decaloba (DC.) Rchb.	Cieca (Medic.) Mast.	
<i>P. morifolia</i> Mast.	Decaloba (DC.) Rchb.	Cieca (Medic.) Mast.	
<i>P. suberosa</i> L.	Decaloba (DC.) Rchb.	Cieca (Medic.) Mast.	
<i>P. truncata</i> Regel	Decaloba (DC.) Rchb.	Cieca (Medic.) Mast.	
<i>P. alliacea</i> Barb.Rodr.	Astrophea (DC.) Mast.	Pseudoastrophea (Harms) Killip	
<i>P. haematostigma</i> Mart. ex Mast.	Astrophea (DC.) Mast.	Pseudoastrophea (Harms) Killip	
<i>P. mansoi</i> (Mart.) Mast.	Astrophea (DC.) Mast.	<b>Pseudoastrophea (Harms) Killip</b>	
<i>P. capsularis</i> L.	Decaloba (DC.) Rchb.	<b>Xerogona (Raf.) Killip</b>	
<i>P. rubra</i> L.	Decaloba (DC.) Rchb.	<b>Xerogona (Raf.) Killip</b>	
<i>P. auriculata</i> Kunth	Decaloba (DC.) Rchb.	Decaloba (DC.) Mast.	Auriculatae Killip ex Milw.-Azevedo & Baumgratz
<i>P. rufa</i> Feuillet	Decaloba (DC.) Rchb.	Decaloba (DC.) Mast.	<b>Auriculatae Killip ex Milw.-Azevedo &amp; Baumgratz</b>

Tabela 1. Espécies que foram utilizadas no estudo filogenético e respectivos subgêneros, secções e séries

Espécie	Subgênero	Secção	Série
<i>P. serrato-digitata</i> L.	<i>Passiflora</i>		Digitatae Killip ex Cervi
<i>P. membranacea</i> Benth.	Decaloba (DC.) Rchb.	Decaloba (DC.) Mast.	Haniopathanthus (Harms) Killip
<i>P. sidaefolia</i> M.Roem.	<i>Passiflora</i>		Imbricatae Killip ex Cervi
<i>P. edmundoi</i> Sacco	<i>Passiflora</i>		Kermesinae Killip ex Cervi
<i>P. kermesina</i> Link & Otto	<i>Passiflora</i>		Kermesinae Killip ex Cervi
<i>P. miersii</i> Mast.	<i>Passiflora</i>		Kermesinae Killip ex Cervi
<i>P. ischnoclada</i> Harms	<i>Passiflora</i>		Laurifoliae Killip ex Cervi
<i>P. laurifolia</i> L.	<i>Passiflora</i>		Laurifoliae Killip ex Cervi
<i>P. amethystina</i> J.C.Mikan	<i>Passiflora</i>		Lobatae (Harms) Killip
<i>P. caerulea</i> L.	<i>Passiflora</i>		Lobatae (Harms) Killip
<i>P. eichleriana</i> Mast.	<i>Passiflora</i>		Lobatae (Harms) Killip
<i>P. gibertii</i> N.E.Br.	<i>Passiflora</i>		Lobatae (Harms) Killip
<i>P. loefgrenii</i> Vitta	<i>Passiflora</i>		Lobatae (Harms) Killip
<i>P. tenuifila</i> Killip	<i>Passiflora</i>		Lobatae (Harms) Killip
<i>P. misera</i> Kunth	Decaloba (DC.) Rchb.	Decaloba (DC.) Mast.	Miserae Killip ex Milw.-Azevedo & Baumgratz
<i>P. tricuspis</i> Mast.	Decaloba (DC.) Rchb.	Decaloba (DC.) Mast.	Miserae Killip ex Milw.-Azevedo & Baumgratz
<i>P. trifasciata</i> Lem.	Decaloba (DC.) Rchb.	Decaloba (DC.) Mast.	Miserae Killip ex Milw.-Azevedo & Baumgratz
<i>P. organensis</i> Gardner	Decaloba (DC.) Rchb.	Decaloba (DC.) Mast.	Organensis Killip ex Milw.-Azevedo & Baumgratz
<i>P. cincinnata</i> Mast.	<i>Passiflora</i>		<i>Passiflora</i>
<i>P. edulis</i> Sims	<i>Passiflora</i>		<i>Passiflora</i>

Tabela 1. Espécies que foram utilizadas no estudo filogenético e respectivos subgêneros, secções e séries

Espécie	Subgênero	Secção	Série
<i>P. incarnata</i> L.	<i>Passiflora</i>		<i>Passiflora</i>
<i>P. pohlii</i> Mast.	Decaloba (DC.) Rchb.	Decaloba (DC.) Mast.	Punctatae Killip ex Milw.-Azevedo & Baumgratz
<i>P. punctata</i> L.	Decaloba (DC.) Rchb.	Decaloba (DC.) Mast.	Punctatae Killip ex Milw.-Azevedo & Baumgratz
<i>P. alata</i> Curtis	<i>Passiflora</i>		Quadrangularis (Harms) Killip
<i>P. quadrangularis</i> L.	<i>Passiflora</i>		Quadrangularis (Harms) Killip
<i>P. serratifolia</i> L.	<i>Passiflora</i>		Serratifoliae Killip ex Cervi
<i>P. setacea</i> DC.	<i>Passiflora</i>		Setaceae Killip ex Cervi
<i>P. sexflora</i> Juss.	Decaloba (DC.) Rchb.	Decaloba (DC.) Mast.	Sexflorae Killip ex Milw.-Azevedo & Baumgratz
<i>P. actinia</i> Hook.	<i>Passiflora</i>		Simplicifoliae (Harms) Killip
<i>P. galbana</i> Mast.	<i>Passiflora</i>		Simplicifoliae (Harms) Killip
<i>P. jilekii</i> Wawra	<i>Passiflora</i>		Simplicifoliae (Harms) Killip
<i>P. mucronata</i> Lam.	<i>Passiflora</i>		Simplicifoliae (Harms) Killip
<i>P. subrotunda</i> Mast.	<i>Passiflora</i>		Simplicifoliae (Harms) Killip
<i>P. maliformis</i> L.	<i>Passiflora</i>		Tiliaefolia Killip ex Cervi
<i>P. platyloba</i> Killip	<i>Passiflora</i>		Tiliaefolia Killip ex Cervi

Tabela 2. Espécies e origem dos taxa utilizados como *outgroup*

Espécies	Origem
<i>Adenia cissampeloides</i> (Planch. ex Hook.) Harms	Gana
<i>Crossostemma laurifolia</i> Planch. ex. Benth.	Gana
<i>Paropsia edulis</i> Noronha ex Thouars	Madagascar

#### 3.1.4 Análises computacionais

As sequências foram alinhadas utilizando o *software* Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) com os parâmetros do *default* do programa. O alinhamento foi então refinado manualmente.

Vários relatos da literatura sugerem que o método da parcimônia tem se mostrado inconsistente com dados moleculares (Swofford *et al.*, 1996). Vários métodos devem, portanto, ser empregados para que que grupos com baixo suporte sejam detectados (Baum *et al.*, 1996). Para estas análises, foram empregados os *softwares* PAUP\* 4.0b (Swofford, 2003) e MEGA (Kumar *et al.*, 2001).

A busca por árvores foi feita pelo método de busca heurística, TBR (*tree bisection-reconnection*) e 1.000 réplicas, armazenando somente a melhor árvore em cada passo. Todos os caracteres receberam o mesmo peso.

Para análise de máxima verossimilhança foi verificado primeiramente, qual dos métodos de substituição nucleotídica mais se aproximava dos dados. Para tanto, foi utilizado o *software* MODELTEST 3.06 (Posada & Crandall, 1998).



Para as análises baseadas em distâncias foram utilizados os modelos de Jukes-Cantor, Tajima-Nei, Kimura 2 parâmetros, Tamura 3 parâmetros e Tamura-Nei conforme disponível no programa computacional MEGA (Kumar *et al.*, 2001).

### 3.2 Análises morfométricas

#### 3.2.1 Material vegetal

Folhas maduras foram coletadas de quatro indivíduos distintos de cada espécie de *Passiflora* (Tabela 3 e Figura 4). Estas espécies foram escolhidas devido à grande variabilidade que apresentam quanto à forma de suas folhas e padrão de nervação, compreendendo grande parte das formas encontradas dentro do gênero.

Tabela 3. Espécies de *Passiflora* usadas nos estudos de morfometria e respectivas posições infragenéricas

Espécie	Subgênero	Secção/ Série
<i>P. amethystina</i>	<i>Passiflora</i>	<i>Lobatae</i>
<i>P. caerulea</i>	<i>Passiflora</i>	<i>Lobatae</i>
<i>P. coriacea</i>	<i>Decaloba</i>	
<i>P. foetida</i>	<i>Dysosmia</i>	
<i>P. gibertii</i>	<i>Passiflora</i>	<i>Lobatae</i>
<i>P. maliformis</i>	<i>Passiflora</i>	<i>Teliaefoliae</i>
<i>P. miersii</i>	<i>Passiflora</i>	<i>Kermesinae</i>
<i>P. organensis</i>	<i>Decaloba</i>	<i>Decaloba/ Organensis</i>
<i>P. pohlii</i>	<i>Decaloba</i>	<i>Decaloba/ Punctatae</i>
<i>P. suberosa</i>	<i>Decaloba</i>	

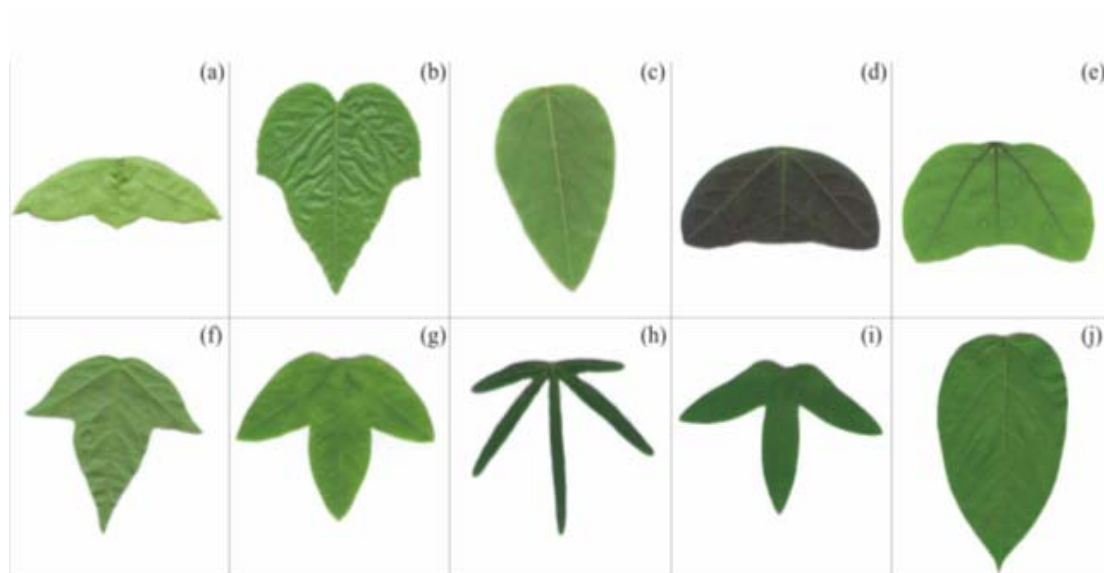


Figura 4 - Espécies de *Passiflora* utilizadas no ensaio morfométrico: (a) *P. coriacea*, (b) *P. foetida*, (c) *P. miersii*, (d) *P. organensis*, (e) *P. pohlii*, (f) *P. suberosa*, (g) *P. amethystina*, (h) *P. caerulea*, (i) *P. gibertii* e (j) *P. maliformis*

### 3.2.2 Análise morfométrica

As folhas foram digitalizadas em *scanner* (Genius<sup>®</sup>) com uma qualidade de imagem de 300 dpi. As imagens das folhas foram normalizadas para que o tamanho não interferisse na precisão do experimento, uma vez que o interesse está na análise fractal multiescala, uma medida de complexidade da folha.

O sistema computacional desenvolvido para o experimento pode ser dividido em três módulos: (i) processamento de imagens, (ii) extração de características e (iii) reconhecimento de padrões. Na Figura 5 é apresentado um diagrama sintetizando o

sistema computacional. No primeiro módulo, é realizado o processamento das imagens, retornando os mapas contendo os objetos de interesse. No segundo módulo é realizada a análise fractal multiescala, retornando um vetor de características e no terceiro é realizada a análise estatística dos vetores de características.

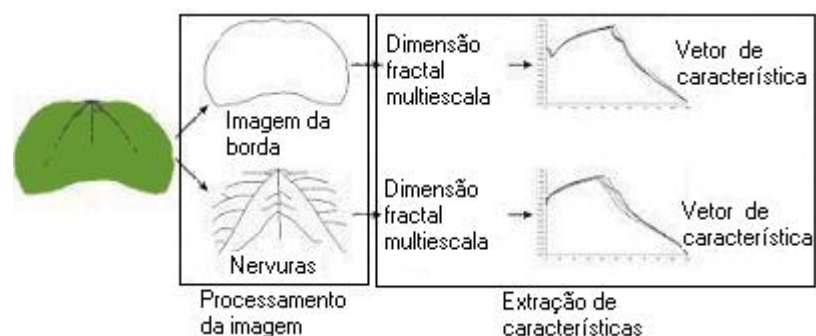


Figura 5 - Diagrama apresentando os principais módulos do sistema computacional

O módulo de processamento de imagem tem como objetivo retornar mapas, ou seja, imagens adequadas para o processo de extração de características. Como resultado, o módulo retorna duas imagens: (a) o mapa do contorno foliar e (b) o mapa das nervuras. A Figura 6 apresenta um diagrama que ilustra o funcionamento do módulo. Para a extração do contorno foliar é realizada a binarização da imagem através do método de Otsu (Papoulis, 1962) e, então é realizada a detecção das bordas. O resultado do processo de extração do contorno é uma imagem binária contendo apenas informações da borda da área foliar.

No procedimento de segmentação do conjunto de nervuras das folhas foi necessário um processamento mais sofisticado. Foi realizada a intensificação dos sinais de alta frequência através da transformada de Fourier. O processo de

segmentação adotado foi o laplaciano morfológico (Serra, 1997), o qual retornou um mapa de bordas da imagem. Para eliminar o ruído, foram aplicados filtros morfológicos, com o objetivo de mapear as regiões das nervuras e, dessa maneira, retirar os conjuntos de pixels isolados, deixando assim apenas as nervuras e o contorno das folhas. Nesta etapa, as nervuras apresentam larguras com diversos valores, ficando espessas, dependendo da posição na folha, por exemplo, a nervura principal próxima ao pecíolo. O mapa de nervuras é reduzido para 1 pixel de largura. Até este estágio é obtida uma imagem contendo as nervuras com largura de 1 pixel e seu contorno. O último processo é a subtração do mapa de nervuras pelo *template* de contorno, resultando em uma imagem binária contendo somente as nervuras da folha.

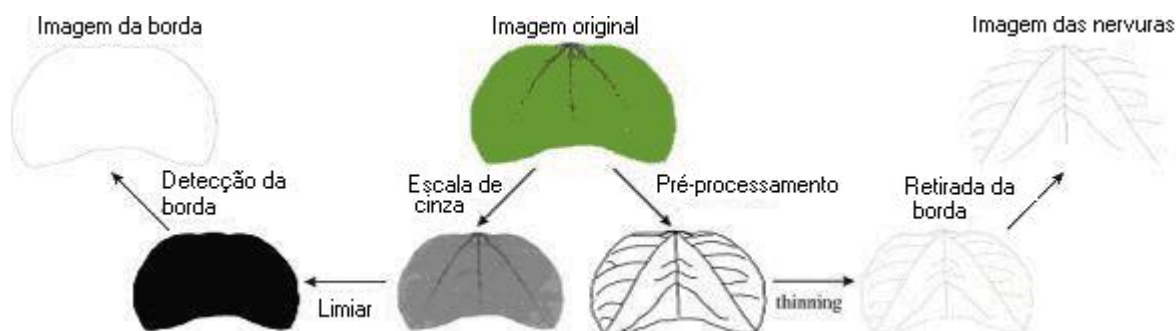


Figura 6 - Diagrama de funcionamento do módulo de processamento de imagens

No módulo de extração de características é realizada a análise da dimensão fractal multiescala. Utilizando as imagens da borda e das nervuras, nelas é aplicado o método de Minkowsky, obtendo-se a transformada da distância com dilatações exatas e duas curvas multiescala, uma para o contorno e outra para as nervuras. Para proceder a dilatação, foi utilizada a Transformada da Distância Euclidiana Exata baseada em dilatações exatas, que pode ser representada da seguinte maneira, seja:

- $E$  o conjunto de distâncias Euclidianas únicas e ordenadas crescentemente, isto é,  $E = \{0, 1, \sqrt{2}, \sqrt{3}, 2\sqrt{2}, \dots, l\}$ , tal que  $l \in D$ , em que  $D = \{d \mid d = (i^2 + j^2)^{1/2} p / i, j \in \mathbb{N}\}$ ;
- $k$  o índice correspondente à posição de cada distância no conjunto  $E$  tal que  $k = \{0, 1, 2, \dots, n\}$ ;
- $P$  o conjunto de pontos que definem a imagem de interesse a ser dilatada:  $P = \{(x, y) \mid f(x, y) \in \text{img}\}$ .
- $g_k(P)$  o conjunto de pixels que ficam a uma distância de índice  $k$ , pertencente ao conjunto  $E$ , dos pixels contidos em  $P$ , tal que:

$$\text{para } k = 0 \quad g_0(P) = P$$

$$\text{para } k \neq 0 \quad g_k(P) = \{(x, y) \mid ((x - P_x)^2 + (y - P_y)^2)^{1/2} = E(k); x, y \in N\}$$

- Sendo  $Q(k)$  a quantidade de pixels mapeados após uma seqüência de  $k-1$  de dilatações através de  $g_k(P)$ , tem-se :

$$Q(k) = \{(x, y) \mid g_k(P) - (g_k(P) \cap \bigcap_{i=0}^{k-1} g_i(P))\}$$

$$\text{Assim pode-se definir a área de dilatação como : } A(k) = \sum_{i=1}^k Q(i)$$

Para cada curva são encontrados os três pontos de interesse, conforme descrito anteriormente. Caso o primeiro ponto de interesse (o vale da curva) não seja detectado, o mínimo local é considerado o primeiro ponto da curva ( $x = 0$ ). Como resultado, o módulo de extração de características retorna um vetor com 12 elementos, sendo os seis primeiros referentes às coordenadas  $x$  e  $y$  de  $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$  da curva

correspondente ao contorno e os outros seis ao mapa de nervuras, os quais, juntos, podem ser utilizados como pontos característicos que definem uma espécie.

Tomando-se o exemplo dos caracteres c, z e d, quando adotada a medida de dimensão fractal, os quatro objetos em análise apresentam valores muito próximos. Isto poderia ser compreendido por um sistema de reconhecimento de padrões, que os objetos são idênticos. Ao aplicar-se nos mesmos objetos a dimensão fractal multiescala, cada um dos objetos apresenta uma assinatura diferente, conforme ilustra a Figura 7, possibilitando a identificação dos objetos por um sistema computacional.

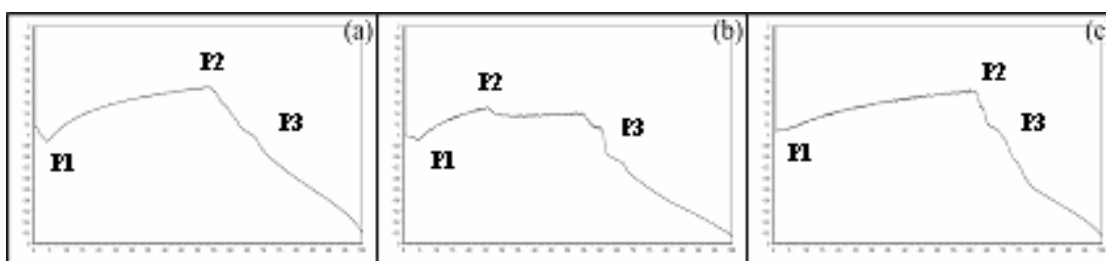


Figura 7 - Curvas de dimensão fractal multiescala, calculadas através dos caracteres da c, z e d. A curva (a) corresponde ao caráter c, a curva (b) ao caráter z e a curva (c) ao d. Pela singularidade de cada curva, observa-se que a dimensão fractal multiescala apresenta informações mais detalhadas, permitindo o adequado reconhecimento de padrões

### 3.3 Marcadores microssatélites

#### 3.3.1 Construção da biblioteca enriquecida

Inicialmente, foi feita a extração do DNA total de *P. alata* e *P. pohlii*, empregando o método CTAB (Doyle & Doyle, 1987), porém com uma etapa adicional

de lavagem com fenol e clorofórmio (1:1). Posteriormente, procedeu-se a diluição para uma concentração de 250 ng/ $\mu$ l. O DNA (5  $\mu$ g) foi digerido com a enzima *Rsa* I por 16 horas a 37°C, de acordo com a reação: 5  $\mu$ g de DNA, 6  $\mu$ l da enzima *Rsa* I (10 U/ $\mu$ l), 10  $\mu$ l do tampão de reação, 10  $\mu$ l de espermidina 40 mM, 44  $\mu$ l de água mili-Q esterilizada.

A qualidade da digestão foi controlada aplicando-se 10  $\mu$ l da reação em gel de agarose 1,2% sob uma voltagem de 4V/cm.

Adaptadores *Rsa*21 (5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3') e *Rsa*25 (TAGTCCACGCGTAAGCAAGCAAGAGCACACA 3') foram ligados ao DNA digerido (1  $\mu$ g) na presença da enzima T4 DNA ligase de acordo com a seguinte reação: 2  $\mu$ l do oligo *Rsa*21 (10  $\mu$ M), 2  $\mu$ l do oligo *Rsa*25 (10  $\mu$ M), 10  $\mu$ l do DNA digerido, 10  $\mu$ l de tampão 5X, 4  $\mu$ l de T4 DNA ligase (1 U/ $\mu$ l), 26  $\mu$ l de água. A reação foi incubada por 2 horas a 20 °C.

Para aumentar a quantidade de fragmentos a serem selecionados, foi feita uma pré-amplificação com o DNA oriundo da ligação, utilizando um *primer* que apresenta a sequência complementar ao adaptador *Rsa*21. A reação foi composta por: 3  $\mu$ l do produto da ligação, 2  $\mu$ l de *Rsa* 21 (10  $\mu$ M), 5  $\mu$ l de tampão PCR 10X, 1,5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 4,0  $\mu$ l de dNTP (2,5 mM), 0,7  $\mu$ l (3 U) de Taq DNA polimerase (5U/ $\mu$ l), 33,8  $\mu$ l de água.

O processo de amplificação via PCR foi realizado segundo o programa: desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, 20 ciclos de (i) desnaturação a 94 °C por 30 segundos, (ii) anelamento a 60 °C por 1 minuto, (iii) extensão a 72 °C por 2 minutos, e uma extensão final a 72 °C por 8 minutos. Para verificação, 10  $\mu$ l do produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% por 2 horas a 4V/cm.

O produto da reação de PCR foi purificado utilizando o *kit* Wizard (Promega) e diluído em 100  $\mu$ l de água.

A seguir, foi feita a seleção dos fragmentos contendo os microssatélites utilizando o kit *Streptavidine Magsphere Paramagnetic Particles* (Promega®). Para tanto, foram sintetizadas sondas que contêm repetições CT e GT ligadas a cinco resíduos de inosina e à uma molécula de biotina.

Foram adicionados ao DNA pré-amplificado e purificado 400  $\mu$ l de água e procedeu-se a uma incubação por 15 minutos a 95 °C. Em seguida, foram adicionados 13  $\mu$ l de SSC 20X e 3  $\mu$ l de cada uma das sondas biotiniladas (CT e GT).

Após 20 minutos, 100  $\mu$ l das *beads* (ou contas magnéticas) foram adicionados à mistura de hibridização. A reação foi incubada por 10 minutos sob temperatura ambiente e constante agitação.

Realizou-se a magnetização e o sobrenadante foi descartado. Às contas ligadas ao complexo sonda-inosina-biotina foram adicionados 300  $\mu$ l de SSC 0,1X. Este procedimento foi repetido por três vezes.

Ao final, 100  $\mu$ l de água foram adicionados, seguindo uma magnetização. O sobrenadante foi colocado em um *ependorf* e ressuspenso em 150  $\mu$ l de água.

Os fragmentos selecionados foram então amplificados novamente a partir da reação: 50  $\mu$ l de DNA dos fragmentos selecionados, 4  $\mu$ l do *primer* Rsa 21 (10  $\mu$ M), 10  $\mu$ l de tampão de PCR 10 X, 3  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 8  $\mu$ l de dNTP (2,5 mM), 1  $\mu$ l de Taq DNA polimerase (5 U/ $\mu$ l), 24  $\mu$ l de água.

O processo de amplificação via PCR foi realizado segundo o programa: desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto, 20 ciclos de (i) desnaturação a 94 °C por 40 segundos, (ii) anelamento a 60 °C por 1 minuto, (iii) extensão a 72 °C por 1 minuto, e



uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. Para verificação, 10 µl do produto amplificado foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8% por 2 horas a 4V/cm.

O DNA amplificado foi clonado em vetor pGEM-T (Promega®) e a transformação feita utilizando *E. coli* estirpe XL1-Blue.

As células competentes foram obtidas utilizando-se o método do CaCl<sub>2</sub>, que segue: células bacterianas (*E. coli* XL1-Blue) foram crescidas em meio LB a 37 °C por 16 horas sob agitação. Cinco ml dessa cultura foram inoculados em 250 ml de meio LB e submetidos a crescimento a uma temperatura de 37 °C até que fosse atingida uma absorbância de 0,5. Os tubos contendo a suspensão bacteriana foram centrifugados por 8 minutos a 8000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 62,5 ml de MgCl<sub>2</sub> 0,1 mM a 4 °C e incubado em gelo por 20 minutos. Centrifugou-se por 8 minutos a 8000 rpm e o *pellet* foi ressuspenso em 10,8 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM e 1,7 ml de glicerol gelado. Alíquotas de 500 µl foram colocadas em tubos de polipropileno, mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em *ultrafreezer*.

A ligação dos fragmentos amplificados ao plasmídeo foi feita utilizando-se 1µl de plasmídeo, 10 µl de tampão 2X, 1 µl de ligase e 8 µl dos fragmentos amplificados, com uma incubação a 4 °C por 16 horas.

A transformação foi realizada utilizando o método do choque térmico. Em um tubo esterilizado foram colocados 100 µl de células competentes e 10 µl do *mix* de ligação. Procedeu-se a incubação em gelo por 1 hora. O tubo foi então colocado em banho-maria a 42 °C por 45 segundos exatos e recolocado no gelo. Foram então

adicionados 400  $\mu$ l de meio LB a 37 °C, procedendo-se uma incubação sem agitação por 1 hora.

A suspensão bacteriana foi plaqueada em meio LBA contendo 20  $\mu$ l de X-Gal (50 mg/ml) e 100  $\mu$ l de IPTG (100 mM), procedendo-se uma incubação a 37 °C por 16 horas.

As colônias brancas foram submetidas a uma PCR para simples confirmação da transformação.

O passo posterior foi o sequenciamento dos clones positivos, i.é que contêm os microssatélites. Para tal etapa foi utilizado o *kit DyEnamic ET* (Amersham). A reação foi composta por: 2  $\mu$ l de *DyEnamic*, 2  $\mu$ l do *primer Rsa21*(10  $\mu$ M), 400 ng de DNA e água qsp. 10  $\mu$ l. Em seguida, as reações foram levadas ao termociclador e submetidas a 25 ciclos de (i) 96°C por 10 segundos, (ii) 50°C por 5 segundos, (iii) 60°C por 4 minutos.

Foi então feita a precipitação do DNA para a etapa de seqüenciamento: aos 10  $\mu$ l da reação foram adicionados 1  $\mu$ l de acetato de sódio/EDTA (1,5 mM/259 mM) e 40  $\mu$ l de etanol 95 %. A solução foi mantida ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, foi feita então uma centrifugação a 13.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 250  $\mu$ l de etanol 70 %. Nova centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos foi feita, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram secos em termociclador a uma temperatura de 90 °C por 1 minuto.

O seqüenciamento foi feito em seqüenciador ABI Prism 377 (Perkin Elmer®), no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Fitopatologia, Entomologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP.

As sequências obtidas foram analisadas com o auxílio do programa TRF (Benson, 1999) para a detecção das repetições que compõem os microssatélites.

Encontrada a posição das repetições, estas foram selecionadas segundo um critério que leva em consideração o tamanho do motivo repetido e o número de vezes que este é repetido. O produto deste dois fatores deve ser no mínimo igual a catorze, ou seja, foram selecionados apenas os dinucleotídeos repetidos no mínimo sete vezes ( $= 14$ ), os trinucleotídeos repetidos cinco vezes ( $= 15$ ), e os tetranucleotídeos repetidos quatro vezes ( $= 16$  bases).

O programa *Primer3* foi utilizado para desenho dos *primers* que flanqueiam a região microssatélite de interesse. Uma análise inicial dos primers, avaliando auto-anelamento e *primer-dimer*, foi feita utilizando-se o software QIAGEN *Operon's Toolkit*.

Os *primers* foram sintetizados pela empresa Imprint®, com uma escala de síntese de 10 nmols.

A otimização da reação de PCR utilizando os *primers* foi feita alterando-se a concentração dos componentes da reação: DNA molde,  $Mg^{++}$ , dNTP, *primers*, além da temperatura e tempo de anelamento e tempo de extensão durante os ciclos de PCR.

A quantidade de DNA utilizada nos experimentos de otimização variou de 5 a 30 ng; as concentrações de  $Mg^{++}$  testadas foram 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mM; de dNTP foram: 0,1 mM; 0,5 mM; 1mM e 1,5 mM; de *primers* foram de 0,25  $\mu$ M; 0,50  $\mu$ M; 0,75  $\mu$ M e 1  $\mu$ M. O volume final da reação de PCR foi constante e igual a 15  $\mu$ l. Estas variações também foram testadas para a análise de transferibilidade destes *primers*, isolados a partir de *P. alata* e *P. pohlii*, para as outras espécies que foram utilizadas no estudo sobre a filogenia do gênero *Passiflora* nesta tese (item Material e Métodos).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análise filogenética

Os *primers* universais descritos por Taberlet *et al.* (1991) foram capazes de amplificar os fragmentos de tamanho esperado em todas as espécies estudadas neste trabalho. A região do espaçador intergênico entre *trnL* e *trnF*, quando alinhada, apresentou um comprimento total de 396 pares de base (pb), dos quais, 72 sítios (18,2 %) foram parsimoniosamente informativos, 198 (50 %) conservados, 151 (38,1%) variáveis e 76 (19,1 %) *singletons*, i é, sítios em que existem somente dois nucleotídeos diferentes. Convém ressaltar que a porcentagem de *singletons* e a de parsimoniosamente informativos estão incluídas na classe de sítios variáveis, de forma que a soma das porcentagens não resulta em 100 %.

*P. rubra* (Decaloba) apresentou a menor seqüência do espaçador *trnL-trnF*, apenas 179. A maior foi detectada para *P. manicata* (Granadillastrum), com 313 pb.

Para as outras duas regiões analisadas, a variação do tamanho das seqüências foi bem menor. Para as seqüências do intron *trnL*, a menor foi detectada em *P. suberosa* (Decaloba), com 658 pb, enquanto a maior seqüência foi a de *P. mansoi* (Astropheae), com 694 pares de base. Considerando-se as seqüências do espaçador do *trnT-L*, a menor foi a de *P. capsularis* (Decaloba) com 530 pb, e a maior seqüência foi a de *P. jillekii* (*Passiflora*), com 586 pb.

Estes resultados mostram que existe uma tendência das espécies do subgênero Decaloba apresentarem seqüências menores que as espécies dos outros

subgêneros analisados. O tamanho médio da seqüência da região *trnT-L-F* em *Decaloba* foi de 1127, em *Passiflora* de 1263 e de 1302 em *Astrophea*.

Resultado semelhante foi observado em estudo usando citometria de fluxo em *Passiflora*. Souza *et al* (2001) observaram que o conteúdo de DNA nuclear variou de 1,84 pg em *P. suberosa* a 5,36 em *P. quadrangularis*, sendo que a média para espécies do subgênero *Passiflora* foi de 3,73 pg.

*Passiflora suberosa* pertence ao subgênero *Decaloba*, cujas seqüências analisadas no presente estudo apresentaram-se menores e, portanto, pode-se supor que haja uma relação entre conteúdo de DNA nuclear e o tamanho das seqüências cloroplastidiais da região *trnT-L-F* (Tabela 4).

Tabela 4. Comparação entre o comprimento das seqüências da região *trnT-L-F* (presente estudo) e o conteúdo de DNA nuclear para sete espécies de *Passiflora* (Souza *et al*, 2001)

Espécie	Seqüência <i>trnT-L-F</i>	Conteúdo 2C
<i>P. suberosa</i>	1177	1,84
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	1317	3,19
<i>P. mucronata</i>	1356	3,41
<i>P. laurifolia</i>	1385	3,88
<i>P. quadrangularis</i>	1124	5,36
<i>P. antioquiensis</i>	-	3,00
<i>P. menispermifolia</i>	-	4,54

Considerando *Decaloba* como o grupo derivado, *Astrophea* como o mais primitivo e *Passiflora* em uma etapa evolutiva intermediária, percebe-se claramente

que durante a história evolutiva do grupo, sucessivas perdas de material genético ocorreram.

Melo e Guerra (2001) concluem em seu trabalho que a teoria mais parsimoniosa sobre o número básico de cromossomos é  $x = 6$ . Contudo, utilizando a mesma árvore por eles apresentada, pode-se concluir que  $x = 9$  provê uma teoria tão parsimoniosa quanto  $x = 6$ . Porém, como detectado neste trabalho e no estudo de Souza *et al.* (2001), empregando metodologias diferentes, pode-se crer, com certa cautela que, provavelmente, o número básico do gênero seja  $x = 9$ .

A frequência de nucleotídeos média foi de 30,6 % de timina (variação de 28,2 % em *Adenia cissampeloides* a 34 % em *P. suberosa*), 18,9 % de citosina (variação de 15 % em *Paropsia edulis* a 22,2 % em *P. edulis*), 34,4 % de adenina (variação de 30,9 % em *P. sexflorae* a 38 % em *P. rubra*) e 16,1 % de guanina (variação de 13,2 % em *P. campanulata* a 18,9 % em *Adenia cissampeloides*). As frequências para cada espécie são mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Freqüência das bases (A, T, C e G em %) e tamanho do total da seqüência da região *trnT-L-F* (em pb)

Espécie	Base				Tamanho total
	A	T	C	G	
<i>Adenia cissampeloides</i>	28,2	20,6	32,4	18,9	1148
<i>Crossostemma laurifolia</i>	30,9	17,8	34,5	16,7	1327
<i>P. actinia</i>	30,6	19,4	35,1	14,9	1293
<i>P. alata</i>	30,5	18,5	36,5	14,6	1124
<i>P. alliacea</i>	30,1	18,7	32,9	18,3	1394
<i>P. amethystina</i>	29,5	20,3	34,2	16,0	1356
<i>P. auriculata</i>	30,6	20,3	33,1	16,0	1056
<i>P. caerulea</i>	31,3	18,9	35,2	14,6	1124
<i>P. campanulata</i>	32,1	18,4	36,3	13,2	1129
<i>P. capsularis</i>	31,4	17,0	35,8	15,7	1105
<i>P. cincinnata</i>	29,9	19,8	34,0	16,3	1389
<i>P. coccinea</i>	29,6	20,0	33,9	16,4	1351
<i>P. coriacea</i>	32,5	17,7	33,6	16,2	1107
<i>P. deidamioides</i>	29,9	19,1	33,1	18,0	1341
<i>P. edmundoi</i>	32,0	17,6	33,5	16,9	1370
<i>P. edulis</i>	29,7	22,2	32,6	15,5	1153
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	30,0	19,8	33,0	17,2	1317
<i>P. eichleriana</i>	31,1	17,6	36,6	14,7	1148
<i>P. foetida</i>	30,5	18,9	36,5	14,2	1124
<i>P. galbana</i>	29,9	19,7	35,9	14,5	1129
<i>P. gibertii</i>	30,7	18,1	33,0	18,1	1303
<i>P. haematostigma</i>	31,4	17,2	36,4	15,1	1153
<i>P. incarnata</i>	31,3	18,5	35,6	14,6	1124
<i>P. ischnoclada</i>	30,7	20,5	32,2	16,6	1365
<i>P. jilekii</i>	29,9	20,3	33,8	16,0	1356
<i>P. kermesina</i>	31,3	19,3	36,1	13,3	1124
<i>P. laurifolia</i>	29,6	19,5	34,8	16,0	1385
<i>P. loefgrenii</i>	30,5	19,5	35,1	14,9	1264
<i>P. macrophylla</i>	29,8	20,0	33,7	16,5	1375
<i>P. maliformis</i>	31,2	19,2	35,5	14,1	1129
<i>P. manicata</i>	31,0	19,2	32,9	16,9	1510
<i>P. mansoi</i>	30,1	18,9	34,3	16,8	1380
<i>P. membranacea</i>	30,3	20,1	33,6	16,1	1322
<i>P. mendoncaei</i>	30,0	19,8	34,1	16,1	1317
<i>P. microstipula</i>	29,7	19,4	33,2	17,7	1365
<i>P. miersii</i>	30,2	20,3	33,5	16,0	1356

Tabela 5. Frequência das bases (A, T, C e G em %) e tamanho do total da seqüência da região *trnT-L-F* (em pb)

Espécie	Base				Tamanho total
	A	T	C	G	
<i>P. morifolia</i>	32,3	16,5	34,7	16,5	1196
<i>P. mucronata</i>	28,5	21,0	33,8	16,7	1356
<i>P. organensis 1</i>	31,5	17,7	34,9	15,9	1139
<i>P. organensis 2</i>	29,5	19,8	33,8	16,9	1141
<i>P. organensis 3</i>	29,5	19,4	34,0	17,0	1189
<i>P. organensis 4</i>	29,6	20,4	33,9	16,1	1151
<i>P. palmeri</i>	30,2	20,1	33,8	15,8	1341
<i>P. platyloba</i>	30,4	17,4	34,4	17,8	1221
<i>P. pohlii</i>	32,1	16,7	36,3	15,0	1129
<i>P. punctata</i>	31,4	17,3	33,2	18,1	1136
<i>P. quadrangularis</i>	31,8	18,0	36,5	13,7	1124
<i>P. reflexiflora</i>	30,3	21,7	33,5	14,6	1225
<i>P. rubra</i>	29,1	17,9	38,0	15,1	864
<i>P. rufa</i>	29,8	18,6	33,3	18,2	1075
<i>P. serratifolia</i>	29,7	21,0	33,0	16,3	1332
<i>P. serratodigitata</i>	30,3	19,3	34,3	16,1	1322
<i>P. setacea</i>	29,0	20,6	36,5	13,9	1216
<i>P. setulosa</i>	32,2	18,5	36,1	13,3	1124
<i>P. sexflora</i>	32,4	18,5	30,9	18,1	1250
<i>P. sidaefolia</i>	29,6	19,4	34,2	16,9	1370
<i>P. speciosa</i>	29,6	20,0	33,9	16,4	1351
<i>P. suberosa</i>	34,0	15,6	35,7	14,8	1177
<i>P. subrotunda</i>	30,9	17,3	37,0	14,8	1172
<i>P. tenuifila</i>	30,6	19,4	35,1	14,9	1293
<i>P. tricuspis</i>	31,5	16,5	34,2	17,7	1154
<i>P. trifasciata</i>	32,5	16,3	34,6	16,7	1158
<i>P. truncata</i>	29,9	19,4	33,3	17,3	1118
<i>P. tulae</i>	29,0	18,9	34,0	18,1	1250
<i>P. villosa</i>	30,4	20,0	33,9	15,7	1351
<i>Paropsia edulis</i>	30,0	15,0	36,3	18,7	1317

É interessante verificar que existe uma tendência de as espécies que compõem o subgênero *Passiflora* apresentarem uma maior frequência de citosina (19,62 % em



média) em relação às espécies do subgênero *Decaloba*, que apresentam uma média de 17,5 % e também das espécies que formam o *outgroup*, com 17,8 %.

A distância patrística está relacionada à divergência entre espécies com base no número de substituições ( $\mu$ ) e tempo em que esta ocorreu ( $t$ ), isto é no produto  $\mu t$ , podendo então servir como uma medida do distanciamento genético entre espécies. A menor distância patrística (0,0192) foi observada entre os subgêneros *Passiflora* e *Distephana*. Já a maior distância (0,0892) foi encontrada entre os grupos *Passiflora* e *Decaloba*. A análise completa das distâncias entre os subgêneros encontra-se na matriz apresentada a seguir.

Tabela 6. Matriz das distâncias patrística entre os subgêneros de *Passiflora*

Táxon	<i>Tacsonioides</i>	<i>Passiflora</i>	<i>Dysosmia</i>	<i>Distephana</i>	<i>Astrophea</i>	<i>Deidamioides</i>
<i>Tacsonioides</i>						
<i>Passiflora</i>	0,0224					
<i>Dysosmia</i>	0,0180	0,0267				
<i>Distephana</i>	0,0113	0,0192	0,0165			
<i>Astrophea</i>	0,0563	0,0641	0,0609	0,0707		
<i>Deidamioides</i>	0,0508	0,0576	0,0536	0,0456	0,0640	
<i>Decaloba</i>	0,0889	0,0892	0,0877	0,0803	0,0910	0,0562

O subgênero mais heterogêneo, i.é, com maior variabilidade, foi *Astrophea*, com uma distância média de 0,052 (distância média entre indivíduos dentro de *Astrophea*). Vale ressaltar que esta comparação não inclui o *outgroup*, uma vez que não é um grupo monofilético, cuja distância foi de 0,0576. Justamente por ser um grupo não natural, compreendendo três gêneros distintos da família *Passifloraceae*, utilizado somente com o objetivo de polarização (determinação de caracteres ancestrais ou derivados) e enraizamento da árvore, era esperado que a variabilidade desse grupo fosse a maior. O grupo de menor distância entre suas espécies foi o subgênero *Deidamioides*, com um valor de 0,0036. A análise completa é apresentada na Tabela 6.

Tabela 7. Valores de distância patrística dentro dos subgêneros, incluindo o grupo externo

Subgênero	Distância
<i>Tacsonioides</i>	0,0158
<i>Passiflora</i>	0,0272
<i>Dysosmia</i>	0,0150
<i>Distephana</i>	0,0071
<i>Astropheia</i>	0,0520
<i>Outgroup</i>	0,0576
<i>Deidamioides</i>	0,0036
<i>Decaloba</i>	0,0432

As outras regiões analisadas, isto é, a do espaçador do *trnT-trnL* e a do intron do *trnL* foram substancialmente menos variáveis que a seqüência do espaçador do *trnL-trnF*. A região do espaçador intergênico entre *trnT* e *trnL*, quando alinhada, apresentou um comprimento total de 480 pb, dos quais, 198 sítios (41,2 %) foram parsimoniosamente informativos, 123 (25,6 %) conservados, 336 (70,0 %) variáveis e 134 (27,9 %) *singletons*, i é, sítios que diferem por somente dois nucleotídeos.

O intron do *trnL* também mostrou-se pouco variável. Com uma seqüência alinhada de 594 pb, apresentou 350 sítios conservados (58,9 %), 167 variáveis (28,1 %), 125 parsimoniosamente informativos (21,0 %) e 44 *singletons* (7,4 %).

As seqüências foram analisadas pelo programa computacional PAUP\*. Para utilizar o método de verossimilhança, é necessário que se determine o correto modelo evolutivo ao qual os dados melhor se adaptam. A escolha do modelo foi feita no programa Modeltest 3.0, que define, dentre 56 modelos, aquele que melhor explica a evolução das seqüências de interesse, por meio de testes baseados na estatística razão de verossimilhança (LRT). Este teste baseia-se em relacionar as

verossimilhanças, na realidade o logaritmo neperiano da verossimilhança, estimadas para cada modelo. O valor de LRT quantifica quantas vezes um modelo melhor explica a evolução das seqüências. No caso da região do *trnL-F*, o modelo GTR+G+I explica melhor a evolução desta seqüência  $10^6$  vezes mais eficientemente que o modelo TVM+I+G. Esta estatística para os 56 modelos, avaliada para as seqüências da região *trnT-L-F* das 67 espécies deste estudo são apresentadas nas tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8. Estimativa do ln da verossimilhança (lnL) e estatística razão de verossimilhança (LRT) estimada para os 56 modelos de evolução de seqüências disponíveis no programa Modeltest para a região do *trnL-F*

Modelo	lnL	LRT
GTR+I+G	-2764,958	0,0000E+00
TVM+I+G	-2764,962	-3,1755E-06
GTR+G	-2765,050	-6,6640E-05
TVM+G	-2765,052	-6,8166E-05
TIM+I+G	-2765,995	-7,5013E-04
K3Puf+I+G	-2766,062	-7,9849E-04
TIM+G	-2766,111	-8,3367E-04
K3Puf+G	-2766,170	-8,7672E-04
TrN+I+G	-2769,236	-3,0923E-03
HKY+I+G	-2769,323	-3,1549E-03
TrN+G	-2769,376	-3,1932E-03
HKY+G	-2769,455	-3,2503E-03
SYM+I+G	-2785,690	-1,4941E-02
SYM+G	-2785,962	-1,5136E-02
TVMef+I+G	-2786,462	-1,5495E-02
TVMef+G	-2786,721	-1,5680E-02
TIMef+I+G	-2788,508	-1,6963E-02
F81+I+G	-2788,556	-1,6997E-02
F81+G	-2788,704	-1,7103E-02
TIMef+G	-2788,730	-1,7122E-02
K3P+I+G	-2789,174	-1,7440E-02
K3P+G	-2789,381	-1,7589E-02

Tabela 8. Estimativa do ln da verossimilhança (lnL) e estatística razão de verossimilhança (LRT) estimada para os 56 modelos de evolução de seqüências disponíveis no programa Modeltest para a região do *trnL-F*

Modelo	lnL	LRT
TrNef+I+G	-2789,829	-1,7910E-02
TrNef+G	-2790,054	-1,8072E-02
K80+I+G	-2790,491	-1,8384E-02
K80+G	-2790,702	-1,8536E-02
GTR+IÊ**	-2791,675	-1,9233E-02
TIM+I	-2791,772	-1,9302E-02
TVM+I	-2792,060	-1,9508E-02
K3Puf+I	-2792,151	-1,9574E-02
TrN+I	-2794,335	-2,1138E-02
HKY+I	-2794,719	-2,1413E-02
JC+I+G	-2806,614	-2,9907E-02
JC+GÊ**	-2806,817	-3,0051E-02
SYM+I	-2808,197	-3,1035E-02
TVMef+I	-2809,241	-3,1778E-02
TIMef+I	-2811,419	-3,3328E-02
K3P+I	-2812,372	-3,4005E-02
F81+I	-2812,724	-3,4256E-02
TrNef+I	-2812,778	-3,4295E-02
K80+I	-2813,723	-3,4967E-02
JC+I	-2829,436	-4,6104E-02
GTR	-2837,341	-5,1684E-02
TVM	-2837,458	-5,1766E-02
TIM	-2837,899	-5,2077E-02
K3Puf	-2838,020	-5,2163E-02
TrN	-2841,405	-5,4547E-02
HKY	-2841,524	-5,4631E-02
F81	-2860,798	-6,8151E-02
SYM	-2862,748	-6,9514E-02
TVMef	-2863,116	-6,9770E-02
TIMef	-2863,484	-7,0028E-02
K3P	-2863,846	-7,0280E-02
TrNef	-2864,824	-7,0963E-02
K80	-2865,181	-7,1212E-02
JC	-2880,628	-8,1966E-02

De acordo com as análises baseadas em verossimilhança, as seqüências da região *trnL-F* seguem o modelo GTR + I + G (Lanave *et al.*, 1984, Tavare, 1986, Rodriguez *et. al.*, 1990). Isso significa que a freqüência de bases é variável e a matriz

de substituição é simétrica, isto é, a taxa de substituição de uma base X para uma Y é freqüente à taxa de mutação reversa, ou seja, de Y para X.

Já o modelo que melhor descreve a evolução da seqüência compreendida pelos genes *trnT-L*, incluindo o espaçador do *trnT* e o intron do *trnL*, é o proposto por Jukes-Cantor (JC) (Jukes e Cantor, 1969). Este é o modelo mais simples que existe, assumindo igual freqüência de bases e taxas de substituição com freqüências iguais, além de desconsiderar eventos de inserção e deleção (*indel*).

A seleção dos modelos já indica quão complexa é a dinâmica evolutiva das seqüências e sua utilidade em reconstruções filogenéticas. O espaçador *trnT-L*, bem como o intron do *trnL* mostram-se com uma evolução bem mais simples e lenta que o espaçador do *trnL-F*, visto que os modelos baseados em GTR (*time-reversible*) são bem mais complexos que JC, que considera apenas substituições nucleotídicas, sem levar em conta *indels*. Pode-se, então, inferir que a dinâmica evolutiva das seqüências da região *trnT-L* pode ser melhor utilizada em reconstruções filogenéticas de grupos supraespecíficos, enquanto o espaçador do *trnF* pode ser utilizado em reconstruções em nível específico. Em nossa reconstrução esta questão fica claramente ilustrada pelos altos valores de *bootstrap* que dão suporte aos clados que correspondem aos subgêneros ao se utilizar o espaçador do *trnL-F*, comparativamente aos valores mais baixos apresentados nestas situações quando do emprego da região *trnT-L*.

Tabela 9. Estimativa de verossimilhança e estatística razão de verossimilhança estimada para os 56 modelos de evolução de seqüências disponíveis no programa Modeltest para o intron do *trnL*

Modelo	-lnL	LRT
JC	3953,58	0,00E+00
JC+I	3946,327	3,67E-03
JC+G	3942,201	5,76E-03
JC+I+G	3942,201	5,76E-03
K80	3928,164	1,29E-02
K3P	3926,075	1,40E-02
TrNef	3925,987	1,40E-02
TVMef	3924,587	1,47E-02
TIMef	3923,908	1,51E-02
SYM	3922,441	1,58E-02
K80+I	3920,898	1,66E-02
K3P+I	3918,908	1,76E-02
TrNef+I	3918,789	1,77E-02
TVMef+I	3917,148	1,85E-02
TIMef+I	3916,811	1,87E-02
K80+G	3916,658	1,88E-02
K80+I+G	3916,658	1,88E-02
SYM+I	3914,994	1,96E-02
K3P+G	3914,73	1,98E-02
K3P+I+G	3914,73	1,98E-02
TrNef+G	3914,822	1,97E-02
TrNef+I+G	3914,822	1,97E-02
TVMef+G	3912,978	2,06E-02
TVMef+I+G	3912,978	2,06E-02
TIMef+G	3912,648	2,08E-02
TIMef+I+G	3912,648	2,08E-02
SYM+G	3910,84	2,17E-02
SYM+I+G	3910,84	2,17E-02
F81	3892,911	3,09E-02
F81+I	3886,758	3,41E-02
F81+G	3882,385	3,63E-02
F81+I+G	3882,385	3,63E-02
HKY	3859,535	4,81E-02
TrN	3857,065	4,94E-02
HKY+I	3854,019	5,10E-02
K3Puf	3853,209	5,14E-02
TrN+I	3851,451	5,23E-02
TVM	3850,622	5,28E-02
HKY+G	3849,36	5,34E-02
HKY+I+G	3849,36	5,34E-02

Tabela 9. Estimativa de verossimilhança e estatística razão de verossimilhança estimada para os 56 modelos de evolução de seqüências disponíveis no programa Modeltest para o intron do *trnL*

Modelo	-lnL	LRT
GTR	3848,306	5,40E-02
K3Puf+I	3848,107	5,41E-02
TrN+G	3846,815	5,48E-02
TrN+I+G	3846,815	5,48E-02
TVM+I	3845,734	5,53E-02
TIM+I	3845,549	5,54E-02
K3Puf+G	3843,437	5,65E-02
K3Puf+I+G	3843,437	5,65E-02
GTR+I	3843,334	5,66E-02
TIM+G	3840,898	5,78E-02
TIM+I+G	3840,898	5,78E-02
TVM+G	3840,889	5,78E-02
TVM+I+G	3840,889	5,78E-02
GTR+G	3838,559	5,90E-02
GTR+I+G	3838,559	5,90E-02

Tabela 10. Estimativa de verossimilhança e estatística razão de verossimilhança estimada para os 56 modelos de evolução de seqüências disponíveis no programa Modeltest para a região do espaçador *trnT-L*

Modelo	-lnL	LRT
JC	3405,76	0,00E+00
K80	3403,232	1,48E-03
K3P	3403,158	1,53E-03
TrNef	3403,066	1,58E-03
TIMef	3402,991	1,63E-03
JC+I	3397,919	4,61E-03
TVMef	3396,857	5,23E-03
SYM	3396,559	5,41E-03
JC+GÊ	3395,924	5,78E-03
JC+I+G	3395,781	5,87E-03
K80+I	3395,036	6,31E-03
K3P+I	3394,842	6,42E-03
TrNef+I	3394,793	6,45E-03
TIMef+I	3394,591	6,57E-03
K80+G	3393,108	7,44E-03
K3P+G	3393,061	7,47E-03
TrNef+G	3392,971	7,52E-03

Tabela 10. Estimativa de verossimilhança e estatística razão de verossimilhança estimada para os 56 modelos de evolução de seqüências disponíveis no programa Modeltest para a região do espaçador trnT-L

Modelo	-lnL	LRT
TIMef+G	3392,924	7,55E-03
K80+I+G	3392,91	7,56E-03
K3P+I+G	3392,828	7,61E-03
TrNef+I+G	3392,749	7,66E-03
TIMef+I+G	3392,663	7,71E-03
TVMef+I	3388,859	9,95E-03
SYM+I	3388,673	1,01E-02
TVMef+G	3387,278	1,09E-02
SYM+G	3387,104	1,10E-02
TVMef+I+G	3386,915	1,11E-02
SYM+I+G	3386,751	1,12E-02
F81	3339,143	3,95E-02
F81+I	3333,832	4,27E-02
F81+G	3331,545	4,41E-02
F81+I+G	3331,441	4,41E-02
HKY	3330,882	4,45E-02
TrN	3330,825	4,45E-02
HKY+I	3326,281	4,72E-02
TrN+I	3326,273	4,72E-02
K3Puf	3325,868	4,75E-02
TIM	3325,817	4,75E-02
HKY+G	3323,841	4,87E-02
HKY+I+G	3323,797	4,87E-02
TrN+G	3323,777	4,87E-02
TrN+I+G	3323,744	4,88E-02
K3Puf+I	3322,344	4,96E-02
TIM+I	3322,329	4,96E-02
K3Puf+G	3319,931	5,10E-02
K3Puf+I+G	3319,918	5,11E-02
TIM+G	3319,857	5,11E-02
TIM+I+G	3319,849	5,11E-02
TVM	3316,759	5,30E-02
GTR	3316,751	5,30E-02
TVM+I	3315,036	5,40E-02
GTR+IÊ	3315,02	5,40E-02
TVM+G	3312,543	5,55E-02
TVM+I+G	3312,543	5,55E-02
GTR+G	3312,523	5,55E-02
GTR+I+G	3312,523	5,55E-02



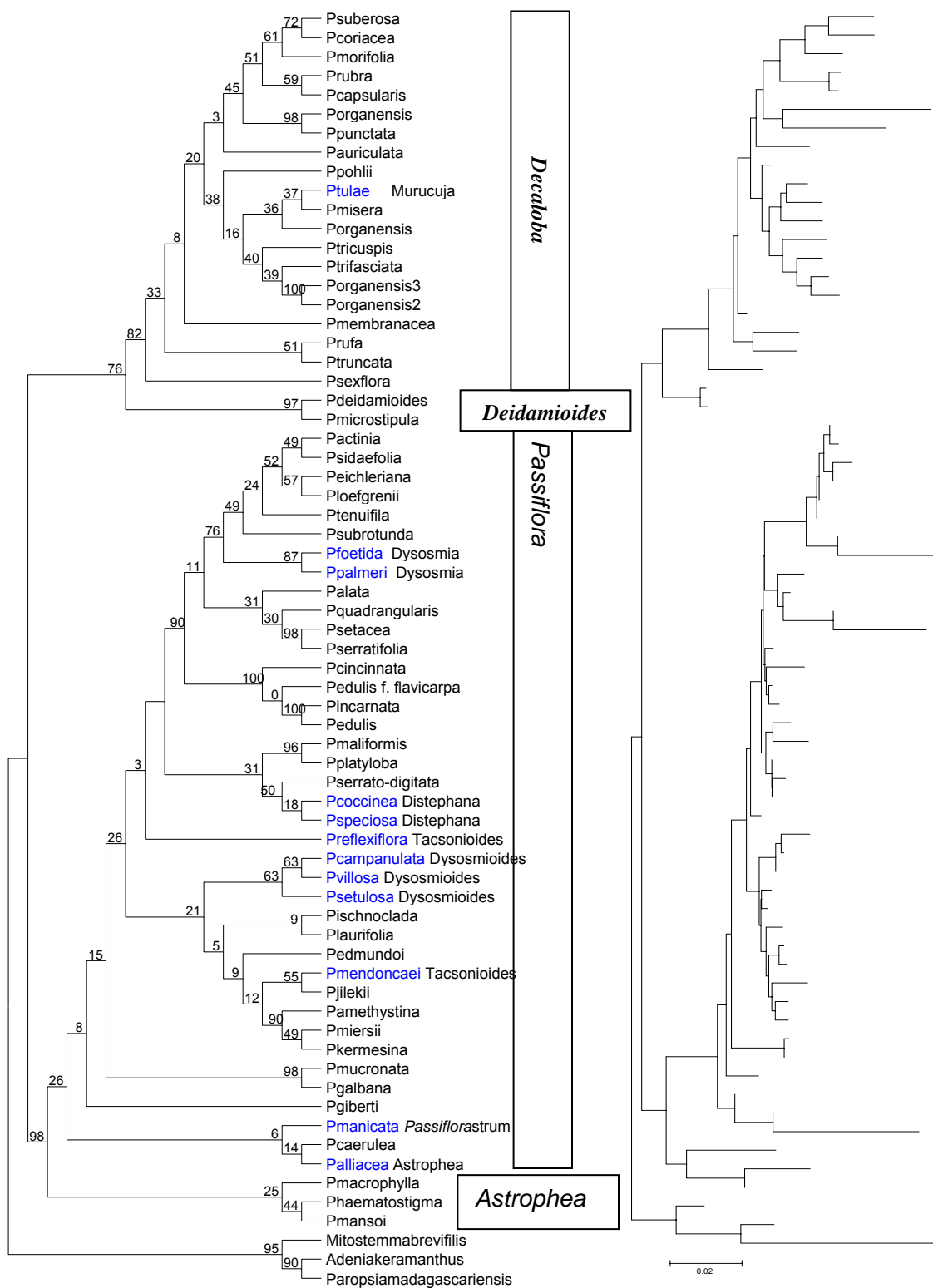


Figura 8 - Cladograma e filograma representando o relacionamento filogenético entre espécies de *Passiflora* utilizando a seqüência da região do espaçador *trnT-L*

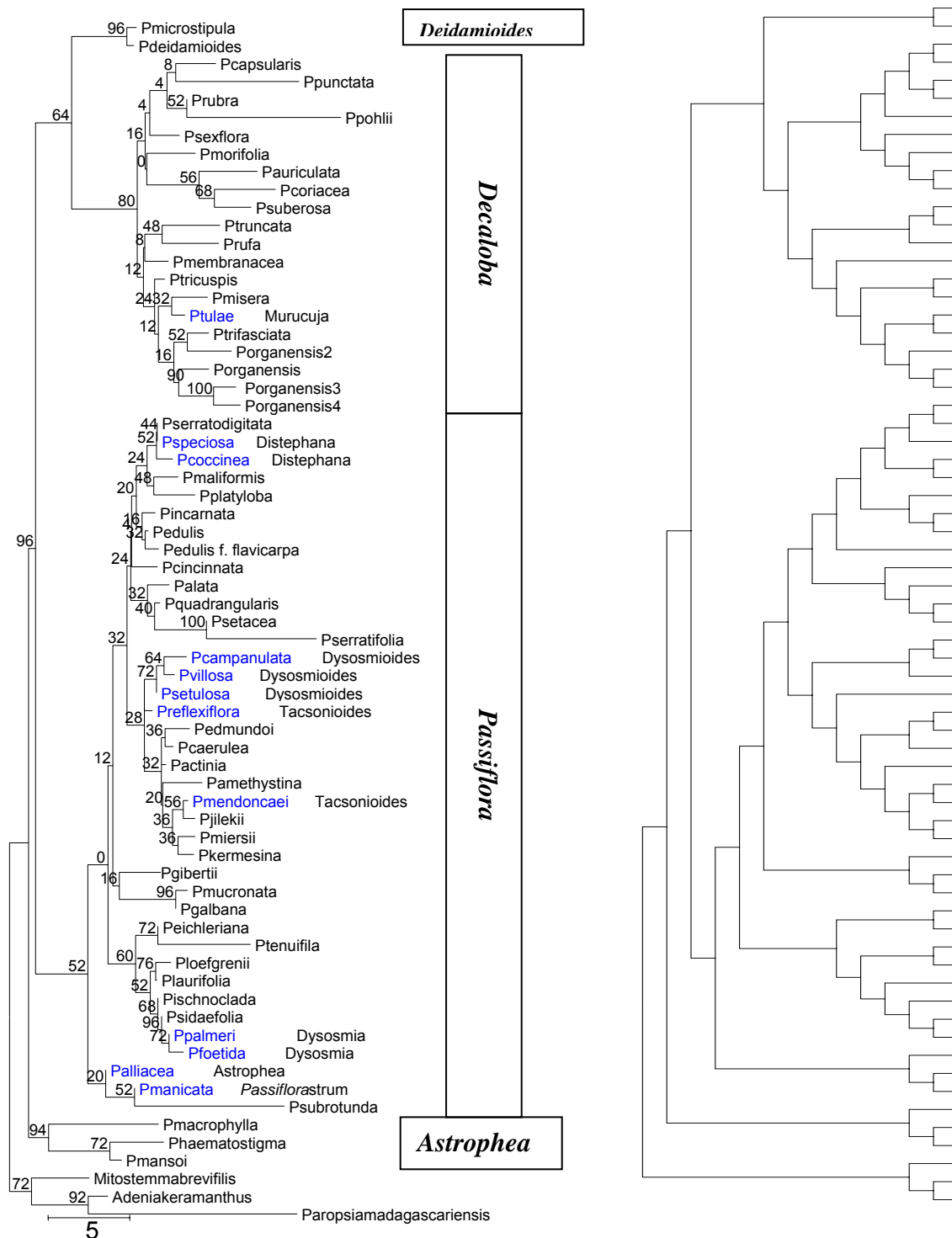


Figura 9 - Cladograma e filograma representando o relacionamento filogenético entre espécies de *Passiflora* utilizando a seqüência a região do espaçador *trnL-F*

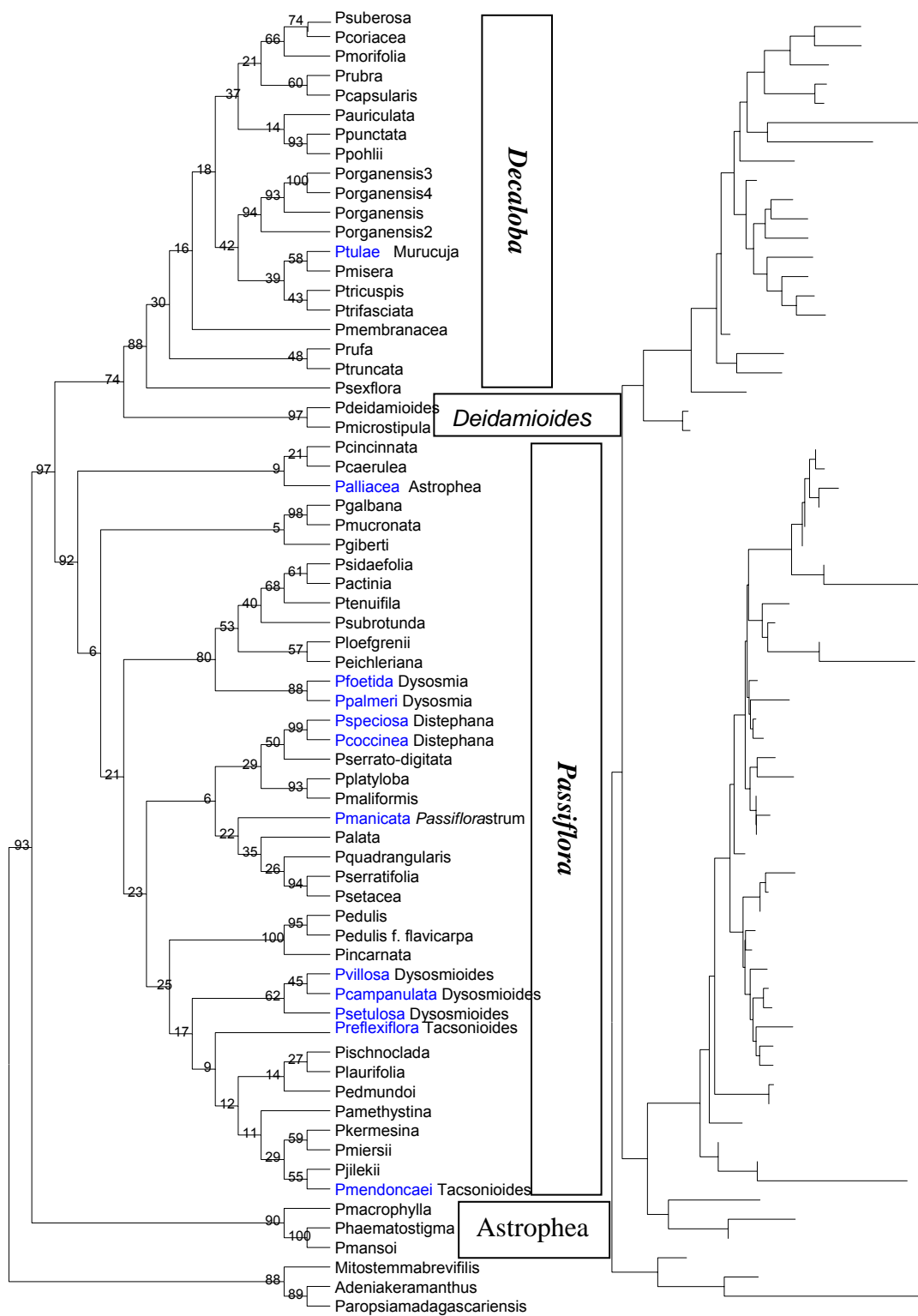


Figura 10 - Cladograma e filograma representando o relacionamento filogenético entre espécies de *Passiflora* utilizando a seqüência a região do intron do *trnL*

Alguns índices têm sido utilizados para verificar a aderência dos dados à árvore (Tabela 11). Dentre estes, o índice de consistência mede a aderência da série de transformações (mutações de um nucleotídeo para outro) e da matriz de dados à árvore, ou seja, é um índice que relaciona o número mínimo de passos na série de transformações e o número de vezes que o caráter aparece na árvore. Portanto, valores próximos de um indicam melhor aderência. O índice de retenção apresenta o mesmo significado, porém em uma escala diferente, sendo livre do viés que pode ser causado por autapomorfias (nucleotídeo único em um sítio de uma seqüência).

A árvore reconstruída com base na seqüência nucleotídica da região do espaçador intergênico *trnT-L* (Figura 8) apresentou um comprimento total de 289, índice de consistência de 0,6817 e de homoplasia de 0,3183. Desconsiderando os caracteres não-informativos, os índices de consistência e de homoplasia (similaridade devida à razões *diversas* que não ancestralidade comum) foram de 0,5306 e 0,4694, respectivamente. O índice de retenção foi igual a 0,8854 e o índice de consistência reescalado foi de 0,6036.

A árvore construída a partir da seqüência do espaçador do *trnL-F* (Figura 9) apresentou um comprimento total de 271, índice de consistência de 0,7269 e índice de homoplasia de 0,2731. Estes mesmos índices, excluindo-se os caracteres não informativos foram iguais a 0,5843 e 0,4157, respectivamente. O índice de retenção foi de 0,8462 e o índice de consistência reescalado foi de 0,6151.

Já para a seqüência correspondente ao intron do *trnL*, a árvore gerada (Figura 10) apresentou um comprimento total de 694, com índice de consistência de 0,9063 e de homoplasia 0,0937. Considerando apenas caracteres informativos, estes índices

apresentaram os valores de 0,8127 e 0,1873, respectivamente. O índice de retenção foi de 0,7833 e o índice de consistência reescalado foi de 0,7100.

Tabela 11. Índices de consistência (CI), homoplasia (HI), consistência (CI\*) e homoplasia (HI\*) desconsiderando os caracteres não-informativos, retenção (RI) e consistência reescalado (CIR)

Índice	Região		
	Espaçador trnL-F	Intron trnL	Espaçador trnT-L
CI	0,7269	0,9063	0,6817
HI	0,2731	0,0937	0,3183
CI*	0,5843	0,8127	0,5306
HI*	0,4157	0,1873	0,4694
RI	0,8462	0,7833	0,8854
CIR	0,6151	0,7100	0,6036
Comprimento total	271	694	289

Foi possível verificar de forma clara o agrupamento das espécies em três grandes grupos principais, com altos valores de *bootstrap*. Num primeiro grupo foram agrupadas todas as espécies do subgênero *Decaloba* utilizadas neste estudo. Além das espécies deste subgênero, foram alocadas neste grupo, em todas as árvores apresentadas, as espécies *P. tulae* (subgênero *Murucuja*) e *P. microstipula* e *P. deidamioides* (subgênero *Deidamioides*). A filogenia insere o subgênero *Murucuja* Killip no clado que inclui as espécies de *Decaloba* Killip, formando um grupo monofilético que coincide com *Decaloba sensu* MacDougal & Feuillet. Assim, *Decaloba* Killip deve passar a ser considerado um gênero. É interessante verificar que a inclusão do subgênero *Murucuja* dentro do gênero *Decaloba* coincide com a reorganização proposta por MacDougal e Feuillet<sup>1</sup>.

Mesmo com valores de *bootstrap* (média de 42) bem modestos, algumas características podem ser citadas como comuns aos subgêneros Decaloba e Murucuja: (i) presença de brácteas em forma linear a setácea presentes ao longo do pedúnculo; (ii) correlação quase perfeita, somente encontrada entre estes dois subgêneros, entre espécies com pecíolos sem glândulas e a forma das sementes; (iii) estilos unidos na base, projetando-se do centro para o topo do ovário, (iv) estípulas inteiras, (v) são os grupos de maior variação foliar (Killip, 1938).

O subgênero Deidamioides caracteriza-se por ser o único do gênero *Passiflora* que apresenta folhas compostas, trifoliadas. A característica que o aproxima de Decaloba seria o opérculo plissado. Porém, a distância entre as espécies *P. microstipula* e *P. deidamioides* (subgênero Deidamioides) das espécies de Decaloba, e a característica foliar que lhe é peculiar, indicam que Deidamioides pode constituir um subgênero distinto como propõem Feuillet e MacDougal<sup>2</sup> (comunicação pessoal) e Yockteng e Nadot (2004). Porém estudos mais detalhados devem ser realizados, pois os estudos de Muschner *et al* (2003) não dão suporte a esta reorganização, uma vez que marcadores distintos resultam em posições ambíguas deste grupo, ou seja, dependendo do marcador utilizado, as espécies do subgênero Deidamioides se localizam em pontos diferentes dentro da árvore filogenética. No presente trabalho, fica evidente que as distâncias entre os grupos é bem superior que as distâncias dentro dos grupos. Esse resultado ressalta a homogeneidade intra-grupo e a perfeita distinção entre grupos. A distância entre Decaloba e Deidamioides é praticamente a mesma existente entre Decaloba e Astrophea, os quais, definitivamente, são subgêneros

---

<sup>2</sup> MacDougal (Missouri Botanical Garden)

distintos; portanto, a disposição de Deidamioides como um dos quatro subgêneros de *Passiflora* propostos por Feuillet e MacDougal recebe suporte deste trabalho.

Outro grande *cluster* formado foi aquele que alocou todas as espécies do subgênero *Passiflora*. Além destas, foram incluídas neste grupo as espécies dos subgêneros *Dysosmia* (*P. foetida* e *P. palmeri*), *Distephana* (*P. speciosa* e *P. coccinea*), *Granadillastrum* (*P. manicata*), *Dysosmioides* (*P. villosa*, *P. campanulata* e *P. setulosa*), *Tacsonioides* (*P. reflexiflora* e *P. mendoncae*). Este agrupamento, apesar de não estar de acordo com qualquer característica morfológica compartilhada por estes subgêneros, também foi estabelecida nas filogenias anteriormente publicadas para o gênero utilizando marcadores distintos, tanto cloroplastidiais quanto nucleares (Muschner *et al*, 2003 e Yockteng e Nadot, 2004). Agrupando-se ao grado *Decaloba sensu* Killip, além das espécies que pertencem a este subgênero, têm-se as seguintes espécies: *P. manicata* (*Granadillastrum*) e *P. tulae* (*Murucuja*). Assim como no caso do subgênero *Decaloba*, a reunião destes subgêneros em um único vai de encontro com a proposta de MacDougal e Feuillet.

No grupo estão incluídas as espécies do subgênero *Dysosmia*, que em outras filogenias estão alocadas em grupo-irmão do subgênero *Passiflora*. Maiores detalhes sobre o posicionamento deste grupo serão discutidos no item sobre análise morfométrica.

A provável inclusão dos subgêneros *Granadillastrum*, *Murucuja* e *Dysosmia* junto a *Passiflora* pode ser devida à divergência anterior de *Decaloba* do restante do gênero. Pelo fato de *Passiflora* e os demais subgêneros serem mais recentes, não houve tempo evolutivo suficiente para uma completa separação entre eles. Tal fato é

corroborado, por exemplo, pela dispersão da série Lobatae ao longo de vários subgrupos de *Passiflora*.

A proximidade de *P. edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo) de *P. edulis* (maracujá roxo) corrobora a hipótese de que a forma amarela deva ter surgido a partir da forma roxa por mutações (Degener, 1933). A facilidade de cruzamento entre estas duas formas (Payán e Martin, 1975) também ajuda a fortalecer a teoria de origem por mutação. Porém, analisando as distâncias patrísticas das várias espécies à forma amarela de *P. edulis*, verifica-se que a menor distância está associada à *P. incarnata*, o que traz dúvidas quanto à hipótese de origem por mutação. Este resultado é um tanto quanto inesperado, uma vez que estas duas espécies não são simpátricas. Enquanto *P. edulis* é nativa das regiões do Brasil e Argentina, *P. incarnata* é restrita aos Estados Unidos (Martin e Nakasone, 1970). Porém, a proximidade das duas formas de *P. edulis*, detectada tanto por marcadores de cloroplasto (presente trabalho) quanto por marcadores nucleares (Yockteng e Nadot, 2004) mostra que a teoria de origem de *P. edulis* f. *flavicarpa* por hibridação (Pope, 1935) parece ser a hipótese menos provável.

O terceiro grupo, com altos valores de *bootstrap* (média igual a 94) é formado exclusivamente por espécies do subgênero *Astrophea*. Entretanto, a monofilia para este grupo não pode ser considerada, uma vez que a espécie *P. alliacea* não agrupou-se neste clado. Este fato também foi observado na filogenia de Yockteng e Nadot (2004). Estes autores observaram o agrupamento de *P. candida* (secção *Pseudoastrophea*) juntamente com espécies do subgênero *Decaloba*. Os autores por não conseguirem explicar este agrupamento, especulam sobre a possível identificação incorreta da espécie. Resultado semelhante obtido no presente trabalho reabre esta discussão. A posição basal deste grupo confirma a hipótese de Benson (1975) de que



Astrophea seja ancestral das *Passifloras*, composto por trepadeiras lenhosas, arbustos e até mesmo árvores, com nectários extraflorais reduzidos e inflorescências de estrutura relativamente simples.

#### 4.2 Análise morfométrica

Os caracteres morfométricos analisados foram capazes de distinguir corretamente as dez espécies selecionadas para este estudo. Estas espécies foram escolhidas devido à grande variabilidade que apresentam quanto à forma de suas folhas e padrão de nervação, compreendendo grande parte das formas encontradas dentro do gênero. O dendrograma (Figura 11) mostra claramente a divisão destas espécies em dois grandes grupos que correspondem aos subgêneros *Passiflora* e *Decaloba* (Killip, 1938).

A única exceção foi *P. miersii*, uma espécie que pertence ao subgênero *Passiflora*, mas que foi agrupada juntamente com o grupo que contém as espécies do subgênero *Decaloba*.

Este agrupamento pode ser explicado por aspectos morfológicos que aproximam a série *Kermesinae* (*P. miersii*) do subgênero *Decaloba*, como a presença de opérculo plissado nos dois grupos.

*P. foetida* foi agrupada junto com as espécies do subgênero *Decaloba*, porém esta pertence ao subgênero *Dysosmia*. Além da filogenia aqui apresentada, duas outras recentemente publicadas para *Passiflora* (Muschner *et al*, 2003; Yockteng and Nadot, 2003) mostraram que *Dysosmia* parece ser filogeneticamente mais relacionado às espécies do subgênero *Passiflora* que *Decaloba*. Contudo, a presença de flores pequenas salienta a proximidade à *Decaloba*. Outro fato que mostra esta proximidade

de *Dysosmia* ( $2n = 20$ ) a *Decaloba* é o número cromossômico  $2n = 20$  e  $2n = 18$ , também apresentado por *P. gracilis*, uma espécie do subgênero *Decaloba* seção *Cieca* (Soares-Scott, 1998; Bowden, 1945).

Estes resultados mostram que o subgênero *Dysosmia* (*P. foetida*, *P. chlatrata* e *P. palmeri*) parece ser intermediário entre os subgêneros *Decaloba* e *Passiflora*, mesmo apresentando um conjunto de características únicas como brácteas pinasetadas, glândulas do pecíolo modificadas em pelos e ausência de gavinhas (Yockteng e Nadot, 2003) e número cromossômico ( $2n = 20$ , além de 18 e 22) (Melo *et al.*, 2001; Soares-Scott, 1998). Essa posição intermediária é também verificada pelo trabalho de Melo e Guerra (2003) que mostra que *P. foetida* ( $2n = 20$ ) apresenta 4 sítios 5S, enquanto no subgênero *Passiflora* são detectados apenas 2 destes sítios e em *Decaloba* o número de sítios é de dois, quatro ou seis. Os seis sítios 45S estão posicionados na região proximal em *P. foetida*. No subgênero *Passiflora*, todos os sítios, quatro ou seis, dependendo da espécie, estão situados na região subterminal, enquanto em algumas espécies de *Decaloba*, estes sítios estão situados na região proximal (Melo e Guerra, 2003 e Cuco *et al.*, 2004).

O segundo grupo foi composto por espécies que pertencem exclusivamente ao subgênero *Passiflora*. É interessante notar que todas as espécies que pertencem à série *Lobatae* formaram um subclado composto exclusivamente por tais espécies. Dentro deste clado pode-se verificar grande variabilidade dentro das espécies, destacando-se *P. caerulea* como a espécie que apresenta maior variabilidade.

Mesmo todas as espécies apresentando uma certa variabilidade, estas formaram grupos altamente consistentes, isto é, os quatro indivíduos de cada espécie

sempre agruparam entre si, mostrando a eficácia do método em distinguir corretamente as espécies (Figura 11).

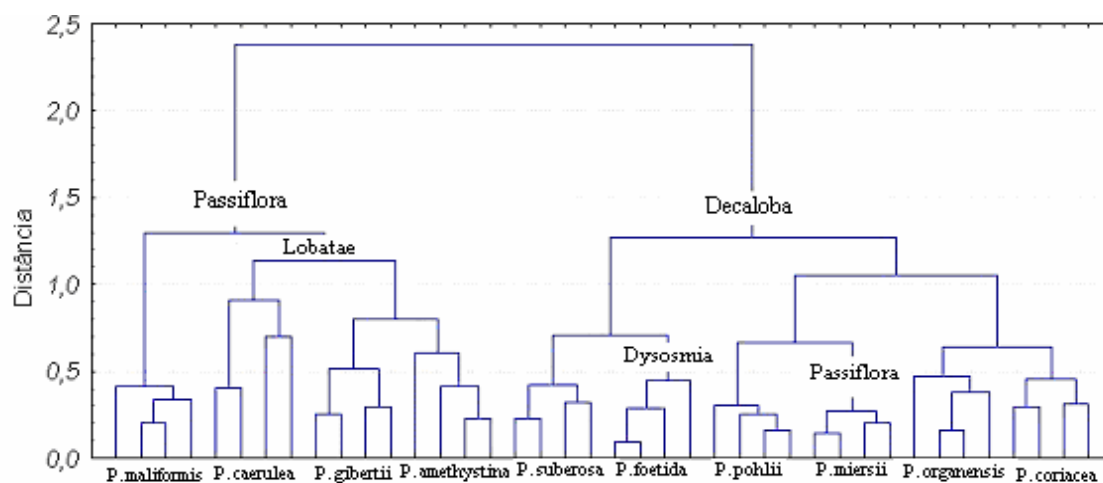


Figure 11 - Dendrograma mostrando o agrupamento de dez espécies de *Passiflora* (*sensu* Killip) com base em características morfométricas foliares

O dendrograma gerado pelos dados morfométricos apresentam uma alta similaridade com a classificação botânica atualmente aceita para o gênero *Passiflora*. Este aspecto mostra a consistência e acurácia do método e revela a presença de um conceito cladístico e filogenético, uma vez que a forma das folhas é muito bem descrita pela curva de dimensão fractal multiescala.

Como a classificação botânica mostra-se associada à caracterização das espécies por dimensão fractal multiescala, pode-se estimar distâncias genéticas com base em coeficientes de dissimilaridade entre as espécies analisadas e, conseqüentemente, correlacioná-las àquelas obtidas pelas diferenças encontradas entre as seqüências de DNA cloroplastidial.

As análises mostraram que a correlação entre as topologias do dendrograma e das árvores filogenéticas é bastante alta: 0,777 (p-valor = 0,004). Esta semelhança reflete-se também nas distâncias genéticas entre as espécies obtidas por estes diferentes enfoques. Mesmo a correlação sendo apenas 0,38, mostra-se significativa, com um p-valor de 0,018.

A eficiência do método pode ser facilmente verificada pela distinção entre duas espécies altamente aparentadas e com formato de folha muito similar: *P. amethystina* e *P. gibertii*. Estas espécies puderam ser distinguidas, porém a proximidade filogenética existente entre elas fica evidenciada, já que o dendrograma mostra que elas são mais próximas uma da outra que qualquer delas em relação à *P. caerulea*, outra espécie da série Lobatae.

O método, surpreendentemente, não agrupou espécies com base apenas na presença ou número de lobos nas folhas. Intuitivamente, esta característica seria, talvez, o primeiro critério a ser utilizado e, portanto, seria esperada a separação das dez espécies analisadas em pelo menos dois grandes grupos: um com folhas lobadas e outro com folhas inteiras. Este fato pode ser exemplificado no grupo formado por *P. miersii* e *P. pohlii*. A primeira apresenta folhas não-lobadas, enquanto *P. pohlii* apresenta-se com dois pequenos lobos. Talvez, o uso conjunto de dados de contorno e padrão de nervação possam responder a esta questão. A utilização apenas da borda do limbo foliar poderia resultar na distribuição esperada, ou seja, o padrão de nervação pode estar contribuindo com informações que evitariam a existência de viés no agrupamento das espécies devido à presença ou número de lobos.

Para cada uma das 40 amostras, foi realizada a extração do mapa de contorno e das nervuras, e para cada mapa foi calculada a curva de dimensão fractal

multiescala. A Figura 12 apresenta as curvas multiescala dos mapas de contorno e a Figura 13 as curvas correspondentes às nervuras. Os gráficos foram organizados por espécie. Deste modo, cada gráfico apresenta quatro curvas correspondentes a uma determinada espécie. Analisando estes resultados, pode-se observar que as curvas de dimensão fractal estão caracterizando as espécies como assinaturas digitais, podendo ser utilizadas diretamente como vetores de características.

A partir daí, para cada curva de dimensão fractal foram extraídas 12 características, sendo estas referentes às coordenadas x e y dos pontos característicos ( $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$ ). As Tabelas 12 apresentam os vetores de características, obtidos a partir da análise das bordas e nervuras. Cada espécie é representada por quatro espécimes, que correspondem às quatro linhas da Tabela 12.

A identificação das folhas das folhas foi realizada através do método *k-means*, utilizado em aglomerados estatísticos (Duda *et al.*, 1973). A classificação para as 40 amostras foi realizada com 100% de acerto. Este resultado indica o grande potencial do método na identificação automática de espécies vegetais através das formas de suas folhas e seus respectivos padrões de nervação, além de mostrar-se eficiente na detecção de variabilidade morfológica e, mais importante ainda, apresentar um apelo cladístico e filogenético.

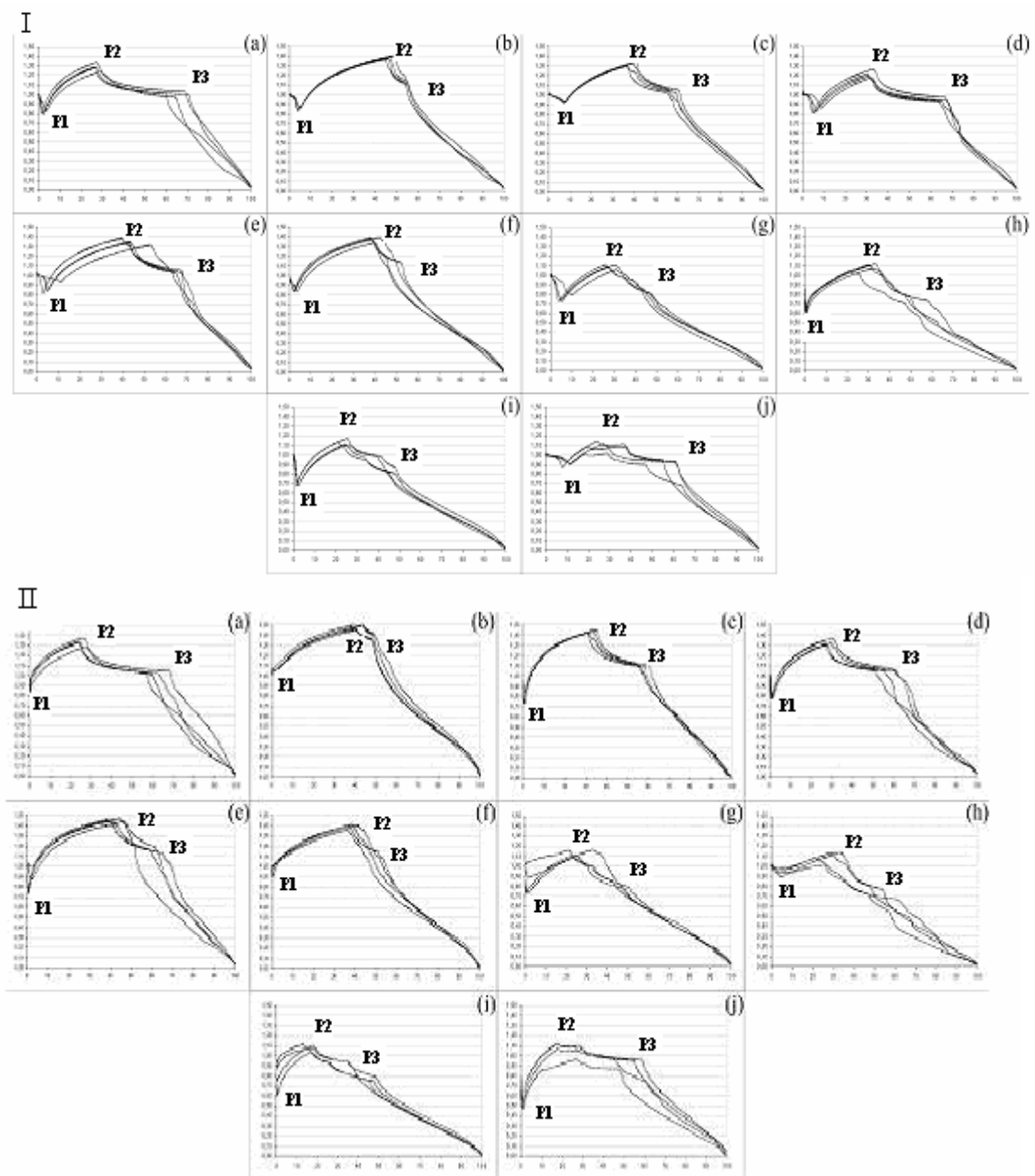


Figura 12 - Gráficos contendo curvas de dimensão fractal das nervuras (I) e das bordas (II) das folhas. (a) *P. coriacea*, (b) *P. foetida*, (c) *P. miersii*, (d) *P. organensis*, (e) *P. pohlii*, (f) *P. suberosa*, (g) *P. amethystina*, (h) *P. caerulea*, (i) *P. gibertii* e (j) *P. maliformis*

Tabela 12. Valores característicos (P1, P2 e P3) relativos à borda de dez espécies de

Espécime	Borda					
	P1		P2		P3	
	X	Y	X	Y	X	Y
<i>P. coriacea</i>	0,1925	0,5522	0,2251	0,6795	0,9545	0,5540
	0,1178	0,5663	0,2250	0,7905	0,9171	0,6147
	0,2017	0,6232	0,1937	0,6812	0,7186	0,5825
	0,2964	0,6452	0,2787	0,5808	0,8195	0,5034
<i>P. foetida</i>	0,3560	0,6627	0,7569	0,9545	0,5710	0,9545
	0,4034	0,7483	0,6996	0,9159	0,6056	0,8081
	0,3676	0,6790	0,6496	0,8733	0,5909	0,7671
	0,4269	0,7709	0,6753	0,8816	0,5940	0,7744
<i>P. miersii</i>	0,5877	0,8964	0,5608	0,7988	0,7347	0,6476
	0,6313	0,9301	0,5187	0,7697	0,6249	0,6656
	0,6382	0,9238	0,4545	0,7168	0,6231	0,5964
	0,6165	0,9045	0,4395	0,6982	0,6992	0,6059
<i>P. organensis</i>	0,3959	0,6095	0,3671	0,6281	0,8664	0,5106
	0,5448	0,6333	0,3007	0,4602	0,8344	0,4303
	0,7501	0,7304	0,3372	0,4168	0,8005	0,4229
	0,4440	0,5851	0,2928	0,5064	0,8780	0,4575
<i>P. pohlii</i>	0,4051	0,6594	0,6083	0,8247	0,8825	0,6108
	0,4528	0,7165	0,5979	0,8143	0,8913	0,6088
	0,2407	0,5927	0,5292	0,9115	0,8872	0,6486
	0,9457	0,9545	0,9545	0,7484	0,8724	0,3025
<i>P. suberosa</i>	0,2974	0,6779	0,5181	0,7914	0,4074	0,7291
	0,1682	0,6729	0,4798	0,9186	0,5500	0,8196
	0,2445	0,7194	0,5001	0,8931	0,3868	0,9480
	0,1943	0,6594	0,5928	0,9229	0,4979	0,8350
<i>P. amethystina</i>	0,3156	0,3664	0,1917	0,2683	0,2668	0,4548
	0,8361	0,5698	0,3210	0,1507	0,2912	0,4247
	0,4065	0,4177	0,2155	0,2121	0,1924	0,4755
	0,4099	0,3680	0,3142	0,2613	0,3700	0,2539
<i>P. caerulea</i>	0,0484	0,1466	0,0795	0,1078	0,2373	0,2121
	0,0604	0,0948	0,3020	0,2613	0,2103	0,5459
	0,0455	0,1902	0,3762	0,2882	0,5010	0,1466
	0,0669	0,0455	0,3619	0,1807	0,6929	0,0455
<i>P. gibertii</i>	0,1143	0,2219	0,0661	0,3152	0,2761	0,5296
	0,1143	0,2127	0,1807	0,4052	0,3211	0,5252
	0,1733	0,1813	0,1305	0,2064	0,1593	0,4626
	0,1736	0,2214	0,1611	0,2662	0,1503	0,4987
<i>P. maliformis</i>	0,9543	0,8605	0,2669	0,0455	0,0455	0,5844
	0,8006	0,9226	0,1475	0,3319	0,2163	0,7674
	0,6596	0,7831	0,0455	0,2077	0,0666	0,6790
	0,9545	0,8750	0,2192	0,2707	0,2313	0,7140

Tabela 12 . Valores característicos (P1, P2 e P3) relativos à nervura das dez espécies de *Passiflora*

Espécime	Nervura					
	P1		P2		P3	
	X	Y	X	Y	X	Y
<i>P. coriacea</i>	0,0758	0,6537	0,3508	0,6510	0,8278	0,4783
	0,0618	0,7535	0,4220	0,7174	0,9545	0,4929
	0,0597	0,7969	0,3677	0,6467	0,7081	0,4851
	0,1077	0,6381	0,4508	0,5726	0,7689	0,4551
<i>P. foetida</i>	0,0455	0,9545	0,8739	0,9545	0,5526	0,9509
	0,1078	0,9168	0,8842	0,9195	0,5332	0,9545
	0,1072	0,9269	0,7942	0,8718	0,5148	0,9030
	0,1100	0,9259	0,8060	0,8445	0,5308	0,8863
<i>P. miersii</i>	0,1953	0,4644	0,6464	0,8485	0,7836	0,5757
	0,1766	0,4589	0,6072	0,8224	0,6616	0,5886
	0,2065	0,6300	0,5314	0,8004	0,6947	0,5589
	0,1759	0,4720	0,5463	0,7970	0,7361	0,5588
<i>P. organensis</i>	0,2475	0,5263	0,5248	0,7137	0,7741	0,5272
	0,3017	0,5347	0,5034	0,6239	0,7940	0,5017
	0,3490	0,5235	0,4389	0,6184	0,5825	0,4996
	0,2143	0,5142	0,4048	0,6502	0,6834	0,4961
<i>P. pohlii</i>	0,2091	0,4704	0,9212	0,8816	0,8072	0,6843
	0,5282	0,8788	0,8264	0,8418	0,7611	0,6436
	0,1663	0,5109	0,7429	0,8647	0,8826	0,6121
	0,4751	0,6869	0,9545	0,8306	0,5924	0,7060
<i>P. suberosa</i>	0,0621	0,8229	0,6932	0,6885	0,4261	0,6188
	0,0781	0,8172	0,7033	0,7662	0,5917	0,6245
	0,1768	0,7468	0,7436	0,7805	0,4559	0,7338
	0,0636	0,8521	0,8338	0,7689	0,4631	0,8209
<i>P. amethystina</i>	0,1258	0,9467	0,2734	0,3671	0,2027	0,4370
	0,3130	0,7143	0,5911	0,3708	0,3900	0,3848
	0,1857	0,4666	0,3453	0,2973	0,1946	0,4314
	0,1878	0,4900	0,3388	0,2470	0,5561	0,1294
<i>P. caerulea</i>	0,7666	0,8265	0,2625	0,2356	0,2844	0,2390
	0,7339	0,8672	0,5013	0,3250	0,3456	0,3624
	0,5993	0,7932	0,6284	0,3268	0,5648	0,1887
	0,9545	0,7354	0,4102	0,1278	0,7421	0,0455
<i>P. gibertii</i>	0,1470	0,8037	0,0455	0,2866	0,2436	0,3717
	0,2000	0,5318	0,1761	0,2686	0,2413	0,3704
	0,2148	0,7296	0,1192	0,2254	0,0769	0,3413
	0,2117	0,3020	0,1420	0,1627	0,0455	0,3602
<i>P. maliformis</i>	0,2057	0,1555	0,1800	0,3021	0,1184	0,5608
	0,2372	0,0455	0,4416	0,0455	0,5117	0,2756
	0,2328	0,1931	0,1780	0,2967	0,0630	0,5528
	0,2021	0,0733	0,1876	0,2152	0,1473	0,5185



#### 4.3 Marcadores microssatélites: um estudo preliminar

De acordo com a metodologia utilizada para o desenvolvimento de uma biblioteca enriquecida de microssatélites, foram obtidos 82 clones que possivelmente continham repetições (determinação via PCR) do tipo microssatélite para a espécie *P. alata* e 81 para *P. pohlii*. Destes, 53 clones (64,6 %) de *P. alata* apresentaram alguma seqüência repetitiva que possibilitou sua inclusão na biblioteca. Para *P. pohlii*, este número foi de 37 (45,7 %). Os 29 clones restantes, apesar de amplificados via PCR, não continham repetições do tipo microssatélite, ou seja, o fragmento que foi clonado não continham este tipo de repetições. Os clones que realmente continham microssatélites (repetições de di, tri, tetra e pentanucleotídeos), com um número mínimo de repetições (conforme detalhado no item Material e Métodos), estão listados na Tabela 14, que mostra o código atribuído ao clone, o motivo repetido e o número de vezes que este é repetido. Estes clones somam 12 em *P. pohlii* (14,8 % da amostra inicial) e 26 em *P. alata* (30,5 %).

Dos clones positivos para os quais foi possível o desenho de *primers*, 30 (30,7 %) apresentavam como seqüência repetitiva um dinucleotídeo, sendo a repetição TG/CA a mais freqüente dentro desta classe (35,7 %). Nenhuma repetição AT/AT, CG/CG ou GC/GC foi encontrada. Cinco (11,4 %) microssatélites com repetições de trinucleotídeos foram detectadas, enquanto oito (18,2 %) clones apresentavam repetições de tetra ou pentanucleotídeos. Apenas um clone apresentava um microssatélite composto  $(CA)_3(CT)_2$ .

Dos clones positivos, foi possível o desenho de 14 primers (17 % considerando os 81 clones iniciais) para *P. alata* e 5 (6,2 %) para *P. pohlii* (Tabela 15). Este

rendimento enquadra-se perfeitamente dentro do relatado na literatura (dados de 1999 a 2001): que varia de 0,04 a 12 % (Zane *et al.*, 2002).

Tabela 14. Relação dos clones nos quais foram encontradas seqüências repetitivas do tipo microssatélite e sua descrição. A primeira letra do clone representa a espécie do qual a seqüência foi isolada: A para *P. alata* e P para *P. pohlii*

<b>Clone</b>	<b>Motivo</b>
A4EP3	(ATA) <sub>6</sub> (CA) <sub>3</sub> (CT) <sub>2</sub>
A5HP3	(GA) <sub>7</sub>
A7HP3	(CA) <sub>9</sub>
A7FP3	(TTAA) <sub>15</sub>
A7CP3	(GT) <sub>8</sub>
A7DP3	(AAAAT) <sub>3</sub>
A7AP3	(TA) <sub>8</sub> (CT) <sub>115</sub>
A6HP3	(TG) <sub>25</sub>
A6AP3	(AC) <sub>9</sub>
A3EP3	(TG) <sub>9</sub>
A1BP3	(GA) <sub>11</sub>
A3FP3	(AG) <sub>51</sub>
A2FP3	(CT) <sub>37</sub>
A2EP3	(TGT) <sub>5</sub>
A1FP3	(TTG) <sub>5</sub> (TG) <sub>9</sub>
A9DP1	(TGGT) <sub>6</sub>
A9FP1	(TG) <sub>9</sub>
A7DP1	(CAAC) <sub>4</sub> (TGCAT) <sub>3</sub>
A8FP1	(TG) <sub>9</sub>
A6FP1	(GAA) <sub>28</sub>
A8GP1	(CT) <sub>50</sub>
A7AP1	(GA) <sub>18</sub>
A6AP1	(TG) <sub>9</sub>
A7GP1	(CT) <sub>50</sub>
A7HP1	(TG) <sub>9</sub>
A9AP1	(GA) <sub>16</sub>
P2EP2	(TG) <sub>14</sub>
P3DP2	(GT) <sub>9</sub>
P3FP2	(TTA) <sub>5</sub>
P5GP2	(TTTTA) <sub>3</sub> (TC) <sub>11</sub> (CA) <sub>13</sub>
P6BP2	(CA) <sub>7</sub>
P6CP2	(GT) <sub>18</sub>

Tabela 14. Relação dos clones nos quais foram encontradas seqüências repetitivas do tipo microssatélite e sua descrição. A primeira letra do clone representa a espécie do qual a seqüência foi isolada: A para *P. alata* e P para *P. pohlii*

Clone	Motivo
P6DP2	(CT) <sub>42</sub>
P6EP2	(GT) <sub>6</sub>
P7EP2	(GA) <sub>11</sub>
P8BP2	(TG) <sub>19</sub>
P9DP2	(AAACC) <sub>4</sub>
P8GP2	(CAAA) <sub>4</sub>

Tabela 15. *Primers* desenhados com base na análise das seqüências clonadas a partir da biblioteca enriquecida com microssatélites de *P. alata* e *P. pohlii*

Clone	Primer	Primer Direto (5´-3´)	Primer Reverso (5´-3´)
1BP3	A1BP3	GCGGGATTCTCTTGCCCTTAC	ACAAAACACATCAGCCACCA
1FP3	A1FP3	AGAGTCGTCTAACCCTCTTGC	TCTTGCTTACGCGTGGACTA
2FP3	A2FP3	TTACGCGTGGACTAGCCTGT	GTGCTTGTGAGGAGGCAAC
3FP2	P3FP2	CTCTTGCTTACGCGTGGA	CGGCGGTCTCTGAAAA
3AP3	A3AP3	GCCTTAGCTTGCAACTTTCG	GGAGGCAACCCGAGTATAAA
4EP3	A4EP3	TACCCGACGCATCTCTGAA	ACCCAGGTTGGAGGGAAT
4AP2	P4AP2	CTCTCGCTGCGGATGCT	GTGGCACGTGAGTCTCATA
4FP2	P4FP2	CCCGAATGTTGTGGAAAAT	TATTGGTGCCGAAAATCCTT
5GP2	P5GP2	CCTCCTCCTCTGGACTTTTC	TGGCTTCTGTCTTCGCTTC
5HP3	A5HP3	CCTGCTCCTAAGTGGACTCG	ACCACCCCAACATTTTCAAT
6FP1	A6FP1	GGCGGAAGAAAAGAGAAG	GAAACACACGATGCGAAAA
7DP1	A7DP1	CGAACTGTGACACCGAGGA	CGGCTTCATCTCGGGTAG
7FP1	A7FP1	GGAAGTGAAGGAGAAGAAGA	CCCTCTGGTTGTCTACCTAC
7GP1	A7GP1	TAACCGACTTCGCCACA	GAGCAGGGGAAGAAAAGGA
7AP3	A7AP3	AGTGAGAAGCAGCCTCGGTA	AAAAAGGAGAGAGGAGCATCG
7CP3	A7CP3	TGTCCCTCTCTCGGTGGTAG	TCTGACTCATTCCCCCTTG
8BP2	P8BP2	CCTTGATTTCATCCTGTT	TACTGTTATCTTTGCAGGA
9DP1	A9DP1	TGGCAATTTGGTGGTTGA	CCTTAACCGCGTTGGA
9FP1	A9FP1	CACATTTGCCGTCCTG	TGTTGTAGTGTGAGTTGGT

Da relação de *primers* mostrada na Tabela 15, foram sintetizados e avaliados os pares: P08BP2, P05GP2, P03FP2, P04AP2, P04FP2, A08FP1, A07FP1, A01BP3, A01FP3, A03AP3, A09DP1, A06FP1 e A08GP1.

A Tabela 16 resume os dados obtidos no estudo de transferibilidade destes pares de *primers* para 80 espécies da família *Passifloraceae*. Quando a transferibilidade foi observada, esta é indicada pelo algarismo 1.

Tabela 16. Transferibilidade dos primers isolados de *P. alata* e *P. pohlii* para outras espécies de *Passiflora*

Espécie	Primer							
	P08BP2	A08FP1	A03AP3	P05GP2	P03FP2	A09DP1	A01BP3	P04AP2
<i>P. setacea</i>	1	1					1	1
<i>P. morifolia</i>	1	1	1				1	
<i>P. miersii</i>	1	1	1	1			1	
<i>P. sanguinolenta</i>	1	1	1		1		1	
<i>P. tenuifila</i>	1	1	1	1			1	
<i>P. manicata</i>	1	1	1				1	1
<i>P. loefgrenii</i>	1	1	1				1	
<i>P. quadrangularis</i>	1	1	1		1		1	1
<i>P. coriacea</i>		1		1	1		1	
<i>P. serrato-digitata</i>	1	1	1		1		1	
<i>P. palmeri</i>	1	1	1				1	1
<i>P. incarnata</i>	1	1		1			1	
<i>P. organensis</i>	1	1	1		1		1	
<i>P. quadrangularis</i>	1	1	1		1		1	
<i>P. tricuspis Pantanal</i>	1	1	1		1		1	1
<i>P. tricuspis MG</i>	1	1			1			1
<i>P. sidaefolia</i>		1			1		1	1
<i>P. rubra</i>				1			1	1
<i>P. edulis</i>		1		1	1		1	1
<i>P. amethystina</i>		1		1	1		1	1
<i>P. suberosa</i>	1	1		1	1		1	
<i>P. maliformis</i>		1	1	1	1		1	1
<i>P. giberti</i>	1	1		1		1	1	1
<i>P. caerulea</i>	1				1	1	1	
<i>P. alata</i>			1		1	1	1	
<i>P. misera</i>		1		1	1	1	1	
<i>P. foetida</i>			1	1	1	1	1	1

Tabela 16. Transferibilidade dos primers isolados de *P. alata* e *P. pohlii* para outras espécies de *Passiflora*

Espécie	Primer							
	P08BP2	A08FP1	A03AP3	P05GP2	P03FP2	A09DP1	A01BP3	P04AP2
<i>P. coriacea</i>		1		1			1	1
<i>P. suberosa</i>	1	1		1	1	1	1	1
<i>P. nitida</i>	1	1		1		1	1	1
<i>P. morifolia</i>	1	1		1	1	1		1
<i>P. incarnata</i>				1	1	1	1	
<i>P. cincinnata</i>		1			1			
<i>P. eichleriana</i>	1	1		1	1		1	1
<i>P. laurifolia</i>	1	1		1	1		1	
<i>P. mansoi</i>	1		1		1		1	1
<i>P. membranacea</i>	1	1		1	1	1	1	
<i>P. monadelphica</i>	1	1		1	1	1	1	1
<i>P. tenuifolia</i>	1	1		1	1		1	1
<i>P. actinia</i>	1	1			1	1	1	1
<i>P. capsularis</i>	1			1	1		1	
<i>Crossostemma laurifolia</i>		1			1		1	
<i>P. jillekii</i>	1	1			1	1	1	
<i>Paropsia edulis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Paropsia edulis</i>	1	1		1		1	1	1
<i>P. suberosa</i>		1					1	1
<i>P. mollissima</i>	1						1	
<i>P. misera</i>	1			1	1		1	1
<i>P. sidaefolia</i>	1	1		1	1			
<i>P. pohlii</i>		1		1	1		1	
<i>P. coccinea</i>		1		1	1			1
<i>P. palmeri</i>	1			1	1		1	1
<i>P. mucronata</i>	1		1	1			1	
<i>P. kermesina</i>	1	1	1	1			1	
<i>P. kermesina</i>	1	1	1		1			1
<i>P. kermesina</i>		1			1			
<i>P. organensis</i>		1		1	1			1
<i>P. organensis</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>P. organensis</i>	1	1			1			
<i>P. coriacea</i>	1		1					
<i>P. tricuspis</i>	1	1			1			
<i>P. auriculata</i>	1				1			
<i>P. jillekii</i>	1		1		1			
<i>P. setulosa</i>	1	1			1			1
<i>P. ischnoclada</i>		1			1			
<i>P. deidamioides</i>		1	1					
<i>P. villosa</i>		1	1					
<i>P. campanulata</i>	1	1	1					1
<i>P. mayarum</i>		1	1					

Tabela 16. Transferibilidade dos primers isolados de *P. alata* e *P. pohlii* para outras espécies de *Passiflora*

Espécie	Primer							
	P08BP2	A08FP1	A03AP3	P05GP2	P03FP2	A09DP1	A01BP3	P04AP2
<i>P. subrotunda</i>								1
<i>P. galbana</i>	1	1	1					1
<i>P. rumicifolia</i>	1	1	1					
<i>P. cissampeloides</i>	1	1						
<i>Barteria dewrevei</i>	1	1	1	1				
<i>Smeathmannia pubescens</i>	1	1		1				
<i>P. obtusifolia</i>	1	1						
<i>P. tenuispira</i>								
<i>Deidamia sp.</i>								

Tabela 16. Transferibilidade dos primers isolados de *P. alata* e *P. pohlii* para outras espécies de *Passiflora*

Espécie	Primer					
	P04AP2	A06FP1	A08GP1	A01FP3	P04FP2	A07FP1
<i>P. setacea</i>	1		1			
<i>P. morifolia</i>			1			
<i>P. miersii</i>		1	1	1	1	
<i>P. sanguinolenta</i>			1			
<i>P. tenuifila</i>			1			
<i>P. manicata</i>	1	1	1			
<i>P. loefgrenii</i>		1	1			
<i>P. quadrangularis</i>	1		1			
<i>P. coriacea</i>						
<i>P. serrato-digitata</i>						
<i>P. palmeri</i>	1	1	1	1		
<i>P. incarnata</i>		1		1	1	
<i>P. organensis</i>			1			
<i>P. quadrangularis</i>			1			
<i>P. tricuspis Pantanal</i>	1	1	1	1		
<i>P. tricuspis MG</i>	1					
<i>P. sidaefolia</i>	1					
<i>P. rubra</i>	1	1		1	1	
<i>P. edulis</i>	1	1		1	1	
<i>P. amethystina</i>	1	1			1	
<i>P. suberosa</i>		1			1	
<i>P. maliformis</i>	1	1	1	1	1	
<i>P. giberti</i>	1	1		1	1	1
<i>P. caerulea</i>						1
<i>P. alata</i>			1			1

Tabela 16. Transferibilidade dos primers isolados de *P. alata* e *P. pohlii* para outras espécies de *Passiflora*

Espécie	Primer					
	P04AP2	A06FP1	A08GP1	A01FP3	P04FP2	A07FP1
<i>P. morifolia</i>	1	1		1	1	1
<i>P. incarnata</i>		1		1	1	1
<i>P. cincinnata</i>						
<i>P. eichleriana</i>	1	1		1	1	
<i>P. laurifolia</i>		1		1	1	
<i>P. mansoi</i>	1		1			
<i>P. membranacea</i>		1		1	1	1
<i>P. monadelphica</i>	1	1		1	1	1
<i>P. tenuifolia</i>	1	1		1	1	1
<i>P. actinia</i>	1					1
<i>P. capsularis</i>		1		1	1	
<i>Crossostemma laurifolia</i>						
<i>P. jillekii</i>						1
<i>Paropsia edulis</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Paropsia edulis</i>	1	1		1		1
<i>P. suberosa</i>	1					
<i>P. mollissima</i>						
<i>P. misera</i>	1	1		1	1	
<i>P. sidaefolia</i>		1		1	1	
<i>P. pohlii</i>		1		1	1	
<i>P. coccinea</i>	1	1		1	1	
<i>P. palmeri</i>	1	1		1	1	
<i>P. mucronata</i>		1	1	1	1	
<i>P. kermesina</i>		1	1	1	1	
<i>P. kermesina</i>	1		1			
<i>P. kermesina</i>						
<i>P. organensis</i>	1	1				
<i>P. organensis</i>	1	1	1			
<i>P. organensis</i>						
<i>P. coriacea</i>			1			
<i>P. tricuspis</i>						
<i>P. auriculata</i>						
<i>P. jillekii</i>			1			
<i>P. setulosa</i>	1					
<i>P. ischnoclada</i>						
<i>P. deidamioides</i>			1			
<i>P. villosa</i>			1			
<i>P. campanulata</i>	1		1			
<i>P. mayarum</i>			1			
<i>P. ambigua</i>	1					
<i>P. subrotunda</i>	1					
<i>P. galbana</i>	1		1			

Tabela 16. Transferibilidade dos primers isolados de *P. alata* e *P. pohlii* para outras espécies de *Passiflora*

Espécie	Primer					
	P04AP2	A06FP1	A08GP1	A01FP3	P04FP2	A07FP1
<i>P. cissampeloides</i>					1	
<i>Barteria dewrevei</i>		1	1		1	
<i>Smeathmannia pubescens</i>		1			1	
<i>P. obtusifolia</i>						
<i>P. tenuispira</i>						
<i>Deidamia sp.</i>						

Com base na análise da Tabela 16 pode-se verificar que o *primer* A08FP1 foi capaz de amplificar a seqüência microssatélite correspondente para um número maior de espécies (Figura 14). Curiosamente, o *primer* A09DP1, também isolado de *P. alata*, amplificou a seqüência microssatélite esperada em apenas 17 espécies. Em média, os *primers* desenhados a partir de clones oriundos de fragmentos genômicos de *P. alata* amplificaram a seqüência repetida (SSR) em 35 espécies, enquanto os de *P. pohlii* amplificaram, em média, em 41,4 espécies. As taxas de transferibilidade são mostradas na Tabela 17.

Tabela 17. Taxas de transferibilidade observada para os *primers* isolados de *P. alata* e *P. pohlii* em espécies do gênero *Passiflora*

Primer	Transferibilidade (%)
A01BP3	63,75
A01FP3	38,75
A03AP3	37,50
A06FP1	48,75
A07FP1	23,75
A08FP1	78,75
A08GP1	37,50
A09DP1	21,25
P03FP2	60,00
P04AP2	45,00
P04FP2	41,25
P05GP2	46,25
P08BP2	66,25



É interessante notar que todos os *primers* construídos a partir de *P. pohlii* foram capazes de amplificar produtos de PCR em *P. alata*, porém o contrário não foi observado.

O desenvolvimento destes marcadores para *Passiflora* abre a possibilidade de estudos referentes à estrutura genética populacional possam ser realizados de forma mais eficiente. Estudos deste escopo são muito importantes para o gênero, sobretudo aqueles relacionados a fluxo gênico, uma vez que as populações de *Passiflora* caracterizam-se pelo seu tamanho reduzido e baixa densidade, o que traz profundas implicações na dinâmica populacional e evolutiva do gênero, além de auxiliar no estabelecimento de estratégias de conservação de germoplasma.

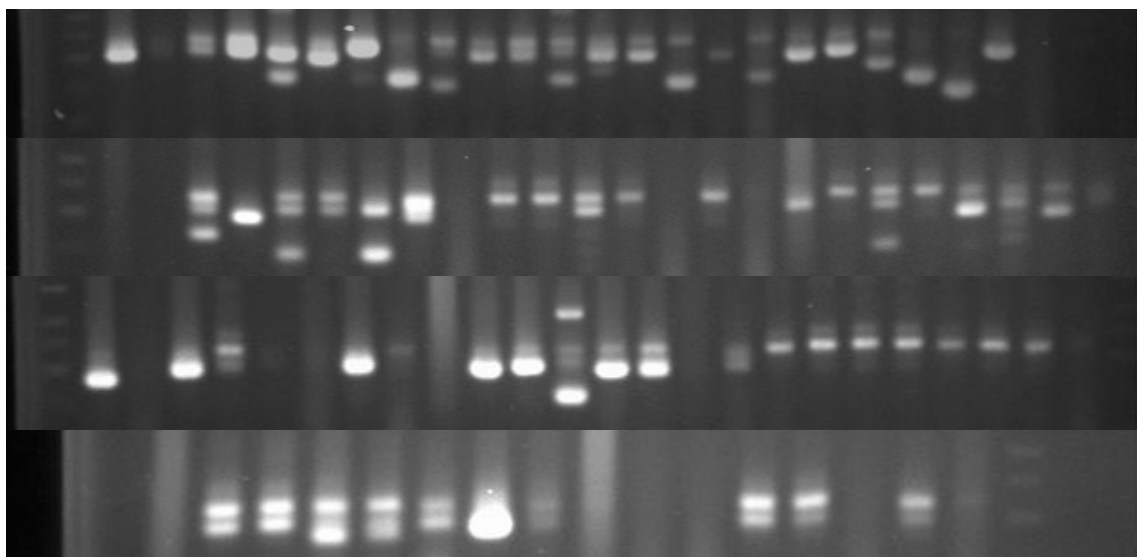


Figura 14 - Géis de agarose 2,5% mostrando a amplificação do loco de microssatélite definido pelo *primer* A08FP1. A ordem das espécies, desconsiderando a primeira e última canaletas é apresentada na Tabela 17

Tabela 17. Ordem das espécies de *Passiflora* cujos microssatélites forma detectados conforme mostra o gel da Figura 14

Código	Espécie
1	<i>P. setacea</i>
2	<i>P. morifolia</i>
3	<i>P. miersii</i>
4	<i>P. sanguinolenta</i>
5	<i>P. tenuifila</i>
6	<i>P. manicata</i>
7	<i>P. loefgrenii</i>
8	<i>P. quadrangularis</i>
9	<i>P. coriacea</i>
10	<i>P. serrato-digitata</i>
11	<i>P. palmeri</i>
12	<i>P. incarnata</i>
13	<i>P. organensis</i>
14	<i>P. quadrangularis</i>
15	<i>P. tricuspis</i> (Pantanal)
16	<i>P. tricuspis</i> (MG)
17	<i>P. sidaefolia</i>
18	<i>P. rubra</i>
19	<i>P. edulis</i>
20	<i>P. amethystina</i>
21	<i>P. suberosa</i>
22	<i>P. maliformis</i>
23	<i>P. giberti</i>
24	<i>P. caerulea</i>
25	<i>P. alata</i>
26	<i>P. misera</i>
27	<i>P. foetida</i>
28	<i>P. quadrangularis</i>
29	<i>P. coriacea</i>
30	<i>P. suberosa</i>
31	<i>P. nitida</i>
32	<i>P. morifolia</i>
33	<i>P. incarnata</i>
34	<i>P. cincinnata</i>
35	<i>P. eichleriana</i>
36	<i>P. laurifolia</i>
37	<i>P. mansoi</i>
38	<i>P. membranacea</i>
39	<i>P. monadelphica</i>
40	<i>P. tenuifila</i>
41	<i>P. actinia</i>
42	<i>P. capsularis</i>

Tabela 17. Ordem das espécies de *Passiflora* cujos microssatélites forma detectados conforme mostra o gel da Figura 14

Código	Espécie
43	<i>Crossostemma laurifolia</i>
44	<i>P. jillekii</i>
45	<i>Paropsia edulis</i>
46	<i>Paropsia edulis</i>
47	<i>P. suberosa</i>
48	<i>P. mollissima</i>
49	<i>P. misera</i>
50	<i>P. sidaefolia</i>
51	<i>P. pohlii</i>
52	<i>P. coccinea</i>
53	<i>P. palmeri</i>
54	<i>P. mucronata</i>
55	<i>P. kermesina</i>
56	<i>P. kermesina</i>
57	<i>P. kermesina</i>
58	<i>P. organensis</i>
59	<i>P. organensis</i>
60	<i>P. organensis</i>
61	<i>P. coriacea</i>
62	<i>P. tricuspis</i>
63	<i>P. auriculata</i>
64	<i>P. jillekii</i>
65	<i>P. setulosa</i>
66	<i>P. ischnoclada</i>
67	<i>P. deidamioides</i>
68	<i>P. villosa</i>
69	<i>P. campanulata</i>
70	<i>P. mayarum</i>
71	<i>P. ambigua</i>
72	<i>P. subrotunda</i>
73	<i>P. galbana</i>
74	<i>P. rumicifolia</i>
75	<i>P. cissampeloides</i>
76	<i>Barteria dewrevei</i>
77	<i>Smeathmannia pubescens</i>
78	<i>P. obtusifolia</i>
79	<i>P. tenuispira</i>
80	<i>Deidamia sp.</i>

## 5. CONCLUSÕES

- A atual classificação botânica de *Passiflora*, considerando-se taxa supra-específicos parece não refletir grupos monofiléticos;
- O subgênero *Dysosmia* abriga um conjunto de espécies com características únicas dentro do gênero, além de características intermediárias entre os dois principais subgêneros de *Passiflora*: *Decaloba* e *Passiflora*;
- Índícios mostram que o número básico de cromossomos do gênero é  $x = 9$ ;
- A proposta de divisão do gênero em apenas quatro subgêneros é respaldada por observações filogenéticas, com fortes evidências de que *Deidamioides* seja um destes subgêneros;
- A origem de *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. por mutações em *P. edulis* parece ser bem mais verossímil que a origem por hibridação;
- O dendrograma gerado pela análise morfométrica revelou uma forte similaridade com a atual classificação botânica aceita para o gênero, mostrando a eficiência do método, além de mostrar o apelo cladístico, uma vez que a forma das folhas e seu padrão de nervação foram eficazmente descritos pela curva de dimensão fractal multiescala

- Por refletir claramente o relacionamento filogenético entre as espécies, as características foliares, formato e padrão de nervação, podem ser utilizadas em estudos desta natureza, bem como em sistemática e ecologia;
- Considerando o grupo de espécies *P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. coriacea*, *P. foetida*, *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. miersii*, *P. organensis*, *P. pohlii* e *P. suberosa* não foi possível confirmar a hipótese de que a variação no formato das folhas de *Passiflora* constitui uma estratégia de escape contra o ataque de borboletas da tribo *Heliconiinae*.
- Os resultados indicam que, possivelmente, exista uma pressão seletiva sobre o formato das folhas em *Passiflora*, uma vez que a correlação entre distâncias patrísticas e morfométricas mostra-se significativa; baixos valores desta correlação indicam que um outro componente, a inércia filogenética, é o principal determinante do formato das folhas.
- Os pares de *primers* desenhados para amplificar locos de microsatélites são transferíveis dentro do gênero *Passiflora* e da família *Passifloraceae*;
- Os altos níveis de transferibilidade indicam uma distância genética não muito grande entre as espécies, mostrando que a diversificação do gênero se deu num passado um tanto quanto recente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A BIBLIOTECA VIRTUAL DO ESTUDANTE BRASILEIRO. Frutas no Brasil: maracujá.  
www.bibvirt.futuro.usp.br (10 jul. 2003).
- BAKKER, F. T.; CULHAM, A.; GOMEZ-MARTINEZ, R.; CARVALHO, J.; COMPTON, J.;  
DAWTREY, R.; GIBBY, M. Patterns of Nucleotide Substitution in Angiosperm  
cpDNA trnL (UAA)–trnF (GAA) Regions. **Molecular Biology and Evolution** v. 17,  
p.1146-1155. 2000.
- BAUM, B. R.; JOHNSON, D. A. The 5S rRNA gene units in ancestral two-rowed barley  
(*Hordeum spontaneum* C. Koch) and bulbous barley (*H. bulbosum* L.): sequence  
analysis and phylogenetic relationships with the 5S rDNA units of cultivated barley  
(*H. vulgare* L.). **Genome**, v.39, p.140–149. 1996.
- BENSON, G. Tandem *repeats* finder: a program to analyze DNA sequences. **Nucleic  
Acids Research**, v.27, n. 2, p. 573-580, 1999.
- BENSON, W. W.; BROWN, K. S.; GILBERT, L. E. Coevolution of plants and herbivores:  
passion flowers butterflies. **Evolution**, v29, p.659-680, 1975.
- BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D. Maracujá-doce: o  
autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (*Passifloraceae*). **Revista  
Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.355-356. 2003.
- BOWDEN W. M. A list of chromosome numbers in higher plants. II. Menispermaceae to  
Verbenaceae. **American Journal of Botany**, v. 32 p.191-201, 1945.

- BRINKMAN, F. S. L.; LEIPE, D. D. Phylogenetic analysis. pp. 323-358. In: A.D. BAXEVANIS; OUELLETTE, B.F.F. (Ed.), **Bioinformatics**: a practical guide to the analysis of genes and proteins. Nova York: John Wiley & Sons, 2001. cap. 14, p. 323-358.
- BRINKMANN, B.; KLINTSCHAR, M.; NEUHUBER, F.; HUHNE, J.; ROLF, B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. **American Journal Human Genetics**, v. 62, p.1408–1415. 1998.
- BRONDANI, R.P.V.; BRONDANI, C.; TARCHINI, R.; GRATTAPAGLIA, D. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 5-6, p.816-827. 1998.
- BRUCKNER, C.H. Auto-incompatibilidade no maracujá (*P. edulis* Sims). Viçosa, 1994. 85p. Tese (Doutorado)- Unversidade Federal de Viçosa.
- BRUNO, O. M., CESAR JR, R. M., CONSULARO, L. A., COSTA, Luciano da Fontoura Synergos - Synergetic Vision Research. **Real-Time Systems**, v.21, p.7 - 42, 2001.
- BRUNO, O. M., COSTA, L. F. Lessons from an Optical Illusion — On Nature and Nurture, Knowledge and Values. **Neurocomputing**, v.41, n.1-4, p.183-185, 2001.
- CARLIN, M. Measuring the complexity of non-fractal shapes by a fractal method. **Pattern Recognition Letters**, v. 21, p.1013-1017, 2000.
- CERVI, A.C. **Passifloraceae**: flora do Estado de Goiás. Goiânia: Imprensa UFGO, 1986. p.1-45 (Coleção Rizzo, 7).

- CIPRIANI, G.; LOT, G.; HUANG, W.G.; MATARAZZO, M.T.; PETERLUNGER, E.; TESTOLIN, R. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch]: isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, n. 1-2, p.65-72, 1999.
- COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, v.83, n.6, p.748-756, 1999.
- CONDIT, R.; HUBBEL, S. P. Abundance and dna-sequence of 2-base *repeat* regions in tropical tree genomes. **Genome**, v.34, n.1, p.66-71, 1991.
- CONSULARO, L. A. Técnica de Mineração de dados para Análise de Imagens. São Carlos, 2000. 236p. Tese (Doutorado) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo.
- COSTA, L. F., MANOEL, E. T. M., FAUCEREAU, F., CHELLY, J., VAN PELT, J.; RAMAKERS, G. A Shape Analysis framework for neuromorphometry. **Network**, v.13, n.3, p.283-310. 2002.
- CREGAN, P.B.; MUDGE, J.; FICKUS, E.W.; MAREK, L.F.; DANESH, D.; DENNY, R.; SHOEMAKER, R.C.; MATTHEWS, B.F.; JARVIK, T.; YOUNG, N.D. Targeted isolation of simple sequence repeat markers through the use of bacterial artificial chromosomes. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.919-928, 1999.
- CROW, J. F.; KIMURA, M. **An introduction to population genetics theory**. Minneapolis: Burgess, 1970. 591 p.



- CUCO, S. M.; MONDIN, M.; VIEIRA, M. L. C.; AGUIAR-PERECIN, M. L. R. Comparative analysis of the karyotype of three *Passiflora* species and cytogenetic characterization of somatic hybrids by fluorochrome banding and physical mapping of 45S and 5S rDNA loci. 2004. (submetido)
- CUMMINGS, C. J.; ZOGHBI, H. Y. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. **Human Molecular Genetics**, v.9, n.6, p.909-916, 2000.
- DAYANADAN, S.; BAWA, K.S.; KESSELI, R. Conservation of microsatellites among tropical tree (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v.84, n.12, p.1658-1663. 1997.
- DAYANADAN, S.; DOLE, J.; BAWA, K.; KESSELI, R. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Molecular Ecology**, v.8, n.10, p.1585-1592, 1999.
- d'EECKENBRUGGE, G. C. Exploração da diversidade genética de *Passifloras* (compact disc) – In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 6., Campos de Goytacazes : UENF, 2003.
- DEGENER, O. **Flora Hawaiiensis**, Book I, Honolulu. 1933.
- DI RIENZO, A.; PETERSON, A.C.; GARZA, J.C.; VALDES, A.M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N.B. Mutational processes of simple-sequence repeat locos in human populations. **Proceeding of the National Academy of Science**, v.91, p.3166-3170, 1994.
- DOUGHERTY, G.; HENEBRY, G. M. Fractal signature and lacunarity in the measurement of the texture of trabecular bone in clinical CT images. **Medical Engineering & Physics**, v.23, p.369-380. 2001.

- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA leaf material. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1988.
- DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, v.131, p.900-910, 2003.
- DUDA, R. O.; HART, P. E.; STORK, D. G. **Pattern Classification and Scene Analysis**. New York: Wiley & Sons, 1973. 283p.
- ELLEGREN, H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. **Trends in Genetics**, v.16, p.551-558, 2000.
- ESTOUP, A.; COURNET, J.M.; ROUSSET, F.; GUYOMARD, R. Juxtaposed microsatellite systems as diagnostic markers for admixture: theoretical aspects. **Molecular Biology and Evolution**, v.16, p.898-908, 1999.
- FAJARDO, D.; ANGEL, F.; GRUM, M.; TOHME, J.; LOBO, M.; ROCA, W. M.; SANCHEZ, I. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. **Euphytica**, v.101, p.341-347, 1998.
- FIELD, D.; WILLS, C. Long polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proceeding of the Royal Society of London**. Series B, v.263, p.209-215, 1996.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Agrianual 2004**: Anuário de Agricultura Brasileira. São Paulo, 1998. 535p.
- GAIOTTO, F.A.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite markers for heart of palm - *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, v.1, n.1-2, p.86-88, 2001.

- GARNER, T.W.J.; ANGELONE, S.; PEARMAN, P.B. Genetic depletion in Swiss populations of *Rana latastei*: conservation implications. **Biological Conservation**, v.114, n.3, p.371-376, 2003.
- GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites**: evolution and applications, London: Oxford University, 1999, 352p.
- HENTSCHEL, C. C. Homocopolymer sequences in the spacer of a sea urchin histone gene *repeat* are sensitive to S1 nuclease. **Nature**, v.295, p.714–716, 1982.
- ISAGI, Y.; SUHANDONO, S. PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. **Molecular Ecology**, v.6, n.9, p.897, 1997.
- JANSEN RK, WALLACE RS, KIM KJ, *et al.* Systematic implications of chloroplast DNA variation in the subtribe Microseridinae (Asteraceae, Lactuceae). **American Journal of Botany**, v.78, n.8, p.1015-1027, 1991.
- JØRGENSEN, P.M.; LAWESSON, J. E.; HOLM-NIELSEN, L. B. A guide to collecting Passionflowers. **Annals Missouri Botanical Garden**, v.71, n.4, p.1172-1174, 1984.
- JUKES, T. H.; C. R. CANTOR. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H. N. (Ed.), **Mammalian Protein Metabolism**, New York: Academic Press, 1969. p.21-132.
- KELCHNER, S.A. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. **Annals of Missouri Botanical Garden**, v.87, n.4, p.482-498, 2000.
- KILLIP, E.P. The american species of *Passifloraceae*. **Publications of the Field Museum of Natural History**, v.19, p.1-613, 1938.

- KIMURA, M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.78, p.454-458, 1981.
- KNAPIK, E.W.; GOODMAN, A.; EKKER, M. *et al.* A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). **Nature Genetics**, v.18, p.338–343, 1998.
- KROSNICK, S. E.; J. V. FREUDENSTEIN. Phylogenetic relationships in *Passiflora* supersection *Disemma*. In: THE AMERICAN SOCIETY OF PLANT TAXONOMISTS MEETING, 5, Madison, 2002. **Resumos**. Madison: Oxford Press, 2002. p.45.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. **Bioinformatics**, 2001 /no prelo/
- LANAVE, C., PREPARATA, G., SACCONI, C., SERIO, G. A new method for calculating evolutionary substitution rates. **Journal of Molecular Evolution**, v.20, p. 86-93, 1984.
- LEITÃO FILHO, H. F.; ARANHA, C. Botânica do maracujazeiro. In: SIMPÓSIO DA CULTURA DO MARACUJÁ, Campinas, 1974. **Anais**. Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 1974, p.13.
- LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular and Biology Evolution**, v.4, p.203-221, 1987.
- LILLANDT, B.-G.; BENSCH, S.; HANSSON, B.; WENNERBERG, L; VON SCHANTZ, T. Isolation and cross-species amplification of microsatellite loci in the Siberian jay (*Perisoreus infaustus*). **Hereditas**, v.137, p.157-160, 2002.
- LIO, P.; GOLDMAN, N. Using protein structural information in evolutionary inference: transmembrane proteins. **Molecular Biology Evolution**, v.16, n.12, p.1696-710, 1999.

- LIU, ZW; BIYASHEV, M.R.; SAGHAI-MAROOF, M.A. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley genetic linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.869-876, 1996.
- LÖFGREN, A. **Manual das Familias Naturaes Phanerogamas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1917. 611p.
- LOPES, S. C. Citogenética do maracujazeiro – *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A. B. (Ed.) **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista, UFBA, 1994. p.19-23.
- LÓPEZ, F. M., VÍLCHEZ-CABRERIZO, M. A.; HIDALGO-ÁLVAREZ, R. An improved method to estimate the fractal dimension of physical fractals based on the Hausdorff definition. **Physica A**, v.298, p.387-399. 2001.
- MA, H. ; DEPAMPHILIS, C. The ABCs of flower evolution. **Cell**, v.101, p.5-8. 2000.
- MADDISON, W.P.; M.J. DONOGHUE; D.R. MADDISON. Outgroup analysis and parsimony. **Systematic Zoology**, v.33, p.83-103.1984.
- MAHADEVAN, M.; TSILFIDIS, C.; SABOURIN, L.; SHUTLER, G.; AMEMIYA, C.; JANSEN, G.; NEVILLE, C.; NARANG, M.; BARCELO, J.; O'HOY, K.; LEBLOND, S.; EARLE- MACDONALD, J.; DE JONG, P.J.; WIERINGA, B. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 38 untranslated region of the gene. **Science**, v.255, p.1253–1258, 1992.
- MANDELBROT, B. B. **The Fractal Geometry of Nature**. New York: Freeman. 1983. 468p.
- MARTIN, F. W.; NAKASONE, H. Y. The edible species of *Passiflora*. **Economical Botany**, v.24, p.333-343, 1970.

- MATHEWS, S.; R. A. SHARROCK. Phytochrome gene diversity. **Plant Cell Environment**, v.20, p.666-671, 1997.
- MCLELLAN, T.; ENDLER, J. A. The relative success of some methods for measuring and describing the shape of some complex objects. **Systematic Biology**, v.47, n. 2, p.264-281, 1998.
- MELO, N. F., CERVI, A. C., GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (*Passifloraceae*). **Plant Systematics and Evolution**, v. 226, n.1-2, p.69 - 84, 2001.
- MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, v.92, n.309-316, 2003.
- METZGAR, M.; BYTOF, J.; WILLS, C. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. **Genome Research**, v.10, p.72-80, 2000.
- MEYER, D. **Árvores Evolutivas Humanas**: uma discussão sobre inferência filogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1995. 158p.
- MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S. R. (Ed.) **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 156p.
- MONTEIRO, L. R.; REIS, S. F. **Princípios de Morfometria Geométrica**. Ribeirão Preto: Holos, 1999. 198p.
- MOORE, S.S.; SARGEANT, L.L.; KING, T.J.; MATTICK, J.S.; GEORGES, M.; HETZEL, J.S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v.10, p.654–660, 1991.

- MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v.30, p.194-200, 2002.
- MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. **The Plant Journal**, v.3, p.175-182, 1993.
- MOXON, R.; WILLS, C. DNA Microsatellites: Agents of Evolution? **Scientific American**, v. 280, n.1, p. 94-99. 1999.
- MUSCHNER, V. C.; LORENZ, A. P.; CERVI, A. C.; BONATTO, S. L.; SOUZA-CHIEZ, T. T. ; SALZANO, F. M.; FREITAS, L. B. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, v.90, n.8, p.1229-1238, 2003.
- NILCEU, A. M.; COSTA, L. F.; LOTUFO, R. A.; VELASTIN, S. A. Estimating Crowd Density With Minkowsky Fractal Dimension. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ACOUSTICS, SPEECH AND SIGNAL PROCESSING, Phoenix, 1999. **Resumos**. Phoenix: ICASSP, 1999. p.45.
- ODLAND, M. L.; NOLL, C. J. The utilization of cross-compatibility and self-incompatibility in the production of F<sub>1</sub> hybrid cabbage. **Proceedings of the American Society of Horticultural Science**, v. 55. p. 391-402. 1950.
- OLIVEIRA, G. C. X. A molecular phylogenetic analysis of *Oryza* L. Based on chloroplast DNA sequences. Saint Louis, 2003. 251p. Thesis (Ph.D.) – Washington University.
- OLMSTEAD, R. G.; J. D. PALMER. Chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis. **American Journal of Botany**, v.81, p.1205-1224, 1994.

- OLMSTEAD, R. G. Phylogeny, phenotypic evolution, and biogeography of the *Scutellaria angustifolia* complex: Inferences from morphological and molecular data. **Systematic Botany**, v.14, p.320–338, 1989.
- OLMSTEAD, R. G.; SWEERE, J. A.; SPANGLER, R. E.; BOHS, L; PALMER, J. D. Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. In: NEE, M; SYMON, D. E.; JESSUP, J. P.; HAWKES, J. G. (Eds.) **Solanaceae IV**, advances in biology and utilization. Kew, Royal Botanic Gardens, 1999. p.111-137.
- PAPOULIS, A. **The Fourier Integral and Its Applications**. McGraw-Hill Higher Education, New York. 1962.
- PAYÁN F. R.; MARTIN, F. W. Barriers to the hybridization of *Passiflora* species. **Euphytica**, v.24, p.709-716, 1975.
- SÃO PAULO (Estado). Secretaria da Agricultura. **A cultura do maracujá**. São Paulo, 1996. 105 p. (Boletim Técnico, 5)
- POPE, W. T. The edible passion fruit in Hawaii. **Hawaii Agricultural Experiment Station Circular**, v.88, p.1-18. 1935.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v.14, p.817-818, 1998.
- POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, v.2, p.225-238, 1996.
- PRIMMER CR, MERILÄ J. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in Ranid frogs. **Conservation Genetics**, v.3, p.445–449, 2002.



- PRIMMER, C.R.; MØLLER, A.P.; ELLEGREN, H. A wide-ranging survey of cross-species amplification in birds. **Molecular Ecology**, v.5, p.365–378, 1996.
- PRINCE, K. L.; GLENN T. C.; DEWEY, M. J. Cross-species amplification among peromyscines of new microsatellite DNA loci from the oldfield mouse (*Peromyscus polionotus subgriseus*). **Molecular Ecology Notes**, v.2, n.2, 133, 2002.
- PRYER, K.M., SCHNEIDER, H.; ZIMMERJ, E. A.; BANKS, A. Deciding among green plants for whole genome studies. **Trends in Plant Science**, v.7, p.550-554, 2002.
- RÊGO MM, BRUCKNER CH, SILVA EAM, FINGER FL, SIQUEIRA DL, FERNANDES AA Self-incompatibility in passionfruit: evidence of two locus genetic control. **Theoretical and Applied Genetics**, v.98, p.564-568, 1999.
- ROA, A. C.; CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; DUQUE, M.C.; MAYA, M.M.; BONIERBALE, M.W.; IGLESIAS, C.; TOHME, J. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, v.87, n.11, p.1647-1655, 2000.
- RODRIGUES, F., OLIVER, J., MAR'N, A.; MEDINA, J. The general stochastic model of nucleotide substitution. **Journal of Theoretical Biology**, v.142, p.485-501, 1990.
- ROHLF, F. J. Morphometrics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.21, p.299-316, 1990.
- RUGGIERO, C. Alguns fatores que podem influenciar na frutificação. In: RUGGIERO, C. **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: FUNEP, 1987. p.76-85.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, n.4, p.406-425, 1987.

- SÁNCHEZ, I.; ANGEL, F.; GRUM, M.; DUQUE, M. C.; LOBO, M.; TOHME, J.; ROCA, W. Variability of chloroplast DNA in the genus *Passiflora* L. **Euphytica**, v.106, p.15-26, 1999.
- SCHLÖTTERER C, TAUTZ D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, v.20, n.2, p.211-215, 1992.
- SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromossoma*, v.109, p.365-371, 2000.
- SCHLOTTERER, C. Microsatellites. In: HOEZEL, A. R. (Ed.). **Molecular Genetic Analysis of Populations**, Oxford: Oxford University Press, 1998. p.237-261.
- SCHLÖTTERER, C.; AMOS, B.; TAUTZ, D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. **Nature**, v.354, p.63–65, 1991.
- SCHLOTTERER, C.; HARR, B. *Drosophila virilis* has long and highly polymorphic microsatellites. **Molecular Biology and Evolution**, v.17, n.11, p.1641-1646 2000.
- SCHROEDER, M. **Fractals, chaos, power laws: minutes from an infinite paradise**. New York: W. H. Freeman, 1996, 429p.
- SCHUG, M. D. ; WETTERSTRAND, K. A.; GAUDETTE, M. S.; LIM, R. H.; HUTTER, C. M.; AQUADRO, C. F. The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Ecology**, v.7, p.57-70, 1998.
- SCHULER, G.D.; BOGUSKI, M.S.; STEWART, E.A. A gene map of the human genome. **Science**, v.274, p.540–546, 1996.

- SEGURA S.D.; COPPENS D'EECKENBRUGGE G.; OCAMPO C.H.; OLLITRAULT P  
Isozyme variation in *Passiflora* subgenera Tacsonia and Manicata. Relationships  
between cultivated and wild species. **Genetic Resources and Crop Evolution**,  
v.50, n.4, p.417-427, 2003.
- SEGURA, S.D.; COPPENS D'E., G.; BOHÓRQUEZ, A.; OLLITRAULT, P.; TOHME M.,  
J.. An AFLP diversity study of the genus *Passiflora* focusing on subgenus *Tacsonia*.  
**Genetic Resources and Crop Evolution**, v.49, n.2, p.111-123, 2002.
- SERRA, C. P., KARAS, E. W. **Fractais gerados por sistemas dinâmicos  
complexos**. Curitiba: Champagnat, 1997, 190p.
- SERRA, J. **Image Analysis and Mathematical Morphology**. London: Academic  
Press, 1982. 600 p.
- SNEATH, P. H. A.; SOKAL R. R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco: Freeman.  
1973. 573p.
- SOARES-SCOTT, M. D. Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos  
interespecíficos de *Passiflora*. Campinas, 1998. 126p. Dissertação (M.S.)-  
UNICAMP.
- SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Applying the bootstrap in phylogeny reconstruction.  
**Statistical Science**, v.18, p.256–267, 2003.
- SOUSA, J. S. I.; MELETTI, L. M . M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**.  
Piracicaba: FEALQ, 1997, 179p.
- SOUZA, M. M., PEREIRA, T. N. S., HASBACH, G. P., VIANA, A.. P.; PEREIRA, M. G.  
Variação no conteúdo de DNA nuclear em espécies de *Passiflora* por citometria de  
fluxo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS,  
Goiânia, 2001. **Resumos**. Goiânia: UFG, 2001. p.101-104.

- SPOONER, D. M.; ANDERSON, G. J.; JANSEN, R. K. Chloroplast DNA evidence for the interrelationships of tomatoes, potatoes and pepinos (Solanaceae). **American Journal of Botany**, v. 80, p.676-688, 1993.
- STALLINGS, R.L. Distribution of trinucleotide microsatellites in different categories of mammalian genomic sequence: Implication for human genetic diseases. **Genomics**, v.21, p.116–121, 1994.
- STEBBINS, G. L. **Variation and evolution in plants**. New York: Columbia University Press, 1950, 643p.
- STEINKELLNER, H.; LEXER, C.; TURETSCHKEK, E.; GLOSSL, J. Conservation of (GA)(n) microsatellite loci between *Quercus species*. **Molecular Ecology**, v.6, n.12, p.1189-1194, 1997.
- STRAND, M.; PROLLA, T.A.; LISKAY, R.M.; PETES, T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, v.365, p.274-276, 1993.
- STREISINGER, G.; OWEN, J.E. Mechanisms of spontaneous and induced frameshift mutation in bacteriophage T4. **Genetics**, v.109, p.633–659, 1985.
- SUASSUNA, T. M. F.; BRUCKNER, C.; CARVALHO, C.; BORÉM, A. Self-incompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. **Theoretical and Applied Genetics**, v.106, p.298-302, 2003 .
- SWOFFORD, D. L. **PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods)**. Versão 4. Sunderland: Sinauer Associates. 2003.

- SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDELL, P. G.; HILLIS, D. M. Phylogenetic Inference. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. (eds.). **Molecular Systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. p. 407-514.
- TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J. Universal primers for amplification of 3 noncoding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**, v.17, n.5, p.1105-1109, 1991.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, p.512-526, 1993.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.6463-6471, 1989.
- TAVARE, S. Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. **Lectures Mathematics Life Sciences**, v.17, p.57-86, 1996.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.15, p.4876-4882. 1997.
- TOTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, v.10, n.7, p.967-981, 2000.
- TRICOT, C. **Curves and Fractal Dimension**. New York: Springer-Verlag. 1995, 323p.
- VANDERPLANK, J. **Passionflowers**. Cambridge: MIT. 2000. 224p.

- VIEIRA, M. L. C.; BARBOSA, L. V.; MAYEDA, L. Y. Citogenética dos maracujazeiros (*Passiflora* spp.). In: LIMA, A. A.; CUNHA, M. A. P (eds.) **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004 /No prelo/.
- VIEIRA, M. L. C. Hibridação somática em plantas- A importância das espécies selvagens como fonte de genes. [http://www.biotechnologia.com.br/3hp\\_12.htm](http://www.biotechnologia.com.br/3hp_12.htm) (12 Out. 2002).
- WATERS, E., VIERLING, E. Chloroplast small heat shock proteins: Evidence for atypical evolution of an organelle-localized protein. **Proceedings National Academy of Sciences**, v.96, p.14394-14399, 1999.
- WEBER, J.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Human Molecular Genetics**, v.2, p.1123–1128. 1993.
- WHITE, G.; POWELL, W. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. **Molecular Ecology**, v.6, n.9, p.851-860, 1997.
- YOCKTENG, R.; NADOT, S. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (ncpGS). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.31, n.1, p.379-396, 2004.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v.11, p.1-16. 2002.
- ZHARKIKH A. Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.39, p.315-329, 1994.

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO, J.B.; BRONDANI, C.; VENCOVSKY, R.  
Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus*, spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, v.2, n.4, p.512-513, 2002.